Universität Ulm
Abteilung Humangenetik
Leiter: Prof. Dr. W. Vogel

Der Einsatz der vergleichenden genomischen Hybridisierung, CGH, im Vergleich zur klassischen Zytogenetik, zur Charakterisierung der Blastenkrise bei der Chronisch-Myeloischen Leukämie

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin (Dr. med.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Ines Nicole Hahntow
aus Fürstenfeldbruck

Ulm, 2000

Amtierender Dekan: Prof. Dr. R. Marre

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Hameister

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Heimpel

Tag der Promotion: 06. Dezember 2001

Für meine Mutter, meinen Vater
und meine Großmutter

Inhaltsverzeichnis

		Seite
Abkürzungen		I
Gen-Liste		II
1.	**Einleitung**	**1**
1.1	Zytogenetische und molekulare Tumorforschung	1
1.2	Genetik der Tumorentstehung	3
1.3	Chronisch-Myeloische Leukämie	8
1.4	Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)	11
1.5	Molekular-zytogenetische Befunde in der Blastenkrise bei Chronisch-Myeloischer Leukämie	16
1.6	Zielsetzung der Arbeit	18
2.	**Material**	**20**
2.1	Geräte	20
2.2	Chemikalien und Bioreagenzien	21
2.3	Nukleinsäuren und Nukleotide	22
2.4	Antikörper	23
2.5	Enzyme	23
2.6	Lösungen und Puffer	24
2.7	Kulturmedien	26
2.8	Reagenziensysteme (Kits)	26
2.9	Untersuchungsmaterial	27
2.10	Blut- und Knochenmarkproben der CML-Patienten	27
2.11	Zellinien	30
2.12	DNA-Sonden	31
2.13	Sonden zur Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)	31

3. Methoden **32**
3.1 Chromosomenpräparation aus Knochenmark- und aus Vollblutproben von CML-Patienten für die zytogenetische Auswertung 32
3.2 Chromosomenpräparation aus Lymphozyten gesunder Probanden für die vergleichende genomische Hybridisierung 34
3.3 Isolierung genomischer DNA 35
3.4 DNA Markierung mit Hilfe der Nick-Translation 37
3.5 Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) 39
3.6 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) 42

4. Ergebnisse **46**
4.1 Hybridisierungen zur Überprüfung der CGH-Methode 46
4.2 Auswertungskriterien für die Interpretation der CGH-Profile 50
4.3 Klinische Daten der CML-Patienten 52
4.4 CGH-Analyse in verschiedenen Krankheitsphasen der Chronisch-Myeloischen Leukämie 56
4.5 FISH-Analyse zur Überprüfung grenzwertiger CGH-Profile 68
4.6 Verteilungsmuster der chromosomalen Aberrationen 74

5. Diskussion **78**
5.1 Diskussion der unterschiedlichen Techniken 78
5.2 Darstellung und Bewertung der CGH-Ergebnisse 82
5.3 Vergleich und Bewertung von zytogenetischen Befunden und CGH-Ergebnissen 101
5.4 CGH in der CML-Diagnostik im Vergleich zur Zytogenetik und FISH-Analyse 104

6. Zusammenfassung **108**
Literaturverzeichnis 109
Danksagung
Lebenslauf

Abkürzungen

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
bp	Basenpaare
CGH	Comparative genomic hybridization
CML	Chronisch-myeloische Leukämie
DMIN	Double Minutes
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
FISH	Fluoreszenz-*in*-*situ*-Hybridisierung
FITC	Fluoroisothiocyanat
GTG	G-bands by Trypsin using Giemsa
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom
HSR	Homogenously staining region
IRS	Interspersed repetitive sequences
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilo Dalton
LOH	Loss of heterozygosity
mar	Markerchromosom
Mb	Megabasenpaare
m-RNA	Messenger Ribonucleic acid
PCR	Polymerase chain reaction
Ph-Chromosom	Philadelphia-Chromosom
PV	Polycythaemia vera
rpm	rounds per minute
WCP	Whole chromosome paint
YACs	Yeast artificial chromosomes

Gen-Liste

ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
AF6	AF-PEN; Antisecretory factor (pituitary)
AML1	Acute myelogenous leukemia 1
APC	Adenomatosis polyposis coli
BCR	Breakpoint cluster region
BLYM	avian lymphoma virus-derived transforming sequence
CAN	auch *NUP214*; nucleoporin 214 kD
CDKN2A/p16	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CDKN2B/p15	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B
DCC	deleted in colon carcinoma
DEK	D6S231E
D-lgl	Drosophila – lethal giant larvae
ERG	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene related
ETO	eight twenty-one; auch *MTG8* oder *CBFA2T1*; core-binding factor, *runt* domain, alpha subunit 2; translocated to, 1 (cyclin D-related)
ETS	v-ets avian erythroblastosis virus oncogene homolog
EVI1	ectropic viral integration site 1
KRAS	v-ki-ras kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LLGL1	lethal giant larvae (Drosophila) homolog 1
MLH1	MutL homolog
MSH2	MutS homolog
MTG8	siehe *ETO*
MYC	Avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
NRAS	v-ras neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
runt	Drosophila segmentation gene
SKI	v-ski avian sarcoma viral oncogene homolog
SRC-2	v-src avian sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog
TP53	tumor protein p53
ZNF179	zinc finger protein 179

1. Einleitung

1.1 Zytogenetische und molekulare Tumorforschung

„Im Jahre 1902 habe ich ... die Vermutung angeknüpft, dass maligne Tumoren die Folge eines gewissen abnormen Chromosomenbestandes sein könnten ... die Zelle des malignen Tumors ist eine in bestimmter Hinsicht defekte Zelle; sie hat die Eigenschaften der normalen Gewebezelle verloren ... Die Tumorzelle, der gewisse Chromosomen fehlen, während sie andere im Übermaß besitzt, wird manche Stoffe im Überschuß produzieren und andere in ungenügender Menge oder gar nicht ... Experimente ... haben zu dem Ergebnis geführt, dass die meisten von der Norm abweichenden Chromosomenkombinationen zum Tod der Zelle führen, dass jedoch auch Kombinationen vorkommen, bei denen die Zelle lebensfähig bleibt, aber nicht mehr in typischer Weise funktioniert ...„.

Theodor Boveri, 1914.

Theodor Boveris These aus dem Jahr 1914, dass Chromosomen-aberrationen für die Tumorigenese verantwortlich sind, hat sich in vielfacher Weise bestätigt. Schon vor ihm hat 1890 ein deutscher Pathologe, David von Hansemann, darüber berichtet, dass er bei Neoplasien vermehrt Kern- und Mitoseabnormalitäten festgestellt habe (Gebhart, 1989). Obwohl sich die Aussagen der beiden Wissenschaftler als richtig erweisen sollten, ruhte die Forschung auf diesem Gebiet fast ein halbes Jahrhundert aufgrund technischer Probleme bei der Darstellung menschlicher Chromosomen (Heim et al., 1995).
Erst mit Beginn der 50er Jahre konnten neue Erfolge verzeichnet werden. Die Entdeckung der Wirkung von Colchizin und die Präparation von Metaphasechromosomen nach hypotoner Behandlung des Zellkerns

und saurer Fixierung der Chromosomen ermöglichten es, die genaue Zahl des menschlichen Chromosomensatzes zu bestimmen (Tjio et al., 1978). Das waren Meilensteine der zytogenetischen Wissenschaft.
Seit 1960 konnte man sich auch die mitogene Wirkung von Phytohämagglutinin auf Lymphozyten (Nowell, 1960) und die Kultivierung von peripherem Blut zur Präparation von Chromosomen aus Leukozyten (Moorhead et al., 1960) zu Nutze machen.
In dieser Phase der „deskriptiven Tumorzytogenetik„ wurden zahlreiche Untersuchungen an malignen Zellpopulationen durchgeführt, an denen man nach und nach Prinzipien der Karyotypevolution während der Tumorigenese herausarbeiten konnte. Immer mehr kristallisierte sich heraus, dass die enorme Chromosomenvariabilität etwas mit der Entwicklung der Neoplasien zu tun haben müsste. Man fand bei den untersuchten Zellpopulationen meist einen vorherrschenden Chromosomensatz, der 1930 von Winge als Stammlinienkaryotyp bezeichnet wurde.
1960 wurde mit der Entdeckung des Philadelphia-Chromosoms bei der chronisch-myeloischen Leukämie durch Nowell und Hungerford ein bahnbrechender Schritt erzielt (Nowell et al., 1960). Der erste, regelmäßig vorkommende chromosomale Marker in einem Tumor schien die Aussagen von Theodor Boveri endlich zu belegen. Es folgten Jahre euphorischer Suche nach anderen, typischen Chromosomen-aberrationen bei unterschiedlichen Malignomen. Nach langer Zeit erfolgloser Suche stellte sich jedoch bei der Erkenntnis, dass das Philadelphia-Chromosom eine Ausnahme zu sein schien, große Ernüchterung ein.
Dennoch ergaben sich aus den zahlreichen Arbeiten hilfreiche Hinweise über den Ablauf der Karzinogenese. Zu Beginn der 70er Jahre wurde die These formuliert, dass den Karyotypanomalien eines Tumors zwei Prinzipien zugrunde liegen: Einerseits entstehen nicht zufällige Veränderungen, die nur bestimmte Chromosomen betreffen; andererseits entstehen zufällige Aberrationen, die alle Chromosomen

betreffen können und die die weitaus größere Zahl der Aberrationen ausmachen. Heute spricht man von primären und sekundären Aberrationen, wobei die primären oft alleine auftreten und als spezifisch für einen Tumor angesehen werden. Die sekundären Aberrationen kommen selten alleine vor und treten eher in späteren Phasen des Krankheitsprozesses auf. Aber auch die sekundären Aberrationen werden inzwischen als nicht zufällig verstanden (Heim et al., 1995). Zwischen beiden Arten von Aberrationen zu unterscheiden, wird noch lange eine Aufgabe der beschreibenden Tumorzytogenetik sein.

Inzwischen hat sich dieses Forschungsgebiet, beginnend mit der Einführung der Bänderungstechnik (1970) und der damit verbundenen erstmals eindeutigen Identifizierung der menschlichen Chromosomen, zu einem unverzichtbaren Bestandteil in der Tumorforschung entwickelt. Die Einbeziehung molekulargenetischer Techniken seit Anfang der 80er Jahre bedeutet eine weitere, enorme Bereicherung für dieses Fach. Die seit 1975 von Yunis praktizierte hochauflösende Bänderungstechnik (Yunis, 1976) und die in den späten 80er Jahren entwickelte nicht-radioaktive DNA-*in-situ*-Hybridisierung ermöglichten detailliertere Einblicke und trugen grundlegend zum Verständnis der chromosomalen Veränderungen in entarteten Zellen bei (Vogel et al., 1997).

Mittlerweile sind zytogenetische und molekulare Methoden, wie konventionelle Karyotypisierung nach Bänderung, Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) und auch die vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) weder aus der klinischen Diagnostik noch als zentrale Säule in der Forschung wegzudenken.

1.2 Genetik der Tumorentstehung

Die Beziehung zwischen den beobachteten Chromosomenaberrationen und Tumoren ist ein sehr komplexes Thema. In den letzten Jahren wurden zwei Klassen von Genen bekannt, die maßgeblich an der

Tumorigenese beteiligt sind: (Proto-) Onkogene und Tumorsuppressorgene. Die entscheidende Erfahrung ist, dass diese Gene auch das normale Zellwachstum und die normale Zelldifferenzierung regulieren.
Die Produkte der Proto-Onkogene fungieren während der Normalentwicklung als Wachstumsfaktoren oder Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, als tyrosinspezifische Proteinkinasen und GTPasen in der Signaltransduktion sowie direkt als aktivierende Transkriptionsfaktoren (Goldberg et al., 1991). Die Proto-Onkogene entfalten während der Tumorigenese als Onkogene ihre Wirkung in dominanter Weise. Allgemein gesagt, unterstützen Proto-Onkogene mit ihren Produkten das Wachstum sensibler Zellen.
Tumorsuppressorgene wirken durch ihre eher negative, hemmende Funktion auf das Zellwachstum wie eine Art Gegenspieler der Onkogene. Sie wirken rezessiv, und kennzeichnend ist der Funktionsverlust beider Allele in Tumoren. Tumorsuppressorgene sind beinahe ausschließlich Regulatorgene des Zellzyklus. Der Ausfall führt zu einer ungehemmten Zellzyklusprogression. Für die gesunde Zelle ist das Gleichgewicht beider Genklassen ausschlaggebend. Nur das exakte Zusammenspiel von Aktivierung und Inaktivierung sorgt für normales Wachstum und Differenzierung (Goldberg et al., 1991).
Tumorigenese und im speziellen Fall Leukämogenese wird heute als ein schrittweise ablaufender Prozeß verstanden, bei dem eine gesunde Körperzelle allmählich in eine maligne, autonom proliferierende Zelle übergeht (Breuer, 1991). Studien zufolge handelt es sich bei dieser Entwicklung um eine Akkumulation molekulargenetischer Veränderungen, wobei der Aktivierung von dominant wirkenden Proto-Onkogenen bzw. der Inaktivierung von rezessiven Tumorsuppressorgenen eine besondere Rolle zukommt (Cavenee et al., 1995). Dieses Modell wird als „multistep„-Theorie bezeichnet (Vogelstein et al., 1993).
Im Gegensatz zu den meisten soliden Tumoren des Menschen spielen bei Leukämien und Lymphomen mutierte Proto-Onkogene die wichtigste

Rolle im Entartungsprozeß (Knudson, 1993). Zu den bekannten Aktivierungsmechanismen gehören Translokation, Punktmutation, Amplifikation und virale Insertion, wobei bei Leukämien insbesondere spezifische, balanzierte Translokationen beobachtet werden (Heim et al., 1995).

Über das initiale Ereignis der Karzinogenese und die Auswirkungen von mutagenen Wirkfaktoren gibt es bei vielen Neoplasien noch keinen endgültigen Nachweis. In welcher genauen zeitlichen Abfolge die gemeinsam beteiligten Ereignisse aufeinandertreffen, ist ebenfalls nicht eindeutig geklärt. Möglicherweise ist die Reihenfolge auch weniger entscheidend, als vielmehr das Zusammentreffen der verschiedenen Ereignisse in einer Zelle.

Untersuchungen an kolorektalen Karzinomen ließen vermuten, dass bei der Karzinogenese der familiären adenomatösen Polyposis ein Gen auf 5q21 (*APC;* Adenomatosis polyposis coli) und beim hereditären nichtpolypösen Kolonkarzinom (HNPCC) unter anderem Gene auf 2p15-p16 und 3p beteiligt sind (Bodmer et al., 1987; Lindblom et al., 1993; Peltomäki et al., 1993; Bronner et al., 1994). Fearon et al. stellten 1990 ein genetisches Modell der kolorektalen Karzinogenese vor, das 1994 nochmals von Fearon bestätigt wurde. Dabei wurde besonders betont, dass der Entartungsprozess in mehreren Schritten abläuft. Neben der Tatsache, dass bestimmte Onkogene aktiviert und bestimmte Tumorsuppressorgene inaktiviert werden müssen, ist besonders die Summe der mutierten Gene für den malignen Vorgang ausschlaggebend. Die ersten Aberrationen, z. B. im *APC*-Gen, führen zu einem gutartigen Adenom. Damit ein malignes kolorektales Karzinom entsteht, müssen mindestens vier bis fünf Gene mutieren. Die Autoren kamen zu dem Schluß, dass nicht die zeitliche Aufeinanderfolge, sondern das gemeinsame Auftreten bestimmter Mutationen im Genom entscheidend ist. Fearon et al. (1990) beschrieben während des adenomatösen Stadiums in der kolorektalen Karzinogenese die Mutation bzw. den Verlust eines 5q Gens. Sie vermuteten, dass das *APC*-Gen

involviert war. Darüberhinaus konnten Fearon et al. (1990) eine DNA-Hypomethylierung oder spezifische Mutationen des *KRAS*-Gens (v-ki-ras kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) nachweisen. *KRAS* ist das einzige Onkogen, bei dem in 50% der untersuchten kolorektalen Karzinome eine Aktivierung festgestellt wurde (Bos et al., 1987). Ein Verlust eines 18q Gens fiel ebenfalls auf. Dabei könnte es sich um das Tumorsuppressorgen *DCC* (deleted in colon carcinoma) handeln. Der Übergang in ein malignes Stadium des Tumors wird durch den Verlust von 17p charakterisiert. Das Tumorsuppressorgen *TP53* (tumor protein p53) ist auf 17p13.1 lokalisiert.

Dieses Modell von Fearon et al. (1990) bietet jedoch noch kein vollständiges Bild der kolorektalen Karzinogenese. 1993 wurde über eine dritte Kategorie von Genen berichtet, die scheinbar entscheidenden Einfluß auf die Tumorigenese hat (Ionov et al., 1993; Thibodeau et al., 1993). Von diesen sogenannten Mutatorgenen wurden *MSH2* (MutS homolog) auf 2p und *MLH1* (MutL homolog) auf 3p21 identifiziert. Die Produkte dieser Gene sind vermutlich an der DNA-Reparatur beteiligt. Bei HNPCC-Tumorzellen wurden Veränderungen der Dinukleotid-Mikrosatelliten-Sequenzen beobachtet, die auf Replikationsfehler zurückgeführt wurden. Inaktivierende Mutationen von *MSH2* und *MLH1* führen zu einer genetischen Instabilität im Sinne einer Fehlpaarungs-Reparatur. Es kommt zu einer erhöhten Mutationswahrscheinlichkeit von Tumorsuppressor- und Onkogenen (Fishel et al., 1993; Bronner et al., 1994). Die Rolle der Mutatorgene in der Karzinogenese sporadischer Tumore und Tumore anderer Organe wurde noch nicht umfassend genug erforscht, um Aussagen darüber treffen zu können.

Gut bekannt und am häufigsten untersucht sind dagegen die genetischen Veränderungen bei der chronisch-myeloischen Leukämie. Beim klassischen Philadelphia-Chromosom kommt es zu einem Rearrangement zwischen dem auf Chromosom 9q34.1 liegenden c-*abl*-Proto-Onkogen (Homolog des Abelson-murine-Leukämie-Virus-Gens oder avian blastosis oncogen/Hühnerleukämievirus) und dem auf

Chromosom 22q11.21 liegenden M-*bcr*-Gen (major break point cluster region) (Campbell et al., 1991; Daley et al. 1991; Kurzrock et al., 1991). M-*bcr* ist Teil des 70 bis 90 kb großen *BCR*-Gens, das in der Breakpoint-Clusterregion auf Chromosom 22 liegt. Die Bruchstelle entsteht innerhalb einer 5,8 kb langen Region des *BCR*-Gens, die als „breakpoint cluster region„ (*bcr*) bezeichnet wird. Meist ist das Intron zwischen Exon 3 und 4 betroffen. M-*bcr* codiert für ein 160 kD Phosphoprotein mit Kinaseaktivität. Wahrscheinlich spielt dieses Protein eine Rolle bei der Signaltransduktion von der Zelloberfläche zum Kern. Die genaue physiologische Funktion ist noch nicht bewiesen (Heim et al., 1995).

Das normale menschliche c-*abl* Gen auf Chromosom 9 ist etwa 250 kb lang. Der Bruchpunkt für die Ph-Translokation kann an unterschiedlichen Stellen des 200 kb langen 1. Introns liegen; meistens findet er sich aber zwischen Exon 1a und 1b (Shtivelman et al., 1986; Dreazen et al., 1988).

Was sich zytogenetisch als eindeutige Translokation darstellt, kann auf molekularer Ebene ein stark variierendes Ereignis bedeuten. Jede in der Giemsafärbung zu identifizierende Bande besteht aus über 5000 kb, in denen viele Gene liegen. Bei der für die CML typischen Translokation t(9;22)(q34;q11) sind jedoch immer die gleichen Gene beteiligt, nur das Bruchereignis innerhalb der Gene zeigt eine gewisse Mikroheterogenität. In jedem Fall kommt es zur Entstehung eines chimären Fusionsgens, *BCR/ABL*, wobei die c-*abl*-Tyrosinkinase unter der Kontrolle des *bcr*-Promotors steht (Cannistra, 1990).

Das durch die Translokation entstandene *BCR/ABL*-Fusionsgen enthält praktisch das gesamte *c-ABL*-Onkogen und führt zu einer Aktivierung des c-*abl*-Proto-Onkogens mit anschließender Transkription einer 8,5 kb großen *bcr*/c-*abl* m-RNA. Diese m-RNA kodiert die Synthese eines 210 kD großen Fusionsproteins (p210) (Konopka et al., 1985). p210 fungiert als Tyrosinkinase mit proliferationsfördernder Wirkung (Konopka, 1984; Davis, 1985). Die Induktion verschiedener hämatologischer Neoplasien

und eines CML-ähnlichen myeloproliferativen Syndroms konnte in Versuchen mit *bcr/abl*-positiven transgenen Mäusen nachgewiesen werden (Daley et al., 1990; Elefanty et al., 1990).
Obwohl dem Philadelphia-Chromosom für die Leukämogenese eine entscheidende, induzierende Rolle zugesprochen wird, diskutiert man derzeit über möglicherweise schon früher ablaufende submikroskopische Veränderungen im Genom, die momentan noch nicht genauer benannt werden können (Lisker et al., 1980).

1.3 Chronisch-Myeloische Leukämie

Der von Rudolph Virchow 1845 geprägte Begriff der Leukämie (weißes Blut) entspricht einer klonal entstandenen Proliferationsstörung, die sich aus der Transformation einer pluripotenten Stammzelle entwickelt. Die systemische, autonome Proliferation eines abnormen Zellstammes (Klon) geht mit einer generalisierten Ausbreitung im Knochenmark, mehr oder weniger ausgeprägter Zellausschwemmung ins periphere Blut und eventueller Infiltration extramedullärer Organe einher (Fialkow et al., 1977; Schuh et al., 1990).
Die chronisch-myeloische Leukämie (CML) ist gekennzeichnet durch eine vermehrte Bildung von Zellen der Granulopoese im Knochenmark mit Ausschwemmung aller Reifungsstufen ins periphere Blut (Linksverschiebung). Im Knochenmark herrschen Myelozyten und Promyelozyten vor. Im Unterschied zu allen anderen leukämischen Erkrankungen sind die Zellen in der initalen Phase noch weitgehend funktionstüchtig (Goldman et al., 1974).
Die CML zählt zu den chronisch myeloproliferativen Syndromen. Der Altersgipfel liegt im mittleren Lebensbereich. Epidemiologische Daten ergeben eine Häufigkeit von einer Erkrankung pro 100.000 Einwohnern pro Jahr. Die Ätiologie ist unbekannt. Strahlenexposition und

längerzeitiger Umgang mit Benzol scheinen das Risiko zu erhöhen (Jacobs, 1989; Ichimaru et al., 1991).

Studien zufolge kommt dem Philadelphia-Chromosom (Ph) bei der Ätiopathogenese eine entscheidende Funktion zu. Dieses Markerchromosom ist bei über 90% der CML-Patienten in Zellen der Myelopoese, der Erythropoese, der Megakaryopoese und einem Teil der Lymphozyten nachzuweisen, was für die pluripotente Stammzelle als Ort der Entstehung der Translokation spricht (Whang et al., 1963; Rastrick et al., 1968; Golde et al., 1977; Martin et al., 1980).

Die Entdeckung des Ph-Chromosoms 1960 (Nowell et al., 1960) machte die CML zur ersten Krebserkrankung, bei der eine nicht zufällige, wiederkehrende Chromosomenanomalie auftrat. Heute weiß man jedoch, dass das Ph-Chromosom auch bei akuten lymphatischen und myeloischen Leukämien zu finden ist (Kurzrock et al., 1987).

Das Philadelphia-Chromosom entsteht - wie oben erwähnt - durch reziproke Translokation zwischen Chromosom 9 und 22. In 85% der Fälle handelt es sich um eine t(9;22)(q34;q11), bei 5 – 10% liegt eine Translokation zwischen 22 und einem anderen als Chromosom 9 vor (Heim et al., 1995).

Bei 10% der Patienten, die zunächst als CML diagnostiziert wurden, findet sich kein Ph-Chromosom. Diese heterogene Gruppe der Ph-negativen CML-Patienten wird zu zwei Dritteln als chronisch myeloproliferatives Syndrom oder Myelodysplasie rediagnostiziert. Bei dem zweiten Kollektiv kann das *bcr/abl*-Gen trotz fehlendem Ph-Chromosom oft molekulargenetisch nachgewiesen werden. In wenigen Fällen bleibt eine dritte Gruppe, die nicht weiter einzuordnen ist (Van der Plas et al., 1989; Kurzrock et al., 1990).

Die Krankheit verläuft zumeist in drei Stadien: Die chronische stabile Phase, die im Durchschnitt 3 Jahre dauert, wird gefolgt von einer maligneren Akzelerationsphase und in 80% der Fälle vom terminalen Blastenschub. Andere Verlaufsformen kommen vor und können zum Teil erst retrospektiv festgelegt werden.

Klinisch spiegelt diese Einteilung den Übergang einer mit Zytostatika weitgehend kontrollierbaren Leukämie in ein wesentlich aggressiveres Krankheitsbild wider, das von den Symptomen her mit einer akuten Leukämie zu vergleichen ist. Wegen hämopoetischer Insuffizienz, Blutungen und Infektionen kommt es in der Blastenphase meist innerhalb weniger Monate zum Exitus letalis.

Zytogenetisch ist der Übergang in die Transformationsphase bei 75 – 80% der Patienten durch das Auftreten sekundärer Chromosomenaberrationen charakterisiert (Heim et al., 1995). Dabei zählen Trisomie 8, Isochromosom i(17q), Trisomie 19 und ein zweites Philadelphia-Chromosom zu den häufigsten Anomalien (Kantarjian et al., 1987; Sokal et al., 1988). Im Durchschnitt findet man in der Blastenphase drei zusätzliche Abweichungen (Heim et al., 1995). Das Erscheinen dieser Imbalanzen korreliert eindeutig mit einer verkürzten Überlebenszeit (Nanjangud et al., 1994; Griesshammer et al., 1997).

Bei 35% der CML-Patienten in der Blastenphase wurde 1997 mit der Mikrosatelliten-PCR ein Verlust der Heterozygotie (Loss of Heterozygosity; LOH) der Region 1p34-p36 nachgewiesen (Mori et al., 1997). Es wird hier eine Region mit Tumorsuppressorgenen vermutet, die bei der CML-Progression involviert sind. Eine Studie von Gribble et al. (1999) konnte einen Verlust dieser Region mittels CGH ebenfalls beschreiben.

Isochromosom i(17q) ist das bei hämatologischen Malignomen am häufigsten vorkommende Isochromosom (Heim et al., 1995). Das Tumorsuppressorgen *TP53* liegt auf 17p13.1. Bis vor kurzem wurde TP53 eine wichtige leukämogene Rolle zugeschrieben. FISH-Untersuchungen von Fioretos et al. (1999) zufolge hat das Auftreten des Isochromosoms i(17q) aber nichts mit dem Verlust von *TP53* zu tun. Sie vermuten ein in der Nähe der „Smith-Magenis-Syndrom common deletion region„ liegendes Tumorsuppressorgen in 17p11.2, das maßgeblich an der CML-Akzeleration beteiligt ist.

Die chronisch-myeloische Leukämie wird klassischerweise mit Busulfan und Hydroxyurea therapiert. Seit den 80er Jahren sind die allogene Knochenmarktransplantation und der Einsatz von Interferonen in den Mittelpunkt gerückt. Die Prognose der Patienten hat sich insgesamt verbessert. Der Medianwert der Überlebenszeit liegt momentan bei 47 Monaten (McGlave et al., 1990; Griesshammer et al., 1993; Kloke et al., 1993).

1.4 Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)

1992 wurde die vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) das erstemal in der Literatur beschrieben (Kalloniemi et al., 1992). Es handelt sich dabei um eine Methode, die zwischen klassischer Zytogenetik und moderner Molekulargenetik anzusiedeln ist.
Im Gegensatz zur Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH), die die Ergebnisse der zytogenetischen Untersuchung voraussetzt, um gezielt Hybridisierungen mit entsprechenden Sonden vornehmen zu können, ermöglicht die CGH ein unabhängiges Screening des gesamten Genoms.
Für die vergleichende genomische Hybridisierung wird Tumor-DNA (sogenannte Test-DNA) und DNA einer normalen Kontrollperson (sogenannte Referenz- bzw. Kontroll-DNA) benötigt. Beide Proben werden unterschiedlich markiert: Die Test-DNA z.B. mit Digoxigenin-11-dUTP und die Referenz-DNA mit Biotin-16-dUTP. Für optimale Ergebnisse sollte die zu hybridisierende DNA so geschnitten werden, dass sie zwischen 500 und 2000 Basenpaaren (bp) lang ist (Kallioniemi et al., 1994). Mit Hilfe der Gelelektrophorese kann die Länge der DNA überprüft werden.

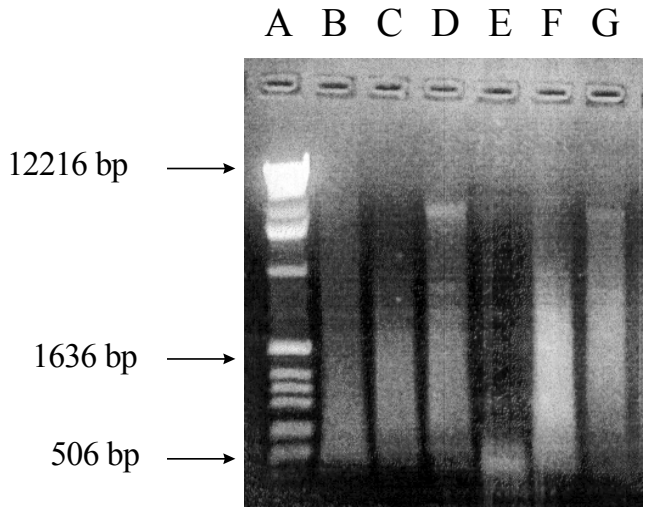


Abb. 1.1: Abbildung eines mit Ethidiumbromid gefärbten 1,5% Agarosegels. Die 1 kb DNA-Leiter in Spur A kann zur Messung linearer, doppelsträngiger DNA-Fragmente von 500 bp bis 12 kb benutzt werden. Die Banden der Leiter enthalten jeweils 1 bis 12 Wiederholungen eines 1019 bp DNA-Fragmentes. Zusätzlich zu diesen 12 Banden enthält die Leiter Vektor-DNA-Fragmente, die von 75 bis 1,636 bp reichen. Die Fragmente der 1 kb DNA-Leiter werden durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht (LIFE TECHNOLOGIES (Hrsg.), 1996). Spur B bis G zeigt DNA-Proben, die mit Hilfe der DNase I auf die gewünschte Länge geschnitten wurden.

Gleiche Mengen der so vorbereiteten, möglichst gegengeschlechtlich gewählten DNA-Proben werden denaturiert und auf normale Metaphase-chromosomen co-hybridisiert.

Entscheidend bei diesem Vorgang ist die Suppression von repetitiven Sequenzen, die überall auf dem menschlichen Genom vorkommen. Durch den Einsatz großer Mengen von sogenannter Cot-1 DNA, die eine repetitive Sequenzen enthaltende DNA-Fraktion darstellt, und mit einer Vorhybridisierung erzielt man eine nahezu vollständige Unterdrückung

der sogenannten „interspersed repetitive sequences„ (IRS) und aller anderen repetitiven Sequenzen (Landegent et al., 1987; Lichter et al., 1988). Unter diesen Bedingungen stehen allein die „single copy„-Sequenzen für die Hybridisierung zur Verfügung, die nur an ihrem entsprechenden chromosomalen Genlocus hybridisieren können. Diese Hybridisierung erfolgt mit einer gendosisspezifischen Kinetik und macht deshalb Gendosisunterschiede sichtbar.

Der Nachweis der Test- bzw. Referenz-DNA erfolgt mit Antidigoxigenin-Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) bzw. Avidin-Texas-Rot. Die Metaphase-Chromosomen werden mit 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) gegengefärbt, um sie mikroskopisch identifizieren zu können.

