

**„Transformation, Progression und Zellinienspezifität der
chronischen myeloischen Leukämie. Zytogenetische und
molekular-zytogenetische Untersuchungen“**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Sabine Naumann
geb. in Georgsmarienhütte

Mainz, 2000

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juni 2001

1. EINLEITUNG	1
1.1 MECHANISMEN DER TUMORENTSTEHUNG.....	1
1.2 CHRONISCHE MYELOISCHE LEUKÄMIE.....	3
1.2.1 <i>Klinische Merkmale</i>	3
1.2.2 <i>Zytogenetik</i>	4
1.2.3 <i>Molekulargenetik</i>	7
1.2.4 <i>Transformation durch die BCR/ABL-Fusion</i>	9
1.2.5 <i>Progression</i>	10
1.2.6 <i>Diagnostik</i>	11
1.2.7 <i>Die CML-Zelllinie K562</i>	13
1.3 KLASSISCHE UND MOLEKULARE ZYTOGENETIK.....	15
1.3.1 <i>Fluoreszenz in situ Hybridisierung</i>	16
1.3.2 <i>Comparative genomische Hybridisierung</i>	18
1.3.3 <i>Multiplex-Fluoreszenz in situ Hybridisierung</i>	22
1.4 ZIELSETZUNG.....	26
2. MATERIAL UND METHODE	27
2.1 CML-ZELLINIE K562.....	27
2.2 CML-BLASTENKRISEN.....	27
2.3 MATERIAL.....	30
2.3.1 <i>Zellseparation</i>	30
2.3.2 <i>Konventionelle und molekulare Zytogenetik</i>	32
2.3.3 <i>Verwendete DNA-Proben</i>	36
2.3.4 <i>Geräte</i>	37
2.4 ZELLSEPARATION AUS PERIPHEREM BLUT.....	39
2.4.1 <i>Isolierung der mononukleären Zellen aus peripherem Blut</i>	39
2.4.2 <i>Gewinnung der T-Lymphozyten über Erythrozyten-Rosettierung</i>	40
2.4.3 <i>Separierung CD34-positiver (CD34+-) Stammzellen</i>	41
2.4.4 <i>Separierung der neutrophilen Granulozyten</i>	42
2.4.5 <i>Gewinnung von Monozyten über immunomagnetische Positivselektion</i>	42
2.4.6 <i>Gewinnung von Monozyten über CD14-MicroBeads</i>	43
2.4.7 <i>Durchflußzytometrische Analyse der Reinheit der Zellpopulationen</i>	44
2.5 ZELLKULTIVIERUNG UND ERNTUNG KULTIVierter ZELLEN.....	45
2.5.1 <i>Ansatz der Kulturen aus peripherem Blut</i>	45
2.5.2 <i>Ansatz und Betreuung von Kulturen aus kryokonservierten Zellen der CML-Zelllinie K562</i>	45
2.5.3 <i>Erntung von Kulturen aus peripherem Blut sowie der CML-Zelllinie K562</i>	46
2.6 G-BANDENFÄRBUNG.....	47
2.7 FLUORESCENZ <i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNG (FISH).....	48
2.7.1 <i>Vorbereitung und Denaturierung der Präparate</i>	48
2.7.2 <i>Vorbereitung und Denaturierung der DNA-Proben</i>	49
2.7.3 <i>Hybridisierung</i>	49
2.7.4 <i>Waschen (und Detektion bei indirekter Markierung)</i>	50
2.7.5 <i>Auswertung der FISH</i>	51
2.8 COMPARATIVE GENOMISCHE HYBRIDISIERUNG (CGH).....	52
2.8.1 <i>DNA-Extraktion</i>	52
2.8.2 <i>Nick-Translation zur Markierung von Test- und Referenz-DNA</i>	53
2.8.3 <i>Fällung der markierten DNA</i>	54

2.8.4 Ansatz der CGH.....	55
2.8.5 Waschen und Detektion der CGH.....	55
2.8.6 Auswertung der CGH.....	56
2.9 MULTIPLEX-FLUORESZENZ <i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNG (M-FISH)	57
2.9.1 PCR zur Amplifizierung durchfluß-zytometrisch hergestellter DNA-Pools	57
2.9.2 PCR zur Markierung der DNA-Pools	59
2.9.3 Fällung der markierten DNA-Pools	60
2.9.4 Ansatz der M-FISH.....	61
2.9.5 Waschen der M-FISH-Präparate und Detektion der indirekt markierten Sonden.....	61
2.9.6 Auswertung der M-FISH.....	62
3. ERGEBNISSE	63
3.1 CML-ZELLINIE K562.....	63
3.1.1 G-Banden-Analyse	63
3.1.2 Multiplex-Fluoreszenz in situ Hybridisierung (M-FISH)	64
3.1.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	66
3.1.4 Comparative genomische Hybridisierung (CGH)	69
3.1.5 Marker-Chromosomen der CML-Zelllinie K562	72
3.2 CML-BLASTENKRISEN	74
3.3 KOMPLEXE TRANSLOKATIONEN	86
4 DISKUSSION	93
4.1 METHODIK	93
4.1.1 Zellseparation aus peripherem Blut	93
4.1.2 G-Bänderung	94
4.1.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	94
4.1.4 Multiplex-Fluoreszenz in situ Hybridisierung (M-FISH)	96
4.1.5 Comparative genomische Hybridisierung (CGH)	97
4.2 DIE CML-ZELLINIE K562	101
4.3 CML-BLASTENKRISEN	106
4.3.1 Nachweis von Progressions-Markern.....	106
4.3.2 Progressions-Marker in verschiedenen Fraktionen des Blutes.....	107
4.4 KOMPLEXE TRANSLOKATIONEN.....	113
4.5 AUSBLICK	117
5. ZUSAMMENFASSUNG	119
6. LITERATUR.....	120
7. ANHANG.....	137
7.1 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	137
7.2 VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	139
7.3 VERZEICHNIS DER TABELLEN	140
7.4 DANKSAGUNG.....	141
7.5 LEBENSLAUF	142
7.6 VERÖFFENTLICHUNGEN	143

1. Einleitung

1.1 Mechanismen der Tumorentstehung

Die genetische Basis von Tumorerkrankungen läßt sich u. a. belegen durch das Auftreten spezifischer Chromosomen-Rearrangements bei bestimmten Neoplasien [1], wie der Translokation 9;22 bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML) (siehe 1.2.2) und der Translokation 15;17 bei akuter promyelozytischer Leukämie, FAB (French-American-British classification) Subtyp M3 (AML M3). Diese Assoziation bestimmter Tumortypen mit spezifischen Translokationen steht möglicherweise in Zusammenhang mit der physikalischen Nähe der beteiligten, auf verschiedenen Chromosomen liegenden, Loci [2-4]. Diese Gennähe, die scheinbar abhängig von Zelltyp, Differenzierungsstadium und Zellzyklusstadium auftritt, erhöht möglicherweise die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination zwischen den betroffenen Genloci [4].

Onkogene und Tumorsuppressorgene stellen Hauptklassen von Genen dar, die bei der Tumorentstehung eine Rolle spielen [5]. Onkogene wurden anhand von Tumorerkrankungen verursachenden Retroviren in Vogel- und Nagetier-Modellen entdeckt: Einige Spezies haben während ihrer Evolution eine Kopie bestimmter Säugetiergene in ihr Genom integriert. Die Protoonkogene sind die normalen Gegenstücke dieser Gene im Säugetiergenom. Sie haben entscheidende Bedeutung für Embryonalentwicklung, Zellerneuerung in adulten Geweben, Differenzierung und programmierten Zelltod (Apoptose). Punktmutationen, Chromosomen-Translokationen oder Genamplifizierungen können zu einer erhöhten Expression oder einer veränderten Struktur dieser Gene führen und sie so in ihre onkogene Version überführen. Diese Mutationen in Protoonkogenen sind mit einem Gewinn an Funktion verbunden („gain-of-function-mutations“) [5]. Tumorsuppressorgene dagegen erhalten ihre Tumorauslösende Form überwiegend durch „loss-of-function-mutations“, also den Verlust ihrer normalen Funktion durch Mutationen. Entdeckt wurden die Tumorsuppressorgene durch die Identifizierung von Keimbahnmutationen, die Individuen für ererbte Krebsformen prädisponieren, und durch die Untersuchung von Chromosomen-Verlusten in Tumoren. Ähnlich wie die Onkogene haben Tumorsuppressorgene Funktionen bei Wachstumsregulation, Differenzierung und programmiertem Zelltod.

Die sogenannten DNA-Reparaturgene wirken indirekt auf die Krebsentstehung: Ihr Funktionsverlust ebnet den Weg für die Entwicklung von Mutationen, die dann die Zellproliferation beeinflussen. Haber & Fearon ordnen die DNA-Reparaturgene den Tumorsuppressorgenen zu [5].

Die Gentheorie der Tumorentstehung und –progression geht von der Entwicklung eines malignen Klons aus einer einzigen gestörten Körperzelle aus (Klonalität): Nach einer Initialmutation kommt es über einen Mehrschritt-Mechanismus mit sequentiellen Mutationsereignissen zur vollen Ausprägung des malignen Phänotyps [1]. Fearon & Vogelstein erläutern in ihrem Mehrschrittmodell der Kolonkarzinogenese grundlegende Prinzipien der Tumorentstehung [6]. Ihr Modell beinhaltet folgende Hauptpunkte:

1. Kolorektale Tumoren entstehen durch Mutationen, die Onkogene aktivieren, assoziiert mit solchen, die Tumorsuppressorgene inaktivieren.
2. Mutationen in mindestens vier bis fünf Genen sind für die Ausbildung des malignen Tumors erforderlich.
3. Die Summe der erworbenen Genom-Veränderungen ist für die Festlegung der Tumor-Eigenschaften entscheidend, weniger die Reihenfolge ihres Auftretens.
4. Manche Tumorsuppressorgene sind auf der zellulären Ebene möglicherweise nicht rezessiv, d. h. schon der Verlust nur eines Allels hat einen Effekt auf den Phänotyp (dominant negative Mutationen).

Die generellen Eigenschaften dieses Modells könnten auch auf andere epitheliale Neoplasien anwendbar sein [6]. Zudem finden sich Parallelen zu den Mechanismen der Transformation und Progression bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML), die in dieser Arbeit behandelt wird. Die CML wird durch die Aktivierung des Protoonkogens *c*ABL initiiert. Der Progression zum maligneren Phänotyp geht die Aktivierung weiterer Protoonkogene (*c*-Myc, Ras), gepaart mit der Inaktivierung verschiedener Tumorsuppressorgene (p53, RB1, p16^{INK4A}), voran. Diese Gene können in unterschiedlicher Zahl und Kombination an der Progression der CML beteiligt sein, z. T. erkennbar am Auftreten bestimmter Chromosomenaberrationen. So ist das häufig bei CML-Blastenkrise auftretende Isochromosom i(17q) mit dem Verlust des auf 17p13 lokalisierten Tumorsuppressorgens p53 gekoppelt. Hier scheint der Verlust nur eines Allels eines Tumorsuppressorgens für die maligne Transformation ausreichend zu sein. Ein weiterer möglicher Mechanismus der Progression ist die Amplifikation des BCR/ABL-Fusionsgens, u. a. durch das Auftreten zusätzlicher Philadelphia-

Chromosomen. Sowohl beim Kolonkarzinom als auch bei der CML vollzieht sich im Verlauf der Erkrankung eine Entwicklung hin zu größerer Malignität.

1.2 Chronische myeloische Leukämie

Als Leukämien bezeichnet man Erkrankungen der Blutzellsysteme. Sie sind charakterisiert durch unkontrollierte Proliferation und Akkumulierung pathologischer, „unreifer“, funktionell gestörter weißer Blutzellen im Blut und in den parenchymatösen Organen, vor allem in Knochenmark, Milz, Leber und Lymphknoten [7]. Sie können eine akute oder chronische Verlaufsform haben und sind meist mit einer Überproduktion an Granulozyten (myeloische Leukämien) oder Lymphozyten (lymphatische Leukämien) verbunden. Akute Leukämien sind maligne Erkrankungen hämatopoetischer Zellen, die unbehandelt innerhalb sehr kurzer Zeit tödlich verlaufen. Sie sind durch das Auftreten unreifer Zellen (Blasten) im Knochenmark und peripheren Blut gekennzeichnet [7]. Die sogenannten chronischen myeloproliferativen Erkrankungen (CMPE), zu denen auch die CML zählt, sind neoplastische Transformationen hämatopoetischer Stammzellen. Sie sind durch extramedulläre Blutbildung, überwiegend in der Milz, charakterisiert (myeloische Metaplasie). Sie haben gewöhnlich einen chronischen Verlauf, können aber mehr oder weniger in eine akzelerierte Phase bzw. in einen Blastenschub übergehen, d. h. in aggressive, akute Erkrankungen transformieren [8;9].

1.2.1 Klinische Merkmale

Die chronische myeloische Leukämie (CML) tritt mit einer Häufigkeit von einem bis zwei Fällen unter 100.000 Personen im Jahr auf und ist für 15 % der adulten Leukämien verantwortlich. Das mittlere Alter bei Erstdiagnose liegt zwischen 45 und 55 Jahren, 12 bis 30 % der Patienten sind 60 Jahre oder älter [10]. Die klinischen Symptome sind u. a. Leistungsabfall, Müdigkeit, Gewichtsverlust, Anämie und Oberbauchschmerzen, bedingt durch Vergrößerung von Leber und Milz.

Die CML ist charakterisiert durch die klonale Expansion einer primitiven pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle, die die Fähigkeit zur Differenzierung in die myeloide, monozytäre, megakaryozytäre und erythrozytäre Linie besitzt, sogar B- und T-Zellen können betroffen sein [11].

Ein weiteres Kennzeichen der CML ist ihr Verlauf in mehreren Phasen: Nach einer initialen chronischen Phase kommt es über die akzelerierte Phase zur Entstehung einer sekundären akuten Leukämie, dem sogenannten Blastenschub [12]. Die initiale chronische Phase, deren mittlere Dauer 4 – 5 Jahre beträgt, ist durch eine ausgeprägte Hyperplasie des Knochenmarks gekennzeichnet [13]. Die Dauer der akzelerierten Phase beträgt weniger als 1 bis 1,5 Jahre [14]. 20 – 25 % der Patienten sterben in der akzelerierten Phase, weitere 20 – 25 % treten in die Blastenkrise ein, ohne die akzelerierte Phase zu durchlaufen [14]. Die Blastenkrise wird durch die massive Proliferation unreifer hämatopoetischer Zellen definiert und kann lymphatische, myeloische, erythroide und megakaryozytäre Zellen betreffen [13]. Sie führt innerhalb von drei bis sechs Monaten zum Tod [15].

1.2.2 Zytogenetik

Zytogenetisch ist die CML durch ein verkürztes kleines akrozentrisches Chromosom charakterisiert, dem Philadelphia (Ph)-Chromosom [16-18]. Dieses entsteht durch die reziproke Translokation $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ (Abb. 1) und führt zur Fusion des Protoonkogens *c-ABL* („Abelson murine leukemia virus“), das auf dem Chromosom 9 lokalisiert ist, mit dem *BCR* („breakpoint cluster region“)-Gen auf Chromosom 22 [19-21].

