

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Royer-Pokora

**Molekularzytogenetischer Nachweis
varianter 8q24-Translokationen bei
der akuten lymphatischen Leukämie
vom Burkitt-Typ**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Daniele Fiore

2011

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Harald Rieder
Korreferent: Prof. Dr. med. Ulrich Germing

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Die akute lymphatische Leukämie (ALL) vom Burkitt-Typ	5
1.1.1	Vorbemerkung.....	5
1.1.2	Definition.....	6
1.1.3	Morphologie, Immunologie und Zytochemie.....	7
1.1.4	Krankheitsbild.....	9
1.1.5	Ätiologie und Inzidenz.....	10
1.1.6	Therapie und Prognose.....	12
1.1.7	Aktuelle Therapiestudien.....	12
1.2	Genetische Grundlagen der 8q24/MYC-Translokationen	13
1.2.1	Zytogenetik.....	13
1.2.2	Molekulargenetik.....	15
1.2.2.1	<i>Genetische Grundlagen der Antikörpervielfalt</i>	15
1.2.2.2	<i>Die 8q24/MYC-Translokation</i>	16
1.2.2.3	<i>c-MYC</i>	17
1.2.3	Zusätzliche chromosomale Veränderungen der B-ALL.....	18
1.3	Nachweismethoden der 8q24-Translokationen	19
1.3.1	Konventionelle Bänderungszytogenetik.....	19
1.3.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	20
1.3.3	Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH).....	21
1.4	Fragestellung	22
2	Patienten und Kontrollen	24
2.1	Patienten	24
2.1.1	Fallzahlen und Diagnosen.....	24
2.2	Kontrollen	26
2.2.1	Beschreibung des Kontrollgruppenkollektivs.....	26

3	Material und Methoden	27
3.1	Beschreibung der eingesetzten Materialien	27
3.1.1	Patientenproben.....	27
3.1.2	Kontrollproben.....	27
3.1.3	DNA-Sonden.....	27
3.1.3.1	<i>Sonden für den c-MYC-Lokus</i>	27
3.1.3.2	<i>Sonden für die Ig-Leichtketten-Loci λ und κ</i>	28
3.1.4	Auflistung der verwendeten Materialien	30
3.2	Technik der lokusspezifischen Chromosomendarstellung	30
3.2.1	Grundlagen der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	30
3.2.2	Aufarbeitung der Kontrollproben.....	31
3.2.2.1	<i>Chromosomenpräparation aus Blutlymphozyten</i>	31
3.2.3	Aufarbeitung des Patientenmaterials.....	33
3.2.3.1	<i>Probenentnahme und Transport</i>	33
3.2.3.2	<i>Zellkulturen</i>	34
3.2.3.3	<i>Chromosomenpräparation</i>	35
3.2.4	Extraktion von Plasmid-DNA aus E.coli zur Sondengewinnung.....	37
3.2.5	Untersuchung der 8q24-Translokationen mittels DNA-Sonden.....	42
3.2.5.1	<i>Markierung der DNA durch Nick-Translation</i>	42
3.2.5.2	<i>Vorbereitung der Objektträger</i>	45
3.2.5.3	<i>Vorbereitung der Chromosomen</i>	46
3.2.5.4	<i>Vorbereitung der Sonden und In-Situ-Hybridisierung</i>	47
3.2.5.5	<i>Waschung der Hybridisierung</i>	51
3.2.6	Auswertung einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	52
3.2.6.1	<i>Fluoreszenz-mikroskopische Auswertung</i>	52
3.2.6.2	<i>Statistische Auswertung</i>	53
3.3	Referenzuntersuchungen der varianten 8q24-Translokationen	54
3.3.1	Konventionelle Bänderungszytogenetik.....	54

4	Ergebnisse	56
4.1	Methodische Ergebnisse der FISH-Technik	56
4.1.1	Extraktion aus E.coli und Etablierung der Sonden für die Ig-Leichtketten- Loci und den c-MYC-Lokus.....	56
4.1.2	Verwendung der Leichtkettensonden in Kombination mit kommerziellen Sonden für den c-MYC-Lokus.....	58
4.1.3	Berechnung des Cut-Off-Levels anhand der Kontrollgruppe.....	59
4.1.4	Hybridisierungseffizienz in Kontrollen und archiviertem Patientenmaterial.....	60
4.2	Ergebnisse der Untersuchung an ALL-Patienten	61
4.2.1	Untersuchung der Fälle auf die Variant-Translokationen.....	61
4.2.2	Ergebnisübersicht der FISH-Analyse.....	86
4.3	Gegenüberstellung der Ergebnisse aus FISH und Bänderungszyto- genetik	89
5	Diskussion	91
5.1	Bewertung der Ergebnisse	91
5.2	Herstellung von DNA-Sonden durch Extraktion aus E.coli	92
5.3	Effizienz der DNA-Sonden und der Hybridisierung	93
5.3.1	Rate an Igκ-myc/Igλ-myc Fusionssignalen in der Kontrollgruppe.....	93
5.3.2	Falsch positive FISH-Befunde bei ALL-Patienten.....	94
5.4	Qualitätsverlust der FISH-Analyse in Abhängigkeit der Lagerungs- periode der Proben	96
5.5	Vergleich der Methoden und ihrer Einflussfaktoren	97
6	Zusammenfassung	103
7	Literatur	106

8	Anhang	118
8.1	Materialverzeichnis	118
8.2	Darstellung des Patientenkollektivs	119
9	Lebenslauf	120
10	Akademische Lehrer	121
11	Danksagung	122
12	Ehrenwörtliche Erklärung	123

1 Einleitung

1.1 Die akute lymphatische Leukämie vom Burkitt-Typ

1.1.1 Vorbemerkung

Hinter dem Begriff der Leukämie verbirgt sich ein weites Erkrankungsfeld mit weitreichenden klinischen Zusammenhängen, zu deren Erfassung unterschiedliche Klassifikationsschemata Anwendung gefunden haben. So besetzen natürlich auch die akuten lymphatischen Leukämien (ALL) ihren festen Platz innerhalb dieser Klassifikationen. Eine Abgrenzung untereinander als auch von verwandten Krankheiten sollte klinisch wie labordiagnostisch in jedem Fall angestrebt werden und ist gerade im Sinne einer adäquaten Therapie unabdingbar. Besonderen Stellenwert haben diese Schemata gerade dann, wenn zwei ätiologisch verknüpfte Krankheitsbilder Gegenstand des Interesses sind: Die akute *lymphatische Leukämie vom Burkitt-Typ* und das *Burkitt-Lymphom*, benannt nach ihrem Erstbeschreiber *Denis Parsons Burkitt*. Möglicherweise kann die ätiologische Verwandtschaft, der im gemeinsamen Namen Rechnung getragen wird, in einigen Fällen die Schwierigkeiten in der genauen Abgrenzung dieser Leiden erklären. Doch auch wenn es in 5-10% der beschriebenen Burkitt-Lymphom-Fälle zu einer leukämischen Ausschwemmung kommen kann, es sich speziell hier bei der ALL vom Burkitt-Typ um den Folgebefund des gleichnamigen Lymphoms handelt, sind dennoch beide Manifestationen (der im Grunde gleichen Aberration) als völlig unterschiedliche Erkrankungen zu verstehen und als solche zu therapieren. Während die malignen Lymphome in erster Linie auf sekundäre lymphatische Gewebe, insbesondere den Lymphknoten, beschränkt sind, betreffen die Leukämien zunächst das Knochenmark (Schlegelberger und Lipp 2003; Jaffe et al. 2001).

Sollte im Folgenden dennoch der Bezug auf das Burkitt-Lymphom notwendig werden, wird darauf an gegebener Stelle nochmals ausdrücklich hingewiesen. Ansonsten gilt: Thema der vorliegenden Abhandlung ist die akute lymphatische Leukämie vom Burkitt-Typ, nicht das Burkitt-Lymphom.

Die Prognoseverbesserung von Patienten mit B-ALL in den letzten Jahren war im überwiegendem Maße auf die Etablierung spezifischer Behandlungsprotokolle

zurückzuführen. Nach wie vor ist die exakte Identifizierung von Patienten mit B-ALL, insbesondere solcher mit Burkitt-Typ-ALL, mittels morphologischer, zytologischer, immunologischer und zytogenetischer Analysen von außerordentlicher Bedeutung. Der relative Stellenwert jeder dieser Ansätze variiert enorm innerhalb der einzelnen Entitäten, sodass man diagnostisch leider noch weit davon entfernt ist, einen Goldstandard zu benennen. Während einige Subgruppen über die Morphologie definiert werden, unter Ergänzung der Immunphänotypisierung in schwierigen Fällen, ist in anderen Erkrankungen des leukämischen Formenkreises der Immunphänotyp so spezifisch, dass man schnell geneigt ist, keine weiterreichende Diagnostik anzuführen. Wiederum andere Neoplasien verfügen über eine ganz spezifische genetische Veränderung (welche bei anderen Krankheiten bisher noch nicht gefunden wurde), mangeln jedoch an eindeutig distinktiven Oberflächenmarkern, die eine Diagnose ermöglichen könnten. Dies gilt im besonderen Maße für die ALL vom Burkitt-Typ. Diese zeigt im typischen Fall eine von drei Translokationen unter Involvierung des 8q24-Lokus, weist darüber hinaus jedoch ausschließlich eine charakteristische, wenn auch wenig spezifische, Kombination aus Oberflächenantigen CD10 bei gleichzeitiger Negativität von TdT auf, die sich ebenso und damit diagnostisch erschwerend bei verschiedenen B-Zelllymphomen findet. Sollte es daher gelingen mittels Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH) unter Verwendung spezifischer, an den 8q24-Lokus angrenzender Sonden, die ALL vom Burkitt-Typ zu detektieren und die relative Häufigkeit von 8q24-Translokationen in dieser Neoplasie zu ermitteln, so wäre ein weiterer Schritt getan, jene Patienten, die unter der ALL vom Burkitt-Typ leiden, klar und mit einfachen Mitteln von denen zu unterscheiden, die an einer B-ALL anderer Kategorie oder gar ein B-Zelllymphom erkrankt sind. Dadurch könnte die Unschärfe einer Diagnose, die bisher allein auf einer morphologischen und immunologischen Untersuchung basiert, weiter ausgeglichen werden. Das entsprechende Behandlungsprotokoll könnte dann zeitnah eingeleitet und im besten Fall die Prognose angehoben werden. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zu diesem Ziel liefern.

1.1.2 Definition

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) des Erwachsenen ist definiert als maligne Erkrankung des blutbildenden Systems. Für sie charakteristisch ist eine ungehemmte Proliferation und Akkumulation unreifer Vorläuferzellen der Hämatopoese, die

-Einleitung-

aufgrund morphologischer, zytochemischer, immunologischer und genetischer Kriterien der lymphatischen Zellreihe zugeordnet werden können. Die Diagnose beruht auf dem Nachweis von mehr als 25% Lymphoblasten im Knochenmark oder peripheren Blut (Benett et al. 1976; Harris et al. 1999 b; Rieder et al. 1998; Rieder und Kneba 2003; Schlegelberger und Lipp 2003). Der Begriff „unreif“ entspringt einer zytologischen Betrachtungsweise und bezieht sich auf die Morphologie der leukämischen Zellen (Herold et. al. 2005).

1.1.3.1 Morphologie, Immunologie und Zytochemie

Für die morphologische bzw. zytochemische Einordnung der akuten lymphatischen Leukämien werden die Kriterien der French-American-British (FAB)- Klassifikation hinzugezogen (Löffler et. al. 1975; Benett et al. 1976; Hoelzer et al. 1984; Morphologic, Immunologic and Cytogenetic (MIC) Working Classification of Acute Lymphoblastic Leukemia 1985; Löffler et al. 1987; Digel et al. 1997). Vereinbarungsgemäß wird eine Unterteilung in die Gruppen L1, L2 und L3 vorgenommen, wobei die Kriterien der Zellgröße, Kern-Plasma-Relation (KPR) sowie Form und Größe der Nukleoli Berücksichtigung finden. L3 ist von den Gruppen L1 und L2 abzugrenzen, da es sich bei dieser immunologisch um die Klasse der reifen B-ALL handelt (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1

Einteilung der ALL gemäß den Kriterien der FAB-Klassifikation (modifiziert nach Pfreundschuh und Hunstein 1981)

FAB-Einteilung	Zelle	Zellkern	Zytoplasma	Nukleolus
L1	klein, uniform	rund, homogen	spärlich, schwach basophil	nicht sichtbar
L2	variable Größe	irregulär, inhomogen	variabel	einer oder mehr
L3* * (Burkitt-Typ)	groß, uniform	rund bis oval, homogen	vermehrt, stark basophil	einer oder mehr, vesikulär

Während die Untergruppe L3 insgesamt äußerst selten ist, sind 70% der ALL im Erwachsenenalter der FAB-Untergruppe L2 und 75% der ALL im Kindesalter L1 zuzuordnen. Dieser Definition analog ordnet sich die akute lymphatische Leukämie vom Burkitt-Typ der klinisch bedeutsamen Subgruppe L3 zu. Sie ist demnach mit der immunphänotypisch definierten reifen B-ALL assoziiert (Rieder et al. 1998).

-Einleitung-

Bei der zytochemischen Untersuchung dürfen die Blasten weder Myeloperoxidase- noch Monozyten-Esterase-Aktivität aufweisen. Häufig hingegen ist der positive Ausfall der Perjodsäure-Schiff- (PAS) und der sauren Phosphatase-Reaktion. Die aufgrund morphologischer und zytochemischer Kriterien gestellte Diagnose einer akuten lymphatischen Leukämie verlangt stets die Bestätigung des immunologischen Nachweises einer typischen Konstellation zellulärer Differenzierungsantigene. Dabei wird das Muster zellmembranständiger und intrazellulärer Antigene innerhalb der leukämischen Zellfraktion bestimmt. Man spricht vom so genannten Immunphänotyp (Chan et al. 1985). Zur dessen genauen Beschreibung findet die CD- (*cluster groups of differentiation*) Nomenklatur Anwendung. Die akuten lymphatischen Leukämien werden anhand des Immunphänotyps bekanntermaßen in Leukämien der B- und T-Zellreihe unterteilt. In diesen Hauptgruppen erfolgt eine spezifischere Unterteilung anhand des Differenzierungsgrads der leukämischen Blasten. Dieser ist abzulesen an den unterschiedlichen Kombinationen von Antigenen (Tabelle 1.2).

Tabelle 1.2

Immunologische Subtypen der ALL (modifiziert nach Ludwig et. al. 1993)

Befund	Expressionsmarker
B-Vorläufer-Zell-ALL	
-Pro-B-ALL (B-I)	CD19+ u./o. CD79+ u./o. CD22+
-Common-ALL (B-II)	CD19+ u./o. CD79+ u./o. CD22+ u. CD10+
-Prä-B-ALL (B-III)	CD19+ u./o. CD79+ u./o. CD22+ u. cyIgM+
Reife B-ALL (B-IV)	CD19+ u./o. CD79+ u./o. CD22+ u. sIgM+ (mit kappa- oder lambda-Leichtkettenrestriktion), CD10+/-, TdT-(/+)
T-Vorläufer-Zell-ALL	
-Pro-T-ALL (T-I)	cyCD3+ o. sCD3+ u. CD7+
-Prä-T-ALL (T-II)	cyCD3+ o. sCD3+ u. CD2+ u./o. CD5+ u./o. CD8+
-Kortikale T-ALL (T-III)	cyCD3+ o. sCD3+ u. CD1a+ u. CD7+
-Reife T-ALL (T-IV)	sCD3+ u. CD1a-
Unklassifizierbar	CD45+, kein Nachweis von B-, T- oder myeloischen Antigenen; unabhängig von HLA-DR, TdT oder CD34-Reaktion

s= surface; cy= cytoplasmatic

Der Immunphänotyp der ALL vom Burkitt-Typ zeichnet sich durch die starke Expression von B-Zell-Antigenen, Immunglobulinen auf der Zelloberfläche (Igs) und meist des CD10 Antigens aus. Im Gegensatz zu den unreiferen Formen der B-Linien ALL zeigt sich bei der ALL vom Burkitt-Typ typischerweise ein Fehlen der terminalen Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT), obwohl Ausnahmen schon beobachtet wurden

(Michiels et al. 1988) und somit dieses laborchemische Kriterium insgesamt keine uneingeschränkte Aussagekraft zu haben scheint.

Während die akuten lymphatischen Leukämien der T-Zellreihe einen Anteil von 24% ausmachen, ist ein Großteil (76%) der ALL im Erwachsenenalter der B-Zellreihe zuzuordnen. Davon entfallen etwa 11% auf die Pro-B-ALL, 51% auf die Common-ALL und weitere 10% auf die Prä-B-ALL. Zusammengefasst werden diese Formen als B-Vorläufer-ALL, die sich abgrenzen von den 4% der reifen B-ALL. Zu diesen 4% gehört auch die ALL vom Burkitt-Typ. Sie ist demnach verhältnismäßig selten.

Grundsätzlich besteht zwischen immunologischer Klassifikation und bestimmten chromosomalen Veränderungen eine enge Korrelation (Ludwig et al. 1994; Cortes und Kantarjian 1995; Digel 1997; Campana und Behm 1998; Gökbuget und Hoelzer 1998).

1.1.4 Krankheitsbild

Krankheitsspezifische Merkmale der akuten lymphatischen Leukämien sind die Verdrängung der physiologischen Blutbildung im Knochenmark durch leukämische Blasten, die Anhäufung leukämischer Zellen im peripheren Blut sowie das Übergreifen der Leukämie auf extramedulläre Organe wie Leber, Milz und das zentrale Nervensystem (ZNS). Das klinische Bild wird hauptsächlich geprägt durch die zum Teil massive Verdrängung der Hämatopoese. Es findet sich de facto eine Panzytopenie, also eine generalisierte Verminderung funktionsfähiger Blutzellen. Die verringerte Granulozytopoese beispielsweise führt zu einer gesteigerten Anfälligkeit gegenüber Infektionen, insbesondere durch Bakterien und Pilze. Im schlimmsten Fall liegt die Zahl funktionstüchtiger Granulozyten unter $500/\mu\text{l}$, sodass sich Patient und Ärzte im Falle eines septischen Vollbilds schnell mit einer vital bedrohlichen Klinik konfrontiert sehen. Zumindest weist etwa 1/3 der Patienten bei Diagnosestellung manifeste Blutungen oder eine nicht selten schwere Infektion auf. Aus der gestörten Erythropoese resultiert eine Anämie mit den Leitsymptomen Abgeschlagenheit, Schwindel und Müdigkeit. Die Patienten zeigen eine charakteristische, die Schleimhäute affektierende Blässe, Petechien, Purpura und Schleimhautblutungen besonders im Mundbereich. Die gehemmte Gerinnungsfähigkeit bzw. verlängerte Blutungszeit ist Ausdruck einer unzureichenden Thrombozytopoese. Mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit treten Symptome wie Lymphome, Schwellung der Tonsillen, Splenomegalie und Hepatomegalie auf und sind bei Kindern insgesamt häufiger als bei Erwachsenen. Der

-Einleitung-

Befall von Organen kann spezifische Symptome hervorrufen. Dabei können Kopfschmerzen, Schwäche in den unteren Extremitäten und der Ausfall von Hirnnerven auf einen Befall des zentralen Nervensystems hinweisen. Solche neurologischen Manifestationen finden sich pathognomonisch bei der „Meningitis leucaemica“. Dyspnoe oder trockener Reizhusten können auf einen Mediastinaltumor, Pleura- oder Perikarderguss beruhen. Abdominelle Beschwerden könnten auf die bereits erwähnte Leber- oder Milzvergrößerung zurückzuführen sein. Mehr als die Hälfte der Patienten weist eine Leukozytose $>10000/\mu\text{l}$ auf und in über 90% der Fälle sind leukämische Blasten im peripheren Blut vorhanden (Kramer 1996; Gökbuget und Hoelzer 1998). Die immunologische Funktion der malignen (Vorläufer-)Zellen kann entsprechend der Funktion der normalen Zellen mehr oder minder ausgeprägt sein (Kramer 1996). Lebenslimitierend ist schließlich das Versagen der physiologischen Knochenmarkfunktion mit konsekutivem Multiorganversagen im septischen oder kardiogenen Schock (Rieder et al. 1998).

1.1.5 Ätiologie und Inzidenz

Die Neuerkrankungsrate ist altersabhängig und beschreibt zwei Häufigkeitsgipfel. Nach einem Maximum der Inzidenz im Kindesalter (bis zum 5. Lebensjahr) mit 3-4,3/100.000 (National Cancer Institute, 1975; Secker-Walker et al., 1990) sinkt die jährliche Neuerkrankungsrate der ALL auf ein Minimum von etwa 0,5/100.000 im Altersbereich von 35-45 Jahren. Mit dem 60. Lebensjahr beginnt die Inzidenz mit 0,9/100.000 Einwohner laut einer Studie von Taylor und Kollegen aus dem Jahr 1992 wieder anzusteigen (Taylor et al., 1992), um jenseits der 85 mit etwa 2,5/100.000 ein weiteres Maximum anzunehmen (McNally et al. 1997; National Cancer Institute, 2000; Rieder et al. 1998; Rieder und Kneba 2003). Abweichend von Taylor und Mitarbeitern, in deren Untersuchung 31% der erwachsenen ALL-Patienten das 60. Lebensjahr bereits überschritten hatten, ergab eine Studie von Cartwright und Kollegen aus dem Jahr 1998 im Beobachtungszeitraum von 1984 bis 1993 bei den 75 bis 79-jährigen nur eine jährliche Neuerkrankungsrate von 0,65/100.000 Einwohner, wobei die Inzidenz bei Männern mit 0,89/100.000 höher ausfiel als bei Frauen (Cartwright et al., 1998). In ihrer Gemeinsamkeit zeigen die erwähnten Studien, dass die ALL bei den Erwachsenen augenscheinlich zu den eher selteneren Malignomen gehört.

-Einleitung-

Die Ätiologie der ALL des Erwachsenen ist nach wie vor weitestgehend nicht erschöpfend aufgeklärt. Unter den exogenen Faktoren scheint Nikotin mit einem erhöhten Risiko für eine ALL verbunden zu sein (Sandler et al. 1993; Rieder und Kneba 2003). Hinweisend auf die Leukämie als Folge des physiologischen Alterungsprozesses ist die Zunahme der Inzidenz im höheren Alter. Genetische Defekte scheinen in diesem Lebensabschnitt zu akkumulieren, was sich letztendlich in der malignen Entartung einer lymphopoetischen Vorläuferzelle manifestiert (National Cancer Institute, 2000). Bestätigung findet dieser Verdacht durch die Beobachtung, dass der Anteil an ALL-Patienten mit einer Philadelphia-Translokation, einer reziproken Translokation zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22 als häufigste Chromosomenaberration bei der B-ALL der Erwachsenen, sowohl in der Gruppe der ALL-Patienten als auch bezogen auf die Gesamtbevölkerung mit höherem Alter zunimmt (Secker-Walker et al. 1997; Taylor et al. 1997). Bei bis zu 2,3% der Patienten mit einer ALL wurde ein vorausgegangenes Malignom beschrieben und bei bis zu 10% der Fälle mit einer Leukämie als Zweitneoplasie nach vorausgegangener Chemo- und/oder Strahlentherapie wurde eine ALL beobachtet. Dabei konnte nicht nur ein Zusammenhang mit der vorausgegangenen Behandlung mit Substanzen aus der Gruppe der Topoisomerase-II-Hemmer festgestellt, sondern auch eine Assoziation mit einer familiären Belastung bei Tumorerkrankungen erfasst werden (Fonatsch et al. 1982; Archimbaud et al. 1987; Kapelushnik et al. 1991; Lennard et al. 1991; Auxenfans et al. 1992; Bokemeyer et al. 1992; GFCH 1994; Pagano et al. 1999; Rieder und Kneba 2003).

Es muss also, zusammengefasst unter dem Begriff des Vulnerabilitäts-Stress-Modells, einerseits die Exposition gegenüber bestimmten Stoffen und andererseits eine genetische Prädisposition als Ursache der ALL in Betracht gezogen werden. Jedoch immer unter der Einschränkung, dass Korrelation nicht gleichbedeutend mit Kausalität ist. Es stellt sich prinzipiell die Frage, ob die gewonnenen Erkenntnisse bezüglich des Risikoanstiegs im höheren Alter nicht auch auf einen Lebenszyklus-Fehlschluss der Querschnittsdaten beruhen und sich in möglichen Längsschnitts-Studien nicht erhärten lassen, womöglich auf einen Kohorteneffekt beruhen (Mueller 2005). So bleibt abzuwarten, ob im Zuge zukünftiger Studien weitere Faktoren verstärkt Beachtung finden und andere aus dem Interessenfokus verschwinden werden.

1.1.6 Therapie und Prognose

Für die Behandlung der ALL des Erwachsenen kommt ein mehrgliedriges Therapieprotokoll zum Einsatz: Der schnell zytoreduzierenden Induktionsphase folgt die Postremissionsphase. Sie vereint Konsolidierungs- oder Intensivierungszyklen, die Reinduktion sowie eine Erhaltungstherapie bis zu 30 Monate nach Erstdiagnose. Unverzichtbar sind, bei einem 5%igen Risiko für ein ZNS-Rezidiv bei erwachsenen ALL-Patienten, spezifische ZNS-Prophylaxen und Therapien. Sie setzen sich zusammen aus einer intrathekalen Applikation von Methotrexat (MTX), in fakultativer Kombination mit Cytosin-Arabinosid und Dexamethason, einer ZNS-Radiotherapie und/oder der systemischen Verabreichung hoher Dosen MTX und anderer ZNS-gängiger Substanzen. Im Falle eines großen mediastinalen Tumorgeschehens, ein vornehmlich bei T-ALL-Patienten zu erwartendes Ereignis, ist die Mediastinalbestrahlung eine gegebene Therapieoption.

Differenzierter ist der Nutzen einer allogenen Knochenmarktransplantation in erster Remission zu betrachten. Während ein Benefit für Hochrisikopatienten bei diesem Prozedere als gesichert angesehen werden kann, konnten verschiedene Studien für Standardrisiko-ALL keinen Überlebensvorteil gegenüber einer konventionellen Polychemotherapie aufzeigen (Barret et al. 1992; Zhang et al. 1995; Rieder et al. 1998; Rieder und Kneba 2003).

1.1.7 Aktuelle Therapiestudien

Die meisten der erwachsenen ALL-Patienten in der Bundesrepublik werden im Rahmen der multizentrischen ALL-Studien des Erwachsenen (German Multicenter ALL Study Group, GMALL) ihrer Therapie zugeführt. Sie unterscheidet eine Standardrisikogruppe von einer Hoch- und einer Höchststrisikogruppe. Die Behandlung der B-ALL-Patienten verlangt ein gesondertes Protokoll. Dem analog werden ältere Patienten (>65 Jahre, Patienten zwischen 55 und 65 Jahren entsprechend ihres biologischen Zustands) nach einem speziellen Protokoll für Ältere therapiert, das sich im Gegensatz zum Standardprotokoll durch eine relevant reduzierte Therapieintensität- und Toxizität auszeichnet (Rieder und Kneba 2003).

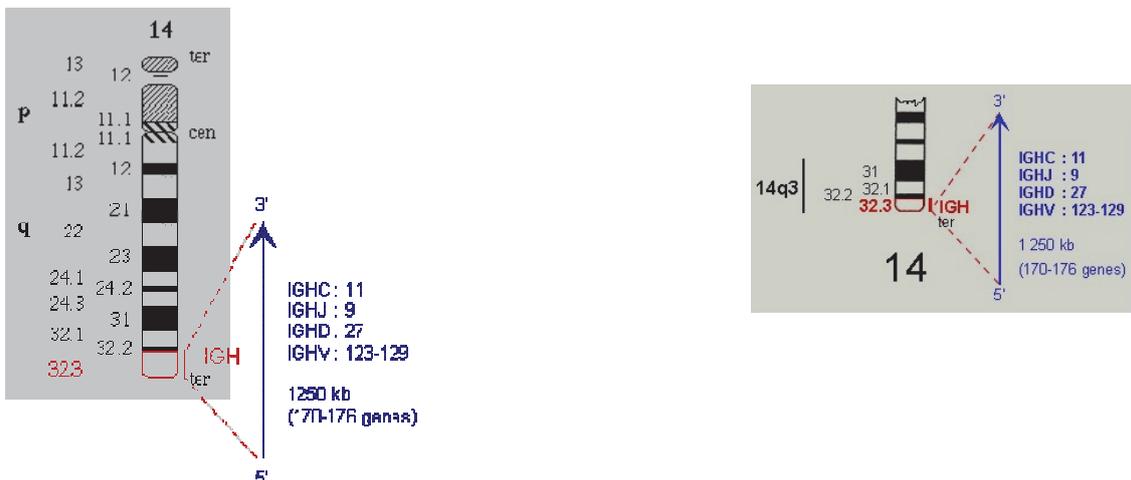
1.2 Genetische Grundlagen der 8q24/MYC-Translokationen

1.2.1 Zytogenetik

Die B-ALL macht etwa 4% aller Fälle der ALL im Erwachsenenalter aus. Darunter findet sich auch die ALL vom Burkitt-Typ, sei es als eigenständige Manifestation oder als leukämische Ausschwemmung des gleichnamigen Lymphoms. Translokationen mit Beteiligung der Chromosomenbande 8q24 sind typisch für reife B-Zell-Neoplasien. So zeigt sich auf zytogenetischer Ebene im typischen Fall eine Translokation, die einen der Immunglobulin-Genloci in 2p11, 14q32 oder 22q11 mit der bereits erwähnten Chromosomenbande 8q24 und dem in ihr lokalisierten c-MYC-Lokus involviert. Mit etwa 85% wird am häufigsten die Translokation $t(8;14)(q24;q32)$, die den Immunglobulin-Schwerketten-Genlocus (IgH) einschließt, beobachtet (Abbildung 1.1). Sie wurde erstmals von *Lore Zech* und Mitarbeitern beschrieben (Zech et al. 1976).

Abbildung 1.1

Der humane IgH-Lokus auf dem langen Arm von Chromosom 14, Bande 14q32.33 (modifiziert n. Ginstoux und Lefranc 2001), IMGT (The International ImMunoGeneTics information system ®) © Copyright 1995-2003 IMGT



Die beiden varianten Translokationen $t(2;8)(p11;q24)$ und $t(8;22)(q24;q11)$ hingegen beobachtete man bisher nur in etwa 5 bzw. 10% der Fälle (Abbildung 1.2 und 1.3). Sie beteiligen die Immunglobulin-Leichtketten kappa ($Ig\kappa$; 2p11) und lambda ($Ig\lambda$; 22q11) (Zech et al. 1976; Berger et al. 1979; Miyoshi et al. 1979; Van den Berghe et al. 1979; Miyoshi et al. 1981; Hecht und Aster 2000). In jedem Fall kommt es zur Rekombination des c-MYC-Lokus in der Chromosomenbande 8q24.

-Einleitung-

Abbildung 1.2

Der humane Igk-Lokus auf dem kurzen Arm von Chromosom 2, Bande 2p11.2 (modifiziert n. Ginestoux und Lefranc 2000), IMGT (The International ImMunoGeneTics information system ®) © Copyright 1995-2003 IMGT

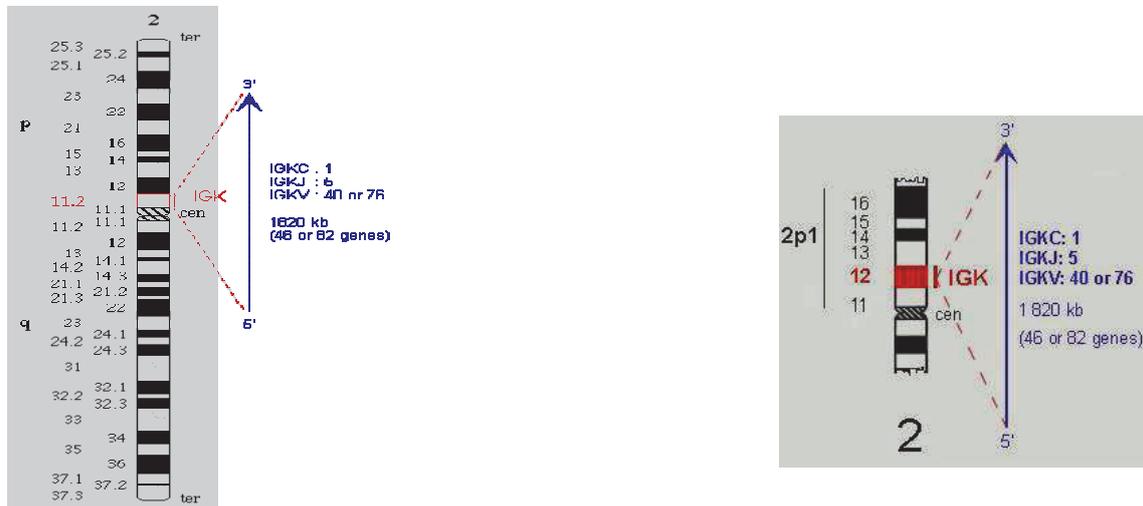


Abbildung 1.3:

Der humane Igl-Lokus auf dem langen Arm von Chromosom 22, Bande 22q11.2 (modifiziert n. Ginestoux und Lefranc 2001), IMGT (The International ImMunoGeneTics information system ®) © Copyright 1995-2003 IMGT



Die Translokation t(8;14) oder ihre Varianttranslokationen treten in den meisten, wenn nicht allen, akuten lymphatischen Leukämien vom B-Typ, exklusiv jedoch in der ALL vom Burkitt-Typ und den Burkitt-Lymphomen auf (Mitelman 1994). Jedoch ist folgende Einschränkung zu unterstreichen: Die Translokation t(8;14) ist eine äußerst subtile Veränderung und in Metaphasen schlechter Qualität mitunter schwierig zu erkennen, wodurch ihre Bedeutung möglicherweise unterschätzt wird.

1.2.2 Molekulargenetik

1.2.2.1 Genetische Grundlagen der Antikörpervielfalt

Für die Synthese der Leicht- und Schwereketten der Immunglobuline werden bestimmte Gene rekombiniert. Dieser Mechanismus ist der Ausgangspunkt für translokative Aberrationen, die, wie im Falle der Leukämien, dem Betroffenen große Schäden zufügen. Bei den Leichtketten werden zwei sog. „Isotypen“ unterschieden: Isotyp κ und Isotyp λ . Sie bedingen die Struktur der konstanten Domäne. Da individuelle B-Zellklone nur Leichtketten eines Isotyps synthetisieren, enthalten die einzelnen Ig-Moleküle Leichtketten identischen Isotyps, also κ oder λ . Dies bezeichnet man als Isotypen-Ausschluss oder Isotyp-Exklusion.

Auch innerhalb der Schwereketten ist die Unterscheidung in mehrere Isotypen Ausdruck struktureller Unterschiede und findet sich in den bekannten fünf Immunglobulin-Klassen IgM, IgD, IgG, IgA und IgE wieder.

Die genetische Information für die Synthese der Immunglobulinketten findet sich an drei Orten: Für die Immunglobulin-Schwereketten auf Chromosom 14, für die Leichtketten des Typs κ auf Chromosom 2 und für die Leichtketten des Typs λ auf Chromosom 22.

Um die Synthese einer spezifischen Schwer- und Leichtkette in reifen B-Zellklonen zu garantieren, werden die Gene innerhalb der einzelnen Familien im Zuge der B-Lymphozyten-Reifung rekombiniert. Die Genfamilien enthalten Gene für den variablen und konstanten Anteil der Immunglobulinketten. V-, J- und D-Gene sind zuständig für die Kodierung des variablen Anteils der Schwereketten, bei den Leichtketten sind hierfür nur V- und J-Gene zuständig. Der konstante Anteil wird bei beiden von den sog. C-Genen kodiert. Die Rekombination erfolgt in einer festgelegten Reihenfolge ausschließlich bei der antigenunabhängigen Differenzierung der B-Lymphozyten. So werden zuerst die Schwereketten-Gene und anschließend die Leichtketten-Gene rekombiniert (Kramer 1997).

1.2.2.2 Die 8q24/MYC-Translokation

Die 8q24/MYC- bzw. Burkitt-Translokation ist der Prototyp der IgH-Translokation, bei der erstmals der Aktivierungsmechanismus eines Onkogens durch dessen Umlagerungen in den Bereich des Immunglobulins aufgeklärt wurde (Adams et al. 1985). Bei der am häufigsten beobachteten t(8;14)(q24;q32)-Translokation wird das in 8q24 lokalisierte c-MYC-Gen an das IgH-Gen in 14q32 angelagert. Weit verstreut (bis zu mehreren Kilobasenpaaren im 5'-Bereich) innerhalb des ersten Exons oder Introns liegen die Bruchpunkte des c-MYC-Gens.