Anschließend können die Signale auf den Chromosomen unter einem Fluoreszenzmikroskop mit entsprechender Software (digitaler Bildanalyse) ausgewertet werden. Dabei wird auf die Intensitätsunterschiede zwischen Test- und Referenz-DNA geachtet. Die Referenz-DNA fungiert als eine Art interner Normwert, durch die Gewinne oder Verluste im Tumor-Genom als von der Norm abweichende Fluoreszenzsignale auffallen. Überschuß in der Tumor-DNA (z.B. Amplifikationen oder Polysomien) stellt sich somit als verstärktes Grün-Signal dar, Defizite (z.B. Deletionen oder Monosomien) dagegen als verstärkte Rot-Signale.

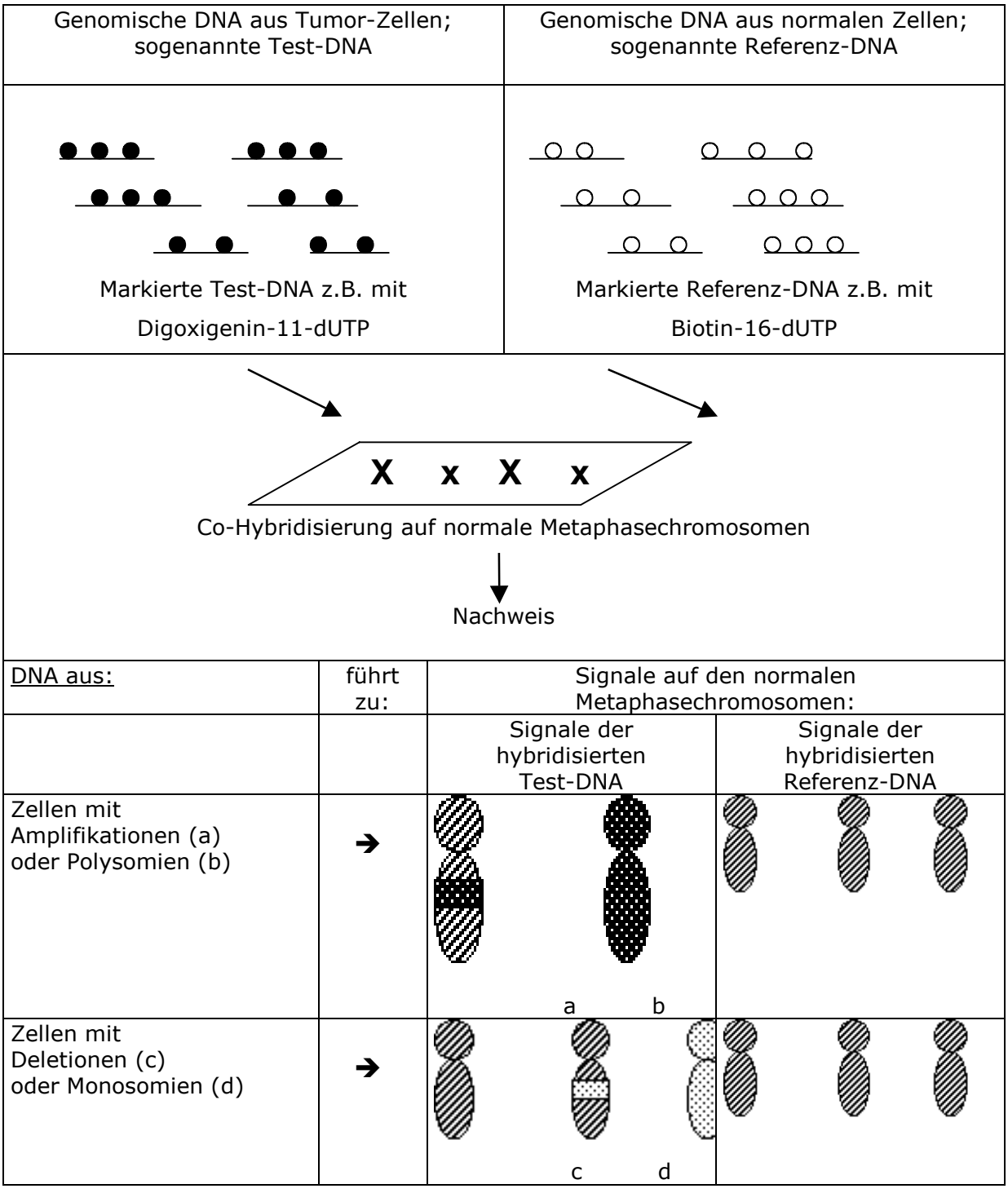


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH). Modifiziert nach Verma et al. (1994). Markierte genomische DNA aus Tumorgewebeproben bzw. leukämischen Zellen (Test-DNA) und unterschiedlich markierte DNA aus normalem Gewebe (Kontroll-DNA) werden gleichzeitig auf normale Metaphasechromosomen hybridisiert. Alle Chromosomen zeigen eine Hintergrundfärbung (gestreift). Sequenzen, die in der Test-DNA überrepräsentiert vorliegen (z.B. Amplifikationen oder Polysomien) führen im Vergleich zur Referenz-DNA zu einer stärkeren Färbung der entsprechenden chromosomalen Abschnitte (schwarz). Sequenzen, die in der Test-DNA unterrepräsentiert vorliegen (z.B.

Deletionen oder Monosomien) führen im Vergleich zur Referenz-DNA zu einer schwächeren Färbung der entsprechenden chromosomalen Abschnitte (weiß).

Die CGH bietet im Vergleich zu herkömmlichen zytogenetischen Untersuchungsmethoden mehrere Vorzüge.

1. DNA-Mengen kleiner als 1 µg reichen aus, um chromosomale Imbalanzen zu erkennen (Houldsworth et al., 1994). Zusätzlich steht die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur DNA-Amplifikation von noch kleineren Mengen zur Verfügung.

2. Die relativ neue Methode erlaubt die Untersuchung jeder Art von Zellen und Gewebe, unabhängig von der mitotischen Aktivität, auf die man bei der Bänderungsanalyse oder bei FISH angewiesen ist. Retrospektives Screening von fixiertem Material wurde somit möglich (Speicher et al., 1993; Isola et al., 1994).

3. Der Hauptvorteil besteht aber sicherlich darin, dass mit einer einzigen Hybridisierung ein Überblick über das gesamte Genom ermöglicht wird. Da mit der gesamten DNA einer Tumorgewebsprobe gearbeitet wird und nicht einzelne Metaphasen untersucht werden, entsteht ein Durchschnittsprofil aller in der Tumorprobe enthaltener Zellen.

In den letzten Jahren wurden viele Studien mit CGH an unterschiedlichen soliden Tumoren und an hämatologischen Neoplasien durchgeführt. Dabei ergaben sich eine Reihe neuer Erkenntnisse und Daten. Der Nachweis des chromosomalen Ursprungs einiger DNA Sequenzen (v.a. „double minutes„ = dmin und „homogeneously staining regions„ = hsr), die in den Entartungsprozeß involviert waren und mit zytogenetischen Möglichkeiten nicht klar identifiziert werden konnten, gelang mit CGH (Shiloh et al., 1992).

Ein Nachteil der Methode ist jedoch, dass die bei hämatologischen Neoplasien häufigsten chromosomalen Anomalien, nämlich balanzierte Aberrationen und Inversionen, nicht erfaßt werden.

Auch auf andere Weise werden der Methode Grenzen gesetzt. Die in der Zahl veränderten DNA-Sequenzen müssen eine bestimmte Größe haben, um erkannt zu werden: Amplifizierte Gen-Abschnitte müssen mindestens 2 Millionen bp lang sein, eine Deletion sollte mindestens 10

bis 20 Millionen bp betragen und damit die Größenordnung einer Bande erreichen. Im allgemeinen sind Verluste mit CGH schwerer ausfindig zu machen als Gewinne (Kallioniemi et al., 1992; Kallioniemi et al. 1994).
Die vergleichende genomische Hybridisierung liefert einen theoretischen Durchschnitt der Tumorprobe. Die möglicherweise vorhandene Heterogenität unter den Zellen wird nicht direkt erfaßt (Heim et al., 1995). Die maligne Entartung einer Zelle fällt nur dann ins Gewicht, wenn die Mehrzahl der Tumorzellen demselben Klon angehört.
Gelegentlich müssen zusätzlich Techniken, wie z.B. FISH, angewendet werden, um nicht eindeutig aussagekräftige CGH-Profile zu verifizieren.

1.5 Molekular-zytogenetische Befunde in der Blastenkrise bei Chronisch-Myeloischer Leukämie

Über 1500 Neoplasien wurden bis jetzt mit CGH untersucht (Forozan et al., 1997). Weniger als 5% davon sind Leukämien. Momentan liegen noch relativ wenig Informationen über die Untersuchung von hämatologischen Krebserkrankungen mit CGH vor. Die erste Untersuchung an nicht kultiviertem Material von CML-Patienten in der Blastenkrise mit Hilfe von CGH wurde von Gribble et al. 1999 durchgeführt.
Mit zytogenetischen Methoden konnte – wie oben erwähnt - bereits gezeigt werden, dass die Akzelerationsphase und der Blastenschub der CML mit dem Auftreten zusätzlicher, nicht zufälliger Chromosomenaberrationen assoziiert sind (Kantarjian et al., 1987; Sokal et al., 1988).
Eine Studie von 1997 (Rodley et al.) untersuchte mit der vergleichenden genomischen Hybridisierung die schon 1970 isolierte Ph-positive CML-Blastenphasen-Zellinie K-562. Obwohl die Linie K-562 schon mehrfach zytogenetisch analysiert worden war und in über 2000 Forschungsberichten zitiert wurde, konnte 27 Jahre später immer noch

von neue Erkenntnissen über Aberrationen berichtet werden. Die CGH-Studie ergab eine Amplifikation 13q31 in K-562, die in ähnlicher Form bislang nur bei 5 von 9 Mamma-Karzinom-Linien beschrieben worden war. Über Gene dieser Region, die mit der Tumorigenese in Zusammenhang stehen könnten, ist noch nichts Näheres bekannt (Rodley et al., 1997).

Die CGH-Untersuchung ergab auch eine Deletion des kurzen Arms von Chromosom 9 (del(9)(p13-pter)). Dieser Befund kommt bei vielen Tumoren, auch lymphoiden Leukämien und lymphoiden Blastenkrisen, vor, wurde aber bislang nicht mit dem myeloiden Blastenschub der CML in Zusammenhang gebracht. Auf 9p21 sind die Gene „cyclin-dependent kinase 4 inhibitor„ (*CDKN2A*), p16, und (*CDKN2B*), p15, lokalisiert. Zyklin-abhängige Kinasen sind wichtige Regulatoren des Zellzyklus in eukaryontischen Zellen. p15 und p16 hemmen die katalytische Aktivität eines bestimmten Zyklinkomplexes und werden deshalb als Tumorsuppressorgen diskutiert (Serra et al., 1995; Rodley et al., 1997). Inwieweit dieser Befund für die myeloide Blastenphase tatsächlich eine Rolle spielt und, ob es sich nicht nur um eine zufällige Aberration der seit 27 Jahren in Kultur gezüchteten Zellinie handelt, bleibt weiteren Studien vorbehalten (Rodley et al., 1997).

Die bei CML-Patienten mit CGH am häufigsten beobachtete Aberration betrifft das Chromosom 8 (Heim et al., 1995). Es handelt sich entweder um eine Trisomie 8, ein Isochromosom i(8)q oder eine Amplifikation von einer bestimmten Region auf Chromosom 8. Gribble et al. (1999) verweisen auf das Auftreten eines Isochromosoms i(8)q nicht nur bei CML, sondern auch bei Prostata-Karzinomen, kleinzelligen Lungen-Karzinomen und hepatozellulären Karzinomen. Sie folgern aus dem Verlust von 8p und dem Gewinn von 8q Veränderungen, die erstens gemeinschaftlich auf die Tumorprogression wirken und zweitens bei verschiedenen Karzinomen und hämatologischen Neoplasien auftreten. Das Proto-Onkogen *c-MYC* (Avian myelocytomatosis viral oncogene homolog) ist auf 8q24 lokalisiert und könnte bei einem Teil der CML-

Patienten für das Fortschreiten der Krankheit eine Rolle spielen (McCarthy et al., 1984; Rothberg et al., 1984).
Mit Hilfe von CGH konnte die Frage beantwortet werden, ob sekundäre Aberrationen bei CML nur in bestimmten Blutzellen auftreten. Das Ergebnis zeigte, dass die typischen Chromosomenanomalien gleichermaßen in CD34-positiven Zellen, Monozyten, Granulozyten und T-Zellen zu finden sind. Wichtiger als die Zellart scheint das Zellreifestadium zu sein (Naumann et al., 1999).
G-Banden-Untersuchungen an Knochenmarkmaterial und CGH-Analyse an der Blutprobe des gleichen Patienten lieferten in der Studie von Gribble et al. (1999) erstaunlich voneinander abweichende Resultate. Diese Beobachtungen unterstützen die Vermutung von Asimakopoulos et al. (1996), dass nicht alle abnormen Zellklone in das periphere Blut ausgeschwemmt werden. Eine Erfahrung, die für die Ergebnisanalyse wichtig ist.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung genetischer Aberrationen bei Patienten in fortgeschrittenen Stadien der chronisch-myeloischen Leukämie mit Hilfe der molekular-zytogenetischen Methode „Comparative Genomic Hybridization„ (CGH). Archiviertes Knochenmarkmaterial und Blutproben wurden zur Analyse herangezogen.

Es ergaben sich folgende Aufgaben:

1. Darstellung der genetischen Aberrationen mittels CGH in verschiedenen Krankheitsstadien der CML.
2. Überprüfung nicht eindeutiger CGH-Profilabweichungen mit Hilfe von Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH).

3. Vergleich der Ergebnisse der CGH-Analyse mit den bereits vorliegenden zytogenetisch ermittelten Ergebnissen.
4. Beurteilung des klinischen Nutzens von CGH-Untersuchungen im Vergleich zur zytogenetischen Routinediagnostik in Bezug auf diagnostische und prognostische Aussagen.

2. Material

2.1 Geräte

Geräte	*Typenbezeichnung (Hersteller)*
Bildanalyse-Systeme	CytoVision 2.35 (Applied Imaging, Sunderland, UK) IKAROS3, V. 3.89 (MetaSystems, Altlussheim, D) ISIS3, V. 2.44 (MetaSystems, Altlussheim, D)
Brutschrank	B 6200 (Heraeus, Hanau, D)
Gelelektrophoresekammer	0665 (Renner, Dannstadt, D)
Heizblock	Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg, D)
Heizplatte	SP 12 (Medax, Kiel, D)
Mikroskope	Photomikroskop Axiophot und Photomikroskop Axioplan (Zeiss, Oberkochem, D)
Reinraumbank	Uniflow UVUB 1200 (UniEquip, Martinsried b. M., D)
Schüttler	VXR (Janke & Kunkel, Staufen i.Br., D)
Spannungsgerät	Consort E 452 (Fröbel, Wasserburg, D)
Spektrophotometer	80-2103-98 (Biochrom, UK)
Transilluminator	Vilber Lourmat 302 nm (Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, D)
Wasserbad mit Thermostat	M 3 und RM 6 Lauda (Lauda, Lauda-Königshofen, D)
Zentrifugen	centrifuge 5402 (Eppendorf, Hamburg, D) Biofuge pico (Heraeus, Hanau, D) Laborfuge 400 (Heraeus, Hanau, D)

2.2 Chemikalien und Bioreagenzien

Chemikalie/Bioreagenz	*Hersteller*
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Serva, Heidelberg, D
Agarose MEEO	Roth, Karlsruhe, D
Albumin, Bovine (BSA)	Sigma, St. Louis, USA
Borsäure	Serva, Heidelberg, D
Chloroform	Roth, Karlsruhe, D
Colcemid	Seromed, Berlin, D
Essigsäure 99-100% (CH_3COOH)	Merck, Darmstadt, D
Ethanol (EtOH)	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromid	Sigma, München, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg, D
Ficoll 400	Sigma, München, D
Fixogum	Marabuwerke, Tamm, D
Formaldehyd	Merck, Darmstadt, D
Formamid	Fluka, Neu-Ulm, D
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, D
Giemsa	Sigma, München, D
Harnstoff (NH_2CONH_2)	Baker, Deventer, Holland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, D
L-Glutamin	Biochrom, Berlin D
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Merck, Darmstadt, D
Methanol p. A.	Roth, Karlsruhe, D
Natriumacetat (NaAc)	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid (NaCl)	Fluka, Buchs, CH
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg, D

Orange G	Hopkin & Williams, Chadwell Heath, UK
PBS (Phosphate buffered saline)	Biochrom, Berlin, D
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, D
Phenol	Roth, Karlsruhe, D
Phytohämagglutinin (PHA-L)	Seromed, Berlin, D
RPMI-Medium 1640	Gibco BRL, Eggenstein, D
Salzsäure (HCl)	Baker, Deventer, Holland
TRIS	Boehringer, Mannheim, D
Tween 20	Sigma, München, D
Vectashield	Vector, Burlingame, USA
Xylol	Merck, Darmstadt, D

2.3 Nukleinsäuren und Nukleotide

Nukleinsäure/Nukleotid	*Hersteller*
1 kb DNA Längenstandard	GIBCO BRL, Eggenstein, D
Biotin-16-dUTP	Boehringer, Mannheim, D
Cot-1-DNA	GIBCO BRL, Eggenstein, D
Desoxy-ATP	Boehringer, Mannheim, D
Desoxy-CTP	Boehringer, Mannheim, D
Desoxy-GTP	Boehringer, Mannheim, D
Desoxy-TTP	Boehringer, Mannheim, D
Digoxigenin-11-dUTP	Boehringer, Mannheim, D
Heringssperma-DNA	Sigma, München, D

2.4 Antikörper

Antikörper	*Hersteller*
Anti-Digoxigenin-Fluorescein Fab Fragment	Boehringer, Mannheim, D
Biotinyliertes Anti-Avidin	Vector, Burlingame, USA
FITC-Avidin	Vector, Burlingame, USA
Texas Red-Avidin DCS	Vector, Burlingame, USA

2.5 Enzyme

Enzym	*Hersteller*
DNA-Polymerase-I	Boehringer, Mannheim, D
DNase I	Boehringer, Mannheim, D
Pepsin	Sigma, München, D
Proteinase K	Qiagen, Hilden, D
RNase A	Sigma, München, D
Trypsin 2,5%, flüssig	Seromed, Berlin, D

2.6 Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	*Rezept*	
Agarosegel 1,5%	Agarose TBE 1x kurz aufkochen, anschließend Zugabe von Ethidiumbromid	3 g ad 200 ml 15 µl
Blocking-Lösung 5%	BSA Waschlösung V	4 g ad 80 ml
DAPI-Gebrauchslösung	Stammlösung (1 mg/ml) SSC 4x/0,1% Tween 20	50 µl ad 90 ml
dNTPs	0,5 mM dATP, dCTP, dGTP 0,05 mM dTTP H_2O dd	je 5 µl 1 µl ad 1 ml
Fixativ	Methanol:Eisessig	3:1
Gel-Ladepuffer	Ficoll wt 400 Orange G H_2O dd	10 g 0,1 ml ad 50 ml
Kaliumchlorid 0,4% (KCl)	KCl H_2O dd	2 g ad 500 ml
Sörensen-Puffer	0,3 M Na_2HPO_4 0,3 M KH_2PO_4, pH 6,8	
Lyse-Puffer	7 M Harnstoff 2% Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,35 M NaCl 0,001 M EDTA 0,01 M Tris-HCl pH 8,0	
Mastermix	SSC 4x 20% Dextransulfat	

Natriumacetat (3 M)	3 M Na-Acetat in H_2O Essigsäure ad pH 5,3	
NT-Puffer 10x	0,5 M Tris-HCl, pH 8,0 50 mM $MgCl_2$ 0,5 mg/ml BSA H_2O dd	5 ml 1 ml 0,5 ml ad 10 ml
PBS 10x	PBS 95,5 g/l H_2O dd	95,5 g ad 1000 ml
Pepsin Stammlösung	100 mg/ml in H_2O	
RNase A Stammlösung	10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl und 15 mM NaCl	
SSC 20x (standard saline citrate)	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat-Dihydrat H_2O dd HCl ad pH 7,0	175,3 g 88,2 g ad 1000 ml
TBE-Puffer 10x	Tris-Base Borsäure EDTA 0,5 M, pH 8,9 H_2O dd	108,0 g 55,0 g 40,0 ml ad 1,0 l
TE-Puffer 1x	1 M Tris-HCl, pH 8,0 50 mM EDTA, pH 8,0 H_2O dd	1,0 ml 1,0 ml ad 50 ml
Waschlösung I	SSC 2x, pH 7,0	
Waschlösung II	50% Formamid 50% SSC 4x, pH 7,0	130 ml 130 ml
Waschlösung III	SSC 2x, pH 7,0	
Waschlösung IV	SSC 0,5x, pH 7,0	
Waschlösung V	SSC 4x/0,1% Tween 20, pH 7,0	

2.7 Kulturmedien

Kulturmedium	*Rezept*	
Plazenta konditioniertes Medium	Aus humaner Plazenta präparierte Fraktion nach einem Rezept von Dr. B. Heinze, Abteilung Tumorzytogenetik, Innere III, Universität Ulm	
RPMI-Medium	RPMI 1640 FCS Gentamycin L-Glutamin Phytohämagglutinin	100 ml 20 ml 1,2 ml 1,0 ml 1,3 ml
RPMI-Medium	RPMI 1640 FCS L-Glutamin Heparin-Natrium Penicillin/Streptomycin	500 ml 100 ml 5 ml 5 ml 5 ml

2.8 Reagenziensysteme (Kits)

Kit	*Inhalt*
QIAamp Blood Midi Kit	Proteinase K Puffer AE (Elutionspuffer) Puffer AW 1 (Waschpuffer) Puffer AW 2 (Waschpuffer)

2.9 Untersuchungsmaterial

Es wurde auf in der Arbeitsgruppe Tumorzytogenetik, Abteilung Innere III der Universität Ulm, Leitung Frau Dr. Barbara Heinze, zytogenetisch bereits analysierte Proben von CML-Patienten zurückgegriffen. Zur Untersuchung stand Blut- oder Knochenmarkmaterial zur Verfügung, das bei –20 °C im Gefrierfach (fixiertes Material) oder bei –196 °C in flüssigem Stickstoff (frisches Zellmaterial) archiviert wurde.
Als Auswahlkriterium für die Patientenserie wurde die zytogenetische Diagnose „chronisch-myeloische Leukämie„, CML, und der Nachweis des Philadelphia-Chromosoms zugrundegelegt. Patient Nummer 26 ist Philadelphia-negativ und bildet eine Ausnahme, wurde aber in die Arbeit mit aufgenommen, weil als Befund Blastenphase der CML angegeben war. Referenzblutproben stammten von gesunden Probanden.

2.10 Blut- und Knochenmarkproben der CML-Patienten

Tab. 2.1: Klinische und zytogenetische Daten von 27 CML-Patienten in verschiedenen Krankheitsphasen, die mit CGH analysiert wurden.

Patient Nr. 1 - 4:	Chronische CML mit Philadelphia-Chromosom, keine weiteren Aberrationen
Patient Nr. 5:	Chronische CML mit komplexer Translokation
Patient Nr. 6:	CML in der Akzelerationsphase ohne Blastenschub (BS) mit komplexer Translokation
Patient Nr. 7 – 16:	CML in der Akzelerationsphase ohne Blastenschub (BS)
Patient Nr. 17 – 27:	CML in der Akzelerationsphase mit Blastenschub (BS)

Nr.	*Diagnose*	*Geschlecht*	*Alter*	*Karyotyp*	*Material*
1	CML	männlich	44	46,XY, t(9;22)(q34;q11)	KM
2	CML	männlich	35	46,XY, t(9;22)(q34;q11)	Blut
3	CML	männlich	47	46,XY, Ph-positiv [25]	KM
4	CML	weiblich	33	46,XX, t(9;22)(q34;q11) [20]	Blut

5	CML	weiblich	68	46,XX, t(1;9;22)(q21;q34;q11)	KM
6	CML	weiblich	58	Klon 1: 46,XX, r(X), del(6)(p23p24), t(9;20;22)(q22;p13;q11) (5K) Klon 2: 48,XX, del(X)(q24)?, del (6)(p23p24), +8, del(8)(p bis q13), t(8;19)(q13;p13), t(9;20;22)(q34;p13;q11), +19 (3K)	Blut
7	CML	männlich	18	Klon 1: 47,XY, t(9;22)(q34;q11), +22, del(22)(q11) [1] Klon 2: 46,XY, t(9;22)(q34;q11) [26]	Blut
8	CML	männlich	29	Klon 1: 46,XY, t(9;22)(q34;q11), i(17q) Klon 2: 48,XY, +8, t(9;22)(q34;q11), +22, del(22)(q11) (6K)	KM
9	CML	männlich	66	Klon 1: 48,XY, +8, t(9;22)(q34;q11), +22, del(22)(q11) [11] Klon 2: 46,XY, t(9;22)(q34;q11) [9]	KM
10	CML	weiblich	58	48,XX, +8, t(8;19)(q24;p13), t(9;22)(q34;q11), +19	Blut
11	CML	männlich	38	46,XY, t(9;22)(q34;q11), del(19)(p11) [17]	KM
12	CML	weiblich	67	48,XX, +8, +9, del(11)(q23), -D, +19 [1]	KM
13	CML	männlich	46	Klon 1: 47,XY, +8, t(9;22)(q34;q11) [5] Klon 2: 46,XY, t(9;22)(q34;q11) [5]	Blut
14	CML	weiblich	74	46,XX, Ph-positiv, zusätzliche Aberrationen [5]	KM
15	CML	männlich	76	Klon 1: 47,XY, +8 [19] Klon 2: 46,XY, normal diploid [2]	KM
16	CML	weiblich	43	46,XX, inv(3)(p12;q26), del(9)(p12), del(13)(q32)?, bcr-positiv	KM
17	CML BS	männlich	63	47,XY, Ph-positiv, +Ph	Blut

18	CML BS	männlich	35	Klon 1: 48,XY, t(9;22)(q34;q11), +C, +Ph, i(17q) Klon 2: 46,XY, t(9;22)(q34;q11)	Blut
19	CML BS	männlich	55	Klon 1: 47,XY, +8, t(9;22)(q34;q11) (5K) Klon 2: 46,XY, t(9;22)(q34;q11) [17]	Blut
20	CML	männlich	57	Klon 1: 47-50,XY, +C, +2Ph Chr. Klon 2: 46,XY, Ph-positiv	KM
21	CML BS	männlich	58	50-53,XY, +4, +6, +7, +8, t(9;22)(q34;q11), +10, +13, +18, +21 (wechsl. Trisomie)	KM
22	CML BS	weiblich	29	Klon 1: 47,XX, +8, t(9;22)(q34;q11) (laut Patientenakte) Klon 2: 46,XX, Ph-positiv	KM
23	CML BS	weiblich	63	51,XX, +8, t(9;22)(q34;q11), +10, +15, +21, +22, del(22)(q11)	Blut
24	CML BS	männlich	51	Klon 1: 48,XY, +8, t(9;22)(q34;11), ins(21)(q11)?, +22, del(22)(q11) Klon 2: 47,XY, t(9;22)(q34;q11), ins(21)(q11)?, +22, del(22)(q11)	Blut
25	CML BS	männlich	30	48,XY, +8, t(9;22)(q34;q11), +22, del(22)(q11)	Blut
26	CML BS	männlich	70	46,XY, Ph-negativ	Blut

27	CML BS	männlich	37	Klon 1: 52,X, +X, -Y, +1, +2, t(1;2)(q21;q33), +8, t(9;22)(q34;q11), +10, t(12;17)(p+;q-), +17, +Ph, +mar (5) Klon 2: 52,X, +X, -Y, +1, +2, t(1;2)(q21;q33), +7, t(9;22)(q34;q11), +10, t(12;17)(p+;q-), +17, 20p-, +Ph, +mar (1K) Klon 3: 52,X, +X, -Y, +1, +2, t(1;2)(q21;q33), +17, -19, +Ph, +mar1, +mar2 (1K) Klon 4: 46,XY, t(3;4)(p14;q31), t(9;22)(q34;q11), 19q- (7K) Klon 5: 46,XY, Ph-positiv [1]	Blut

Abkürzungen:

[1]	Anzahl der Mitosen mit dieser Aberration
(7K)	7 Karyogramme wurden gelegt
BS	Blastenschub
Klon 1	Klon mit den meisten Aberrationen
KM	Knochenmark
mar	Markerchromosom
normal diploid	normaler diploider Chromosomensatz
Ph-positiv	meint Ph, wenn kein Karyogramm vorliegt
t(9;22)	meint Ph, wenn Karyogramm vorliegt
wechsl. Trisomie	keine konstant vorkommende Trisomie

2.11 Zellinien

Tab. 2.2: Die Zellinien NB4 und U-BLC2.

Bezeichnung	*Zelltyp*	*Quelle*
NB4	Promyelozyten-Leukämie-Zellinie	Dr. Michel Lanotte, Institut d´Hématologie, Université Paris 7

U-BLC2	Ulmer-Blasenkarzinom-Zellinie	Universität Ulm, Abteilung Pathologie, Dr. S. Brüderlein

Die Zellinien NB4 und U-BLC2 wurden zu Beginn der Untersuchungsserie zur Validierung der CGH-Methode eingesetzt.

2.12 DNA-Sonden

Tab. 2.3: In dieser Arbeit eingesetzte YAC-DNA-Sonden.

Bezeichnung	*Gen/Bande*	*Vektor*	*Insertgröße*	*Klonierungs-stelle*	*Bezugsquelle*
771H1	6p23	pYAC4	1780 kb	EcoRI	CEPH
917A1	6p23	pYAC4	1350 kb	EcoRI	CEPH

Die DNA-Sonden 771H1 und 917A1 wurden zur Überprüfung der CGH-Profile bei der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung eingesetzt.

2.13 Sonden zur Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Tab. 2.4: In dieser Arbeit eingesetzte kommerzielle Sonden zur Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung.

FISH-Sonde	*Chromosomen*
Telomerproben der Firma Vysis	8q
whole chromosome paint Proben (wcp) der Firma Vysis	1, 2, 6, 8, 9

DNA-Sonden, die in der vorliegenden Arbeit zur Überprüfung der CGH-Profile bei der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung eingesetzt wurden.

3. Methoden

3.1 Chromosomenpräparation aus Knochenmark- und aus Vollblutproben von CML-Patienten

3.1.1 Kultivierung von Knochenmark- und Vollblutproben

Heparinisierte Knochenmark- und Vollblutproben der CML-Patienten wurden so verwendet, dass bei weniger als 20.000 Leukozyten/µl ca. 1 ml der Probe in 9 ml RPMI-Medium und 1,5 ml aus Plazenta präpariertem Medium eingesetzt wurde. Die Knochenmarkzellkulturen wurden 24 h, die Vollblutzellkulturen 48 h unter 5% CO_2-Begasung im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Nach Zugabe von 100 µl Colcemid 40 min vor Beendigung der Kultur wurde die in Zentrifugenröhrchen à 5 ml aufgeteilte Suspension abzentrifugiert (10 min bei 950 rpm). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen resuspendiert. Zur hypotonen Behandlung wurde 1 ml auf 37°C vorgewärmtes 0,075 M Kaliumchlorid dazugegeben, die Lösung aufgeschüttelt und abermals 5 ml 0,075 M Kaliumchlorid hinzugefügt. Die Knochenmarkproben mußten 20 min, die Vollblutproben 15 min im Wasserbad (37°C) inkubieren. Anschließend wurden die Röhrchen wieder bei 950 rpm 10 min lang zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen resuspendiert. Zum Fixieren wurden insgesamt 9 ml Fixativ (Methanol:Eisessigsäure 3:1) tropfenweise und unter Schütteln dazugegeben. Die Proben wurden 20 min im Kühlschrank (+4°C) verwahrt und wurden dann ein drittes Mal bei 950 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet resuspendiert. Der Waschschritt mit Zugabe von 5 ml Fixativ und anschließender Zentrifugation (10 min bei 950 rpm) wurde im ganzen viermal wiederholt.