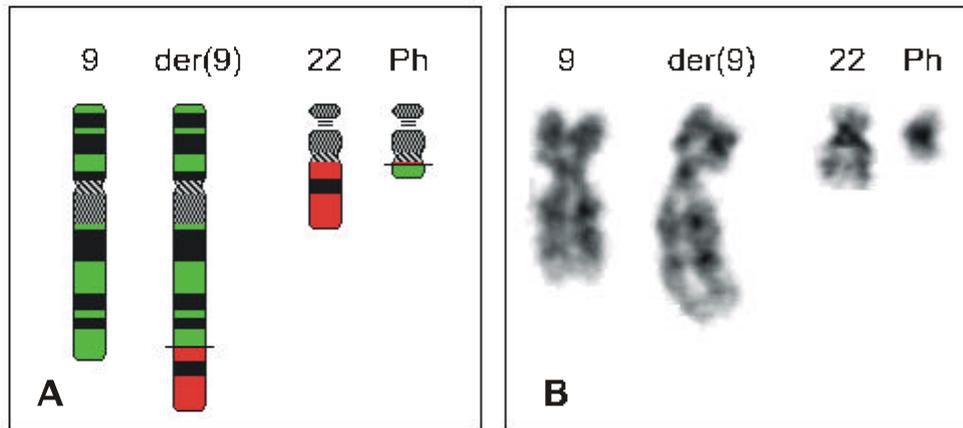


Abb. 1: Die zur Entstehung des Philadelphia (Ph)-Chromosoms führende Translokation $t(9;22)(q34.1;q11.2)$.

(A) Darstellung der Translokation 9;22 in Ideogrammen. (B) Die Chromosomen 9 und 22 sowie die derivativen Chromosomen eines Patienten mit Ph-positiver CML in der G-Bänderung.

Auch bei 5 – 6 % der Kinder und 15 – 30 % der Erwachsenen mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) [22;23] sowie bei etwa 2 % der Erwachsenen mit akuter myeloischer Leukämie [23;24] ist ein Ph-Chromosom nachweisbar.

Das Ph-Chromosom ist in ca. 90 % aller CML-Fälle nachweisbar, in etwa 85 % verursacht durch die klassische Translokation (9;22), während 5 – 10 % die Folge varianter Translokationen sind. In 5 – 12 % aller CML-Fälle ist das Ph-Chromosom nicht nachweisbar [25-27].

Die varianten zur Entstehung von Ph-Chromosomen führenden Translokationen werden traditionell, auf der Grundlage der klassischen Bänderungs-Analyse in zwei Untergruppen eingeteilt: Die einfachen varianten Translokationen, an denen neben dem Chromosom 22 ein weiteres Chromosom beteiligt ist, sowie die komplexen varianten Translokationen, bei denen neben den Chromosomen 9 und 22 ein bis drei weitere Chromosomen involviert sind [25;26]. Die Resultate genauerer zytogenetischer Untersuchungen sowie molekulargenetischer Analysen der BCR/ABL-Fusion weisen auf eine Beteiligung des Chromosoms 9 auch bei einfachen varianten Translokationen hin [25]. Auf allen Chromosomen wurden Bruchpunkte gefunden, die an der Bildung varianter CML-Translokationen beteiligt sind, Häufungen von Bruchpunkten treten in den Banden 3p21, 11q13, 12p13, 17q25 und 22q13 auf [25]. Patienten, die komplexe Philadelphia-Translokationen aufweisen, unterscheiden sich in ihren hämatologischen und klinischen Eigenschaften nicht von solchen mit einfachen Translokationen [14].

In 5 – 12 % aller CML-Fälle wird bei der zytogenetischen Analyse kein Ph-Chromosom gefunden [25-27]. In einem Drittel bis der Hälfte dieser Ph-negativen Fälle ist das BCR/ABL-Fusionsgen molekular-zytogenetisch durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) (siehe 1.2.6, 1.3.2) bzw. molekulargenetisch (Southern blot-Analyse, Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), Western blot) (siehe 1.2.6) nachweisbar [11;26]. Die BCR/ABL-Fusion kann durch Insertion des ABL-Gens von Chromosom 9 in das BCR-Gen auf Chromosom 22 entstehen [28;29], oder auch durch komplexe Chromosomenrearrangements, die zytogenetisch nicht nachweisbar sind [28;30-32]. Kürzlich wurden Fälle beschrieben, in denen das BCR/ABL-Fusionsgen auf Chromosom 9 liegt [33;34]. Diese Patienten mit Ph-negativer, BCR/ABL-positiver CML haben dieselben klinischen und hämatologischen Eigenschaften wie Patienten mit Ph-positiver CML [25;35;36].

Die restlichen 5 – 7 % aller klinisch diagnostizierten CML-Fälle sind sowohl Ph-Chromosomen-negativ als auch BCR/ABL-negativ [11;25;26]. Sie gehören häufig in andere diagnostische Kategorien [25;26], wie die chronische myelomonozytische Leukämie (CMML) [37;38], die atypische CML (aCML) [39;40], die juvenile CML (jCML) und die chronische neutrophile Leukämie (CNL).

Während des größten Teils der chronischen Phase der CML bleibt die Translokation (9;22) die einzige Aberration. In 75 – 85 % der Fälle treten vor oder gleichzeitig mit der Progression der CML, also mit der Transition in die akzelerierte Phase und Blastenkrise, zusätzliche Chromosomenaberrationen auf. Die häufigsten mit der Progression assoziierten sekundären Chromosomenmutationen („major route changes“) sind Trisomie 8 (+8), Isochromosom 17 [i(17q)], ein zusätzliches Ph-Chromosom (+Ph) und Trisomie 19 (+19) [10;25;26;41]. Bei 70 – 75 % der transformierten Fälle ist mindestens eine dieser Aberrationen nachweisbar [26;41]. Seltener Aberrationen („minor route changes“) sind Monosomien der Chromosomen 7, 17 und Y (-7, -17, -Y), Trisomien der Chromosomen 17 und 21 (+7, +21) und die Translokation t(3;21)(q26;q22). In 15 % der Fälle tritt mindestens eine dieser Mutationen auf [25;41].

1.2.3 Molekulargenetik

Das Protoonkogen *c-ABL* auf Chromosom 9 zeigt Sequenz-Homologie mit dem *v-ABL*-Onkogen, das für die Onkogen-Aktivität des „Abelson murine leukemia virus“ verantwortlich ist. Das phylogenetisch hochkonservierte *ABL*-Gen gelangte vermutlich während der Evolution durch Rekombination zwischen dem Maus-Retrovirus und dem zellulären Gen in den Virus [11]. Es besitzt 11 Exons (a1 bis a11) und hat eine Länge von etwa 230 kb. Es weist zwei alternative erste Exons auf, 1a und 1b, die durch das 175 kb große erste Intron verbunden sind [10;42] (Abb. 2). Die Bruchpunkte im *c-ABL*-Gen sind über eine ca. 200 kb lange Region zwischen den Exons 1b und 2 verteilt, wobei die meisten innerhalb des ersten Introns lokalisiert sind [42]. Somit wird bei der Translokation 9;22 fast das gesamte *ABL*-Gen auf das Chromosom 22 transloziert, die Exons 2 – 11 eingeschlossen. Die Exons 1a und 1b können ebenfalls beteiligt sein [11;42].

Das zweite an der Translokation 9;22 beteiligte Gen wird als *BCR* (breakpoint cluster region)-Gen bezeichnet. Es hat eine Länge von ca. 130 kb und besteht aus 25 Exons, zwei mutmaßliche alternative Exons, *e1'* und *e2'*, inbegriffen [11] (Abb. 2). Bei der Mehrzahl der CML-Patienten liegen die Bruchpunkte im *BCR*-Gen innerhalb einer 5,8 kb-Sequenz, der sogenannten major breakpoint cluster region (*M-bcr*). Diese besteht aus fünf Exons (*b1 – b5*), die den Exons 12 – 16 des Gens entsprechen [10;11]. Die Bruchpunkte liegen innerhalb von Introns dieser Region, zwischen den Exons *b2* und *b3* oder zwischen *b3* und *b4*. Das *BCR/ABL*-Fusionsgen stellt eine transkriptionelle Einheit dar, die durch den *BCR*-Promotor reguliert wird [43]. Nach Transkription und Spleißen entstehen zwei 8 – 8,5 kb lange Arten von Fusion-mRNAs [44;45]: Ist das *Abl*-Exon 2 mit dem *BCR*-Exon 13, das dem Exon *b2* der *M-bcr* entspricht, verknüpft, so spricht man von einer *b2a2*-Verbindung. Die Verbindung des *ABL*-Exons 2 mit dem *BCR*-Exon 14 (*M-bcr*-Exon *b3*), wird als *b3a2*-Verbindung bezeichnet. Das Translationsprodukt ist ein 210 kD-Fusionsprotein ($p210^{\text{BCR/ABL}}$), welches in nahezu allen CML-Fällen vorhanden ist [46;47].

Neben der *M-bcr* enthält das *BCR*-Gen die sogenannte minor breakpoint cluster region (*m-bcr*), eine ca. 10 kb große Region im ersten Intron, in der bei etwa 50 % der Erwachsenen und 80 % der Kinder mit Ph-positiver akuter lymphatischer Leukämie (ALL) sowie in wenigen CML-Fällen die Bruchpunkte liegen [10;22;42;48]. Die

resultierende mRNA ist 7 kb lang und die Verknüpfung wird als e1a2-Verbindung bezeichnet [22]. Das nach Translation daraus entstehende 190 kD-Hybridprotein (p190^{BCR/ABL}) besitzt ebenfalls eine verstärkte Tyrosinkinase-Aktivität.

Eine dritte Bruchpunktregion wurde 3'-wärts der M-bcr-Region zwischen den Exons e19 und e20 gefunden: Die micro-bcr (μ -bcr)-Region [10;11]. Es resultiert ein Transkriptionsprodukt mit e19a2-Verknüpfung. Aus dieser Verknüpfung resultiert ein 230 kD-Hybridprotein (p230). Bruchpunkte in der μ -bcr-Region, die bei der CML äußerst selten sind, treten vermutlich bei der chronischen neutrophilen Leukämie und der Thrombozytose auf [10;11].

In Ausnahmefällen der CML treten die Bruchpunkte im BCR- oder ABL-Gen außerhalb der definierten Regionen auf [26;29].

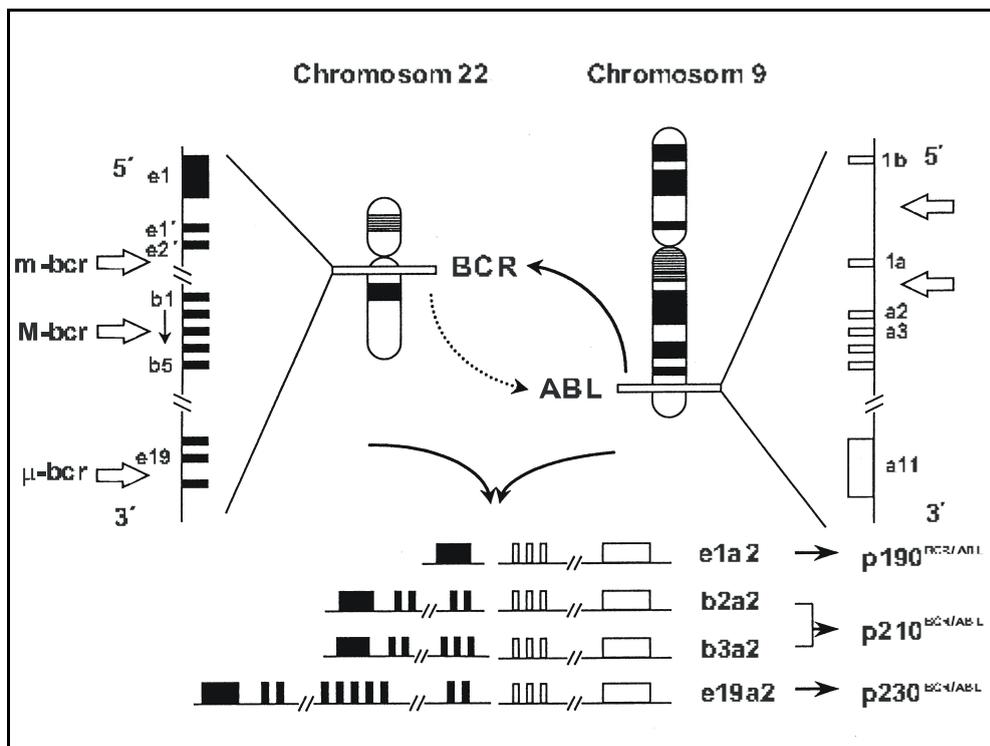


Abb. 2: Translokation t(9;22)(q34;q11).

Das Philadelphia (Ph-) Chromosom resultiert aus der Verknüpfung des 3'-ABL-Segmentes von Chromosom 9 mit dem 5'-BCR-Segment auf Chromosom 22. Die Bruchpunkte im ABL-Gen liegen zwischen den Exons 1b und 2 in einer 200 kb großen Region verteilt. Die Bruchpunkte im BCR-Gen liegen bei der Mehrzahl der CML-Patienten in der major breakpoint cluster region (M-bcr), die aus fünf Exons (b1 – b5) besteht, die den Exons 12 – 16 des Gens entsprechen. In seltenen Fällen der CML liegen die Bruchpunkte in der minor breakpoint cluster region (m-bcr), in sehr seltenen Fällen in der micro-bcr (μ -bcr). In Abhängigkeit von der Bruchpunktregion (m-bcr; M-bcr; μ -bcr) resultieren verschiedene mRNA (e1a2; b2a2, b3a2; e19a2), die zu verschiedenen Fusionsproteinen translatiert werden (p190^{BCR/ABL}; p210^{BCR/ABL}; p230^{BCR/ABL}). Verändert nach [23].

1.2.4 Transformation durch die BCR/ABL-Fusion

Dem BCR/ABL-Fusionsprotein wird die Hauptrolle bei der neoplastischen Transformation Ph⁺-positiver CML zugesprochen. Das normale ABL-Genprodukt gehört zu einer Familie von Tyrosinkinase. Diese katalysieren die Übertragung des endständigen Phosphat-Resten von ATP auf Tyrosin. Für eine pathogene Rolle des BCR/ABL-Proteins spricht:

- Es transformiert Fibroblastenzellen *in vitro* [49].
- Es transformiert unreife hämatopoetische Zellen *in vitro* [50-52].
- Es induziert eine CML-ähnliche Erkrankung in Mäusen (bei retroviraler Transduktion in Maus-Knochenmarkszellen mit anschließender Knochenmarkstransplantation) [53-56].
- Es führt zur Lymphom-Induktion in transgenen Mäusen (Einschlebung des BCR/ABL-Fusionsgens in die Maus-Keimbahn) [57]; Mäuse, die für p190^{BCR/ABL} transgen sind, entwickeln eine akute Leukämie [58].
- Es hat eine wesentliche höhere Tyrosinkinase-Aktivität als das normale ABL-Genprodukt p145 [59].