Die durch die bereits beschriebenen Translokationen, kurz „Burkitt-Translokationen“, verursachte Dysregulation der Expression des Proto-Onkogens c-MYC wird als entscheidender Faktor bei der onkogenen Transformation der betroffenen B-Zelle angesehen. Bei der Translokation t(8;14) liegt der chromosomale Bruchpunkt auf Chromosom 14 entweder im Bereich der J (Joining)- oder D (Diversity)-Regionen (bei den endemischen Burkitt-Lymphomen) oder im Bereich der verschiedenen „switch“-Regionen (bei den sporadischen Burkitt-Lymphomen) 5' vor den Gensegmenten C_{λ} , $C_{\lambda 2}$, $C_{\lambda 3}$, $C_{\lambda 4}$, C_{μ}/C_{δ} , $C_{\alpha 1}$, $C_{\alpha 2}$, und eventuell auch C_{ϵ} , die für den konstanten (C-) Teil der Immunglobulin-Schwerkette kodieren. Im Bereich des c-MYC-Genlokus auf Chromosom 8 liegt der Bruchpunkt im ersten Exon 1 oder Intron (*class I*) unmittelbar angrenzend (*class II*) oder weiter zentromerwärts (*class III*) von Exon 1. Insgesamt sind die chromosomalen Bruchpunkte über einen Bereich von 350 Kilobasenpaaren (kbp) und mehr verstreut (Cory 1986).

Bei den varianten Translokationen t(2;8) und t(8;22) sind die chromosomalen Bruchpunkte 3' der C-Regionen des Leichtketten- κ - und λ - Bereichs und telomerwärts von c-MYC weniger gut charakterisiert und scheinen über einen Bereich von 300 kbp und mehr verteilt (Adolph et al. 1989; Henglein et al. 1989; Zeidler et al. 1994). Diagnostisch interessant ist, dass es bei den Variantranslokationen Hinweise auf so genannte „hot spots“, d.h. Abschnitte mit erhöhter Wahrscheinlichkeit für einen Chromosomenbruch, gibt (Cario et al. 2000).

In Betracht muss man die Möglichkeit ziehen, dass die unterschiedlichen Bruchpunkte auf unterschiedliche Entstehungsmechanismen hindeuten, eine Theorie, die durch die Beobachtung verschiedener Burkitt-Lymphom-Varianten gestützt wird und möglicherweise auf die ALL vom Burkitt-Typ Auswirkungen auf die Klassifikation haben könnte: So kommt es bei der endemischen Variante während der frühen B-Zell-

Differenzierung im Knochenmark zu einem fehlerhaften VDJ-Rearrangement. Bei der sporadischen Form wird die entsprechende Chromosomentranslokation durch einen Fehler beim „Switching“ der Ig-Klassen verursacht (Haluska et al. 1986).

1.2.2.3 *c-MYC*

Zwei Mechanismen sind für die Pathogenese der ALL vom Burkitt-Typ entscheidend. Zum einen die Verhinderung der Apoptose und damit das verlängerte Überleben der Zelle und zum anderen die gesteigerte Proliferationsrate und damit ihr rascheres Wachstum. Dies zeigt sich u.a. am Anteil der Zellen, die das proliferationsassoziierte Antigen Ki67 exprimieren. Es beträgt, am Beispiel der Burkitt-Lymphome, bis zu 80%. In diesem Zusammenhang steht *c-MYC*, ein Transkriptionsfaktor. Er induziert in verschiedenen Zelltypen die Proliferation (Zunahme des Größenwachstums der Zelle), die DNA-Synthese und die Progression durch den Zellzyklus. Zusätzlich verhindert es die Differenzierung, hat ein ausgeprägtes transformierendes Potenzial und kann unter Umständen die Apoptose, d.h. den programmierten Zelltod, auslösen. Sein molekulares Konstruktionsschema ist verhältnismäßig komplex. Am N-terminalen Ende des *c-MYC*-Proteins liegt die Transaktivierungsdomäne, am C-terminalen Ende liegen eine basische Domäne sowie Leucinzipper- und Helix-Loop-Helix-Motive, die für die Dimerisierung mit dem Bindungspartner MAX verantwortlich sind. Dieser interagiert wiederum mit zwei weiteren Domänen, MAX und MXI1, die ihrerseits an SIN3 binden. Durch Rekrutierung eines Repressorkomplexes mit Histondeazetylase (HDAC) wird die Transkription gehemmt. Transkriptionelle Aktivierung und Hemmung werden durch die kompetitive Bindung von MYC und MAD/MXI1 an MAD in einem empfindlichen Gleichgewicht gehalten. Wenn *c-MYC* überwiegt, wird die Proliferation, wenn MAD/MXI1 überwiegen, die Wachstumshemmung induziert. Zu den Zielgenen von *c-MYC* gehören CDC25a, das über cyclinabhängige Kinasen den Zellzyklus aktiviert, eIF- α und eIF-4E, die in der Translation, sowie ODC und CAD, die in der DNA-Synthese eine Rolle spielen. Die Überexpression von *c-MYC* kann durch Verzögerung der G₂-Phase und die Reinduktion der DNA-Synthese Aneuploidien hervorrufen. (Felsher et al. 2000).

1.2.2.4 Zusätzliche chromosomale Veränderungen der B-ALL

Bei etwa 60% der Patienten mit B-ALL/B-NHL (Non-Hodgkins-Lymphome) und 8q24-Translokationen finden sich zusätzliche Chromosomenveränderungen (Berger et al. 1989; Lai et al. 1989; Kornblau et al. 1991). Diese sind zum größten Teil komplexer Natur und umfassen ganz überwiegend unbalancierte Chromosomenaberrationen. Die häufigsten Zugewinne betreffen Duplikationen des langen Arms von Chromosom 1, zumeist unter Beteiligung der Region 1q23, sowie die kompletten langen Arme der Chromosomen 13, 14 und 17. Die häufigsten Verluste involvieren den Bereich des langen Arms von Chromosom 6 sowie den des kurzen Arms von Chromosom 17 (Berger et al. 1989; Lai et al. 1989; Kornblau et al. 1991; Barin et al. 1992; Schoch et al. 1995). In etablierten B-ALL/NHL-Zelllinien wurde mittels molekulargenetischer und molekularzytogenetischer Methoden ein minimales, gemeinsam deletiertes Segment in 6q25q27 eingegrenzt (Parsa et al. 1994). Als weitere wiederkehrende Veränderungen sind Strukturaberrationen des langen Arms von Chromosom 13 mit Rearrangements der Bande 13q34 (Berger et al. 1989) und Duplikationen mit Beteiligung der Region 13q22 beschrieben (Barin et al. 1992).

Eine besondere Zusatzaberration stellt die sonst für das folliculäre Lymphom typische Translokation $t(14;18)(q32;q21)$ dar, da sie mit einer äußerst ungünstigen Prognose der B-ALL/NHL-Patienten einherzugehen scheint (Gluck et al. 1986; Thangavelu et al. 1990; Fiedler et al. 1991; Kramer et al. 1991; Karsan et al. 1993; Rieder et al. 1994; Macpherson et al. 1999).

TP53-Mutationen wurden bei 16-37% der Fälle mit B-NHL/ALL-Patienten gefunden. Aus klinischer Sicht ergab sich jedoch kein Unterschied zu den Fällen ohne *TP53*-Veränderungen (Bhatia et al. 1992; Preudhomme et al. 1995).

Eine detaillierte Prüfung der prognostischen Konsequenzen von genetischen Zusatzaberrationen für Patienten mit reifer B-ALL/Burkitt-Lymphom unter einheitlicher Behandlung ist bisher nicht erfolgt.

1.3 Nachweismethoden der 8q24-Translokationen

1.3.1 Konventionelle Bänderungszytogenetik

Grundsätzlich befasst sich die Zytogenetik mit der Darstellung des menschlichen Chromosomensatzes. Dabei ist die Chromosomenbandenanalyse ihr zentrales Instrument, seit es *Nowell* und *Hungerford* Anfang der Sechziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts gelang, die Philadelphia-Translokation der chronisch-myeloischen Verlaufsform der Leukämie mit ebensolcher Chromosomenbandenanalyse nachzuweisen (Nowell et Hungerford 1960). Die große Leistung der Methode ist die Visualisierung der Metaphasechromosomen und deren lichtmikroskopische Darstellung unter zu Hilfenahme verschiedener Bänderungsfärbetechniken (Fonatsch et. al 1980). Während sich die heterochromatischen Abschnitte als sog. C-Banden präsentieren, verwendet man bei den euchromatischen Segmenten die gängigen G,Q und R-Bandentechniken (Giemsa, Quinacrin und *reverse banding*), wobei jeweils G und R komplementär sind (Traut 1991). Je nach Kontraktionszustand der Chromosomen sind unterschiedliche Auflösungsgrade möglich. Bei Metaphasechromosomen gesunder Blutlymphozyten erreicht die Analyse eine Schärfe von 550-850 Banden, bei Präparaten aus Leukämiezellen ist häufig nur eine Auflösung von 150-300 Banden möglich (Rieder und Bradtke 2002).

In der Regel jedoch erlaubt es die Chromosomenbandenanalyse einzelne Chromosomen zu identifizieren und durch die Detektion von atypischen Bänderungsmustern auf strukturelle Aberrationen zu schließen (Mitelman et al. 2001).

Voraussetzung der konventionellen Bänderungszytogenetik des gesamten menschlichen Chromosomensatzes ist eine Zellkultivierung, um die Gewinnung der zu analysierenden Metaphasen zu gewährleisten. Aber auch wenn bei leukämischen Erkrankungen die Aufarbeitung von Probenmaterial per se verhältnismäßig einfach ist und somit die Leukämien unter den malignen Erkrankungen zytogenetisch sehr gut untersucht sind (Raimondi 1993; Mitelmann et al. 1998), sieht man sich dennoch bei der Methode mit einigen Schwierigkeiten konfrontiert. Zum einen sind zur Metaphasezellpräparation frische und vor allem teilungsfähige Zellen notwendig, deren sichere Gewinnung nicht bei allen ALL-Patienten möglich ist (Fenaux et al. 1988; Hudis et al. 1990; Williams et al. 1990; Walters et al. 1990; Hawkins und Secker-Walker 1991; Le Beau 1993; Raimondi et al. 1996). Zum anderen erschweren viele andere Faktoren die genaue

Identifizierung von Chromosomen und das Erkennen struktureller Anomalien: Zu nennen sind eine unzureichende Chromosomenmorphologie, ein zu geringer Mitose-Index, eine grenzwertige Metaphasenspreitung, oder eine ausgeprägte klonale Heterogenität. Diese Störgrößen scheinen sich vor allem bei malignen Zellen der ALL zu manifestieren. Darüber hinaus erschweren Derivat- und Markerchromosomen die zytogenetische Analyse (Heim und Mitelman 1995; Czepulkowski und Rooney 2002). Hieraus ergibt sich, dass die Identifizierung hinzugewonnener oder fehlender Chromosomen bei ALL-Patienten mit mehr als 50 Chromosomen mit der klassischen Zytogenetik nur in etwa der Hälfte der Fälle möglich ist (Ritterbach et al. 1998). Häufig bleibt jegliche strukturelle Veränderung bei Patienten mit einer ALL im Verborgenen (Fenaux et al. 1988; Hudis et al. 1990; Williams et al. 1990; Walters et al. 1990; Hawkins und Secker-Walker 1991; Groupe Français de Cytogénétique Hématologique 1996; Raimondi et al. 1996; Secker-Walker et al. 1997; Chessells et al. 1997).

1.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Ziel der PCR (Polymerase-Chain-Reaction) ist die exponentielle Amplifikation eines bestimmten (kurzen) Genabschnittes. Voraussetzung dafür ist die Kenntnis über solche den Zielabschnitt einrahmenden Sequenzen. Ist diese Bedingung erfüllt, können passende Primer gewählt und eingesetzt werden. Primer sind kurze, einzelsträngige DNA-Sequenzen, die zu den nach thermischer Denaturierung ebenfalls einzelsträngig vorliegenden Sequenzen an den Rändern der Zielstruktur komplementär sind. Anhand dieser Vorlage synthetisiert an dieser Stelle eine spezielle DNA-Polymerase neue Einzelstränge, die ihren Ausgangspunkt vom 3'-OH-Ende der Primer nehmen. Prototyp dieser hitzestabilen DNA-Polymerasen ist die Taq-Polymerase, gewonnen aus *Thermus aquaticus*. Dieser Zyklus lässt sich durch Denaturierung der Präparation und einen neuen Reaktionsstart beliebig wiederholen, sodass durch diese exponentielle Amplifikation eine millionenfache Kopie des gewählten Genabschnittes erzielt wird. Der bedeutende, wenngleich einfache Nutzen dieser Amplifikation ist eine veränderte Zelle (bzw. eine veränderte Nukleotid-Sequenz) unter 10^5 anderen detektieren zu können.

Häufig ist es jedoch nötig, diese Untersuchung auf Stufe der RNA vorzunehmen, da die Bruchpunkte der zu Grunde liegenden Translokationen unter Umständen sehr variabel sind. In dem Fall wird mit Hilfe einer reversen Transkriptase (RT) eine cDNA (copy-

DNA) des mRNA-Transkripts hergestellt, welche dann das Substrat für die PCR liefert (Kurzrock et al. 1987, Hermans et al. 1988; Janssen et al. 1992; Knippers 1997).

Im Falle der 8q24-Translokationen sind die chromosomalen Bruchpunkte über ein für die herkömmliche PCR nicht bzw. schwer fassbares Areal verstreut, sodass die Chromosomentranslokationen auf diese Art nicht nachgewiesen werden können. Jedoch wurde in der Vergangenheit am Beispiel von Burkitt-/B-ALL-Zelllinien gezeigt, dass die Translokation t(8;14) mittels *long PCR* unter Nutzung von Polymerasen mit *proofreading*, d.h. Korrekturleseaktivität, nachweisbar ist (Burmeister et al. 2005; Akasaka et al. 1996). Auf der Basis dieser Erkenntnisse sollen im Rahmen eines parallelen Arbeitsansatzes neue Daten über die bisher weniger gut charakterisierten Bruchpunkte der Varianttranslokationen t(2;8) und t(8;22) gewonnen werden. Auch diese erstrecken sich über einen Bereich von 300 kbp und mehr (Aholph et al. 1989; Henglein 1989; Zeidler et al. 1994). Eine angepasste PCR-Anordnung unter zu Hilfenahme von Kenntnissen über so genannte *hot spots* für den Chromosomenbruch sollte jedoch mittels *long PCR* den Nachweis wenigstens eines Teils der Translokationen erbringen (Cario et al. 2000). Ein genaueres Verständnis der molekularen Grundlagen der Chromosomenaberrationen bei B-ALL-Patienten könnte in Zukunft den molekularzytogenetischen Nachweis erheblich vereinfachen und beschleunigen.

1.3.3 Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH)

Die Einführung der FISH (Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung) Technik lässt sich zurückführen auf die Arbeiten der Forschungsgruppen um *Pardue und Gall* im Jahr 1969 sowie *John* und Kollegen im selben Jahr (John et al. 1969). Ihnen gelang erstmals die *in vitro* durchgeführte spezifische Anlagerung von Einzelstrang-DNA an komplementäre Nukleotidsequenzen, dem zu Grunde liegenden Prinzip der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung. Dabei wird sich die Eigenschaft zu Nutze gemacht, dass zwei Nukleinsäure-Einzelstränge sich wieder zu Doppelsträngen zusammenfinden, wenn sie sich in ihrer Basenfolge entsprechen. Ziel-DNA war dabei die DNA von Metaphase-Chromosomen oder die nukleäre DNA von Interphasezellen, die im Falle der ALL aus nativem Knochenmarkspirat oder peripherem Blut von Leukämiepatienten gewonnen wird. Der überwiegende Einsatz von radioaktiv-markierten DNA-Sonden wurde Anfang der Achtziger Jahre des vergangenen

Jahrhunderts abgelöst durch die Einführung von Fluoreszenzfarbstoffen (Lichter und Ried 1994). Die Hybridisierung mit genomischen DNA-Sonden ermöglicht die Identifizierung von numerischen und strukturellen Chromosomenaberration anhand von aberranten Fluoreszenzsignalen (Morgan und Pratt 1998). Die Analyse erfolgt unter Einbeziehung eines Fluoreszenzmikroskops, das unter Verwendung verschiedener Filter die Fluoreszenzsignale darstellen kann.

Während die klassische Chromosomenbandenanalyse nur Aberrationen erkennt, deren Rearrangement bzw. Deletion eine Region von mehreren Megabasenpaaren betrifft, vermag die Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung auch Aberrationen von 30-40 kb zu identifizieren (Lichter et al. 1995). Auch ist es möglich Veränderungen der chromosomalen (numerischen) Zusammensetzung aufzuspüren. Die Verwendung chromosomenspezifischer Zentromer-Sonden, die sich wiederholende DNA-Sequenzen erkennen, brachte hier den Durchbruch (Tosi et al. 1994; Heinonen und Mahlamäki 1996; Cuneo et al. 1997; Ritterbach et al. 1998).

Eine Sonderform der FISH stellt die Mehrfarb-Karyotypisierung, die so genannte M-FISH-Analyse, dar. Hier wird durch den Einsatz multipler, markierter DNA-Sonden eine Anfärbung des gesamten Chromosoms erreicht. Mittels der Mehrfarb-Karyotypisierung (auch *chromosome-painting* genannt) sollen insbesondere komplexe Umbauten genauer charakterisiert werden (Carter 1994).

1.4 Fragestellung

Die Verbesserung der Heilungschancen von Patienten mit B-ALL geht überwiegend einher mit der Einführung von passgenauen Behandlungsprotokollen. Die exakte Identifizierung von Patienten mit B-ALL und die genaue Benennung der im einzelnen Fall zugrunde liegenden molekularen Veränderung ist daher im Sinne der spezifischen Therapie von immenser Bedeutung. Jedoch zeigen sich auch aktuell in einem beträchtlichen Anteil der Patienten diskordante Ergebnisse zwischen den morphologischen, zytologischen, immunologischen und zytogenetischen Analysen, auf deren Kombination bisher die Diagnose beruht (Hoelzer et al. 1996).

Im Falle der B-NHL/ALL ermöglichte die Aufklärung der molekularen Veränderungen des c-MYC-Lokus die Entwicklung von Sonden für den Einsatz in der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung zur Aufdeckung der klassischen und varianten 8q24-Translokationen bei B-NHL/ALL. Hierbei wurden Sonden aus dem c-MYC-Lokus mit

-Einleitung-

Sonden aus dem Locus der Immunglobulin-Schwerketten zum Teil in zweifarbiger Kombinationstechnik eingesetzt (Ried et al. 1992; Veronese et al. 1995; Rack et al. 1998; Siebert et al. 1998).

Im Rahmen meiner Arbeit wurde analog zum Immunglobulin-Schwerketten-Locus der Einsatz von Sonden für die Immunglobulin-Leichtketten-Loci in 2p11 und 22q11 bei der FISH-Analyse erprobt, wobei der Versuch unternommen wurde, die Sonden in Eigenarbeit aus *E.coli* zu extrahieren und für die Analyse mit kommerziellen c-MYC-Sonden zu kombinieren.

In der vorliegenden Arbeit sollen daher folgende Fragen für die FISH-Analyse mit Sonden für die Varianttranslokationen $t(2;8)(p11;q24)$ und $t(8;22)(q24;q11)$ der akuten lymphatischen Leukämie vom Burkitt-Typ beantwortet werden:

1. Wie häufig ergibt die FISH-Analyse einen auffälligen Befund?
2. Wie hoch sind Sensitivität und Spezifität der FISH-Untersuchung für den Nachweis der varianten 8q24-Translokationen?
3. Gibt es Faktoren, die Sensitivität und Spezifität der FISH-Analyse in Hinblick auf die ALL-Diagnostik beeinflussen und um welche handelt es sich?
4. Inwieweit werden andere Veränderungen als die varianten 8q24-Translokationen im Rahmen der FISH miterfasst?
5. Welchen Beitrag leistet die FISH-Untersuchung zur Aufdeckung der Variant-Translokationen?
6. Inwiefern eignen sich eigens aus *E.coli*-Stämmen extrahierte und selbst markierte PAC-Sonden der Immunglobulin-Leichtketten-Genloci λ und κ für eine solche FISH-Analyse?

In der abschließenden Diskussion soll die Frage im Mittelpunkt stehen, welcher diagnostische Stellenwert der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung hinsichtlich der Identifikation der Burkitt-Translokationen insgesamt zukommt und wie im Hinblick auf Therapie und individuelle Prognose zukünftig ein sicherer und praktikabler Nachweis einer varianten 8q24-Translokation erbracht werden kann.

2 Patienten und Kontrollen

2.1 Patienten

2.1.1 Fallzahlen und Diagnosen

Untersucht wurden 31 Patienten mit leukämischem Blutbild, jeder Patient parallel auf das Vorhandensein der Translokationen t(2;8) und t(8;22). Das Patientenkollektiv für beide Translokationsvarianten war zu Beginn der Untersuchung identisch, jedoch gelang es aufgrund geringer Materialbestände und niedriger Materialqualität nicht, jeden Patienten auf beide Translokationen zu untersuchen. Die Verteilung der Patienten mit personenbezogenen Eckdaten und dem Vermerk des Hybridisierungserfolgs für die jeweilige Variant-Translokation ist Tabelle 2.1 zu entnehmen.

Tabelle 2.1

Übersicht über das Patientenkollektiv

Fall	Alter	t(2;8)	t(8;22)	Fall	Alter	t(2;8)	t(8;22)	Fall	Alter	t(2;8)	t(8;22)
1	70/w	+	+	12	61/m	+	+	23	51/w	-	+
2	44/m	+	+	13	20/m	+	+	24	67/m	+	-
3	37/w	+	+	14	42/m	+	+	25	73/m	+	+
4	48/m	+	+	15	30/m	+	+	26	34/m	+	+
5	18/w	-	+	16	49/m	+	+	27	58/m	+	-
6	64/w	+	+	17	59/w	+	+	28	73/m	+	-
7	19/m	-	+	18	58/w	+	-	29	56/m	+	-
8	41/w	-	+	19	17/m	+	+	30	50/w	-	+
9	61/m	+	-	20	26/w	+	+	31 I	60/m	+	+
10	50/w	+	-	21	36/w	+	+	31 II	60/m	+	+
11	61/w	-	+	22	75/m	+	+				

„+“ = Hybridisierung für diesen Ansatz vorhanden; „-“ = Hybridisierung nicht vorhanden

Von den 31 untersuchten Patienten waren 18 männlichen und 12 weiblichen Geschlechts. 2 Patienten liefen im Vorfeld unter der Diagnose NHL, darunter einer mit der Differentialdiagnose Burkitt im Gegensatz zu den 25 Patienten, die klinisch als B-ALL eingestuft wurden. Bei 4 Patienten wurde eine klinisch-diagnostisch nicht weiter spezifizierte ALL angegeben. Bei einem Fall lag bereits das erste Rezidiv vor. Die Knochenmarkprobe eines Patienten wurde unter Kortison-Therapie entnommen. Auf zytogenetischer Ebene wiesen im Vorfeld 10 Patienten eine t(8;14), drei Patienten eine t(8;22) und drei weitere Fälle eine t(2;8)-Translokation auf. In einem Fall konnte die Zytogenetik nur die Beteiligung des Gens an der Stelle q24 des Chromosoms 8 an einer

-Patienten und Kontrollen-

translokativen Veränderung feststellen, ohne den Translokationspartner aufspüren zu können. Drei weitere Patienten trugen zum Teil hochkomplexe genetische Karyotypen, jedoch ohne Beteiligung des Myc-Onkogens. Insgesamt wiesen 7 eine anormale Chromosomenzahl im Karyogramm auf.

Für die FISH-Untersuchungen lag mir in 21 der 31 Fälle bereits aufgearbeitetes Knochenmark vor. Dabei handelte es sich um in einer Zellsuspension fixierte Zellen. In 11 Fällen stand mir analog präpariertes venöses Blut zur Verfügung. Für den direkten Vergleich untersuchte ich in einem Fall sowohl Blut- als auch Knochenmarkproben desselben Patienten. Daher wird Fall 31 in der abschließenden Bewertung der Tauglichkeit von archiviertem Patientenmaterial eine besonders wichtige Rolle zukommen. Am Ende der Versuchsreihe lag schließlich für 19 von 31 Patienten ein Ergebnis für beide Translokationsvarianten vor. Für die übrigen zwölf Patienten konnte ich nur Ergebnisse für eine der beiden Translokationsvarianten liefern, wobei die Gründe dafür in der anschließenden Diskussion noch detailliert beleuchtet werden.

Eine dezidierte Aufstellung und Beschreibung des Patientenkollektivs ist Tabelle 8.2 im Anhang zu entnehmen.

Die Patientenproben, welche zuvor im Rahmen der zentralen zytogenetischen Diagnostik der deutschen multizentrischen Therapiestudie der ALL der Erwachsenen *GMALL (German multicenter studygroup for adult ALL)* in Form von Blut- und/oder Knochenmarkproben an das Institut für Klinische Genetik der Philipps-Universität Marburg zur Analyse übersandt wurden, lagen zu Beginn der Untersuchung in sehr unterschiedlicher Qualität und Quantität bei -20°C aufbewahrt in Form von über mehrere Jahre archivierter Zellsuspensionen fixierter Zellen aus Zellkulturen vor. Die Diagnose und in weiten Teilen auch der genaue Karyotyp lag mir bis zum Ende der Auswertung der Versuchsreihen nicht vor. Die zytogenetische Befundung, soweit erfolgt, wurde im Rahmen der Routinediagnostik von den Kollegen des Instituts für Zytogenetik der Philipps-Universität Marburg vorgenommen.

Zur Etablierung der Sonden für die Leichtketten-Loci und deren Anwendung auf das Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierungsprotokoll diente zu Beginn die Zelllinie RiFo280/93 einer reifen B-Zell-Leukämie mit 48 Chromosomen und einem komplex-aberranten Karyotyp.

2.2 Kontrollen

2.2.1 Beschreibung des Kontrollgruppenkollektivs

Als Kontrollen dienten Zellsuspensionen fixierter Zellen, gewonnen aus EDTA- bzw. Heparin-Blut von 10 gesunden Probanden. Alle Proben lagen bereits in einer PHA-Aufarbeitung vor und dienten zuvor einer früheren Untersuchung als Kontrollkollektiv. Die Auswertung der Ergebnisse der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung der Kontrollen erfolgte analog zu den Patientenproben. Anhand dieser Ergebnisse konnten so der „Cut-Off“-Level der Sonden, sprich der Schwellenwert, ab dem ein Befund als positiv für die untersuchte Translokation zu bewerten ist, ermittelt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Beschreibung der eingesetzten Materialien

3.1.1 Patientenproben

Die Untersuchung erfolgte an Knochenmarkaspirat aus Sternal- und Spina-Iliaca-Punktionen oder peripherem Blut, welches im Rahmen der studienbegleitenden zentralen Diagnostik der GMALL-Studie (*German multicenter studygroup for adult ALL*) nach schriftlicher Einwilligung der Patienten entnommen worden war. Das Material lag dem Institut für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg zur zytogenetischen Befundung vor und wurde anschließend in geeigneten Gefriereinrichtungen zur weiteren Analyse archiviert. Die ältesten Proben, die im Rahmen meiner FISH-Analysen untersucht wurden, sind auf das Jahr 1996 datiert. Lagerungsbedingt stand für meine Untersuchungen Material in unterschiedlicher Qualität zu Verfügung.

3.1.2 Kontrollproben

Die Untersuchung des Kontrollkollektivs zur Ermittlung der Rate an falsch positiven Befunden erfolgte an zehn gesunden Probanden deren Proben für meine Arbeit anonymisiert wurden. Das Blut, das den fünf weiblichen und fünf männlichen Probanden nach deren Genehmigung abgenommen wurde, durchlief schon vor Beginn meiner Versuchsreihe das entsprechende Protokoll zur Aufreinigung der Chromosomen und diente zuvor einer früheren Arbeit des Instituts als Kontrollmaterial.

3.1.3 DNA-Sonden

3.1.3.1 Sonden für den c-MYC-Lokus

Zur Detektion des c-MYC-Lokus diente die LSI c-myc SO (*Spectrum Orange*)-Sonde der Firma *Abott/Vysis*. Diese hybridisiert an der Bandenregion 8q24.12-q24.13 des

humanen Chromosoms 8. Das hybridisierte Fluoreszenzsignal leuchtet im mit entsprechenden Filtern ausgestatteten Fluoreszenzmikroskop neon-orange sowohl in Interphasekernen als auch in Metaphase-Chromosomen. In Interphasekernen gesunder Zellen erscheinen nach der Hybridisierung zwei einzelne Signale. Je nach Kondensierungszustand der DNA und des relativen Abstands zwischen den Chromatiden können die Signale gesplittet bzw. diffus erscheinen. Dies darf in der späteren Auswertung nicht als „echte“ Chromosomenaberration fehlgedeutet werden. In normalen Metaphase-Chromosomen kann jedes Chromosom 8 ein oder zwei Signale führen (Quality Assurance Certificate 2003).

In einem parallelen Ansatz erfolgte der Versuch der Extraktion von Vektor-DNA für den c-MYC-Lokus (chr8:128,817,685-128,822,853) aus E.coli-Stämmen. Diese, analog zu den Ig-Leichtketten-Sonden als Hauptgegenstand meiner Arbeit, verdanken wir ebenfalls dem BACPAC Resources Center des CHORI (Children's Hospital Oakland Resources Center). Im Einzelnen sind hier die Bakterienstämme dJ944B18 (plate: 944, row: B, column: 18) und dJ968N11 (plate: 968, row: N, column: 11) zu nennen. Aufgrund des aufwendigen Extraktionsverfahrens, dem Verdacht einer Kreuzhybridisierung mit dem IgH-Lokus und dem Vorhandensein erprobter c-MYC-Sonden wurden diese Sondenansätze trotz erfolgreicher Extraktion und Etablierung anhand der Kontrollen in der späteren Untersuchung des Patientienkollektivs nicht eingesetzt. Prinzipiell wäre ein Einsatz jedoch möglich und kann in einer weiteren Arbeit verfolgt werden.

3.1.3.2 Sonden für die Ig-Leichtketten-Loci λ und κ

Voraussetzung für die Gewinnung spezifischer DNA-Sonden für die Ig-Leichtketten-Loci λ und κ und somit Grundlage meiner Arbeit war die Bereitstellung von bakterieller Plasmid-DNA, in welche die DNA-Sequenzen der Sonden artifiziell eingebracht werden konnte. Diese E.coli-Stämme mit entsprechender Plasmid-Ausstattung wurden mir für meine Untersuchungen freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. Mariano Rocchi (Universität Bari, Italien) zur Verfügung gestellt und entstammen alle dem BACPAC Resources Center des Children's Hospital Oakland Research Institute (CHORI) unter der wissenschaftlichen Leitung von Pieter de Jong (dJ).

-Material und Methoden-

Für den Ig-Leichtkettenloкус κ (chr2:88,937,791-89,400,985) stand mir für meine Versuchsreihe der E.coli-Stamm dJ1117G4 (plate: 1117, row: G, column: 4) mit dem entsprechendem PAC-Vektor zur Verfügung. Dieser umfasst folgende Basenfolge:

(<http://www.biologia.uniba.it/rmc/TUMORS/project/LOCI/IgK-2.html>)

```
1 gatcttcacg caggcctcat gttagagact gcttggcacc attttggctc ctgcacacct
61 gtaagtgtcc catctaccca cctgccctat gtcagatggt ccaggaaata aggcctttgg
121 ctaaatagtc cttttgaagt cccccatagc acacctgact acatcctcat tgatctttct
181 cttagtcatc tctcctctaa tgacatttta tttatccatc agccatttta tcttattttc
241 tgtcctgata tatgtgtttg ctttgcagtt ttttctttgg gtccctacta attatgtttg
301 tgcaattggt taaggcagga cacttggatg taagaattct cctgttctgt tgactctaag
361 aagccagagt cacattgttc tatggcccaa ccaggccttt ggggctcatt gttggccacc
421 ccactgaggc tncaggattt tctgn
```

Für den Ig-Leichtkettenloкус λ (chr22:22,245,313-22,252,495) analog standen sogar zwei E.coli-Stämme bereit: dJ1019H10 (plate: 1019, row: H, column: 10) und dJ869I1 (plate: 869, row: I, column:1). Der PAC-Vektor in Stamm dJ1019H10 umfasst folgende Basenfolge:

(<http://www.biologia.uniba.it/rmc/TUMORS/project/LOCI/IgL-22.html>)

```
1 ttcaacaatt gtaggaatca tttcagtaaa ccaaacacaa gagcctcaac tataactaca
61 agtcctccag gagaggagaa cgctgtctca gaggggtgcat tcctactgga atttctcttc
121 tctttgggac aaaccagccc agaggaggca caggggtgtg gtgtcatctg gtttcctaga
181 tgagggtgtc cctcctcact gtcttgagat tttgaagaaa ctggggagat tgggtgcagac
241 actccttggg tccttacagg aaacttcctt cagaccacac actcctcaat ttgttcccaa
301 gctccaaaagt ttctaaagtc actgtctaaa gggcccacag tgtttttgtg gagtgggtgga
361 aaagctctgg ggatgggaagn gggggggggg tgcaaacatt ctgaatgtcc tactggtgct
421 gatgcnactt caat
```

Der wenige Nukleotide größere Vektor für den Ig-Leichtkettenloкус λ aus Stamm dJ869I1 umspannt diese Basenfolge:

(<http://www.biologia.uniba.it/rmc/TUMORS/project/LOCI/IgL-22.html>)

```
1 gatctataat ataaattgga gacttcagta cccacttta aaaaagaata gaacatatga
61 acaaaagatt aataggaaaa tgcagctatt gaacactata atccagctag acctaacaga
121 tatatacaaa atactgcaca aaacaaaagc agaatacaca tctactcaag agcacaatgga
181 acattctcca gaatggacgc tatttttaggc cttaaaacaa ttctcaacag ttttttaaaa
241 cttgaagtca tacagggagt catctaaaac caccaggaaa cgaagtttgg gtaggggagg
301 aacaatattt ccttctactc aacttagatt tattggccag cagtccctat cacacaagac
361 agattaacaaa ataaactcat gcacatttat taaattaatt tttcttgcac gggagcttta
421 ataggaatga aactcagaga atggtgac
```

Aufgrund einer schwachen, jedoch die Auszählung der Hybridisierung möglicherweise erschwerenden Kreuzhybridisierung im Chromosomenabschnitt 9q22 des dJ 869I1-Vektors wählte ich nach mehreren Testhybridisierungen an Zelllinie 280/93 den Stamm dJ1019H10 für die eigentliche Versuchsreihe.

Die Plasmid-DNA für die Leichtketten-Sonden wurde aus diesen E.coli-Stämmen im Rahmen meiner Arbeit in mehreren Chargen aufgearbeitet.

3.1.4 Auflistung der verwendeten Materialien

Alle verwendeten Geräte und Materialien wurden mir freundlicherweise vom Institut für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg zur Verfügung gestellt, in dessen Laboratorien auch sämtliche Versuchsreihen meiner Arbeit ausnahmslos durchgeführt wurden. Eine ausführliche tabellarische Übersicht über die Materialien ist dem Anhang am Ende meiner Ausarbeitung angefügt (Tabelle 8.1).

Die benötigten Analyselösungen werden in den Folgenden Abschnitten über die Aufarbeitungstechnik detailliert beschrieben und am Ende des entsprechenden Kapitels in einer Kurzen Übersicht zusammenfassend aufgeführt. Alle Markennahmen sind urheberrechtlich geschützt.

3.2 Technik der lokusspezifischen Chromosomendarstellung

3.2.1 Grundlagen der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die in den Sechziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts entwickelte Technik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ist zurückzuführen auf Arbeiten von Joseph G. Gall und Mary Lou Pardue (1969). Ihnen gelang die Anlagerung von radioaktiv markierter Test-DNA an stationäre DNA von *Xenopus* (Pardue und Gall 1969), einer Technik, mit der erstmals ausgewählte DNA-Abschnitte in Chromosomen oder Zellkernen dargestellt werden konnten. Die Wissenschaftler nutzten dabei die Eigenschaft von Einzelstrang-DNA, sich an korrespondierende Sequenzen anzulagern. Während aber die Forscher zu ihrer Zeit noch auf die Verwendung radioaktiver Elemente angewiesen waren, schaffte die Einführung fluoreszierender Analoga eine Vereinfachung und Risikooptimierung der Methode, die sich darüber hinaus bis heute kaum verändert hat.