Die Objektträger wurden mit Methanol entfettet, 10 min unter fließendem Wasser gewässert und zuletzt mit Aqua bidest gespült. Der Überstand aus den Zentrifugenröhrchen wurde abgesaugt, das Pellet aufgeschüttelt und mit einer Pipette entnommen. 1 - 3 Tropfen wurden zum Spreiten auf den gekühlten, feuchten Objektträger aufgetropft. Die

Präparate trockneten anschließend an der Luft, bevor sie zur mikroskopischen Beurteilung in der Giemsa-Lösung (5 ml Giemsa ad 50 ml mit KH_2PO_4/NaOH-Puffer; 1:10) für 8 min gefärbt und in KH_2PO_4/NaOH-Puffer und Aqua bidest gespült wurden.

3.1.2 GTG-Bänderung (G-bands by trypsin using Giemsa)

Die 1-2 Wochen bei Raumtemperatur gealterten, bereits für die erste Auswertung mit Giemsa gefärbten Präparate wurden in frischem Xylol 30 min entfettet, das Deckglas entfernt und in Fixativ (Methanol:Eisessig 3:1) zweimal 10 min entfärbt. Nach einem Tag Trocknen bei Raumtemperatur wurde die Proteolyse in 50 ml 0,9% NaCl unter Zusatz von 1 ml Trypsin (10 - 40 sek) durchgeführt. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Präparate anschließend in eiskalter 0,9% NaCl Lösung gespült. Zuletzt wurden die Präparate 6 min in Giemsa-Lösung gefärbt und in KH_2PO_4/NaOH-Puffer sowie Aqua bidest gespült.

3.1.3 Auswertung der G-gebänderten Chromosomenpräparate

Die G-gebänderten Chromosomenpräparate wurden routinemäßig in der Abteilung Tumorzytogenetik der Universität Ulm hergestellt und ausgewertet. Die Karyotypisierung erfolgte am Durchlicht-Mikroskop nach dem aktuellen Stand des „International System for Human Cytogenetic Nomenclature„ (ISCN).

3.2 Chromosomenpräparation aus Lymphozyten gesunder Probanden für die vergleichende genomische Hybridisierung

Für die vergleichende genomische Hybridisierung werden normale Metaphase-Präparate verwendet.

Das venöse Blut (5 ml) stammte von gesunden Probanden aus der Abteilung Humangenetik der Universität Ulm und wurde mit 0,1 ml Heparin versetzt. Jeweils vier Tropfen des heparinisierten Blutes wurden in mit 3 ml RPMI-Medium + PHA gefüllte Zentrifugenröhrchen getropft und 72 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Um die Zellen in der Metaphase der Mitose zu halten, wurden 1 h vor Abbruch der Kultur 200 µl Colcemid dazugegeben. Die Kulturen wurden dann für 8 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen, die Zellen resuspendiert. 3-4 ml 37°C warme 0,4% KCl-Lösung wurde unter vorsichtigem Schütteln in die Zentrifugenröhrchen getropft. Damit die hypotone Behandlung wirken konnte, mußten die Proben 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubieren. Die Röhrchen wurden anschließend abzentrifugiert (8 min bei 800 rpm), der Überstand abpipettiert und der Bodensatz resuspendiert. Auf –20°C gekühltes Fixativ (Methanol:Eisessig 3:1) wurde dazupipettiert (ca. 3-4 ml). Die Proben mußten 20-30 min bei +4°C im Kühlschrank lagern. Anschließend folgte wieder eine Zentrifugation 8 min bei 1000 rpm. Der Vorgang wurde insgesamt viermal durchgeführt. Nachdem die Kulturen über Nacht im Kühlschrank (+4°C) gelagert worden waren, wurden sie am nächsten Morgen abzentrifugiert (8 min bei 1000 rpm), der Überstand abpipettiert und ein fünftes Mal Fixativ hinzugefügt. Die Proben ruhten 20-30 min bei +4°C, bevor sie abermals abzentrifugiert und abpipettiert wurden. Das resuspendierte Zellpellet wurde auf die vorbereiteten Objektträger aufgetropft.

Die verwendeten Objektträger wurden zuerst mit 70% Äthanol gereinigt und 2-3 Tage in einer Küvette mit 2 M HNO_3 gewässert. Nachdem sie

10 min unter demineralisiertem Wasser gespült worden waren, lagerten die Objektträger bei +4°C in einer mit Aqua bidest gefüllten Küvette.
Von der Suspension wurden 3-4 Tropfen auf die kalten, nassen Objektträger aufgetropft und 2-3 Tage luftgetrocknet. Die Präparate wurden bei –20°C im Kühlfach auf Kieselgel gelagert.

3.3 Isolierung genomischer DNA

3.3.1 Isolierung genomischer DNA aus mit Carnoy fixierten Blut- und Knochenmarkproben

Die mit dem Fixativ nach Carnoy (Methanol:Eisessig 3:1) bei –20°C eingebetteten Blut- bzw. Knochenmarkproben wurden aufgetaut und bei 1000 rpm 10 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde so weit wie möglich abgesaugt. Die Pelletmenge wurde mit Hilfe eines zweiten, mit Wasser gefüllten Eppendorfgefäßes, das als Vergleichswert diente, abgemessen. Auf das so berechnete Pelletvolumen wurden alle weiteren Mengenangaben bezogen. Zum Bodensatz wurde die fünffache Menge an RPMI 1640 Medium/5% FCS zum Waschen eingesetzt. Die Suspension wurde 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet zur Proteinolyse tröpfchenweise in einem Lysepuffer (7 M Harnstoff + 2% (w/t) Natriumdodecylsulfat + 0,35 M NaCl + 0,001 M EDTA + 0,01 M Tris-HCl pH 8,0) resuspendiert. Pro ml Zellsuspension wurden 5 ml Lysepuffer verwendet. Die in sterile Eppendorfgefäße umgefüllten Proben wurden bei 25°C Raumtemperatur so lange geschüttelt, bis der Inhalt vollständig gelöst war. Im folgenden Schritt wurden zu der Suspension mit x µl Volumen sowohl 0,5 x µl Phenol mit 0,1% 8-Hydroxychinolin (Proteinverdau) als auch 0,5 x µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) (Entfernung der Phenolreste) hinzugefügt. Die Mischung wurde so lange auf dem Vortexer geschüttelt, bis eine gleichmäßig weiße Lösung entstanden war. Die Röhrchen wurden anschließend 10 min bei 14.000 rpm bei 25°C

zentrifugiert. Die nach dem Auftrennvorgang in der wässrigen Schicht enthaltenen Nukleinsäuren wurden abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß gefüllt. Abermals wurde – ausgehend von x µl Volumen – 0,5 x µl Chloroform: Isoamylalkohol (24:1) hinzugefügt. Die Eppendorfgefäße wurden solange auf dem Vortexer gemischt, bis eine weiße Lösung entstanden war. Nach erneutem Zentrifugieren bei 14.000 rpm (10 min, 25°C) wurde die die Nukleinsäuren enthaltende oberste Phase abpipettiert und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Es wurden 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat und 2-3 Volumen 100% Äthanol zur Fällung dazugegeben. Die Proben wurden über Nacht bei –20°C tiefgefroren und am nächsten Morgen 30 min bei +4°C mit 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet kurz angetrocknet. In das Eppendorfgefäß wurden 500 µl 70% Äthanol eingefüllt. Nach 2 min wurde die Lösung erneut bei 14.000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im Thermoblock bei 37°C getrocknet. Mittels 50 µl 1x TE-Puffer wurde das Pellet über Nacht gelöst.
Die DNA-Konzentration wurde im Spektrophotometer gemessen. 1x TE-Puffer wurde für den Null-Abgleich verwendet.

3.3.2 Isolierung genomischer DNA aus kryofixiertem Blut und Knochenmark

Die Isolierung genomischer DNA aus kryofixiertem (flüssiger Stickstoff; -196°C) Blut und Knochenmark wurde mit Hilfe des „QIAamp Blood Midi Kit„ durchgeführt.
1 ml Blut bzw. Knochenmark wurde nach dem Auftauen in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit 100 µl Proteinase K-Stammlösung und 1,2 ml AL Puffer auf dem Vortexer gemischt. Die Suspension wurde für 10 min im 70°C warmen Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 1 ml 100% Äthanol hinzugefügt und auf dem

Vortexer gemischt. Der Inhalt wurde in ein im Kit enthaltenes Röhrchen mit Filter umgefüllt und bei 3000 rpm für 3 min zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Auf den Filter wurden 2 ml AW1 Puffer gefüllt und das Gefäß bei 5000 rpm für 1 min zentrifugiert. Danach wurden 2 ml AW2 Puffer hinzugefügt und bei 5000 rpm für 15 min zentrifugiert. Das Filtrat wurde erneut verworfen. Auf die Säule des Zentrifugenröhrchens wurden 200 µl AE Puffer gefüllt. Das Gefäß wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 5000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die 200 µl des DNA enthaltenden Filtrats wurden ein zweites Mal auf die Säule pipettiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert.
Die DNA-Konzentration wurde im Spektrophotometer gemessen. 1x TE-Puffer diente zum Null-Abgleich.

3.4 DNA Markierung mit Hilfe der Nick-Translation

3.4.1 Pipettieransatz der Nick-Translation

Mittels der Nick-Translation wurde Referenz-DNA gesunder Probanden mit Biotin-16-dUTP und Tumor-DNA von CML-Patienten mit Digoxigenin-11-dUTP indirekt markiert.
Der Pipettieransatz ergab insgesamt 100 µl und bestand aus x µl Aqua bidest, 10 µl 10x NT-Puffer, 10 µl 0,1 M Mercaptoethanol, 10 µl dNTP, 4µl Biotin-16-dUTP bzw. Digoxigenin-11-dUTP, x µl DNA-Probe (auf 2000 ng berechnet), 2 µl DNA-Polymerase-I und x µl DNase I (1:1000; ca. 2-4 µl). Die Chemikalien wurden in der oben genannten Reihenfolge in Eppendorfgefäße auf Eis pipettiert, einmal kurz zentrifugiert und für 90 min bei 15°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben bis zur Gelelektrophorese auf Eis aufbewahrt, um die Reaktion der Enzyme zu stoppen.

3.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Das Agarosegel für die Elektrophorese wurde aus 3 g MEEO Agarose Gel 1,5% und 200 ml 1x TBE hergestellt. Die Mischung wurde im Mikrowellengerät aufgekocht, bis sie klar war und anschließend 10 min bei 60°C im Wasserbad abgekühlt. Nachfolgend wurden 15 µl Ethidiumbromid dazugegeben und das Gel in eine Gelkammer eingegossen.
Aus dem Ansatz für die Nick-Translation wurden jeweils 8 µl DNA-Probe mit 5 µl Gel-Ladepuffer gemischt und direkt in der horizontalen Gelkammer aufgetrennt. 1x TBE diente als Ladepuffer für die Elektrophorese. Dauer der Elektrophorese: 40 min bei 200 mA und 80 mV. Das im Agarosegel enthaltene Ethidiumbromid ermöglichte die Sichtbarkeit der DNA-Fragmente im UV-Licht. Die Quantität ließ sich im Vergleich zum ebenfalls aufgetragenen 1 kb DNA-Marker (10 µl) ablesen. Es erfolgte eine fotografische Ergebnisdokumentation.

3.4.3 Fällung der markierten DNA-Sonden

Zum Stoppen der Reaktion wurde zu jeder DNA-Probe 1 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 dazugegeben. Die Gefäßinhalte wurden gemischt, kurz abzentrifugiert und für 10 min bei 65°C im Thermoblock inkubiert. Nachfolgend wurden zum Fällen gleiche Mengen (je 70 µl) Tumor-DNA und Referenz-DNA mit 80 µl Cot-1-DNA und 2 µl Heringssperma-DNA vermengt und mit 28 µl Aqua bidest auf insgesamt 250 µl aufgefüllt. 25 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 688 µl eiskaltes 100% Äthanol wurden anschließend dazugegeben. Die DNA-Proben wurden zur Fällung über Nacht bei –20°C aufbewahrt.

3.5 Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)

3.5.1 Vorbehandlung und Denaturierung der Chromosomenpräparate

Die Chromosomenpräparate (siehe Abschnitt 3.2) wurden aufgetaut und 2-3 Tage vor der Hybridisierung zum Altern bei Raumtemperatur aufbewahrt. Zur Vorbehandlung der Präparate wurden 150 µl der 1:100 verdünnten RNase A-Stammlösung (990 µl 2x SSC + 10 µl RNase A; Endkonzentration 100 µg/ml) auf die Objektträger aufgetragen, die Lösung mit einem Deckglas geschützt und die Objektträger für 60 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Präparate in 2x SSC (dreimal 5 min), in Pepsin-Gebrauchslösung (99 ml ddH_20 + 20 µl Pepsin-Stammlösung + 1 ml 1 N HCl; 8 min bei 37°C), in 1x PBS (einmal kurz, zweimal 5 min) und in 1x PBS/50 mM $MgCl_2$ (einmal 5 min) gewaschen. Die Chromosomen wurden zur Post-Fixierung für 15 min in 1% Formaldehyd (2 ml Formaldehyd + 68 ml 1x PBS/50 mM $MgCl_2$) inkubiert und nochmal für 5 min in 1x PBS gewaschen. Die Arbeitsschritte wurden auf dem Schüttler ausgeführt. Alle Lösungen hatten Raumtemperatur.

Zur Dehydrierung wurden die Objektträger durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 85%, 95%, 99% Äthanol) geführt und anschließend 30 min luftgetrocknet.

Die Denaturierungslösung aus 70% Formamid/0,7x SSC (49 ml Formamid + 21 ml 2x SSC, mit HCl auf pH 7,0 eingestellt) wurde auf 70°C im Wasserbad vorgewärmt, und die Präparate darin 1 min 45 sek denaturiert. Anschließend wurden die Präparate kurz in 2x SSC geschwenkt, bevor sie ein zweites Mal durch die auf –20°C gekühlte, aufsteigende Alkoholreihe (70%, 85%, 95%, 99% Äthanol) geführt wurden. Die Chromosomen trockneten danach 30 min an der Luft.

3.5.2 Vorbehandlung und Denaturierung der DNA-Proben

Die DNA-Proben wurden mit der Nick-Translation markiert und zum Fällen bei –20°C tiefgefroren (siehe Abschnitt 3.4). Zum Ansetzen des Hybridisierungsmixes wurden die gefrorenen DNA-Proben bei +4°C 30 min mit 14.000 rpm zentrifugiert. Im Anschluß daran wurde der Überstand schnell dekantiert und 400 µl 70% Äthanol zum Waschen dem Bodensatz hinzugefügt. Das nicht resuspendierte Pellet wurde ein weiteres Mal bei +4°C 30 min lang bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nachdem die Proben bei 37°C im Thermoblock ca. 15 min trockneten, wurden sie für etwa 1 h in 10 µl Formamid im Thermomixer bei leichtem Schütteln und 37°C gelöst. Zu der vollständig gelösten DNA wurden 10 µl Mastermix (4x SSC, 20% Dextransulfat) dazupipettiert. Anschließend wurde die Probe weitere 30 min bei 37°C im Thermoblock inkubiert. Zur Denaturierung wurden die Proben 10 min bei 76°C erhitzt und für 1 h bei 37°C vorhybridisiert.

3.5.3 Hybridisierung

Die getrockneten Chromosomenpräparate wurden auf der Heizplatte bei 37°C kurz vorgewärmt, bevor der Hybridisierungsmix aufgetragen wurde. Die Flüssigkeit wurde mit einem Deckglas abgedeckt und mit Fixogum vor dem Austrocknen geschützt. Die Präparate lagerten zur Hybridisierung 3 Tage in einer Metallkassette bei 37°C im Wasserbad.

3.5.4 Waschen und Nachweis

Die Waschlösungen I bis V wurden vorbereitet und auf 45°C vorgewärmt. Nur eine Küvette von Waschlösung IV wurde auf 60°C erwärmt und eine Küvette von Waschlösungen V behielt

Raumtemperatur. Die Waschschritte erfolgten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.

Das Fixogum wurde entfernt und die Objektträger in Waschlösung I gesammelt, um das Deckglas abschwimmen zu lassen. Anschließend wurden die Präparate dreimal 10 min in Waschlösung II geschwenkt, um dann zweimal 5 min in Waschlösung III gewaschen zu werden. Es folgten zweimal 5 min Waschschritte in Lösung IV. Die Chromosomen-Präparate wurden zuletzt in Waschlösung V für ca. 5 min gesammelt.

Für den Nachweis wurde die Blocking-Lösung (4,0 g BSA + 80 ml Waschlösung V) gefiltert und im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Die Antikörper Anti-Digoxigenin-Fluoreszein und Texas Rot-Avidin wurden 1:200 mit 1% BSA/Waschlösung V (8 ml Waschlösung V + 2 ml filtriertes 5% BSA) verdünnt (5 µl Anti-Digoxigenin-Fluoreszein + 5 µl Texas Rot-Avidin + 1000 µl 1% Blocking-Lösung), 5 min bei 12.000 rpm zentrifugiert und bis zum Auftragen im Dunkeln gelagert.

Die Chromosomenpräparate wurden 30 min in der vorgewärmten Blocking-Lösung inkubiert und anschließend in der Waschlösung V gesammelt. 150 µl verdünnte Antikörperlösung wurden auf ein Deckglas aufgetragen und mit dem kurz angetrockneten Objektträger abgehoben. Die Präparate inkubierten 45 min in einer feuchten Kammer bei 37°C. Nachdem die Deckgläser entfernt worden waren, wurden die Chromosomen dreimal 5 min durch die Waschlösung V (45°C) geführt. Der Arbeitsgang erfolgte im Dunkeln auf dem Schüttler bei Raumtemperatur.

Zuletzt wurden die Chromosomenpräparate 5 min bei Raumtemperatur in DAPI-Gebrauchslösung gegengefärbt, in Aqua bidest gespült und mit 24 µl Vectashield Eindeckmedium und einem Deckglas eingedeckt. Die Präparate lagerten bei +4°C in einer Präparatemappe.

3.5.5 CGH-Auswertung

Die Auswertung der mit CGH bearbeiteten Präparate erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop. Die digitale Bildauswertung wurde mit dem Programm CytoVision von Applied Imaging durchgeführt und dokumentiert.

3.6 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

3.6.1 Herstellung der Chromosomenpräparate aus fixierten Blut- und Knochenmarkproben

Die mit Carnoy fixierten Blut- und Knochenmarkproben der CML-Patienten wurden aufgetaut und 5-8 Tropfen auf gekühlte, feuchte Objektträger aufgetropft (siehe 3.1.1).
Das kryofixierte Material wurde nach folgendem Verdünnungsschema aufgetaut: Bei einer Suspensionsmenge von 1 ml wurde nach 0 min 0,10 ml Verdünnungsmedium (500 ml RPMI 1640 + 100 ml FCS + 5 ml Streptomycin und Penicillin + 5 ml L-Glutamin + 5 ml Heparin-Natrium), nach 1 min 0,12 ml, nach 2 min 0,15 ml, nach 3 min 0,19 ml, nach 4 min 0,26 ml, nach 5 min 0,36 ml, nach 6 min 0,52 ml, nach 7 min 0,86 ml, nach 8 min 1,69 und nach 9 min 4,75 ml dazugegeben. Es wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet.
Die so aufbereiteten Proben wurden anschließend 8 min bei 800 rpm zentrifugiert, analog dem Protokoll von 3.1.1 in Kultur gebracht und die Chromosomen entsprechend 3.2 präpariert.

3.6.2 FISH-Hybridisierung

Für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung wurden direkt markierte Sonden der Firma Vysis und von CEPH, Paris, bezogene DNA-Sonden (Yeast artificial chromosomes; YACs) verwendet.

3.6.2.1 Hybridisierung mit direkt markierten Sonden der Firma Vysis

Die Chromosomenpräparate wurden analog dem Protokoll für die CGH (3.5) vorbereitet.
Für das Ansetzen der Probe wurden 7µl des mitgelieferten Puffers (Dextransulfat + Formamid + SSC; pH 7,0) plus 1 µl SpectrumOrange markierte Probe plus 1 µl SpectrumGreen markierte Probe plus 1 µl Aqua bidest bzw. 7 µl des Puffers plus 2 µl Probe (SpectrumOrange oder SpectrumGreen) plus 1 µl Aqua bidest in einem Eppendorfgefäß zusammengegeben. Die gut gemischten Proben wurden für 5 min bei 73°C im Thermomixer denaturiert und der gesamte Inhalt auf den entsprechenden Objektträger aufgetragen. Das aufgelegte Deckglas wurde mit Fixogum umrandet. Zur Hybridisierung wurden die Präparate über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer aufbewahrt.
Am nächsten Morgen wurde das Fixogum mit einer Pinzette entfernt und die Objektträger den Waschschritten unterzogen. Dafür wurden die Chromosomenpräparate in 2 Küvetten 2x SSC (45°C) kurz geschwenkt und in 0,4x SSC (72°C), 2x SSC (RT) und 4x SSC/0,1% Tween 20 (RT) je 2 min gespült. Zuletzt wurden die Präparate mit DAPI-Gebrauchslösung für 5 min gegengefärbt und mit Aqua bidest gewaschen. Die Objektträger wurden an der Luft getrocknet und mit 24 µl Vectashield und einem Deckglas eingedeckt. Die Präparate lagerten bei +4°C.

3.6.2.2 Hybridisierung mit Yeast artificial chromosomes (YACs)

Die Chromosomenpräparate wurden analog dem Protokoll der CGH (3.5) vorbereitet.
Es wurden zwei YACs, mit denen in der Abteilung Humangenetik der Universität Ulm gearbeitet wird, verwendet. Sie wurden mittels Nick-Translation mit Biotin-16-dUTP markiert (siehe 3.4), gefällt und analog den DNA-Proben im Protokoll für CGH zentrifugiert und in Formamid und Mastermix gelöst. Die YACs wurden anschließend 10 min bei 72°C denaturiert und für 20 min bei 37°C im Thermoblock vorhybridisiert. Für die Hybridisierung wurden 12 µl der YAC-Mischung verwendet.
Der Nachweis erfolgte in drei Runden. Zuerst wurden 150 µl aus der ersten Antikörpermischung (992 µl 1% BSA/Waschlösung V + 5 µl FITC-Avidin) auf ein Deckglas aufgetragen, mit dem Objektträger abgehoben und für 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger einmal kurz und dreimal 5 min in 4x SSC/0,1% Tween 20 (45°C) bei Raumtemperatur auf dem Schüttler im Dunkeln gespült. In der zweiten Runde wurden 150 µl aus der Mischung von 990 µl 1% BSA/Waschlösung V + 10 µl biotinyliertes Anti-Avidin aufgetragen. Inkubation und Spülen erfolgte analog der ersten Runde. In der letzten Runde wurden 150 µl der dritten Antikörpermischung (990 µl 1% BSA/Waschlösung V + 5 µl FITC-Avidin) aufgetragen. Inkubation und Spülung wie oben erwähnt.
Zuletzt wurden die Chromosomenpräparate mit DAPI-Gebrauchslösung 5 min gegengefärbt, mit Aqua bidest gewaschen und mit 24 µl Vectashield eingedeckt. Die Präparate lagerten bei +4°C.

3.6.2.3 FISH Auswertung

Die FISH-Präparate wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die digitale Bildanalyse und -dokumentation erfolgte mit dem Programm ISIS3 von Metasystems.

4. Ergebnisse

4.1 Hybridisierungen zur Überprüfung der CGH-Methode

Zur Überprüfung der CGH-Methode wurden Hybridisierungen an in der Abteilung Humangenetik der Universität Ulm vorrätigen Zellinien durchgeführt. Da der Karyotyp der verwendeten Linien durch frühere Untersuchungen ermittelt worden war, konnte nachgeprüft werden, ob die zu erwartenden Unterschiede in der Kopienzahl der Chromosomen oder Chromosomenabschnitte mit der vergleichenden genomischen Hybridisierung darstellbar sind.
Es wurden die Promyelozyten-Leukämie-Zellinie NB4 sowie die Ulmer Blasenkarzinom-Zellinie U-BLC2 untersucht.

4.1.1 Promyelozyten-Leukämie-Zellinie NB4

Bei der Promyelozyten-Leukämie-Zellinie NB4 lagen die folgenden vier Karyogramme vor:
82, X, -X, +1, +1, +1, +2, +2, +3, +4, +4, +5, +6, +7, +8, +8, +9, +9, +9, +11, +13, +13, +13, +15, +15, +16, +17, +17, +18, +21, +22, +mar

80, XX, +1, +2, +3, +4, +5, +7, +7, +7, +8, +9, +10, +10, +11, +11, +15, +15, +15, +15, +16, +16, +16, +17, +17, +22, +mar

80, XX, +1, +1, +1, +2, +2, +3, +4, +5, +5, +6, +7, +7, +7, -8, +9, +11, +11, +12, +12, +13, +15, +15, +16, +17, -18, +20, +20, -21, +22, +mar

79, XX, +1, +1, +1, +1, +2, +2, +3, +4, +6, +7, +7, +7, +8, -9, +11, +12, +13, +13, +15, +15, +15, +16, +16, +17, +17, +20, +21, +mar

Die Zellinie ist damit tri- bis tetrasom (siehe Abb. 4.1). Es wurden Gewinne bzw. Verluste von ganzen Chromosomen bzw. Chromosomenarmen erwartet. Das CGH-Profil ergab eindeutig einen Gewinn von Chromosom 2, 4p, 5p, 7, 9p, 10q, 11q, 12 und 15q sowie einen Verlust des Chromosomenarms 10p. Ein Zugewinn von 6p, 19p und 20 wurde als nicht eindeutig gewertet, weil die Profile die 1,25 Ratio nicht vollständig überschnitten (siehe Abb. 4.2).

4.1.2 Ulmer Blasenkarzinom-Zellinie U-BLC2

Von der Ulmer Blasenkarzinom-Zellinie U-BLC2 lagen die folgenden drei Karyogramme vor:
63, -X, -Y, -2, -2, +3, +3, +6, -7, +8, +8, +11, +11, -12, -13, -13, +15, -17, +20, +20, +20, +mar

62, +X, -Y, +2, +4, -5, -8, -9, -9, +15, +15, +16, +16, -17, -18, -18, +20, +20, -22, +mar

62, XY, +2, +3, +4, +4, +6, +6, +9, -14, -22, -22, +mar

Diese Zellinie ist durch Gewinne und Verluste von Chromosomen und einzelnen chromosomalen Regionen gekennzeichnet (siehe Abb. 4.3). Man erwartet ein sehr viel ausgeprägteres Profil bei der CGH-Untersuchung. Das CGH-Profil zeigte eindeutig –1p, +1q, +2q, -4p, -5q, +7, -8p, -9q, +10q11-q22, -10q23-qter, -11p, +12p, +12q11-q15, +14q, +15q, -17p, +17q11-q24, +18p, -18q, +19q11-q13, +20, -21q22, +22q und +Xp (siehe Abb. 4.4).

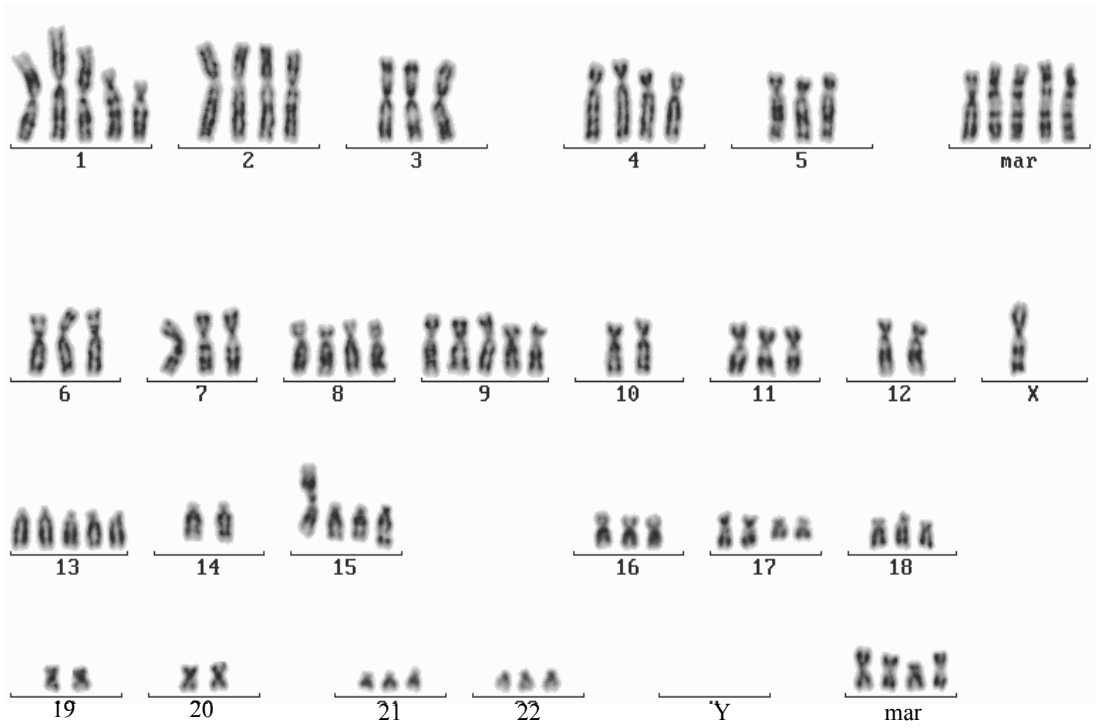


Abb. 4.1: Karyogramm der Promyelozyten-Leukämie-Zellinie NB4.

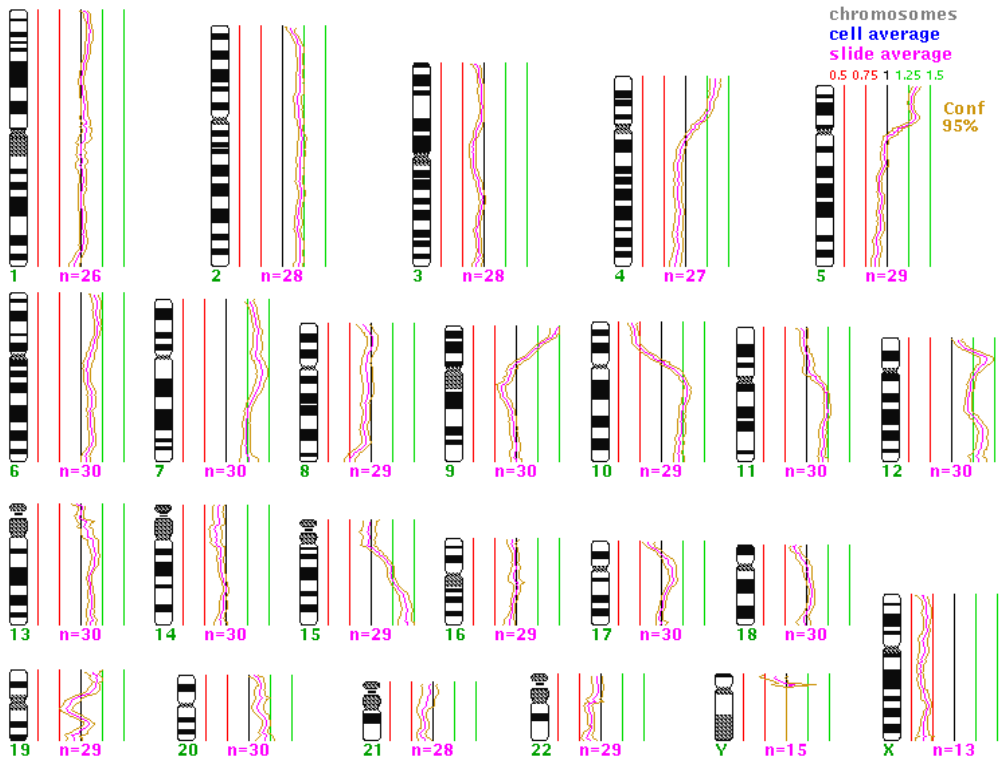


Abb. 4.2: CGH-Profil der Promyelozyten-Leukämie-Zellinie NB4.