Die wachstumsfördernde Aktivität des häufig bei akuter lymphatischer Leukämie (ALL) vorkommenden p190^{BCR/ABL} ist stärker als die des bei CML vorkommenden p210^{BCR/ABL} [51;60]. Dies erscheint in Anbetracht der akuten Krankheitsform der ALL folgerichtig [61].

Das BCR/ABL-Fusionsprotein interferiert vermutlich mit zellulären Signal-Transduktions-Wegen, die normalerweise an der Kontrolle von Zelltod und Proliferation beteiligt sind [62]. Eine zunehmende Resistenz gegenüber einer Reihe apoptotischer Stimuli in BCR/ABL-exprimierenden Zellen wurde berichtet [63;64]. Eine Ausnahme bildet die Ceramid-induzierte Apoptose, die durch die BCR/ABL-Expression verstärkt wird [65]. Weiterhin induziert BCR/ABL in hämatopoetischen Zelllinien Faktor-unabhängiges Zellwachstum [66-68]. Vermutlich ist die Apoptose-Inhibition, weniger die Zunahme der Proliferation, der Primäreffekt des BCR/ABL-Fusionsproteins. Myeloide Vorläuferzellen der CML haben im Vergleich zu untransformierten Vorläuferzellen keine Veränderung in ihrer Proliferationsrate [69]. Außerdem haben sie keine Wachstumsfaktorunabhängigkeit der Proliferation sowie keine erhöhte Responsivität gegenüber Cytokinen [63;70;71]. In einer temperatur-

sensitiven Mutante von BCR/ABL in BaF3-Zellen setzt die Induktion der Proliferation ca. zwei Wochen später als die Apoptose-Hemmung ein [68]. Dies spricht klar für die Tatsache, daß die BCR/ABL-Expression primär die Apoptose, nicht die Proliferation, beeinflusst. Dafür sprechen auch die Ergebnisse von Rowley et al. an der CML-Zelllinie K562: Die Verringerung der BCR/ABL-Expression durch Antisense-Oligonukleotide führte zu einer deutlich reduzierten Apoptose-Inhibition, die Proliferationsrate dagegen blieb unbeeinflusst [72]. Die erhöhte Proliferation ist möglicherweise ein sekundärer Effekt, verursacht durch die Apoptose-Hemmung und dem daraus resultierenden verlängerten Überleben der Zellen.

Es werden verschiedene Wege der Signal-Transduktion durch das BCR/ABL-Fusionsprotein diskutiert. Mindestens drei davon scheinen für die transformierende Wirkung der BCR/ABL-Fusion unerlässlich zu sein: der Ras-abhängige Weg, der Jun-Kinase-Weg und der P13-Weg [62].

1.2.5 Progression

Nach der initialen chronischen Phase kommt es über die akzelerierte Phase zur Entstehung einer sekundären akuten Leukämie, dem sogenannten Blastenschub [9;12]. Die Blastenkrise ähnelt einer akuten Leukämie und führt innerhalb von drei bis sechs Monaten zum Tod [15]. Sie ist charakterisiert durch die massive Proliferation unreifer hämatopoetischer Zellen. Der Beginn der Blastenkrise kann auf verschiedene Arten definiert werden, u. a. dadurch, daß der Anteil der Blasten und Promyelozyten mehr als 30 % der Leukozyten im peripheren Blut ausmacht, oder daß Blasten und Promyelozyten mehr als 50 % der kernhaltigen Zellen im Knochenmark ausmachen [9].

Man nimmt an, daß die Progression zur Blastenkrise durch das Auftreten sekundärer Mutationen in Tumorsuppressorgenen oder Protoonkogenen bewirkt wird [62]. Hinzu kommt eine, teilweise durch Duplikation des Ph-Chromosoms verursachte, erhöhte BCR/ABL-Expression [73]. Die zytogenetischen Veränderungen bei der Progression der CML lassen sich z. T. mit molekularen Veränderungen korrelieren. Folgende Gene können u. a. betroffen sein: p53 (auf Chromosom 17p13), RB1 (13q14),

c-Myc (8q14), p16^{INK4A} (9p21), RAS und AML/EVI-1, ein Fusionsprotein, das aus der Translokation t(3;21)8q26;q22) resultiert [10;23].

Bei 20 - 30 % der CML-Patienten in der Blastenkrise ist ein Verlust der Funktion des Tumorsuppressorgens p53 nachweisbar [10;62]. Das Auftreten des Isochromosoms 17q geht eindeutig mit dem Verlust des p53-Gens einher. p53 ist ein Tumorsuppressorgen mit negativer regulatorischer Funktion in der Zellzyklusprogression. Der Verlust von p51 führt zu einer Apoptose-Resistenz [62;74] und ist ausschließlich mit einer myeloiden Transformation gekoppelt [74]. Skorski et al. stellten einen direkten Zusammenhang zwischen dem Verlust der p53-Funktion und der Progression der CML her: Durch Infektion mit einem BCR/ABL-positiven Retrovirus erhielten normale Knochenmarkszellen einen leichten, p53-defiziente Knochenmarkszellen einen erheblichen Proliferationsvorteil [75].

Bei bis zu 50 % der Patienten mit lymphoider Transformation treten homozygote Deletionen des Tumorsuppressorgens p16^{INK4A} auf [76]. Veränderungen von RB1, c-Myc-Amplifikationen und RAS-Mutationen sind seltener [10].

1.2.6 Diagnostik

Neben der konventionellen Zytogenetik (u. a. G-Bänderung) werden zur Diagnostik der CML auch molekular-zytogenetische sowie molekulargenetische Methoden eingesetzt.

Der Nachweis der BCR/ABL-Fusion mittels FISH zur Quantifizierung der Erkrankung ist unter Verwendung einer einzigen oder mehrerer, differentiell markierter, DNA-Sonden möglich. Für die Hybridisierung auf Interphase-Zellen eignen sich gut Einzelkopie-Sequenzen, die Bruchpunkt-angrenzend oder Bruchpunkt-übergreifend sein können: Werden zwei Sonden verwendet, die an den Bruchpunkt auf dem Ph-Chromosom angrenzen, so ergeben sich auf Ph-positiven Zellen zwei Signale auf den normalen Chromosomen 9 und 22, sowie zwei verschiedenfarbige Signale auf dem Ph-Chromosom, die dicht nebeneinander liegen oder fusioniert sein können [77-82]. Bei Verwendung einer einzigen, bruchpunktübergreifenden Probe ergeben sich auf Ph-positiven Zellen drei Signale [83;84]. Ebenso möglich ist die Kombination einer

Bruchpunkt-übergreifenden mit einer Bruchpunkt-angrenzenden Probe, aus der sich drei einzelne sowie ein Fusionssignal ergeben [84].

Die Vorteile der FISH-Analyse im Vergleich zur G-Bandenanalyse liegen im genaueren Nachweis der Größe des Ph-positiven Klon, auch im Verlauf von Erkrankung und Therapie [80-82]. Außerdem lassen sich niedrigere Anteile Ph-positiver Zellen nachweisen und FISH ist auch auf Knochenmarks-Direktpräparationen möglich [80]. Zudem ist FISH eine zuverlässige Methode zum Nachweis der BCR/ABL-Fusion bei Ph-negativer CML [85].

Werden zwei Bruchpunkt-übergreifende DNA-Proben für die BCR/ABL-FISH verwendet, so ergeben sich für eine Ph-Chromosomen-positive Zellen zwei Fusionssignale, eines auf dem Ph-Chromosom und eines auf dem derivativen Chromosom 9. Daher nennt man diese Technik D-FISH (**d**ouble fusion) [86;87] oder 2F FISH (**t**wo fusion signals) [88]. Im Gegensatz dazu kann man die oben beschriebene FISH-Technik, die nur ein Fusionssignal ergibt, als S-FISH (**s**ingle fusion) oder 1F-FISH (**o**ne fusion signal) bezeichnen. Die Anwendung der D-FISH zum quantitativen Nachweis der BCR/ABL-Fusion hat im Vergleich zur S-FISH mehrere Vorteile: Die Häufigkeit der falsch-positiv sowie die der falsch-negativ gewerteten Zellen nähert sich Null, so daß die Anzahl der betroffenen Zellen auf wenige Prozentpunkte genau bestimmt werden kann. So können auch sehr kleine Anteile BCR/ABL-positiver oder – negativer Zellen nachgewiesen werden. Außerdem lassen sich variante Ph-Translokationen nachweisen [86-88].

O'Brien et al. erachten innerhalb der (molekular-)zytogenetischen Diagnostik der CML bei Erstdiagnose die G-Bandenanalyse zur zytogenetischen Charakterisierung als essentiell, sowie Hypermetaphase-FISH (siehe 1.3.1) wichtig für die Ermittlung der Häufigkeit von Ph-positiven Zellen [27]. Während der Behandlung der CML dient Interphase-FISH zur Überwachung des Anteils Ph-positiver Zellen, die G-Bänderung kann dann zur Identifizierung eventuell auftretender sekundärer Aberrationen eingesetzt werden. Führt die Interphase-FISH zu einem negativen Resultat, so ist laut O'Brien Hypermetaphase-FISH eine Möglichkeit zur Ermittlung des „minimal residual disease“ (MRD) [27;89-91].

Die BCR/ABL-Fusion kann neben den (molekular-) zytogenetischen Techniken u. a. auch auf DNA-Ebene (Southern blot) und RNA-Ebene (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) nachgewiesen werden. Bei der Southern blot-

Analyse wird gesamtgenomische DNA von Patienten mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose- oder Nylon-Membran übertragen („geblottet“). Nach Hybridisierung mit Sonden für BCR und ABL wird anhand der Fragmentlängen festgestellt, ob eine BCR/ABL-Fusion vorliegt oder nicht [92-95]. Bei der RT-PCR erfolgt die reverse Transkription der mRNA des Patienten, d. h. deren Umsetzung in copy-DNA (cDNA) durch eine reverse Transkriptase, ausgehend von einem 3'-ABL-Primer. Die erhaltene mRNA wird per PCR unter Verwendung von Primern, die die BCR/ABL-Fusionsstelle flankieren, amplifiziert und dann gelelektrophoretisch aufgetrennt [45;96-98]. Weiterentwicklungen dieser Methoden sind die kompetitive quantitative RT-PCR [99], die *in situ* RT-PCR [100] und die „real time“ quantitative RT-PCR [101].

1.2.7 Die CML-Zelllinie K562

Die Leukämie-Zelllinie K562 stammt von einer Patientin mit Ph-Chromosomenpositiver CML in der Blastenkrise [102]. Die Zellen dieser Linie sind undifferenzierte pluripotente Zellen der granulozytären Reihe [103]. In der Vergangenheit wurden bereits verschiedene zytogenetische Untersuchungen der Zelllinie K562 durchgeführt, um sie im Detail zu charakterisieren. Lozzio & Lozzio fanden ein Ph-Chromosom sowie einen langen akrozentrischen Marker, den sie als Translokation 15;17 interpretierten [102]. Die von ihnen untersuchten Kurzzeit-Kulturen der Zelllinie waren hypodiploid, während die Langzeit-Kulturen einen annähernd triploiden Karyotyp aufwiesen. In den darauffolgenden Jahren wurden weitere zytogenetische Untersuchungen der Zelllinie vorgenommen. Collins & Groudine fanden einen Ph-positiven hyperdiploiden Karyotyp [104], Dimery et al. klassifizierten die Zelllinie als Ph-positiv und annähernd triploid [105]. In mehreren weiteren Analysen wurde der K562-Karyotyp als Ph-negativ und annähernd triploid charakterisiert [78;106-109]. Wiederholt wurden ein oder zwei mutmaßlich vom Ph-Chromosom abstammende Chromosomen, zusammengesetzt aus amplifizierten BCR/ABL-Fusionsgenen, nachgewiesen [78;104;107-109], der von Lozzio & Lozzio als t(15;17) beschriebene Marker (s. o.) ist aller Wahrscheinlichkeit

nach mit diesem Marker identisch [102]. Möglicherweise ist ein solches maskiertes Ph-Chromosom die Ursache für die Immortalisierung der Zelllinie K562 [109].

In dieser Arbeit wurde die Zelllinie K562 mittels comparativer genomischer Hybridisierung (CGH), Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH), G-Banden-Analyse und Multiplex-FISH (M-FISH) untersucht. Durch die kombinierte Anwendung dieser Methoden konnte der Karyotyp der Zelllinie K562 aufgedeckt werden. Dieser Karyotyp wurde mit Daten aus der Literatur verglichen [78;102;104;107;109-111].

1.3 Klassische und molekulare Zytogenetik

1956 gelang Tjio und Levan die Bestimmung der menschlichen Chromosomenzahl ($n = 46$) [112]. Seitdem sind die Methoden zur Chromosomendarstellung ständig weiterentwickelt worden: In den frühen sechziger Jahren erlaubte die homogene Chromosomenfärbung erste Anwendungen der zytogenetischen Diagnostik. Dabei lag der Schwerpunkt auf dem Nachweis numerischer Aberrationen, insbesondere des Down-Syndroms (Trisomie 21) (Übersichtsartikel: [113]). Aber auch die erste spezifische mit einer Tumorerkrankung assoziierte Chromosomen-Aberration wurde gefunden, das Philadelphia-Chromosom [16] (siehe 1.2.2). Durch die Entwicklung von Techniken zur Chromosomen-Bänderung Anfang der siebziger Jahre wurde es möglich, alle menschlichen Chromosomen anhand ihres Bandenmusters zu identifizieren [114]. So wurde auch die Diagnose struktureller Chromosomen-Aberrationen möglich, u. a. wurde die der Entstehung des Philadelphia-Chromosoms zugrundeliegende Translokation aufgeklärt [17].

Die sogenannten molekular-zytogenetischen Methoden leiten sich von der Technik der *in situ* Hybridisierung ab. Diese wurde erstmals 1969 veröffentlicht [115]. Dabei werden mittels spezifischer DNA-Proben die dazu komplementären Chromosomenareale markiert. Der Nachweis der Proben erfolgte zunächst radioaktiv [115-117], später durch Fluoreszenzfarbstoffe, wobei man von „Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung“ (FISH) spricht [118;119]. Die FISH ist u. a. in der pränatalen Diagnostik sowie der Tumordiagnostik einsetzbar (siehe 1.3.1).