Nach wie vor werden also markierte DNA-Sonden verwendet, deren Sequenz spezifisch für einen bestimmten Chromosomenabschnitt ist. Dies ermöglicht die Analyse struktureller wie auch numerischer Chromosomenaberrationen. Großer Vorteil der Methode ist ihre Durchführbarkeit nicht nur an Metaphasechromosomen, sondern auch an solchen, die sich in der Interphase des Zellzyklus befinden. Das macht die Technik geeignet für Gewebe, die sich durch eine nur geringe bzw. gar nicht vorhandene Zellteilungstendenz auszeichnen und soll zentrales Argument für die Durchführung der

Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung an Tumor-Chromosomen von ALL-Patienten im Rahmen meiner Arbeit sein.

In meinen Analysen nutzte ich direkt markierte Sonden, sprich solche, die schon selbst flurochrom-markierte Nukleotide gebunden hatten und keiner weiteren Detektion bedurften. Im Gegensatz dazu macht man sich bei den indirekten Nachweismethoden in der Regel die Affinität von Biotin zu Avidin oder Streptavidin zu Nutze. Nach der Hybridisierung werden die mit Biotin markierten Nukleotide mit Avidin behandelt, das mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Durch die Anlagerung des flurochrom-markierten Avidins an die Biotinmoleküle werden die hybridisierten DNA-Sonden unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

Da im Rahmen meiner Arbeit die beiden varianten 8q24-Translokationen untersucht werden sollten, sprich sowohl die $t(2;8)(p11;q24)$ und $t(8;22)(q24;q11)$, wurden drei verschiedene Sonden für die Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung benötigt. Auf der einen Seite eine kommerziell erworbene Sonde vom direkt-markierten Typ für den c-MYC-Lokus (Fa. Vysis) für die daher keine weiteren Markierung notwendig war. In der Erprobungsphase meiner Arbeit gelang zwar die Eigenextraktion entsprechender c-MYC-Sonden aus geeigneten E.coli-Stämmen, aus bereits erwähnten Erwägungen bekamen die kommerziellen Sonden den Vorzug. Auf der anderen Seite bedarf es je einer Sonde für die Ig-Leichtketten-Loci auf Chromosom 2 und 22. Diese mussten für die Analyse in einem vorangehenden Arbeitsschritt aus E.coli extrahiert werden, da ein etabliertes Äquivalent bis dato nicht zur Verfügung stand. Die Markierung der Sonden wurde von mir vor jeder neuen Hybridisierung neu vorgenommen, da es im Gegensatz zu den kommerziell erworbenen c-MYC-Sonden nicht möglich war die selbst extrahierte PAC-DNA in gleich bleibender Qualität über einen längeren Zeitraum im markierten Zustand zu lagern.

3.2.2 Aufarbeitung der Kontrollproben

3.2.2.1 *Chromosomenpräparation aus Blutlymphozyten*

Grundlagen:

Zur Kultivierung von Metaphasechromosomen werden solche Zellen benötigt die sich in Teilung befinden. Das Verfahren, das erstmals von Moorhead im Jahre 1960 etabliert

-Material und Methoden-

wurde, ermöglicht die Chromosomenpräparation einerseits von Knochenmarkzellen, auf der anderen Seite von somatischen Zellen, z.B. peripheren Blutlymphozyten (Moorhead et al. 1960). Vorbedingung ist die vorangehende Anregung zur Teilung in vitro. Diese wird durch Phythämagglutinin (PHA), einem Extrakt aus Bohnensamen, gewährleistet. Um die Ausbildung des Spindelapparates zu verhindern und dadurch die mitotische Zellteilung in der Metaphase erstarren zu lassen muss das Mitosegift Colchecin, ein Colcemid-Derivat eingebracht werden. Durch die Behandlung mit hypotoner Kalziumchloridlösung (KCl) wird den Zellen ein „osmotischer Schock“ versetzt, dessen Folge ein Zerplatzen der Metaphasezellen durch Aufquellung des Zytoplasmas ist. Zu beachten ist, dass im Falle der Chromosomenpräparation aus peripherem Blut ausschließlich heparinisiertes Vollblut Verwendung finden kann, da der Kalzium-Entzug durch Einbringung von EDTA/Zitrat-Blut das Zellwachstum verhindert, eine Tatsache, die leider im klinischen Alltag allzu oft nicht beachtet wird und somit zu einer unnötigen Erschwerung der Routinediagnostik führt.

Lösungen:

Bikarbonat:	HCO ₃
Colchecin (Colcemid):	Fa. Life-Technologies
Fixativ:	Ethanol/Eisessig 3:1
Mc Coy's Nährmedium:	Fa. GIBCO BRL/ Life-Technologies
Antibiotikalösung:	GIBCO PRL/ Life-Technologies 10.000 IE Penicillin G/ml 10.000 µg/ml Streptomycin 25µg/ml Amphotericin B
Fetales Kälberserum (FCS):	Fa. Life-Technologies

Vorgehen:

Zur Aufarbeitung der Blutlymphozyten der Kontrollproben musste zunächst ein Nährmedium angesetzt werden. Dazu waren 100 ml Mc Coy's Medium, 20 ml zuvor auf Zimmertemperatur abgetautes Fetales Kälberserum (FCS), 1ml der Antibiotikalösung und 1 ml Bikarbonat in einem entsprechenden Gefäß zu vermengen. Jeweils 5 ml dieses Ansatzes wurden in ein kleineres Röhrchen pipettiert und dienten 5 bis 10 Tropfen Blut einer Kontrolle zusammen mit 0,1 ml PHA als finales Nährmedium. Das Medium wurde für 72 Stunden bei 37°C im Brutschrank belassen

wobei es täglich aufgeschüttelt werden musste. Nach Ablauf der 72 Stunden wurde jedem Ansatz 0,4 ml Colcemid (Colchecin) zugegeben und für eine weitere halbe Stunde zurück in den Brutschrank überführt. Parallel war eine der Zahl der Ansätze entsprechende Menge KCl (6 ml pro Ansatz) auf 37°C vorzuwärmen, das Fixativ, bestehend aus Ethanol und Eisessig, im Verhältnis 3:1 an zumischen und bei -20°C im Eisfach zu lagern. Nach verstreichen der 30 Minuten wurden die Röhrchen für 10 Minuten bei 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand war bis auf ca. 1 ml zu verwerfen, der Rest wurde mit einer Pipette vorsichtig gemischt. Der nun noch in den Röhrchen befindliche Ansatz wurde anschließend mit 6 ml des vorgewärmten KCl tropfenweise aufgefüllt und verschlossen für 20 Minuten in den Brutschrank überführt. Nach verstreichen der Zeit wurde den Ansätzen, welche zuvor erneut auf 1 ml abpipettiert wurden, 6 ml vorbereitete Fixativlösung zugegeben und vermischt. Dem Schritt folgten weitere 10 Minuten Zentrifugation bei gleichen Bedingungen. Diese Fixativ-Behandlung wurde in toto vier Male vollzogen, beim letzten Mal bis auf ca. 0,5 ml abpipettiert. Sollte ein Auftropfen der Zellen unmittelbar anschließend erfolgen, wurden nur 0,5 ml, bei einer längeren Lagerungszeit im Eisfach 5 ml Fixativ zugegeben.

3.2.3 Aufarbeitung des Patientenmaterials

3.2.3.1 *Probenentnahme und Transport*

Grundlagen:

Die Analysen erfolgten an Knochenmarkzellen die der Punktion aus Beckendornfortsätzen oder dem Sternum oder aus einer peripheren Blutentnahme entstammten. Da die begonnene Einleitung einer zytoreduktiven Therapie bei den Patienten das Ergebnis der Chromosomenanalyse verfälscht, wurde darauf geachtet, dass die Entnahme zu einem geeigneten Zeitpunkt stattfand. Vereinbarungsgemäß hatten die Proben innerhalb eines Tages im Labor einzutreffen um den Veränderungen des Zellmilieus nach Entnahme zu begegnen. Diese Veränderungen wirken sich auf das Nährstoffangebot, den Abtransport von Stoffwechselprodukten und der Regulierung des Säure-Base-Haushalts der Zellen aus. Dies führt zu einer Verringerung der Zellzahl insgesamt, wirkt sich aber auch auf das Verhältnis der Zellpopulationen aus, da sich der

Anteil der malignen Zellen durch Apoptose oder Überwucherung durch andere stärker reduziert (Williams et al. 1984).

Insgesamt wurden 2-3 ml Knochenmarkaspirat sowie 5-10 ml Blut mit Lithium-Heparin versetzt und unmittelbar darauf folgend per Expresspost an die Tumorzytogenetik der Philipps-Universität Marburg versandt.

3.2.3.2 Zellkulturen

Grundlagen:

Um den leukämischen Zellen möglichst optimale Wachstumsbedingungen in vitro zu bieten, werden für Zellkulturen kommerziell erhältliche Nährstofflösungen verwendet. Da bei weitem noch nicht alle Faktoren, die bei einem optimalen Wachstum solcher Zellen mitwirken, erforscht sind, ist es daher um so wichtiger, das natürliche Zusammenspiel zwischen Blut- und Stromazellen nicht zu zerstören und die physiologischen Wachstumsfaktoren zu erhalten. Das Probenmaterial sollte ohne größere Auftrennung oder andere Manipulationen der zellulären Kompartimente direkt in die Kulturen eingesetzt werden (McGinnes et al. 1991; Manabe et al. 1992; Eder et al. 1992). Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass Leukämiezellen verstärkt auf einen Nebenstoffwechsel zurückgreifen, bei dem der DNA-Baustein Thymidintriphosphat direkt aus Thymidin hergestellt wird (Wilmanns 1967; Hallek et al. 1992). Um einen vermehrten Bedarf der leukämischen Zellen an Thymidin gerecht zu werden, werden die Kulturansätze mit selbigen versetzt. Die Gabe von antibiotisch-wirksamen Substanzen soll die Ausbreitung von Pilzen und Bakterien verhindern. Die Dauer der Zellkultivierung kann sich unterschiedlich auf das Wachstumsverhalten verschiedener Zellarten auswirken, weshalb jede Probe einer anderen Kulturzusammensetzung und Kulturzeit zugeführt wird (Knuutila et al. 1981; Stewart und Secker-Walker 1986; Li et al. 1991).

Lösungen:

McCoy's Nährmedium:	Fa. GIBCO BRL/ Life-Technologies
RPMI 1640 Nährmedium:	Fa. PAN-Biotech (GIBCO BRL)
Antibiotikallösung:	GIBCO PRL/ Life-Technologies
	10.000 IE Penicillin G/ml
	10.000 µg/ml Streptomycin

	25µg/ml Amphotericin B
Fetales Kälberserum (FCS):	Fa. Life-Technologies
Thymidin:	Fa. Life-Technologies

Vorgehen:

Für meine Analysen standen die Präparate aus Knochenmarkaspirat oder peripherem Blut noch aus anderen Untersuchungsreihen zum größten Teil bereit und waren ordnungsgemäß mit Fixativ aufgefüllt bei -20°C in Gefriereinrichtungen gelagert, sodass eine erneute Aufarbeitung der Patientenproben aus dem zu untersuchendem Kollektiv nicht mehr notwendig war. Der Vollständigkeit halber soll die Aufarbeitung des Patientenmaterials, welche von den Kollegen der AG Rieder durchgeführt wurde, vom methodischen Ablauf an dieser Stelle dennoch Erwähnung finden:

Für die Kultivierung der Zellen wurden maximal 0,5 ml Knochenmarkaspirat oder peripheres Blut in 5 ml Kulturmedium eingebracht. Als Kulturmedium fand 5 ml RPMI-1640 oder McCoy's 5a Medium (jeweils mit L-Glutamin und Bikarbonat, Fa. Life Technologies) mit 20% fetalem Kälberserum (FCS) Anwendung. Die Kulturmedien dienten allesamt der Bereitstellung essentieller Nährstoffe und wirkten darüber hinaus einer pH-Verschiebung entgegen. Eventuellen Störungen, die nach Entnahme des Zellmaterials durch Änderung des Milieus entstanden sein konnten, konnte so wirkungsvoll vorgebeugt werden. Die darauf folgende Kurzzeitkultivierung, durchzuführen bei 37°C im Wärmeschrank für 24h, 48h oder 72h, in einigen wenigen Fällen auch für 4 Stunden im 37°C-Wasserbad, diente der Regeneration der Zellen.

3.2.3.3 Chromosomenpräparation

Grundlagen:

Die Chromosomen der Zellen sind im Zellteilungsstadium der Metaphase maximal kondensiert und folglich am besten darstell- und befundbar. Indem den Zellkulturen das Spindelgift Colcemid[®], eine chemisch modifizierte Form des Colchizins, zugegeben wird, kommt es bekanntermaßen zur Hemmung der Ausbildung des Spindelapparates was eine Anhäufung von sich teilenden Zellen im Stadium der Metaphase zur Folge hat. Indes kann eine Zugabe von DNase die Chromosomenqualität verbessern, indem sie überschüssige freie DNA verdaut. Danach erfolgt eine Quellung der Zellen in hypotoner Kaliumchlorid Lösung. Dabei kommt es zur Ausdehnung der Zellen und zur besseren

Verteilung der Metaphasechromosomen. Zur dauerhaften Erhaltung der Struktur der Chromosomen werden diese in mehreren Zyklen mit einem Eisessig/Methanol-Gemisch, dem sog. Carnoy's Fixativ, behandelt. Es bewirkt die abschließende Auflösung der Zellmembran und schafft so die Voraussetzung der weiteren Analyse der Chromosomen.

Lösungen:

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

Vorgehen:

Die Chromosomen sind im Stadium der Metaphase des Zellteilungsprozesses für die Bandenanalyse (für deren Zweck diese Kultivierung vornehmlich durchgeführt wurde) am besten darzustellen. Jedoch waren für meine Arbeit Metaphasen nicht zwingend erforderlich, da die mikroskopische Auswertung an Interphasekernen zu erfolgen hatte, deren ausreichendes Vorhandensein im Rahmen der Aufarbeitung fast immer gewährleistet werden konnte. Daher wurde 2 Stunden vor Beendigung der Kulturzeit 0,1 ml des Spindelgiftes Colcemid (Fa. Life Technologies) zugefügt. Die Colcemid-Endkonzentration betrug 0,2 µg/ml Medium. Nach Ablauf der Colcemid-Einwirkzeit wurden die Zellen bei 1000 U/min für 7 Minuten zentrifugiert. Der Entfernung des Überstandes und der Resuspension des Sediments folgte die langsame, unter Beachtung der fortlaufenden homogenen Durchmischung durchgeführte Zugabe von 9 ml 0,0075 M hypotoner Kaliumchlorid (KCl)-Lösung. Die hypotone Lösung bewirkt den Gesetzen der Diffusion folgend eine Aufquellung der Zellen und eine bessere intrazelluläre Ausbreitung der Chromosomen. Nach 15minütiger Einwirkungszeit erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Diesmal bei 700 U/min für 10 Minuten. Die nun im Überstand befindliche hypotone KCl-Lösung wurde dekantiert und das Sediment vorsichtig resuspendiert. Zur anschließenden Fixation diente kaltes Carnoy's Fixativ (Methanol:Eisessig = 3:1; -20°C). Die Arbeitsschritte Zentrifugation bei 900 U/min, Abnahme des Überstands und Resuspendierung des Sediments wurden insgesamt drei Mal vollzogen. An dieser Stelle konnte das Auftropfen der Zellsuspension auf geeignete

Objektträger (hier der Fa. Marienfeld) erfolgen und der regelhaften zytogenetischen Chromosomenbandenanalyse zugeführt werden. Zur weiteren Verwendung wurde die verbliebene Zellsuspension mit Fixativ aufgefüllt und bei -20°C in entsprechen Gefriereinrichtungen gelagert. In diesem Zustand standen die Zellkulturen meinen Analysen zur Verfügung.

3.2.4 Extraktion von Plasmid-DNA aus E.coli zur Sondengewinnung

Grundlagen:

Voraussetzung für die Gewinnung der DNA-Sonden ist das Vorhandensein von bakterieller Plasmid-DNA, in welche die DNA-Sequenzen der Sonden artifiziell eingebracht werden. Diese E.coli-Stämme mit entsprechender Plasmid-Ausstattung wurden mir für meine Untersuchungen freundlicherweise von Prof. Mariano Rocchi (Universität Bari, Italien) zur Verfügung gestellt und entstammen alle dem BACPAC Resources Center des Children's Hospital Oakland Resources Institute (CHORI) unter der wissenschaftlichen Leitung von Pieter de Jong.

Plasmide sind zirkuläre DNA-Fragmente bakterieller Herkunft, die zur autonomen und extrachromosomalen Replikation fähig sind. Da sie regelhaft ein Antibiotikaresistenzgen tragen, sind sie molekulargenetisch höchst interessant. So werden Plasmide als Vektor-DNA zur Klonierung von DNA-Fragmenten verwendet. Für meine Arbeit konnte ich auf so genannte PACs zurückgreifen. Diese, den BAC-Vektoren zuzuordnenden künstlichen Bakterienchromosomen (*bacterial artificial chromosomes*, BACs), haben den Vorteil, dass durch sie auch 50-300 kb große DNA-Fragmente kloniert werden können. Im Gegensatz zu den BAC-Vektoren haben PACs (*P1-derived artificial chromosomes*) den Replikationsursprung des Bakteriophagen P1. Die transformierten E.coli-Bakterien werden unter geeigneten Bedingungen und unter Antibiotika-Selektion (verhindert das Anwachsen von nicht-transformierten Stämmen) gezüchtet. Der anschließenden Zentrifugation folgt die Zugabe von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), welches durch Kationenentzug die äußere Bakterienmembran schwächt, und Lysozym, welches das Peptidoglykan der Bakterienzellwand degradiert. Durch Beigabe von Natriumdodecylsulfat (SDS), einem ionischen Detergenz und Natriumhydroxid (NaOH) werden die Zellen lysiert. Während SDS eine Denaturierung der Proteine bewirkt denaturiert NaOH aufgrund seines hohen pH-Werts doppelsträngige DNA-Moleküle. Dabei ist entscheidend, dass die

-Material und Methoden-

komplementären Stränge linearer DNA-Moleküle vollständig voneinander getrennt werden, während die Einzelstränge zirkulär geschlossener Plasmide ineinander verschränkt bleiben. Durch Absenkung des pH-Werts, beispielsweise durch Acetat, wird eine Renaturierung der denaturierten DNA erreicht. Die kurze Plasmid-DNA renaturiert relativ schnell und vollständig, während die lange, chromosomale Bakterien-DNA denaturiert verbleibt. Durch verschiedene Zentrifugationsschritte werden diese beiden DNA-Bestandteile voneinander getrennt (die renaturierte Plasmid-DNA verbleibt im Überstand, die chromosomale DNA, RNA und Proteine aggregieren und pelletieren). Die Plasmid-DNA kann anschließend mit Alkohol (Ethanol oder Isopropanol) gefällt, gewaschen und in Puffer gelöst werden.

Für die weitere Aufreinigung der Plasmid-DNA fand früher standardmäßig die Methode der Dichtegradientenzentrifugation Anwendung. Heutzutage wird Plasmid-DNA üblicherweise durch Ionenaustauschchromatographie oder Bindung an Silikatoberflächen weiter aufgereinigt, wobei analog zu meinem Protokoll erstere Anwendung fand.

Bei der Ionenaustauschchromatographie wird die noch unreine Plasmid-DNA-Lösung bei relativ hoher Salzkonzentration auf einen Anionentauscher, üblicherweise eine Diethylammoniummethyl-(DEAE)-Matrix, gegeben. Proteine, die im Gegensatz zu Nukleinsäuren nur relativ wenige negative Ladungen aufweisen können unter diesen Bedingungen nicht mehr an die positiv geladene DEAE-Matrix binden, während die polyanionischen Nukleinsäuren in selbiger verbleiben. Durch eine weitere Erhöhung der Salzkonzentration wird zunächst die RNA von der Matrix gewaschen. Die Eluation der Plasmid-DNA erfolgt schließlich durch eine letzte Erhöhung der Salzkonzentration. Das nun überflüssige Salz ist durch eine abschließende Fällung mit Ethanol einfach zu entfernen (Quiagen[®] Genomic DNA Handbook 1995; Mülhardt 2003; Seyffert 2003).

Lösungen:

Alkohol (70%ig); vergällt:	Fa. Riedel de-Haën
Aqua ad iniectabilia Braun:	Fa. B. Braun Melsungen AG
ATP-Abhängige Exonuklease:	Fa. Quiagen [®] GmbH
ATP-Lösung:	Fa. Quiagen [®] GmbH
Exonuklease Solvent:	Fa. Quiagen [®] GmbH
	20 mM KCl
	20 mM K ₂ P ₄ O ₇ , pH 7,5

-Material und Methoden-

EX-Puffer:	Fa. Quiagen® GmbH
HPLC-H ₂ O	
Isopropanol/ 2-Propanol	
Kanarmycin	
LB Broth (Luria Bertani):	International Diagnostics Group plc
	10 g/l Trypton
	5 g/l Yeast-Extrakt
	10 g/l Natriumchlorid
NaOH	
P1-Puffer (2-8°C):	Fa. Quiagen® GmbH
	50 mM Tris Cl, pH 8,0
	10mM EDTA
	100 µg/ml Rnase A
P2-Puffer (RT):	Fa. Quiagen® GmbH
	200 mM NaOH
	1% SDS
P3-Puffer (RT):	Fa. Quiagen® GmbH
	3,0 M potassium Acetat, pH 5,5
QBT-Puffer (RT):	Fa. Quiagen® GmbH
	750 mM NaCl
	50 mM MOPS, pH 7,0
	0,15% Triton®, X-100
QC-Puffer (RT):	Fa. Quiagen® GmbH
	1,0 M NaCl
	50 mM MOPS, pH 7,0
	15% Isopropanol
QF-Puffer (RT):	Fa. Quiagen® GmbH
	1,25 mM KCl
	50 mM Tris Cl, pH 8,5
	15% Isopropanol
QS-Puffer:	Fa. Quiagen® GmbH

Vorgehen:

Das im Folgenden beschriebene Verfahren zur Extraktion von Plasmid-DNA aus E.coli-Bakterien zur Herstellung von DNA-Sonden erfolgte analog zum *Large-Construct Kit Protocol* der Firma Quiagen[®]. Von mir genutzt wurde ein DNA-Aufbereitungsset der Firma Quiagen[®] (Quiagen[®] Large-Construct Kit), in dessen Lieferungsumfang alle Pufferlösungen, Filter und Anionentauschersäulen gebrauchsfertig bereitstanden.

Vor Beginn der Extraktion mussten die E.coli-Bakterien soweit vermehrt werden, dass die in ihnen klonierten Plasmide in ausreichend hoher Kopienzahl vorhanden sein würden. Dazu wurde 25g LB Broth (Luria Bertani) mit entionisiertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt und mit 1 M NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Die Lösung wurde für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert und nach ausreichender Abkühlung anschließend auf zwei geeignete Erlenmeyerkolben zu je 500 ml aufgeteilt. Jedem Lösungsansatz wurden dann 625µl Kanarmycin und 100 µl der entsprechenden Bakterienkultur (dJ1019H10 oder dJ1117G4) beigelegt und über Nacht bei 37°C unter kontinuierlichem Schwenken inkubiert. Von nun an beginnend bis zum Ende der Prozedur war stets penibel darauf zu achten, alle verwendeten Gefäße mit dem beinhaltendem Bakterienklon zu beschriften, um unter allen Umständen einer Verwechslung der Sonden in jeder Arbeitsphase entgegenzuwirken.

Nach Kontrolle des Inkubationserfolgs, eine deutliche Trübung des Mediums ließ auf ein Anwachsen der Bakterienkultur schließen, waren die Kulturansätze in zentrifugensichere Kunststoffgefäße umzufüllen und für 15 Minuten bei 4°C und 6000 Umdrehung pro Minute (rpm) zu zentrifugieren. Die 6000 rpm entsprachen 6000 x g (Erdbeschleunigung) bei dem von mir genutzten Sorvall GS3-Rotor. Der Überstand wurde in die ursprünglichen Erlenmeyerkolben zurück gegossen und im Autoklaven inaktiviert.

Jedes einem 500 ml-Ansatz entstammende Pellet wurde in den Gefäßen durch Zugabe von 20 ml P1-Puffer (entsprechend 20 ml pro Bakterienstamm) und anschließendes Vortexen und Pipettieren resuspendiert, bis alle Pellet Bestandteile vollständig gelöst waren. Jeder Lösung wurde zunächst 20 ml P2-Puffer beigelegt, durch seichtes Invertieren gemischt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur und im gut verschlossenen Behälter inkubiert. Darauf folgend wurde den Ansätzen je 20 ml P3-Puffer beigelegt, durch erneutes Invertieren gemischt und für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Bei jedem dieser Schritte musste in jedem Fall auf ein Vortexen verzichtet werden. Nach Verstreichen der letzten Inkubationszeit wurden beide Ansätze für 60

-Material und Methoden-

Minuten bei 4°C und 6000 rpm im Sorvall GS3-Rotor zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde filtriert, wobei darauf zu achten war, dass der Filter im Vorhinein mäßig mit destilliertem Wasser befeuchtet wurde. Dem Filtrat waren 0,6 Anteile 2-Propanol hinzuzufügen. Der Ansatz wurde zentrifugiert. Dieses Mal für 40 Minuten bei 10.000 rpm bei 4°C im Sorvall SS-34-Rotor, wobei hier 10.000 Umdrehungen in der Minute 15.000 x g entsprachen. Dafür waren die Ansätze in entsprechend kleinere Zentrifugenröhrchen umzufüllen.

Der Überstand wurde wieder abgegossen und jedem Ansatz 5ml 70% Alkohol hinzugefügt und für 20 Minuten bei 10.000 rpm und Raumtemperatur im Sorvall SS-34-Rotor zentrifugiert. In der Zwischenzeit war die ATP-abhängige Exonuklease in 225 µl der für diesen Zweck angedachten Exonuklease-Lösung (Fa. QUIAGEN) vollständig, ggf. durch Antippen des mitgelieferten Behältnisses, zu lösen.

Nach Beendigung des Zentrifugationsintervalls war der Überstand zu verwerfen. Zur Trocknung der Pellets wurden die Zentrifugenröhrchen kopfüber (als Unterlage waren gewöhnliche Papiertücher dienlich) abgestellt und für drei Minuten in dieser Position belassen. Hatte sich der Alkohol ausreichend verflüchtigt, wurde jedem Ansatz je 9,5 ml EX-Puffer hinzugefügt um die Pellets zu lösen. Dabei wurden die Lösungen nur durch leichtes Schwenken der Behältnisse vermischt, da zu starkes Schütteln oder ein Auf- und Ab Pipettieren der Ansätze eine Spaltung der PAC-DNA zur Folge hätte haben können.

Anschließend wurde den Ansätzen 200µl der vorbereiteten Exonuklease-Lösung und 300 µl ATP-Lösung zugeführt. Während die Ansätze für eine Stunde im 37°C-Wasserbad inkubiert wurden musste der QF-Puffer in einem separaten, entsprechend heißen Wasserbad auf 65°C erwärmt werden. Zehn Minuten vor Ablauf der einstündigen Inkubationsphase mussten die Ionentauschersäulen (jedem Plasmid-Stamm wurde selbstverständlich eine Säule zugeordnet) dahingehend vorbereitet werden, dass durch jede 10 ml QBT-Puffer durchzulaufen hatte. Mit diesem Puffer wurde die Bindungskraft der Säule eingestellt bzw. äquilibriert. Anschließend, nach Ende der Inkubationszeit, wurden die DNA-Lösungen durch die Säulen geleitet und anschließend mit je 60 ml QC-Puffer ausgewaschen. Der Überstand wurde regelmäßig verworfen. Abschließend wurden die in der Matrix fixierten Plasmide mit je 15 ml QF-Puffer, der im Vorhinein auf 65°C erwärmt wurde, eluiert und der Überstand mit der Plasmid-DNA aufgefangen.

An dieser Stelle unterbrach ich planmäßig die Prozedur und lagerte die Behälter über Nacht bei 4°C.

Am zweiten Tag der Aufarbeitung wurde den gelagerten Ansätzen je 10,5 ml Isopropanol zugegeben, durch leichtes Schwenken gemischt und bei 4°C für 35 Minuten bei 10.000 rpm im Sorvall SS-34-Rotor zentrifugiert. Der Überstand war zu verwerfen. Die verbliebene DNA wurde mit 5 ml 70% Alkohol gewaschen und abschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur und 10.000 rpm zentrifugiert. Der Alkohol wurde erneut abgegossen. Das Pellet war dann nach gründlicher Trocknung in 300 µl HPLC-H₂O zu lösen. Der DNA-Gehalt wurde in einer 1:80-Verdünnung photometrisch gemessen und der Wert notiert. Die Ansätze wurden dann in geeigneten Eppendorf-Cups bei -20°C gelagert.

Die photometrische Ermittlung der DNA-Konzentration war dahingehend wichtig, da die Markierung der DNA-Sonden konzentrationsabhängig durchgeführt wurde.

3.2.5 Untersuchung der 8q24-Translokationen mittels DNA-Sonden

3.2.5.1 *Markierung der Sonden durch Nick-Translation*

Grundlagen:

Seit einiger Zeit drängen mehr und mehr nicht-radioaktive Nachweismethoden auf den Markt, die inzwischen eine recht gute Alternative zu den radioaktiven Sonden darstellen. Deren Vorteil ist zum einen der weitgehend gefahrlose Umgang und zum anderen die lange Halbwertszeit (Mülhardt 2003).

Technisch beginnt die Nick-Translation damit, dass die Template-DNA zunächst mit DNase I in Gegenwart von Mb^{2+} -Ionen angedaut wird, sodass unter diesen Bedingungen das Enzym nur einen der beiden Stränge schneidet. Prinzipiell bleibt der Doppelstrang in seiner Grundstruktur erhalten. Im zweiten Schritt bearbeitet man das Template mit DNA-Polymerase I in Gegenwart von Nukleotiden von denen eines oder mehrere markiert sein sollten. Während die Methode in ihrem Ursprung den Austausch der Base Thymin gegen die mit Digoxigenin oder Biotin markierte analoge Base Uracil vorsieht (Rigby et al. 1977), sodass nach der Hybridisierung diese Markermoleküle über Reportermoleküle z.B. mit roten oder grünen Fluoreszenzfarbstoffen sichtbar gemacht werden, erforderte die Markierung der DNA für meine Untersuchungen eine kleine

-Material und Methoden-

Abwandlung. So wurden zu den unmarkierten Nukleotidbausteinen im vorher festgelegten Konzentrationsverhältnis zwei direkt markierte Nukleotide hinzugefügt: Fluorescein-12-dATP und Fluorescein-12-dCTP (Fa. Perkin-ElmerTM). Diese ließen die Sonden unter dem Fluoreszenzmikroskop grün (*spectrum-green*; SG) leuchten. Ganz gleich jedoch, welcher Variante man sich bedient, erkennt die Polymerase die Schnitte (*nicks*), die durch die DNase I gesetzt wurden und verlängert an diesen Punkten das freie 3'-Ende, während das 5'-Ende gleichzeitig abgebaut wird. Demzufolge wird der alte Strang durch einen neuen mit Markierung ersetzt.

Entscheidend bei dieser Methode ist die Wahl der richtigen DNase I-Konzentration. Eine zu hohe Konzentration würde die Template-DNA in viele kleine, unbrauchbare Stücke zerschneiden, eine zu niedrige würde nur sporadisch Schnitte setzen und die spezifische Aktivität der DNA fällt zu gering aus.

Lösungen:

C ₀ t 1-DNA:	1 mg/ml ; Fa. Life Technologies
DNA:	PAC dJ 1010H10 PAC dJ 1117G4
Ethanol:	100 Vol % 70 Vol %
Fluorescein-12-dATP; NEL-465:	Fa. Perkin-Elmer TM
Fluorescein-12-dCTP; NEL-424:	Fa. Perkin-Elmer TM
Formamid:	100% deionisiertes Formamid ultra pure Fa. Gibco BRL/Life Technol.

Vorgehen:

Da ich für den MYC-Lokus auf Chromosom 8 kommerzielle, bereits markierte Sonden der Firma Vysis verwenden würde, war an dieser Stelle ausschließlich die Plasmid-DNA zu markieren, die im Vorhinein wie beschrieben aus den entsprechenden E.coli-Stämmen dJ 1019H10 und dJ 1117G4 (jeweils für die Ig-Leichtketten-Loci λ und κ) extrahiert wurden. Erst durch die Markierung ging die Template-DNA in den „Sonden-Status“ über.

Zu Beginn waren die Reaktionsgefäße mit der entsprechenden Sonden-Bezeichnung zu beschriften und auf Eis kühl zu lagern. Ebenfalls sollten von hier an alle Pipettierarbeiten grundsätzlich auf Eis geschehen, um einer vorzeitigen Enzymreaktion

-Material und Methoden-

entgegenzuwirken. Es stellte sich im Laufe der Verfahrensetablierung heraus, dass es erforderlich war für jede Hybridisierung die benötigten Sondengemische einzeln zu markieren. Dementsprechend viele Reaktionsgefäße mussten im Vorhinein bereitgestellt werden. Eine Markierung der DNA auf Vorrat erwies sich hinsichtlich der Hybridisierungsstabilität als ineffizient.

Zuerst mussten die nicht markierten Nukleotide auf Eis abgetaut, anschließend gevortext und durch leichtes Auf- und Ab- Pipettieren gemischt werden. Kurz vor Gebrauch wurden die markierten Nukleotide unter lichtgeschützten Bedingungen auf dieselbe Weise abgetaut. Abhängig von der Anzahl der geplanten Hybridisierungen und entsprechend erforderlichen Sonden-Einheiten mussten die Einzel-Nukleotid-Mengen mit eben diesem Faktor multipliziert werden. Das Nukleotidgemisch wurde nach folgendem Pipettierschema zusammengestellt (Tabelle 3.1):

Tabelle 3.1:

Pipettierschema „Nukleotide“

Nukleotid	Menge (einfacher Ansatz)
dATP	2,7 µl
dCTP	2,7 µl
dTTP	4,0 µl
dGTP	4,0 µl
FITC-dATP	0,4 µl
FITC-dCTP	0,4 µl

Der Ansatz wurde kurz gevortext, gemischt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Als nächstes waren die weiteren Reagenzien sowie die DNA abzutauen und wie folgt in einem vorgekühlten Reaktionsgefäß zusammenzustellen:

Der Ansatz für eine Hybridisierung erforderte diejenige Menge DNA, die sich aus dem Wert der photometrischen Messung (direkt erfolgt nach der Extraktion aus E.coli) ergab. Eine DNA-Konzentration von 0,216 µg/µl beispielsweise ergab eine Vorlage von 4,6 µl zum Ansatz. Zusätzlich wurden dem Ansatz 10 µl des Nukleotidgemischs, 10 µl Reaktionspuffer und als letztes 10 µl der Enzymmischung hinzugefügt. (Es war stets darauf zu achten, dass alle Reagenzien nach dem Abtauen kurz zentrifugiert und gemischt wurden, da sich die einzelnen Lösungsbestandteile durch das Einfrieren in verschiedenen Phasen hätten befinden können.) Der Ansatz wurde zur Angleichung mit

nukleotid-freiem Wasser auf 50 µl aufgefüllt, nur durch leichtes Pipettieren gemischt und im 15°C-Wasserbad für zwei Stunden inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationsphase musste die anhaltende Enzymreaktion gestoppt werden. Dazu wurde der Ansatz für zehn Minuten in ein 74°C-Wasserbad eingebracht.

Die weitere Verarbeitung erfolgte wieder auf Eis.

Von jedem Ansatz wurden zunächst 5 µl entnommen, um damit ggf. eine gelelektrophoretische Bestätigung des DNA-Gehaltes und dessen Komposition zu erbringen. In jedem Fall wurde jedem Ansatz 20 µl C₀t 1-DNA (bindet und blockiert damit repetitive DNA-Sequenzen, die zu Störsignalen bei der mikroskopischen Auswertung der FISH führen könnten) hinzugefügt. Nach erneuter Durchmischung waren die Ansätze zu fällen. Dazu wurde jedem Ansatz zum Einsalzen der DNA 6,5 µl 3M NaOAc hinzugefügt. Darüber hinaus wurden 100 µl eiskaltes 100% Ethanol und 1 µl Gen Elute LPA in die Ansätze eingebracht. Die Reaktionsgefäße wurden durch mehrmaliges Invertieren gemischt und anschließend bei -20°C über Nacht gefällt.