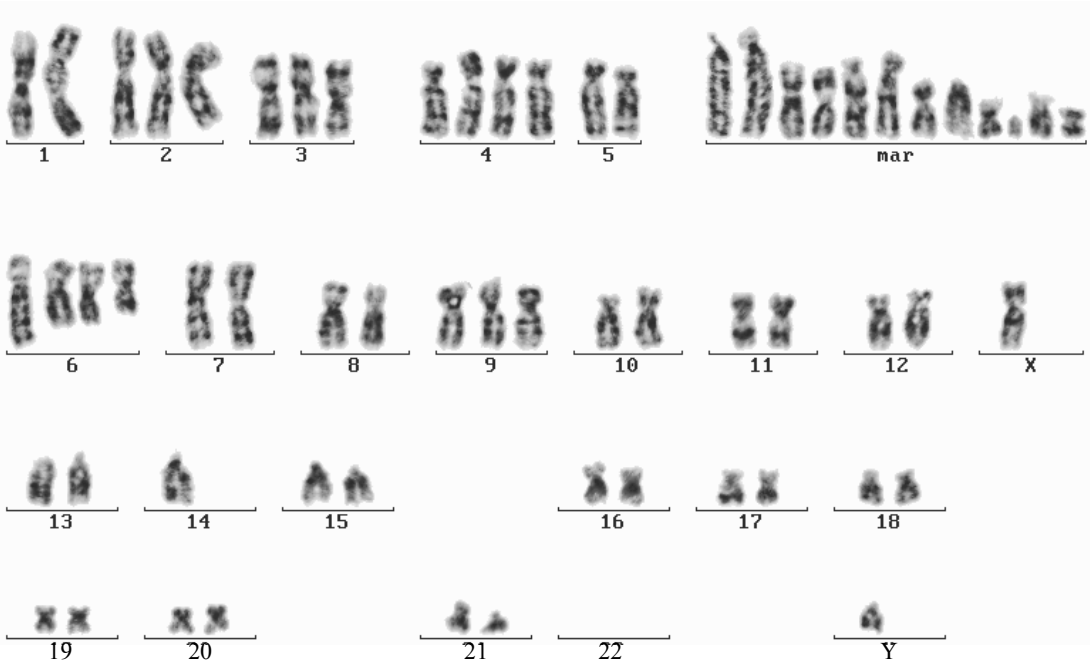


Abb. 4.3: Karyogramm der Ulmer Blasenkarzinom-Zellinie U-BLC2.

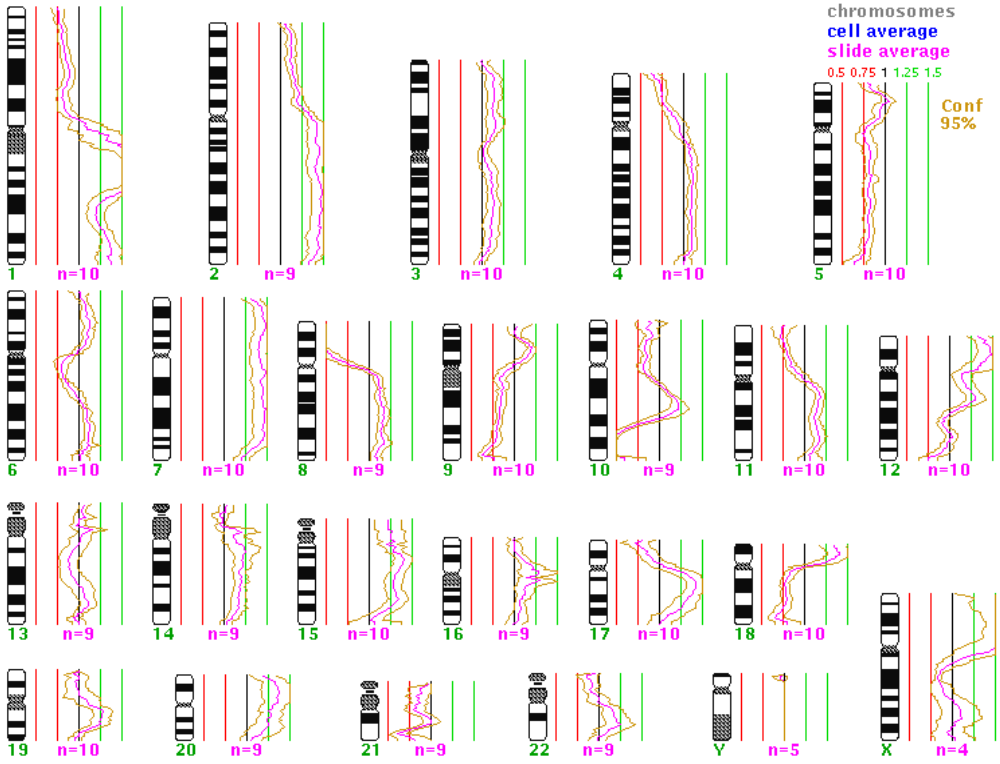


Abb. 4.4: CGH-Profil der Ulmer Blasenkarzinom-Zellinie U-BLC2.

4.2 Auswertungskriterien für die Interpretation der CGH-Profile

Die CGH-Präparate wurden mit dem Programm CytoVision 2.35 von Applied Imaging ausgewertet. Die wesentliche Aufgabe des Untersuchers ist, das Programm bei der Analyse des Karyotyps zu unterstützen. Mindestens 10 Metaphasen pro Fall wurden für die CGH-Auswertung ausgewertet. Wie in Abbildung 4.5 zu sehen ist, wurde von jeder Metaphase ein Bild der DAPI-Bänderung, ein Bild der Hybridisierung der Referenz-DNA (Texas-Rot) und ein Bild der Hybridisierung der Tumor-DNA (FITC) angefertigt. Die digitale Bildanalyse ermöglichte eine Überlagerung und Auswertung der Hybridisierung in Form eines Profils.

Außerdem erstellt das Programm aus den Karyogrammen Gesamtprofile, die den Durchschnittswert aller analysierten Metaphasen widerspiegeln. Die schwarze Mittellinie symbolisiert die Ratio 1,0, bei der Tumor- und Referenz-DNA im gleichen Verhältnis vorliegen. Werden zwei genetisch normale DNAs miteinander hybridisiert, zeigen alle Autosomen Profile, die auf der 1,0 Linie angeordnet sind.

Die beiden Linien links der Mittellinie stellen die Fluoreszenzquotienten 0,5 und 0,75 dar, die beiden Linien rechts der Mittellinie die Fluoreszenzquotienten 1,25 und 1,5.

CGH-Profile, die mindestens eine Ratio von 0,75 (bei Verlust) bzw. 1,25 (bei Gewinn) ergaben, wurden als eindeutiger Hinweis auf Aberrationen angesehen. CGH-Profile, die Abweichungen von der 1,0 Ratio zeigten, den festgelegten Fluoreszenzquotienten von 0,75 bzw. 1,25 aber nicht erreichten, wurden als nicht eindeutige, grenzwertige Ergebnisse eingestuft. Die Bereiche des zentromerischen Heterochromatins wurden in die Analyse nicht einbezogen.

Die Profile wurden nicht in quantitativer Hinsicht ausgewertet, weil davon ausgegangen werden mußte, dass die Leukämieproben neben Tumorzellen im unbekannten Mengenverhältnis normale Zellen enthielten.

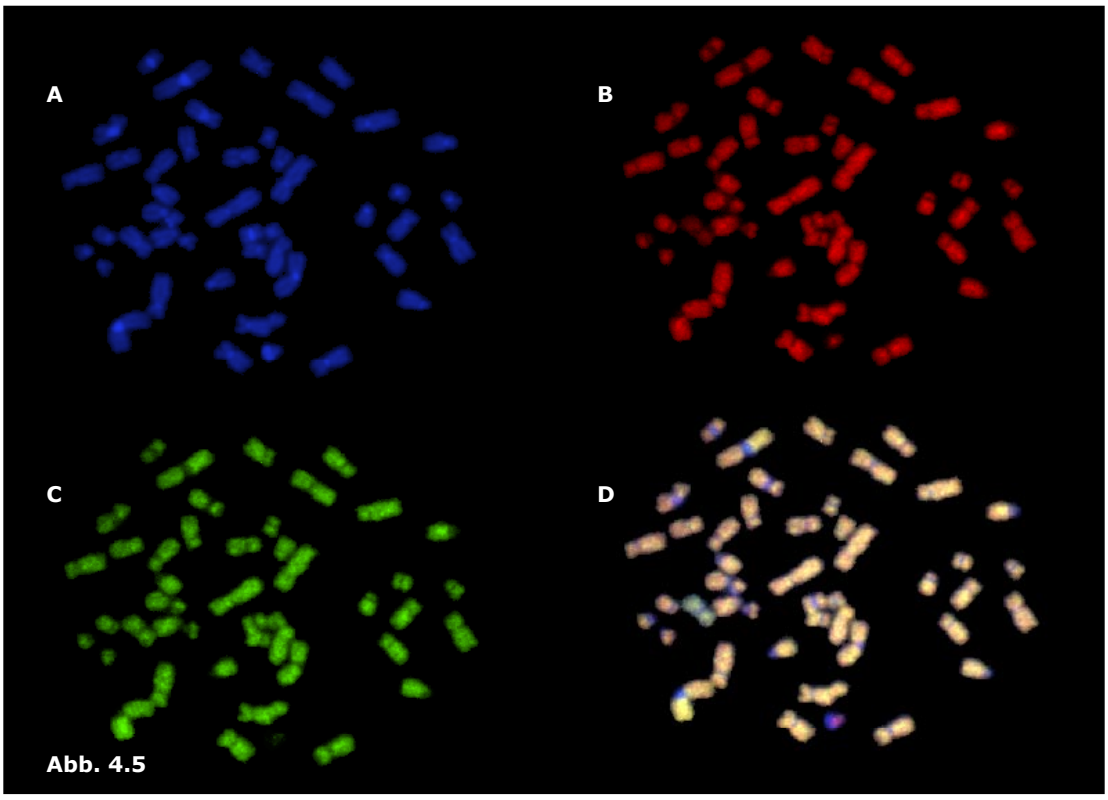
Abb. 4.5:

A: DAPI-Bänderung der Chromosomen.

B: Hybridisierung der Referenz-DNA.
Die Metaphase zeigt eine Färbung mit Texas-Rot.

C: Hybridisierung der Tumor-DNA.
Die Metaphase zeigt eine Färbung mit FITC.

D: Überlagerung von A, B und C.
Überrepräsentierte Chromosomenabschnitte stellen sich als stärkere Grünfärbung dar, unterrepräsentierte Abschnitte als stärkere Rotfärbung. Unauffällige Regionen zeigen eine gelbliche Färbung.



Da Heterochromatin, perizentromerische Regionen und bestimmte Telomerregionen aufgrund der hier vorkommenden repetitiven Sequenzen Besonderheiten im menschlichen Genom darstellen, zeigen die CGH-Profile in diesen Bereichen oftmals Abweichungen der 1,0 Ratio (Kallioniemi et al., 1994). Anomalien dieser Stellen wurden deshalb unter Vorbehalt bewertet und zum Teil aus der Auswertung herausgenommen.

Bei der vergleichenden genomischen Hybridisierung empfiehlt es sich, zur internen Kontrolle jeweils männliche (XY) gegen weibliche (XX) DNA zu hybridisieren. Die CGH-Profile des X- und Y-Chromosoms stellen sich somit als Gewinn bzw. Verlust dar. Dieses interne Normmaß der Hybridisierung sollte bei dem Fluoreszenzquotienten 1,5 bzw. 0,5 liegen. Die Ratio der Gonosomen gibt Auskunft über das Verhältnis der Fluoreszenzintensität zwischen Chromosomen und Hintergrund und erlaubt damit Rückschlüsse über die Dynamik der Hybridisierung.

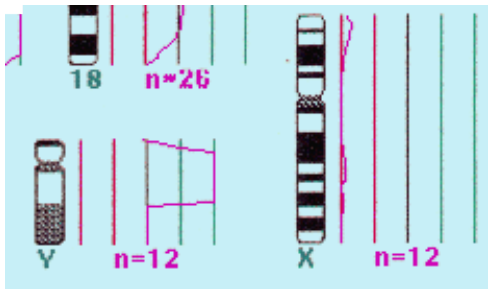


Abb. 4.6: Hybridisierung einer männlichen (XY) Digoxigenin-11-dUTP markierten Tumor-DNA gegen eine weibliche (XX) Biotin-16-dUTP markierte Referenz-DNA. Das Y-Chromosom stellt sich als Gewinn dar, das X-Chromosom als Verlust.

4.3 Klinische Daten der CML-Patienten

Zur Überprüfung der zytogenetischen Krankheitsbeurteilung wurden die Angaben zur klinischen Einweisungsdiagnose, zur klinischen Diagnose zum Zeitpunkt der zytogenetischen Untersuchung und zur zuletzt gestellten klinischen Diagnose herangezogen. Die aufgelisteten Befunde

der Patienten beschränken sich auf Angaben zur chronisch-myeloischen Leukämie.

Die Informationen der Patienten Nummer 1 – 7, 18 – 20, 22 - 25 sowie 27 stammen aus den Unterlagen des Universitätsklinikums Ulm. Die Befunde von Patient Nummer 9 wurden freundlicherweise von der Münchner Onkologischen Praxis Dr. Tigges/Dr. Boehning, von Patient Nummer 13 von den Städtischen Kliniken Kassel, von Patient Nummer 14 vom Caritas-Krankenhaus Lebach, von Patient Nummer 15 vom Städtischen Krankenhaus München-Schwabing, von Patient Nummer 16 vom Kreiskrankenhaus Bad Hersfeld und von Patient Nummer 26 vom Lukas-Krankenhaus in Bünde zur Verfügung gestellt. Die klinischen Angaben zu Patient Nummer 8, 10, 11, 12, 17 und 21 waren nicht zugänglich.

Tab. 4.1: Klinische Daten der CML-Patientenserie.

Nr.	**Klinische Einweisungs-diagnose**	**Klinische Diagnose zum Zeitpunkt der zyto-genetischen Untersuchung**	**Zuletzt gestellte klinische Diagnose**
1	ED 03/98: CML in chron. Phase, Ph-pos.	13.03.98: CML in chron. Phase	07/99: SZT 11/99: CML in chron. Phase nach SZT
2	ED 98: CML in chron. Phase	22.04.98: CML in chron. Phase	02/00: CML in chron. Phase
3	ED 93: CML in chron. Phase	15.07.98: CML in chron. Phase	02/00: CML in chron. Phase
4	ED 98: CML in chron. Phase	11.08.98: CML in chron. Phase, Ph-pos.	02/00: CML in chron. Phase
5	ED 10/83: CML in chron. Phase, komplexe Ph-Translokation	25.07.83: CML in chron. Phase, komplexe Ph-Translokation	06/84: Exitus letalis; CML in chron. Phase
6	ED 8/83: CML in chron. Phase, Ph-pos.	01.09.88: CML in Transformationsphase, komplexe Ph-Translokation	02/90: Exitus letalis; myeloischer BS seit 09/89

7	ED 04/84: CML in chron. Phase	22.11.84: CML in akzel. Phase	02/85: KMT 08/85: beginnender BS 09/85: verstorben im BS
9	ED ?: Leukozytose	26.10.89: CML im BS	?: verstorben
13	ED ?: Verdacht auf Systemerkrankung	10.02.98: CML in chron. Phase	?: CML in chron. Phase
14	ED 07/95: CML in chron. Phase, Ph-pos.	13.05.98: CML Ph-pos.	02/00: CML Ph-pos. seit 2 Jahren in Remission
15	ED 11/98: Myeloproliferatives Syndrom, DD: CML	24.11.98: CML, kein Anhalt für BS	keine Angaben
16	ED 96: CML	16.09.97: CML	01/00: CML in chron. Phase
18	ED 09/81: CML	16.03.83: CML Trans-formationsphase mit BS, Blasten- und Promyelo-zytenanteil >50%; nach Chemotherapie nur Teilremission	keine Angaben
19	ED 08/82: CML	18.05.83: CML mit BS 12/83: partielle Remission nach Chemotherapie 03/84: erneuter BS	07/83: Exitus letalis bei erneutem BS (8/82)
20	ED 01/80: CML, Ph-pos.	27.05.83: CML in Transformationsphase mit myeloidem BS	07/83: Exitus letalis unter Sepsis bei rasch progredienter Grunderkrankung; CML in BS
22	ED 04/81: CML, Ph-pos.	22.11.84: CML in Transformationsphase, beginnender BS	01/84: Exitus letalis; myeloischer BS bei CML
23	ED 12/83: CML, Ph-pos.	03.12.87: CML im BS	03/87: Exitus letalis im BS
24	ED 02/87: CML in chron. Phase	03.11.87: CML im BS	12/87: Exitus letalis im myeloiden BS

25	ED 02/83: CML in chron. Phase, Ph-pos.	07.12.87: CML in akzel. Phase, zunehmende Zahl an Blasten	12/87: Exitus letalis
26	ED ?: CML im BS	21.12.98: lymphatisch determinierter BS bei CML	?: lymphatisch determinierter BS bei CML
27	ED 02/85: CML in chron. Phase	03/86: KMT 22.10.90: CML im BS	01/91: BS konnte in 10/90 nicht verifiziert werden; aber fortgeschrittene akzel. Phase; 03/91: Exitus letalis mit 23% Blasten

Abkürzungen:

?	Daten nicht bekannt
akzel. Phase	akzelerierte Phase
BS	Blastenschub
chron. Phase	chronische Phase
DD	Differentialdiagnose
ED	Erstdiagnose
KMT	allogene Knochenmarktransplantation
Ph-pos.	Philadelphia-Chromosom positiv
SZT	Stammzelltransplantation

Bei den Patienten Nummer 9, 13, 14 und 16 stimmen klinische und zytogenetische Diagnose nicht vollständig überein.

Zur Untersuchung mittels CGH wurde der Patientenserie die zytogenetische Diagnostik zugrundegelegt.

4.4 CGH-Analyse in verschiedenen Krankheitsphasen der Chronisch-Myeloischen Leukämie

Für die folgenden Ausführungen wird auf die zytogenetische Diagnostik verwiesen, die in Abschnitt 2.8 dieser Arbeit aufgelistet worden ist.

4.4.1 CGH-Analyse in der chronischen Phase (Ph-positiv)

Die chronische Phase der chronisch-myeloischen Leukämie ist neben den üblichen klinischen Parametern durch den Nachweis des Philadelphia-Chromosoms gekennzeichnet. In dieser Arbeit wurden vier Fälle chronischer CML mit klassischer Translokation t(9;22)(q34;q11) mittels CGH untersucht.
Da die balanzierte Translokation nicht nachgewiesen werden kann, zeigten die CGH-Profile erwartungsgemäß keine eindeutigen Aberrationen. Bei Patient Nummer 3 wurden die Profilabweichungen der Chromosomen 15, 19 und 21 nicht als eindeutiger Gewinn gewertet, da für das X-Chromosom eine nicht ausreichende Dynamik beobachtet wurde. Bei Patient Nummer 2 und 4 wurden die Profile ebenfalls als grenzwertig eingestuft, weil entweder die 0,75 bzw. 1,25 Ratio nicht deutlich genug erreicht wurde oder die Abweichungen im Telomerbereich lagen.

Dennoch wurden folgende Aberrationen bestimmt:
Patient Nummer 2: +21q22
Patient Nummer 3: +15q, +19p und +21q22
Patient Nummer 4: -9q34 und –19p

4.4.2 CGH-Analyse bei CML mit komplexen Translokationen

Da bei der CML zytogenetisch komplexe Translokationen beobachtet werden können, wurden in dieser Arbeit zwei Fälle für die CGH-Analyse ausgewählt.

Bei Patient Nummer 5, der klinisch der chronischen Phase zuzurechnen ist, ergab sich entsprechend dem vorliegenden Karyotyp keine Abweichung im CGH-Profil.
Bei Patient Nummer 6, der klinisch bereits zu diesem Zeitpunkt in der akzelerierten Phase war, fiel ein Gewinn von Chromosom 2p14-pter auf, der zytogenetisch nicht beschrieben worden war. Zur Überprüfung dieses im CGH-Profil nicht eindeutigen Befundes wurde eine FISH-Analyse durchgeführt (siehe Abb. 4.7).

4.4.3 CGH-Analyse in der akzelerierten Phase ohne Blastenschub

Für die Diagnose „akzelerierte Phase bei CML„ gelten an der Universität Ulm standardisierte klinische und hämatologische Kriterien. Ein Patient mit CML muß eines oder mehrere der folgenden Merkmale aufweisen: 20% oder mehr Basophile in Blut oder Knochenmark, 30% oder mehr (aber weniger als 50%) Blasten und Promyelozyten in Blut oder Knochenmark, 15% oder mehr (aber weniger als 30%) Blasten in Blut oder Knochenmark, ein Hämoglobinspiegel unter 7 g/dl unabhängig von Blutungen, Thrombozyten größer oder gleich 2000 x 10^9/l oder weniger als 100 x 10^9/l unabhängig von einer Chemotherapie und eine zytogenetisch klonale Evolution (Griesshammer et al., 1996).
Die zytogenetische Diagnose „akzelerierte Phase„ wird gestellt, wenn der Patient neben dem Ph-Chromosom noch weitere Aberrationen aufweist.

Bei der zytogenetischen Diagnostik war neben einem überwiegenden Klon mit einer einfachen Translokation t(9;22)(q34;q11) ein Klon mit einem zusätzlichen Chromosom 22 bestimmt worden (Tabelle 2.1). Patient Nummer 7 zeigte jedoch keine Veränderungen im CGH-Profil.
Patient Nummer 8 zeigte die nach dem Karyotyp zu erwartenden Aberrationen +8 (Ratio 1,25) und Isochromosom i(17q). Zusätzlich fielen ein Gewinn von 9q und ein Gewinn der Region 1p32-p36 auf. Eine

im Karyogramm beschriebene Veränderung von Chromosom 22 war als Zugewinn von 22q11-12 zu sehen, mußte aber wegen der Nähe zum Zentromerbereich als nicht eindeutig eingestuft werden. Ebenso wurden ein Gewinn von 6p21-p22, 12q22-q24, 19p11-p12, 19q11-q12 und 20q11-q12 wegen grenzwertiger Ratio oder Auftreten im Telomerbereich als nicht eindeutig vermerkt (siehe Abb. 4.8).

Bei Patient Nummer 9 wurde ein Gewinn von Chromosom 8 bestimmt. Ein in der Zytogenetik beschriebener Gewinn von Chromosom 22 und eine Deletion del(22)(q11) konnte mittels CGH nicht ermittelt werden. Auch hier waren zwei verschiedene Klone in etwa gleichem Mengenverhältnis beschrieben worden (Tabelle 2.1).

Patient Nummer 10 zeigte einen wie in der Zytogenetik beschriebenen eindeutigen Gewinn von Chromosom 8 mit einer CGH-Ratio von 1,5. Abweichungen bei Chromosom 19 und 20 lagen zwischen der Ratio 1,0 und 1,25 bzw. zwischen der Ratio 0,75 und 1,0 und mußten daher als nicht eindeutiger Gewinn von Chromosom 19 bzw. Verlust von Chromosom 20 verzeichnet werden. Eine Trisomie 19 war auch in der Zytogenetik beschrieben worden. Ein Verlust von 9q34 fiel auf, wurde jedoch wegen den in der Literatur häufig beschriebenen Abweichungen im Telomerbereich als grenzwertig angesehen.

Das CGH-Profil von Patient Nummer 11 zeigte keinerlei Aberrationen. Eine im Karyogramm vermerkte Deletion del(19)(p11) war nicht nachweisbar.

Das CGH-Profil von Patient Nummer 12 zeigte einen als nicht eindeutig zu wertenden Verlust am kurzen Arm von Chromosom 1 und einen Verlust von Chromosom 19. Die Ergebnisse wurden als grenzwertig eingestuft, weil sie im Telomerbereich lagen und die 0,75 Ratio nicht deutlich erreichten. Die zytogenetisch beschriebenen Anomalien +8, +9, del(11)(q23), -D und +19 wurden nicht beobachtet.

Das CGH-Profil von Patient Nummer 13 war ebenfalls ohne Auffälligkeiten, obwohl zytogenetisch in einem Teil der Zellen eine Trisomie 8 bestimmt worden war (Tabelle 2.1).

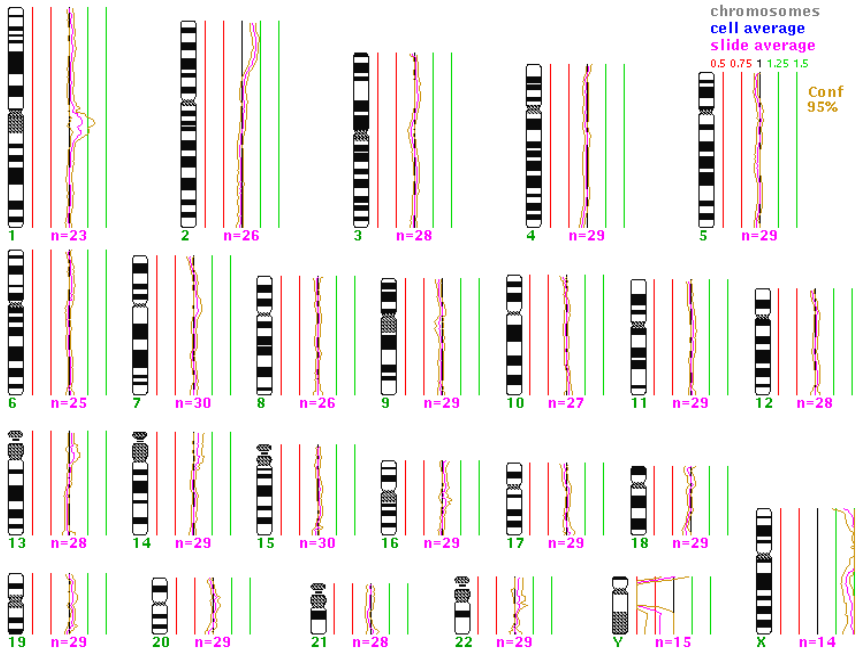


Abb. 4.7: CGH-Profil von Patient Nummer 6.

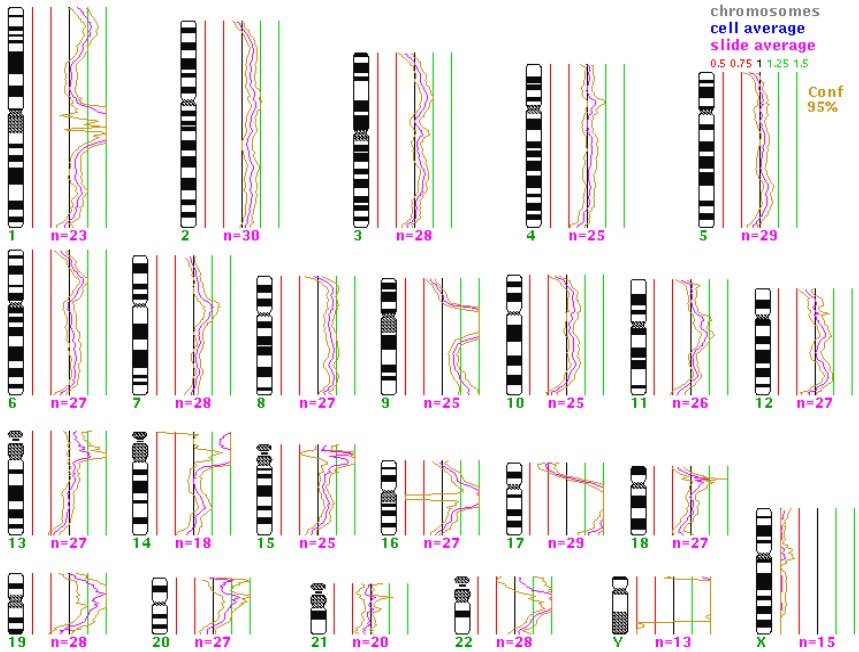


Abb. 4.8: CGH-Profil von Patient Nummer 8.

Die CGH-Auswertung von Patient Nummer 14 ergab eindeutig einen Gewinn von 1q. Die vorhergehende Zytogenetik beschrieb lediglich zusätzliche Aberrationen ohne genauere Angaben (siehe Abb. 4.9).

Bei Patient Nummer 15 ergab sich gemäß der zytogenetischen Diagnostik eine Trisomie 8.
Patient Nummer 16 zeigte eine Deletion del(1)(p32-pter), die aufgrund der häufig vorkommenden Abweichungen im Telomerbereich bei CGH-Auswertungen als nicht eindeutig eingestuft wurde. Eine Deletion del(19)(p13) wurde wegen des undeutlichen CGH-Profils ebenfalls als grenzwertig eingestuft. Die nach dem Karyotyp zu erwartenden Aberrationen von Chromosom 9 und 13 konnten nicht dargestellt werden.

4.4.4 CGH-Analyse in der akzelerierten Phase mit Blastenschub

Die klinische Diagnose „CML in der Blastenkrise„ wird an der Universität Ulm bei Anwesenheit von ≥30% Blasten im peripheren Blut oder Knochenmark gestellt (Griesshammer et al., 1996).

Bei Patient Nummer 17 ergab das CGH-Profil nicht eindeutige Ergebnisse für einen Gewinn der Region bzw. des Chromosoms 1p32-p35, 9q34, 17, 19p13 und 22q11-q13. Die Abweichungen wurden deshalb als grenzwertig gewertet, weil die Aberrationen entweder im Telomerbereich lagen oder die Ratio 1,25 nicht deutlich genug erreicht wurde. Im Karyogramm wurde außer einem zweiten Philadelphia-Chromosom keine dieser Veränderungen erwähnt. Die beschriebenen Veränderungen an Chromosom 9 und 22 sind mit einem zweiten Philadelphia-Chromosom vereinbar.
Wie in der zytogenetischen Auswertung beschrieben, zeigte Patient Nummer 18 deutlich eine Trisomie 8 und ein zusätzliches Isochromosom i(17q) (siehe Abb. 4.10).

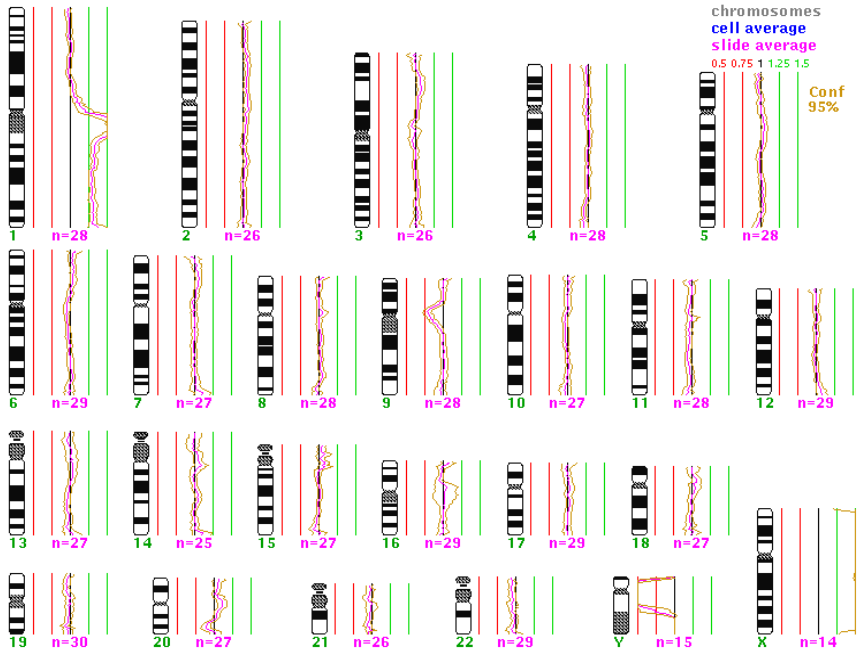


Abb. 4.9: CGH-Profil von Patient Nummer 14.