Die Technik des „chromosome painting“ [120;121] ermöglicht es, ganze Chromosomen mittels FISH spezifisch nachzuweisen. Die Entwicklung ging weiter über die Darstellung von bis zu 12 verschiedenen Farben in einer Hybridisierung [122;123] bis hin zur differentiellen Darstellung aller 24 menschlichen Chromosomen mit den Methoden der Multiplex-Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (M-FISH) [124;125] (siehe 1.3.3) und des „spectral karyotyping“ (Sky) [126]. Diese 24-Farben-FISH ermöglicht die Charakterisierung komplexer Karyotypen, indem sich sowohl kryptische Rearrangements aufdecken als auch Chromosomen unbekannter Herkunft identifizieren lassen. Zu den neuesten Entwicklungen gehören Methoden der Farb-Bänderung von Chromosomen: So gibt es das „cross-species colour banding“, bei dem Probensätze, die aus den Chromosomen anderer Spezies hergestellt wurden, auf

menschliche Chromosomen hybridisiert werden [127], auch als Rx-FISH bezeichnet [128]. Daneben lassen sich durch die Verwendung subregionaler FISH-Proben Bandenmuster für einzelne Chromosomen erzeugen [129;130] oder auch der gesamte Karyotyp bändern [131], wofür der Begriff „chromosomal bar code“ geprägt wurde [130;132].

Bei den bisher genannten FISH-Techniken handelt es sich um inverse Techniken, d. h. aus normaler DNA erstellte Proben werden auf zu untersuchende Metaphasen oder –Interphasen hybridisiert. Im Gegensatz dazu wird bei der comparativen genomischen Hybridisierung (CGH) die zu untersuchende DNA auf gesunde Referenz-Metaphasen hybridisiert, die CGH ist somit eine reverse FISH-Technik. Sie wurde erstmals 1992 beschrieben [133]. Die CGH ist unabhängig von mitotisch ausreichend aktiven Zellen des Tumors und ermöglicht es, das gesamte Genom in nur einem Hybridisierungsexperiment auf Gewinne und Verluste chromosomalen Materials hin zu untersuchen.

1.3.1 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Die Technik der *in situ* Hybridisierung (ISH) wurde erstmals 1969 veröffentlicht [115;116]. Dabei wird die DNA fixierter Chromosomen bzw. von Interphasekernen denaturiert, d. h. die DNA wird „in situ“ denaturiert. Die denaturierte chromosomale DNA wird in Gegenwart denaturierter Proben-DNA renaturiert, so daß sich die DNA der Probe an komplementäre Sequenzen der Chromosomen anlagert. Anfangs wurden die in der ISH eingesetzten Proben durch Radioisotope wie (^3H), (^{125}J), (^{32}P) und (^{35}S) markiert, die mittels Autoradiographie detektiert wurden [115-117].

Heute erfolgt die Detektion der Proben-DNA durch Fluoreszenzfarbstoffe, wobei man von „Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung“ (FISH) spricht. Die ersten FISH-Methoden beruhten auf indirekter Fluoreszenz-Markierung der Proben, zu der Hapten-modifizierte Nukleotide wie Biotin-11-dUTP, Biotin-16-dUTP und Digoxigenin-11-dUTP eingesetzt werden [118;119;134-138]. Biotin läßt sich per Affinitätsmarkierung durch Avidin, das an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, nachweisen. Digoxigenin wird immunologisch durch Anlagerung eines Digoxigenin-spezifischer

Antikörpers, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, nachgewiesen. Bei der FISH eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe sind z. B. Rhodamin oder TRITC (Tetraethyl-Rhodamin-Isothiocyanat) und Fluorescein oder FITC (Fluorescein-Isothiocyanat), die unter dem Fluoreszenzmikroskop durch Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge sichtbar gemacht werden. Cremer et al. gelang erstmals der Nachweis einer Trisomie 18 durch FISH [139]. Pinkel et al. wiesen durch FISH erfolgreich Aneuploidien des Y-Chromosoms nach [140].

In neuester Zeit setzt sich neben der indirekten Markierung immer mehr die direkte Markierung von DNA-Sonden mittels modifizierter Nukleotide, an die Fluoreszenzfarbstoffe direkt gekoppelt sind, durch. Die direkte Fluoreszenzmarkierung erfolgt z. B. mit Spectrum green und Spectrum orange [81;137;141] und ermöglicht eine schnellere Durchführung der FISH.

Die FISH ist für vielfältige Anwendungen geeignet: Neben der Bestimmung spezifischer Bruchpunkte [142-144] dienen FISH-Analysen zur Untersuchung der Interphase-Topologie der Chromosomen [120;145-148], inklusive der relativen Lage spezifischer Gene zueinander [4]. Weiterhin sind FISH-Sonden in der pränatalen Diagnostik [139;149-153] sowie der Tumordiagnostik [81;85;86;154;155] einsetzbar.

In dieser Arbeit wurden Proben von CML-Patienten in der Blastenkrise sowie die CML-Zelllinie K562 mittels FISH analysiert. Durchgeführt wurde Interphase-FISH, Metaphase-FISH und Hypermetaphase-FISH: Für die sogenannte Interphase *in situ* Hybridisierung können Centromer- oder Einzelkopie-Sonden eingesetzt werden. Sie dient u. a. zum Nachweis spezifischer Translokationen, z. B. der BCR/ABL-Translokation bei CML (siehe 1.2.6) oder zum Nachweis von Aneuploidien wie der Trisomie 9. Ein Vorteil der Interphase-FISH ist, daß keine Metaphasen erforderlich sind. Außerdem ist eine quantitative Auswertung von 200 bis 300 Kernen relativ rasch möglich. FISH auf Metaphasen vereinfacht die Charakterisierung komplexer Translokationen, z. B. bei CML-Fällen, in denen drei Chromosomen an der BCR/ABL-Translokation beteiligt sind. Zudem ist FISH auf Metaphasen ein wichtiges Hilfsmittel für die Aufdeckung oder Verifizierung der Zusammensetzung von Marker-Chromosomen, in dieser Arbeit angewendet für die CML-Zelllinie K562. Die Technik der „Hypermetaphase“-FISH basiert auf einer 24-stündigen mitotischen Arretierung von Zellen des Knochenmarks oder des peripheren Blutes, wodurch eine große Anzahl

von Metaphasen geerntet werden kann, die zwar nicht unbedingt zur klassischen Zytogenetik, wohl aber für die FISH geeignet sind [89-91;156]. Durch diese Erhöhung der Zahl der Metaphasen ist eine quantitative Analyse der Hybridisierung anhand von Metaphasen leichter möglich. Diese Technik wurde hier, ergänzend zum Interphase-FISH, zur Analyse der BCR/ABL-Translokation, des Auftretens des Isochromosoms 17q und zur Untersuchung von Aneuploidien eingesetzt und ermöglichte die Auswertung von bis zu 200 Metaphasen pro Fall.

1.3.2 Comparative genomische Hybridisierung

Über die vergleichende genomische Hybridisierung oder comparative genomic hybridization (CGH) wurde erstmals 1992 berichtet [133]. Seit 1995 findet die CGH zunehmende Verbreitung in der Tumorzytogenetik, da sie im Gegensatz zur konventionellen Zytogenetik unabhängig von mitotisch ausreichend aktiven Zellen durchführbar ist. Sie ermöglicht es, das gesamte Genom in nur einem Hybridisierungsexperiment auf Gewinne und Verluste chromosomalen Materials hin zu untersuchen [157]. Dies ist auch aus fixiertem Gewebe anhand einer nur kleinen Anzahl von Zellen möglich [158;159]. Mit Hilfe der CGH lassen sich nur unbalancierte Chromosomen-Aberrationen nachweisen, nicht aber Inversionen und balancierte Translokationen [157;160].

Bei der CGH, in Abb. 3 schematisch dargestellt, wird eine zu untersuchende Tumor-DNA auf normale Metaphase-Chromosomen hybridisiert ("reverse painting", siehe 1.3). Die Fluorochrom-markierte gesamtgenomische DNA des Tumors hybridisiert relativ gleichmäßig über die normale Metaphase, sofern in der Tumor-DNA nicht Über- oder Unterrepräsentationen von Chromosomen oder Chromosomenteilen vorhanden sind: Liegt ein Chromosom in der Tumor-DNA überrepräsentiert vor, so ist das Hybridisierungssignal auf dem entsprechenden Chromosom der normalen Metaphase, auf die hybridisiert wird, stärker. Eine Unterrepräsentation führt zu einem schwächeren Signal. Da experimentelle Variabilitäten zu Unregelmäßigkeiten der Hybridisierungsintensitäten entlang der Chromosomenachsen führen können, wird differentiell markierte DNA einer gesunden Person (Referenz- bzw. Kontroll-DNA) mit

der Tumor-DNA (Test-DNA) kohybridisiert. Bei der Hybridisierung von DNA-Fragmenten, die weite Bereiche von Chromosomen überspannen, kommt es zu unerwünschten Bindungen von DNA-Sonden mit den auf den Chromosomen ubiquitär auftretenden repetitiven Elementen („interspersed repetitive sequences“ = IRS). Hier macht man sich die Entwicklung der „chromosomal *in situ* suppression“ (CISS)-Hybridisierung zunutze [120], auch als „chromosome painting“ bezeichnet [161]: Man hybridisiert gleichzeitig mit Tumor- und Referenz-DNA unmarkierte menschliche Cot 1-DNA, die nahezu ausschließlich aus repetitiven Sequenzen besteht, insbesondere den Alu I- und den Kpn I-Familien. Durch die Reassoziationskinetik repetitiver Sequenzen (diese reassoziieren unter Renaturierungsbedingungen sehr schnell an komplementäre Sequenzen) fängt man mit Hilfe der Cot 1-DNA die repetitiven Sequenzen von Tumor- und Referenz-DNA vor der eigentlichen Hybridisierung ab, so daß es bei der CGH nicht zu unspezifischen und somit uninformativen Hybridisierungen kommen kann. Die IRS sind vermehrt in den Zentromerregionen aller Chromosomen, dem zentromernahen Heterochromatin der Chromosomen 1, 9 und 16, den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen sowie im heterochromatischen Anteil des Y-Chromosoms vorhanden. Aufgrund der Supprimierung der Hybridisierung repetitiver Sequenzen durch den Einsatz der Cot 1-DNA werden diese Regionen in der CGH nicht ausgewertet.

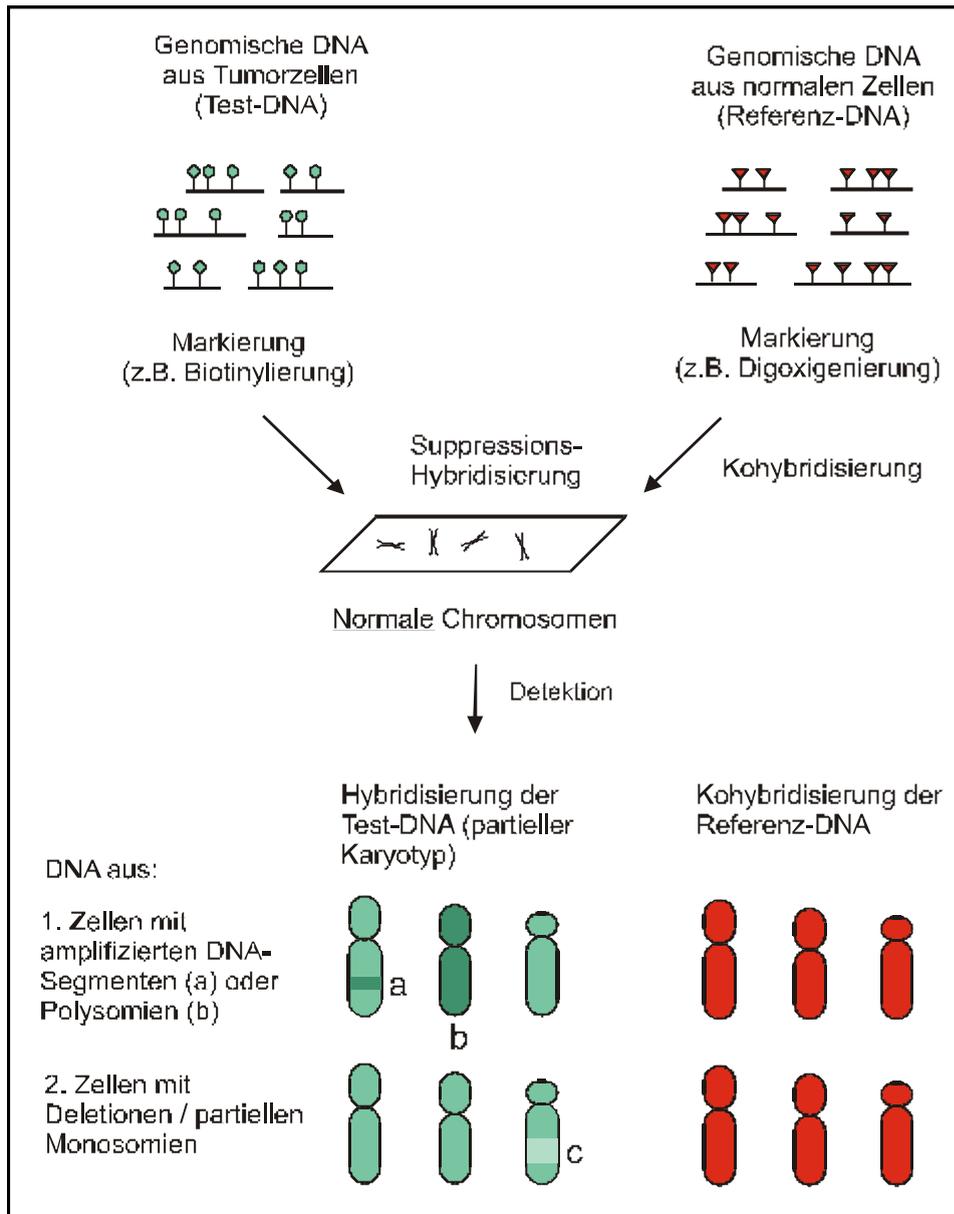


Abb. 3: Schema der comparativen genomischen Hybridisierung (CGH).

Genomische DNA aus malignen Zellen (Test-DNA) und normalen Zellen (Referenz-DNA) werden differentiell markiert und gemeinsam auf normale Metaphasen hybridisiert. Dies erfolgt unter Suppressionsbedingungen, d. h. unter Zugabe repetitiver DNA zur Unterdrückung unspezifischer Hybridisierungen. Liegt im untersuchten Tumor eine Amplifizierung eines DNA-Segmentes oder eine Polysomie (z. B. Trisomie) vor, so ist das Hybridisierungssignal der Test-DNA (Grün) verstärkt, bei Verlust chromosomalen Materials im Tumor ist die Hybridisierung in der entsprechenden Region schwächer. Die normale Referenz-DNA hybridisiert relativ gleichmäßig über die Metaphase.