Eine Fällung für eine Stunde bei -80°C wäre ebenfalls möglich, würde aber eine zu starke Salzausfällung nach sich ziehen, was wiederum die Qualität der Hybridisierung beeinträchtigen könnte.

Am Tag nach der Fällung wurden die Ansätze zunächst für 30 Minuten und 13.000 rpm bei 4°C in einer geeigneten Kühlzentrifuge zentrifugiert. Bis auf einen geringen Rest in Höhe des Pellets wurde der Überstand verworfen und den Ansätzen wiederum 400 µl 70% Ethanol (eiskalt) hinzugegeben. Erneut wurde bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert - diesmal für zehn Minuten - der Überstand verworfen und mit 400 µl Ethanol (RT) nachgewaschen. Dem letzten zehnminütigen Zentrifugationsschritt folgten die komplette Entnahme des Überstands und die anschließende Trocknung der Pellets unter der Abzugseinrichtung. Jeder Ansatz wurde mit 10 µl Formamid versetzt (deionisiertes Formamid hemmt die Ausbildung von Wasserstoffbrücken und wirkt damit destabilisierend) und über Nacht auf einem Wärmeschüttler (Stufe 7; 37°C) belassen.

3.2.5.2 *Vorbereitung der Objektträger*

Grundlagen:

Ein völlig fettfreier Objektträger (OT) schafft die Voraussetzung dafür, dass die Chromosomen bei ihrer Präparation zuverlässig an dem Glas des Objektträgers haften.

Die Verwendung von weiterhin eisgekühlten, mit Wasser benetzten Objektträgern verbessert die Spreitung bzw. Ausbreitung der Chromosomen.

Den langjährigen Erfahrungen der AG Rieder folgend nutzte ich exklusiv Objektträger der Firma Marienfeld, da mit diesen die besten Ergebnisse beim Auftropfen der Chromosomen zu erzielen waren.

Lösungen:

Alkohol (100%ig), vergällt:	Fa. Riedel de-Haën
Aqua ad injectabilia Braun:	Fa. B. Braun Melsungen AG

Vorgehen:

Die Objektträger wurden in vergälltem 100%igem Alkohol für mehrere, mindestens jedoch eine Stunde, gereinigt. Anschließend wurden selbige viermal mit aqua bidest. (Fa. Braun) gespült und bis zur weiteren Verwendung in aqua bidest. bei 4-8°C gekühlt im Kühlschrank aufbewahrt. Nur täglich auf diese Weise frisch vorbereitete Objektträger wurden zur FISH-Analyse verwendet.

3.2.5.3 Vorbereitung der Chromosomen

Grundlagen:

Zur weiteren Analyse werden die fixierten Chromosomen auf Objektträger aufgetropft. Bei diesem Vorgang breiten sich die Chromosomen aus, sodass sie im Rahmen einer Chromosomenbandenanalyse oder Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung der strukturellen und numerischen Beurteilung zugänglich werden.

Für die (molekular)zytogenetische Befundung ist eine geordnete Metaphasenspreitung von größter Wichtigkeit. Die einzelnen Chromosomen sollten in voller Ausdehnung sichtbar und nicht versprengt sein jedoch keinesfalls überlappen. Verschiedene Faktoren spielen hierbei eine wichtige Rolle: Auf die korrekte Vorbereitung ist genauso zu Achten, wie auf die geeignete Luftfeuchtigkeit und Auftropfhöhe (Weiss et al. 1999).

Die Überlappung der Interphasekerne durch das Auftropfen großer Zellmaterialmengen ist in jeden Fall zu vermeiden, da sie eine molekularzytogenetische Analyse mittels FISH-Technik unmöglich macht.

Lösungen:

Alkohol (100%ig); vergällt:	Fa. Riedel de-Haën
1xSSC :	0,25 M NaCl
	0,0017 N NaOH

Vorgehen:

Am Tag vor der Hybridisierung wurden die bei -20°C gelagerten fixierten Zellsuspensionen senkrecht auf vorpräparierte Objektträger aufgetropft. Dabei wurde darauf geachtet, diesen Vorgang in einer warm-feuchten Umgebung durchzuführen und nicht übermäßig viel Zellmaterial auf die Objektträger zu bringen. Die Auftropfhöhe betrug 20-30 cm. Zwei bis sechs Tropfen Substrat wurden eingesetzt. Überschüssige Flüssigkeit konnte auf unterliegendes Fließpapier ablaufen. Bis zum Tag der Hybridisierung wurden die Objektträger unter Umgebungsbedingungen luftgetrocknet. Es war darauf zu achten, die Präparate in einer sauberen, staubfreien Umgebung zu lagern, um eine Artefaktbildung zu vermeiden.

Am Tag der Hybridisierung wurden die Objektträger in einer absteigenden Alkoholreihe (100%; 70%, 50%; 30%) für jeweils 1 Minute rehydriert. Anschließend wurden die Präparate für 1 Minute bei Raumtemperatur (RT) in 0,1x SSC (1xSSC = 0,15M NaCl, 0,0017M Ca-Citrat) gestellt und dann bei 70°C in 2x SSC für 30 Minuten im Wasserbad inkubiert. Die darauf folgende Abkühlung der Objektträger in einem kalten Wasserbad sollte die Präparate auf eine Temperatur von 37°C runterkühlen, bevor die Chromosomen für 1 Minute und RT in 0,07 N NaOH denaturiert werden konnten. Anschließend wurden die Präparate für 1 Minute in 0,1x SSC (ca. 4°C) und eine weitere Minute in 2xSSC bei RT inkubiert. Nach einer abschließenden aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 100% Ethanol), die Objektträger durchliefen jede Konzentrationsstufe für je eine Minute, und einer unmittelbar darauf folgenden Trocknungszeit von 10 Minuten konnten die Sondengemische aufgetragen werden.

3.2.5.4 Vorbereitung der Sonden und In-situ-Hybridisierung

Grundlagen:

Die markierte und erhitzte Sonden-DNA wird im entscheidenden Schritt, der In-Situ-Hybridisierung, auf die denaturierten Patienten-Metaphasechromosomen bzw.

Interphasekerne gegeben, die auf entsprechenden Objektträgern fixiert vorliegen. Bei niedrigeren Temperaturbedingungen finden sich gesetzmäßig komplementäre DNA-Sequenzen spontan wieder zu Doppelstrangmolekülen zusammen. Ebenfalls homologe, aufgrund interindividueller Unterschiede nicht völlig identische, DNA-Abschnitte der gleichen Genombereiche von markierter Sonden-DNA und Chromosomen-DNA können stabile Doppelstränge, sog. Hybride, ausbilden. Je mehr Fehlpaarungen bei nicht genau identischen Regionen vorliegen, desto instabiler ist der Nukleinsäurehybrid. Folglich beeinflusst die Zusammensetzung der Hybridisierungsmischung (im folgenden Mastermix genannt) die Stabilität der Nukleinsäurehybride: Deionisiertes Formamid hemmt die Ausbildung von Wasserstoffbrücken und wirkt damit destabilisierend. Solche im SSC-Puffer enthaltenen Na^+ -Kationen wirken wiederum stabilisierend auf die Doppelhelix. Deshalb ist es theoretisch möglich, über ein günstiges Mischungsverhältnis dieser Substanzen den Anteil an schlecht gepaarten Hybriden möglichst gering zu halten. Wie dieses Mischungsverhältnis konkret auszusehen hat, muss im Zweifelsfall empirisch nachvollzogen werden.

Das im Mastermix enthaltene Dextransulfat ist ein Polyanion, das eine Matrix für die DNA bildet und durch deren lokale Konzentration die effektive Geschwindigkeit der Hybridisierung erhöht.

Eine weitere Störgröße, die für ein Gelingen der Hybridisierung bedacht werden muss, ist der im menschlichen Genom häufig vertretene Anteil repetitiver Sequenzen an verschiedene Stellen, die untereinander eine so große Ähnlichkeit aufweisen, dass diese unbeeinflusst unspezifische Hybridisierungen nicht korrespondierender Genomabschnitte bedingen würden. Aufgrund ihrer Struktur finden sich solche Sequenzen in einem Gemisch aus DNA-Einzelsträngen besonders schnell zu Doppelstranghybriden zusammen. Um diese Störsequenzen zu eliminieren besteht die Möglichkeit der markierten Sonden-DNA große Mengen $\text{C}_0\text{t-1}$ DNA hinzuzufügen. Diese Bezeichnung steht für solche DNA-Abschnitte, die sich durch eine besonders schnelle Doppelstrangbildung auszeichnen und demnach einen besonders hohen Anteil repetitiver Sequenzen erwarten lassen (Britten et al. 1974; Marx et al. 1976). Die unmarkierte $\text{C}_0\text{t-1}$ DNA blockiert die unspezifischen Stellen der Sonden-DNA, indem sie mit deren hochrepetitiven Sequenzen Doppelstränge bildet, sodass diese nicht mehr für eine Hybridisierung zur Verfügung stehen. Unspezifische Fluoreszenzsignale werden so weitestgehend unterdrückt, was für eine spätere mikroskopische Auswertung

unabdingbar ist. Die Phase, in der die C₀t-1 DNA die entsprechenden Sequenzen bindet wird „Preannealing“ genannt (Landegent et al. 1987).

Sind die Sonden soweit präpariert, für die letztgenannten Schritte hat sich der Begriff Prähybridisierung eingebürgert, können die Sonden den fixierten und denaturierten Metaphasechromosomen zugeführt werden. Der entscheidende Punkt der nun beginnenden Hybridisierung ist die Hybridisierungstemperatur, da über sie die Spezifität des gesamten Verfahrens gesteuert wird. Theoretisch kann die optimale Temperatur über folgende Gleichung ermittelt werden:

$$T_m = 81,5^\circ\text{C} - 16,6 (\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41 (\%G+C) - 0,63 (\% \text{ Formamid}) - 600/L$$

([Na⁺] = Natriumkonzentration in mol/l, % G+C = Anteil von Guanosin und Cytosin, L = Länge der Sonde in Basen)

Die Schmelztemperatur T_m ist die Temperatur bei der die Hälfte der Nukleotide in einer Doppelhelix dissoziiert sind. Da aber ein weiterer entscheidender Faktor beispielsweise die Sequenz der Sonde ist und eine hohe Homologie ihrerseits zu anderen Sequenzen eine höhere Temperatur bedingen würde (bei gleichzeitiger Signalstärkenverminderung), muss die effiziente Temperatur in der Praxis der Erfahrung des Untersuchers oder im Zweifelsfall vorangehender Kontrollreihen entstammen (Mülhardt 2003).

Lösungen:

DNA

Alkohol (100%ig); vergällt:

Fa. Riedel de Häen

Formamid:

100% deionisiertes Formamid ultra pure

Fa. Gibco BRL/Life Technologies

20xSSC-Puffer:

350,4 g NaCl + 176,4 g Na-Citrat ad 2000 ml aq. dest.; pH 7,4; autoklaviert

Dextransulfat:

Fa. Farmacia Biotech

Mastermix:

20% Dextransulfat, 4xSSC

Fixogum:

Marabuwerke GmbH & Co, Tamm

Vorgehen:

Die Schwierigkeit der nun einsetzenden Vorbereitung der Sonden-DNA und der anschließenden Hybridisierung bestand darin ein Protokoll zu entwerfen, dass sowohl

den Anforderungen der selbst markierten Sonden als auch den kommerziell erworbenen Sonden der Firma Abott/Vysis für den c-MYC-Lokus gerecht würde. Nur ein Kompromiss zwischen den Anforderungen würde zu einem zufrieden stellenden Hybridisierungsergebnis gemessen an der Signalstärke und der Störsignalintensität (Background) führen. Aus den Ergebnissen und Erfahrungen der Vorversuchsreihe kristallisierte sich folgendes Vorgehen heraus:

Die selbst markierten DNA-Sonden, die über Nacht im Schüttler bei 37°C inkubieren konnten wurden nun mit Mastermix versetzt, wobei jedem einzelnen Ansatz je 10 µl des Hybridisierungsgemisches aus Dextransulfat und SSC-Puffer zugefügt wurde. Anschließend mussten die Sondengemische für 10 Minuten im 70°C-Wasserbad denaturieren. (Es war vor Beginn des aktuellen Versuchstags darauf zu achten, dass alle benötigten Wasserbäder vollständig auf die im Einzelnen erforderlichen Temperaturen vorgeheizt worden waren.) Anschließend folgte eine 30-minütige Vorhybridisierungsphase im 37°C-Wasserbad. Währenddessen erfolgte die separate Aufarbeitung der kommerziell erworbenen Sonden für den c-MYC-Lokus der Firma Abott/Vysis. In Anlehnung an das mitgelieferte Protokoll für LSI-Sonden versetzte ich entsprechend der Anzahl der Ansätze mit selbst markierten Sonden eine äquivalente c-MYC-Sonden-Lösung mit ebenso viel LSI-Puffer und H₂O (alle Fa. Abott/Vysis). Beispielsweise machte ein sechsfacher Markierungsansatz für den Igl-Leichtkettenloкус ein Gemisch aus 6 µl LSI-Sonde, 6 µl LSI-Puffer und 6 µl H₂O erforderlich. Dieser Ansatz wurde dann für 5 Minuten im 73°C-Wasserbad denaturiert und anschließend zu gleichen Teilen auf die Ansätze mit den selbst markierten DNA-Sonden (je 2 µl LSI-Sondengemisch pro Reaktionsgefäß) aufgeteilt und durchmischt.

Für die Hybridisierung wurden die Sondengemische vollständig auf die vorbereiteten Objektträger mit den denaturierten Patientenchromosomen überführt, wobei das Sondengemisch für den Igl/c-MYC-Lokus mattrandseitig und jenes für den Igl/c-MYC-Lokus stets mattrandfern aufgetragen wurden. Durch ein 22x22 mm Deckgläschen wurden beide Bereiche abgedeckt und mit Fixogum-Klebstoff (Fa. Marabu) großzügig versiegelt. Zur schnelleren Aushärtung des Klebstoffes konnten die OT auf eine 37°C-Heizplatte lichtgeschützt platziert werden.

Die Hybridisierung hatte über Nacht bei 37°C in einer entsprechend feucht präparierten Kammer zu erfolgen.

3.2.5.5 *Waschung der Hybridisierung*

Grundlagen:

Die Waschung der Hybridisierung ist der zweite entscheidende Punkt der gesamten Prozedur und trägt zur Spezifität genauso viel wenn nicht noch mehr bei wie die Hybridisierung selbst. Durch das richtige Waschen sollen solche Bindungen zwischen Sonden-DNA und Chromosomen-DNA wieder gelöst werden, die an Sequenzen geringerer Basenfolgenübereinstimmung erfolgten (und somit weniger fest sind) und so zu ungewünschten Fluoreszenzsignalen führen würden, dem sogenannten Background oder auch Hintergrund. Die Prozedur erfolgt unter solchen Bedingungen, bei denen sich instabile bzw. ungünstig gepaarte Doppelstränge wieder lösen: Typischerweise wäscht man für 2x15 Minuten mit 2xSSC bei der gleichen Temperatur mit der zuvor hybridisiert wurde. Jedoch ist die Spezifität zu erhöhen, indem die Ionenstärke der Waschlösung gesenkt wird oder indem man die Waschtemperatur erhöht. Im Zweifelsfall müssen auch hier Vorversuche Klärung über die im vorliegenden Fall günstigsten Waschbedingungen schaffen (Mülhardt 2003).

Fakultativ kann ein Detergenz (Triton X100) zur Herabsetzung der Oberflächenspannung eingesetzt werden.

Unmittelbar den Waschschrinen folgend wird der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Fa. Sigma) zur Gegenfärbung der Chromosomen herangezogen. Dieser führt zu einem Q-Bandenmuster und erlaubt die eindeutige Identifizierung der einzelnen Chromosomen im DAPI-Filter.

Das abschließende Einbetten der Präparate in ein Eindeckmedium (Vectashield; Fa. Vector-Laboratories) erleichtert die spätere Analyse unter Exposition einer starken Lichtquelle und verhindert zusätzlich ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe.

Lösungen:

1xSSC:	10 ml 20xSSC + 190 ml Aqua dest.
2xSSC:	20 ml 20xSSC + 180 ml Aqua dest
DAPI:	700ng/ml 4'-6'-Diamino-2-Phenylindol in 4xSSC (Fa. Sigma)
Einbettmedium:	Vectashield [®] , Fa. Vector-Laboratories

Vorgehen:

Vor Beginn der Waschprozedur waren 22x22 mm Deckgläschen und die Fixogum-Klebmasse vollständig zu entfernen. Dazu konnten die Objektträger gegebenenfalls in 2xSSC-Lösung getaucht werden. Der Hauptwaschschritt erfolgte in 1xSSC für 5 – 10 Minuten bei exakt 75°C. Bei diesem Schritt war besonders penibel darauf zu achten, dass das in einer Küvette befindlich SSC exakt die oben genannte Temperatur angenommen hatte. Dazu musste das Wasserbad auf über 78,5°C eingestellt werden, um die Dämmung durch die Kunststoffküvette auszugleichen. Nach Beendigung der Hauptwaschung wurden die Objektträger zusätzlich für 5 Minuten in 2xSSC und Raumtemperatur nachgewaschen. Anschließend folgte für zwei Minuten die Gegenfärbung in einer kühl aufbewahrten DAPI-Lösung. Die abschließende Eindeckelung der Präparate mit 22x60 mm Deckgläschen erfolgte unter Verwendung von Vectashield®-Einbettmedium. Überschüssiges Einbettmedium musste sorgfältig im Pressblock herausgedrückt werden.

Die fertigen Präparate wurden bis zur späteren Auswertung sorgfältig beschriftet kühl bei 4°C aufbewahrt.

3.2.6 Auswertung einer Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung

3.2.6.1 *Fluoreszenz-mikroskopische Auswertung*

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Hybridisierungen sowohl der Kontrollen als auch der Patientenproben im Hauptversuchsteil erfolgte am Fluoreszenzmikroskop „Leica“ DM RBE der Firma Leitz unter Verwendung verschiedener Spektralfilter. Die Aufnahmen der Sondensignale in Metaphasechromosomen bzw. Interphasekernen wurde mit der Kamera PCO CCD IMAGING Typ VC 44 des gleichen Herstellers vorgenommen.

Zunächst erfolgte eine grobe Begutachtung des Hybridisierungserfolgs unter Einbeziehung der Qualität der Interphasekerne bzw. Metaphasenchromosomen und Abschätzung der Größenordnung der Störsignale. Sollte ein Hybridisierungsansatz eine zu hohe Dichte an Störsignalen aufweisen, so erfolgte eine erneute Waschung im Wasserbad mit anschließender Re-Evaluierung des Ansatzes.

Dieser ersten Begutachtung folgte die Auszählung von 200 Interphasekernen pro Sonde und Patient bzw. Kontrolle. Hierbei wurde jede Signalkombination der c-MYC- und Leichtkettensonden einzeln berücksichtigt. Detektierte Fusionssignale, die eine der beiden Variant-Translokationen aufzeigten, wurden separat gezählt. Ein Interphasekern konnte demnach je Sonde kein, ein einzelnes, zwei oder mehr Signale aufweisen. Auch waren mehrere Fusionssignale je Interphasekern möglich. Die Ergebnisse wurden schriftlich fixiert und für die spätere statistische Auswertung archiviert. Teilweise war es nicht möglich, je nach Intensität der Hybridisierung, mit einem Kombinationsfilter beide Sondersignalfarben zu detektieren. In diesem Fall war es notwendig, jeden einzelnen Interphasekern mit einem Einzelfarbfilter separat auf die Signale der MYC-Sonde und der Leichtkettensonden zu untersuchen.

Ziel der Versuchsreihe war es ursprünglich, für jeden Kontrollansatz und jede Patientenprobe Angaben für beide Variant-Translokationen zu liefern, d.h. mindestens 200 Interphasekerne auszuzählen. Dieses Ziel wurde aufgrund teilweise geringer Materialbestände und unterschiedlicher Probenqualität nicht erreicht.

3.2.6.2 *Statistische Auswertung*

Zur Ermittlung des Werts ab dem die gewerteten Fusionssignale eines Ansatzes diagnostisch signifikant für das Vorliegen einer pathologischen Burkitt-Translokation sind musste zunächst anhand der Ergebnisse des Kontrollgruppenkollektivs der sog. Cut-Off-Level ermittelt werden. Die Rate falsch positiver bzw. falsch negativer Signale hängt nicht nur von der eingesetzten Vektorsonde, sondern auch von der Aufarbeitung der Präparate ab. Die deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie verlangt deshalb für jedes Labor für die Auswertung von FISH-Analysen die Bestimmung eines Cut-Off-Levels für die verwendeten Sonden und Materialien. Der Cut-Off-Level wird nach Auswertung von üblicherweise 5-10 Kontrollen errechnet. Dieser gibt die prozentuale Grenze sporadisch auftretender, diagnostisch nicht-signifikanter und potentiell falsch-positiver Fusionssignale wieder und dient somit als Ausschlussgrenze für eine B-ALL vom Burkitt-Typ. Bei Unterschreitung des Cut-Off-Levels in einem Ansatz liegt demnach die Anzahl (x) der auf eine Burkitt-Translokation hinweisenden Fusionssignale unterhalb eines signifikanten Werts. Der Cut-Off-Level wurde für jede Leichtkettensonde mit der c-MYC-Sonde einzeln ermittelt und berechnet sich über die

Summe aus Mittelwert \bar{x} und der dreifachen Standardabweichung s , welche sich aus der Varianz v ergibt (Engel 1999):

Mittelwert \bar{x} :

$$\bar{x} = \frac{\text{Summe : Fusionssig nale}}{\text{Anzahl : Kontrollen}} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

Varianz v :

$$v = (\bar{x} - x_1)^2 + (\bar{x} - x_n)^2 / n - 1$$

Standardabweichung s :

$$s = \sqrt{v}$$

Cut-off-Level :

$$3 \cdot s + \bar{x}$$

Für die Variant-Translokation t(2;8) konnte im Kontrollgruppenkollektiv nach Ermittlung der Fusionssignale aus PAC-Vektor 1117G4 und c-MYC-Sonde ein Cut-Off-Level von 4,5% ermittelt werden. Analog dazu lag der Cut-Off-Level für die t(8;22)-Translokation bei 3,0%.

3.3 Referenzuntersuchungen der varianten 8q24-Translokationen

3.3.1 Konventionelle Bänderungszytogenetik

Vereinfacht dargestellt ist die Beschreibung des gesamten Chromosomensatzes das Ziel der konventionellen Bänderungszytogenetik. Das Attribut „konventionell“ dient in diesem Fall der Abgrenzung zur molekularen Zytogenetik.

Die Bänderungszytogenetik wurde seit ihrer Einführung in den sechziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts stets weiterentwickelt und verbessert, sieht sich jedoch nach wie vor mit denselben grundsätzlichen Schwierigkeiten konfrontiert. Im Bereich der Tumorzytogenetik sind zur Darstellung des Chromosomensatzes spezifische mitose-induzierende Substanzen notwendig. Dennoch erschweren neben Derivat- und Markerchromosomen häufig auch ein geringer Mitoseindex und eine klonale Heterogenität die Auswertung (Heim und Mitelman 1995).

Letztlich erfolgt die Identifikation und Beurteilung jedes einzelnen Chromosoms über die reproduzierbare Darstellung horizontaler heller und dunkler Banden. Dazu sind

verschiedene Behandlungs- und Färbeschritte notwendig. Die heterochromatischen Abschnitte lassen sich als C-Banden darstellen. Die euchromatischen Abschnitte wiederum bieten durch unterschiedliche Bänderungstechniken die Möglichkeit einer weiteren Untergliederung. Man unterscheidet in G-, Q- und R-Banden wobei das G komplementär zum R-Bandenmuster ist. Je nach Kondensationszustand können unterschiedliche Auflösungen erreicht werden. Die Analyse von Metaphasenchromosomen normaler Blutlymphozyten erreicht durchschnittlich eine Auflösung von 550-850 Banden. Eine Präparation aus Leukämiezellen hingegen liefert in einigen Fällen nur eine Auflösung von 150-300 Banden (Rieder und Bradtke 2002). Für meine Arbeiten lagen für einen Teil der Patientenproben bereits konventionell-zytogenetische Befunde vor, so dass im Anschluss an die fluoreszenzmikroskopische Auswertung ein Abgleich meiner FISH-Analysen mit dem zuvor konventionell-zytogenetisch erstellten Karyotyp erfolgen konnte.

4 Ergebnisse

4.1 Methodische Ergebnisse der FISH-Technik

4.1.1 Extraktion aus E.coli und Etablierung der Sonden für die Ig-Leichtketten-Loci und den c-MYC-Lokus

Vor Präparation der Sonden war es notwendig, in einem speziellen Aufbereitungsverfahren die Vektor-DNA aus den jeweiligen E.coli-Stämmen zu extrahieren. Für den Ig κ -Lokus stand ein Bakterienstamm zur Verfügung (dJ117G4), für den Ig λ -Lokus waren es zu Beginn meiner Arbeit zwei Stämme (dJ869I1 und dJ1019H10). In einem parallelen Ansatz wurden Extraktion und die Markierung von Vektoren für den c-MYC-Lokus aus den Bakterienstämmen dJ944B18 und dJ968N11 erprobt.

Die Prozedur zur Extraktion von Plasmid-DNA aus E.coli-Bakterien zur Herstellung von DNA-Sonden erfolgte streng nach Vorgabe des *Large-Construct Kit Protocol* der Firma Quiagen[®]. In mehreren Chargen konnte so erfolgreich die Plasmid-DNA aus allen drei Stämmen extrahiert werden. Erste Erfolgskontrollen zur Bestimmung des DNA-Gehalts der Ansätze erfolgten per Gel-Elektrophorese und zur quantitativen Bestimmung mittels Photoabsorption. Insgesamt konnte für jeden Vektor eine ausreichend hohe Konzentration extrahiert werden. Die Spannbreite der dsDNA-Konzentration erstreckte sich von minimal 0,011 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bis maximal 0,216 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

In dem nun folgenden Schritt meiner Arbeit erfolgte die Markierung der Vektoren, die Erprobung der fertig gestellten Sonden anhand Kontrollen und der Zelllinie 280/93 sowie die Etablierung der Hybridisierung mit definitiver Auswahl der geeigneten Stämme. Hauptproblem war die Wahl der minimal erforderlichen Sondenmenge je Hybridisierungsansatz. Schnell war festzustellen, dass eine zu hohe Menge markierter Sonden eine ebenso hohe Störsignaldichte verursachte, die eine spätere Auszählung erschwerte. Bei zu geringer Menge war im Umkehrschluss die Fehlhybridisierungsrate zu groß. Letztlich erwies sich eine Sondenkonzentration von 400 – 800 μg in Abhängigkeit der Interphasekernqualität und späteren Waschttemperatur als ideal.

Zweites Hauptproblem war die Temperatur und die Dauer der abschließenden Waschung der Ansätze. Eine zu lange und zu heiße Waschung hinterließ regelmäßig

-Ergebnisse-

eine unzureichende Fluoreszenzsignaldichte, eine zu kurze Waschung konnte dem störenden Hintergrund nicht beikommen. Obwohl die optimale Waschtemperatur- und -dauer stark abhängig von der jeweilig extrahierten Charge war, d.h. jeder neue Extraktionsansatz vorab neu auf die Idealbedingungen getestet werden musste, erwies sich eine Temperatur von 74 - 75°C und eine Waschdauer von 10 Minuten als Optimum.

Als nächster Arbeitsschritt musste die Frage nach dem zuverlässigsten PAC-Klon beantwortet werden. Während für den Ig κ -Lokus nur ein Bakterienstamm zur Verfügung stand (dJ1117G4), musste im Falle von Ig λ zwischen Stamm dJ1019H10 und dJ869I1 gewählt werden. Letztlich musste die Frage geklärt werden ob und falls ja, welcher der c-MYC-Vektoren der Stämme dJ944D18 und dJ968N11 Verwendung finden sollte, oder doch der etablierten c-MYC-Sonde Vorzug gegeben werden musste.

Obwohl die Markierung beider Plasmide eine gute Signalintensität lieferte erwies sich der Vektor aus Stamm dJ1019H10 als zuverlässiger hinsichtlich der angestrebten Kombination mit der c-MYC-Sonde. Zusätzlich zeigte sich, bedingt durch die schwache Kreuzhybridisierung von PAC dJ869I1 mit Chromosom 9, teilweise ein vierfaches Signal in einigen Kontrollen. Für die Auszählung des Patientenmaterials fand daher ausschließlich Stamm dJ10129H10 Anwendung. Probatorisch wurde ebenfalls der Versuch unternommen, für einen Hybridisierungsansatz eine Kombination der beiden Ig λ -Vektoren einzusetzen um eine Verstärkung der Hybridisierungseffizienz und der Signalintensität zu erreichen. Dazu wurden die beiden Vektoren noch vor der Fällung des Ansatzes gemischt und dann gemeinsam aufgearbeitet. Jedoch ließ sich dadurch die erhoffte Verbesserung der Hybridisierung nicht erreichen. Daher wurde die Methode einer kombinierten Sonde auch aufgrund des höheren Plasmid Bedarfs und der immer noch bestehenden Kreuzhybridisierungsproblematik von PAC dJ869I1 nicht weiter verfolgt.

Ein weiteres Problem betraf die Lagerung markierter Sonden. So stellte sich heraus, dass der Versuch Sonden in größerer Menge zu markieren und dann in Portionen den einzelnen Hybridisierungen zukommen zu lassen scheiterte. Die Hybridisierung zeigte in fast allen Fällen eine geringere Signalintensität und Auswertbarkeit. Offenbar wurde die Markierung der Sonden bei größeren Mengen anfälliger gegenüber Mess- und Pipettierfehlern. Darüber hinaus scheint eine Lagerung bei -20°C nicht über einen Zeitraum von mehreren Wochen bei gleich bleibender Qualität möglich.

Ferner war festzuhalten, dass bereits hybridisierte Chromosomen, die eine gewisse Zeit im Kühlschrank bei 4°C lagerten, rasch an Signalintensität der Sonden einbüßten. Ebenfalls waren solche Ansätze äußerst sensibel einer zweiten Waschung gegenüber. Der Versuch, bereits gelagerte Hybridisierungen zum Zwecke der Entfernung restlicher Hintergrundsignale erneut zu waschen, löste regelhaft die Bindung zwischen Sonde und Chromosomen und zerstörte somit den Ansatz.

Die Markierung der PACs für den c-MYC-Lokus war ebenfalls erfolgreich. Jedoch war das spätere Hybridisierungsergebnis dieser Sonden hinsichtlich Störsignalintensität dem der kommerziellen c-MYC-Sonde unterlegen. Auch vor dem Hintergrund der aufwendigen Markierungsprozedur und beschränkter Lagerungstauglichkeit über einen längeren Zeitraum wurde für die eigentliche Arbeit die c-MYC-Sonde der Firma Abott/Vysis eingesetzt.

4.1.2 Verwendung der Leichtkettensonden in Kombination mit kommerziellen Sonden für den c-MYC-Lokus

Ein Hauptproblem zu Beginn meiner Arbeit war die Etablierung eines Hybridisierungsprotokolls, welches sowohl den Vorgaben des MYC-Sonden-Protokolls der Firma Abott/Vysis Rechnung trug auf der anderen Seite jedoch auch anwendbar für die eigens angefertigten Leichtketten-Sonden sein würde. Letztendlich konnte ein taugliches Protokoll etabliert werden, welches ein separates Aufarbeiten der Sonden erlaubt und die Zusammenführung der Sonden erst unmittelbar vor der eigentlichen Hybridisierung vorsieht.

Viel schwieriger gestaltete sich die Festlegung der optimalen Waschtemperatur der Ansätze. In der Tat divergierten die Temperaturoptima der verschiedenen Sondentypen um einige Grad Celsius. Insbesondere zeigten sich die Leichtkettensonden einerseits sehr sensibel auf eine zu heiße Waschphase, konnte so ein nicht marginaler Teil der Signale versehentlich zerstört werden, resultierte andererseits aus einem zu kurzen Waschintervall ein ausgeprägtes Hintergrundrauschen. Letztlich brachte ein Hauptwaschintervall von minimal 5 bis maximal 10 Minuten bei exakt 75°C mit folgender Nachwaschung für 5 Minuten bei Raumtemperatur die besten Ergebnisse für beide bzw. alle drei Sonden. Besonders für die exakte Beibehaltung der Hauptwaschtemperatur wurde viel Aufwand betrieben.

4.1.3 Berechnung des Cut-Off-Levels anhand der Kontrollgruppe

Nach separater Auszählung der Hybridisierungsansätze zur Detektion sporadischer Translokationen bzw. auf eben solche hinweisenden Fusionssignale konnte der Cut-Off-Level berechnet werden. Die Tabellen 4.1 und 4.2 geben das Auszählergebnis des Kontrollgruppenkollektivs wieder. Besondere Berücksichtigung findet hier die Rate der detektierten Fusionssignale, sprich der Anteil falsch positiver Ergebnisse, angegeben in Prozent.

Tabelle 4.1

Hybridisierung der Kontrollen mit dem Sondenpaar dJ1117G4/LSI-c-myc SO

Kontrolle	Gezählte Kerne (n)	Hybridisierungseffizienz (%)	Fusionssignalrate (%)	Material
1	200	94,5	1,0	B/PHA
2	200	100	0,5	B/PHA
3	200	99,0	1,0	B/PHA
4	200	96,5	1,0	B/PHA
5	200	81,0	0	B/PHA
6	200	93,0	0	B/PHA
7	200	89,5	0,5	B/PHA
8	202	98,5	4,0	B/PHA
9	202	67,0	0	B/PHA
10	200	98,5	0,5	B/PHA

Tabelle 4.2

Hybridisierung der Kontrollen mit dem Sondenpaar dJ1019H10/LSI-c-myc SO

Kontrolle	Gezählte Kerne (n)	Hybridisierungseffizienz (%)	Fusionssignalrate (%)	Material
1	200	93,5	0,5	B/PHA
2	216	99,0	1,0	B/PHA
3	208	99,5	1,5	B/PHA
4	204	98,5	1,0	B/PHA
5	200	79,0	0	B/PHA
6	210	97,0	2,5	B/PHA
7	200	97,5	1,0	B/PHA
8	202	94,5	0,5	B/PHA
9	202	77,0	0	B/PHA
10	203	90,5	0,5	B/PHA

Bei insgesamt guter Hybridisierungseffizienz, durchschnittlich 90,0%, und geringer Störsignalintensität wiesen nach Auswertung der c-MYC- und Igg-Sondensignale, detektierend auf eine t(2;8)-Translokation, durchschnittlich 90,0% der ausgezählten Interphasekerne mindestens ein Sondensignal auf. Ebenfalls 90,0% Interphasekerne mit

mindestens einem Sondensignal ergaben sich für das auf eine t(8;22)-Translokation angesetzte Sondenpaar. Nach der Formel

$$3 \cdot s + \bar{x} \text{ bzw. } 3 \cdot \sqrt{v} + \bar{x} \wedge v = (\bar{x}-x_1)^2 + (\bar{x}-x_n)^2/n-1$$

ergeben sich daher folgende Cut-Off-Level:

- Für die t(2;8)-Translokation: 4,5% [Fusionssignale]
- Für die t(8;22)-Translokation: 3,0% [Fusionssignale]

Werte unterhalb des Cut-Off-Levels wurden methodisch bedingt als falsch-positiv gewertet. Bei Überschreiten desselben ergibt sich die Diagnose einer varianten Leichtkettenaberration.

Augenscheinlich fällt der Cut-Off-Bereich der Sondenkombination für den Igκ- und c-MYC-Lokus etwas höher aus. Dies liegt insbesondere an der relativ hohen Rate an Fusionssignalen in Kontrolle 8 - ohne das die Kontrollprobe selbst den Cut-Off-Level für eine kritische t(2;8)-Translokation überschreitet - und muss als relativ hoher Streuwert im Spektrum der falsch-positiven Signale angesehen werden.