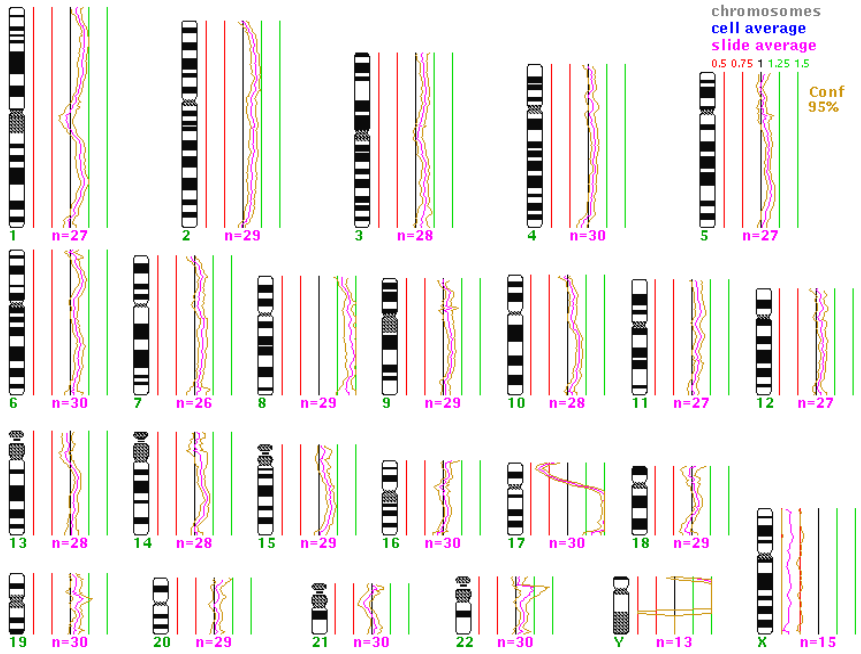


Abb. 4.10: CGH-Profil von Patient Nummer 18.

Bei Patient Nummer 19 ergab das CGH-Profil einen Verlust von 6p22-pter, einen Gewinn von 6p11-p21 und 6q sowie einen Zugewinn am langen Arm von Chromosom 8 (+8q22-qter). Im Karyogramm war eine Trisomie 8 beschrieben worden, eine Veränderung an Chromosom 6 dagegen nicht (siehe Abb. 4.11).

Patient Nummer 20 wies eine Trisomie 8 und einen Gewinn von Chromosom 21 (+21q21) auf. In der Zytogenetik war ein zusätzliches Chromosom der C-Gruppe notiert worden.

Patient Nummer 21 zeigte im CGH-Profil die meisten eindeutigen Aberrationen dieser Serie. Eine Trisomie 6, 7, 8, 10, 13q und 21q wurden im Karyogramm beschrieben und waren auch bei der CGH-Analyse nachweisbar. Das Profil von Chromosom 19 zeigte einen als grenzwertig zu wertenden Zugewinn, da das Profil die 1,25 Ratio nicht vollständig erreichte. Die in der Tumorzytogenetik beschriebenen Zugewinne von Chromosom 4 und 18 waren bei der CGH-Darstellung unauffällig. Ein Verlust im Telomerbereich 1p32-pter war im CGH-Profil nicht eindeutig (siehe Abb. 4.12).

Das CGH-Profil von Patient Nummer 22 zeigte übereinstimmend mit dem zytogenetischen Befund eine Trisomie 8 (Ratio >1,25). Daneben fiel ein nicht beschriebener Verlust von Chromosom 19 auf. Ein Verlust am kurzen Arm von Chromosom 1 (del(1)(p32-pter)) und 17 (del(17)(p)) und am langen Arm von Chromosom 9 (del(9)(q34)) sowie ein Gewinn von 6q13-q23 und ein Verlust von 22q wurde im CGH-Profil nicht eindeutig dargestellt. Die Aberrationen lagen im Telomerbereich oder erreichten die festgelegte Ratio von 0,75 bzw. 1,25 nicht.

Das Profil von Patient Nummer 23 zeigte im Gegensatz zum Karyotyp keinerlei Aberrationen. Alle Autosomen zeigten eine CGH-Ratio von 1,0.

Patient Nummer 24 zeigte deutlich einen Zugewinn des ganzen Chromosoms 8 (CGH-Ratio >1,25). Bei Chromosom 17 fiel ein Gewinn der Region 17q24-qter auf. Bei Chromosom 1, 9, 12 und 22 lagen Veränderungen im Telomerbereich vor und wurden unter Vorbehalt als Gewinne der Regionen 1p32-p35, 9q34, 12q24 und 22q11-12 gewertet.

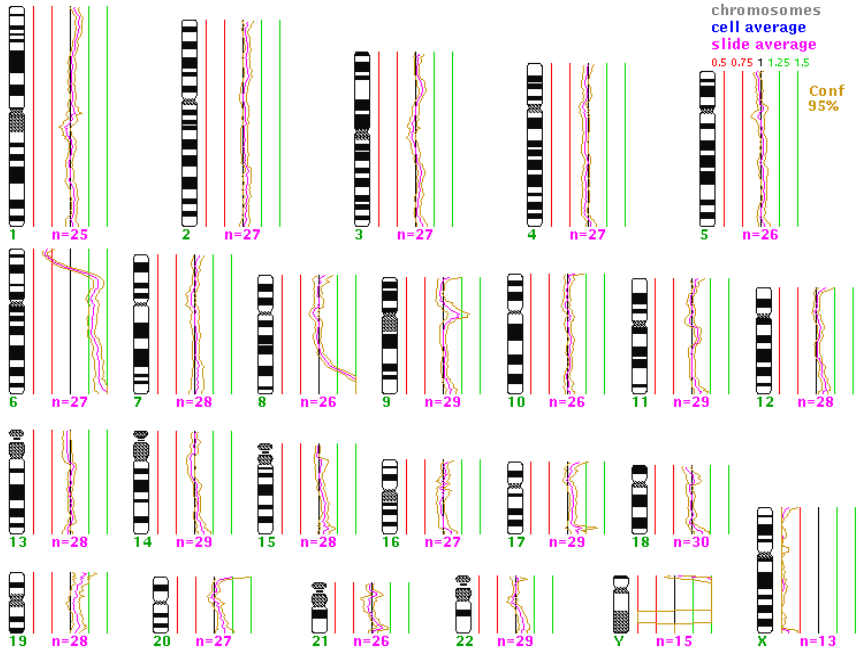


Abb. 4.11: CGH-Profil von Patient Nummer 19.

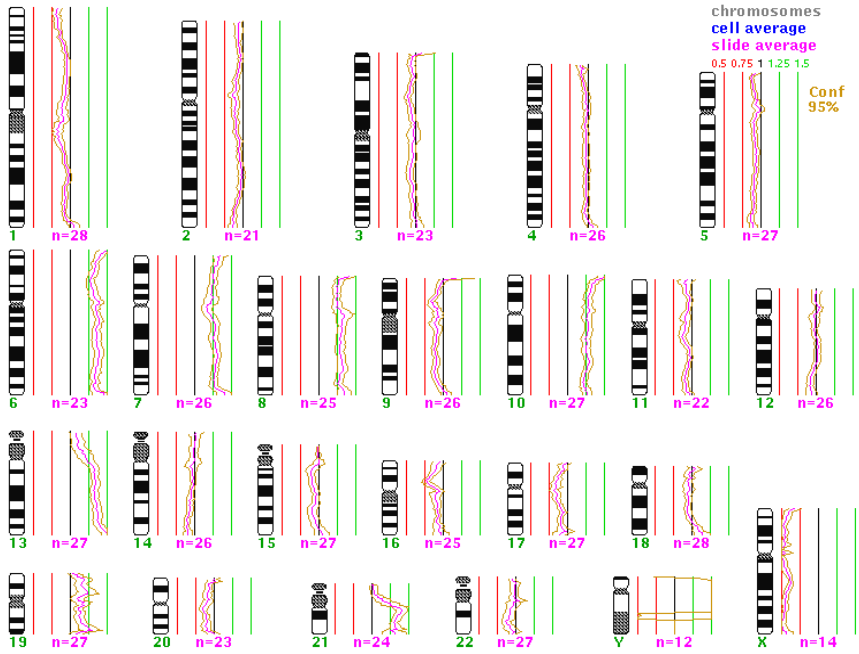


Abb. 4.12: CGH-Profil von Patient Nummer 21.

In der vorausgegangenen Zytogenetik war eine Trisomie 8 und ein Gewinn von Chromosom 22 beschrieben worden, die sich auch in der

CGH wiederfanden; eine Insertion ins(21)(q11) und eine Deletion del(22)(q11) wurden dagegen nicht beobachtet.

Patient Nummer 25 zeigte einen Gewinn von Chromosom 8 (CGH-Ratio bei 1,5), ein Isochromosom i(17q) und einen Gewinn von Chromosom 19. Neben der Trisomie 8 war in der Zytogenetik eine Trisomie 22 und eine Deletion del(22)(q11) beschrieben worden, die durch die CGH-Analyse nicht bestätigt werden konnten (siehe Abb. 4.13).

Bei Patient Nummer 26 fand sich als Aberration eine Deletion 19 und ein Gewinn von Chromosom 20. Das Profil von Chromosom 9 zeigte einen nicht eindeutigen Verlust der Regionen 9p21-pter und 9q21-33. Die Aberrationen wurden als grenzwertig bewertet. Keine dieser Veränderungen war in der zytogenetischen Diagnostik beschrieben worden (siehe Abb. 4.14).

Obwohl durch die Zytogenetik bei Patient Nummer 27 fünf Klone mit verschiedenen Aberrationen beschrieben worden waren, zeigte das CGH-Profil nur einen als nicht eindeutig zu wertenden Gewinn im Telomerbereich bei 1p32-p36.

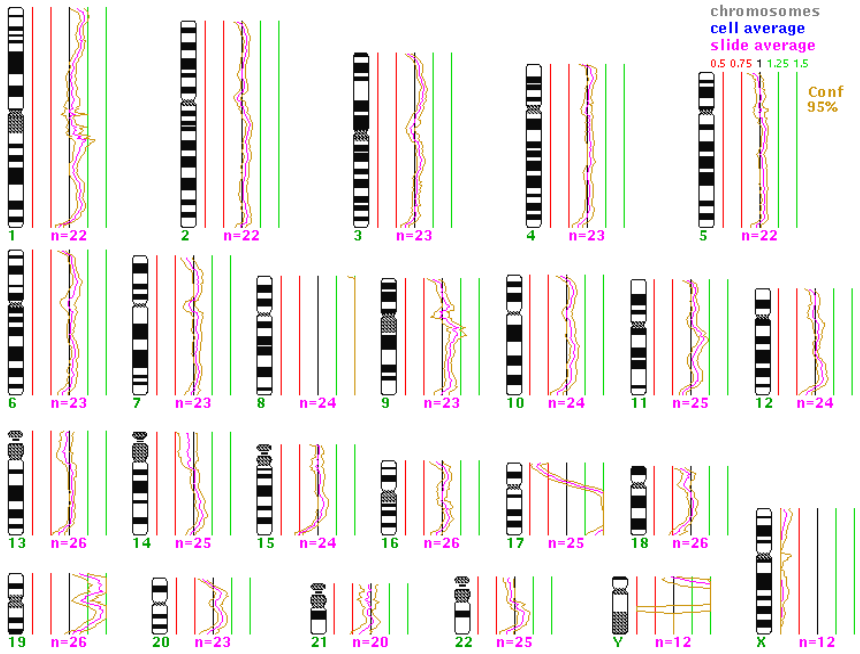


Abb. 4.13: CGH-Profil von Patient Nummer 25.

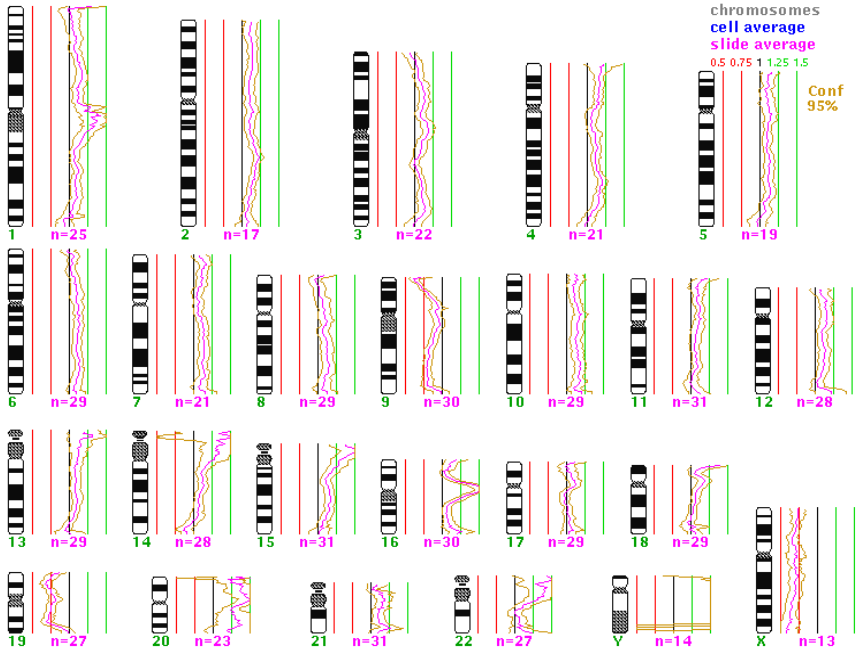


Abb. 4.14: CGH-Profil von Patient Nummer 26.

4.4.5 Übersichtstabelle für Gewinne und Verluste

Tab. 4.2: Übersicht der CGH-Ergebnisse der 27 untersuchten CML-Patienten.

	CGH Ergebnisse			
	eindeutige Ergebnisse		**grenzwertige Ergebnisse**	
Nr.	**Gewinne**	**Verluste**	**Gewinne**	**Verluste**
1				
2			21q22	
3			15q, 19p, 21q22	
4				9q34, 19p
5				
6	2p14-pter			
7				
8	1p32-p36, 8, 9q, 17q	17p	6p21-p22, 12q22-q24, 19p11-p12, 19q11-q12, 20q11-q12, 22q11-q12	
9	8			
10	8		19	9q34, 20
11				
12				1p32-pter, 19
13				
14	1q			
15	8			
16				1p32-pter, 19p13
17			1p32-p35, 9q34, 17, 19p12, 22q11-q13	
18	8, 17q	17p		
19	6p11-p21, 6q, 8q22-qter	6p22-pter		
20	8, 21q21-qter			
21	6, 7, 8, 10, 13q, 21q		19	1p32-pter
22	8	19	6q13-q23	1p32-pter, 9q34, 17p, 22q

23				
24	8, 17q24-qter		1p32-p35, 9q34, 12q24, 22q11-q12	
25	8, 17q, 19	17p		
26	20	19		9p21-pter, 9q21-q33
27			1p32-p36	

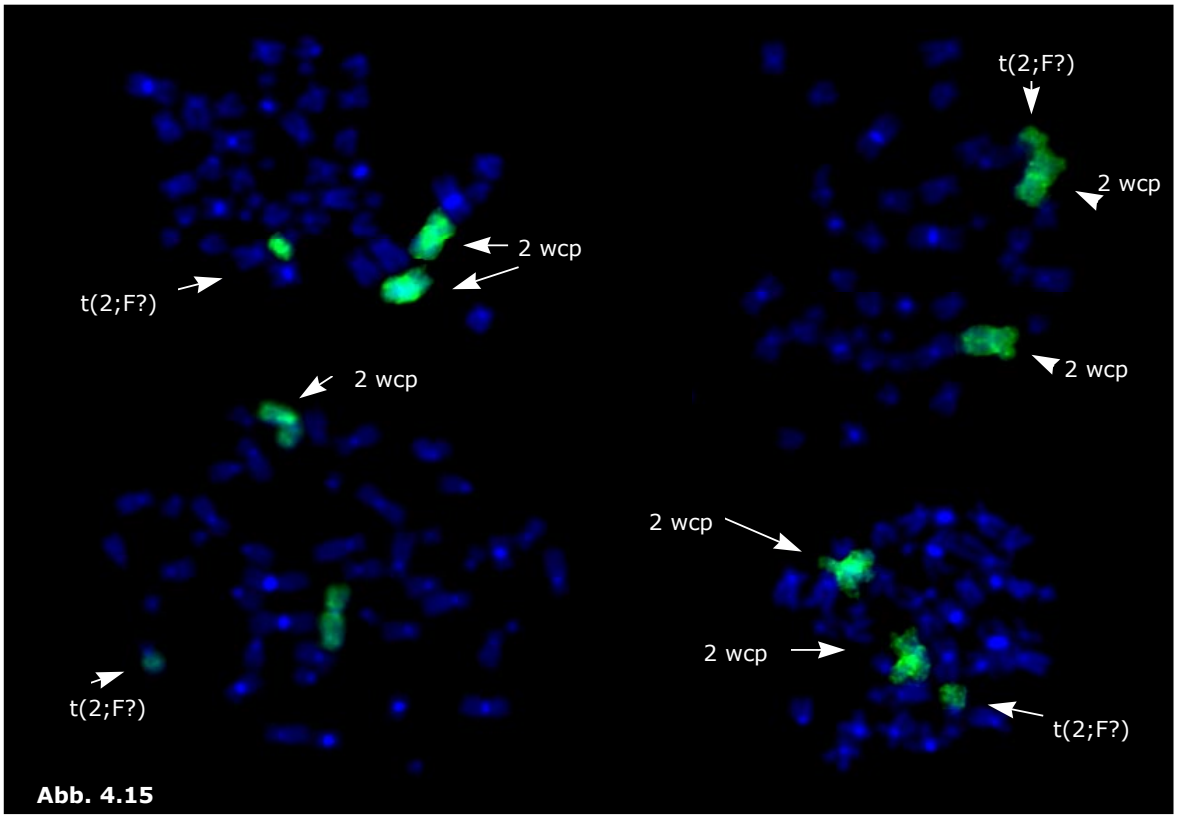
4.5 FISH-Analyse zur Überprüfung grenzwertiger CGH-Profile

Im Anschluß an die CGH-Untersuchungen wurden bei den Patienten Nummer 6, 14 und 19 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen, FISH, durchgeführt, um die CGH-Befunde zu überprüfen. Die FISH-Analysen mußten auf diese drei Fälle beschränkt werden, weil von den anderen Patienten keine Blut- bzw. Knochenmark-Proben mehr zur Verfügung standen.

4.5.1 Patient Nummer 6

Bei Patient 6 war durch CGH ein Gewinn von Chromosom 2p14-pter nachgewiesen worden, während die zytogenetische Diagnostik verschiedene andere Aberrationen zeigte, jedoch keinen Gewinn 2p14-pter. Bei Patient Nummer 6 wurde deshalb eine wcp (whole chromosome paint)-Sonde für Chromosom 2 eingesetzt, um den Gewinn von 2p14-pter nachzuprüfen. Die FISH-Analyse zeigte deutlich zwei homologe normale Chromosomen 2 und einen weiteren markierten Chromosomenabschnitt auf einem nicht näher identifizierbaren Chromosom. Vermutlich handelte es sich um eine Translokation mit einem Chromosom der F-Gruppe (siehe Abb. 4.15).

Abb. 4.15: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung bei Patient Nummer 6 mit einer wcp-Sonde für Chromosom 2 (grün).



4.5.2 Patient Nummer 14

Die CGH-Analyse hatte einen Zugewinn von Chromosom 1q ergeben, der mit der konventionellen Zytogenetik nicht beobachtet wurde. Bei Patient Nummer 14 wurde eine Hybridisierung mit den wcp-Proben für Chromosom 1 und 9 durchgeführt. Da Chromosom 9 bezüglich des Philadelphia-Chromosoms bei der CML eine besondere Rolle spielt, wurde diese Sonde ausgewählt, um eine möglicherweise vorhandene Translokation mit +1q nachzuweisen.

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung ergab ein normales und ein dizentrisches Chromosom 1. Der verdoppelte lange Chromosomenarm 1q war direkt an den normalen Chromosomenarm 1q angefügt. In der FISH-Analyse zeigten sich bei diesem Chromosom 1 zwei Zentromere.

Eine Beteiligung von Chromosom 9 war nicht nachzuweisen (siehe Abb. 4.16).

4.5.3 Patient Nummer 19

Bei Patient Nummer 19 waren durch die konventionelle zytogenetische Diagnostik zwei Klone beobachtet worden, von denen einer eine Trisomie 8 zeigte. Durch die CGH-Analyse wurde ein Verlust von 6p22-pter, ein Gewinn von 6p11-p21 sowie ein Gewinn von 6q aufgedeckt. Zum Nachweis dieser Aberrationen wurde eine Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit der wcp-Sonde für Chromosom 6 und zwei YACs aus der Region 6p23 durchgeführt. Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung zeigte drei Signale für Chromosom 6, aber nur eines der Chromosomen 6 zeigte ein Signal für den Bereich 6p23 (siehe Abb. 4.17).
Um den Gewinn von 8q22-qter zu analysieren, wurde die wcp-Sonde für Chromosom 8 gemeinsam mit der Telomer-Sonde für 8q eingesetzt. Mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung wurden pro Metaphase zwei homologe Chromosomen Nummer 8 und vier bis fünf Telomerregionen von 8q nachgewiesen. Es handelte sich vermutlich um Translokationen der Telomerregion 8q mit Chromosomen der C-Gruppe (siehe Abb. 4.18).

Abb. 4.16: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung bei Patient Nummer 14 mit wcp-Sonden für die Chromosomen 1 (rot) und 9 (grün).

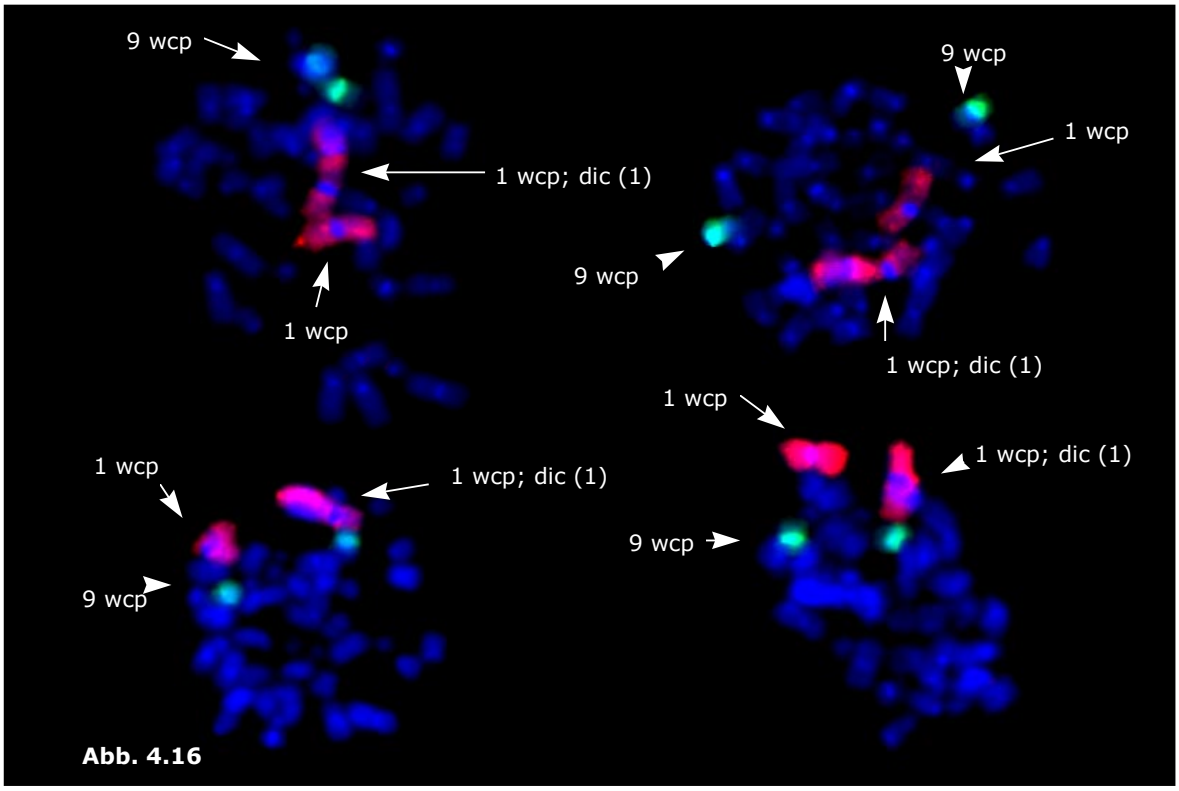


Abb. 4.17: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung bei Patient Nummer 19 mit einer wcp-Sonde für Chromosom 6 (rot) und zwei YACs aus der Region 6p23 (grün).

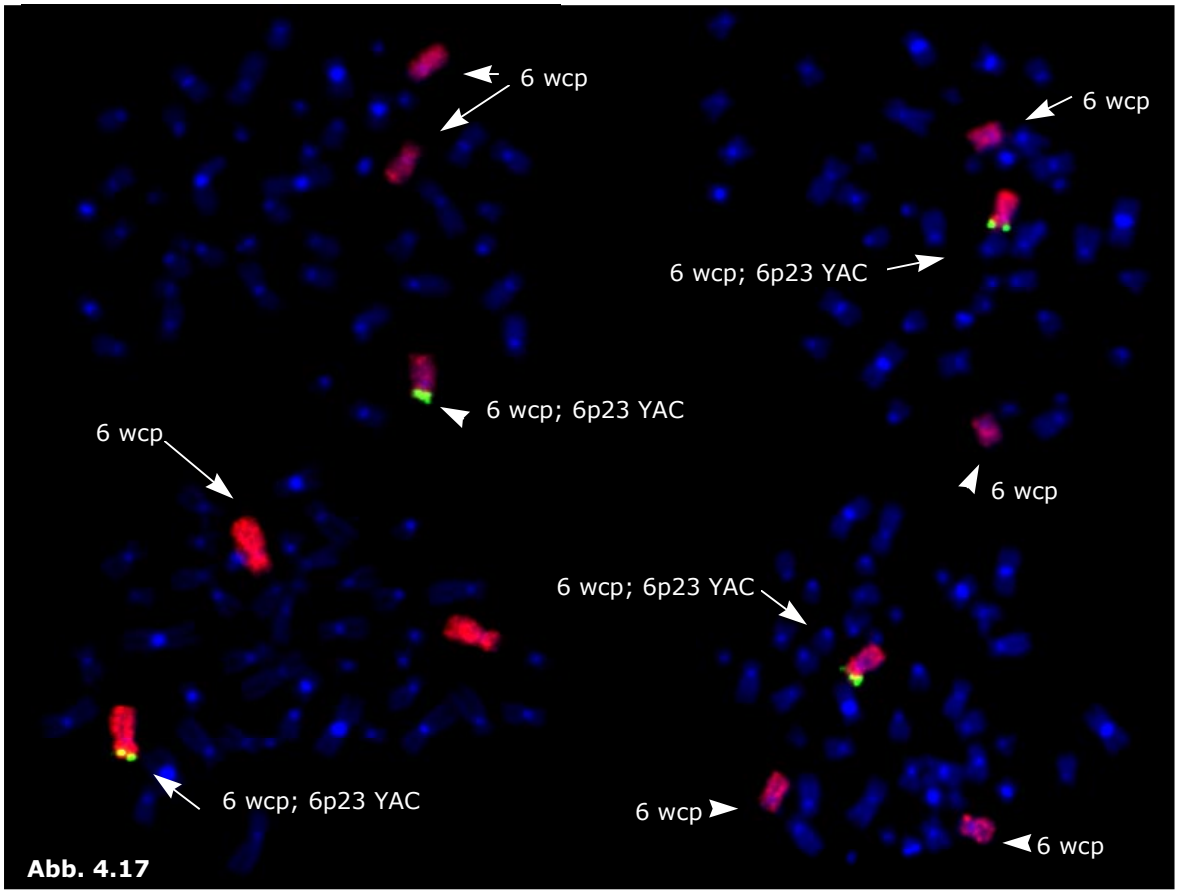
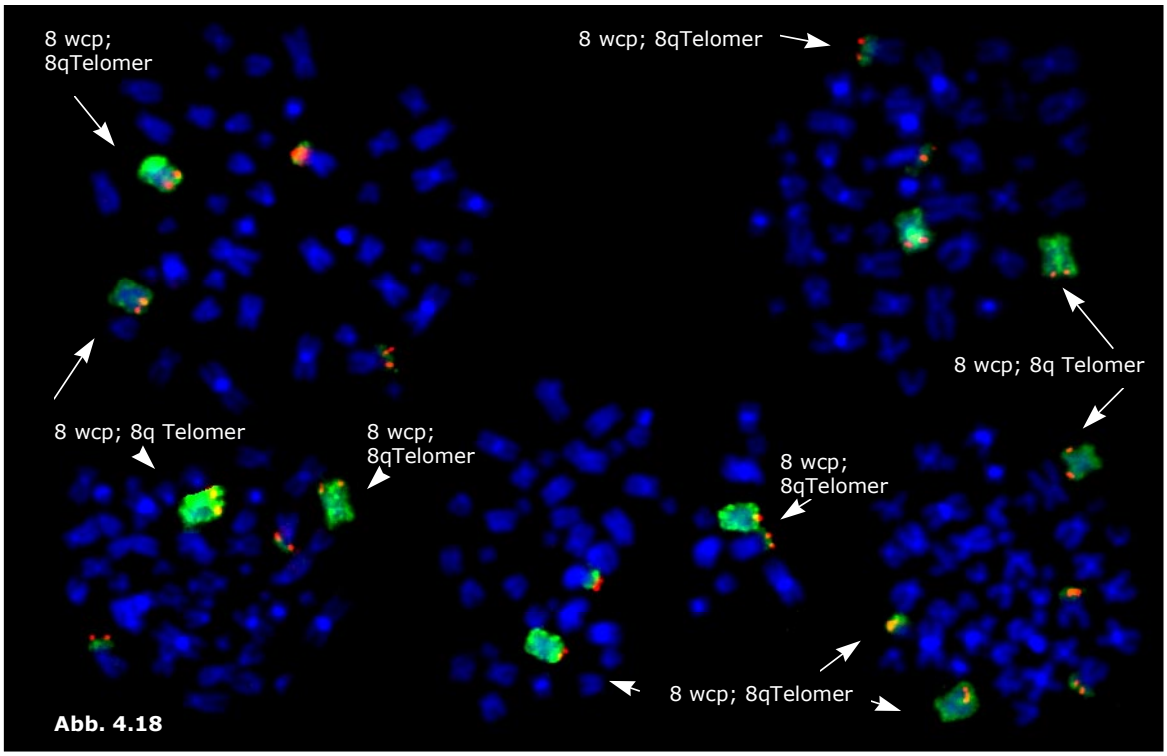


Abb. 4.18: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung bei Patient Nummer 19 mit einer wcp-Sonde für Chromosom 8 (grün) und einer Telomer-Sonde für 8q (rot).



4.6 Verteilungsmuster der chromosomalen Aberrationen

4.6.1 Häufigkeiten der mit CGH ermittelten chromosomalen Aberrationen

Die häufigste eindeutige Anomalie war als Zugewinn bei Chromosom 8 zu verzeichnen: 11 von 27 Fällen (41%), und zwar bei den Patienten Nummer 8, 9, 10, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 24 und 25. Neben dem Vorkommen einer Trisomie 8 trat einmal ein Gewinn der Region 8q22-qter (Nummer 19) auf.

Chromosom 19 war ebenfalls in 11 von 27 Fällen (41%) involviert. Sechsmal konnten Gewinne verzeichnet werden (Nummer 3, 8, 10, 17, 21, 25), wobei nur Nummer 25 ein eindeutig zu wertendes CGH-Profil aufwies. Bei Nummer 10, 21 und 25 war das ganze Chromosom 19 betroffen, bei Nummer 3 nur der kurze Arm und bei Nummer 8 und 17 der Bereich 19p11-p12 und 19q11-q12 bzw. 19p12. Verluste von Chromosom 19 wurden in 5 Fällen notiert (Nummer 4, 12, 16, 22, 26). Dabei war entweder das ganze Chromosom (Nummer 12, 22, 26) betroffen oder nur der kurze Arm (Nummer 4, 16).

Veränderungen an Chromosom 1 traten in 9 von 27 Fällen (33%) auf. Viermal konnte im Bereich 1p32-p35 oder 1p32-p36 ein Gewinn verzeichnet werden (Nummer 8, 17, 24, 27) und genauso oft ein Verlust im Bereich 1p32-pter (Nummer 12, 16, 21, 22). Die Profilabweichungen wurden bis auf die bei Patient Nummer 8 als nicht eindeutig eingestuft, da die Aberrationen jeweils im Telomerbereich lagen, und dessen CGH-Profil mit einer gewissen Zurückhaltung beurteilt werden muß. In einem Fall trat ein Gewinn des gesamten langen Arms von Chromosom 1 auf (Nummer 14).