Die Auswertung der CGH erfolgt mittels quantitativer digitaler Bildanalyse: Von jeder Metaphase werden drei Graustufenbilder aufgenommen und durch die Software mit Falschfarben versehen: Die DAPI-Gegenfärbung, die FITC-Färbung der Test-DNA und die Rhodamin-Färbung der Referenz-DNA. Die Fluoreszenz-Intensitäten von Tumor- und Referenz-DNA werden anhand der Graustufenbilder durch digitale

Bildverarbeitung entlang der medianen Achse der Chromosomen gemessen. Der Quotient der Fluoreszenzintensität aus Tumor- und Referenz-DNA entlang der Chromosomen reflektiert für jeden Chromosomenabschnitt die relative Kopienzahl der Test-DNA im Vergleich zur Referenz-DNA. Die Berechnung des Quotienten erfolgt chromosomenspezifisch nach Karyotypisierung der Chromosomen jeder einzelnen Metaphase. Die Karyotypisierung erfolgt anhand des invertierten Bildes der DAPI (Diamidino-Phenylindol)-Bänderung. Da sich dieser DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoff bevorzugt an AT-reiche Sequenzen anlagert, entsprechen die hellen DAPI-Banden in etwa den dunklen G-Banden [162] (siehe 2.6).

In die Auswertung jedes Hybridisierungsexperimentes gehen etwa 10 Metaphasen ein, um eine ausreichend große Anzahl von Chromosomen ($n > 15$) zu erhalten und so eine Aussage hinsichtlich der verhältnismäßigen Verteilung der Tumor-DNA treffen zu können. Ein Beispiel für ein CGH-Experiment ist in Abb. 4 dargestellt. In Abb. 4A ist ein Ausschnitt des Karyogrammes zu sehen. Im Karyogramm sind die Chromosomen durch die gemeinsame Hybridisierung von Tumor-DNA (grün) und Referenz-DNA (rot) relativ gleichmäßig gelb gefärbt. Zugewinne chromosomalen Materials führen zu einer Grünfärbung des jeweiligen Bereiches, Verluste zu einer Rotfärbung. Dementsprechend ist der mittlere Quotient aus Tumor- und Referenz-Fluorochrom-Intensitäten im Mittelprofil bei Verlusten chromosomalen Materials nach links verschoben, bei Zugewinnen nach rechts (Abb. 4B). Bei normaler diploider Chromosomenzahl hat das Mittelprofil einen Wert von 1, eine Monosomie in mehr als 50 % der in die CGH eingegangenen Zellen führt theoretisch zu einem Mittelprofil unter 0,5, ein Trisomie in mehr als 50 % der Zellen zu einem Wert höher als 1,5 [163].

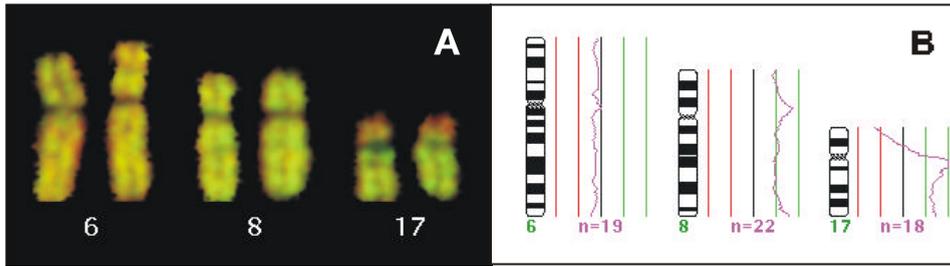


Abb. 4: Beispiel einer comparativen genomischen Hybridisierung (CGH).

Ausschnitt des Ergebnisses. **(A)** Teil-Karyogramm einer repräsentativen Metaphase. Die gemeinsame Hybridisierung von FITC-markierter Tumor-DNA (grün) und Rhodamin-markierter Referenz-DNA (rot) auf normale Chromosomen führt zu einer relativ gleichmäßigen Gelbfärbung der gesamten Metaphase (siehe Chromosom 6). Zugewinne chromosomalen Materials führen zu einer Grünfärbung (Chromosomen 8 und 17q), Verluste zu einer Rotfärbung (17p). **(B)** Mittelprofil. Der mittlere Quotient aus den Fluoreszenzintensitäten von Tumor- und Referenz-DNA bei Auswertung von 11 Metaphasen. Ein Zugewinn chromosomalen Materials führt zu einer Rechtsverschiebung des Mittelprofils (Chromosomen 8 und 17q), ein Verlust zu einer Linksverschiebung (17p).

Die CGH findet häufig Anwendung bei der Untersuchung solider Tumoren, da hier oft die Präparation von Metaphasen ausreichender Qualität schwierig ist und häufig komplexe Karyotypen vorliegen [160]. So z. B. bei der Untersuchung von Prostata-Krebs [164-166], Hirntumoren [167-170] und Nierenzellkarzinomen [171-176]. Auch für die Leukämie-Forschung ist die CGH von Bedeutung [177-184].

1.3.3 Multiplex-Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Bei der Multiplex-Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (M-FISH) werden alle 24 Chromosomen des menschlichen Karyotyps, die 22 Autosomen und die beiden Geschlechtschromosomen, mit unterschiedlichen Farben markiert [124;125]. Dies ermöglicht die schnelle Analyse von Metaphase-Spreitungen, auch bei Vorliegen einer hohen Zahl von Chromosomenaberrationen, sowie die Identifizierung der Herkunft von Marker-Chromosomen. Während Versuche der Entwicklung stabiler Computer-Algorithmen zur Entschlüsselung komplexer Chromosomenbanden-Muster erfolglos geblieben sind, bietet die MFISH potentiell die Möglichkeit der vollautomatischen Karyotyp-Analyse [132;185-187]. Das Potential der MFISH wird u. a. anhand der Untersuchung verschiedener Tumor-Zelllinien deutlich [111;124;188;189].

Die differentielle Markierung aller menschlichen Chromosomen erfolgt bei der M-FISH durch kombinatorische Markierung: Fünf spektral unterscheidbare

Fluorochrome werden eingesetzt, jedes Chromosom wird mit einer Kombination aus ein bis drei Fluorochromen markiert (siehe Abb. 5 und 6) [124;125]. Die hier für die M-FISH eingesetzten Fluorochrome sind DAPI (zur Gegenfärbung der Chromosomen), FITC, Cy3, Cy3.5, Cy5 und Cy5.5. Von jeder Metaphase werden mit den entsprechenden Fluoreszenz-Filtern sechs Aufnahmen gemacht. Die Analyse der M-FISH erfolgt unter Benutzung einer speziellen Bildverarbeitungs-Software, hier der Leica Q-FISH software im Verbund mit der Leica MCK image analysis software. Die aufgenommenen Bilder sind Graustufenbilder, denen von der software Farben zugewiesen werden. Bei der automatischen Bildverarbeitung werden nicht die fünf einzelnen Fluorochrombilder einer Mataphase unabhängig voneinander verarbeitet, sondern ein Bild, das in jedem Punkt eine fünfdimensionale Farbinformation besitzt. Dementsprechend korrespondiert jede der 24 spezifischen Fluoreszenzkombinationen mit einem fünfdimensionalen Farbvektor, dem sogenannten Merkmalsvektor (spectral feature vector). Ausgehend von dieser fünfdimensionalen Farbinformation wird durch Zusammenfassung benachbarter Regionen mit ähnlicher Farbinformation („Voronoi tessellation“) das „rendered image“ (Abb. 5) errechnet, wodurch Hintergrundrauschen und Inhomogenitäten der Markierung unterdrückt werden [187]. Zur Klassifizierung der einzelnen Chromosomen werden in einer halbautomatischen Prozedur die Chromosomenumrisse ausgehend von der DAPI-Gegenfärbung festgelegt. Innerhalb dieser Umrisse werden automatisch anhand der spektralen Zusammensetzung der fünf Fluorochrome Falschfarben zugewiesen und das sogenannte „classified image“ erstellt (Abb. 6).

Mit Hilfe verschiedener Werkzeuge kann der Benutzer das Ergebnis der automatischen Klassifizierung kontrollieren: Per Mausklick auf ein Chromosom läßt sich ein Fenster öffnen („single chromosome window“), in dem nebeneinander das Chromosom in der invertierten DAPI-Färbung, in „rendered colors“, in Klassifizierungsfarben („classified image“) und in den verschiedenen Fluorochromen dargestellt ist. Außerdem läßt sich für jeden Punkt der Metaphase die quantitative Fluorochrom-Zusammensetzung darstellen („probe meter“). Eine zusätzliche Kontrollmöglichkeit bietet die Darstellung des Karyogramms in der invertierten DAPI-Gegenfärbung (Abb. 5).

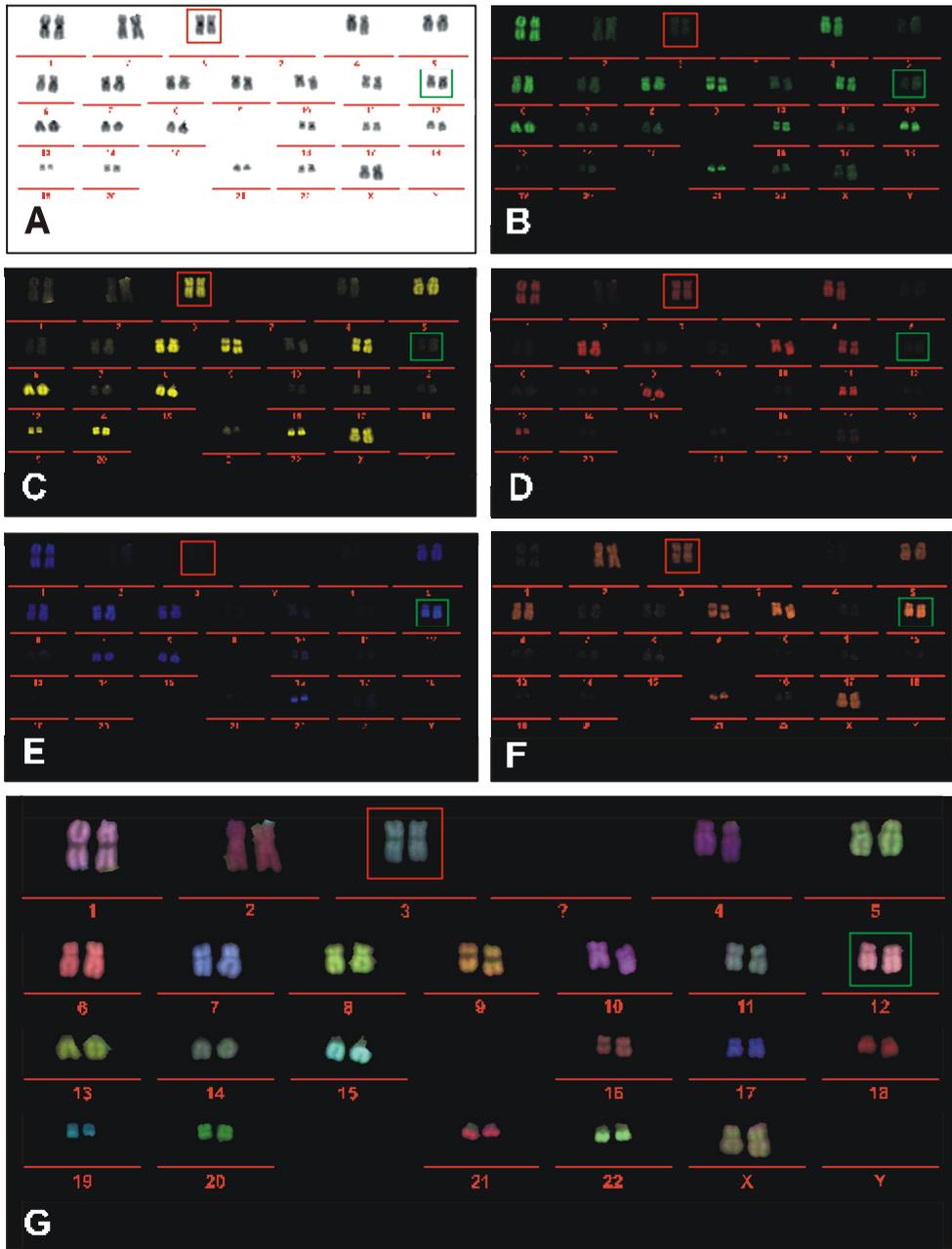


Abb. 5: Multiplex Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (M-FISH).

Karyogramm einer normalen weiblichen Metaphase. Für die M-FISH werden fünf spektral unterscheidbare Fluorochrome eingesetzt: **(A)** Invertierte DAPI-Gegenfärbung. **(B)** FITC-Markierung. **(C)** Rhodamin-Markierung. **(D)** Cy3-Markierung. **(E)** Cy5-Markierung. **(F)** Cy 5.5-Markierung. **(G)** Darstellung des Karyogrammes in „rendered colors“. Jedes Chromosom wird mit einer Kombination aus einem bis drei Fluorochromen markiert, z. B. das Chromosom 3 (rot eingerahmt) mit Cy3 (C), Cy3.5(D) und Cy5.5 (F), das Chromosom 12 (grün eingerahmt) mit Cy 5 (E) und Cy5.5 (F).

Name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
Colour																								
FITC	X			X	X			X	X		X		X			X		X			X		X	X
Cy3			X		X			X	X		X		X		X				X	X			X	X
Cy3.5	X		X	X			X			X	X				X		X		X					X
Cy5	X				X	X	X	X				X		X	X	X							X	
Cy5.5		X	X		X	X			X	X		X										X	X	X

A

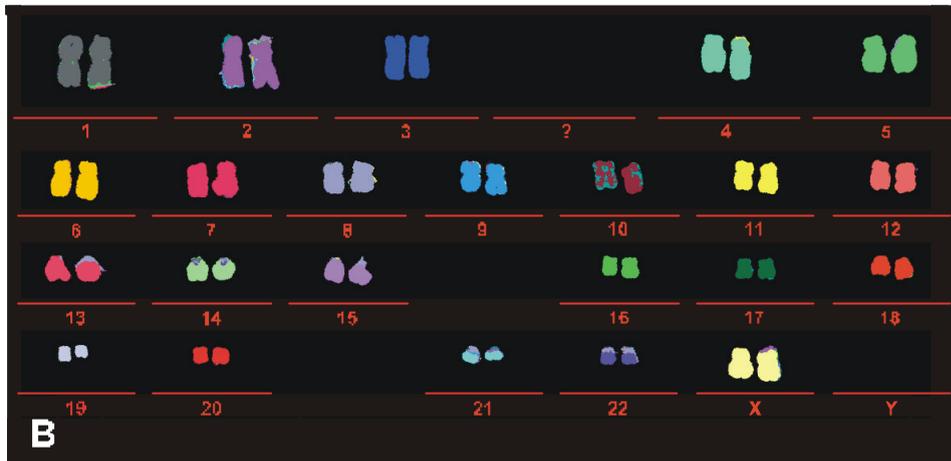


Abb. 6: Multiplex-Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (M-FISH).

A) Falschfarbentabelle. Durch kombinatorische Markierung der einzelnen Chromosomen mit einem bis drei Fluorochromen bei Einsatz von insgesamt fünf verschiedenen Fluorochromen lassen sich alle 24 Chromosomen in einer anderen Falschfarbe darstellen. **B)** Falschfarbenbild („classified image“) einer normalen Metaphase (Vgl. Abb. 5).