4.1.4 Hybridisierungseffizienz in Kontrollen und archiviertem Patientenmaterial

Die Hybridisierungseffizienz der einzelnen Vektorsonden hing in der vorliegenden Arbeit stark von dem zu hybridisierenden Chromosomenmaterial ab. So erreichte die Hybridisierung die besten Resultate und die kräftigsten Signale am gesunden Kontrollkollektiv. Dies lag einerseits an der besseren Qualität der aufgebrauchten Interphasekerne hinsichtlich Aufarbeitung und fehlender pathologischer chromosomaler Aberrationen im gesunden Kontrollgruppenkollektiv und dem kürzeren thermischen Lagerungszeitraum andererseits. Die Kombination aus c-MYC- und Igκ-Leichtkettensonde erzielte in der Kontrollgruppe nur einen Fehlhybridisierungsanteil, sprich dem Anteil erfasster Interphasekerne, die weder ein grünes (Leichtkettensonde) noch ein rotes Signal aufweisen, von **8,3%**. Analog dazu war im Sondenansatz für die t(8;22)-Translokation ein Fehlhybridisierungsanteil von **7,4%** zu verzeichnen.

-Ergebnisse-

Dieser Anteil lag bei der eigentlichen Hybridisierungsreihe mit Patientenmaterial aufgrund v.a. lagerungsbedingt schlechterer Probenqualität signifikant höher. Darüber hinaus gelang es in insgesamt neun Ansätzen nicht, die geforderte Mindestanzahl von 200 Interphasekernen auszuzählen. In 12 von insgesamt 64 Ansätzen ($\approx 19\%$) konnte aufgrund zu geringer Materialbestände - einige der Patientenproben lagerten zum Zeitpunkt meiner Versuchsreihe bereits über acht Jahre in den Gefriereinrichtungen des Instituts und waren bereits zuvor Bestandteil molekular-zytogenetischer Diagnostik - keine auswertbare Hybridisierung erfolgen. Der Fehlhybridisierungsanteil für das t(2;8)-Rearrangement im Patientenansatz lag bei rund **21%**, für die Untersuchung auf eine t(8;22)-Translokation bei **17%**. Es zeigte sich also eine deutlich höhere Hybridisierungseffizienz bei Probenmaterial gesunder Probanden und kürzerer Lagerungszeit.

4.2 Ergebnisse der Untersuchung an ALL-Patienten

4.2.1 Untersuchung der Fälle auf die Variant-Translokationen

Fall Nr. 1: B-NHL, weiblich; 70 Jahre (Abbildung 4.1)

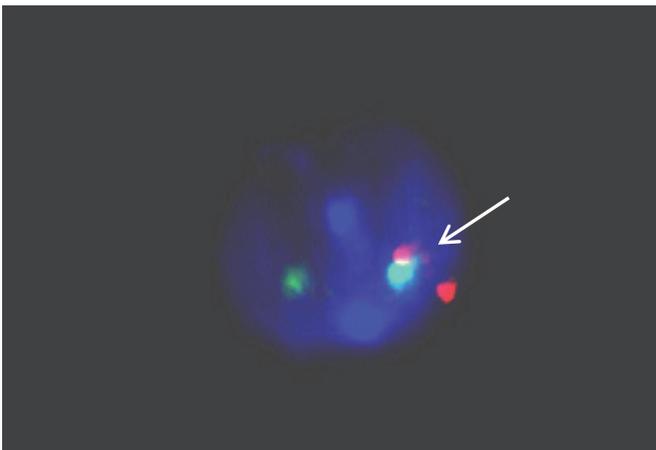


Abbildung 4.1: Interphase-Kern nach Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung mit DNA von Fall 1 mit den Sonden 1117G4 (grün) und LSI c-MYC SO (rot). Zu sehen ist ein deutliches Fusionsignal (Pfeil).

-Ergebnisse-

Befund der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Karyotyp: 46,XX,t(2;8)

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Im Rahmen der Auswertung der durchgeführten Hybridisierung mit den Sonden 1117G4 für den Ig κ -Leichtketten-Lokus und LSI c-MYC SO für den c-MYC-Lokus wurden 200 Interphase-Kerne ausgezählt. Davon wiesen 176 Kerne mindestens ein Signal für jede Sonde auf. Dies entspricht einer Effizienz der Hybridisierung von 88,0%. In 16 Fällen zeigte sich ein deutliches Fusionsignal auszumachen (Abbildung 4.1). Dies entspricht einem Anteil von 8,0%.

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

Ebenfalls für das Sondenpaar 1019H10 für den Ig λ -Lokus und LSI c-MYC SO für den MYC-Lokus wurden 200 Interphasekerne erfasst. 183 Kerne wiesen mindestens ein Signal je Sonde auf (entsprechend einer Hybridisierungseffizienz von 91,5%). Darüberhinaus fand sich in drei Kernen mindestens ein Fusionsignal (1,5%).

Interpretation:

Bei insgesamt guter Hybridisierungseffizienz konnte hier die Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung den zytogenetischen Befund einer t(2;8)-Translokation bestätigen. In Anbetracht der klinischen Diagnose eines B-NHL besteht nun der Verdacht auf ein Burkitt-Lymphom vom IgK-Leichtkettentyp mit leukämischer Ausschwemmung.

Fall-Nr. 2: B-ALL, männlich; 44 Jahre (Abbildung 4.2)

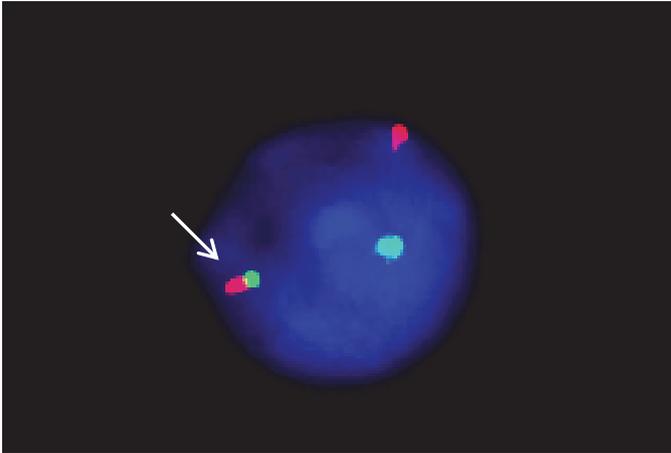


Abbildung 4.2: Interphase-Kern nach Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung mit DNA von Fall 2 mit den Sonden 1019H10 (grün) und LSI c-myc SO (rot). Ein dezentes Fusionssignal ist zu detektieren (Pfeil)

Befund der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Karyotyp: 46,XY,t(8;14)(q24;q32)

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Von 140 ausgewerteten Interphasekernen konnte in 91 Fällen je Sonde mindestens ein Signal detektiert werden (Hybridisierungseffizienz: 65%). Insgesamt 4 Kerne (3,0%) trugen ein Fusionssignal. In 49 Kernen gelang die Hybridisierung nicht.

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

200 Kerne wurden ausgezählt. Davon trugen 182 Interphasekerne je Sonde mindestens ein Signal (91%). 17 Kerne wiesen ein (oder mehrere) Fusionssignale auf. Die Kolokalisationsrate beträgt hier 8,5 %.

Interpretation:

Bei ausreichender Hybridisierungseffizienz ergaben sich bei der FISH-Analyse für einen Leichtkettentyp Hinweise für ein Rearrangement mit dem c-MYC-Lokus. Jedoch nur der Ansatz für den Lambda/Myc-Lokus überschritt diesen Grenzwert während der Anteil der t(2;8)-Translokationen (3,0%) unterhalb des Cut-Off-Level blieb und somit nicht signifikant ist. Die konventionelle Bänderungszytogenetik zeigte jedoch keine Translokationen die Leichtketten involvieren, befundet allerdings die häufigere Burkitt-

-Ergebnisse-

Schwerketten-Translokation t(8;14). Ob es sich hierbei um einen komplexen, die Leichtkettentranslokation aufweisenden Karyotypen handelt, welcher der konventionellen Bänderungszytogenetik verborgen blieb oder in Fall 2 Hinweise auf eine Kreuzhybridisierung der Leichtkettensonden mit dem IgH-Lokus (wie sie schon bei den PACs dJ 944B18 und dJ968N11 beschreiben wurde) ist, bleibt unklar wird jedoch noch Bestandteil der abschließenden Diskussion sein .

Zur Visualisierung der Ergebnisse werden in der anschließenden tabellarischen Zusammenfassung solche den Cut-Off-Level überschreitenden Ergebnisse grau unterlegt.

Fall-Nr.3: B-ALL, weiblich; 37 Jahre (Abbildung 4.3)

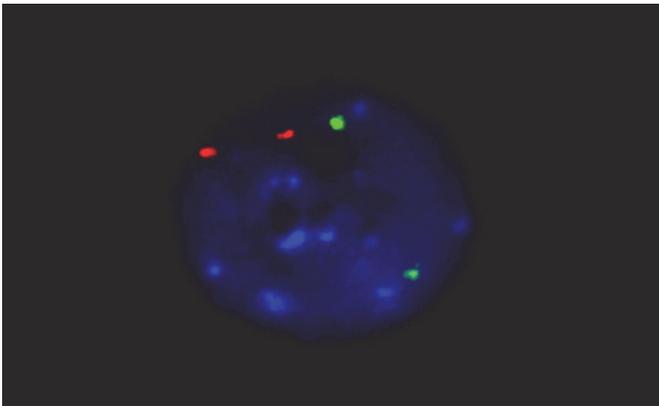


Abbildung 4.3: Interphasekern nach FISH mit DNA von Fall 3 mit den Sonden 1117G4 (grün) und LSI c-myc SO (rot). Es handelt sich hierbei um einen Normalbefund.

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Karyotyp: 46,XX,t(8;14)(q24;q32)

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

199 Interphasekerne wurden ausgezählt. Davon trugen 160 mindestens ein Signal je Sonde (81%). In sechs Kernen waren Fusionssignale auszumachen (3,0%).

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

200 Interphasekerne wurden erfasst, von denen 157 ein Fluoreszenzsignal der Sonden zeigten (78,5%). In vier Kernen fand sich ein Fusionssignal (2,0%).

Interpretation:

Bei ausreichender Hybridisierungseffizienz ergab sich kein Hinweis auf eine t(2;8) oder eine t(8;22)-Variant-Translokation. Ein zum Vergleich heranzuziehender zytogenetischer Befund lag vor. Die klinische Diagnose des Patienten ist eine B-ALL mit t(8;14)-Translokation.

Fall-Nr. 4: B-ALL, männlich; 48 Jahre (Abbildung 4.4)

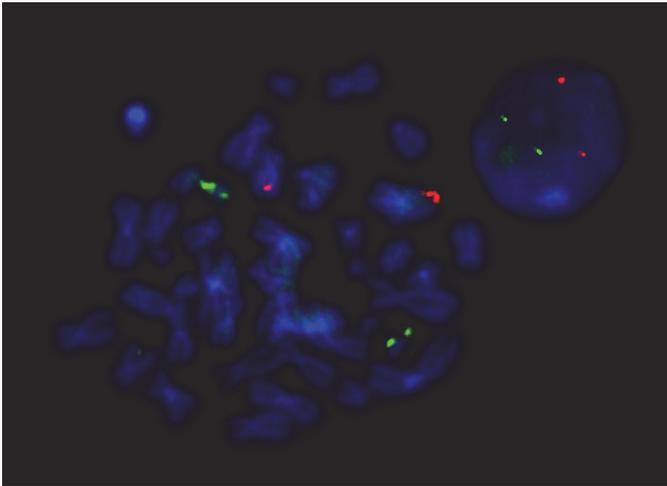


Abbildung 4.4: Interphasekern (rechts) und Metaphase nach FISH mit DNA von Fall 4 mit den Sonden 1019H10 (grün) und LSI c-myc SO (rot). Hier lässt sich besonders gut die Zuordnung der Sonden zu den Chromosomen nachvollziehen.

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Karyotyp: 46,XY,dup(1)(q21;q32),t(8;14)(q24;q32),del(13)(q14;q22)

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Die Anzahl der ausgewerteten Interphasekerne beträgt exakt 200. Davon 159 Kerne (79,5%) mit mindestens einem Signal je Sonde. Weniger als 0,5% der Interphasekerne zeigten eine Kolokalisation.

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

Von 200 ausgezählten Interphasekernen zeigten 157 mindestens ein Signal je Sonde. Davon detektierten 2,5% eine t(8;22)-Translokation.

Interpretation:

Der vollständige Karyotyp zeigte eine Beteiligung einer t(8;14)-Translokation. Von Seiten der FISH-Analyse ergab sich kein Verdacht auf eine variante Burkitt-Translokation, da der Anteil der Fusionssignale nicht mit dem geforderten Cut-off-Level zusammenfiel. Erfreulich war in diesem Ansatz die Hybridisierungsqualität. Selbst im vorliegenden Patientenmaterial konnten einzelne Markierungen an Metaphasechromosomen erfolgen. Somit konnte die korrekte Anlagerung der Sonden an die Chromosomen kontrolliert werden. Abbildung 4.4 zeigt anschaulich die Anlagerung der IgL-Leichtkettensonde dJ1019H10 an die kleinen Chromosomen 22.

Fall Nr.5: B-ALL, weiblich; 18 Jahre

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Die Karyotypisierung erbrachte folgenden Befund: 46,XX,t(8;14)(q24;q32)

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Aufgrund geringer Materialbestände gelang kein auswertbarer Hybridisierungsansatz.

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

Von 200 ausgewerteten Kernen trugen 161 mindestens ein Sondensignal für jeden Locus entsprechend einer ausreichenden Hybridisierungseffizienz. Der Anteil der Fusionssignale betrug 2,0% und lieferte somit keinen Verdacht auf eine Varianttranslokation.

Interpretation:

Hinweise auf eine t(8;22) ergaben sich in der FISH nicht. Leider konnte eine entsprechende Untersuchung auf eine t(2;8)-Translokation nicht geliefert werden. Es muss vermerkt werden, dass in diesem Fall trotz zytogenetisch evaluierter t(8;14)-Translokation nur sporadisch t(8;22)-Fusionssignale auftraten. Eine relevante Kreuzhybridisierung der Igλ-Sonde mit dem Schwerekettenloкус ließ sich hier nicht erkennen.

Fall Nr. 6: B-ALL, weiblich; 64 Jahre

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Karyotyp: 46,XX,[26]

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Von 200 ausgezählten Kernen waren 161 bezüglich des Hybridisierungserfolgs verwertbar. In 1,5% der Fälle konnte eine Kolokalisation registriert werden.

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

187 von 205 ausgezählten Interphasekernen zeigten für jeden Sondentyp mindestens ein Signal. Dieser Ansatz zeichnete sich insgesamt durch eine gute Hybridisierungseffizienz aus. Ein Fusionsignal zeigte sich in 2,5% der Interphasekerne.

Interpretation:

Konkordant zum Karyotyp ergaben sich in diesem Fall keine molekularzytogenetischen Hinweise auf eine variante Burkitt-Translokation die Ig-Leichtketten-Abschnitte involvierend.

Fall Nr. 7: B-ALL, männlich; 19 Jahre

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Karyotyp: 46,XY, [25]

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Aufgrund geringer Materialbestände gelang kein auswertbarer Hybridisierungsansatz.

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

Im Rahmen der Auswertung wurden 200 Zellen erfasst. Bei mäßiger Hybridisierungseffizienz zeigten nur 141 Interphasekerne (70,5%) mindestens ein Signale für jede Sonde. Nur ein Kern zeigte ein Fusionsignal.

-Ergebnisse-

Interpretation:

Hinweise auf eine signifikante t(8;22)-Translokation ergaben sich weder in der Bänderung noch in der FISH.

Fall Nr. 8: B-ALL, weiblich; 41 Jahre

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Karyotyp: 46,XY, [25]

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Aufgrund geringer Materialbestände gelang kein auswertbarer Hybridisierungsansatz.

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

Bei geringer Zelldichte im Suspensat konnten insgesamt nur 190 Interphasekerne gezählt werden. Bei einer Hybridisierungseffizienz von 84% zeigten 160 Kerne ein Sondensignal. In 3,0% der Fälle wurde ein Fusionssignal detektiert.

Interpretation:

Die Aussagekraft in diesem Ansatz ist gering, da für die Analyse nur wenig Material verfügbar war. Der Cut-Off-Level für eine signifikante Varianttranslokation wurde gerade nicht überschritten, sodass ggf. andere Methoden einbezogen werden müssen.

Fall Nr. 9: B-ALL, männlich; 61 Jahre

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

49,XY,add(6)(q2?5),+7,t(8;22)(q24;q11),+12,t(14;18)(q32;q21),+der(18)t(14;18)

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Von 200 gezählten Kernen zeichneten sich nur 69 Interphasekerne durch eine brauchbare Hybridisierung aus. In 2,0% der Fälle war ein deutliches Fusionssignal auszumachen.

-Ergebnisse-

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO

Aufgrund geringer Materialbestände und kaum auswertbarer Signalstärke gelang kein auswertbarer Hybridisierungsansatz.

Interpretation:

Leider war auch dieser Ansatz unvollständig und das Ergebnis muss kritisch überprüft werden. Formal zeigte sich mit 2,0% Fusionssignalen kein Hinweis auf eine t(2;8)-Translokation. Die in der konventionellen Zytogenetik gezeigte t(8;22)-Translokation konnte leider mittels FISH nicht geprüft werden.

Fall Nr. 10: B-ALL, weiblich; 50 Jahre

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Keine Zellen in Teilung.

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Von 200 gezählten Kernen gingen 142 in die Analyse ein. Keiner der Interphasekerne zeigte ein Fusionssignal.

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

Aufgrund geringer Materialbestände war kein weiterer Hybridisierungsansatz auswertbar.

Interpretation:

Bei wiederum unvollständiger Analyse ergab sich kein Hinweis auf eine t(2;8)-Translokation.

Fall Nr. 11: B-ALL, weiblich; 61 Jahre

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Karyotyp: 46,XX,t(2;8)(p12;q24)/47,XX,t(2;8)(p12;q24),+mar

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Aufgrund geringer Materialbestände gelang kein auswertbarer Hybridisierungsansatz.

-Ergebnisse-

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

Bei insgesamt ausreichender Zelldichte im Suspensat wurde eine nur mäßige Hybridisierungseffizienz von 76% erreicht. Von 201 ausgezählten Zellen zeigten 3,0% der Zellkerne ein Fusionssignal.

Interpretation:

Der Karyotyp zeigte eine Varianttranslokation zwischen c-MYC und Ig-kappa. Da der entsprechende Ansatz mit der FISH nicht gelang war ein Abgleich nicht möglich.

Fall Nr. 12: B-ALL, männlich; 61 Jahre

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Karyotyp: 46,XY[24]

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Die geforderten 200 Interphasezellkerne konnten ausgezählt werden. Entsprechend einer Hybridisierungseffizienz von 87% zeigten 173 Zellkerne mindestens ein Signal je Sondentyp. Fusionssignale wurden nicht detektiert.

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

Von 200 gezählten Kernen trugen nur 90 mindestens ein Sondersignal entsprechend einer Hybridisierungseffizienz von 45%. Fusionssignale traten nicht auf.

Interpretation:

Bei leider sehr geringer Hybridisierungseffizienz für den Ig λ -Lokus (45%) jedoch erstaunlicherweise guten methodischen Effizienz für das zweite Sondenpaar konnte in diesem Testansatz kein einziges Fusionssignal ausgemacht werden. Von einem methodischen Problem als augenscheinlichste Begründung ist jedoch nicht auszugehen, da der gesamte Ansatz gemeinsam auf einem Objektträger präpariert und aufgearbeitet wurde.

Fall Nr. 13: B-ALL, männlich; 20 Jahre (Abbildung 4.5)

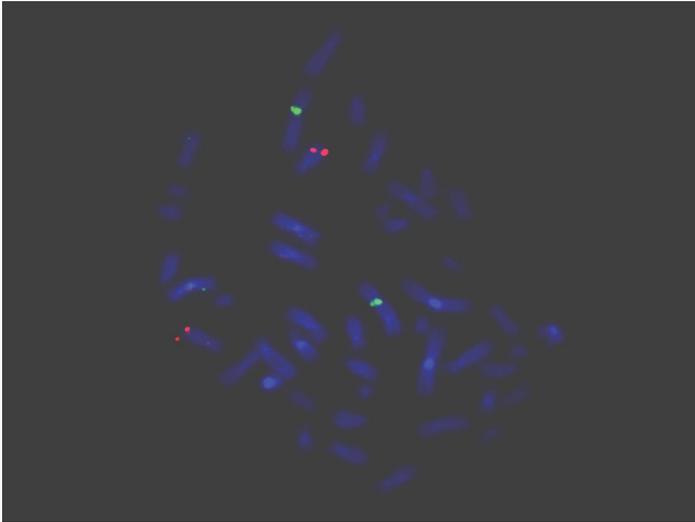


Abbildung 4.5: Eine schöne Darstellung einer Hybridisierung an Metaphasechromosomen. Gezeigt wird das Sondenpaar für den Igκ-Lokus. Weiterhin deutlich erkennbar ist die Signalsplittung durch die separaten Chromosomenärmchen.

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Karyotyp: 46,XY

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Von 200 ausgezählten Interphasekernen konnten bei guter Hybridisierungseffizienz 179 bewertet werden (89%). Genau ein Prozent der Kerne wies ein Translokationsmuster auf.

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

Nur 190 Interphasekerne standen für die Auszählung zur Verfügung. Davon zeigten 120 zumindest ein Sondersignal (63%). In 0,5% Prozent der Fälle wurde ein Fusionsignal detektiert.

Interpretation:

Bei leichtem Ungleichgewicht bezogen auf die Verteilungsdichte der Interphasekerne auf dem Objektträger gelang eine insgesamt ausreichende Hybridisierungseffizienz. Hinweise auf eine aberrante Leichtkettentranslokation waren im vorliegenden Ansatz nicht zu finden. Wie in Abbildung 4.5 deutlich zu erkennen erlauben die Sonden teilweise ein getrenntes Signal an den Chromosomenarmen.

Fall Nr. 14: B-ALL, männlich; 42 Jahre

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Anhand der konventionellen Bänderungszytogenetik konnte folgender Karyotyp ermittelt werden: 46,XY,t(8;14)(q24;q32)

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Von den 200 gezählten Interphasekernen konnten 143 zumindest ein Fusionssignal aufweisen. Dies entspricht einer Effizienz von 72%. Hier ergab sich eine Fusionssignalrate von 1,0%.

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

Von 200 gezählten Interphasekernen wiesen nur 115 Kerne ein oder mehrere Sondensignale auf. Dies entspricht einer Hybridisierungseffizienz von 58%. Translokationssignale wurden nicht detektiert.

Interpretation:

Hier findet sich ein konkordantes Ergebnis aus konventioneller Zytogenetik und Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung. Der Karyotyp zeigte eine t(8;14)-Translokation entsprechend einer klassischen Burkitt-Translokation. In der ergänzenden FISH fanden sich auch keine alternativen Hinweise auf eine variante Leichtkettentranslokation mit dem c-MYC-Lokus. Ebenfalls konnte eine mögliche, noch nicht näher bestimmte, Kreuzhybridisierung zwischen den Leichtkettensonden und dem IgH-Lokus nicht nachvollzogen werden.

Fall Nr. 15: B-ALL, männlich; 30 Jahre (Abbildung 4.6)

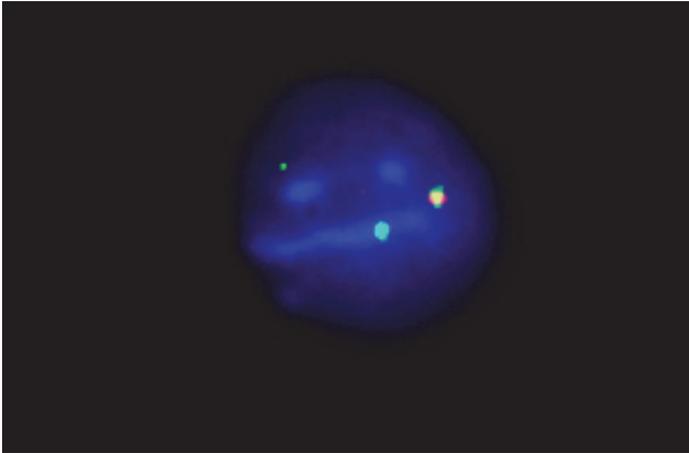


Abbildung 4.6: Deutlich zu erkennen ist ein Fusionssignal aus den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO. Detektiert wird eine Igλ- Translokation.

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Karyotyp: 46,XY,add(1)(p36),t(8;22)(q24;q11)del(14)(q22)

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Von 200 gezählten Interphasekernen konnten 175 (88%) bewertet werden. Nur ein Fusionssignal wurde registriert (0,5%).

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

Von 200 Kernen trugen 188 mindestens ein Sondersignal entsprechend einer Hybridisierungseffizienz von 94%. Insgesamt 14 Zellen (7,0%) zeigten ein Translokationssignal den Igλ-Lokus involvierend.

Interpretation:

Bereits die Bänderungszytogenetik erbrachte den Hinweis auf eine Igλ-Leichtketten-Translokation. Die Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung konnte diese in einem sehr effizienten Hybridisierungsansatz bestätigen (Abbildung 4.6). Somit ist ein Burkitt-Leichtketten-Rearrangement sehr wahrscheinlich.

Fall Nr. 16: B-ALL, männlich; 49 Jahre (Abbildungen 4.7 und 4.8)

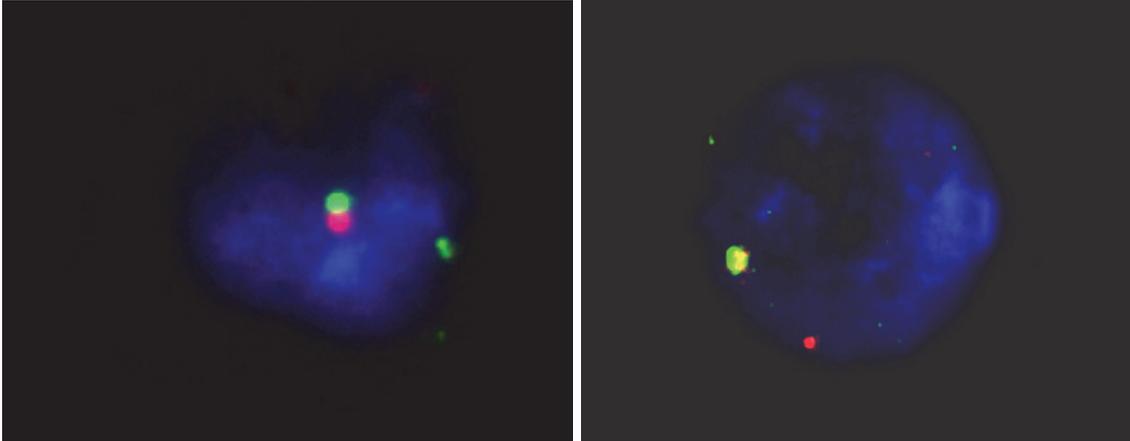


Abbildung 4.7 und 4.8: Deutlich lassen sich auf den Abbildungen die hellen Fusionssignale für den Leichtkettenloкус erkennen. Einerseits als konfluierender gelber Lichtpunkt, oder wie im linken Bild, als Berührung zweier Signale. Unter dem Fluoreszenzmikroskop kommen dafür verschiedene Filter und Vergrößerungen zum Einsatz.

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Zytogenetisch konnte folgender Karyotyp ermittelt werden:

47-48,XY,add(1)(p36),t(2;8)(p13;q24),t(14;18)(q32;q21),+1-2mar

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Von 198 gezählten Interphasekernen wurden 187 bewertet (94%). Die Rate an Fusionssignalen beträgt 7,0%.

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

Von 197 Kernen, welche aus dem Suspensat gewonnen werden konnten, ließen sich 94% (186 Interphasekerne) hybridisieren. Nur drei Kerne wiesen ein Fusionssignal auf.

Interpretation:

Insgesamt handelt es sich hier um einen technisch gelungenen Ansatz. Trotz knapp ausreichenden Zellmaterials konnte für beide Sondenpaare eine hohe Hybridisierungseffizienz erreicht werden. Ein Indiz für die kaum vorhersehbare Lagerungseigenschaft von Patientenmaterial über einen längeren Zeitraum. Übereinstimmend konnte sowohl die FISH als auch die Bänderungsanalyse eine t(2;8)-Variant-Leichtkettentranslokation nachweisen. Der Umstand einer zuzüglichen t(8;14)-Translokation führte zu keiner erhöhten Fusionssignallrate für das zweite Sondenpaar um den Igλ-Lokus.

Fall Nr. 17: NHL, z.B. vom Burkitt-Typ DD ALL, weiblich; 59 J. (Abb. 4.9)

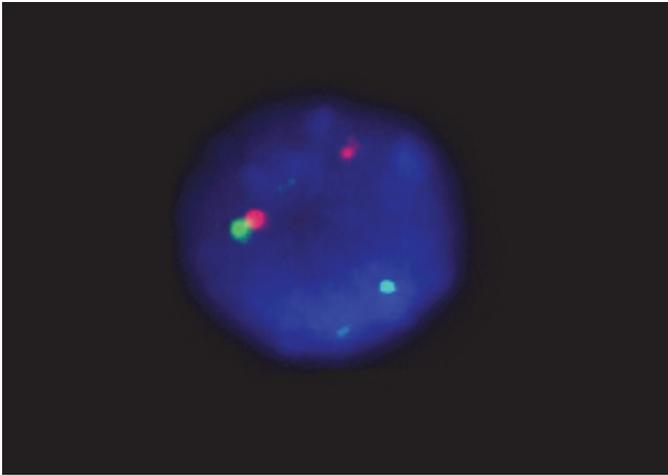


Abbildung 4.9: Das Fusionssignal aus 1019H10 und LSI c-myc SO-Sondenpaar als gelber Lichtpunkt.

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Fall 17 zeigt einen komplexen Karyotyp:

51,XX,+1,der(1)t(1;5)(q10;q10),+2,der(2)del(2)(p11)del(2)(q21q23?),?i(5)(p10),+12,+13,t(14;18)(32;q21),add(22)(p13),+mar

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO

Alle 200 gezählten Interphasekerne konnten hinsichtlich des Hybridisierungserfolgs der Auswertung zugeführt werden. Insgesamt 10 Kerne (5,0%) wiesen ein Fusionssignal auf.

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

Von 207 gezählten Kernen zeigten 204 ein Sondersignal (99%). Die Quote an Translokationssignalen lag bei 11,5%.

Interpretation:

Bei Fall Nr. 17 handelt es sich um einen komplexen Karyotyp, was sich hier möglicherweise als diagnostisch ungünstig auszeichnet. Klinisch wurde die Erkrankung als ein NHL, möglicherweise vom Burkitt-Typ mit der differentialdiagnostischen Erwägung einer ALL geführt und aller Wahrscheinlichkeit auch ebenso behandelt. Die Bänderungszytogenetik zeigte unter anderem die klassische Burkitt-Translokation den

-Ergebnisse-

IgH-Schwerketten-Lokus involvierend, fand jedoch auch Fragmente hinweisend auf eine Leichtkettenaberration, ohne die Translokation spezifizieren zu können. Diesbezüglich war die FISH-Analyse aufschlussreich. Bei ausgezeichneter Hybridisierungseffizienz konnte für beide Varianttranslokationen eine relevante Rate an Fusionssignalen eruiert werden. Diagnostisch wegweisend waren vor allem die 11,5% an Fusionssignalen aus dem Sondenpaar 1019H10 und LSI c-myc SO. Eine t(8;22)-Translokation scheint wahrscheinlich, eine t(2;8)-Translokation kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Fall Nr. 18: B-ALL, weiblich; 58 Jahre

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Karyotyp: 48,X,-X,komplex

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Von 201 gezählten Interphasekernen gingen 188 entsprechend einer Hybridisierungseffizienz von 94% in die Bewertung ein. Detektiert wurden 7 Fusionssignale (3,5%).

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

Aufgrund geringer Materialbestände gelang in diesem Fall kein weiterer auswertbarer Hybridisierungsansatz.

Interpretation:

Leider wurde der Karyotyp in meinen Unterlagen bänderungszytogenetisch nur als komplex bezeichnet. Ob mittels konventioneller Bandenfärbung eine genaue Karyotypisierung möglich war ist mir nicht bekannt. Ebenfalls konnte aufgrund sehr geringer Materialbestände eine Hybridisierung mit dem 1019H10 und LSI c-myc SO-Sondenpaar nicht erfolgen, sodass ebenfalls eine genaue Analyse des Falls mittels FISH nicht möglich war. Ein dringender Verdacht auf eine c-MYC-Igκ-Translokation mit einer Fusionssignalarate hier unter dem Cut-Off-Level ergab sich jedoch nicht.

Fall Nr. 19: B-ALL, männlich; 17 Jahre

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Karyotyp: 46,XY,t(8;14)(q24;q32)

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Von 200 ausgezählten Interphasenkernen trugen 184 ein minimales Signalmuster entsprechend einer Hybridisierungseffizienz von 92%. Vier Kerne wiesen ein Fusionsignal auf (2,0%).

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

Ebenfalls im parallelen Ansatz wurden 200 Kerne erfasst. Die Hybridisierungseffizienz betrug 69%. Fünf Interphasekerne (2,5%) zeigten ein Translokationssignal.

Interpretation:

Die Bänderungszytogenetik zeigte über eine t(8;14)-Translokation hinaus keine weiteren Aberrationen. Ebenfalls ergab die FISH-Analyse keine weiteren Hinweise auf eine Varianttranslokation.

Fall Nr. 20: B-ALL, weiblich; 26 Jahre (Abbildung 4.10)

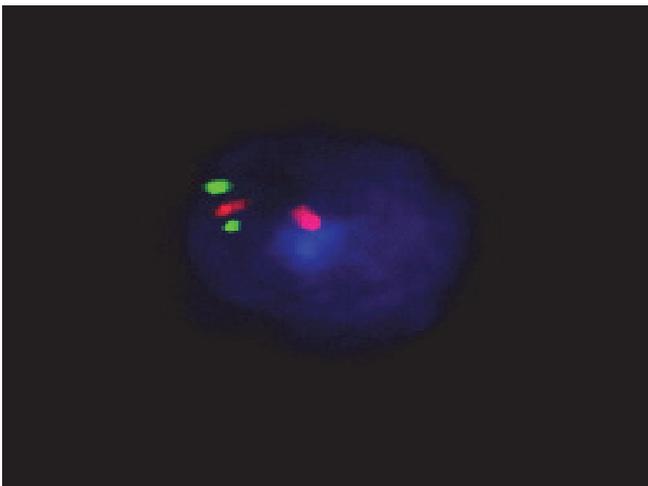


Abbildung 4.10: Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Karyotyp: 46, XX, t(8;14)(q24;q32)

-Ergebnisse-

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Von 201 ausgezählten Interphasenkernen trugen 195 das minimal geforderte Signalmuster entsprechend einer Hybridisierungseffizienz von 98%. Acht Kerne wiesen ein Fusionssignal auf (4,0%).

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

Im parallelen Ansatz wurden 200 Kerne erfasst. Bei einer Hybridisierungseffizienz von 87% trug nur ein Interphasekern (0,5%) ein Translokationssignal.

Interpretation:

Hinweise für eine Varianttranslokation ergaben sich weder in der Bänderungszytogenetik noch, bei sehr guter Hybridisierungseffizienz, in der FISH-Analyse.

Fall Nr. 21: B-ALL, 1. Rezidiv, weiblich; 36 Jahre (Abbildung 4.11)

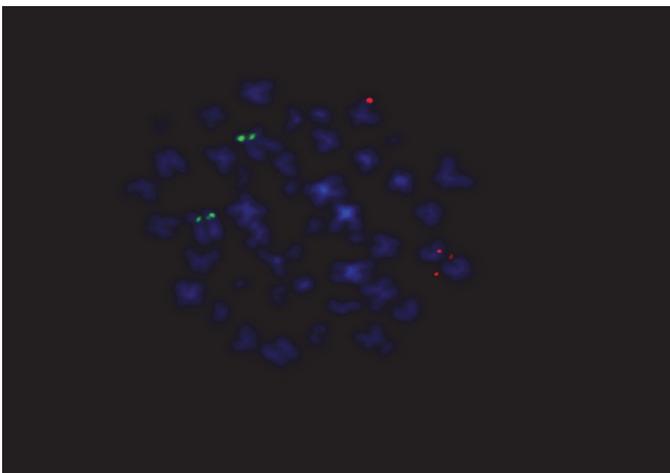


Abbildung 4.11: Zu sehen ist ein Metaphasechromosomensatz. Die Sonden für den Igκ- und Myc-Lokus haben effektiv hybridisiert.

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Karyotyp: 47,XX,+der(1)t(16)(p11;p11),t(8;14)(q24;q32),-14,+der(14)(8;14)(q24;q32)

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Von 200 ausgezählten Interphasenkernen trugen 179 das geforderte minimale Signalmuster entsprechend einer Hybridisierungseffizienz von 90%. Acht Kerne (4,0%) wiesen ein Fusionssignal auf.