In 7 von 27 Fällen (26%) war Chromosom 9 involviert. Ein eindeutiger Gewinn von 9q (Nummer 8) sowie ein weniger eindeutiger Gewinn von 9q34 (Nummer 17, 24) und ein weniger eindeutiger Verlust von 9q34 (Nummer 4, 10, 22) wie auch von 9p21-pter und 9q21-33 (Nummer 26) fielen auf.

In 6 von 27 Fällen (22%) waren Aberrationen von Chromosom 17 zu sehen. Dreimal trat ein Isochromosom i(17q) auf (Nummer 8, 18, 25). Einmal war die Region 17q24-qter mit einem Zugewinn betroffen (Nummer 24). Bei den Patienten Nummer 17 und 22 war der Gewinn von Chromosom 17 bzw. der Verlust von 17p als nicht eindeutig einzustufen.

Eine Aberration von Chromosom 6 zeigte sich bei vier Patienten der CML-Serie (15%) eindeutig als +6, +6p11-p21, +6q und –6p22-pter (Nummer 19, 21) sowie nicht eindeutig als +6p21-p22 und +6q13-q23 (Nummer 8, 22).

In 4 von 27 Fällen (15%) fiel Chromosom 21 durch Gewinne des langen Arms auf. Nummer 20 und 21 zeigten deutlich einen Zugewinn von 21q21-qter bzw. 21q. Bei Nummer 2 und 3 wurde der Gewinn von 21q22 als nicht eindeutig eingestuft.

Vier Fälle der Serie (15%) boten Veränderungen an Chromosom 22. Einmal fiel ein grenzwertiger Verlust von 22q (Nummer 22), dreimal ein Gewinn von 22q11-q12 (Nummer 8, 17, 24) auf.

Bei drei Fällen (11%) traten Aberrationen des Chromosoms 20 auf. Bei Patient Nummer 26 war ein deutlicher Zugewinn des ganzen Chromosoms 20 zu verzeichnen. Patient Nummer 8 zeigte einen grenzwertigen Gewinn von 20q11-q12. Bei Patient Nummer 10 mußte der Verlust von Chromosom 20 als nicht eindeutig bewertet werden.

Bei 2 von 27 Proben zeigten sich Gewinne am langen Arm von Chromosom 12: 12q22-q24 (Nummer 8) und 12q24 (Nummer 24). Beide Fälle mußten als nicht eindeutig eingestuft werden.

In 1 von 27 Fällen war Chromosom 2 aberrant. Ein Gewinn von 2p14-pter (Nummer 6) konnte mit Hilfe der FISH-Analyse eindeutig bewiesen werden.

Chromosom 7 war nur einmal als Gewinn des ganzen Chromosoms 7 (Nummer 21) auffällig.

Chromosom 10 lag ebenso wie Chromosom 13 nur einmal als +10 (Nummer 21) bzw. +13q (Nummer 21) vor.

Ein von der 1,0 Ratio abweichendes CGH-Profil von Chromosom 15 war als Zugewinn des langen Arms von Chromosom 15 auffällig (Nummer 3).
In der untersuchten Serie von 27 CML-Patienten zeigten die Chromosomen 3, 4, 5, 11, 14, 16 und 18 keinerlei Aberrationen.

4.6.2 Verteilungshäufigkeiten chromosomaler Aberrationen bezüglich der Krankheitsphase der CML

In dieser Arbeit wurden insgesamt 27 Patienten mit CML untersucht. Fünf Patienten in der chronischen Phase wurden 22 Patienten in der akzelerierten Phase gegenübergestellt. Zwei Patienten mit komplexen Translokationen wurden in die Serie aufgenommen. Die Patienten für die akzelerierte Phase wurden so ausgewählt, dass Patienten ohne Blastenschub (10) in etwa gleichem Verhältnis wie mit Blastenschub (11) vorkamen.
Bei den fünf Patienten in der chronischen Phase war kein eindeutiges Ergebnis abzulesen. Das Material von drei Patienten wies im CGH-Profil zwar Aberrationen auf, die jedoch als grenzwertig zu bewerten waren.
Bei den 22 Patienten aus der akzelerierten Phase ergaben sich bei insgesamt 14 Fällen eindeutige Abweichungen (64%), bei 6 Patienten aus der Gruppe ohne Blastenschub und bei 8 Patienten aus der Gruppe mit Blastenschub.

4.6.3 Gegenüberstellung der mit CGH bzw. der mit konventioneller Zytogenetik ermittelten Ergebnisse

In 12 von 27 Fällen (44%) waren die Ergebnisse der CGH-Auswertung auch in den bereits vorliegenden zytogenetischen Daten beschrieben worden (Nummer 8, 9, 10, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 27). Dennoch stimmten in nur vier Fällen (15%) die zytogenetischen Daten

mit den CGH-Profilen vollständig überein (Nummer 1, 5, 15, 18). Bei den übrigen 23 Proben gab es entweder auf der Seite der Zytogenetik oder auf der Seite der CGH Abweichungen. Die Proben Nummer 2, 3, 4, 6, 8, 10, 14, 17, 19, 20, 22 und 26 zeigten Aberrationen, die in der Zytogenetik nicht beschrieben worden waren (12/27; 44%). Dagegen wurden bei den Proben Nummer 7, 9, 11, 13, 23 und 27 die Befunde der Zytogenetik in der CGH nicht sichtbar (6/27; 22%). Bei den Patienten Nummern 12, 16, 21, 24 und 25 lagen Abweichungen auf beiden Seiten vor (5/27; 19%).

5. Diskussion

5.1 Diskussion der unterschiedlichen Techniken

5.1.1 Zytogenetische Auswertung

Die Tumorzytogenetik ist heute wichtiger Bestandteil der CML-Diagnostik. Die Knochenmark- oder Vollblutproben werden, wie in 3.1.1 beschrieben, in Kultur gebracht. Neben dem Problem, die Zellen unter *in vitro* Bedingungen zu kultivieren, stellt sich auch die Frage, ob bei der Heterogenität der Zellpopulationen neoplastischer Erkrankungen einzelne Subpopulationen in Kultur selektiv gefördert oder gehemmt werden. Bei der zytogenetischen Auswertung besteht das Risiko, nur einen Teil der Tumorzellpopulationen zu erfassen (Gebhart, 1989).
Die zytogenetische Diagnostik ist von guten Chromosomenpräparaten abhängig. Die mikroskopische Analyse der G-gebänderten Chromosomen bedeutet eine weitere Eingrenzung oder „Stichprobenentnahme„, da nie alle Metaphasen karyotypisiert werden können. Oftmals ist es nicht möglich, einzelne Chromosomen der komplexen neoplastischen Genome zu identifizieren. In solchen Fällen bedarf es weiterer Methoden, wie z.B. FISH oder CGH, um die komplexen Chromosomenaberrationen richtig einzuordnen.
Zudem ist die Zytogenetik nicht in der Lage, kleinste Aberrationen zu erfassen, die unter der Grenze des Auflösungsvermögens der Bänderungstechniken liegen (Mori et al., 1997).

5.1.2 Vergleichende genomische Hybridisierung

In den meisten publizierten CGH-Studien wurde als Schwelle für Verluste bzw. Gewinne ein Verhältnis zwischen Tumor- und Kontroll-DNA von 0,75 bzw. 1,25 festgelegt (Moore II et al., 1997). Profile, die diese vorgegebenen Grenzwerte erreichten oder überschritten, wurden als eindeutiger Hinweis auf eine Aberration gewertet.

Diese Auswertungsrichtlinien dürfen in Telomer- und Zentromerbereichen sowie in Regionen mit Heterochromatin aber nur unter Vorbehalt angewendet werden. Bekanntermaßen weichen CGH-Profile hier oft stark von der 1,0 Ratio ab, ohne dass Veränderungen im Genom vorliegen (Moore II et al., 1997). Der Grund für das Auftreten uneinheitlicher Profile liegt vor allem darin, dass die repetitiven Sequenzen dieser Bereiche hoch polymorph sind, d.h. die Anzahl der Sequenzen sehr unterschiedlich ist und somit wechselnde Hybridisierungssignale zustande kommen. In den ersten Untersuchungen von Kallioniemi et al. (1994) wurden solche Bereiche vollständig aus der Auswertung ausgeschlossen.

Abweichungen in besagten Problemregionen wurden auch in der vorliegenden Arbeit kritisch bewertet. Es wurde festgelegt, dass Profilabweichungen im Telomerbereich sowie Profilabweichungen, die die Ratio von 0,75 bzw. 1,25 nicht eindeutig erreichten, als grenzwertig einzustufen sind. Profilabweichungen in den heterochromatischen Zentromerbereichen wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Damit wurde versucht, der Tatsache gerecht zu werden, dass die Hybridisierung nicht immer gleichmäßig ausfällt und, dass Unterschiede in den polymorphen Heterochromatinbereichen für die klinische Beurteilung keine Relevanz haben. Da bei dieser Regelung die Bewertung der Profilabweichung vom Betrachter abhängt, ist eine gewisse Subjektivität und damit eine Fehlerquelle in der Ergebnisanalyse nicht zu vermeiden.

Moore II et al. (1997) versuchten, dem Problem durch Einführung einer objektiven Auswertungsmethode gerecht zu werden. Es wurde ein Verfahren eingeführt, dem die t-Statistik zugrunde liegt. Neben der normalen Hybridisierung von Test- mit Referenz-DNA wurde eine Hybridisierung mit zwei Referenz-DNAs durchgeführt. Die Ergebnisse der Referenz:Referenz Hybridisierung wurden mit den Ergebnissen der Test:Referenz Hybridisierung verglichen, um die Regionen

herauszufinden, die tatsächliche Unterschiede aufwiesen. Bestimmte Regionen wurden bei dieser Art der Auswertung ausgeschlossen.
Als interner Normwert für die Dynamik der Hybridisierung wird in dieser Arbeit das CGH-Profil des X-Chromosoms verwendet. Wird männliche Digoxigenin-11-dUTP markierte Tumor-DNA gegen weibliche Biotin-16-dUTP markierte normale Referenz-DNA hybridisiert, sollte das CGH-Profil des Geschlechtschromosoms bei der Ratio 0,5 liegen. Wird weibliche Digoxigenin-11-dUTP markierte Tumor-DNA gegen männliche Biotin-16-dUTP markierte normale Referenz-DNA hybridisiert, wird erwartet, dass das CGH-Profil des Geschlechtschromosoms bei einer Ratio von >1,5 (eigentlich 2,0) liegt. Die Profile der Geschlechtschromosomen, die deshalb deutlich über den 0,75 bzw. 1,25 Grenzwerten liegen sollen, geben damit die Dynamik der Hybridisierung wieder. Dynamik beschreibt in diesem Zusammenhang die Fähigkeit der Hybridisierung, Gendosisunterschiede sichtbar zu machen. Mit manchen Chromosomenpräparationen wurden diese dynamischen Grenzwerte aus bisher unverstandenen Gründen nicht erreicht. Diese Präparate sind dann für die Auswertung nicht geeignet. Häufig treten auch Probleme bei der Dynamik der Hybridisierung auf, weil zu starke Fluoreszenzsignale des Hintergrunds die Hybridisierung der Chromosomen abschwächen (Karhu et al., 1997). Verluste des „dynamic range„ müssen beachtet werden, weil unter diesen Umständen genomische Veränderungen im CGH-Profil nicht mehr erfaßt werden.
In dieser Arbeit wurde vor allem bei Patient Nummer 3 eine verminderte Dynamik des X-Chromosoms beobachtet. Die Profilabweichungen dieses Falles wurden deshalb als grenzwertig eingestuft. Auch bei den Patienten Nummer 15, 18 und 26 lag das Profil des Geschlechtschromosoms unter dem vorgegebenem Grenzwert. Da nicht genügend DNA zur Verfügung stand, konnten die CGH-Hybridisierungen nicht wiederholt werden.

Um die Dynamik der Hybridisierung zu testen und sicherzugehen, dass die CGH-Profile korrekt ausgewertet werden, führten Karhu et al. (1997) jeweils eine Co-Hybridisierung mit normaler männlicher gegen normale weibliche DNA durch.
In der vorliegenden Arbeit wurden grenzwertige Profilabweichungen beobachtet, die sich weder im Telomer- oder Zentromerbereich befanden, noch eine unzureichende Dynamik des X-Chromosoms aufwiesen. Ein Beispiel dafür sind die Chromosomen 2 und 3 bei Patient Nummer 8. Da umgekehrt nicht ausgeschlossen werden kann, dass es sich um Abweichungen handelt, die auftreten, wenn nur eine geringe Zahl von Zellen diese Aberration besitzt, wurden diese Profilabweichungen berücksichtigt.
Um in dieser Arbeit den oben beschriebenen Problemen der CGH-Auswertung gerecht zu werden, einigte man sich darauf, die nicht eindeutigen Ergebnisse als solche aufzuführen und bei der Ergebnis-Analyse gesondert zu berücksichtigen.

5.1.3 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Um eine herkömmliche Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung sinnvoll durchzuführen, muß durch vorherige klinische oder zytogenetische Untersuchungen eine Idee entwickelt werden, welche Chromosomen bzw. Chromosomenabschnitte aberrant sein könnten. Nur dann gelingt es, Proben für die FISH-Analyse auszuwählen, mit denen eine Chance besteht, die Aberrationen besser zu beschreiben. Die FISH-Analysen eignen sich zum Nachweis und zur genauen Charakterisierung chromosomaler Imbalanzen bzw. im Falle der *BCR/ABL*-Fusion zum Nachweis der Philadelphia-Translokation. Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung wird deshalb als Ergänzung zu anderen Methoden eingesetzt.

5.2 Darstellung und Bewertung der CGH-Ergebnisse

5.2.1 Beurteilung häufiger chromosomaler Aberrationen bezüglich ihrer molekular-genetischen Bedeutung im Krankheitsprozeß

Die häufigste eindeutige Aberration in dieser Serie von 27 CML-Patienten betraf Chromosom 8 (41%). In 10 Fällen lag ein Gewinn des ganzen Chromosoms 8 vor, in einem Fall ein Gewinn der Region 8q22-qter. Die zweithäufigste eindeutige Aberration betraf Chromosom 17 (15%). In drei Fällen sind die CGH-Profile mit einem Isochromosom i(17q) vereinbar, in einem Fall fiel ein Gewinn der Region 17q24-qter auf. Diese Aberrationen traten bei Patienten auf, die sich in der akzelerierten Phase der CML befanden.

Heim et al. (1995) erläutern, dass der Übergang der chronischen Phase in die Transformationsphase der CML mit dem Auftreten sekundärer Aberrationen verbunden ist. Dabei wird zwischen einer „major route„ und einer „minor route„ unterschieden. Die typischen Veränderungen der in 70% vorliegenden „major route„ sind ein zweites Philadelphia-Chromosom, eine Trisomie 8 und ein Isochromosom i(17q). Da es sich bei einem zweiten Philadelphia-Chromosom um eine Verdoppelung handelt, war auch im CGH-Profil von Patient Nummer 17 ein Gewinn der entsprechenden Regionen von Chromosom 9 und 22 zu sehen. Die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit sind somit mit den Ergebnissen anderer Studien vereinbar.

Die Kombination einer Trisomie 8 und eines Isochromosom i(17q) tritt durchschnittlich in 7% der Fälle auf (Heim et al., 1995). Die Verbindung eines Zugewinns von Chromosom 8 mit einem Isochromosom i(17q) zeigte sich in der dieser Arbeit zugrundeliegenden Patientenserie dreimal (11%). Sie wurde dabei einmal bei einem Patienten beobachtet, bei dem noch kein Blastenschub diagnostiziert worden war (Patient Nummer 8).

Dass neben einem Philadelphia-Chromosom nur eine Trisomie 8 als zusätzliche Aberration zu finden ist (11%), wird in der Literatur als fast genauso häufiges Ereignis beschrieben wie die Kombination Philadelphia-Chromosom und Isochromosom i(17q) (12%) (Heim et al., 1995). In der vorliegenden Patientenserie trat ein Gewinn von Chromosom 8 weitaus häufiger auf als ein Isochromosom i(17q) (37% : 11%), wobei das Isochromosom i(17q) immer mit einem Gewinn von Chromosom 8 vergesellschaftet war und nie als alleinige Aberration gefunden wurde. Dagegen war ein Zugewinn von Chromosom 8 in 3 von 27 Fällen (11%) die einzige eindeutige sekundäre Imbalanz.

Die Molekularbiologie des initalen Ereignisses der CML und das *BCR/ABL*-Fusionsgen sind gut bekannt (Campbell et al., 1991; Kurzrock et al., 1991). Dagegen wird über die molekular-genetischen Abläufe, die zur Progression der Krankheit führen, nur gemutmaßt. Endgültige Belege liegen noch nicht vor. Die Forschung konzentriert sich vor allem auf die Chromosomen, die als sekundäre Aberrationen am häufigsten in Erscheinung treten. Dazu gehören die Chromosomen 8 und 17.

Trisomie 8 scheint für myeloide Krankheiten relativ spezifisch zu sein. Eine Trisomie 8 ist auch die häufigste numerische Aberration, die bei der akuten myeloiden Leukämie gefunden wird. Bei lymphatischen Leukämien tritt diese Anomalie fast nie auf (Heim et al., 1995).

Ein mögliches Kandidatengen auf Chromosom 8 ist *c-MYC*, das auf 8q24 lokalisiert ist. Es ist wahrscheinlich kein Zufall, dass bei Patient 19 der Zugewinn den distalen langen Arm von Chromosom 8 betrifft, nämlich 8q22-qter. *c-MYC* selber wurde in die Region 8q24.1 lokalisiert. *c-MYC* ist bei der Regulation von Wachstum und Differenzierung der Zellen beteiligt (Evan et al., 1993). Studien an CML-Patienten zeigten bei 21% der Probanden eine Assoziation zwischen einer erhöhten Expression von *c-MYC* und dem Fortschreiten der Krankheit (Jennings et al., 1998). Dem *c-MYC* Gen wird eine entscheidende Rolle beim Übergang der chronischen CML in die Akzelerationsphase zugesprochen. Der Anteil von *c-myc* Protein in unreifen Zellen vergrößert sich mit dem Übergang

in die Akzelerationsphase. Die fehlende Regulation der *c-MYC*-Expression könnte die myeloide Differenzierung hemmen und das Wachstumspotential der Zellen vergrößern (Handa et al., 1997).
Untersuchungen von Jennings et al. (1998) ergaben, dass eine *c-MYC*-Amplifikation nicht unbedingt mit einer Trisomie 8 einhergehen muß. Die Southern-Blot Analysen bewiesen bei 50% der Fälle, die die terminale Krankheitsphase erreicht hatten, eine *c-MYC*-Amplifikation ohne Erwerb einer Trisomie 8. Möglicherweise stellen die *c-MYC*-Amplifikation und die Trisomie 8 für den malignen Zellklon zwei alternative Wege der Progression dar.
Das häufige Auftreten eines Isochromosoms i(17q) bei akzelerierter CML (12%) legt nahe, dass durch den Gewinn des langen Arms oder durch den Verlust genetischen Materials vom kurzen Arm des Chromosoms 17, eventuell auch durch die Kombination beider Ereignisse, chromosomale Situationen entstehen, die mit der Progression der Krankheit zu tun haben. Whang-Peng et al. (1981) sowie Pasquali et al. (1982) konnten in ihren Arbeiten nachweisen, dass die Bruchpunkte dieses Isochromosoms nicht wie angenommen im Zentromer liegen, sondern in der perizentromerischen Region des kurzen Armes von Chromosom 17. Meist waren die Bruchstellen in 17p11 zu finden, eine Region, die auch beim Smith-Magenis-Syndrom (SMS) häufig als Deletion betroffen ist. Ihre Untersuchungen ergaben außerdem, dass der Großteil der Isochromosomen i(17q) zwei Zentromere besitzt und man deshalb von einem dizentrischen Isochromosom idic(17)(p11) sprechen sollte.
Verschiedene Gene, die in der SMS-Region liegen, sind bis jetzt bekannt. Dazu gehört unter anderem das menschliche Homolog (*LLGL1*; lethal giant larvae homolog 1) des Drosophila Tumorsuppressorgens *D-lgl* (Drosophila – lethal giant larvae), sowie das als Transkriptionsfaktor diskutierte *ZNF179* Gen (zinc finger protein 179) (Strand et al., 1995; Zhao et al., 1998).

Ein weiteres mögliches Kandidatengen auf Chromosom 17, das lange Zeit in Zusammenhang mit der CML-Progression diskutiert wurde, ist das Tumorsuppressorgen *TP53* (Ahuja et al., 1991). *TP53* liegt auf 17p13.1. Molekular-genetische Analysen von Feinstein et al. (1991) haben gezeigt, dass bei Patienten mit zytogenetischem Verlust von 17p, der bei einem Isochromosom i(17q) vorliegt, oft das andere *TP53*-Allel durch Rearrangements, Punktmutationen oder Verlust der Expression inaktiviert wird. Damit verhält sich *TP53* wie ein typisches Tumorsuppressorgen, das in seiner Wirkung vollkommen ausgeschaltet werden muß. Bei 25% der CML-Patienten mit Blastenschub wurde eine Mutation von *TP53* festgestellt, die zur Ausschaltung dieses Gens führte und mit der Progression der Krankheit in Zusammenhang stehen könnte (Feinstein et al., 1992). Die Untersuchungen von Fioretos et al. (1999) ergaben allerdings, dass keine Verbindung zwischen dem Auftreten von Isochromosom i(17q) und einer Mutation von *TP53* besteht. Sie vermuten, dass bei der Entstehung eines Isochromosoms i(17q) ein anderes Gen involviert ist, das eine entscheidende Rolle in der Leukämogenese spielt.

Dieses Gen könnte ähnlich wie *c-MYC* auf Chromosom 8 ein dominant wirkendes Tumorgen auf dem langen Arm von Chromosom 17 sein. Beim Isochromosom i(17q) ist der ganze lange Arm verdoppelt. In einem Fall der untersuchten CML-Serie (Patient Nummer 24) wurde eine isolierte Gendosiserhöhung für die Region 17q24-qter beobachtet. Dies darf man zumindest als Hinweis werten, dass das entscheidende, dominant wirkende Tumorgen in der distalen Region 17q24-qter liegt. Mögliche Kandidatengene auf dem langen Arm von Chromosom 17 sind noch nicht bekannt. Dieses Gen zu finden, bleibt weiteren Studien vorbehalten.

Bei den Verteilungshäufigkeiten der Chromosomenaberrationen in der CML-Patientenserie dieser Arbeit fiel auch Chromosom 19 auf. In insgesamt 11 Fällen (41%) zeigten die CGH-Profile Gewinne oder Verluste an. Nur drei dieser Profile sind als eindeutig anzusehen. Es

handelte sich einmal um einen Gewinn von Chromosom 19 und zweimal um einen Verlust von Chromosom 19. Unter Berücksichtigung der grenzwertigen Ergebnisse waren sechs Fälle (6/11; 55%) als Gewinne und fünf Fälle (5/11; 45%) als Verluste zu bewerten. Von den Aberrationen waren entweder das ganze Chromosom 19 betroffen oder nur einzelne Regionen.

Auffallend war, dass bei Chromosom 19 keine einheitliche Aberration festzustellen war. Gewinne und Verluste lagen in annähernd gleichem Verhältnis vor. Durch andere Studien ist bekannt, dass Chromosom 19 zu den kritischen Bereichen der CGH-Auswertung gehört und GC-reiche Regionen besitzt (Kallioniemi et al., 1994). Oft führt das CGH-Profil zu falsch positiven Ergebnissen, weil es deutlich unter der 1,0 Ratio liegt, ohne dass tatsächlich Verluste vorliegen. Deshalb muß man die durch CGH bestimmten Verluste sehr kritisch bewerten, während Zugewinne von Chromosom 19 bei der CGH-Auswertung eher unterrepräsentiert sein dürften. Dieses entspricht auch der bekannten Sequenz von auftretenden Aberrationen bei der CML, die in der Akzelerationsphase eher durch eine Trisomie 19 gekennzeichnet ist.

Trisomie 19 zählt zu den „major route„-Veränderungen der CML. Sie tritt nicht so häufig auf wie Trisomie 8 oder Isochromosom i(17q), wird aber dennoch zusammen mit anderen genetischen Aberrationen bei 15% der CML-Patienten beobachtet (Heim et al., 1995). Die Kombination Trisomie 8, Isochromosom i(17q) und Trisomie 19 findet sich bei 1% der CML-Patienten (Heim et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit trat diese Zusammenstellung einmal auf.

Über die molekular-genetische Bedeutung einer Trisomie 19 bei CML ist noch nichts Genaueres bekannt.

5.2.2 Beurteilung seltener chromosomaler Aberrationen bezüglich ihrer molekular-genetischen Bedeutung im Krankheitsprozeß

Chromosom 6 fiel viermal durch Gewinne im CGH-Profil auf (15%). Es handelte sich dabei zweimal um nicht eindeutige Amplifikationen unterschiedlicher Regionen auf dem kurzen bzw. langen Arm von Chromosom 6 sowie um eine Trisomie 6. Bei Patient Nummer 19 zeigte sich eine Kombination von Gewinn und Verlust. Das CGH-Profil wurde zuerst als Isochromosom i(6q) interpretiert. Da aber nicht nur der lange Arm von Chromosom 6 amplifiziert war, sondern auch die Region des kurzen Arms 6p11-p21, mußte gleichermaßen eine Translokation in Erwägung gezogen werden. Zur Überprüfung der Profilabweichung wurde eine Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit einem „whole chromosome paint„, wcp 6, und einer spezifischen Sonde für 6p23 durchgeführt. Die Hybridisierung ergab drei Signale der 6 wcp-Probe und nur ein Signal für 6p23 (siehe Abschnitt 4.5.3). Ein im Vorfeld vermutetes dizentrisches Chromosom konnte nicht bestätigt werden. Scheinbar handelte es sich um eine Duplikation beginnend bei 6p21 bis 6qter mit Verlust der Region 6p22-pter.

Aberrationen von Chromosom 6 in der Blastenkrise der CML wurden bereits in der Literatur beschrieben. Meist handelt es sich um Translokationen mit jeweils unterschiedlichen Bruchpunkten und unterschiedlichen Partnerchromosomen (Huret et al., 1989). Eine besonders kritische Stelle scheint die Region 6p21-p23 zu sein (Huret et al., 1989). Einheitliche Veränderungen wurden bislang aber nicht gefunden; eine Tatsache, die für die Variabilität sekundärer Aberrationen spricht.

Translokationen, bei denen Chromosom 6 als eines der Partnerchromosomen beteiligt ist, treten häufig bei der akuten myeloischen Leukämie als primäre Aberration auf. Es handelt sich dabei meist um die t(6;9)(p23;q34) und um t(6;11)(q27;q23) (Heim et al.,

1995). Als mögliche Kandidatengene werden *DEK* auf 6p23 und *AF6* (AF-PEN; Antisecretory factor (pituitary)) auf 6q27 diskutiert. Ihre physiologische Funktion ist noch nicht bekannt. Die in dieser Arbeit untersuchten Patientenproben zeigten nur bei Fall Nummer 8 eine gemeinsam auftretende Veränderung an Chromosom 6 und 9 (+6p21-p22 und +9q). Bei dem als besonders auffällig besprochenen Fall Nummer 19 mit Verlust der Region 6p22-pter und Zugewinn des restlichen Chromosoms 6p21-qter waren weder Chromosom 9 noch Chromosom 11 im CGH-Profil auffällig. Die FISH-Auswertung ergab, wie oben erwähnt, keine Translokation.

Jadayel et al. (1995) führten molekular-zytogenetische Untersuchungen an einem Ph-negativen, *BCR/ABL*-positiven CML-Fall durch, der als einzige zytogenetische Aberration eine Translokation t(6;9)(p23;q34) zeigte. Ziel der Analysen war es, die Rolle der normalerweise bei AML involvierten Gene *DEK* (6p23) und *CAN* (9q34) (auch *NUP214*; nucleoporin 214 kD) bei der Progression der chronisch-myeloischen Leukämie zu ermitteln. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen mit *BCR*- und *ABL*-Sonden ergaben eine „maskierte„ Ph-Translokation, bei der *BCR*- und *ABL*-Sequenzen auf 6p23 sichtbar wurden. Bei 20% der untersuchten Metaphasen waren die Signale nur auf einem Chromosom 6, bei den übrigen 80% der Metaphasen auf beiden homologen Chromosomen 6 vorhanden. Die Gene *DEK* und *CAN* waren in die Rearrangements nicht miteinbezogen. Die Ergebnisse der Studie legen nahe, dass eine Translokation t(6;9)(p23;q34) bei CML nicht mit der bei AML zu vergleichen ist. Im Gegensatz zur AML sind bei CML nicht *DEK* und *CAN*, sondern *BCR* und *ABL* in einer „maskierten„ Ph-Translokation involviert. Jadayel et al. (1995) vermuten auf 6p23 außer *DEK* andere Gene, die für die Pathogenese der CML eine Rolle spielen könnten.

In der untersuchten CML-Patientenserie trat in einem Fall eine Aberration von Chromosom 2 auf. Mit Hilfe der FISH-Analyse wurde ein Gewinn von 2p14-pter bestätigt. Die DNA-Probe stammte von einem Patienten mit akzelerierter CML und komplexer Translokation ohne

Blastenschub. Die FISH-Analyse ergab, dass es sich um eine Translokation zwischen der amplifizierten Region des Chromosoms 2 und einem Chromosom der F-Gruppe handelte.
Ein Gewinn der Region 2p13-p24 wurde auch bei Gribble et al. (1999) erwähnt. Die Bedeutung dieser seltenen Aberration bei der Progression der chronisch-myeloischen Leukämie ist unklar.
Aberrationen von 2p wurden bei kutanen T-Zell Lymphomen und beim Sézary-Syndrom beschrieben. 2p fiel in den untersuchten Fällen als Deletion oder Translokationspartner auf (Berger et al., 1987; Shapiro et al., 1987). Berger et al. (1987) fanden bei einem Drittel ihrer Patientenserie mit Sézary-Syndrom eine Translokation t(2p). Diese Imbalanzen von Chromosom 2 wurden als nicht zufällig eingestuft.
Bei der CGH-Profilauswertung traten auch Veränderungen bei Chromosom 9 und 22 auf. Der lange Arm von Chromosom 9 zeigte in 7 von 27 Fällen (26%) Auffälligkeiten, der lange Arm von Chromosom 22 in 4 von 27 Fällen (15%). Insgesamt war keine einheitliche Aberration zu erkennen. Es traten sowohl Gewinne als auch Verluste auf.
Ein eindeutiges Ergebnis für Chromosom 9 war nur bei Fall Nummer 8 als Gewinn von 9q abzulesen. Bei allen anderen DNA-Proben mußten die Profilabweichungen als grenzwertig eingestuft werden. In fünf Fällen war die Region 9q34 auffällig. Zweimal lag ein Gewinn vor und dreimal ein Verlust. Auch hier gilt wieder die schon bei Chromosom 19 aufgestellte Regel: Die CGH-Profile haben in GC-reichen Sequenzregionen die Tendenz, Verluste anzuzeigen. Deshalb sind eventuelle grenzwertige Gewinne sicher als solche anzusehen. Patient Nummer 26 zeigte den Verlust der Regionen 9p21-pter und 9q21-q33. In der Literatur wird Chromosom 9 nicht bei den als kritisch zu bewertenden Chromosomen genannt (Kallioniemi et al., 1994; Karhu et al., 1997). Aus diesem Grund wurden die Abweichungen in die Bewertung miteinbezogen, obwohl sie zum größten Teil im Telomerbereich lagen.

Eine Deletion am kurzen Arm von Chromosom 9 wurde auch bei Sill et al. (1995) beschrieben. Es wird berichtet, dass bei der mittels semiquantitativer Multiplex-Polymerasekettenreaktion (PCR) untersuchten Patientenserie mit lymphoider Blastenkrise 50% eine homozygote Deletion für das p16 Gen aufwiesen. Bei den CML-Patienten mit Blastenschub ohne lymphoiden Phänotyp wurde keine Deletion gefunden. p16 bzw. *CDKN2A* liegt in der Region 9p21 und kodiert für ein 16 kD Protein, das hemmend auf CDK4 (cyclin-dependent kinase) wirkt. Da CDKs wesentlich an der Regulation des Zellzyklus und der Zellteilung beteiligt sind und speziell CDK4 eine wesentliche Kontrollfunktion im Wachstumsprozeß der Zelle darstellt, kommt auch seinem Gegenspieler-Protein, *CDKN2A*, eine entscheidende Kontrollfunktion zu. Eine Deletion des möglicherweise auf 9p21 lokalisierten Tumorsuppressorgens wird in Zusammenhang mit der Genese verschiedener Tumore, vor allem dem malignen Melanom, gesehen. Sill et al. (1995) vermuten, dass ein Verlust von p16 auch mit dem Entstehen einer aggressiven, lymphoiden CML zusammenhängen könnte.