1.4 Zielsetzung

In dieser Arbeit werden mit Hilfe zytogenetischer und molekular-zytogenetischer Methoden Proben von CML-Patienten in der Blastenkrise untersucht. Ziel dabei ist das Finden neuer Progressionsmarker. Von besonderem Interesse dafür ist die comparative genomische Hybridisierung (CGH), mit der möglicherweise Amplifikationen nachweisbar sind, die durch die konventionelle Zytogenetik nicht auffindbar sind.

Weiterhin werden mittels CGH verschiedene aus dem peripheren Blut von CML-Patienten in der Blastenkrise gewonnene Fraktionen (CD34-positive Zellen, T-Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten) untersucht, um Anhaltspunkte zur Zellinienspezifität der sekundären Chromosomenaberrationen zu erhalten und so Aussagen über die Tumor-Progression treffen zu können. Dies kann nur durch CGH geschehen, da sich aus den fraktionierten Zellpopulationen keine oder nur sehr schwer Metaphasen gewinnen lassen, die einer Untersuchung durch konventionelle Zytogenetik, sprich G-Bänderung, oder Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) zugänglich wären.

Bei der Untersuchung des Vollblutes der CML-Patienten, aus dem sich neben DNA durch Kultivierung auch Metaphasen gewinnen lassen, sollen die Ergebnisse aus G-Bänderung, FISH sowie CGH verglichen werden. Dies dient der Validisierung der CGH-Ergebnisse sowie der Untersuchung von Eigenschaften dieser Technik, wie z. B. der Nachweisgrenze. D. h. es soll herausgefunden werden, welcher Prozentsatz von Zellen von einer gegebenen Chromosomenaberration betroffen sein müssen, um diese in der CGH-Analyse sichtbar werden zu lassen.

Ein weiterer Abschnitt dieser Arbeit wird sich mit den Einsatzmöglichkeiten der zytogenetischen und molekular-zytogenetischen Methoden befassen, d. h. G-Bänderung, FISH, CGH und Multiplex-FISH (M-FISH). Zu diesem Zweck soll unter Einsatz der genannten Methoden eine exakte zytogenetische Charakterisierung der CML-Zelllinie K562 vorgenommen werden.

2. Material und Methode

2.1 CML-Zelllinie K562

Die K562-Zellen stammen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ ACC 10) und wurden etwa fünf Jahre lang kultiviert.

2.2 CML-Blastenkrise

Peripheres Blut von 15 CML-Patienten wurde untersucht. In Tabelle 1 sind die bekannten klinischen Daten zusammengefaßt.

Tabelle 1: CML-Blastenkrisen, Patientendaten

Patient	Geschlecht	Alter bei		Art der Blastenkrise	Therapie	WBC [x 10 ³ /ml]	Blasten [%]	RT-PCR
		ED	BC					
CML1	w	54	59	myeloisch	Myleran; HU; Ara C		20 (KM)	b3a2
CML2	m	57	58	myeloisch	ICE			negativ
CML3	m	73	73 ¹⁾	myeloisch	Litalir, Allopurinol, Zytatic	35,9		negativ
CML4	w							
CML5	m	64	73 ²⁾		Litalir	31,9		
CML6	m	21	27	myeloisch	allogene KMT			b3a2
CML7	w	39	46	myeloisch	IFN- α ; ICE	17,6	40 (KM)	
CML8	m	61	63	Prä-B- lymphatisch	Syrea; ICE	11,9		b3a2
CML9	m	61	63	myeloisch	IFN- α ; autologe KMT		38/42/? (PB)	b3a2

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 1, Fortsetzung

Patient	Geschlecht	Alter bei		Art der Blastenkrise	Therapie	WBC [x 10 ³ /ml]	Blasten [%]	RT-PCR
		ED	BC					
CML10	w	44	44	myeloisch	Litalir; ICE; KMT	56,9	24 (PB)	b2a2
CML11	w	33	34	myeloisch/B- lymphatisch	Litalir; IFN- α ; HU; allogene KMT	26,6	20 (KM)	b2a2
CML12	m	34	43/ 50 ³⁾		IFN- α ; Hydroxycarbamid	8,8	9 (PB)	b2a2
CML13	w	40	40	myeloisch/T- lymphatisch	allogene KMT	44,4	30 (KM)	e1a2
CML14	w	60	63		HU	3,9		
CML15	w	47	47 ¹⁾	myeloisch	HU	33,0	40 (KM)	e1a2/b2a2

¹⁾ Initiale Präsentation als Blastenschub

²⁾ Akzelerierte Phase

³⁾ Zweiter Blastenschub

Abkürzungen: ED, Erstdiagnose; BC, Blastenkrise; w/m, weiblich/männlich; HU, Hydroxyurea; KMT, Knochenmarkstransplantation; IFN- α , Interferon-alpha; ICE, Idarubicin, Cytarabin, Etoposid; KM, Knochenmark; PB, peripheres Blut.

2.3 Material

2.3.1 Zellseparation

- 80 cm²-Kulturflaschen (Nunc, Roskilde, Dänemark)
- 15 ml- sowie 50 ml-Probenröhrchen mit Schraubverschluß (Greiner, Frickenhausen)
- PP-Röhrchen für die FACS-Analyse (Greiner, Frickenhausen)
- Ficoll-Hypaque-Lösung, Dichte: 1,077 g/cm³ bei 20 °C (Seromed, München)
- PBS (Apotheke des Klinikums der Universität Mainz):

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ xH ₂ O	1,3 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Aqua ad iniectabilia ad 1000 ml	
- Kulturmedien:
 - a) RPMI 1640 (Gibco BRL, Karlsruhe), ohne Zusätze
 - b) mit Zusätzen: 500 ml RPMI 1640 + 5 ml Penicillin/Streptomycin (Gibco, Eggenstein) + 5 ml Pyruvat (Gibco, Eggenstein) + 5 ml Glutamin (Seromed, München) + 5 ml 2M Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen) + 3 ml Nicht-essentielle Aminosäuren (Biochrom KG, Berlin), 1 ml 10 mg/ml Asparagin (Sigma, Deisenhofen) + 5 ml Hepes (Sigma, Deisenhofen) + 50 ml FCS (Fetales Kälberserum; Greiner, Frickenhausen)
 - c) Kulturmedium mit Zusätzen, ohne FCS
- Erythrozyten-Lysis-Puffer (NH₄Cl-Puffer):

NH ₄ Cl (Merck, Darmstadt)	8,29 g/l
KHCO ₃ (Merck, Darmstadt)	1 g/l
EDTA (Sigma, Deisenhofen)	0,0372 g/l
pH 7,27; steril filtriert	
- PBS/0,5% BSA/DNAse I (10 µg/ml)/2 mM EDTA:

500 ml PBS (Apotheke Uniklinik Mainz. s. o.)
+ 8,3 ml 30%ige BSA-Lösung (Sigma, Deisenhofen)

+ 500 µl DNase I-Stammlösung (10 µg/µl) (Sigma, Deisenhofen)

+ 5 ml 0,2 M EDTA (Sigma, Deisenhofen)

- PBS/0,5% BSA/2 mM EDTA
- PBS/1% BSA
- “CD34 Progenitor Cell Isolation Kit (QBEND/10)” (Miltenyi Biotec GmbH, Gladbach) zur Abtrennung CD34+-Stammzellen von PBMNC bzw. BMMNC
[Bestandteile: - Reagens A1 = menschl. Ig (FcR blocking reagent)
- Reagens A2 = monoklonaler Hapten-konjugierter CD34-Antikörper (Klon: QBEND/10. Isotyp: mouse IgG1)
- Reagens B = kolloidale super-paramagnetische MACS MicroBeads, konjugiert mit einem Anti-Hapten-Antikörper]
- Schaf-Erythrozyten (Virion, Würzburg)
- Neuraminidase (Sigma, Deisenhofen)
- Fetales Kälberserum (FCS) (Greiner, Frickenhausen)
- Maus-Antikörper:
 - B4 (Beckman-Coulter, Krefeld) → B-Zellen
 - My4 (Beckman-Coulter, Krefeld) → Monozyten
 - NKH1 (Beckman-Coulter, Krefeld) → NK-Zellen
 - CD16 (Beckman-Coulter, Krefeld) → Granulozyten, NK-Zellen, Monozyten
- Schaf-anti-Maus-IgG-Beads (Dynal, Hamburg): Dynabeads M-450 (SαM-Beads)
- CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
- CD14 Dynalbeads (Dynal, Hamburg)
- VarioMACS-Säulen (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
- MiniMACS-Säulen (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
- 4%ige Dextransulfatlösung (Amersham, Uppsala, Schweden) in FCS-freiem Medium
- FACS-Antikörper (Coulter, Krefeld) zur Messung der Reinheit der verschiedenen Blutfraktionen: Die angegebenen Antikörpermischungen werden durch 1 : 1 Mischungen der einzelnen Antikörper hergestellt.
 - a) CD34-positive Zellen: IgG-AK (Antikörper), FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)-konjugiert/IgG-AK, PE (Phycoerythrin)-konjugiert; FITC-

CD45-AK/PE-CD14-AK; FITC-CD45-AK/PE-CD34-AK; FITC-CD3-AK/PE-CD19-AK; FITC-CD15-AK/PE-CD56-AK.

b) T-Zellen: FITC-IgG-AK/PE-IgG-AK; FITC-CD3-AK/PE-CD19-AK; FITC-CD16-AK/PE-CD34-AK; FITC-CD45-AK/PE-CD14-AK; FITC-CD4-AK/PE-CD8-AK; FITC-CD16-AK/PE-CD56-AK.

c) Granulozyten: FITC-IgG-AK/PE-IgG-AK; FITC-CD45-AK/PE-CD4-AK; FITC-CD45-AK/PE-CD16-AK; FITC-CD3-AK/PE-CD19-AK.

d) Monozyten: FITC-IgG-AK/PE-IgG-AK; FITC-CD45-AK/PE-CD14-AK; FITC-CD45-AK/PE-CD33-AK.

2.3.2 Konventionelle und molekulare Zytogenetik

Allgemeines

- 25 cm²-, 80 cm²- sowie 175 cm²-Kulturflaschen (Nunc, Roskilde, Dänemark)
- 15 ml- sowie 50 ml-Probenröhrchen mit Schraubverschluß (Greiner, Frickenhausen)
- Küvetten (Objektträgerkästen nach Hellendahl, Assistent)
- Diamantschreiber
- Objektträger geschnitten, Mattrand (IDL, Nidderau)
- Deckgläschen 18 x 18, 22 x 22 mm sowie 24 x 50 mm (IDL, Nidderau)
- Fixogum (Marabu, Tamm)
- feuchte Kammer (eigene Herstellung)
- Aqua dest.
- 20 x SSC: 3M NaCL (Merck, Darmstadt)
0,3 M Tri-Natrium-Citrat (Roth, Karlsruhe)
pH 7,0

Durch entsprechende Verdünnung werden 4 x SSC, 2 x SSC, 1 x SSC, 0,5 x SSC, 0,4 x SSC, 0,25 x SSC, sowie 0,1 x SSC hergestellt

- DAPI/Antifade (Oncor, Gaithersburg, MD)
- Nagellack (handelsüblich)

Zellkultur

- Kulturmedium: 500 ml RPMI 1640 (Gibco BRL, Karlsruhe) + 10 - 20% FCS (Fetales Kälberserum; Greiner, Frickenhausen) + 6 ml L-Glutamin (Gibco BRL, Karlsruhe) + 6 - 12 ml Pen-Strep (Penicillin-Streptomycin; Gibco BRL, Karlsruhe)
- Phytohämagglutinin (PHA, Seromed, Berlin)
- Pokeweed mitogene (PWM, Seromed, Berlin)
- Colcemid (Gibco BRL, Karlsruhe)
- Hypotone 0,075 M KCL(Merck, Darmstadt)-Lösung, auf 37 °C vorgewärmt
- Fixativ Methanol (Roth, Karlsruhe)/Eisessig (Merck, Darmstadt) 3 + 1, frisch angesetzt, auf -20 °C gekühlt
- Antikoagulanzen Liquemin (Roche, Mannheim)

G-Bänderung

- Physiologische NaCl (Roth, Karlsruhe) -Lösung (0,9% ig)
- Sørensen-Phosphat-Puffer, pH 6,8: 0,067 M KH_2PO_4 (Merck, Darmstadt; 9,07g/l)-Lösung mit 0,067 M Na_2HPO_4 (Merck, Darmstadt; 11,87 g/l)-Lösung im Verhältnis 1 : 1 gemischt
- Bacto-Trypsin-Stammlösung: Lösen des Bacto-Trypsin-Pulvers (Difco, Detroit MI, USA) in 10 ml sterilem Aqua dest., bei -20 °C lagern
- Bacto-Trypsin-Lösung in Sørensen-Puffer: 2 ml Bacto-Trypsin-Stammlösung + 98 ml 0,9% ige NaCl-Lösung
- Giemsa-Lösung: 8 ml Giemsa-Stammlösung (Merck, Darmstadt) + 92 ml Sørensen-Puffer
- Entellan (Merck, Darmstadt)

Molekulare Zytogenetik, Ansatz von Hybridisierungen

- Denaturierungspuffer für Präparate: 70% Formamid/2 x SSC, pH 7,0
- Hybridisierungsgemische zur Lösung der zu hybridisierenden DNA:
 - Hybrisol VI (Oncor, Gaithersburg, MD)

- 50% deionisiertes Formamid/10% Dextransulfat/2 x SSC, pH 7,0 (deionisiertes Formamid (Oncor, Gaithersburg, MD) mit 20%igem Dextransulfat (Amersham, Uppsala, Schweden) in 4 x SSC 1 : 1 gemischt)
- 50% deionisiertes Formamid/15% Dextransulfat/2 x SSC (deionisiertes Formamid mit 30%igem Dextransulfat in 4 x SSC 1 : 1 gemischt)
- eisgekühlte Ethanolreihe: 70, 80 bzw. 100% Ethanol (Roth, Karlsruhe)

Molekulare Zytogenetik, Waschen und Detektion nach Hybridisierungen

- 1 x PBD (hergestellt aus 20 x PBD, Oncor, Gaithersburg, MD)
- Rhodamine-labeled anti-digoxigenin (Oncor, Gaithersburg, MD)
- Rabbit Anti-Sheep Antibody I (Oncor, Gaithersburg, MD)
- Rodamin Anti-Rabbit Antibody II (Oncor, Gaithersburg, MD)
- 0,4 x SSC/0,3 % NP-40 (Nonidet P-40; ICN Biomedicals Ins., Aurora, Ohio)
- 2 x SSC/0,1 % NP-40
- 50% deionisiertes Formamid (Oncor, Gaithersburg, MD)/2 x SSC
- Block: 4 x SSC/0,1% Tween 20 (Roche, Mannheim)/3% BSA (PAA Lab., Cölbe)
- Florescein-labeled Avidin/Rhodamin-labeled Anti-Digoxigenin (Oncor, Gaithersburg, MD)
- 4 x SSC/0,1% Tween 20 (Roche, Mannheim), pH 7,0
- Anti-DIG-Cy5.5 (Amersham Life Sciences Inc., Arlington Heights, USA)
- Cy3.5-Avidin (Amersham Life Sciences Inc., Arlington Heights, USA)
- Detektionslösung für M-FISH: Cy3.5-Avidin (1 : 300) und Anti-DIG-Cy5.5 (1 : 200) in 4 x SSC/0,1% Tween 20/1% BSA verdünnt