-Ergebnisse-

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

Im parallelen Ansatz wurden ebenfalls 200 Kerne erfasst. Vier Interphasekerne trugen ein Translokationssignal (2,0%).

Interpretation:

Obwohl das Karyogramm keinen Hinweis auf eine Burkitt-Leichtketten-Translokation lieferte, zeigte die FISH-Analyse einen relativ hohen Anteil von Fusionssignalen für ein Kappa-Leichtkettenrearrangement. Ob der komplexe Karyotyp zu einem markant höheren Anteil an falsch-positiven Signalen führt, ist nicht auszuschließen. Jedoch ist der Fusionssignalanteil im parallelen Ansatz deutlich geringer.

Fall Nr. 22: B-ALL, männlich; 75 Jahre (Abbildung 4.12)

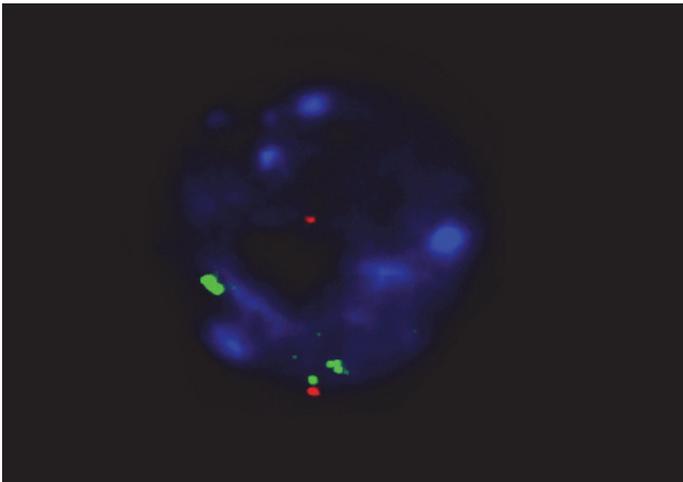


Abbildung 4.12: Zu sehen ist ein Interphasenchromosomensatz. Die Sonden für den Igκ- und Myc-Lokus haben effektiv hybridisiert, wobei das grüne Signal gesplittet ist.

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Karyotyp: 46,XY

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Bei ausreichendem Zellmaterial konnten die geforderten 200 Zellen ausgezählt werden. 180 konnten bezüglich ihres Signalmusters gewertet werden. Es wurde ein Anteil von 1,5% Fusionssignalen erfasst.

-Ergebnisse-

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

Bei 183 von 200 wurde eine Hybridisierung erreicht. Nur zwei Translokationssignale wurden detektiert (1,0%).

Interpretation:

Weder konventionell- noch molekularzytogenetisch zeigte sich bei guter Hybridisierungseffizienz ein Anhalt für eine Leichtkettenaberration.

Fall Nr. 23: ALL, weiblich; 51 Jahre

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Karyotyp: 46,XX,t(8;14)(q24;q32),der(8)t(1;8)(q1?1;p11)

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Aufgrund geringer Materialbestände gelang kein auswertbarer Hybridisierungsansatz.

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

Trotz geringer Materialbestände gelang für diese Sondenkombination ein Hybridisierungsansatz. Von 202 gezählten Interphasen hybridisierten 193 (96%). Ein Anteil von 2,0% an Fusionssignalen wurde ermittelt.

Interpretation:

Aufgrund geringer Materialbestände- und Qualität bei nunmehr zunehmender Lagerungsdauer gelang nur mit der zweiten Sondenkombination ein auswertbarer Ansatz. Hier zeigte sich kein relevanter Anteil an Translokationsbefunden. Die Bänderung zeigt im Wesentlichen eine IgH-Schwerketten-Translokation mit dem c-MYC-Lokus.

Fall Nr. 24: ALL, männlich; 67 Jahre

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Karyotyp: 47,XY,t(8;14)(q24;q32),+?mar

-Ergebnisse-

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Für die Auszählung standen 200 Interphasekerne bereit. 161 zeigten einen Hybridisierungserfolg. Sechs Kerne trugen eine Fusionssignalkonfiguration (3,0%).

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

Aufgrund geringer Materialbestände gelang kein auswertbarer Hybridisierungsansatz.

Interpretation:

Wie im vorangegangenen Ansatz wurde die Hybridisierung durch das bereitstehende Zellmaterial erschwert. Für den Kappa-Lokus wurde eine mäßige Hybridisierungseffizienz erreicht, für den parallelen Ansatz stand leider nicht genügend Material zur Verfügung. Hinweise für eine Igκ/c-MYC-Translokation fanden sich nicht.

Fall Nr. 25: B-ALL, männlich; 73 Jahre

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Karyotyp: 46,XY

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Nur 115 Interphasekerne konnten ausgezählt werden. Darunter zeigten nur 60 einen Hybridisierungserfolg entsprechend einer Hybridisierungseffizienz von rund 52%. Ein Interphasekern trug ein Translokationssignal (1,0%).

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

Von nun 200 gezählten Interphasen konnten dennoch nur 108 hinsichtlich ihrer Hybridisierungssignale bewertet werden. Die Hybridisierungseffizienz (54%) lag analog zum parallelen Ansatz. Es wurde ein Fusionssignalanteil von 3,5% ermittelt.

Interpretation:

Es gelang nur eine geringe Hybridisierungseffizienz. Bemerkenswert ist der Aspekt, dass diese für beide Ansätze nahezu identisch ist (54% und 52%). Daraus lassen sich Rückschlüsse auf ein zu Grunde liegendes Materialdefizit schließen. Der FISH-Befund eines Lambda/c-MYC-Rearrangement ist daher kritisch zu werten.

Fall Nr. 26: B-ALL, männlich; 34 Jahre

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Karyotyp: 46, XY

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

200 Interphasekerne wurden gezählt, 169 zeigten eine Hybridisierung (85%). Nur ein Fusionsignal wurde registriert (0,5%).

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

Ganze 199 von 200 gezählten Interphasekernen zeigten einen Hybridisierungserfolg. Vier Interphasen trugen ein Translokationsmuster (2,0%).

Interpretation:

Bei guter Hybridisierungsqualität konnte kein relevanter Anteil an Fusionsignalen erfasst werden. Ein aberranter Karyotyp lag nicht vor.

Fall Nr. 27: ALL (Kortisontherapie), männlich; 58 Jahre

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Karyotyp: 46,XY

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

200 Interphasekerne wurden gezählt, 150 zeigten eine Sondenanlagerung (75%). Insgesamt 8 Fusionssignale wurden registriert (4,0%).

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

187 von 200 gezählten Interphasekernen konnten hinsichtlich der geforderten Hybridisierungsqualität gewertet werden. Sechs Interphasen trugen ein Translokationsmuster (3,0%).

Interpretation:

Bei mäßiger Hybridisierungseffizienz im ersten Ansatz wurde ein Anteil an Fusionsignalen von 4,0% ermittelt werden. Damit wurde der Cut-Off-Level für das

-Ergebnisse-

Sondenpaar um den Kappa/c-MYC-Lokus nicht überschritten. Jedoch erreichte bei guter Hybridisierungseffizienz das Sondenpaar um den Lambda/c-MYC-Lokus genau den Cut-Off Level von 3,0% ohne diesen Grenzwert letztendlich zu überschreiten. Es ergaben sich somit keine Hinweise für eine Leichtkettenaberration im analysierten Patientenmaterial.

Fall Nr. 28: B-ALL, männlich; 73 Jahre

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Keine Zellen in Teilung. Ein zytogenetischer Befund lag daher nicht vor.

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Nur 72 Interphasekerne konnten gezählt werden, 33 hybridisierten. Nur ein Fusionsignal wurde registriert (1,5%).

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

Aufgrund geringer Materialbestände gelang kein auswertbarer Hybridisierungsansatz.

Interpretation:

Aufgrund geringer Hybridisierungseffizienz, unzureichender Materialbestände und fehlgeschlagenem Parallelansatz auf die Lambda/c-MYC-Translokation ist kaum eine verlässliche Aussage bezüglich einer zu Grunde liegenden Varianttranslokation zu machen. Für eine diagnostische Routineuntersuchung hätte dieser Hybridisierungsansatz kritisch bewertet werden müssen.

Fall Nr. 29: B-ALL, männlich; 56 Jahre

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Karyotyp: 46,XY

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Insgesamt 201 Interphasekerne wurden gezählt, 159 hybridisierten (78%). Jedoch wurden in 6,5% der Fälle ein oder mehrere Fusionssignale detektiert.

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

Aufgrund geringer Materialbestände gelang kein auswertbarer Hybridisierungsansatz.

Interpretation:

Aufgrund geringer Materialbestände konnte kein Hybridisierungsansatz für das Sondenpaar 1019H10/LSI c-myc SO ergänzt werden. In der vorliegenden FISH zeigte sich jedoch ein signifikanter Anteil an Fusionsignalen den Kappa-Leichtketten-Lokus involvierend. Bei 6,5% an Translokationssignalen wurde der Cut-Off-Level signifikant überschritten. Eine entsprechende Translokation konnte die klassische Zytogenetik nicht aufzeigen.

4.2.1.30 Fall Nr. 30: ALL, weiblich; 50 Jahre

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Karyotyp: 48,XX,add(14)(q32),+?der(8)t(8,?)(q24;q?),+?19

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

Aufgrund geringer Materialbestände gelang kein auswertbarer Hybridisierungsansatz.

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

Von 200 gezählten Interphasekernen trugen 185 zur Auswertung entsprechend einer Effizienz von 93% bei. In 4,5% der Fälle ließ sich ein Fusionsignal nachweisen.

Interpretation:

Bei Fall Nr. 30 handelt es sich um einen sehr wichtigen Ansatz zur Einordnung des Stellenwertes der FISH-Analyse. Aus mir nicht bekannten Gründen war es hier bänderungszytogenetisch nicht möglich, den Karyotyp vollständig aufzuschlüsseln. An einer für die Burkitt-Leichtketten-Translokation relevanten Stelle konnte der Translokationspartner der c-MYC-Region nicht identifiziert werden. Dieser konnte schließlich durch die FISH-Analyse aufgedeckt werden: Das Sondenpaar für den Lambda/c-MYC-Lokus lieferte einen signifikanten Anteil an Fusionsignalen (4,5%) und ermittelte somit den Translokationspartner 22q11.

Fall Nr. 31: B-ALL, männlich; 60 Jahre (Abbildungen 4.13 und 4.14)

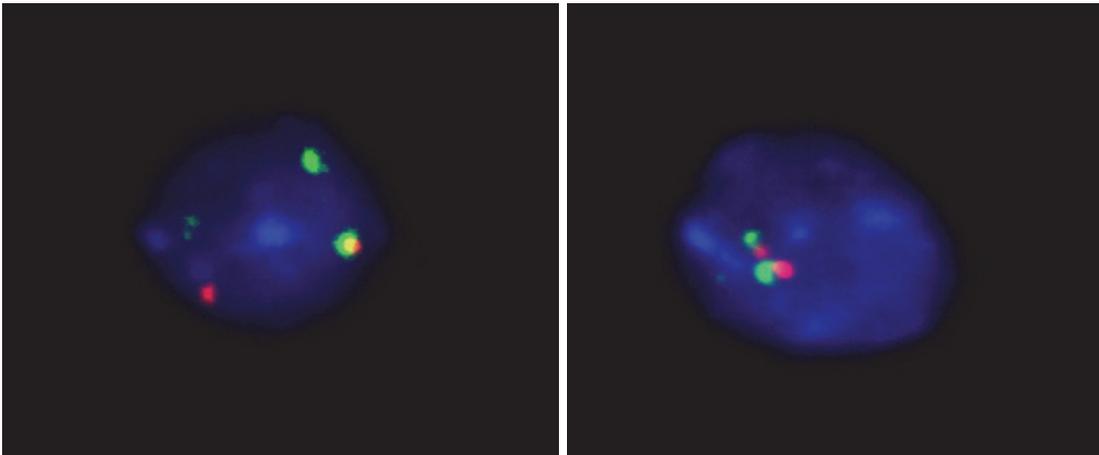


Abbildung 4.13 und 4.14:

Gezeigt werden die Sondenpaare für den Kappa/MYC-Lokus (linkes Bild) und den Lambda/MYC-Lokus. Alle Sonden liefern ein deutliches Signal. Auf dem linken Bild lässt sich ein klares Translokationsmuster abgrenzen.

Ergebnis der konventionellen Bänderungszytogenetik:

Karyotyp: 45-46,XY,inv(2)(p13-15),add(11)(q23),add(13)(q32),-21,+1-2mar

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1117G4 und LSI c-myc SO:

I. Analyse aus Knochenmarkzellen (KM/R 24+T):

200 Interphasen wurden ausgezählt. Die Fusionssignalrate lag bei 1,5%.

II. Analyse aus Blutzellen (B/24 mix):

199 Interphasen wurden gezählt. Die Fusionssignalrate lag ebenfalls bei 1,5%.

Ergebnis der FISH mit den Sonden 1019H10 und LSI c-myc SO:

I. Analyse aus Knochenmarkzellen (KM/R 24+T):

200 Interphasen wurden ausgezählt. Die Fusionssignalrate lag bei 2,0%.

II. Analyse aus Blutzellen (B/24 mix):

200 Interphasen wurden gezählt Die Fusionssignalrate lag ebenfalls bei 2,0%

Interpretation:

Der letzte Fall der Analysereihe (Nr. 31) ist abschließend sehr wichtig zur Evaluierung der methodischen Wiederholbarkeit der FISH-Analyse. Der Fall wurde im doppelten Ansatz bearbeitet. Jedes Sondenpaar wurde nacheinander an Knochenmark- sowie Blutzellen desselben Patienten angewandt. Wie auch die vorangegangene Bänderungszytogenetik konnte auch die FISH keinen Hinweis auf eine Ig-Leichtkettenaberration liefern. Jedoch war zu verzeichnen, dass in beiden Ansätzen für beide Sondenpaare konkordante Werte für die Fusionssignalrate bestimmt werden konnten. Ebenfalls stimmte die Hybridisierungseffizienz überein.

4.2.2 Ergebnisübersicht der FISH-Analyse

Tabelle 4.3 gibt eine Übersicht der Hybridisierungsergebnisse im Patientenkollektiv in Bezug auf den Anteil der Fusionssignale wieder (Tabelle 4.3). Grau hervorgehoben sind die Ergebnisse, die den Cut-off-Level überschreiten und somit hinweisend auf eine Leichtketten-Translokation sind. Zur dezidierten Aufschlüsselung sind gegenüberstellend die Ergebnisse unterstrichen, die genau mit dem Cut-Off-Level zusammenfallen und einzeln diskutiert werden. Methodisch sind diese jedoch nicht als positiv zu Werten. In der vierten Spalte derselben Tabelle sind die Ergebnisse der Bänderungszytogenetik aufgeführt.

Die Tabellen 4.4 und 4.5 schlüsseln für jedes Sondenpaar getrennt die Translokationsraten und die Hybridisierungseffizienz der Ansätze auf. Erneut grau unterlegt sind die Translokationsraten, die den Cut-Off-Level erreichen oder überschreiten. Schwerpunkt dieser Tabellen sind jedoch die methodische Effizienz und die technischen Rahmenbedingungen. Ergänzend wird daher das vorliegende Material zwischen Blut (B) oder Knochenmark (KM) unterteilt und die jeweilige Aufarbeitungsform aufgeführt sowie ferner auf die Lagerungszeit in Jahren (a) in den Gefriereinrichtungen des Instituts verwiesen. Die längste Lagerungsdauer bis zum Zeitpunkt der Analysereihe betrug neun Jahre, die kürzeste betrug hingegen weniger als ein Jahr.

-Ergebnisse-

Tabelle 4.3

Übersicht über die Fusionssignalraten der Sondenpaare im Patientenkollektiv:

Fall-Nr.	1117H10/ c-myc SO	1019H10/ c-myc SO	Ergebnis der Karyotypisierung
1	8,0%	1,5%	46,XX,t(2;8)
2	3,0%	8,5%	46,XX,t(8;14)(q24;q32)
3	3,0%	2,0%	46,XX,t(8;14)(q24;q32)
4	0,5%	2,5%	46,XY,dup(1)(q21q32),t(8;14)(q24;q32),del(13)(q14q22)
5	-	2,0%	46,XX,t(8;14)(q24;q32)
6	1,5%	2,5%	46,XX[26]
7	-	0,5%	46,XY[25]
8	-	3,0%	46,XX[25]
9	2,0%	-	49,XY,add(6)(q2?5),+7,t(8;22)(q24;q11),+12,t(14;18)(q32;q21),+der(18)t(14;18)
10	0%	-	Keine Zellen in Teilung
11	-	3,0%	46,XX,t(2;8)(p12;q24)/ 47,XX,t(2;8)(p12;q24),+mar
12	0%	0%	46,XY[24]
13	1,0%	0,5%	46,XY
14	1,0%	0%	46,XY,t(8;14)(q24;q32)
15	0,5%	7,0%	46,XY,add(1)(p36),t(8;22)(q24;q11),del(14)(q22)
16	7,0%	1,5%	47-48,XY,add(1)(p36),t(2;8)(p13;q24),t(14;18)(q32;q21),+1-2mar
17	5,0%	11,5%	51,XX,+1,der(1)t(15)(q10;q10),+2,der(2)del(2)(p11)(q21,q23?),?i(5)(p10),+12,+13,t(14;18)(q32;q21),add(22)(p13),+mar
18	3,5%	-	44,X,-X,complex
19	2,0%	2,5%	46,XY,t(8;14)(q24;q32)
20	4,0%	0,5%	46,XX,t(8;14)(q24;q32)
21	4,0%	2,0%	47,XX,+der(1)t(1;6)(p11;p11),t(8;14)(q24;q32),-14,+der(14)t(8;14)(q24;q32)
22	1,5%	1,0%	46,XY
23	-	2,0%	46,XX,t(8;14)(q24;q32),der(8)t(1;8)(q1?1;p11)
24	3,0%	-	47,XY,t(8;14)(q24;q32),+?mar
25	1,0%	3,5%	46,XY
26	0,5%	2,0%	46,XY
27	4,0%	3,0%	46,XY
28	1,5%	-	Keine Zellen in Teilung
29	6,5%	-	46,XY
30	-	4,5%	48,XX,add(14)(q32),+?der(8)t(8;?)(q24;?),+?19
31 I	1,5%	2,0%	45-46,XY,inv(2)(p13-15),add(11)(q23),add(13)(q32),-21,++1-2,
II	1,5%	2,0%	mar

Hervorzuheben ist Fall 31, welcher doppelt angelegt wurde. Die Analyse wurde einerseits an Knochenmarkproben als auch an peripherem Blut vorgenommen und kann somit als intraexperimentelle Kontrolle gewertet werden. Die Ergebnisse sind in beiden Ansätzen konkordant.

-Ergebnisse-

Tabelle 4.4:

Ergebnisübersicht Sondenpaar dJ1117G4/LSI-c-myc SO unter besonderer Berücksichtigung der Hybridisierungseffizienz:

Fall	Gezählte Kerne (n)	Hybridisierungseffizienz (%)	Translokationsrate (%)	Material	Lagerungsdauer (a)
1	200	88,0	8,0	KM/24 PG	<1
2	140	65,0	3,0	KM/24 CDM	2
3	199	80,5	3,0	B/R 48 + cam	3
4	200	79,5	0,5	B/24 ALL	3
5	-	-	-	B/direkt	3
6	200	80,5	1,5	B/24/48 mix	3
7	-	-	-	KM/R 24	3
8	-	-	-	B/24 CDM	4
9	200	34,5	2,0	KM/24 mix	4
10	200	71,0	0	KM/R 48	4
11	-	-	-	KM/48 ALL	4
12	200	86,5	0	KM/R 24 cam	5
13	200	89,5	1,0	KM/72 mix	5
14	200	71,5	1,0	KM/48+Fibros	5
15	200	87,5	0,5	KM/24 mix	5
16	198	94,5	7,0	KM/48 mix	5
17	200	100	5,0	B/24 mix	5
18	201	93,5	3,5	KM R/24	5
19	200	92,0	2,0	KM/48 mix	7
20	201	97,0	4,0	KM/48 mix	6
21	200	89,5	4,0	KM/24 mix	7
22	200	90,0	1,5	KM/R 4	7
23	-	-	-	KM/72 mix	7
24	200	80,5	3,0	B/24	7
25	115	52,0	1,0	B/48 mix	7
26	200	84,5	0,5	KM/24 mix	8
27	200	75,0	4,0	KM/R48+SLF/IL7	8
28	73	45,0	1,5	KM/72	8
29	201	79,0	6,5	B/24/72 mix	9
30	-	-	-	B/R 24+T	9
31 I	200	55,0	1,5	KM/R 24+T	9
31 II	199	93,5	1,5	B/24 mix	9

Methodisch wurde die Analyse bei 31 vorliegenden Patientenfällen 21 Mal an Knochenmarkproben und 11 Mal an peripherem Blut durchgeführt. Für Fall 31 lag sowohl Knochenmark als auch peripheres Blut vor.

Die durchschnittliche Hybridisierungseffizienz für das Sondenpaar dJ1117G4/LSI-c-Myc SO liegt bei 79%. Für dJ1019H10 mit LSI-c-Myc SO bei 82,5%.

-Ergebnisse-

Tabelle 4.5:

Ergebnisübersicht Sondenpaar dJ1019H10/LSI-c-myc SO unter besonderer Berücksichtigung der Hybridisierungseffizienz:

Fall	Gezählte Kerne (n)	Hybridisierungseffizienz (%)	Translokationsrate (%)	Material	Lagerungsdauer (a)
1	200	91,5	1,5	KM/24 PG	<1
2	200	91,0	8,5	KM/24 CDM	2
3	200	78,5	2,0	B/R 48 + cam	3
4	200	78,5	2,5	B/24 ALL	3
5	200	80,5	2,0	B/direkt	3
6	205	91,0	2,5	B/24/48 mix	3
7	200	70,5	0,5	KM/R 24	3
8	190	84,0	3,0	B/24 CDM	4
9	-	-	-	KM/24 mix	4
10	-	-	-	KM/R 48	4
11	201	76,0	3,0	KM/48 ALL	4
12	200	45,0	0	KM/R 24 cam	5
13	190	63,0	0,5	KM/72 mix	5
14	200	57,5	0	KM/48+Fibros	5
15	200	94,0	7,0	KM/24 mix	5
16	197	94,5	1,5	KM/48 mix	5
17	207	98,5	11,5	B/24 mix	5
18	-	-	-	KM/R 24	5
19	200	68,5	2,5	KM/48 mix	7
20	200	87,5	0,5	KM/48 mix	6
21	200	85,0	2,0	KM/24 mix	7
22	200	91,5	1,0	KM/R 4	7
23	202	95,5	2,0	KM/72 mix	7
24	-	-	-	B/24	7
25	200	54,0	3,5	B/48 mix	7
26	200	99,5	2,0	KM/24 mix	8
27	200	93,5	3,0	KM/R48+SLF/IL7	8
28	-	-	-	KM/72	8
29	-	-	-	B/24/72 mix	9
30	200	92,5	4,5	B/R 24+T	9
31 I	200	93,5	2,0	KM/R 24+T	9
II	200	95,0	2,0	B/24 mix	9

4.3 Gegenüberstellung der Ergebnisse aus FISH und Bänderungszytogenetik

Betrachtet wurde ein Patientenkollektiv von 31 Patienten. In 29 Fällen lag ein bänderungszytogenetischer Befund im Sinne eines Karyotyps vor. Dieser zeigte in drei Fällen eine t(2;8)-Translokation (Fall 1, Fall 11 und Fall 16). Bei zwei Patienten konnte eine t(8;22)-Translokation gesichert werden (Fall 9 und 15). Die häufigere Immunglobulin-Schwerkettentranslokation t(8;14) zeigte sich in 10 Fällen (Fall 2, 3, 4, 5, 14, 19, 20, 21, 23 und 24). In einem Fall konnte der Karyotyp nur als komplex

-Ergebnisse-

beschrieben werden (Fall 18) und in einem weiteren Fall konnte der Translokationspartner zur c-MYC-Region auf Chromosom 8 nicht weiter bestimmt werden (Fall 30).

Die FISH-Analyse betrachtete die Leichtketten-Aberrationen separat in zwei verschiedenen Ansätzen. Für die Igκ-Varianttranslokation gelang eine Analyse in 25 Fällen. Die Fälle 5, 7, 8, 11, 23, und 30 konnten materialbedingt nicht erfolgreich hybridisiert werden. Für vier Patienten konnte eine variante t(2;8)-Translokation nachgewiesen werden. Der Anteil an detektierten Fusionssignalen lag über dem Cut-Off-Level. In keinem Fall fiel dieser Anteil genau mit dem Cut-Off-Level zusammen. Die Patienten, in denen der Karyotyp eine t(2;8)-Translokation zeigte, konnten durch die FISH sicher bestätigt werden (Fall 1 und 16). In einem Fall detektierte die FISH eine Varianttranslokation, die bänderungszytogenetisch einen komplexen Karyotyp darstellte (Fall 17). In Fall 29 zeigte sich für den Igk/c-MYC-Lokus ein Fusionssignalanteil von 6,5%, obwohl der Karyotyp (46,XY) keine Varianttranslokation aufwies.

Bezüglich der Igλ-Translokation im parallelen Ansatz gelang die Hybridisierung ebenfalls in 25 Fällen. Für 5 Patienten wurde der Verdacht auf eine variante t(8;22)-Translokation geäußert. Bei drei Ansätzen fiel die Translokationsrate mit 3,0%, mit dem Cut-Off-Level zusammen. Bei einem der 5 positiv getesteten Ansätze zeigte die Bänderung eine IgH-Schwerkettentranslokation auf. Die bereits zytogenetisch eruierte t(8;22)-Translokation in Fall 15 konnte durch die FISH bestätigt werden. In Fall 30 konnte die FISH den fehlenden Translokationspartner detektieren.

Zusammenfassend wurde in jedem Fall die Varianttranslokation bestätigt, die bereits im Rahmen der Bänderungszytogenetik gesichert wurde. Hinweise für einen hohen Anteil falsch negativer Befunde der FISH-Analyse ergaben sich nicht, sodass, vorbehaltlich der geringen Fallzahl, von einer hohen Sensitivität der Methode ausgegangen werden kann. Jedoch erbrachten beide Hybridisierungsansätze in zwei bzw. drei Fällen einen signifikanten Befund, der bänderungszytogenetisch nicht nachvollzogen werden konnte. Im Fall von Patient 17 - hier zeigte das Karyogramm einen komplexen Befund ohne Hinweise auf eine Leichtkettentranslokation - zeigten ebenfalls beide Sondenkombinationen einen positiven Fusionssignalanteil. Hieraus müssen in der Diskussion Rückschlüsse auf die Spezifität gezogen werden.

5 Diskussion

5.1 Bewertung der Ergebnisse

Trotz des überschaubaren Patientenkollektivs mit geringer Fallzahl gelingt es der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung die Patienten, die einen Karyotyp mit einer varianten Burkitt-Translokation aufweisen, zu detektieren. Auch wenn ein Vergleich mit dem Goldstandard der PCR noch ausstehend ist, scheint das Ergebnis der vorliegenden Arbeit die hohe Sensitivität der Methode zu bestätigen. In der Tat konnten die Patienten benannt werden, bei denen bereits bänderungszytogenetisch der Verdacht auf eine entsprechende Aberration geäußert wurde. Diese Beobachtung deckt sich mit den Arbeiten von Sonoki et al., die bereits vor Jahren nachweisen konnten, dass c-MYC pathognomonisch von L3-Akuten Lymphatischen Leukämien als auch Burkitt's Type Lymphoma exprimiert wird. Dadurch wird der Stellenwert einer entsprechenden FISH-Diagnostik betont wo andere Methoden möglicherweise eine diagnostische Unschärfe zeigen (Sonki et al. 1995). Hier müssen jedoch sicherlich noch weitere Versuchsreihen herangezogen werden, um die Aussagen statistisch zu validieren, v.a. sollte der Vergleich mit der PCR angestrebt werden. Vorsichtiger müssen hingegen die Aussagen hinsichtlich der Spezifität der Methode getroffen werden. Dies hat zwei Gründe: Erstens fällt auf, dass in einigen Fällen eine Burkitt-Translokation befundet wurde, die nicht durch die Bänderungszytogenetik bestätigt werden konnte. Dies war teilweise der Fall, wenn die Translokation $t(8;14)(q24;q32)$ involviert war. Das Sondenpaar dJ1019H10 und LSI c-MYC zeigte in Fall 2 eine Diskrepanz zum Befund der klassischen Zytogenetik. Dies kann hinweisend auf eine systematische Kreuzhybridisierung sein. Weiterhin scheinen beide Sonden Schwierigkeiten mit einer spezifischen Bindung bei komplexen Karyotypen zu haben (Fall 17).

Erstaunlicher ist der Unterschied der Hybridisierungseffizienz zwischen Kontrollen und dem Patientenkollektiv. Während die Sonden bei den gesunden Probanden eine Hybridisierungseffizienz von 90,0% erreichten, schaffte das Sondenpaar dJ1117G4/LSI-c-myc SO bei den Patientenproben nur eine Hybridisierungsquote von 79,0% und dJ1019H10 mit LSI-c-myc SO eine Effizienz von 82,5%. Mit anderen Worten ist die Methode bei Patientenproben mit einem Fehlhybridisierungsanteil von 17,5% bzw. 21,0% behaftet. Dieser fiel im Rahmen meiner Arbeit umso höher aus desto länger die Lagerungsperiode des Probenmaterials war. Inwieweit dieser Umstand ins Gewicht fällt muss klinisch entschieden werden. Jedoch scheint es unwahrscheinlich,

dass eine Analyse auf eine bestimmte Aberration, die eine therapeutische Konsequenz hat, erst Jahre später durchgeführt wird. Letztlich erzielte die Methode dann die besten Resultate, wenn die Hybridisierung an Probenmaterial gesunder Probanden mit kurzer Lagerungszeit vorgenommen wurde.

5.2 Herstellung von DNA-Sonden durch Extraktion aus E.coli

Die Prozedur zur Extraktion von Plasmid-DNA aus E.coli-Bakterien zur Herstellung von DNA-Sonden erfolgte analog den Vorgaben des *Large-Construct Kit Protocol* der Firma Quiagen[®]. Das Verfahren ist lange etabliert und insgesamt einfach in der Anwendung. Vor allem sind die Resultate hinsichtlich gewonnener DNA-Mengen wiederholbar. Als vorteilhaft hatte sich im Verlauf des Projekts zudem erwiesen, dass die Extrahierte Plasmid-DNA über einen längeren Zeitraum zu lagern war, ohne dass daraus Strangbrüche oder andere eine spätere Hybridisierung erschwerende Schäden resultierten. Eine solche Lagerung war für die spätere Laborroutine sehr wichtig, um im Bedarfsfall eine entsprechende FISH-Analyse durchführen zu können zumal der Extraktionsprozess mehrere Tage in Anspruch nahm.

Weit problematischer war der Vorgang der Markierung der Plasmid-DNA. Zwar ist auch hier die Technik zur Fluoreszenzmarkierung lange erprobt fanden sich jedoch in der Literatur keine Angaben zur dauerhaften Lagerung von selbst extrahierten Sonden. Während die kommerziell erworbenen Sonden für den c-MYC-Lokus ohne Probleme im markierten Zustand gelagert werden konnten musste der Versuch der Vorratsmarkierung der Leichtkettensonden aufgegeben werden. Der Grund hierfür lag im Qualitätsverfall der Sonden hinsichtlich Hybridisierungseffizienz und Signalstärke. Letztlich musste für jeden Versuchsansatz eine erneute Plasmidmarkierung erfolgen. Dadurch dehnte sich der Analysezyklus der gesamten Prozedur auf drei Tage.

Zusammenfassend zeigte sich die Methode der Eigenextraktion von Plasmid-DNA aus E.coli mit abschließender Fluoreszenzmarkierung als möglich jedoch im Vergleich zu den kommerziellen c-MYC-Sonden als deutlich aufwendiger. Schließlich kostete allein die Vorbereitungsphase zur Etablierung der entsprechenden Leichtkettensonden über die Hälfte der gesamten Projektdauer. Dennoch eignet sich die Methode der Selbstextraktion von PAC-Klonen für eine FISH-Analyse gerade dann, wenn auf eine sehr seltene Aberration untersucht werden soll. Teure Sonden müssen so nicht für jede Aberration vorgehalten werden.

5.3 Effizienz der DNA-Sonden und der Hybridisierung

Zur Beurteilung der Effizienz des FISH-Verfahrens wurde im Rahmen meiner Arbeit bei 10 gesunden Kontrollen der Anteil der zu erwartenden Verteilung der c-MYC- und Leichtketten-Loci an 200 Interphasenkernen untersucht. Einer der Hauptbefunde der Versuchsreihe war schließlich die unterschiedliche Effizienz der Hybridisierung und somit retrospektiv die Effizienz der DNA-Sonden in Betrachtung des Kontrollgruppenkollektivs im Gegensatz zur Patientenmessreihe. Letztere beziffert einen Fehlhybridisierungsanteil von 17,5 bzw. 21,0%. In der Kontrollgruppe konnte ein Hybridisierungsanteil von 90,0% erzielt werden. Zum Vergleich sollen hier Hybridisierungseffizienzen einer vergleichbaren YAC-Sonde (yeast artificial chromosome) für den BCR-Lokus herangezogen werden. Cabot et al. erreichten in deren Arbeiten eine Hybridisierungseffizienz von $95,8 \pm 0,9\%$ (Cabot et al. 1995; Rieder et al. 1998). Während die Leichtkettensonden für die Burkitt-Translokationen bei gesunden Probanden eine nur marginal geringere Effizienz erbrachten konnte im Gegensatz zu vergleichbaren Untersuchungen die Effizienz im Patientenkollektiv nicht ganz erreicht werden.

5.3.1 Rate an Ig κ -myc/Ig λ -myc Fusionssignalen in der Kontrollgruppe

Zur weiteren Analyse der Effizienz der Sondenpaare wurden die falsch positiven Ig κ /MYC- und Ig λ /MYC-FISH-Signale in der Kontrollgruppe ermittelt. Bekanntermaßen trägt die zweidimensionale Projektion der Signale in einem theoretisch dreidimensionalen Zellkern zum Auftreten falsch-positiver Fusionssignale durch ein zufälliges Übereinanderliegen der entsprechenden Chromosomenabschnitte bei (Dewald et al. 1993; Lukasova et al. 1997; Rieder et al. 1998). Im Rahmen meiner Untersuchung wurde hier im Gegensatz zu vergleichbaren Ansätzen Material von 10 gesunden Kontrollen herangezogen. Analog zu den Kriterien von Chase und Mitarbeitern wurde nach Kriterium A dann eine Zelle als positiv bewertet, wenn sich das Leichtketten- und c-MYC-Signal überlappt bzw. berührt (Chase et al. 1997; Rieder et al. 1998). Ein zusätzliches Kriterium B, welches weiterhin diejenigen Zellen als positiv wertet in denen beide Signale weniger als einen Signaldurchmesser voneinander entfernt liegen wurde nicht angewandt.

In der Kontrollgruppe fand sich für den Igκ-Lokus (Sondenpaar dJ1117G4/LSI-c-myc SO) ein Anteil falsch positiver Zellekerne von 0,9%. Derselbe Wert konnte für den Iglλ-Lokus mit dem Sondenpaar dJ1019H10/LSI-c-myc SO ermittelt werden. Direkte Vergleichswerte fanden sich für FISH der Burkitt-Varianttranslokationen in der Literatur nicht. Zieht man jedoch vergleichend FISH-Analysen der Philadelphia-Translokation heran findet man für diese in der Kontrollgruppe höhere Werte falsch positiver Zellen. Dewald und Mitarbeiter belegten 1993 in einer Arbeit an 25 gesunden Probanden einen Anteil von 1,5% bis 6,0% falsch positiver Zellkerne (Dewald et al. 1993).

5.3.2 Falsch positive FISH-Befunde bei ALL-Patienten

Da nach Abschluss der Arbeit noch keine Vergleichsdaten mit der PCR vorlagen erfolgte der Vergleich der Ergebnisse mit den Befunden der Chromosomenbandenanalyse, welche fast vollständig für die 31 Patienten vorlagen. Vorbehaltlich der Validität der klassischen Zytogenetik kann eine Diskrepanz in den Befunden als falsch positives Ergebnis der FISH-Analyse gewertet werden. Falsch negative Befunde ergaben sich im Rahmen der Arbeit nicht.