In der vorliegenden Arbeit findet sich bei Patient Nummer 26 neben dem Verlust von 9p21-pter auch ein Verlust von 9q21-q33. Der Patient befand sich im lymphatisch determinierten Blastenschub (siehe Tabelle 4.1).

Die Region 9q34 ist bei der CML durch die Lokalisation des *ABL*-Gens von Bedeutung. Bei der Entstehung des Ph-Chromosoms kommt es zur Fusion zwischen *ABL* auf 9q34 und *BCR* auf 22q11. Im CGH-Profil von Patient Nummer 17 fiel ein Gewinn von 9q34 und 22q11-q13 auf. In der Zytogenetik war ein zweites Ph-Chromosom beschrieben worden. Die CGH-Ergebnisse stimmen damit mit diesem zytogenetischen Befund überein.

Allerdings war auch in den zytogenetischen Daten von Patient Nummer 18, 20 und 27 ein doppeltes Ph-Chromosom aufgeführt worden. In den dazugehörenden CGH-Profilen zeigten sich jedoch keine Gewinne an

Chromosom 9 und 22. Man muß sich bei der Gegenüberstellung der Befunde aus Zytogenetik und CGH immer wieder vergegenwärtigen, dass mit der Zytogenetik nur eine Subpopulation von malignen Zellen erfaßt wird, während CGH alle Zellen repräsentiert.

Darüberhinaus konnten bei Chromosom 22 wie bei Chromosom 9 keine einheitlichen Aberrationen festgestellt werden. Alle Profilabweichungen wurden als grenzwertig eingestuft. Von einem Verlust war der ganze lange Arm 22q betroffen. Gewinne lagen jeweils in der Region 22q11-q12 vor (3/27; 11%). Chromosom 22 gehört zu den kritischen Bereichen bei der CGH-Auswertung. Da hier GC-reiche Regionen liegen, führt die Hybridisierung oftmals zu Profilabweichungen unterhalb der 1,0 Ratio (Kallioniemi et al., 1994).

In zwei Fällen (7%) zeigte sich eine eindeutige CGH-Profilabweichung von Chromosom 1. Ein Gewinn des langen Arms 1q sowie ein Gewinn der Region 1p32-p36 waren deutlich abzulesen. Insgesamt war die Region distal von 1p32 achtmal entweder als Gewinn oder als Verlust auffällig (30%).

Nach Untersuchungen von Karhu et al. (1997) ist bekannt, dass 1p34-pter zu den GC-reichen Regionen des menschlichen Genoms gehört. Im CGH-Profil treten an dieser Stelle oft Artefakte auf, die einen Verlust vortäuschen können (Kallioniemi et al., 1994). Unter Berücksichtigung dieser Tatsache mußten die Verluste von 1p32-pter bei der Interpretation der Ergebnisse außer Acht gelassen werden. Nur Gewinne wurden als Aberration gewertet. Gewinne traten in der vorliegenden Patientenserie in vier Fällen (15%) bei 1p32-p35 oder 1p32-p36 auf.

Ungeachtet des Tatbestandes, dass die distale Region des kurzen Arms von Chromosom 1 falsch positive Verluste im CGH-Profil darstellen kann, wurden ähnliche Befunde bei Gribble et al. (1999) als Deletion von 1p34-p36 gewertet. In ihrer Arbeit wurde über möglicherweise vorhandene Tumorsuppressorgene in dieser Region diskutiert, die bei der Progression der CML zur Blastenkrise eine Rolle spielen könnten.

Eine Studie von Mori et al. (1997) führte Allelotyp-Analysen an CML-Patienten in der Transformationsphase durch, um Veränderungen der molekularen Evolution bei CML aufzuklären. Ihre Untersuchungen ergaben bei 35% der 30 untersuchten Probanden einen Verlust der Heterozygotie (Loss of Heterozygosity; LOH) auf 1p. Ein Verlust von 1p wurde bereits bei anderen Tumoren, wie etwa Neuroblastom, kolorektales Karzinom, hepatozelluläres Karzinom oder parathyroidales Adenom beschrieben (Mori et al., 1997). Die vorliegenden Daten deuten ebenfalls darauf hin, dass ein oder mehrere Tumorsuppressorgene in dieser Region lokalisiert sein könnten.

Da aber Artefakte des CGH-Profils im Bereich von 1p32-pter, wie oben erwähnt, auftreten können, erscheint die Interpretation der Gendosisveränderungen dieser Region, trotz der unabhängigen Befunde über LOH Verluste, schwierig. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb bei der Auswertung der Schwerpunkt auf die Gewinne im Bereich 1p32-pter gelegt. Die amplifizierten Regionen müßten dann als Hinweis auf möglicherweise vorhandene Onkogene im Bereich 1p32-pter gewertet werden. Diese Aussage steht im Gegensatz zu den Vermutungen von Gribble et al. (1999) sowie Mori et al. (1998). Onkogene auf dem kurzen Arm von Chromosom 1, die mit verschiedenen Neoplasien in Zusammenhang gebracht werden, sind *NRAS* (v-ras neuroblastoma RAS viral oncogene homolog) auf 1p11-p12(p22) beim Myelodysplastischen Syndrom und T-Zell-Lymphom, *BLYM* (avian lymphoma virus-derived transforming sequence) auf 1p32 beim Burkitt Lymphomen sowie *SRC-2* (v-src avian sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog) auf 1p36.1-p36.2 bei Neuroblastomen, Melanomen und Myelodysplastischen Syndromen (Cooper et al., 1984; Gilbert et al., 1984; Hafez et al., 1985; Lakkala-Paranko et al., 1987).

Bei Patient Nummer 14 fiel ein eindeutiger Gewinn von 1q auf. Aberrationen von Chromosom 1 spielen eine wichtige Rolle bei der Progression myeloproliferativer Erkrankungen, sind im speziellen Fall von CML aber eher selten zu finden.

Eine Gewinn des langen Arms von Chromosom 1 wurde auch bei Carbone et al. (1987) beschrieben. Bei der dort zytogenetisch untersuchten Probe eines CML-Patienten mit Blastenschub war zusätzlich eine Inversion der perizentrischen Region festgestellt worden. In einem weiteren Fall war Chromosom 1 Partnerchromosom verschiedener Translokationen. Alimena et al. (1980) konnten zeigen, dass Chromosom 1 scheinbar zwei kritische Bereiche besitzt, bei denen vor oder während des Blastenschubs Gewinne bzw. Verluste zu verzeichnen sind. Diese Regionen sind 1q32-q42 und 1p36-pter. Die Trisomie 1q bei Patient Nummer 14 dieser Arbeit schließt die kritische Region 1q32-q42 ein. Das Auftreten von Aberrationen bei Chromosom 1 wurde von Alimena et al. (1980) als ungünstiges prognostisches Zeichen gewertet. Oshimura et al. (1976) berichten über drei AML-Patienten mit Chromosom 1 Aberrationen, die unter Therapie keine komplette Remission zeigten, und über einen CML-Patienten, der zum Zeitpunkt des Auftretens einer Chromosom 1 Aberration einen beginnenden Blastenschub entwickelte. Carbone et al. (1987) vermuteten auf diesem Chromosom der A-Gruppe Gene, die den leukämischen Zellen einen Selektionsvorteil geben. In der Region 1q22-q24 liegt das Onkogen *SKI* (v-ski avian sarcoma viral oncogene homolog). Bei Pre-B-Zell ALL und AML konnte bestätigt werden, dass das Onkogen *SKI* zu diesen Krankheiten eine Verbindung hat (Carrol et al., 1984; Michael et al., 1984).

Diese Berichte stimmen nicht mit den klinischen Angaben von Patient Nummer 14 der vorliegenden CML-Patientenserie überein. Bei Patient Nummer 14 wurde eine akzelerierte Phase der CML ohne Blastenschub diagnostiziert. Die Patientin befindet sich seit zwei Jahren unter Litalir®-Therapie (Hydroxyharnstoff) in Remission.

Gewinne von 1q findet man neben CML auch bei anderen Krankheiten der chronisch myeloproliferativen Syndrome. 10% der Patienten mit Polycythaemia vera (PV), eine Krankheit mit Vermehrung der Erythro-, Thrombo- und Granulozytopoese, weisen Aberrationen von Chromosom

1 auf. Meist liegt bei PV ein zusätzliches Chromosom 1 vor, dessen kurzer Arm in Nähe des Zentromers deletiert ist. Gelegentlich entsteht die partielle Trisomie 1 auch durch Duplikationen oder verschiedene Translokationen. PV tritt vorwiegend bei über 60 Jahre alten Patienten auf (Heim et al., 1995).

Eine partielle Trisomie 1 gehört aber auch zu den zytogenetischen Befunden der Osteomyelosklerose, ebenfalls eine Krankheit, die den chronisch myeloproliferativen Erkrankungen zugerechnet wird. Unbalanzierte Translokationen und Duplikationen können der Aberration zugrunde liegen (Heim et al., 1995).

Eine Duplikation dup(1)(q12-21q31-32) wird auch als sekundäre Aberration der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) zugerechnet. dup(1) ist bei ALL eine seltene Anomalie, die in etwa ein Drittel der Fälle zusammen mit einer Translokation t(8;14) auftritt und in einem weiteren Drittel bei massiv hyperdiploiden Karyotypen (>50 Chromosomen) zu finden ist (Heim et al., 1995). Gene, die bei dieser Duplikation involviert sein könnten, sind noch nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit waren bei der vorangegangenen zytogenetischen Diagnostik von Patient Nummer 14 nur „zusätzliche Aberrationen„ beschrieben worden, ohne genauere Angaben. Da auch bei ALL, PV und Osteomyelosklerose ein Ph-Chromosom auftreten kann, ist die Überlegung berechtigt, dass es sich bei Patient Nummer 14 nicht um eine CML, sondern um eine andere hämatologische Erkrankung handelt. Neben dem CGH-Befund eines Zugewinns des langen Arms von Chromosom 1 spricht darüberhinaus für diese Annahme, dass die Patientin bei der zytogenetischen Diagnosestellung bereits 74 Jahre alt war. CML tritt vorwiegend im mittleren Lebensalter zwischen 40 und 50 Jahren auf (Heim et al., 1995). Das durchschnittliche Alter der PV-Patienten liegt bei über 60 Jahren. Die überwiegende Zahl der Osteomyelosklerose-Patienten ist zwischen 50 und 70 Jahre alt. Ph-positive ALLs treten ebenfalls bei Patienten auf, die meist älter als der Durchschnitt der Ph-negativen ALLs sind. ALL hat seinen Altersgipfel

meist bei Patienten unter 30 Jahren (Heim et al., 1995). Außerdem sprechen Ph-positive ALL-Patienten besser auf die jeweilige Therapie an und haben längere Überlebenszeiten als CML-Patienten in der Blastenkrise (Heim et al., 1995). Patient Nummer 14 befindet sich, wie bereits erwähnt, seit zwei Jahren unter Litalir®-Therapie (Hydroxyharnstoff) in Remission.

Auffälligkeiten bei Chromosom 21 kamen in 4 von 27 Fällen vor (15%). Bei allen vier Patienten-Proben zeigten sich Gewinne. Zwei Fälle wurden als eindeutiges Ergebnis gewertet (+21q und +21q21-qter), zwei Fälle als grenzwertig (+21q22). Die beiden als eindeutig zu bewertenden Profile gehörten zu Patientenproben, die sich in der Blastenphase befanden.

Trisomie 21 gehört zu den häufigsten sekundären Aberrationen der „minor route„ bei CML (Heim et al., 1995). 7% der Patienten mit Blastenschub weisen eine Trisomie 21 auf. Meistens liegen zusätzlich zur Trisomie 21 eine oder mehrere Aberrationen der „major route„ vor. Weitere Aberrationen der „minor route„ sind ein Verlust des Y-Chromosoms sowie eine Monosomie 7 und 17 oder eine Trisomie 17. Die Translokation t(3;21)(q26;q22) ist die erste strukturelle Aberration, die bei den „minor route„-Veränderungen gefunden wurde. 1% der CML-Patienten mit myeloidem Blastenschub weisen dieses Rearrangement auf (Lafage-Pochitaloff-Huvalé et al., 1989).

Eine Trisomie 21 oder Translokationen, an denen Chromosom 21 beteiligt ist, finden sich auch bei der akuten myeloiden Leukämie (AML). Zu den primären Translokationen der AML gehören t(3;21)(q26;q22), t(8;21)(q22;q22) und t(16;21)(q11;q22) (Heim et al., 1995).

Das Gen *AML1* (Acute myelogenous leukemia 1) auf 21q22 scheint bei den Translokationen t(3;21)(q26;q22) und t(8;21)(q22;q22) involviert zu sein. *AML1* zeigt große Übereinstimmung mit dem für ein Kernprotein kodierenden Drosophila-Gen *runt* (Erickson et al., 1992). Auf 3q26 ist wahrscheinlich das Gen *EVI1* (ectropic viral integration site 1) von Bedeutung. Das durch die Translokation t(3;21) entstandene

Fusionsgen *AML1/EVI1* kodiert für einen chimären Transkriptionsfaktor, der vermutlich die Transformation von der chronischen Phase in die Blastenphase bei CML und von Myelodysplasie in akute myeloische Leukämie begünstigt (Russel et al., 1993; Mitani et al., 1994).

ETO (eight twenty-one) oder *MTG8* ist auf 8q22 lokalisiert und fungiert als DNA-bindendes Gen mit einem Zinkfingermotiv (Gao et al., 1991; Nisson et al., 1992).

Bei der Translokation t(16;21)(q11;q22) ist *ERG* (v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene related) beteiligt. *ERG*, ebenfalls auf 21q22 lokalisiert, gehört zur Familie der *ETS*-Onkogene (v-ets avian erythroblastosis virus oncogene homolog), die beim Ewing-Sarkom eine Rolle spielen (Shimizu et al., 1993).

Bei einer Patientenprobe der vorliegenden CML Serie war im CGH-Profil eindeutig ein Gewinn von Chromosom 20 abzulesen. In einem weiteren Fall fiel ein grenzwertiger Gewinn der Region 20q11-q12 auf und ebenfalls einmal ein nicht eindeutiger Verlust des gesamten Chromosoms 20. Amplifikationen von Chromosom 20 kommen bei CML selten vor. Su et al. (1999) fanden bei den von ihnen untersuchten 38 Patienten drei Fälle, die Gewinne an Chromosom 20 zeigten (8%). Eine Trisomie 20 wird in der Literatur vorwiegend bei Mamma-Karzinomen oder Hepatoblastomen beschrieben (Heim et al., 1995). Su et al. (1999) vermuten, dass Trisomie 20 eine Rolle in der Pathogenese der CML-Transformationsphase spielen könnte. Genauere Angaben über molekulargenetische Ergebnisse liegen zur Zeit noch nicht vor.

Monosomie 20 wird als numerische Aberration bei akuter lymphatischer Leukämie (ALL) beobachtet. Bei einigen ALL Fällen tritt der Verlust des Chromosom 20 als einzige nachweisbare Aberration auf (Heim et al., 1995).

Patient Nummer 21 besaß in der Serie von 27 CML-Patienten die meisten eindeutigen Aberrationen. Neben einem Zugewinn von Chromosom 6, 8 und 21q fiel vor allem ein Gewinn der Chromosomen 7, 10 und 13q auf. +7, +10 und +13q kamen in der Serie jeweils nur

einmal vor. Die vorliegenden Trisomien sind weder für „major route„-Veränderungen, noch für „minor route„-Veränderungen bei CML typisch.
Trisomie 7 wurde unter anderem bei Non-Hodgkin-Lymphomen, Mamma-Karzinomen, Astrozytomen, nicht-kleinzelligen Lungen-Karzinomen, Prostata-Karzinomen und Schilddrüsenadenomen beschrieben (Heim et al., 1995). Myeloiden Neoplasien wird eher eine Monosomie 7 zugerechnet. Heim et al. (1995) erläutern, dass es keine Anzeichen dafür gibt, dass eine Trisomie 7 auch bei hämatologischen Neoplasien auftritt. Gene auf Chromosom 7, die mit der Pathogenese der Tumore in Zusammenhang stehen könnten, sind noch nicht bekannt.
Trisomie 10 findet man oft als numerische Aberration in den hyperdiploiden Karyotypen der ALL. 8% einer untersuchten Patientenserie von 598 Kindern mit ALL wiesen eine Trisomie 10 auf (Raimondi et al., 1992).
Trisomie 13 zählt zu den primären Aberrationen der AML. Etwa 25% der AMLs weisen eine Trisomie 13 als einzige Aberration auf (Heim et al., 1995).
Insgesamt fiel bei der Auswertung der vergleichenden genomischen Hybridisierungen der vorliegenden CML-Patientenserie auf, dass die CGH-Profile keine Amplifikationen im strengen Sinne, d.h. mehrfache Gewinne, die über eine Trisomie hinausgehen, aufwiesen. CGH-Profile solider Tumore sind dagegen oft durch besonders vielfältige Muster und Amplifikationen charakterisiert (Kallioniemi et al., 1992; Isola et al., 1994). Diese Beobachtung konnte bei den untersuchten CML-Patienten nicht gemacht werden.
Literaturrecherchen ergaben drei Arbeiten, bei denen ebenfalls die Untersuchung sekundärer Aberrationen bei chronisch-myeloischer Leukämie durch CGH im Mittelpunkt der Analysen stand. 1997 veröffentlichten Rodley et al. ihre Ergebnisse. Gegenstand ihrer Studien war die bereits 1970 isolierte Zellinie einer Ph-Chromosom-positiven CML-Patientin im Blastenschub, K-562. Besonderes Augenmerk legten

Rodley et al. (1997) auf die Amplifikation der Regionen 13q31 und 9q31-q34. Eine Aberration von Chromosom 13 war zuvor in keiner der zahlreichen Untersuchungen von K-562 beschrieben worden. Auch in der vorliegenden Arbeit fand sich bei Patient Nummer 21 ein Gewinn des langen Arms von Chromosom 13.

Da die vergleichende genomische Hybridisierung von Rodley et al. (1997) einen Gewinn am langen Arm von Chromosom 9 zeigte, der über die Lokalisation des *ABL*-Gens auf 9q34 hinausging (+9q31-q34), vermuteten die Autoren hier keine Verbindung zur *BCR-ABL*-Rekombination. Sie mutmaßten vielmehr über die Beteiligung weiterer Gene auf 9q bei der Progression der CML. In der vorliegenden Arbeit fiel bei den CGH-Untersuchungen überwiegend die Region 9q34 auf. Bei den Patient Nummer 8 und 26 waren allerdings auch eine größere Region auf dem langen Arm von Chromosom 9 involviert. Es handelte sich einmal um einen Gewinn des ganzen langen Arms (Nummer 8) und einmal um den Gewinn der Region 9q21-q33 (Nummer 26).

Bei den CGH-Analysen von Gribble et al. (1999) bestätigte sich, dass eine der häufigsten sekundären Aberrationen bei CML das Chromosom 8 betrifft. Die Veränderungen präsentierten sich entweder als Trisomie 8, Isochromosom i(8q) oder Amplifikation einer bestimmten Region auf Chromosom 8. In jedem Fall lag aber ein Gewinn des langen Arms vor. In der vorliegenden CML-Patientenserie trat in 10 von 27 Fällen ein Gewinn des ganzen Chromosoms 8 auf (37%). In einem Fall aber handelte es sich nur um einen Gewinn der Region 8q22-qter (Nummer 19). Die CGH-Untersuchungen ermöglichen es, die relevanten Bereiche auf den Chromosomen besser einzugrenzen.

Su et al. (1999) stellten in ihrer Arbeit, bei der CML-Patientenproben in der Blastenkrise mittels Zytogenetik und CGH untersucht wurden, einen Gewinn der Region 1q12-21 besonders heraus. Die Amplifikation dieses Bereiches konnte durch die vergleichende genomische Hybridisierung bei einem Patienten der Serie aufgedeckt werden. Nachfolgende Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen ergaben bei drei Patientenproben

unterschiedliche Translokationen, in die jeweils die Region 1q12-21 involviert war. Die Partnerchromosomen waren Chromosom 10, 11 und 17. Su et al. (1999) zogen aus diesen Beobachtungen die Schlußfolgerung, dass auf der Region 1q12-21 wichtige Gene für die CML-Transformationsphase liegen könnten. In den vorliegenden Untersuchungen der 27 CML-Patienten zeigte sich ebenfalls einmal ein Gewinn des langen Arms von Chromosom 1 (Nummer 14). Dieser Befund schließt die bei Su et al. (1999) erwähnte kritische Region 1q12-21 ein.

5.2.3 Beurteilung uneinheitlicher CGH-Ergebnisse

Bei der untersuchten CML-Patientenserie fielen besonders die konträren Ergebnisse der CGH-Profilabweichungen der Chromosomen 1, 9, 19, 20 und 22 auf. Die betroffenen Chromosomenabschnitte lagen in meist gleichem Verhältnis zum Teil als Gewinn, zum Teil als Verlust vor. Die Frage trat auf, wie diese wechselnden Befunde zu bewerten sind.
Wie in Abschnitt 5.1.1 erläutert, weisen die Chromosomen bzw. die Regionen 1p32-pter, 16p, 19 und 22 oftmals CGH-Profile auf, die unterhalb der 1,0 Ratio liegen (Kallioniemi et al., 1994). Diese falsch positiven Ergebnisse, die auf GC-reichen Sequenzen dieser Chromosomenregionen zurückzuführen sind, werden in verschiedenen Arbeiten vollständig aus der Bewertung herausgenommen (Kallioniemi et al., 1994; Karhu et al., 1997).
Da in der hier untersuchten CML-Serie die Profile nicht nur Verluste darstellten, sondern die Uneinheitlichkeit der Ergebnisse auffiel, erscheint es nicht gerechtfertigt, die Abweichungen der Chromosomen 1, 16, 19 und 22 aus der Bewertung auszuschließen. Zudem zeigte Chromosom 16 in keinem der 27 untersuchten Fälle Profilabweichungen. Stattdessen trat die Region 9q34 dreimal (11%) als Verlust und zweimal (7%) als Gewinn in Erscheinung. 9q34 wird in der Literatur nicht als

Bereich erwähnt, der bei der CGH kritisch zu bewertende Resultate liefert.

Wenn man den Analysen von Kallioniemi et al. (1994) und Karhu et al. (1997) aber doch folgend die Verluste dieser Regionen nicht werten würde, blieben in vier Fällen der vorliegenden CML-Serie (15%) Gewinne von 1p32-p35 oder 1p32-p36, in zwei Fällen (7%) Gewinne von 9q34, in sechs Fällen (22%) Gewinne von Chromosom 19, in zwei Fällen (7%) Gewinne von Chromosom 20 und in drei Fällen (11%) Gewinne von Chromosom 22q11-q12 oder 22q11-q13. Diese Gewinne müßten als Hinweis auf möglicherweise dominant wirkende Tumorgene während der Progression gewertet werden.

Diese Folgerung widerspricht allerdings den Ergebnissen von Mori et al. (1997 und 1998). Mit Hilfe von Allelotyp-Analysen fanden sie bei 47% der 30 untersuchten Patienten im Blastenschub einen Allelverlust auf 1p. Sie vermuten ein Tumorsuppressorgen auf 1p36, das maßgeblich an der Transformation von chronischer zu akzelerierter Phase beteiligt ist. Interessanterweise zeigten die zytogenetischen Daten dieser LOH-positiven Patienten, trotz teilweise großer deletierter Bereiche, keinerlei Aberrationen dieser Region. Auch dieser Befund illustriert noch einmal den großen Unterschied in der Auflösung von Aberrationen, die einmal mit molekularen Methoden auf dem Niveau eines einzelnen Gens erreicht werden kann und die mit zytogenetischen Methoden maximal einen Teil einer ganzen chromosomalen Bande mit 5 Mb ausmacht.

In der vorliegenden Arbeit fiel auch die Region 9q34 wegen uneinheitlicher Ergebnisse auf. Entweder zeigten sich in diesem Telomerbereich Gewinne (3/27; 11%) oder Verluste (3/27; 11%). Wie in Abschnitt 5.2.2 beschrieben, verdient 9q34 vor allem wegen dem dort liegenden *ABL*-Gen Aufmerksamkeit. Bei Patient Nummer 17 ist der Gewinn von 9q34 und der Gewinn der Region 22q11-q13 im CGH-Profil als Ausdruck eines zweiten Ph-Chromosoms zu werten. Allerdings traten bei den Patientenproben Nummer 18, 20 und 27, bei denen in der Zytogenetik ebenfalls ein Doppel-Philadelphia beschrieben worden war,

diese Auffälligkeiten im CGH-Profil nicht auf. Dagegen war bei Patient Nummer 8 und 24 sowohl ein Gewinn der Region 9q34 als auch ein Gewinn der Region 22q11-q12 zu finden, obwohl in den zytogenetischen Daten kein Doppel-Philadelphia beschrieben worden war.
Leider gibt es keine verläßlich eingeführten molekularen Methoden, die in ähnlicher Weise durchgeführt werden können, wie die Darstellung der Deletionen bei LOH-Untersuchungen, um Gendosisunterschiede um den Faktor 2 sicher zu erfassen.
Wie die gegensätzlichen Ergebnisse letzten Endes auszuwerten sind, bleibt molekularen Untersuchungen vorbehalten. Festzuhalten ist, dass die Regionen 1p32-p36 und 9q34 sowie die Chromosomen 19, 20 und 22 für weitere Analysen der CML-Progression wichtig zu sein scheinen.

5.3 Vergleich und Bewertung von zytogenetischen Befunden und CGH-Ergebnissen

Nur in 15% der Fälle stimmen die CGH Daten vollständig mit den zytogenetischen Resultaten überein. In 44% der Fälle waren die Ergebnisse, die mit CGH ermittelt werden konnten, schon durch die Zytogenetik bekannt. Bei 6 von 27 Fällen (22%) waren in der Zytogenetik numerische Aberrationen beschrieben worden, die die CGH nicht erkannte.
Grundsätzlich sollte die Auflösungsgrenze für beide Methoden gleich sein. Jedoch erkennt man mit CGH keine Translokationen. Als Tumorzytogenetiker ist man geneigt, im Zusammenhang von Translokationen Imbalanzen zu erkennen. Das betrifft z.B. die bei den Patienten 7, 9 und 23 beschriebenen Deletionen del(22)(q11) oder auch die bei Patient 11 beschriebene Deletion del(19)(q11). Eine Deletion muß 10 – 20 Millionen bp lang sein, damit sie mit CGH erfaßt werden kann. Außerdem sind Verluste mit CGH grundsätzlich schlechter darstellbar als Gewinne (Houldsworth et al., 1994).

Als weiterer Grund, warum die CGH die erwarteten Aberrationen bei Patient Nummer 7, 9, 13, 23 und 27 nicht zeigte, wäre die Möglichkeit, dass nur eine Subpopulation von Zellen mit diesen Anomalien vorlag. Es ist bekannt, dass nur bestimmte Subpopulationen in vitro wachsen, die dann alleine den zytogenetischen Befund ergeben. Da die CGH Durchschnittswerte liefert, erfaßt sie nur die Aberrationen, die in einem bestimmten Mengenverhältnis vorhanden sind. So könnte erklärt werden, warum trotz zahlreicher, numerischer Aberrationen im Karyogramm bei Patient Nummer 27 das CGH-Profil fast vollständig blande ausfiel. Bei den vorliegenden Karyogrammen war zum Teil angegeben, wieviele Karyotypen ausgezählt worden sind. In Fall Nummer 27 wurde Klon 1 fünfmal, Klon 2 nur einmal, Klon 3 ebenfalls nur einmal und Klon 4 siebenmal ausgezählt (Karyogramme siehe Tabelle 2.1).

Diese Erklärungsversuche reichen jedoch nicht für alle Fallbeispiele aus. Bei Patient Nummer 9 waren in 11 Metaphasen eine Trisomie 8 und 22 beschrieben worden und bei Patient Nummer 27 fiel Klon 1 mit verschiedenen Kopienzahlveränderungen in immerhin 5 Metaphasen auf. Die CGH-Profile zeigten bis auf einen Zugewinn von Chromosom 8 bei Patient Nummer 9 und einen nicht eindeutigen Gewinn der Region 1p32-p36 bei Patient Nummer 27 keinerlei Abweichungen. CGH-Untersuchungen alleine, ohne zugrundeliegende zytogenetische Daten, hätten demnach in diesen beiden Fällen verschiedene numerische Aberrationen nicht erkannt.

Andererseits fielen mit der vergleichenden genomischen Hybridisierung bei 12 von 27 Fällen (44%) Imbalanzen auf, die in der Tumorzytogenetik nicht beschrieben worden waren. Dabei handelte es sich um numerische Aberrationen, die zum Teil eindeutig, zum Teil aber nur als grenzwertig zu bewerten waren. Besonders interessante und eindeutige Ergebnisse zeigten Patient Nummer 6 mit +2p14-pter, Nummer 8 mit +9q, Nummer 14 mit +1q, Nummer 19 mit –6p22-pter, +6p21-qter und +8q22-qter, Nummer 20 mit +21q21-qter, Nummer 22

mit –19, Nummer 24 mit +17q24-qter, Nummer 25 mit Isochromosom i(17q) und +19 sowie Nummer 26 mit –19 und +20.

Gewinne von Chromosom 8, 19 und 21 sowie das Auftreten eines Isochromosom i(17q) werden als typische sekundäre Aberrationen der CML angesehen (Heim et al., 1995). Die CGH-Analysen zeigten, dass bei den genannten Patienten nur bestimmte Regionen von den Veränderungen betroffen waren. Es ist deshalb denkbar, dass die vorliegenden CGH-Ergebnisse die entscheidenden Regionen der genetischen Aberrationen eingrenzen. Danach wäre bei der Trisomie 8 ein Gewinn der Region 8q22-qter (Nummer 19), bei der Trisomie 21 ein Gewinn der Region 21q21-qter (Nummer 20) und bei der Formation eines Isochromosoms i(17q) ein Gewinn der Region 17q24-qter (Nummer 24) für die Progression der CML ausschlaggebend.

Numerische Aberrationen an den Chromosomen 1, 2, 6, 9, 19, 20 und 22 gehören nicht zu den charakteristischen „major route„- oder „minor route„-Veränderungen der CML-Akzelerationsphase. Dennoch sollten die vorliegenden CGH-Ergebnisse nicht als Zufallsbefund gewertet werden, sondern vielmehr Anregung zu weiterführenden molekularen Untersuchungen sein.

Die vorgestellten Chromosomenzahlveränderungen wurden in den Befunden der Tumorzytogenetik nicht erwähnt. In diesen 9 von 27 Fällen (33%) ermöglichte es die vergleichende genomische Hybridisierung, den Karyotyp der CML-Patientenproben zu vervollständigen. Bei Patient Nummer 6 war allerdings eine Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung nötig, um das CGH-Profil zu verifizieren. Welche Art von Aberration sich hinter dem Gewinn von 1q, 6p11-p21, 6q und 8q22-qter sowie hinter dem Verlust von 6p22-pter verbarg, konnte ebenfalls nur mit FISH genauer bestimmt werden. Die Untersuchungen mit CGH gaben Hinweise auf aberrante Regionen, FISH ermöglichte die Zuordnung der beteiligten Chromosomen.