Comparative genomische Hybridisierung (CGH)

- Referenz-Metaphasen: Metaphase-Präparate aus Blutkulturen normaler männlicher Personen (siehe 2.3.1); teilweise wurden gekaufte Präparate verwendet (Normal metaphase CGH target slides; Vysis, Downers Grove, IL)
- DNA-Isolierungskit für Säugetierblut (Roche, Mannheim):
 - Lysis-Puffer für rote Blutkörperchen
 - Lysis-Puffer für weiße Blutkörperchen
 - Protein-Präzipitationslösung

- 100 bzw. 70%iges Ethanol (Roth, Karlsruhe)
- TE-Puffer: 10 mM Tris-HCL (Merck, Darmstadt)
1 mM EDTA (Merck, Darmstadt)
pH 7,5 mit konz. HCL (Merck, Darmstadt) einstellen
- RNase A (Quiagen, Hilden)
- steriler stumpfendiger Glasstab
- CGH Nick Translation Kit (Vysis, Downers Grove, IL):
 - Nick-Translations-Enzymgemisch
 - 10 x Nick-Translations-Puffer
 - dATP, dCTP, dGTP, dTTP
 - Nuklease-freies Wasser
- Biotin-16-dUTP (Roche, Mannheim)
- DIG-11-dUTP (Roche, Mannheim)
- TBE-Puffer: 90 mM Tris-HCL (Merck, Darmstadt)
90 mM Borsäure (Merck, Darmstadt)
1,2 mM Na₂EDTA (Merck, Darmstadt)
- Agarose-HE (Amersham, Buckinghamshire, England)
- 0,7 mg/ml Ethidiumbromid (Eurobio, Raunheim)
- Blaumarker: 50 % Sucrose
50 % Bromphenolblau (Xylen Cyanol, Sigma, Deisenhofen)
- 100 bp-Längenstandard (Gibco BRL, Eggenstein)
- Hitzebeständiges Klebeband
- Cot 1-DNA (Gibco BRL, Eggenstein)
- 3 M Natrium-Acetat (Merck, Darmstadt), pH 5,2

Multiplex-Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (M-FISH)

- 10 x Puffer (Gibco BRL, Eggenstein)
- 50 mM MgCl₂ (Gibco BRL, Eggenstein)
- 10 mM dATP, dTTP, dCTP und dGTP (Perkin Elmer, Norwalk, England)
- 100 µM DOP-Primer (MWG Biotech GmbH, Ebersberg)
- 5 U/µl Taq-Polymerase (Gibco BRL, Eggenstein)
- 1 mM Biotin-dUTP (Roche, Mannheim)

- Cy3-dUTP (Amersham life Science Inc., Arlington Heights, USA)
- DIG-dUTP (Roche, Mannheim)
- Cy5-dUTP (Amersham life Science Inc., Arlington Heights, USA)
- FITC-dCTP (Amersham life Science Inc., Arlington Heights, USA)
- Lachsspermien-DNA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- 1 µg/µl RNase A (Quagen, Hilden) in 2 x SSC
- 8,5 x 10⁻⁴% Pepsin (Roche, Mannheim) in A. dest, pH 2

2.3.3 Verwendete DNA-Proben

- DNA-Proben der Firma Vysis (Downers Grove, USA):
 - LSITM bcr/abl translocation probe: Spectrum green-markierte BCR-Probe, beginnt zwischen den M-bcr-Exons 2 und 3 und erstreckt sich über ca. 300 kb zentromerwärts auf Chromosom 22; Spectrum orange-markierte ABL-Probe, beginnt zwischen den Exons 4 und 5 und erstreckt sich ca. 200 kb telomerwärts auf Chromosom 9.
 - LSI HER-2/neu / CEP17 (Iso 17q): Spectrum orange-markierte HER-2/neu-Probe (Banden 17q11.2-12); Spectrum green-markierte Chromosom 17-Zentromerprobe (17p11.1-q11.1, Locus D17Z1).
 - Proben für ganze Chromosomen = whole chromosome painting (WCP)-Proben: WCP2, WCP5, WCP6, WCP9, WCP10, WCP11, WCP12, WCP13, WCP19, WCP20, WCP21, WCP22q, WCP22, WCPX.
 - Zentromerproben = chromosome enumeration probes (CEPs): CEP6, CEP8, CEP10, CEP11, CEP12, CEP17, CEPX/CEPY.
 - TelVysionTM 11p SG Probe: Spectrum green-markierte Probe, liegt innerhalb von 300 kb vom Ende des Chromosomenarms 11p entfernt.

Alle Proben der Firma Vysis sind mit Spectrum green und/oder Spectrum orange direkt markiert.

- DNA-Proben der Firma Oncor (Gaithersburg, MD):
 - bcr/abl 1 S-FISHTM Translocation DNA Probe: Bruchpunkt-angrenzende BCR- und ABL-Proben; FITC-markierte 350 kb ABL-Probe; Texas red-markierte 350 kb BCR-Probe.
 - bcr/abl 1 D-FISHTM Translocation DNA Probe: FITC-markierte ABL-Probe, ein 600 kb-contig, das die Bruchpunktregion im ABL-Gen überspannt; Texas red-markierte BCR-Probe, ein 500 kb-contig, das die Major- und Minor-Bruchpunktregionen im BCR-Gen überspannt (Vergleich hierzu Sinclair et al., 2000).
 - Alpha Satellite 9, digoxygeniert; Alpha Satellite 13,21, digoxygeniert.

- Nicht-kommerzielle DNA-Proben
 - PAC 1132H12, digoxygeniert: Im ersten ABL-Intron nahe dem Exon 2 auf Chromosom 9
 - BAC bk295D5, digoxygeniert: 200 kb telomerwärts des BCR-Gens auf Chromosom 22
 - Für M-FISH: DNA-Pools der ersten Generation (Michael Speicher, LMU München), siehe 2.9.1

2.3.4 Geräte

- Biofuge fresco (Heraeus, Hanau)
- Kühlzentrifuge mit Schwenkbecherrotor (Heraeus, Hanau)
- Omnifuge 2.0 RS (Heraeus, Hanau)
- Kühlwasserbad F10 (Julabo, Seelbach)
- Wasserbad (Grant, Cambridge, England)
- Schüttelwasserbad (Grant, Cambridge, England)
- CO₂-Inkubator 37 °C (Heraeus, Hanau)
- Brutschrank (Heraeus, Hanau)
- Sterilwerkbank Antair Bsk (M. Hoffman, Stade)
- Kühlschranks (Bosch, Wien)

- Gefrierschrank -20 °C (Bosch, Wien)
- Tiefgefrierschrank, -80 °C (Heraeus, Hanau)
- Taumeltisch WT 12 (Biometra, Göttingen)
- Photometer Pharmacia Ultrospec 2000 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
- Heizblock Dri-Block[®] DB-3 Tech (Thermo-dux, Wertheim/Main)
- Heizblock temperierbar 20 – 96 °C (Eppendorf-Nethelner-Hinz, Hamburg)
- Maxicoldlab, LKB Bromma (Schrank zum Inkubieren in Kälte)
- Taumelrollmischer TRM 50 (IDL, Nidderau)
- Permanentmagnet (Miltenyi Biotec, Bergisch, Gladbach)
- Magnetständer (Dynal, Hamburg)
- Epics XL Durchflußzytometer (Coulter, Krefeld)
- Minigelelektrophoresekammer mit Gelträger und 8-Spur-Gelkammer (Applied Biosystems, Weiterstadt)
- Gleichstromquelle (Gibco BRL, Eggenstein)
- Mikrowellengerät 600 W (Bosch, Wien)
- PCR-Gerät Thermoblock (Biometra, Göttingen)
- Zum Aufnehmen von Gelbildern:
 - UV-Illuminationstisch (Labotec, Wiesbaden)
 - Dokumentationssystem (Mitsubishi, Deutschland)
- Leica DM RBE-Mikroskop (Leica, Cambridge, England) mit einer hochauflösenden KOHU-Graustufen CCD Kamera und der Bildauswertungs-Software Cytovision Version 3.1 der Firma Applied Imaging (Santa Clara, CA), implementiert auf einem Dell Power Edge Sp 590-2-Rechner
- Leica DM RXA-Mikroskop (Leica, Cambridge, England) mit einer hochauflösenden Sensys-CCD-Kamera (Photometrics, Tucson, Arizona) und der Q-FISH-Software Version Y2.3.2.Beta sowie der MCK image analysis-Software (Leica) auf einem Leica Q550 CW-Computer

2.4 Zellseparation aus peripherem Blut

Aus peripherem Blut von CML-Patienten in der Blastenkrise wurden die CD34-positiven Zellen, die Granulozyten, die Monozyten und die T-Zellen gewonnen (Abb. 7).

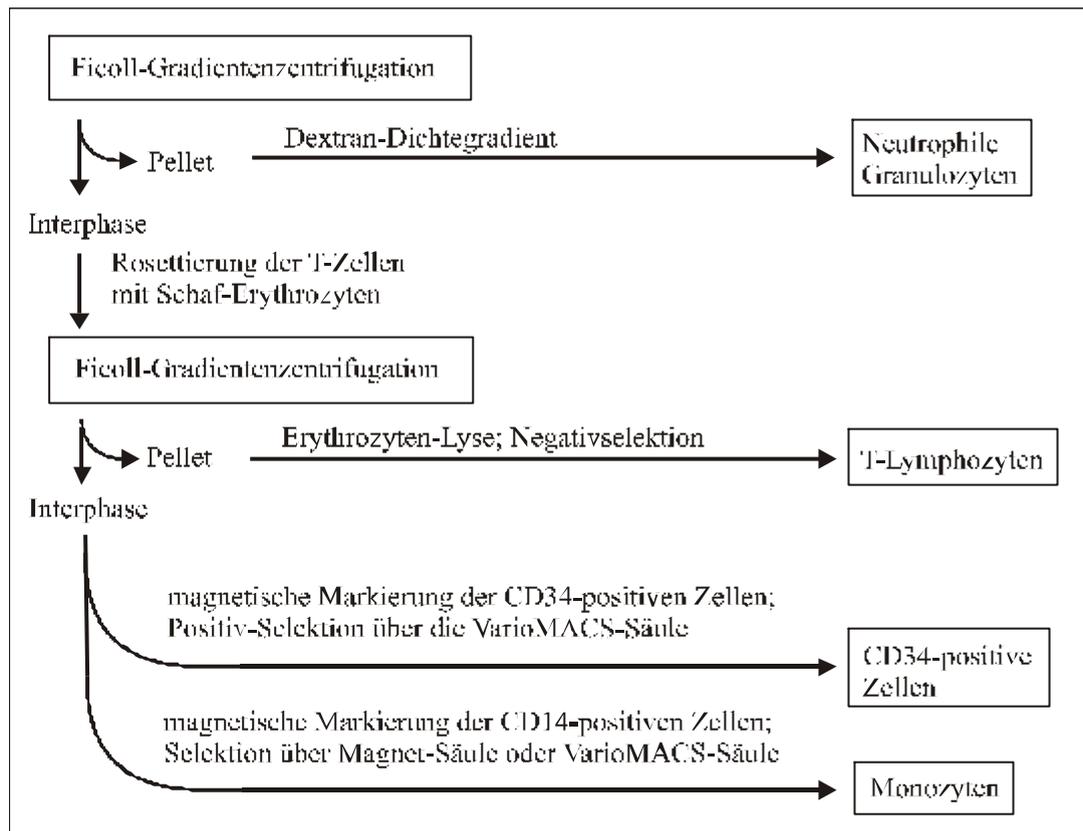


Abb. 7: Separierung von neutrophilen Granulozyten, T-Lymphozyten, CD34-positiven Zellen und Monozyten aus peripherem Blut von CML-Patienten in der Blastenkrise.

Für die Fraktionierung der Monozyten wurde im Verlauf des Projektes zur Benutzung von MicroBeads übergegangen, analog zur CD34-Aufreinigung

2.4.1 Isolierung der mononukleären Zellen aus peripherem Blut

Zur Isolierung der mononukleären Zellen (peripheral blood mononuclear nucleated cells = PBMNC) werden je 25 ml Ficoll in ein Falcon vorgegeben und vorsichtig mit 1 : 1 mit PBS gemischtem Blut überschichtet. Nach Zentrifugieren über dem Ficoll-Dichtegradienten bei 500 x g für 25 min ohne Bremse befinden sich Erythrozyten und Granulozyten im Sediment, während die mononukleären Zellen in der

Interphase als Ring sichtbar werden. Die Interphase wird abgenommen, 1 : 1 mit PBS gemischt und 5 min bei 500 x g zentrifugiert). Zur Lyse der restlichen Erythrozyten wird das Pellet mit 5 – 10 ml kaltem NH_4Cl -Puffer überschichtet, resuspendiert und 5 min auf Eis gestellt. Die erfolgreiche Erythrozyten-Lyse ist am Farbumschlag von rot nach lachsfarben erkennbar. Anschließend werden die mononukleären Zellen noch einmal mit PBS gewaschen.