In insgesamt fünf Fällen ohne bänderungszytogenetischen Hinweis auf eine der beiden Burkitt-Varianttranslokationen lag die Rate an Fusionssignalen der FISH-Analyse über dem ermittelten Cut-off-Level. In einem dieser Fälle lieferten beide Sondenpaare einen vermeintlich falsch positiven Befund (Fall 17). Bei zwei Fällen lag die Fusionssignalarate nur knapp über dem ermittelten Grenzwert (3,5% und 5,0%), bei den übrigen jedoch signifikant darüber (6,5%-11,5%).

In Fall 17, bei dem beide Sondenpaare ein zur Bänderungszytogenetik falsch positives Ergebnis lieferten, handelte es sich um einen Patienten mit komplexem Karyotyp, welcher hier unter der Verdachtsdiagnose eines Non-Hodgkin-Lymphoms (DD vom Burkitt-Typ) mit der differentialdiagnostischen Erwägung einer akuten lymphatischen Leukämie geführt wurde. Möglicherweise war hier der hyperploide Chromosomensatz (n=51) eine Ursache für die erhöhte Kolokalisationsrate. Vor allem der Zugewinn eines Chromosoms 22 und eines Chromosoms 2 schien mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für eine zufällige Kolokalisation von FISH-Signalen einherzugehen. Allerdings konnte dieser Verdacht anhand der gesunden Kontrollgruppe mit normalen Chromosomensatz nicht geprüft werden. In einer Arbeit von Rieder, Bonwetsch und Mitarbeitern aus dem

-Diskussion-

Jahre 1998 konnte anhand von FISH-Analysen des Philadelphia-Chromosoms festgestellt werden, dass innerhalb der Kontrolluntersuchung die Fälle mit einem Chromosomensatz größer 50 im Gegenteil sogar eine signifikant niedrigere Rate an falsch positiven Ergebnissen aufwiesen (Rieder et al. 1998). Insgesamt ist auch bei anderen Leukämieformen eine Häufung von Chromosomen-Trisomien beschrieben (Raimondi et al. 1996). Meine Beobachtungen aus Fall 17 bestätigend beschrieben Secker-Walker und Mitarbeiter bei an akuter lymphatischer Leukämie erkrankten Kindern mit jeweils 47 Chromosomen in zwei von sieben Fällen ein überzähliges Chromosom 22 (Secker-Walker et al. 1990; Rieder et al. 1998). In einer weiterführenden Literaturübersicht von 1026 erwachsenen ALL-Patienten konnte unter anderem ein zusätzliches Chromosom 22 bei 120 Fällen beobachtet werden. Insgesamt scheint das Chromosom 22 bei Patienten mit zwei überzähligen Chromosomen vergleichsweise überrepräsentiert (Mertens et al. 1996; Rieder et al. 1998). Zusammen mit der zweidimensionalen Projektion der Signale und dadurch erhöhten Koloalisationsrate durch zufällige Überlappung sollte auch bei der ALL die bereits durch Rieder, Bonwetsch und Mitarbeitern formulierte Empfehlung gelten das Signalmuster bei dem Leichtketten/c-MYC-Rearrangement exakt zu bestimmen, um im Falle einer überproportional erhöhten Kopienzahl das Vorliegen einer erhöhten Rate falsch positiver Befunde erkennen zu können (Rieder et al. 1998). Jedoch scheint es nicht realisierbar, für verschiedene Subgruppen und Diversitäten, z.B. für verschiedene Zellkerngrößen, unterschiedliche Grenzwerte festzulegen, da eine zu diesem Zweck ausreichend große Fallzahl nicht zu gewährleisten ist. Letztlich bleibt unklar, ob ein polyploider Chromosomensatz allein ursächlich für eine erhöhte Rate falsch positiver Ergebnisse ist obwohl meine Beobachtungen aus Fall 17 dies andeuten.

Unklar bleibt weiterhin die Ursache für die falsch positiven Befunde in den Fällen 2, 25 und 29. Ein komplexer Karyotyp lag nicht vor. Eine Kreuzhybridisierung mit dem IgH-Schwerkettenloкус in Fall 2 ist nicht auszuschließen, wird jedoch in den anderen Fällen nicht beobachtet. Ursache für das falsch positive Ergebnis von Fall 25 ist a.e. die sehr geringe Hybridisierungseffizienz in diesem Ansatz.

5.4 Qualitätsverlust der FISH-Analyse in Abhängigkeit der Lagerungsperiode der Proben

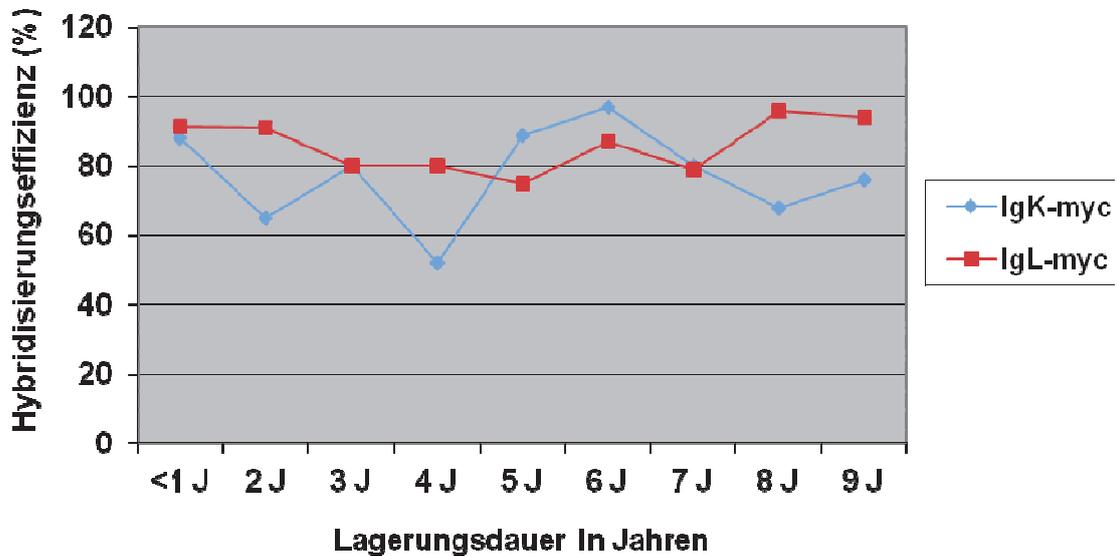
Zu Beginn meiner Versuchsreihe stand mir aus den Gefriereinrichtungen des Instituts für Humangenetik der Universität Marburg Zellmaterial von ALL-Patienten unterschiedlicher Lagerungsdauer zur Verfügung. Die jüngste Probe (Fall 1) lagerte zum Zeitpunkt der Analyse weniger als ein Jahr in den Gefriereinrichtungen. Die ältesten Patientenproben wurden mehr als 9 Jahre archiviert (Fälle 29 bis 31).

Im Laufe der Experimente schien sich ein Zusammenhang zwischen Lagerungsdauer des Zellmaterials der Patientenproben und der Hybridisierungseffizienz abzuzeichnen. Jedoch konnte dieser Zusammenhang nach Auswertung aller Ergebnisse statistisch nicht bestätigt werden. Zur Veranschaulichung dient Diagramm 5.1 welches die Lagerungsdauer ins Verhältnis zur Hybridisierungseffizienz setzt getrennt für beide Sondenpaare (Diagramm 5.1). Anhand des Diagrammverlaufs lässt sich klar erkennen, dass kein Zusammenhang zwischen Probenalter und Hybridisierungseffizienz besteht. Vielmehr scheinen die Unterschiede der Effizienz der einzelnen FISH-Ansätze zurückführbar sein auf die unterschiedliche Quantität an Probenmaterial was jedoch anhand von objektiven Parametern nicht belegt werden kann. Da das Patientenmaterial bereits für andere Untersuchungsreihen herangezogen wurde lag für meine Experimente teilweise nur wenig Material vor. So konnte für einige Fälle bei frustriertem Primäransatz keine Wiederholung der Hybridisierung vorgenommen werden. Daher liegt für einige Fälle nur die Auswertung für ein Sondenpaar vor.

Trotz dieser Einschränkungen ist es zusammenfassend dennoch möglich auch aus fixiertem und archiviertem Tumormaterial erfolgreich FISH-Analysen durchzuführen. Mögliche Qualitätsverluste, die sich jedoch nicht aus der Lagerungsperiode sondern vielmehr aus der verbliebenen Zellquantität ableiten müssen berücksichtigt werden. Dadurch ist es theoretisch möglich bei Leukämien auch retrospektiv Untersuchungen auf chromosomale Aberrationen durchzuführen. In welchem Fall sich in der klinischen Routine eine solche Fragestellung ergeben könnte ist allerdings unklar.

Diagramm 5.1:

Darstellung der Hybridisierungseffizienz in Abhängigkeit der Lagerungsdauer des Probenmaterials getrennt für beide Leichtketten/c-MYC -Rearrangements



5.5 Vergleich der Methoden und Ihrer Einflussfaktoren

Um abschließend auf eine der eingangs gestellten zentralen Fragen meiner Arbeit zurückzukommen soll nun die Frage diskutiert werden, welchen Beitrag die Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung im Vergleich zu anderen Techniken zur Detektion varianter Burkitt-Translokationen liefert. Im Rahmen der Untersuchungen vor allem am Patientenkollektiv wurden mehrere Einschränkungen und schließlich auch Grenzen der Anwendung der FISH verdeutlicht. Allen voran handelt es sich bei dieser Form der Fluoreszenzhybridisierung mit vorangehender Extraktion entsprechender DNA-Sonden aus E.coli-Stämmen um eine aufwendige und vor allem untersucherabhängige Prozedur. Dies ist vor allem bei der Untersuchung auf die Varianttranslokationen vom Burkitt-Typ relevant wo häufig nur wenige Prozent zwischen positivem und negativem Ergebnis entscheiden. So kann trotz aller Sensitivität der Methode die Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung selbstverständlich nicht alleine zur Befundung von Varianttranslokationen herangezogen werden. Zumindest sollte parallel eine Chromosomenbandenanalyse und PCR erfolgen.

Ein großes Problem ist v.a. die hohe Variabilität der Fusionssignale innerhalb der t(2;8)(p11;q24) und t(8;22)(q24;q11)-positiven Fälle. Hier mussten vorab die Kriterien

für das Vorhandensein eines positiven Fusionssignals festgelegt werden welche dann anhand von 200 Interphasezellkernen ausgezählt wurden. Hieraus entsteht eine hohe Untersucherabhängigkeit. Im Rahmen von FISH-Untersuchungen an BCR-ABL positiven Patienten ist es durch die Fusionssignalvariabilität laut einer Studie von Dewald und Mitarbeitern zu fehlerhaften Diagnosen gekommen wenngleich es in einer Arbeit von Rieder, Bonwetsch und Mitarbeitern zu keinen falsch negativen Befunden kam (Dewald et al. 1993, Rieder et al. 1998). Die Beeinflussbarkeit durch das gewählte Auswertungskriterium konnte ebenfalls durch Chase und Mitarbeiter nachgewiesen werden (Chase et al. 1997). Wie bereits angedeutet wurde in deren Arbeiten ein Kriterium A (Signale überlappen oder berühren sich) von einem Kriterium B unterschieden (Signale sind weniger als ein Signaldurchmesser voneinander entfernt). Durch Ergänzung des Kriteriums B konnte somit die Rate an falsch negativen Ergebnissen auf 2,0% verringert werden, erhöhte sich jedoch gleichsam die Rate an falsch positiven Fusionssignalen von 6,1% (Kriterium A allein) auf 17,6%. So wird nicht zuletzt ein (objektives) Auswertungskriterium durch die untersucherabhängige Interpretation der Lage der Signale bestimmt. Um dieser Problematik zu entgehen, wählte ich in meiner Arbeit bereits im Kontrollgruppenkollektiv ausschließlich das Kriterium A weil dieses weniger Interpretationsspielraum zuließ und bediente mich im Rahmen der Auswertung stets (soweit möglich) einer großen Anzahl an Zellkernen.

Dass Kriterium B trotz der Verringerung der falsch negativen Befunde kritisch zu bewerten ist, liegt an der Physik der Geometrie der Interphasezellkerne auf einem Objektträger. Naturgemäß handelt es sich bei einem Interphasezellkern um ein dreidimensionales Gebilde im mikroskopischen Bereich. Die optische Auswertung begibt sich bereits aufgrund physiologischer Einschränkungen des Untersucher und der Technik zurück auf eine Zweidimensionalität, welche die räumliche Struktur in der Anordnung der Chromosomensignale nicht wiederzugeben vermag. Dadurch kann eine Überlappung der Signale nur vorgetäuscht werden, während die Signale in Wirklichkeit hintereinander liegen. Dies konnte anhand einer Studie von Kozubeck und Mitarbeitern eindrucksvoll nachgewiesen werden (Kozubeck 1997). Bezogen auf ein BCR-ABL-Rearrangement fanden sich bei Untersuchungen an gesunden Probanden vergleichsweise kleine Abstände der Signale. Bei Abständen zwischen teilweise nur 0 und 0,5 μm führte dies in 5% der Zellen zur falsch positiven Diagnose eines Philadelphia-Chromosoms. Vergleichbare Daten für die Burkitt-Variant-Translokationen fanden sich in der Literatur bisher leider nicht. Jedoch könnten

spezielle Mikroskopieverfahren, die zur Bestimmung der Abstände zwischen Chromosomenregionen eingesetzt werden eine dreidimensionale Auswertung der FISH-Ansätze ermöglichen. Ein routinemäßiger Einsatz ist mir allerdings nicht bekannt (Rieder et al. 1998)

Ein weiterer die Variabilität der Ergebnisse steuernder Einflussfaktor ist möglicherweise die Wahl des Untersuchungsmaterials. Zu Beginn meiner Experimente standen Patientenproben sowohl aus Knochenmarkaspirat als auch Blutzellen zur Verfügung die teilweise unterschiedliche Kultivierungszyklen- und Techniken durchliefen. Ob die Kultivierungszeit das Untersuchungsergebnis beeinflusst ist allerdings umstritten. In einer Studie von Chen und Mitarbeitern aus dem Jahre 1997 fanden sich Hinweise auf eine Steigerung der Fusionssignalrate bei der Ausschließlichen Verwendung von Knochenmark (Chen et al. 1997). Ein solcher Zusammenhang konnte bei einer weiteren Untersuchung aus demselben Jahr, durchgeführt von Lukasova und Mitarbeitern, nicht nachvollzogen werden (Lukasova et al. 1997; Rieder et al. 1998). Auch in meinen Untersuchungen konnte keine Ergebnisvariabilität zwischen Knochenmark- und Blutproben nachgewiesen werden. Während die Arbeitsgruppe um Lukasova und Mitarbeitern keinen Unterschied zwischen der Unterschiedlichen Materialien fand, konnte jedoch eine Beeinflussung der Abstände der Sondensignale durch das Stadium der Zellen im Zellzyklus nachgewiesen werden (Lukasova et al. 1997; Rieder et al. 1998). Auf diese zytobiologischen Einflussfaktoren konnte aufgrund technischer Limitationen im Rahmen meiner Arbeiten jedoch keine Rücksicht genommen werden.

Vergleicht man nun die Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung mit der Bänderungszytogenetik ergeben sich bei letzterer völlig andere technische Einschränkungen. Als Einflussfaktoren sind zu nennen: Die Art des verwendeten Materials, die Dauer der Materialentnahme- und Verarbeitung, die Dauer der Zellkulturen und vor allem die Art des eingesetzten Kulturmediums. Begrenzungen bestehen hier schließlich durch einen absoluten Mangel an Zellen oder an den auswertbaren Mitosen (Rieder et al. 1998).

Eine prägnante Arbeit zu Unterschieden zwischen der Verwendung von peripherem Blut oder Knochenmark hinsichtlich Diagnose des leukämischen Klons erfolgte durch Stewart und Secker-Walker 1986. Die exakte Diagnose wurde bei Verwendung von Knochenmarkaspirat in 60-88% der Fälle, bei peripherem Blut nur in 43-55% der Fälle gestellt (Stewart und Secker-Walker 1986,; Rieder et al. 1998). Diese Beobachtung

konnte innerhalb meiner Versuchsreihe nicht bestätigt werden. Zudem muss das Stadium der Erkrankung (Leukämische Ausschwemmung, Blastenexzess) stets berücksichtigt werden.

Betrachtet man weiterhin die Periode zwischen Materialentnahme- und Verarbeitung konnten Williams und Mitarbeiter im Jahr 1984 bei Verlängerung der Zeitspanne eine Reduktion der Zahl sich teilender Zellen registrieren. In 95,5% der Fälle konnte ein Gewinn an Mitosen registriert werden, wenn die Kultivierung der Proben unmittelbar nach Entnahme erfolgte. Dadurch konnte eine zu große Milieuverschiebung im Säure-Base- und Elektrolythaushalt der Zellen vermieden werden (Williams et al. 1984; Rieder et al. 1998). Einen Schritt weiter gehen die Ergebnisse um Hawkins und Secker-Walker, die nicht nur einen Verlust an Mitosen, sondern zudem eine Veränderung der Häufigkeit chromosomaler Aberrationen durch Verlängerung der Lagerungsperiode herausarbeiteten (Hawkins und Secker-Walker 1991; Rieder et al. 1998). Diese Ergebnisse herausgreifend muss man also hinterfragen, ob diejenigen Fälle, bei denen die FISH-Analyse im Gegensatz zur Bänderungszytogenetik einen positiven Befund bezogen auf eine Burkitt-Varianttranslokation lieferte möglicherweise auf ein falsch negatives Ergebnis der Chromosomenbandenanalyse zurückzuführen ist. Vor allem in den Fällen 2, 25 und 29 lieferte die Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung einen positiven Befund für das Vorliegen einer $t(8;22)(q24;q11)$ -Translokation. Die Bänderungszytogenetik zeigte jedoch hier nur eine Schwerekettenaberration $t(8;14)(q24;q32)$ oder einen normalen Karyotyp. Für die Diskrepanz muss zum einen ein falsch negativer Befund der Bänderungszytogenetik oder ein falsch positiver Befund der FISH-Analyse durch eine Kreuzhybridisierung diskutiert werden.

Nach Therapiebeginn oder abgeschlossener Therapie zeigte sich in der Chromosomenbandenanalyse an kultivierten Metaphasechromosomen ein höherer Anteil persistierender Zellen im Gegensatz zur FISH (45-100% gegenüber 22-30%). Hier konnte als Ursache die stärkere proliferative Kapazität und raschere Regeneration der leukämischen Zellen nachgewiesen werden (Chen et al 1997; Rieder et al. 1998).

Schließlich muss für die Bänderungszytogenetik die Zellkulturzeit berücksichtigt werden. Sicherlich gelingt bei der Direktpräparation ein besseres Ergebnis hinsichtlich Anzahl sich teilender Zellen. Jedoch konnte durch Kurzzeitkulturen eine bessere Regeneration der Zellen nach Aufarbeitung und Transport erreicht und so der mittlere Anteil der leukämischen Zellen gesteigert werden. In der Tat übertrifft die Apoptose-Rate der leukämischen Blasten nach Kurzzeitkultur die der normalen Zellen. Eine

Verbesserung von 50% gegenüber 23% in der Direktpräparation konnte erreicht werden (Li et al. 1991; Rieder et al. 1998). Doch auch in Anbetracht unterschiedlicher Modifikationen zur Optimierung der Ergebnisse der Bänderungsanalyse sollten immer mehrere Kultivierungsansätze bearbeitet werden. Bei Untersuchung nur eines Ansatzes kann unter Umständen in nur 33-50% der Fälle ein leukämischer Klon detektiert werden. Zellen mit einem langen Zellzyklus können hier der Vermehrung in Kurzzeitkulturen entgehen (Stewart und Secker-Walker 1986). Hinzu kommt, dass immunologische Subtypen der ALL ganz spezieller Kulturmedien bedürfen. So kultivieren exemplarisch Zellen der pro-B-Zellreihe besser bei Vorhandensein von Stromazellen des humanen Knochenmarks. Es konnte beobachtet werden, dass diese Art der Kultivierung eine Apoptose der leukämischen Zellen verhindern kann (Manabe et al 1993; Rieder et al. 1998). Diese Einschränkungen müssen ebenso für die Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung berücksichtigt werden. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass die positiven Ergebnisse der FISH in der vorliegenden Arbeit der Bänderungszytogenetik verborgen blieben. Zur Klärung sollten die Ergebnisse anhand der PCR geprüft werden. Dieser Ansatz erfolgte in einer Arbeit von Rieder, Bonwetsch und Mitarbeitern im Jahre 1998. Bei der FISH-Analyse eines BCR/ABL-Rearrangements an 54 Patienten konnte im Vergleich zu PCR und Chromosomenbandenanalyse keine der drei Methoden in allen Fällen die richtige Diagnose stellen. Ähnlich zu den Ergebnissen meiner Arbeit fanden sich in drei Fällen positive FISH-Befunde ohne Korrelat in den Vergleichsuntersuchungen. Allerdings zeigte die FISH in Analogie zu der vorliegenden Arbeit ebenfalls keine falsch negativen Befunde (Rieder et al. 1998). Genau wie Rieder, Bonwetsch und Mitarbeiter für die BCR/ABL-Translokation kam ich im Rahmen meiner Arbeit zu dem Schluss, dass im Falle widersprüchlicher Ergebnisse aus Chromosomenbandenanalyse und Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung die PCR das Vorhandensein einer varianten Burkitt-Translokation entscheiden kann.

Letztlich bleibt die Interpretation eines FISH-Ansatzes ein subjektiver, benutzerabhängiger Vorgang, der zudem limitiert ist durch die bereits beschriebenen Faktoren wie Quantität und Qualität der Zellen, Kulturmedien- und Zeit sowie Krankheitsstadium. Häufig nicht berücksichtigt ist zudem die unterschiedliche Dichte

-Diskussion-

von Tumorzellen in verschiedenen Proben aber auch Tumorentitäten. So ist es möglich, dass in einigen Erkrankungen nur einige wenige kranke Zellen pro Gesichtsfeld zu finden sind und diese zusätzlich verdeckt werden durch beistehende Zellen. Dies macht die ohnehin schon zeitaufwendige Interpretation von FISH-Analysen ungleich schwieriger, vor allem dann wenn zweifelhafte Fusionsignale nicht beachtet und ganze Befunde als nicht-relevant ausgelegt werden. Dadurch könnten wertvolle Befunde verloren gehen. Insgesamt rückt die Kombination der FISH-Technik mit allen anderen Methoden weiter ins Blickfeld um dieser Limitationen zu umgehen. Darunter ist z.B. exemplarisch die FICTION-Technik zu nennen. Aber auch die Fluoreszenz-Immunphänotypisierung oder die Interphase-Zytogenetik sind viel versprechende Kombinationspartner. Dadurch könnten Aberrationen in einigen wenigen Tumorzellen in einem Konglomerat vieler beistehender gesunder Zellen detektiert werden (Weber-Matthiesen et al. 1992; Siebert et al. 1997; Martin-Subero et al. 2002).

6 Zusammenfassung

Auftrag der vorliegenden Arbeit war es erwachsene Patienten mit einer akuten lymphatischen Leukämie (Erstdiagnose oder Rezidiv) auf das Vorhandensein der beiden Varianttranslokationen $t(2;8)(p11;q24)$ und $t(8;22)(q24;q11)$ vom Burkitt-Typ zu untersuchen und zu diesem Zweck Sonden für die entsprechenden Leichtkettenloci auf Chromosom 2 und 22 zu etablieren. Analysemethode war die Fluoreszenz in-Situ-Hybridisierung an Knochenmark- und Blutproben von insgesamt 31 Patienten. Zum Vergleich der Ergebnisse wurde die Chromosomenbandenanalyse herangezogen.

Vorab gelang im Rahmen des Projekts die erfolgreiche Extraktion von BAC-Klonen für die Leichtkettenloci aus E.coli-Plasmid-DNA. Ebenfalls konnte ein Protokoll für eine wiederholbare In-Situ-Hybridisierung von extrahierten Sonden in Kombination mit den c-MYC-Sonden erstellt werden.

In der anschließenden Auswertung der Hybridisierungen an Patienten wurde zur Ermittlung des Anteils falsch positiver Zellkerne vorab an zehn gesunden Kontrollproben die Rate der entsprechenden Interphasezellkerne bestimmt und so der Cut-off-Level ermittelt. Für das Sondenpaar dJ1117G4/LSI-c-myc SO (spectrum orange) detektierend auf eine Kappa-Leichtkettenaberration fand sich ein Anteil falsch positiver Fusionssignale von 0,9% und für das Sondenpaar dJ1019H10/LSI-c-myc SO (lambda-Leichtkette) ein Anteil von ebenfalls 0,9%. Der Cut-off-Level für den Grenzbereich eines relevanten Befunds wurde somit auf 4,5% bzw. 3,0% (Mittelwert plus dreifache Standardabweichung) errechnet. Gleichzeitig wurde anhand der Kontrollgruppe die Effizienz der Sonden bzw. der Hybridisierung bestimmt. Für beide Sondenpaare konnten 90% der Interphasekerne mindestens ein Signal je für den Leichtkettenloкус sowie für den c-MYC-Lokus zeigen.

In der späteren FISH-Analyse an 31 Patienten gelang aufgrund unterschiedlicher Materialqualität und Probenbestände keine vollständige Analyse für beide Varianttranslokationen. Sowohl für den Kappa- als auch für den Lambda-Leichtkettenloкус konnte eine erfolgreiche Hybridisierung nur in 25 Fällen erfolgen. Für Igk wurde in vier Fällen eine Fusionssignallrate über dem Cut-off-Level gefunden. Die übrigen Fälle lagen unter dem Grenzwert. Für Igl wurde in fünf Fällen der Cut-off-Level überschritten. 3 Fälle waren hier Deckungsgleich mit dem Grenzwert und somit inkonkordant. Die übrigen 15 Fälle lieferten Fusionssignallraten unter dem Cut-off-Level.

-Zusammenfassung-

Methodisch konnten alle Patienten, die bereits durch die Bänderungszytogenetik positiv auf die Varianttranslokationen untersucht wurden durch die Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung bestätigt werden. Es war also von einer hohen Sensitivität der Methode auszugehen. Bezogen auf den I κ -Lokus erbrachte die FISH-Analyse jedoch in zwei Fällen einen positiven Befund, der sich nicht in der Chromosomenbandenanalyse gezeigt hatte. Für den Kappa-Lokus traf dies in drei Fällen zu. Für beide Sondenpaare war diese Diskrepanz dann zu beobachten, wenn ein hochkomplexer Karyotyp mit schwerer Aberration zu analysieren war. Das Sondenpaar dJ1019H10/LSI-c-myc SO zeigte zudem dann ein falsch positives Ergebnis, wenn eine IgH t(8;14)(q24;32) vorlag. Hier könnte eine Kreuzhybridisierung mit dem Schwerekettenloкус ursächlich sein, jedoch wurde dies nur in einem Fall dokumentiert. Zusammengefasst konnte formal im Vergleich zur Chromosomenbandenanalyse eine Sensitivität von 100% erreicht. Die Spezifität schien geringer auszufallen. Da zum Zeitpunkt der Arbeit noch keine Daten für die PCR-Analyse vorlagen war eine genaue Quantifizierung der Sensitivität und Spezifität nicht möglich.

Hauptfehlerquelle für falsch positive Befunde unter Berücksichtigung der Erfahrungen in der Literatur war die Auswahl der Bewertungskriterien bei der Auszählung der Interphasezellkerne. Damit war die Untersucherabhängigkeit bei dieser Methode der größte Störfaktor wenn die Kriterien nicht genau eingehalten wurden. Weitere Fehlerquellen resultierten in der Materialbeschaffenheit und der Lagerungsperiode sowie der Quantität der Proben. Zusätzlich erhöhte möglicherweise eine geringere Kerngröße mit verringertem Verteilungsvolumen bei verschiedenen Malignomen, in jedem Fall aber ein polyploider Chromosomensatz im Zellekern die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Überlagerung der Chromosomenabschnitte mit erhöhter Fusionssignalrate.

Betrachtet man die Untersuchungen, die einen falschen bzw. nicht eindeutigen Befund ergaben, zeigt besonders Fall 17 die Limitationen der FISH-Analyse wenn hochkomplexe Aberrationen untersucht werden. Auch wenn aufgrund der hohen Sensitivität der Methode die FISH-Analyse ein zur Bänderungszytogenetik gleichwertiges Verfahren zu sein scheint, kann eine zuverlässige Diagnose einer akuten lymphatischen Leukämie vom Burkitt-Typ nur durch Kombination aller verfügbaren Verfahren erreicht werden. Zumindest sollte die PCR mit einbezogen werden. Häufig schafft es ohnehin keine einzelne Methode, alle Aberrationen aufzudecken, wird bei hämatologischen Erkrankungen ohnehin eine multimodale Diagnostik gefordert. Zum

-Zusammenfassung-

Ausgleich der geringen Spezifität einer einzelnen Methode müssen zudem bereits klinisch ein ausreichend begründeter Verdacht und eine präzise Fragestellung vorliegen. Nur dann kann die aufwendige Methode der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung mit vorangehender Nick-Translation der Sonden eine wertvolle diagnostische Hilfe sein.

Letztlich ist die Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung eine weit verbreitete Technik um Chromosomen- und Gen-Abschnitte zu detektieren. In der Routine ist die FISH in mittlerweile vielen genetischen und pathologischen Instituten durch die Verfügbarkeit kommerzieller Sonden und Extraktionskits angekommen. Jedoch zeigte sich im „1st Discussion Workshop on Standardisation of FISH-Procedures“ im Jahre 2002, dem ersten Treffen dieser Art, dass die FISH-Prozeduren von Labor zu Labor noch sehr stark variieren und ein Optimum, gar ein Goldstandard für viele medizinische und humanbiologische Fragestellungen weit entfernt ist (Hausmann et al. 2003). Hier wäre es ein interessanter Ansatz, nicht nur Einzel-Sonden-Kits industriell zu etablieren, sondern darüber hinaus spezifische Sondenkombination herzustellen, um sich so für spezifische (hämatologische) Tumoren einer standardisierten und zertifizierten Methode bedienen zu können. So könnte vermieden werden, dass jedes Labor wie beispielsweise im Rahmen der vorliegenden Arbeit an Burkitt-Varianttranslokationen gezwungen wäre, ein eigenes Hybridisierungsprotokoll erstellen zu müssen. Ziel dieser Anstrengungen müsste ein „universell anwendbares FISH-Protokoll“ sein, wie es schon Michael Vetter im „2nd Discussion Workshop on Standardisation of FISH-Procedures“ forderte (Hausmann et al. 2004). Dies wird jedoch in jedem Fall eine Frage und Abwägung der Kosten werden. Zum jetzigen Zeitpunkt können die Unternehmen nur eine Empfehlung für das einfachste und anwendbarste Protokoll geben. Die Adaptierung auf die eigenen Möglichkeiten muss nach wie vor von den Laboren selbst vorgenommen werden. Darüber hinaus wird in Zukunft die „spot-counter“-Technik, das heißt die computergestützte Auszählung von Interphasekernen bei FISH-Analysen, weiter an Stellenwert zunehmen, ohne dass auf eine letzte Validierung durch den Untersucher verzichtet werden könnte. In Anbetracht der Budgetentwicklung und des steigenden Kostendrucks werden zusätzlich andere Techniken in den Fokus rutschen. Vor allem wird die kostengünstigere PCR mehr und mehr zur konkurrierenden Technik werden. Dass dadurch die FISH aufgrund des Ressourcen- und Zeitaufwands weiter in den Bereich der universitären Forschung gedrängt wird bleibt abzuwarten. Dennoch wird die FISH auch weiterhin ein Feld mit wenigen ausgewiesenen Experten bleiben.