Bei drei von vier chronischen CML-Proben wurden mittels CGH Aberrationen sichtbar (Nummer 2, 3, 4), die in der zytogenetischen

Auswertung als einzige Aberration ein Ph-Chromosom aufwiesen. Dabei handelte es sich bei Patient Nummer 2 um einen Gewinn der Region 21q22, bei Patient Nummer 3 um Gewinne der Regionen 15q, 19p sowie 21q22 und bei Patient Nummer 4 um Verluste der Region 9q34 und 19p. Diese Aberrationen mußten zwar als nicht eindeutig eingestuft werden, könnten aber für die zytogenetische Diagnose – wenn sie sich durch weitere Untersuchungen wie z.B. FISH bestätigen würden - eine bedeutende Rolle spielen. Die mit CGH ermittelten zusätzlichen Aberrationen der Fälle Nummer 2, 3 und 4 sprächen somit nicht für die Diagnose „chronische CML„, sondern würden auf eine bereits akzelerierte Phase der Krankheit hindeuten.
Insgesamt stehen in dieser Serie von 27 Patienten neun Fällen (33%), bei denen die CGH mehr Informationen lieferte, sechs Fällen (22%), bei denen die Tumorzytogenetik mehr Informationen lieferte, gegenüber. Dabei ist zu beachten, dass die CGH lediglich numerische Aberrationen erfaßt, die zudem eine bestimmte Größe an Basenpaaren haben müssen. Balanzierte Translokationen wie z.B. das Ph-Chromosom oder Inversionen, wie bei Patient Nummer 16 im Karyotyp beschrieben, werden mit der vergleichenden genomischen Hybridisierung nicht registriert.

5.4 CGH in der CML-Diagnostik im Vergleich zur Zytogenetik und FISH-Analyse

Die Ergebnisse dieser Arbeit, bei der 27 CML-Patientenproben mittels CGH untersucht wurden, ergaben keine deutliche Überlegenheit dieser relativ neuen molekular-zytogenetischen Methode im Vergleich zur klassischen Tumorzytogenetik. Obwohl die Befunde der vergleichenden genomischen Hybridisierung bei 12 Fällen neue Aberrationen aufdecken konnten, bleibt die Tatsache bestehen, dass in sechs Fällen die CGH die zytogenetisch beschriebenen Imbalanzen nicht erkannte. Speziell bei

Fall Nummer 6 war zusätzlich die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung notwendig, um den im CGH-Profil nicht eindeutig auszuwertenden Gewinn von 2p14-pter nachzuprüfen.

Jede der drei in dieser Arbeit verwendeten Methoden hat ihre Vorteile und ihre Berechtigung. Die Einschränkungen der Tumorzytogenetik liegen vor allem darin, dass nur die Zellen untersucht werden können, die in Kultur wachsen und, dass nur die Zellen karyotypisiert werden können, die auch tatsächlich analysierbare Metaphasen liefern. Die Tumorzytogenetik macht damit letztlich immer nur einen Ausschnitt der Chromosomenaberrationen sichtbar und erfaßt das neoplastische Geschehen nicht vollständig.

Mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung können gezielt aberrante Chromosomen überprüft werden. Um zu wissen, welche Sonden eingesetzt werden müssen, bedarf es aber einer Voruntersuchung, z.B. mittels Zytogenetik oder CGH.

Die vergleichende genomische Hybridisierung bietet die Möglichkeit, alle Zellen zu erfassen und einen Überblick über das gesamte Genom zu erhalten. Ihr Nachteil ist allerdings, dass nur Imbalanzen dargestellt werden können. Balanzierte Translokationen, wie sie häufig bei hämatologischen Neoplasien zu finden sind, werden nicht erfaßt. Deshalb sind CGH-Untersuchungen in der chronischen Phase der CML, wenn nur der Nachweis des Philadelphia-Chromosoms entscheidend ist, nicht sinnvoll.

Bei Überlegungen zur bestmöglichen Diagnostik müssen auch praktische Argumente erwogen werden. Die vergleichende genomische Hybridisierung ist eine relativ zeitaufwendige und teure Methode. Die Befunde der klassischen Tumorzytogenetik und der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung sind schneller und zum Teil auch kostengünstiger zu bekommen.

CGH-Untersuchungen haben aber durchaus ihre Berechtigung in einem wissenschaftlichen Labor, wenn es darum geht, die für die Akzelerationsphase und den Blastenschub verantwortlichen

Aberrationen zu erfassen. Bisher sind unter anderem eine Trisomie 8 und 19 und ein Isochromosom i(17q) beschrieben. Welche Gene auf diesen Chromosomen sind entscheidend? Möglicherweise gelingt es, durch fortgesetzte CGH-Untersuchungen solcher Patienten in der Progressionsphase, die Regionen auf den betroffenen Chromosomen besser einzugrenzen. Vielleicht spielen die 1p-Aberrationen, die in dieser Arbeit häufig beobachtet wurden, doch eine größere Rolle.

Die vergleichende genomische Hybridisierung wird seit 1992 angewendet. Die Forschung ist bemüht, die Methode laufend zu verbessern (Kallioniemi et al., 1994). Zukünftige Aufgaben sind die Verbesserung der Sensitivität beim Erkennen von Aberrationen, die nur eine geringe Zahl von Basenpaaren betreffen, und die Verbesserung der Kontinuität von Profilabweichungen (siehe Abschnitt 5.2.3). Die derzeit begrenzten Einsatzmöglichkeiten von CGH in der CML-Diagnostik könnten sich demzufolge in den kommenden Jahren vergrößern.

Im Moment wertet die Abteilung Tumorzytogenetik der Universität Ulm die Patientenproben mit Hilfe der klassischen Zytogenetik aus. Bei Unklarheiten wird die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung ergänzend angewendet.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kombination der beiden Methoden Tumorzytogenetik und vergleichende genomische Hybridisierung es ermöglicht, ein weites Spektrum chromosomaler Aberrationen zu erfassen. Bei allen 27 CML-Patienten dieser Serie waren Anomalien zu finden. Durch Einsatz der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung eröffnete sich zudem die Möglichkeit, Unklarheiten nachzuprüfen und genauer zu charakterisieren.

Da die Vorteile jeder dieser drei Methoden in anderen Bereichen liegen, erscheint die Kombination der verschiedener Techniken das beste Verfahren zur Erfassung möglichst aller Aberrationen.

Die Möglichkeit, mittels CGH mehr genetische Aberrationen der CML zu erfassen als mit Zytogenetik allein, bedeutet, dass die Krankheit hinsichtlich der Komplexität ihrer genetischen Veränderungen besser

analysiert werden kann. Das Ziel, die molekular-genetischen Prozesse bei der chronisch-myeloischen Leukämie zu verstehen, setzt die Kenntnis der aberranten Chromosomen bzw. Chromosomenabschnitte voraus. Die vergleichende genomische Hybridisierung bietet sich somit nicht als Ersatz, sondern als Ergänzung zur zytogenetischen Untersuchung an, um in Zukunft diagnostische und prognostische Aussagen verbessern zu können.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden 27 Blut- bzw. Knochenmarkproben von CML-Patienten mit der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) untersucht. Fünf Patienten befanden sich in der chronischen Phase der CML, 22 Patienten in der akzelerierten Phase. Bei 11 Patienten der Transformationsphase war ein Blastenschub diagnostiziert worden.

Mit Hilfe der CGH wurde das Patientenmaterial auf chromosomale Aberrationen bezüglich der Krankheitsphase untersucht. Die Ergebnisse der molekular-zytogenetischen Analyse wurden mit den bereits vorliegenden zytogenetischen Befunden verglichen. Um nicht eindeutige Ergebnisse der CGH-Auswertung nachzuprüfen, wurden bei drei Patientenproben Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen (FISH) durchgeführt.

In 4 von 27 Fällen (15%) stimmten die zytogenetischen Daten mit den CGH Ergebnissen vollständig überein. In 12 von 27 Fällen (44%) waren die CGH-Profilabweichungen bereits in den Karyogrammen der Tumorzytogenetik beschrieben worden. Bei 6 von 27 Proben (22%) waren in der Zytogenetik numerische Aberrationen beschrieben worden, die die CGH nicht erkannte. Andererseits fielen mit der vergleichenden genomischen Hybridisierung bei 12 von 27 Proben (44%) Imbalanzen auf, die in der Tumorzytogenetik nicht beschrieben worden waren.

Alle nicht eindeutigen CGH-Ergebnisse, bei denen eine Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung durchgeführt wurde, konnten mittels FISH bestätigt werden.

In der untersuchten CML-Patientenserie war es möglich, die Vorzüge sowie die Nachteile der CGH im Vergleich zur klassischen Tumorzytogenetik darzustellen. Eine Kombination der drei Methoden Zytogenetik, CGH und FISH-Analyse erlaubt eine umfassende Darstellung der genetischen Veränderungen bei der chronisch-myeloischen Leukämie.

Literaturverzeichnis

Ahuja H, Bar-Eli M, Arlin Z, Advani S, Allen SL, Goldman J, Snyder D, Foti A, Cline M: The spectrum of molecular alterations in the evolution of chronic myelocytic leukemia. The Journal of Clinical Investigation 87: 2042-2047 (1991)

Alimena G, Dallapiccola B, Mitelman F, Montuoro A: Aberrations of chromosome No. 1 in blastic phase of chronic myeloid leukemia. Heredias 92: 59-63 (1980)

Asimakopoulos FA, Holloway TL, Nacheva EP, Scott MA, Fenaux P, Green AR: Detection of chromosome 20q deletions in bone marrow metaphases but not peripheral blood granulocytes in patients with myleoproliferative disorders or myleodysplastic syndromes. Blood 87: 1561-1570 (1996)

Berger R, Bernheim A: Cytogenetic studies of Sézary cells. Cancer Genetics and Cytogenetics 27: 79-87 (1987)

Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJR, Ellis A, Gorman P, Lucibello FC, Murday VA, Rider SH, Scambler P, Sheer D, Solomon E, Spurr NK: Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromsome 5. Nature 328: 614-616 (1987)

Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B: Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. Nature 327: 293-297 (1987)

Boveri T: Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Fischer, Jena, S. 1, 4, 23, 59 (1914)

Breuer M: The use of transgenic mice in unraveling the multistep process of tumorigenesis. Radiation and Environmental Biophysics 30: 181-183 (1991)

Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, Tannergård P, Bollag RJ, Godwin AR, Ward DC, Nordenskjøld M, Fishel R, Kolodner R, Liskay RM: Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon caner. Nature 368: 259-261 (1994)

Campbell ML, Arlinghaus RB: Current status of the BCR gene and ist involvement with human leukemia. Advances in Cancer Research 57: 227-256 (1991)

Cannistra SA: Chronic myelogenous leukemia as a model for the genetic basis of cancer. Hematology/Oncology Clinics of North America 4: 337-357 (1990)

Carbone P, Barbata G, Santoro A, Giglio MC, Mirto S, Granata G: t(1;2), inv(1) and trisomy 1q during the blastic phase of Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia. Acta haematologica 77: 198-202 (1987)

Carroll AJ, Crist WM, Parmley RT, Roper M, Cooper MD, Finley WH: Pre-B cell leukemia associated with chromosome translocation 1;19. Blood 63: 721-724 (1984)

Cavenee WK, White RL: The genetic basis of cancer. Scientific American 272: 72-79 (1995)

Cooper GM: Activation of transforming genes in neoplasms. The British Journal of Cancer 50: 137-142 (1984)

Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D: Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the $P210^{bcr/abl}$ gene of the Philadelphia chromosome. Science 247: 824-830 (1990)

Daley GQ, Ben-Neriah Y: Implicating the bcr/abl gene in the pathogenesis of Philadelphia chromosome-positive human leukemia. Advances in Cancer Research 57: 151-184 (1991)

Davis RL, Konopka JB, Witte ON: Activation of the c-abl oncogene by viral transduction or chromosomal translocation generates altered c-abl proteins with similar in vitro kinase properties. Molecular and Cellular Biology 5: 204-213 (1985)

Dreazen O, Canaani E, Gale RP: Molecular biology of chronic myelogenous leukemia. Seminars in Hematology 25: 35-49 (1988)

Elefanty AG, Hariharan IK, Cory S: bcr-abl, the hallmark of chronic myeloid leukaemia in man, induces multiple haemopoietic neoplasms in mice. The EMBO Journal 9: 1069-1078 (1990)

Erickson P, Gao J, Chang KS, Look T, Whisenant E, Raimondi S, Lasher R, Trujillo J, Rowley J, Drabkin H: Identification of breakpoints in t(8;21) acute myelogenous leukemia and isolation of a fusion transcript, AML1/ETO, with similarity to Drosophila segmentation gene runt. Blood 80: 1825-1831 (1992)

Evan GI, Littlewood TD: The role of c-myc in cell growth. Current Opinion in Genetics and Development 3: 44-49 (1993)

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

Fearon ER: Molecular genetic studies of the adenoma-carcinoma sequence. Advances in Internal Medicine 39: 123-147 (1994)

Feinstein E, Cimino G, Gale RP, Alimena G, Berthier R, Kishi K, Goldman J, Zaccaria A, Berrebi A, Canaani E: p53 in chronic myelogenous leukemia in acute phase. Proceedings of the National Academy of Sciences 88: 6293-6297 (1991)

Feinstein E, Cimino G, Gale RP, Canaani E: Initiation and progression of chronic myelogenous leukemia. Leukemia 6, Suppl. 1: 37-43 (1992)

Fialkow PJ, Jacobson RJ, Papayannopoulou T: Chronic myelocytic leukemia: Clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. The American Journal of Medicine 63: 125-130 (1977)

Fioretos T, Strömbeck B, Sandberg T, Johansson B, Billström R, Borg Å, Nilsson PG, van den Berghe H, Hagemeijer A, Mitelmann F, Höglund M: Isochromosome 17q in blast crisis of chronic myeloid leukemia and in other hematologic malignancies is the result of clustered breakpoints in 17p11 and is not associated with coding TP53 mutations. Blood 94: 225-232 (1999)

Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R: The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. Cell 75: 1027-1038 (1993)

Forozan F, Karhu R, Kononen J, Kallioniemi A, Kallioniemi OP: Genome screening by comparative genomic hybridization. Trends in Genetics 13: 405-409 (1997)

Gao J, Erickson P, Gardiner K, Le Beau MM, Diaz MO, Patterson D, Rowley JD, Drabkin HA: Isolation of a yeast artificial chromosome spanning the 8;21 translocation breakpoint t(8;21)(q22;q22.3) in acute myelogenous leukemia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88: 4882-4886 (1991)

Gebhart E: Tumorzytogenetik. Schattauer, Stuttgart - New York, S. 17-23, 127-160 (1989)

Gilbert F, Feder M, Balaban G, Brangman D, Lurie DK, Podolsky R, Rinaldt V, Vinikoor N, Weisband J: Human neuroblastomas and abnormalities of chromosomes 1 and 17. Cancer Research 44: 5444-5449 (1984)

Goldberg YP, Parker MI, Gevers W: The genetic basis of cancer. South African Medical Journal 80: 99-104 (1991)

Golde DW, Burgaleta C, Sparkes RS, Cline MJ: The Philadelphia chromosome in human macrophages. Blood 49: 367-370 (1977)

Goldman JM, Th´ng KH, Lowenthal RM: In vitro colony forming cells and colony stimulating factor in chronic granulocytic leukaemia. The British Journal of Cancer 30: 1-12 (1974)

Gribble SM, Sinclair PB, Grace C, Green AR, Nacheva EP: Comparative analysis of G-banding, chromosome painting, locus-specific fluorescence in situ hybridization, and comparative genomic hybridization in chronic myeloid leukemia blast crisis. Cancer Genetics and Cytogenetics 111: 7-17 (1999)

Griesshammer M, Hehlmann R, Hochhaus A, Talpaz M, Tura S, Stryckmans P, Allan NC, Tanzer J, Kolb HJ, Heimpel H: Interferon in chronic myeloid leukemia. Annals of Hematology 67: 101-106 (1993)

Griesshammer M, Heinze B, Hellmann A, Popp C, Anger B, Heil G, Bangerter M, Heimpel H: Chronic myelogenous leukemia in blast crisis: Retrospective analysis of prognostic factors in 90 patients. Annals of Hematology 73: 225-230 (1996)

Griesshammer M, Heinze B, Bangerter M, Heimpel H, Fliedner TM: Karyotype abnormalities and their clinical significance in blast crisis of chronic myeloid leukemia. Journal of Molecular Medicine 75: 836-838 (1997)

Hafez M, El-Meadday M, Sheir M, Al-Tonbarry Y, Nada N, El-Desoky I: Chromosomal analysis of neuroblastoma. The British Journal of Cancer 51: 237-243 (1985)

Handa H, Hegde UP, Kotelnikov VM, Mundle SD, Dong LM, Burke P, Rose S, Gaskin F, Raza A, Preisler HD: BCR-2 and c-MYC expression, cell cycle kinetics and apoptosis

during the progression of chronic myelogenous leukemia from diagnosis to blastic phase. Leukemia Research 21: 479-489 (1997)

Heim S, Mitelman F: Cancer Cytogenetics. Wiley-Liss, New York (1995)

Houldsworth J, Chaganti RSK: Comparative genomic hybridization: An overview. American Journal of Pathology 145: 1253-1260 (1994)

Huret JL, Schoenwald M, Brizard A, Guilhot F, Vilmer E, Tanzer J: Chromosome 6p rearrangements appear to be secondary changes in various haematological malignancies. Leukemia Research 13: 819-824 (1989)

Ichimaru M, Tomonaga M, Amenomori T, Matsuo T: Atomic bomb and leukemia. Journal of Radiation Research 32, Suppl. 2: 14-19 (1991)

Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M: Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. Nature 363: 558-561 (1993)

Isola J, DeVries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F: Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. American Journal of Pathology 145: 1301-1308 (1994)

Jacobs A: Benzene and leukemia. British Journal of Haematology 72: 119-121 (1989)

Jadayel D, Calabrese G, Min T, van Rhee F, Swansbury GJ, Dyer MJS, Maitland J, Halka G, Catovsky D: Molecular cytogenetics of chronic myeloid leukemia with atypical t(6;9)(p23;q34) translocation. Leukemia 9: 981-987 (1995)

Jennings BA, Mills KI: c-myc locus amplification and the acquisition of trisomy 8 in the evolution of chronic myeloid leukaemia. Leukemia Research 22: 899-903 (1998)

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

Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D: Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequences copy number changes in solid tumors. Genes, Chromosomes & Cancer 10: 231-243 (1994)

Kantarjian HM, Keating MJ, Talpaz M, Walters RS, Smith TL, Cork A, McCredie KB, Freireich EJ: Chronic myelogenous leukemia in blast crisis. The American Journal of Medicine 83: 445-454 (1987)

Karhu R, Kähkönen M, Kuukasjärvi T, Pennanen S, Tirkkonen M, Kallioniemi O: Quality Control of CGH: Impact of metaphase chromosomes and the dynamic range of hybridization. Cytometry 28: 198-205 (1997)

Kloke O, Niederle N, Qiu JY, Wandl U, Moritz T, Nagel-Hiemke M, Hawig I, Opalka B, Seeber S, Becher R: Impact of interferon alpha-induced cytogenetic improvement on survival in chronic myelogenous leukaemia. British Journal of Haematology 83: 399-403 (1993)

Knudson AG: Antioncogenes and human cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences 90: 10914-10921 (1993)

Konopka JB, Watanabe SM, Witte ON: An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. Cell 37: 1035-1042 (1984)

Konopka JB, Watanabe SM, Singer JW, Collins SJ, Witte ON: Cell lines and clinical isolates derived from Ph^1-positive chronic myelogenous leukemia patients express c-abl proteins with a common structural alteration. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 82: 1810-1814 (1985)

Kurzrock R, Shtalrid M, Romero P, Kloetzer WS, Talpas M, Trujillo JM, Blick M, Beran M, Gutterman JU: A novel c-abl protein product in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia. Nature 325: 631-635 (1987)

Kurzrock R, Kantarjian HM, Shtalrid M, Gutterman JU, Talpaz M: Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia without breakpoint cluster region rearrangement: a chronic myeloid leukemia with a distinct clinical course. Blood 75: 445-452 (1990)

Kurzrock R, Talpaz M: The molecular pathology of chronic myelogenous leukaemia. British Journal of Haematology 79, Suppl. 1: 34-37 (1991)

Lafage-Pochitaloff-Huvalé M, Sainty D, Adriaanssen HJ, Lopez M, Maraninchi D, Simonetti J, Mannoni P, Carcassonne Y, Hagemeijer A: Translocation (3;21) in Philadelphia positive chronic myeloid leukemia: High resolution chromosomal analysis and immunological study on five new cases. Leukemia 3: 554-559 (1989)

Lakkala-Paranko T, Franssila K, Lappalainen K, Leskinen R, Knuutila S, de la Chapelle A, Bloomfield CD: Chromosome abnormalities in peripheral T-cell lymphoma. British Journal of Haematology 66: 451-460 (1987)

Landegent JE, Jansen in de Wal N, Dirks RW, Baas F, van der Ploeg M: Use of whole cosmid cloned genomic sequences for chromosomal localization by non-radioactive in situ hybridization. Human Genetics 77: 366-370 (1987)

Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC: Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybrdization using recombinant DNA libraries. Human Genetics 80: 224-234 (1988)

LIFE TECHNOLOGIES (Hrsg.): GIBCO BRL - 1996-97 Produktkatalog für die Molekularbiologie und Zellbiologie, S. 75 (1996)

Lindblom A, Tannergård P, Werelius B, Nordenskjöld M: Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. Nature Genetics 5: 279-282 (1993)

Lisker R, Casas L, Mutchinick O, Pérez-Chávez F, Labardini J: Late-appearing Philadelphia chromosome in two patients with chronic myelogenous leukemia. Blood 56: 812-814 (1980)

Martin PJ, Najfeld V, Hansen JA, Penfold GK, Jacobson RJ, Fialkow PJ: Involvement of the B-lymphoid system in chronic myelogenous leukaemia. Nature 287: 49-50 (1980)

McCarthy DM, Rassool FV, Goldman JM, Graham SV, Birnie GD: Genomic alterations involving the c-myc proto-oncogene locus during the evolution of a case of chronic granulocytic leukaemia. The Lancet 2: 1362-1365 (1984)

McGlave P: Bonde marrow transplants in chronic myelogenous leukemia: An overview of determinants of survival. Seminars in Hematology 27, Suppl. 4: 23-30 (1990)

Michael PM, Levin MD, Garson OM: Translocation 1;19 – A new cytogenetic abnormality in acute lymphocytic leukemia. Cancer Genetics and Cytogenetics 12: 333-341 (1984)

Mitani K, Ogawa S, Tanaka T, Miyoshi H, Kurokawa M, Mano H, Yazaki Y, Ohki M, Hirai H: Generation of the AML1-EVI-1 fusion gene in the t(3;21)(q26;q22) causes blastic crisis in chronic myelocytic leukemia. The EMBO Journal 13: 504-510 (1994)

Moore II DH, Pallavicini M, Cher ML, Gray JW: A t-Statistic for objektive interpretation of comparative genomic hybridization (CGH) profiles. Cytometry 28: 183-190 (1997)

Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA: Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Experimental Cell Research 20: 613-616 (1960)

Mori N, Morosetti R, Lee S, Spira S, Ben-Yehuda D, Schiller G, Landolfi R, Mizoguchi H, Koeffler HP: Allelotype analysis in the evolution of chronic myelocytic leukemia. Blood 90: 2010-2014 (1997)

Mori N, Morosetti R, Spira S, Lee S, Ben-Yehuda D, Schiller G, Landolfi R, Mizoguchi H, Koeffler HP: Chromosome band 1p36 contains a putative tumor suppressor gene important in the evolution of chronic myelocytic leukemia. Blood 92: 3405-3409 (1998)

Nanjangud G, Kadam PR, Saikia T, Bhisey AN, Kumar A, Gopal R, Chopra H, Nair CN, Advani SH: Karyotypic findings as an independent prognostic marker in chronic myeloid leukaemia blast crisis. Leukemia Research 18: 385-392 (1994)

Naumann S, Reutzel D, Brieger J, Reifenrath C, Fischer T, Huber C, Decker HJH: Comparative genomic hybridization reveals a novel aspect of tumor cell type specific progression in blast crisis of chronic myelogenous leukemia (Abstract). Cytogenetic Cell Genetic 85: 81 (1999)

Nisson PE, Watkins PC, Sacchi N: Transcriptionally active chimeric gene derived from the fusion of the AML1 gene and a novel gene on chromosome 8 in t(8;21) leukemic cells. Cancer Genetics and Cytogenetics 63: 81-88 (1992)

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

Nowell PC, Hungerford DA: A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science 132: 1497 (1960)

Oshimura M, Sonta S, Sandberg AA: Brief Communication: Trisomy of the long arm of chromosome #1 in human leukemia. Journal of the National Cancer Institute 56: 183-184 (1976)

Pasquali F, Panarello C, Bernasconi P, Casalone R: The isochromosome (17q) in chronic myelocytic leukaemia: Mechanism of origin, centromeric function and clonal evolution. Human Genetics 62: 89-90 (1982)

Peltomäki P, Aaltonen LA, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Green JS, Jass JR, Weber JL, Leach FS, Petersen GM, Hamilton SR, de la Chapelle A, Vogelstein B: Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. Science 260: 810-812 (1993)

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

Rastrick JM, Fitzgerald PH, Gunz FW: Direct evidence for presence of Ph^1 chromosmoe in erythroid cells. British Medical Journal 1: 96-98 (1968)

Rodley P, McDonald M, Price B, Fright R, Morris C: Comparative genomic hybridization reveals previously undescribed amplifications and deletions in the chronic myeloid leukemia-derived K-562 cell line. Genes, Chromosomes & Cancer 19: 36-42 (1997)

Rothberg PG, Erisman MD, Diehl RE, Rovigatti UG, Astrin SM: Structure and expression of the oncogene c-myc in fresh tumor material from patients with hematopoietic malignancies. Molecular and Cellular Biology 4: 1096-1103 (1984)

Russel M, Thompson F, Spier C, Taetle R: Expression of the EVI1 gene in chronic myelogenous leukemia in blast crisis. Leukemia 7: 1654-1657 (1993)
Schuh AC, Sutherland DR, Horsfall W, Mills GB, Dube I, Baker MA, Siminovitch K, Bailey D, Keating A: Chronic myeloid leukemia arising in a progenitor common to T cells and myeloid cells. Leukemia 4: 631-636 (1990)

Serra A, Gottardi E, Ragione FD, Saglio G, Iolascon A: Involvement of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor (CDKN2) gene in the pathogenesis of lymphoid blast

crisis of chronic myelogenous leukaemia. British Journal of Haematology 91: 625-629 (1995)

Shapiro PE, Warburton D, Berger CL, Edelson RL: Clonal chromosomal abnormalities in cutaneous T-cell lymphoma. Cancer Genetics and Cytogenetics 28: 267-276 (1987)

Shiloh Y, Mor O, Manor A, Bar-Am I, Rotman G, Eubanks J, Gutman M, Ranzani GN, Houldsworth J, Evans G, Avivi L: DNA sequences amplified in cancer cells: An interface between tumor biology and human genome analysis. Mutation Research 276: 329-337 (1992)

Shimizu K, Ichikawa H, Tojo A, Kaneko Y, Maseki N, Hayashi Y, Ohira M, Asano S, Ohki M: An ets-related gene, ERG, is rearranged in human myeloid leukemia with t(16;21) chromosomal translocation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90: 10280-10284 (1993)

Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Roe BA, Canaani E: Alternative splicing of RNAs transcribed from the human abl gene and from the bcr-abl fused gene. Cell 47: 277-284 (1986)

Sill H, Goldman JM, Cross NCP: Homozygous deletions of the p16 tumor-suppressor gene are associated with lymphoid transformation of chronic myeloid leukemia. Blood 85: 2013-2016 (1995)

Sokal JE, Gomez GA, Baccarani M, Tura S, Clarkson BD, Cervantes F, Rozman C, Carbonell F, Anger B, Heimpel H, Nissen NI, Robertson JE: Prognostic significance of additional cytogenetic abnormalities at diagnosis of Philadelphia chromosome-positive chronic granulocytic leukemia. Blood 72: 294-298 (1988)

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

Strand D, Unger S, Corvi R, Hartenstein K, Schenkel H, Kalmes A, Merdes G, Neumann B, Krieg-Schneider F, Coy JF, Poustka A, Schwab M, Mechler BM: A human homologue of the Drosophila tumour suppressor gene l(2)gl maps to 17p11.2-12 and codes for a cytoskeletal protein that assocites with nonmuscle myosin II heavy chain. Oncogene 11: 291-301 (1995)

Su XY, Wong N, Cao Q, Yu LZ, Niu C, Wickham N, Johnson P, Chen Z, Chen SJ: Chromosomal aberrations during progression of chronic myeloid leukemia identified by cytogenetic and molecular cytogenetic tools: Implication of 1q12-21. Cancer Genetics and Cytogenetics 108: 6-12 (1999)

Thibodeau SN, Bren G, Schaid D: Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. Science 260: 816-819 (1993)

Tjio JH, Levan A: The chromosome number in man. American Journal of Obstetrics and Gynecology 130: 722-724 (1978)

Van der Plas DC, Hermans ABC, Soekarman D, Smit EME, de Klein A, Smadja N, Alimena G, Goudsmit R, Grosveld G, Hagemeijer A: Cytogenetic and molecular analysis in Philadelphia negative CML. Blood 73: 1038-1044 (1989)

Verma RS, Babu A: Human Chromosomes – Principles and Techniques. McGraw-Hill, New York, S. 6-14, 191-210 (1994)

Vogel F, Motulsky AG: Human Genetics – Problems and Approaches. Springer, Berlin - Heidelberg - New York, S. 28, 440-452 (1997)

Vogelstein B, Kinzler KW: The multistep nature of cancer. Trends in Genetics 9: 138-141 (1993)

Whang J, Frei III E, Tjio JH, Carbone PP, Brecher G: The distribution of the Philadelphia chromosome in patients with chronic myelogenous leukemia. Blood 22: 664-673 (1963)

Whang-Peng J, Lee E, Knutsen T, Solanki D: Dicentric isochromosome for the long arm of chromosome #17, dic i(17q), in a patient with chronic myelogenous leukemia (CML). Cancer Genetics and Cytogenetics 3: 233-236 (1981)

Yunis JJ: High resolution of human chromosomes. Science 191: 1268-1270 (1976)
Zhao Q, Chen KS, Bejjani BA, Lupski JR: Cloning, genomic structure, and expression of mouse ring finger protein gene Znf179. Genomics 49: 394-400 (1998)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Humangenetik der Universität Ulm unter der wissenschaftlichen Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Vogel und Herrn Prof. Dr. H. Hameister durchgeführt.
Herrn Prof. Dr. W. Vogel danke ich für die Aufnahme in die Abteilung Humangenetik und für die sehr guten Möglichkeiten, das Thema zu bearbeiten.
Bei Herrn Prof. Dr. H. Hameister möchte ich mich für die Überlassung des Themas, die Hilfestellung bei der Durchführung der Versuche und die intensive Betreuung während der ganzen Arbeitszeit sehr herzlich bedanken. Die rasche und kritische Durchsicht dieser Arbeit war eine große Hilfe.
Mein Dank gilt auch Frau Dr. Barbara Heinze, die besonders bei Fragen zur Tumorzytogenetik immer Zeit für ein Gespräch hatte und mich oft mit wertvollen Vorschlägen unterstützte.
Außerordentlich zu schätzen weiß ich den Einsatz von Frau Antje Kollak bei der Einarbeitung in die verschiedenen Arbeitstechniken und die praktischen Hinweise, die zum Gelingen der Experimente beigetragen haben.
Ein Dankeschön auch an Herrn Ralf Kemmerling für die Hilfsbereitschaft beim Erlernen der Computerprogramme.
Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Abteilung, besonders Frau Beate Fischer, Frau Alexandra Killian, Frau Antje Kollak, Frau Bettina Schreiner und Frau Dr. Monika Wilda für das freundliche und kooperative Arbeitsklima bedanken.

Lebenslauf

Name		Ines Nicole Hahntow
Geburtsdatum		21. Dezember 1975
Geburtsort		Fürstenfeldbruck
Schulausbildung	1982 bis 1986	Grundschule Herrsching/Ammersee
	1986 bis 1995	Christoph-Probst-Gymnasium Gilching
	30. Juni 1995	Allgemeine Hochschulreife
Studium	WS 1995/96 bis SS 1997	Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig
	WS 1997/98 bis SS 2000	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
	Seit WS 2000/01	Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München
Examina	10.09.1997	Ärztliche Vorprüfung in Leipzig
	18.09.1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Ulm
	04.09.2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Ulm
Promotions-arbeit	seit Dezember 1998	Doktorarbeit bei Prof. Dr. H. Hameister in der Abteilung Humangenetik der Universität Ulm

München, 08. September 2001

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ulm, 08. Juli 2000