7 Literatur

- Adams JM, Harris AW, Pinket CA et al. (1985): The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318:533-538
- Adolph S, Hameister H, Henglein B, Lipp M, Hartl P, Baas F, Lenoir G, Bornkamm GW (1989): t(2;8) variant translocation in Burkitt's lymphoma: mapping of chromosomal breakpoints by in situ hybridization. *Int J Cancer* 44:261-265
- Akasaka T, Muramatsu M, Ohno H, Miura I, Tatsumi E, Fukuhara s, Mori T, Okuma M (1996): Application of long-distance polymerase chain raction to detection of junctional sequences created by chromosomal translocation in mature B-Cell neoplasms. *Blood* 88:985-994
- Archimbaud E, Charrin C, Ffrench M et al. (1987): Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia following radiotherapy for carcinoma of the cervix. *Acta Haematol* 77:238-240
- Auxenfants E, Morel P, Lai JL, et al. (1992): Secondary acute lymphoblastic leukemia with t(4;11): teport on two cases and review of the literature. *Ann Haematol* 65:143-146
- Barin C, Valtat C, Briault S, Bremond JL, Petit A, Lejars O, Linassier C, Gaschard P, Moraine (1992) : Stuctural rearrangements of chromosome 13 as additional abnormalities in Burkitt lymphoma and type 3 acute lymphoblastic leukemia. *Cancer genet Cytogenet* 60:206-209
- Barrett AG, Horowitz MM, Ash RC et al. (1992): Bone marrow transplantation for Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 79:3067-3070
- Benett JM, Catovsky D, Daniel M-T et al. (1976): Proposals for the classification of the acute leukemias: French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br J Haematol* 33:451-458
- Berger R, Bernheim A, Weh HJ, Flandrin G, Daniel MT, Brouet JC, Colbert N (1979): A new translocation in Burkitt's tumor cells. *Hum Genet* 53:111-112
- Berger R, Le Coniat M, Derré J, Vecchione D (1989): Secondary chromosomal abnormalities of band 13q34 in Burkitt lymphoma-leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1:114-118
- Bhatia KG, Gutiérrez MI, Huppi K, Simwarski D, Magrath IT (1992): The pattern of p53 mutations in Burkitt's lymphoma differs from that of solid tumors. *Cancer Res* 52:4273-4276
- Bokemeyer C, Freund M, Schmoll H-J et al. (1992): Secondary lymphoblastic leukemia following treatment of a malignant germ cell tumour. *Ann Oncol* 3:772

- Britten RJ, Graham DE, Neufeld BR (1974): Analysis of repeating DNA sequences by reassociation. *Methods Enzymol.* 29(0):363-418
- Burmeister T, Schwartz S, Horst HA, Rieder H, Gökbuget N, Hoelzer D, Thiel E (2005): Molecular heterogeneity of sporadic adult Burkitt-type leukemia/lymphoma as revealed by PCR and cytogenetics: correlation with morphologic, immunologic and clinical features. *Leukemia.* 19:1391-1398
- Burmeister T, MacLeod RAF, Reinhardt R, Mansmann V, Loddenkemper C, Marinets O, Drexler H, Thiel E, Blau IW (2006): A novel sporadic Burkitt lymphoma cell line (BLUE-1) with a unique t(6;20)(q15;q11.2) rearrangement. *Leukemia Research.* 30(11): 1417-1423
- Cabot GP, Bentz M, Scholl C, Moos M, Fischer K, Lichter P and Döhner H (1996): High incidence of a second BCR-ABL fusion in chronic myeloid leukaemia revealed by interphase cytogenetic analysis on blood and bone marrow smears. *Cancer Genet. Cytogenet.* 87:107-111
- Campana D und Behm FG (1998): Leukemia and related disorders. Chapter 4. 3rd Edition. Blackwell Science
- Cario G, zur Stadt U, Reiter A, Sykora K-W (2000): Variant translocations in sporadic Burkitt's lymphoma detected in fresh tumor material: analysis of three cases. *Brit J Haematol* 110:537-546
- Carter NP (1994): Cytogenetic analysis by chromosome painting. *Cytometry* 18 (1):2-10
- Cartwright RA et al. (1998): Leukemia and related disorders. Chapter 1. 3rd Edition. Blackwell Science
- Chan LC, Pegram SM und Greaves MF (1987): Contribution of immunophenotype to the classification and differential diagnosis of acute leukemia. *Lancet I*:475-479
- Chase A, Grand F, Zhang JG, Blackett N, Goldman J and Gordon M (1997): Factors influencing the false positive and negative rates of BCR-ABL fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosom.Cancer* 18:246-253
- Chessells JM, Swansbury GJ, Reeves B, Bailey CC, Richards SM (1997): Cytogenetics and prognosis in childhood lymphoblastic leukemia: results of MRC UKALL X. *Br J Haematol* 99 (1): 93-100
- Cortes JE und Kantarjian HM (1995): Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review with emphasis on biology and therapy. *Cancer* 76:2393-2417
- Cory S (1986): Activation of cellular oncogenes in hemopoietic cells by chromosome translocation. *Adv Cancer Res* 47:189-234
- Cuneo A, Bigoni R, Roberti MG, Bardi A, Balsamo R, Piva N, Castoldi G (1997): Detection of numerical aberrations in hematologic neoplasias by fluorescence in situ hybridization. *Haematologica* 82:85-90

- Czepulkowski B und Rooney D (2001): Human Cytogenetics a Practical Approach: Malignancy and Aquired Abnormalities. Oxford Univ Pr (Sd): The Practical Approach Series.
- Dewald GW, Schad CR, Christensen ER, Tiede AL, Zinsmeister AR, Spurbeck JL, Thibodeau SN and Jalal SM (1993): The application of fluorescent in situ hybridization to detect Mbr/abl fusion in variant Ph chromosomes in CML and ALL. Cancer Genet.Cytogenet. 71:7-14
- Digel W (1997/98): Das Rote Buch: Hämatologie und internistische Onkologie. Berger, Engelhardt, Mertelsmann. Landsberg/Lech: ecomed, 1997
- Eder M, Ottmann OG, Hansen-Hagge TE, Bartram CR, Falk S, Gillis S, Hoelzer D, Ganser A (1992): In vitro culture of common acute lymphoblastic leukemia blasts: effects of interleukin-3, interleukin-7, and accessory cells. Blood 79:3274-3284
- Engel H (1999): Empfehlung des Arbeitskreises Laboratorium der DGHO für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH). Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie: www.dgho.de/dgho/fish99.htm
- Felsher DW, Zetterberg A, Zhu J et al. (2000): Overexpression of MYC causes p53-dependent G2 arrest of normal fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA 97:10544-10548
- Fenaux P, Lai JL, Morel P et al. (1988) : Cytogenetics and their prognostic value in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) excluding L3. Haematol Oncol 7:307-317
- Fiedler W, Weh HJ, Zeller W, Fonatsch C, Hillion J, Larsen C, Wörmann B, Hossfeld DK (1991): Translocation (14;18) and (8;22) in three patients with acute leukemia/lymphoma following centrocytic/centroblastic non-Hodgkin's lymphoma. Blut 63:282-287
- Fonatsch C, Schaadt M; Kirchner HH und Diehl V (1980): A possible correlation between the degree of karyotype aberrations and the rate of sister chromatid exchanges in lymphoma lines. Int J Cancer 26:749-756
- Fonatsch C, Burrichter H, Schaadt M et al. (1982): Translocation t(8;22) in peripheral lymphocytes and established lymphoid cell lines from a patient Hodgkin's disease followed by acute lymphatic leukemia. Int J Cancer 30:321-327
- GFCH (1994) Groupe Français de Cytogénétique Hématologique – Acute leukemia treated with intensive chemotherapy in patients with a history of previous chemo- and/or radiotherapy : prognostic significance of karyotype and preceding myelodysplastic syndrome. Leukemia 8:87-91
- Ginestoux C, Lefranc M-P (2000): http://imgt.cines.fr/textes/IMGTrepertoire/LocusGenes/chromosomes/human/IGK/Hu_IGKchrom2.html
IMGT (The International ImMunoGeneTics information system ®) ©
Copyright 1995-2003 IMGT

- Ginestoux C, Lefranc M-P (2001): http://imgt.cines.fr/textes/IMGTrepertoire/LocusGenes/chromosomes/human/IGH/Hu_IGHchrom14.html
IMGT (The International ImMunoGeneTics information system ®) ©
Copyright 1995-2003 IMGT
- Ginestoux C, Lefranc M-P (2000): http://imgt.cines.fr/textes/IMGTrepertoire/LocusGenes/chromosomes/human/IGL/Hu_IGLchrom22.html
IMGT (The International ImMunoGeneTics information system ®) ©
Copyright 1995-2003 IMGT
- Gluck WL, Bigner SH, Borowitz MJ, Brenckmann WD (1986): Acute lymphoblastic leukemia of Burkitt's type (L3 ALL) with 8;22 and 14;18 translocations and absent surface immunoglobulines. *Am J Clin Pathol* 85:636-640
- Gökbuget N und Hoelzer D (1998): Akute lymphatische Leukämie des Erwachsenen. *Onkologie* 4:778-790
- Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (1996) : Cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia: Correlations with hematologic findings and outcome. A collaborative study of the Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. *Blood* 87 :3135-3142
- Hallek M, Wanders L, Strohmeyer S, Emmerich B (1992) : Thymidin kinase : A tumor marker with prognostic value for non-Hodgkin's lymphoma and a broad range of potential clinical applications. *Ann Hematol* 65:1-5
- Haluska FG, Tsujimoto Y, Croce CM (1987): The t(8;14) translocation of the Burkitt's lymphoma cell line Daudi occurred during immunoglobulin gene rearrangement and involved the heavy chain diversity region. *Proc Natl Acad Sci* 84:6835-6839
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J et al. (1999b): World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, 1997. *J Clin Oncol* 17:3835-3849
- Hausmann M, Winkler R, Hildenbrand J, Finsterle A, Weisle A, Rapp A, Schmitt E, Janz S and Cremer C (2003): COMBO-FISH: specific labelling of nondenaturated chromatin targets by computer-selected DNA oligonucleotide probe combinations. *Biotechniques* 35, 664-577
- Hausmann M, Cremer C, Linares-Cruz G, Nebe TC, Peters K, Plesch A, Tham J, Vetter M and Werner M (2004): Standardisation of FISH-procedures: Summary of the Second Discussion Workshop. *Cellular Oncology* 26: 119-124
- Hawkins JM und Secker-Walker LM (1991): Evaluation of cytogenetic samples and pertinent technical variables in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 52:79-84

-Literatur-

- Hayflick L, Moorhead PS (1961): The serial cultivation of human diploid strains. *Exp Cell Res* 25:585-621
- Hecht JL, Aster JC (2000): Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Onkol* 18:3707-3721
- Heim S und Mitelmann F (1995): *Cancer Cytogenetics*. 2nd ed. Wiley-Liss, New York
- Heinonen K und Mahlamäki E (1996): Detection of numerical chromosome abnormalities by FISH in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 87:123-126
- Henglein B, Synovzik H, Groit P, Bornkamm GW, Hartl P, Lipp M (1989): Three breakpoints of variant t(2;8) translocations in Burkitt's lymphoma cells fall within a region 140 kilobases distal from c-myc. *Mol Cell Biol* 9:2105-2113
- Hermans A, Grow J, Selleri L, von Lindern M, Hagemeijer A, Wiedemann LM, Grosveld G (1988): bcr-abl oncogene activation in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2:628-633
- Herold et al. (2005): *Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung*. Köln, 2005.
- Hoelzer D, Thiel E, Löffler H et al. (1984): Intensified therapy in acute lymphoblastic and acute undifferentiated leukemia in adults. *Blood* 64:38-47
- Hudis C, Offit K, Jhanwar S et al. (1990): Prognostic significance of cytogenetic abnormalities in 126 adult patients with newly diagnosed lymphocytic leukemia. *Proc Am Assoc Cancer Res* 31:26-26
- Huret, J-L, <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/t0814ID1050.html>
Dept Medical Information, University Hospital, Poitiers
Ehemals www.infobiogen.fr/services/chrimcancer/Genes
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (Eds; 2001): *World Health Organization Classification of tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC Press: Lyon 2001
- Jahnke K, Burmeister T, Korfel A, Coupland SE, Thiel E (2005): Long distance polymerase chain reaction of ascites lymphoma cells aids diagnosis establishment of abdominal Burkitt's lymphoma and Burkitt-like lymphoma. *Leukemia and Lymphoma* 46(1): 83-86
- Janssen JWG, Fonatsch C, Ludwig WD, Rieder H, Maurer J, Bartram CR (1992): Polymerase chain reaction analysis of BCR-ABL sequences in adult Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia patients. *Leukemia* 6:463-464
- John HA, Birnstile ML, John KW (1969): RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223:582-587

-Literatur-

- Kapelushnik J, Dubé I, Wilson P, Greenberg M (1991): Acute lymphoblastic leukemia with t(4;11) translocation after osteogenic sarcoma. *Cancer* 67:2887-2889
- Karsan A, Gascoyne RD, Coupland RW, Shepherd JD, Phillips GL, Horsman DE (1993): Combination of t(14;18) and a Burkitt's type translocation in B-cell malignancies. *Leuk Lymphoma* 10:433-441
- Knippers R (1997): *Molekulare Genetik*. 7. Auflage, Stuttgart: Thieme-Verlag, 1997
- Knuutila S, Vuopio P, Elonen P, Siimes M, Kovanen R, Borgstrom GH, de la Chapelle A (1991): Culture of bone marrow reveals more cells with chromosomal abnormalities than the direct method in patients with hematologic disorders. *Blood* 58:369-375
- Kornblau SM, Goodacre A, Cabanillas F (1991): Chromosomal abnormalities in adult non-endemic Burkitt's lymphoma and leukemia: 22 new reports and a review of 148 cases from the literature. *Hematol Oncol* 9:63-78
- Kozubek S, Lukasova E, Ryznar L, Kozubek M, Liskova A, Govorun RD, Krasavin EA und Horneck G (1997): Distribution of ABL and BCR genes in cell nuclei of normal and irradiated lymphocytes. *Blood* 89:4537-4545
- Kramer MD (1997): *Immunologie und Immunpathologie*. 1. Auflage, Heidelberg: Enke Verlag, 1997
- Kramer MHH, Raghoebier S, Beverstock GC, Ce Jong D, Kluin PM, Kluin-Nelemans JC (1991): De novo acute B-cell leukemia with translocation t(14;18): an entity with a poor prognosis. *Leukemia* 5:473-478
- Kubo Y, Kakazu N, Tasaka T, Oka D, Hirose T, Matsuhashi Y, Wada H, Tohyama K, Sugihara T (2010): Acute lymphoblastic leukemia (ALL) with t(8;14)(q11.2;q32) in an elderly patient. *Leukemia Research* 34(3): 82-84
- Kurzrock R, Shtalrid M, Romero P, Kloetzer WS, Talpaz M, Trujillo JM, Blick M, Beran M, Guttermann JU (1987): A novel c-abl protein product in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Nature* 325:631-635
- Lai JL, Fenaux P, Zandecki M, Nelken B, Huart JJ, Deminatti (1989) : Cytogenetic studies in 30 patients with Burkitt's lymphoma or L3 acute lymphoblastic leukemia with special reference to additional chromosome abnormalities. *Ann Genet* 32:26-32
- Landegent JE, Jansen in de Wal N, Dirks RW, Baao F, Van der Ploeg M (1987): Use of whole cosmid cloned genomic sequences for chromosomal localization by non-radioactive genomic hybridization. *Cytometry* 31(3):174-179
- Le Beau MM (1993): Detecting genetic changes in human tumor cells: have scientists "gone fishing"? *Blood* 81:1979-1983

-Literatur-

- Lennard A, Jackson GH, Carey PJ et al. (1991): Secondary acute lymphoblastic leukaemia with 4;11 translocation following treatment for Hodgkin's disease: case report and review of the literature. *Leukemia* 5:624-627
- Li YS, Le Beau MM, Mick R, Rowley JD (1991): The proportion of abnormal karyotypes in acute leukemia samples related to method of preparation. *Cancer Genet Cytogenet* 52 (1):93-100
- Lichter P, Bentz M, Joos S (1995): Detection of chromosomal aberrations by means of molecular cytogenetics: painting of chromosomes and chromosomal subregions and comparative genomic hybridization. *Methods Enzymol* 254:334
- Lichter P, Ried T (1994): Molecular analysis of chromosome aberration. In situ hybridization. *Methods in molecular biology. Chromosome analysis protocols.* 29:449
- Löffler H (1974): Biochemical properties of leukemic blast cells revealed by cytochemical methods: Their relation to prognosis, in: Flidner TM, Perry S: Prognostic factors in human acute leukemia-advances in biosciences. 14. Auflage, Braunschweig: Pergamon, 1975
- Löffler H, Kayser W, Schmitz N et al. (1987): Morphological and cytochemical classification of adult acute leukemias in two multicenter studies in the Federal Republic of Germany. *Haematol Blood Transfus.* 30:21-27
- Ludwig WD, Harbott J, Bartram CR, Komischke B, Sperling C, Teichmann JV, Seibt-Jung H, Notter M, Odenwald E, Nehmer A (1993): Incidence and prognostic significance of immunophenotypic subgroups in childhood acute lymphoblastic leukemia: experience of the BFM study 86. *Recent Results Cancer Res* 131: 269-282
- Ludwig WD, Reiter A, Löffler H et al. (1994): Immunophenotypic features of childhood and adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): Experience of the German multicentre trials ALL-BFM and GMALL. *Leuk Lymphoma* 13 Suppl. 1:71-76
- Lukasova E, Kozubek M, Kjeronska J, Ryznar L, Horakova J, Krahulcova E and Horneck G (1997): Localisation and distance between ABL and BCR genes in interphase nuclei of bone marrow cells of control donors and patients with chronic myeloid leukaemia. *Hum Genet* 100:525-535
- Macpherson N, Lesack D, Klasa R, Horsman D, Connors JM, Barnett M, Gascoyne RD (1999): Small noncleaved, non-Burkitt's (Burkitt-like) lymphoma: Cytogenetics predict outcome and reflect clinical presentation. *J Clin Oncol* 17:1558-1567
- Manabe A, Coustan-Smith E, Behm FG, Raimondi SC, Campana D (1992): Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 79:2370-2377

-Literatur-

- Martin-Subero JI, Chudoba I, Harder L, Gesk S, Grote W, Novo FJ, Calasanz MJ und Siebert R (2002): Multicolor-FICTION: expanding the possibilities of combined morphologic, immunophenotypic and genetic single cell analysis. *Am. J. Pathol* 161: 413-420
- Marx KA, Allen JR, Hearst JE (1976): Characterization of the repetitions human DNA families. *Biochim. Biophys. Acta* 425(2):129-147
- McGinnes K, Quesniaux V, Hitzler J, Paige C (1991): Human B-lymphopoiesis is supported by bone marrow derived stromal cells. *Exp Hematol* 19:294-298
- McNally RJ, Rowland D, Roamn E, Cartwright RA (1997): Age and sex distributions of hematological malignancies in the U.K. *Hematol Oncol* 15:173-189
- Mertens F, Johansson B und Mitelman F (1996): Dichotomie of hyperdiploid acute lymphoblastic leukaemia on the basis of the distribution of gained chromosomes. *Cancer Genet. Cytogenet.* 92:8-10
- Michiels JJ, Adriaansen HJ, Hagemeyer A et al. (1988): TdT positive B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) without Burkitt characteristics. *Br J Haematol* 68(4):423-426
- Mitelman F (1994): *Catalog of chromosome aberrations in cancer.* Wiley-Liss, New York
- Mitelman F, Johansson B und Mertens F (1998): *Catalog of chromosome aberrations in cancer '98 CD-ROM.* Wiley-Liss, New York
- Mitelman F, Johansson B und Mertens F (2002): *Mitelmann Database of Chromosome Aberrations in Cancer.* <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelmann>
- Miyoschi I, Hamazaki K, Kubonishi I, Yoshimoto S, Kitajima K, Kimura I, Miyamoto K, Sato J, Yorimitsu S, Tao S, Ishibachi K, Tokuda M (1981): A variant translocation (8;22) in a Japanese patient with Burkitt Lymphoma. *Gann* 72:176-177
- Miyoschi I, Hiraki S, Kimura I et al. (1976): 2/8 translocation in a Japanese Burkitt's lymphoma. *Experientia* 35:742-743
- Moorhead PS, Nowell WJ, Baltips DM, Hungerford DA (1960): Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 20:613-616
- Morgan GJ, Pratt G (1998): *Modern molecular diagnostics and the management of haematological malignancies.* *Clin Lab Haem* 20:135
- Mülhardt C (2003): *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics.* 4. Auflage, Heidelberg, Berlin: Gustav Fischer- Verlag; Spektrum Akademischer Verlag, 2003
- Mueller U (2005): *Skript Medizinische Soziologie, Stand Oktober 2005.*

-Literatur-

- National Cancer Institute (2000): SEER Cancer statistics review, 1973-1997. In: Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L Edward BK (eds) http://seer.cancer.gov/Publications/CSR1973_1997, 245.1-1-200 National Cancer Institute, Bethesda, MD
- National Cancer Institute Monograph 41 (1975). In: Third national cancer survey: incidence data, edited by Cutler SJ and Young JL Jr. Bethesda: U.S. Departement of Health, Education and Welfear, S. 114-115
- Nowell PC, Hungerford DA (1960): A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132:1497-1501
- Pagano L, Pulsoni A, Tosti ME et al. (1999): Acute lymphoblastic leukaemia occurring as second malignancy: report of the GIMEMA Archive or Adult AcuteLeukaemia. *Br J Haematol* 106:1037.1040
- Pardue ML und Gall JG (1969): Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 64(2):600-604
- Parsa N, Gaidano G, Mukherjee AB, Hauptschein RS, Lenoir G, Dalla-Favera R, Chaganti RSK (1994): Cytogenetic and molecular genetic analysis of 6q deletions in Burkitt's lymphoma cell lines. *Genes Chromosome Cancer* 9:13-18
- Pfreunds Schuh M, Hunstein W (1981): Classification of acute leukemia. *Krankenhausarzt* 42:206
- Preudhomme C, Dervite I, Wattel E, Vanrumbeke M, Flactif M, Lai JL, Hecquet B, Coppin MC, Nelken B, Gosselin B, Fenaux P (1995): Clinical significance of p53 mutations in newly diadnosed Burkitt's lymphoma and acute lymphoblastic leukemia: a report of 48 cases. *J Clin Oncol* 13:812-820
- Quality Assurance Certificate, Abott (4-21-2003).
- Quiagen GmbH Large-Construct Kit Handbook. 05/2002
- Rack KA, Delabesse E, Radford-Weiss I, Botrquelot P, Le Guyader G, Vekemans M, Mancintyre EA (1998): simultaneous detection of MYC, BVR1 and PVT1 translocations in lymphoid malignancies by fluorecence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 23:220-226
- Raimondi SC (1993): Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 81:2237-2251
- Raimondi SC, Pui C-H, Hanock ML, Behm FG, Filatov L, Rivera GK (1996): Heterogeneity of hyperdiploid (51-67) childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 10:213-224
- Ried T, Lengauer C, Cremer T, Wiegant J, Raap AK, Groitl P, Lipp M (1992): Specific metaphase and interphase detection of the breakpoint region in 8q24 of Burkitt

- lymphoma cells by tripplecolor fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 4:69-74
- Rieder H, Bonwetsch C, Janssen LA, Maurer J, Janssen JW, Schwartz S, Ludwig WD, Gassmann W, Bartram CR, Thiel E, Löffler H, Gökbuget N, Hoelzer D, Fonatsch C (1998): High rate of chromosome abnormalities detected by fluorescence in situ hybridization using BCR and ABL probes in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 12(9):1473-81
- Rieder H, Bradtke J (2002): Was ist Zytogenetik? Kompetenznetz Leukämien <http://knm1.ibe.med.uni-muenchen.de/tumorzytogenetik/zytogenetik/zytogenetik.html>
- Rieder H, Kneba M. (2003): Akute Lymphatische Leukämie der Erwachsenen. In: Ganten D, Ruckpaul K: Molekularmedizinische Grundlagen von hämatologischen Neoplasien. 1. Auflage, Berlin: Springer, 2003
- Rieder H, Kolbus U, Koop U, Liedtke B, Müller P, Berkovic D, Wörmann B, Fonatsch C (1994): B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) with t(14;18), t(8;22) and complex chromosome abnormalities: cytogenetic characterization by two color fluorescence in situ hybridization (FISH) and establishment of a new cell line, RIFO-280/93. *Onkologie* 17, suppl. 2, 119
- Ritterbach J, Hiddemann W, Beck JD, Schrappe M, Jankaschaub G, Ludwig WG, Harbott J, Lampert F (1998): Detection of hyperdiploid karyotypes (>50 chromosomes) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Leukemia* 12 (3):427-433
- Rocchi M, Archidiacono N <http://www.biologia.uniba.it/rmc/TUMORS/project/LOCI/IgK-2.html>
- Rocchi M, Archidiacono N <http://www.biologia.uniba.it/rmc/TUMORS/project/LOCI/IgL-22.html>
- Sandler DP, Shore DL, Anderson JR et al. (1993): Cigarette smoking and risk of acute lymphoblastic leukemia: associations with morphology and cytogenetic abnormalities in bone marrow. *J Natl Cancer Inst* 85:1994-2003
- Schlegelberger B., Lipp M. (2003): Hochmaligne B-Zell-Lymphome. In: Ganten D, Ruckpaul K: Molekularmedizinische Grundlagen von hämatologischen Neoplasien. 1. Auflage, Berlin: Springer, 2003
- Schoch C, Rieder H, Stollmann-Gibbels B, Freund M, Tischler H-J, Silling-Engelhardt G, Fonatsch C (1995): 17p anomalies in lymphoid malignancies: Diagnostic and prognostic implications. *Leuk Lymphoma* 17:271-279
- Secker-Walker LM (1990): Prognostic and biological importance of chromosome findings in acute lymphoblastic leukemia in adults: Age distribution, BCR breakpoint and prognostic significance. *Leukemia* 5:196-199

-Literatur-

- Secker-Walker LM, Prentice HG, Durrant J et al. (1997): Cytogenetics adds independent prognostic information in adults with acute lymphoblastic leukemia on MRC trial UKALL XA. *Br J Haematol* 96:601-610
- Seyffert W (2003): *Lehrbuch der Genetik*. 2. Auflage, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2005
- Sonoki T et al. (1995): Establishment of the novel B acute lymphoblastic leukemia (FAB L3) cell line KHM-10B with a 13q34 abnormality and constitutive expression of c-myc and max during cell cycle. *Leukemia* 9(12):2093-9
- Siebert R und Schlegelberger B (1997): Combined immunophenotyping and interphase cytogenetics in malignant lymphomas: results from FICTION studies. *Rec. Clin. Exp. Hematol.* 4: 41-55
- Siebert R, Matthiesen P, Harder S, Zhang YM, Borowski A, Zuhlkejenisch R, Metzke S, Joos S, Weber-Matthiesen, K, Groto W, Schlegelberger B (1998): Application of interphase fluorescence in situ hybridization for the detection of the Burkitt translocation t(8;14)(q24;q32) in B-cell lymphomas. *Blood* 91:984-990
- Stewart EL and Secker-Walker LM (1986): Detection of the chromosomally abnormal clone in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 23:25-35
- Taylor PRA, Reid MM, Bown N et al. (1992): Acute lymphoblastic leukemia in patients aged 60 years and over: a population-based study of incidence and outcome. *Blood* 80:1813-1817
- Taylor PRA, Irving J, Brown N, Proctor SJ (1997): Incidence of Ph-1 positive ALL in unselected, population-based study of adult ALL. *Br J Haematol* 97:937-938
- Thangavelu M, Olopade O, Beckman E, Vardiman JW, Larson RA, McKeithan TW, Le Beau MM, Rowley JD (1990): Clinical, morphologic, and cytogenetic characteristics of patients with lymphoid malignancies characterized by both t(14;18)(q32;q32) and t(8;14)(q24;q32) or t(8;22)(q24;q11). *Genes Chromosomes Cancer* 2:147-158
- Tosi S, Ritterbach J, Maglia O, Harbott J, Riehm H, Masera G, Biondi A, Lampert F (1994): Double target in situ hybridization applied to the study of numerical aberration in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 73:103-108
- Van den Berghe H, Parloir C, Gosseye S, Englebienne V, Corn G, Sokal G (1979): Variant translocation in Burkitt's lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1:9-14
- Veronese ML, Ohta M, Finan J, Nowell PC, Croce CM (1995): Detection of myc translocations in lymphoma cells by fluorescence in situ hybridization with artificial yeast chromosomes. *Blood* 85:2132-2138

-Literatur-

- Walters R, Kantarjian HM, Keating MJ, Estey EH, Trujillo J, Cork A, McCredie KB, Freireich EJ (1990): The importance of cytogenetic studies in adult acute lymphoblastic leukemia. *Am J Med* 89:579-587
- Weber-Matthiesen K, Winkelmann M, Müller-Hermelink HK, Schlegelberger B and Grote W (1992): Simultaneous fluoreszenz immunophenotyping and interphase cytogenetics: a contribution to the characterization of tumor cells. *J. Histochem. Cytochem.* 40: 171-175
- Weiss MM, Hermsen MA, Meijer GA, van Grieken NC, Baak JP, Kuiper EJ, van Diest PJ (1999): Comparative genomic hybridization. *Mol Pathol* 52 (5): 243-251
- Williams DL, Harris A, Williams KJ, Brosius MJ und Lemons W (1984): A direct bone marrow chromosome technique for acute lymphoblastic leukaemia. *Cancer Genet.Cytogenet.* 89:157-162
- Williams DL et al. (1990): Evolving chromosome patterns and new cytogenetic concepts in childhood acute lymphoblastic leucemia. In: Gale RP, Hoelzer D: *Acute Lymphoblastic Leukemia: UCLA-Symposia on Molecular and Cellular Biology.* New ser, v. 108, 1 ed, New York: Liss, 1990
- Wilmanns JF (1967): Die Thymidinkinase in normalen und leukämischen myeloischen Zellen. *Klin Wschr* 45:505-511
- Zech L, Haglund U, Nilsson K, Klein G (1976): Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* 17:47-56
- Zeidler R, Joos S, Delecluse HJ, Klobeck G, Vuillaume M, Lenoir GM, Bornkamm GW, Lipp M (1994): Breakpoints of Burkitt's lymphoma t(8;22) translocations map within a distance of 300 kb downstream of MYC. *Genes Chromosomes Cancer* 9:282-287
- Zhang MJ, Hoelzer D, Horowitz MM et al. (1995): Long-term follow-up of adults with acute lymphoblastic leukemia in first remission treated with chemotherapy or bone marrow transplantation. The Acute Lymphoblastic Leukemia Working Committee. *Ann Intern Med* 123:428-431

8 Anhang

8.1 Materialverzeichnis

Tabelle 8.1:

Übersicht über die eingesetzten Materialien und Geräte

Brutschrank	
Deckgläser 22x22mm	Fa. Menzel
Deckgläser 24x60mm	Fa. Menzel
Dosierpumpe 505 Di	Fa Watson Marlow
Facial Tissue (100 pcs.)	Fa. Tork
Falcon [®] -Pipette (10ml)	Fa. Becton Dickinson Labware
Falcon [®] -Pipette Spacesaver (25ml)	Fa. Becton Dickinson Labware
Fixogum Rubber Cement	Fa. Marabu GmbH
Fluoreszenzmikroskop „Leica“ DM RBE	Fa. Leitz
Gefriertruhe	Fa. Siemens
Glasflasche mit Deckel (50ml)	Fa. Schott/Duran
Glasflasche mit Deckel (250ml)	Fa. Schott/Duran
Glasflasche mit Deckel (1000ml)	Fa. Schott/Duran
Glasküvette für Objektträger (100ml)	Fa. Glaswerk Wertheim
Glaspipette „Spacesaver“ (25ml)	Fa. Falcon
Immersionsöl	Keine Herstellerangaben
Kamera PCO CCD IMAGING Typ VC 44	Fa. Leitz
Kühlschrank 4°C	
Kühlzentrifuge 1395	Fa. Hettich
Kühlzentrifuge Biofuge 28 RS	Fa. Heraeus Sepatech
Kunststoffküvette (schwarz; 300ml)	Keine Herstellerangaben
Kunststoffspritzflasche (500ml)	Fa. VitLab
Latexhandschuhe (Medium)	Fa. Nabaglove
Magnet-Heizrührer Ikamag RET	Fa. Jahnke und Kunkel GmbH
Metallbox „Feuchte Kammer“	Keine Herstellerangaben
Mikropipette Finnpipette [®] (2µl)	Fa. Labsystems
Mikropipette Finnpipette [®] (10µl)	Fa. Labsystems
Mikropipette Finnpipette [®] (100µl)	Fa. Labsystems
Mikropipette Finnpipette [®] (1000µl)	Fa. Labsystems
Mikropipette Reference (2,5µl)	Fa. Eppendorf
Mikropipette Reference (10µl)	Fa. Eppendorf
Mikropipette Reference (100µl)	Fa. Eppendorf
Mikropipette Reference (200µl)	Fa. Eppendorf
Mikropipette Reference (1000µl)	Fa. Eppendorf
Objektträger 76x26x1mm mit Mattrand	Fa. Marienfeld
Parafilm	Fa. American National Can
PC mit Software „Digitales Farb-Fluoreszenz-Bild-Analyse System ISIS“	Fa. Metasystem
Petrischale	Fa. Falcon
Pipettenspitze Biosphere [®] (10µl); Typ Eppendorf	Fa. Sarstedt
Pipettenspitze Biosphere [®] (200µl); Typ Eppendorf	Fa. Sarstedt
Pipettenspitze TipOne [™] (1250µl)	Fa. Starlab
Reaktionsgefäß 3810X (1,5ml; weiß)	Fa. Eppendorf
Stoppuhr (Digital)	Fa. Oregon Scientific
Tischzentrifuge Centrifuge 5415C	Fa. Eppendorf
Thermobad RM6	Fa. Lauda
Trockenblock 556; 50 sheets	Fa. Schleicher&Schüll
Vortexer „Reax Control“	Fa. Heidolph
Vortexer Typ RCAX	Fa. Heidolph Elektro KG
Wärmeplatte	Fa. StörkTronic
Zentrifugenröhrchen mit Verschluss „Blue Max [™] Conical	Fa. Falcon

8.2 Darstellung des Patientenkollektivs

Tabelle 2.1:

Übersicht über das Patientenkollektiv

Fall	Alter	Zytogenetischer Befund/ Karyotyp	Diagnose	Probenmaterial	t(2;8)	t(8;22)
1.	70/w	46,XX,t(2;8)(p13;q24)	B-NHL	KM/24 PG	+	+
2.	44/m	46,XY,t(8;14)(q24;q32)	B-ALL	KM/24 CDM	+	+
3.	37/w	46,XX,t(8;14)(q24;q32)	B-ALL	B/R 48 + cam	+	+
4.	48/m	46,XY,dup(1)(q21q32),t(8;14)(q24;q32),del(13)(q14;q22)	B-ALL	B/24 ALL	+	+
5.	18/w	46,XX,t(8;14)(q24;q32)	B-ALL	B/direkt	-	+
6.	64/w	46,XX[26]	B-ALL	B/24/48/mix	+	+
7.	19/m	46,XY[25]	B-ALL	KM/R 24	-	+
8.	41/w	46,XX[25]	B-ALL	B/24 CDM	-	+
9.	61/m	49,XY,add(6)(q2?5),+7,t(8;22)(q24;q11),+12,t(14;18)(q32;q21),+der(18)t(14;18)	B-ALL	KM/24 mix	+	-
10.	50/w	Keine Zellen in Teilung	B-ALL	KM/R 48	+	-
11.	61/w	46,XY,t(2;8)(p12;q24)/47,XX,t(2;8)(p12;q24),+mar	B-ALL	KM/48 ALL	-	+
12.	61/m	46,XY[24]	B-ALL	KM/R 24 cam	+	+
13.	20/m	46,XY	B-ALL	KM/72 mix	+	+
14.	42/m	46,XY,t(8;14)(q24;q32)	B-ALL	KM/48 + Fibros	+	+
15.	30/m	46,XY,add(1)(p36),t(8;22)(q24;q11),del(14)(q22)	B-ALL	KM/24 mix	+	+
16.	49/m	47-48,XY,add(1)(p36),t(2;8)(p13;q24)t(14;18)(q32;q21),+1-2mar	B-ALL	KM/48 mix	+	+
17.	59/w	51,XX,+1,der(1)t(1;5)(q10;q10),+2,der(2)del(2)(p11)del(2)(q21q23?),?i(5)(p10),+12+13,t(14;18)(q32;q21),add(22)(p13),+mar	NHL z.B. Typ Burkitt; DD: ALL	B/24 mix	+	+
18.	58/w	44,X,-X,complex	B-ALL	KM/R 24	+	-
19.	17/m	46,XY,t(8;14)(q24;q32)	B-ALL	KM/48 mix	+	+
20.	26/w	46,XX,t(8;14)(q24;q32)	B-ALL	KM/48 mix	+	+
21.	36/w	47,XX,+der(1)t(1;6)(p11;p11),t(8;14)(q24;q32),-14,+der(14)t(8;14)(q24;q32)	B-ALL; 1. Rezidiv	KM/24 mix	+	+
22.	75/m	46,XY	B-ALL	KM/R 4	+	+
23.	51/w	46,XX,t(8;14)(q24;q32),der(8)t(1;8)(q1?1;p11)	ALL	KM/72 mix	-	+
24.	67/m	47,XY,t(8;14)(q24;q32),+?mar	ALL	B/24	+	-
25.	73/m	46,XY	B-ALL	B/48 mix	+	+
26.	34/m	46,XY	B-ALL	KM/24 mix	+	+
27.	58/m	46,XY	ALL unter Decortin	KM/R 48 +SLF/IL-7	+	+
28.	73/m	Keine Zellen in Teilung	B-ALL	KM/72	+	-
29.	56/m	46,XY	B-ALL	B/24/72 mix	+	-
30.	50/w	48,XX,add(14)(q32),+?der(8)t(8;?)(q24;?),+`19	ALL	B/R+T 24	-	+
31 I	60/m	45-46,XY,inc(2)(p13-15),add(11)(q23),add(13)(q32),-21,+1-2mar	B-ALL	KM/R 24+T	+	+
31II	60/m	45-46,XY,inc(2)(p13-15),add(11)(q23),add(13)(q32),-21,+1-2mar	B-ALL	B/24 mix	+	+

9 Lebenslauf

Personalien

Name	Daniele Gabriele Antonio Fiore
Geburtsdatum	14.06.1982
Geburtsort	Essen
Nationalität	italienisch

Familie

Mutter	Lina Viglione-Fiore
Vater	Giuseppe Fiore
Bruder	Fabio Fiore

Schulbildung

08/1988 – 07/1992	Städtische Gem.-Grundschule Birth, Velbert
08/1992 – 06/2001	Geschwister-Scholl-Gymnasium, Velbert

Schulabschluss

06/2001	Abitur
---------	--------

Hochschulausbildung

10/2001 – 07/2006	Medizinstudium an der Philipps-Universität Marburg
08/2006 – 07/2007	Praktisches Jahr (PJ) im städtischen Klinikum Kassel

Berufsausbildung

01/2008 – 12/2010	Assistenzarzt, Abteilung Innere Medizin, Evangelisches Krankenhaus Mettmann
seit 01/2011	Assistenzarzt, Abteilung Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie Universitätsklinikum Düsseldorf, Prof. Dr. R. Haas

10 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg, Kassel und Düsseldorf waren die Damen und Herren:

Philipps-Universität Marburg:

Aumüller, Arnold, Basler, Barth, Baum, Daut, Elsässer, Geus, Gotz, Grzeschik, Heuer, Koolmann, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lang, Maisch, Moll, Müller, Neubauer, Örtel, Rausch, Reeder, Remschmidt, Rieder, Röhm, Rothmund, Schneider, Seitz, Steiniger, Ulke, Varga, Voigt, Westermann

Klinikum Kassel, Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Marburg:

Faß, Kim, Rüschoff, Wolf

Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf:

Fenk, Gattermann, Germing, Haas, Kobbe, Kündgen, MacKenzie, Rieder

11 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Karl-Heinz Grzeschik, Direktor des Instituts für klinische Genetik der Philipps-Universität Marburg, für die Überlassung des Arbeitsplatzes und die Bereitstellung der Materialien.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Joachim Windolf für die Möglichkeit der Promotion an der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Harald Rieder für die Vergabe des Themas der Doktorarbeit sowie die persönliche und fachliche Unterstützung.

Frau Ina Bachmann danke ich für die geduldige Einarbeitung in die Technik der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung, die freundliche Hilfestellung in allen labortechnischen Problemen und die Chromosomenpräparation.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung für klinische Genetik der Philipps-Universität Marburg bedanke ich mich für die Hilfsbereitschaft und das stets offene Ohr jedes Einzelnen, das mir bei der Durchführung der Experimente sehr geholfen hat.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinen Eltern. Ohne deren Zuspruch über all die Jahre hätte ich diese Arbeit nie vollendet.

12 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf eingereichte Arbeit mit dem Titel „*Molekularzytogenetischer Nachweis varianter 8q24-Translokationen bei der akuten lymphatischen Leukämie vom Burkitt-Typ*“ im Medizinischen Zentrum für Humangenetik, Abteilung klinische Genetik, Tumorzytogenetik, der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Harald Rieder selbst, ohne sonstige Hilfe, durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.