2.4.2 Gewinnung der T-Lymphozyten über Erythrozyten-Rosettierung

Durch Rosettierung mit Schaf-Erythrozyten wird eine deutliche Anreicherung der T-Zellen erreicht. Schaferythrozyten exprimieren ein Oberflächenmolekül, das große Ähnlichkeit mit dem humanen Adhäsionsmolekül LFA-3 (Leukocyte Function Associated Antigen) aufweist. LFA-3 ist der physiologische Ligand für den T-Zellmarker CD2. Die Bindung der Schaferythrozyten an das CD2-Antigen der T-Lymphozyten führt zur Bildung von Rosetten. Neuraminidase macht die LFA-3-Oberflächenmoleküle der Erythrozyten besser zugänglich, was zu einer Stabilisierung der Rosetten führt. Daher werden 5 ml Schaf-Erythrozyten nach dreimaligem Waschen mit PBS (jeweils bei 1800 rpm für 5 min zentrifugieren) in 1 ml PBS mit 0,5 U/ml Neuraminidase aufgenommen und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen in PBS werden die Schaf-Erythrozyten in 25 ml Kulturmedium aufgenommen und bleiben so bis zu einer Woche lang bei 4 °C stabil. 10 ml PBMNC-Suspension (mit einer Konzentration von 10^7 Zellen in 1 ml PBS) werden mit 5 ml fetalem Kälberserum und 5 ml Schaf-Erythrozytensuspension (s. o.) gemischt und 15 min lang bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Anschließend werden die Zellen 10 min bei 800 rpm zentrifugiert und zur Stabilisierung der Bindung für 30 – 60 min auf Eis gestellt. Danach werden sie kurz im Wasserbad bei 37 °C aufgewärmt, vorsichtig resuspendiert und mit 10 ml Ficoll unterschichtet. Bei der nun erfolgenden Ficoll-Gradientenzentrifugation (25 min bei 500 x g, ohne Bremse) werden die an die Schaf-Erythrozyten gebundenen T-Lymphozyten im Sediment von den restlichen mononukleären Zellen in der Interphase getrennt. Die Schaf-Erythrozyten werden mit 10 ml kalter Ammoniumchloridlösung lysiert (siehe 2.4.1). Zur Reinigung der T-Zellen von den restlichen B-Zellen, Monozyten und NK-Zellen wird im Anschluß eine

Negativ-Selektion durchgeführt. Dazu werden die Zellen in 1 ml kaltem Medium pro 2×10^7 Zellen aufgenommen und mit einer Mischung aus Maus-Antikörpern gegen die unerwünschten Zelltypen 30 min bei 4 °C rotierend inkubiert. Diese Mischung setzt sich zusammen aus Anti-CD19-(Anti-B4), Anti-CD14-(Anti-MY4-), Anti-CD56-(Anti-NKH1-) und Anti-CD16-Antikörpern. Die Schaf-anti-Maus-beads werden dreimal gewaschen (mit 8 ml kaltem Medium in einem 15 ml-Falcon für einige sec im Magnetständer stehenlassen, dann das Medium abpipettieren), in einer Konzentration von 7 Beads pro Zielzelle dem Zellgemisch beigefügt und 45 min rotierend bei 4 °C inkubiert. Die Abtrennung der markierten Zielzellen von den gewünschten T-Lymphozyten erfolgt dann im Magnetständer. Hierfür wird das Falcon mit dem Zellgemisch für jeweils 5 min in den Magnetständer eingestellt, die Flüssigkeit abpipettiert und in ein neues Falcon überführt, das wiederum in den Magnetständer gestellt wird. Dies wird solange wiederholt, bis an der Wand des Falcons zum Magnetständer hin keine Beads mehr sichtbar werden.

2.4.3 Separierung CD34-positiver (CD34⁺) Stammzellen

Die Abtrennung CD34-positiver Zellen mit dem „CD34 Progenitor Cell Isolation Kit“ basiert auf der magnetischen Markierung von Zellen, die das humane CD34-Antigen auf ihrer Oberfläche exprimieren, und deren anschließender magnetischer Separierung. Dazu werden die über Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen PBMNCs (siehe 2.4.1) in supplementiertem PBS (enthält 0,5% BSA, 10 µg/ml DNase I und 2 mM EDTA) gewaschen und in 300 µl supplementiertem PBS pro 10^8 Zellen resuspendiert. Je 300 µl dieser Suspension werden mit 100 µl Reagens A1 sowie 100 µl Reagens A2 versetzt und 15 min bei 4 °C rotierend inkubiert. Anschließend wird mit PBS/BSA/DNase/EDTA gewaschen und in 500 µl supplementiertem PBS pro 10^8 Zellen resuspendiert. Die Separierung der CD34⁺-Zellen erfolgt nun über die am Permanentmagneten befestigte MiniMACS-Säule (bei einer Ausgangs-Zellzahl von bis zu 2×10^8 Zellen) oder VarioMACS-Säule (bei höherer Zellzahl). Dabei werden die markierten, CD34-positiven, Zellen in der Säule festgehalten, während die CD34-negativen Zellen der Schwerkraft folgend nach unten wandern. Die Säule wird zunächst

mit PBS/0,5% BSA/2 mM EDTA äquilibriert, dann werden die markierten Zellen daraufgegeben. Nachdem die Zellsuspension durch die Säule gelaufen ist, wird diese drei mal mit PBS/BSA/EDTA durchgespült. Schließlich wird die Säule vom Magneten entfernt und die CD34+-Zellen werden mit Hilfe des dazugehörenden Stempels aus der Säule herausgedrückt.

2.4.4 Separierung der neutrophilen Granulozyten

Zur Gewinnung der neutrophilen Granulozyten wird das aus der Ficoll-Gradientenzentrifugation erhaltene Sedimentationspellet aus Erythrozyten und Granulozyten (siehe 2.3.1) über einen Dextran-Dichtegradienten gegeben: Das Pellet wird mit FCS-freiem Medium im Verhältnis 1 : 1 gemischt, die Mischung mit einem Volumenanteil von 10 % mit einer 4%igen Dextransulfatlösung versetzt, resuspendiert, in ein neues 50 ml-Falcon überführt und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die obere Phase, in der sich die neutrophilen Granulozyten angereichert haben, abgenommen und abzentrifugiert (5 min bei 500 x g). Das Pellet wird dann durch Erythrozytenlyse mit kaltem NH₄CL-Puffer (siehe 2.4.1) von den restlichen Erythrozyten befreit. Nach zweimaligem Waschen in PBS sollten die Granulozyten möglichst sofort weiterverarbeitet werden, da sie sehr kurzlebig sind.

2.4.5 Gewinnung von Monozyten über immunomagnetische Positivselektion

Die PBMNCs aus der durch Ficoll-Gradientenzentrifugation gewonnenen Interphase (siehe 2.4.1) werden an Antikörper gebunden, die mit Metallbeads gekoppelt sind und gegen das Monozyten-Oberflächenantigen CD14 gerichtet sind (CD14 Dynalbeads). Die PBMNCs werden mit kaltem Kulturmedium auf eine Konzentration von 10⁷ Zellen/ml eingestellt. Die Beads werden dreimal mit kaltem Medium gewaschen und in einer Konzentration von 7 Beads pro Zielzelle zu den mononukleären Zellen gegeben. Die Suspension wird 45 min bei 4 °C rotierend inkubiert. Im Anschluß werden die markierten, CD14-positiven Zellen, mit Hilfe eines Magnetständers von der

Restpopulation getrennt: 8 ml kaltes PBS werden hinzugefügt, das 15 ml-Falcon wird in den Magnetständer eingestellt und nach 5 min wird die Flüssigkeit vorsichtig entfernt (ohne die Beads vom Rand des Röhrchens mit aufzusaugen). Dies wird drei- bis viermal wiederholt, dann werden die an die Beads gekoppelten CD14-positiven Zellen in PBS aufgenommen. Die DNA-Isolierung kann dann ohne vorherige Abtrennung der Beads erfolgen, für die FACS-Analyse (siehe 2.4.7) sind die Zellen so allerdings nicht zugänglich. Da eine Abtrennung der Beads mit hohen Einbußen hinsichtlich der Zellzahl verbunden wäre, wurde die Gewinnung von Monozyten über CD14-MicroBeads eingeführt.

2.4.6 Gewinnung von Monozyten über CD14-MicroBeads

Die Separierung von Monozyten über CD14-MicroBeads beruht, ebenso wie die Gewinnung CD34-positiver Zellen (siehe 2.4.3), auf der magnetischen Markierung der Zielzellen und deren anschließender magnetischer Abtrennung von den Restzellen. Die aus der Ficoll-Gradientenzentrifugation gewonnenen PBMNCs werden in 80 μ l PBS/0,5% BSA/2mM EDTA pro 10^7 Zellen aufgenommen. Anschließend werden sie mit 20 μ l MACS MicroBeads pro 10^7 Zellen gemischt und 15 min bei 4 °C rotierend inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS/BSA/EDTA werden sie 10 min bei 300 x g zentrifugiert und in 500 ml PBS/BSA/EDTA pro 10^8 Zellen resuspendiert. Die Separierung der CD14-positiven Monozyten über die am Permanentmagneten befestigte MiniMACS- oder VarioMACS-Säule wird analog zur Gewinnung der CD34-positiven Zellen durchgeführt (siehe 2.4.3).

2.4.7 Durchflußzytometrische Analyse der Reinheit der Zellpopulationen

Die aus peripherem Blut separierten Fraktionen wurden mittels FACS-Analyse am EPICS XL Durchflußzytometer der Firma Coulter (Krefeld) auf den Grad ihrer Reinheit hin untersucht.

Bei der hier angewendeten Mehrfarbenfluoreszenzanalyse sind die Fluoreszenzfarbstoffe so gewählt, daß sich ihre Fluoreszenzspektren zwar unterscheiden, ihre Fluoreszenz jedoch mit der gleichen Wellenlänge angeregt werden kann: Verwendet werden Antikörper, die mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC; Emissionsspektrum bei 525 nm) oder Pycoerythrin (PE; Emissionsspektrum bei 575 nm) konjugiert sind. Zur Markierung der Zellen mit den verschiedenen Antikörper-Kombinationen (siehe 2.3.1) werden jeweils 1 bis 5×10^5 Zellen mit 100 µl PBS und 10 µl AK-Gemisch zusammengegeben, vorsichtig gemischt, 8 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, 5 min bei 1400 rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Anschließend werden die Zellen mit 1 ml PBS/1% BSA gewaschen (5 min bei 1400 rpm zentrifugieren), in 0,5 ml PBS/1% BSA aufgenommen und im Durchflußzytometer gemessen. Sofern genügend Zellen der jeweiligen Fraktion verfügbar waren, wurden alle im Material-Teil genannten Antikörper-Kombinationen für die Messung eingesetzt.

2.5 Zellkultivierung und Erntung kultivierter Zellen

Zellen aus dem peripheren Blut von Normalpersonen bzw. von CML-Patienten in der Blastenkrise sowie kryokonservierte Zellen der CML-Zelllinie K562 wurden kultiviert und geerntet.

2.5.1 Ansatz der Kulturen aus peripherem Blut

Eine 25 cm²-Kulturflasche wird mit 10 ml Kulturmedium und ca. 1 ml (20 Tropfen) Blut beschickt und mit geöffnetem Schraubverschluß für 24 bzw. 48h (CML-Blastenkrise) oder 72h (Blut normaler Personen) bei 37 °C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Die Lymphozytenkulturen aus dem Blut normaler Personen werden bei Ansatz mit 300 µl PHA und 200 µl PWM stimuliert.

2.5.2 Ansatz und Betreuung von Kulturen aus kryokonservierten Zellen der CML-Zelllinie K562

Die Zellen werden im 37 °C-Wasserbad schnell aufgetaut und sofort zweimal unter sterilen Bedingungen mit PBS gewaschen (jeweils 5 min bei 1400 rpm zentrifugieren). Anschließend werden die Zellen in Kultur genommen, wobei 1 x 10⁶ Zellen pro ml Kulturmedium eingesetzt werden. 6 ml-Kulturen werden in 25 cm²-Kulturflaschen angesetzt. Die Kulturen werden täglich auf Kontaminationen hin kontrolliert. Sind die Nährstoffe verbraucht, was durch einen Farbumschlag des Mediums von rot nach gelb (aufgrund des enthaltenen Indikators, der im Basischen gelb gefärbt ist) angezeigt wird, werden die Zellen gefüttert: Die Menge des Mediums wird erhöht (verdoppelt bis vervierfacht) und die Zellen werden entweder auf mehrere Kulturflaschen verteilt oder in größere Kulturflaschen überführt.

2.5.3 Erntung von Kulturen aus peripherem Blut sowie der CML-Zelllinie K562

Alle Kulturen werden mit Colcemid versetzt, um die im Wachstum befindlichen Zellen in der Metaphase zu arretieren. Blutkulturen normaler Spender werden mit 120 bis 180 μ l Colcemid pro 10 ml Medium versetzt, die K562-Kulturen und die Kulturen aus CML-Blastenkrise mit 120 – 180 μ l Colcemid pro 10 ml Medium. Um den Mitose-Index der Präparate aus CML-Blastenkrise zu erhöhen, wurde bei einem Teil der Kulturen 24h nach Kulturansatz 1/10 der Colcemid-Menge zugegeben, die nach 48h zur Erntung zugegeben wurde. Dies führt zu einer höheren Zahl an Metaphasen, deren Chromosomen dann meist kurz sind, also für G-Banden-Analyse nicht gut geeignet, aber sehr wohl für die „Hypermetaphase-FISH“ (siehe 1.3.1; 2.7).

Nach Colcemid-Zugabe werden die Kulturen für 15 – 20 min bei 37 °C inkubiert, bei den stimulierten Kulturen aus dem Blut normaler Spender kann die Einwirkzeit bis zu 30 min betragen. Anschließend werden die Kulturen in Falcons überführt, bei 1000 rpm für 10 min abzentrifugiert, und der Überstand wird abgesaugt. Die Falcons werden mit hypotoner Lösung aufgefüllt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird erneut zentrifugiert (s. o.), der Überstand abgesaugt und Fixativ Methanol/Eisessig 3 + 1 zugegeben (bei dieser ersten Fixierung muß das Fixativ zunächst sehr langsam unter Schütteln des Röhrchens zugegeben werden, bis sich die Suspension dunkel färbt, der Rest kann schneller aufgefüllt werden). Dann wird wieder zentrifugiert. Insgesamt wird drei bis vier mal fixiert. Die Zellen können im Fixativ bei –20 °C gelagert werden.

2.6 G-Bandenfärbung

Zur klassischen zytogenetischen Analyse wurden Metaphasen aus CML-Blastenkrise und der CML-Zelllinie K562 nach der GTG-Technik (G-Banden mit Trypsin und Giemsa) [114] gebändert. Die G-Bandenfärbung beruht auf einer Vorbehandlung der Chromosomen mit dem proteolytischen Enzym Trypsin, das vermutlich die Proteine des GC-reichen Euchromatins stärker angreift als die des AT-reichen Heterochromatins. Daraufhin werden die Proteine des Heterochromatins stärker gefärbt, so daß ein Bandenmuster entsteht [162]. Für die G-Bänderung u. a. Bandenmuster wurde eine internationale Standard-Chromosomen-Nomenklatur festgelegt [190].

Für die G-Bänderung werden Präparate durch Auftropfen aus den in Methanol/Eisessig fixierten Zellen hergestellt und eine Woche lang bei Raumtemperatur gealtert. Die Metaphase-Präparate werden 30 – 60 sec mit Bacto-Trypsin-Lösung behandelt, kurz in Sørensen-Puffer gespült, 10 min in der Giemsa-Lösung angefärbt und schließlich in Aqua dest. gespült. Nach dem Lufttrocknen werden die gefärbten Präparate mit Entellan eingedeckt. Die G-Banden-Analyse wurde an einem Leica DM RBE-Mikroskop (Leica, Cambridge, England) durchgeführt. Für die Bildaufnahme und Karyotypisierung der Metaphasen wurden eine hochauflösende KOHU-Graustufen CCD (Charge Coupled Device)-Kamera und die Bildauswertungs-Software Cytovision Version 3.1 der Firma Applied Imaging (Santa Clara, CA), implementiert auf einem Dell Power Edge Sp 590-2-Rechner, eingesetzt.

Von den Proben aus CML-Blastenkrise wurden jeweils 20 bis 38 Metaphasen ausgewertet, die in der Regel alle mit Hilfe der Cytovision Software vollständig karyotypisiert wurden. In zwei Fällen wurden zum Teil Zeichnungen der Metaphasen angefertigt, in einem weiteren Fall wurden von den ausgewerteten 20 Zellen 12 karyotypisiert, während 8 Zellen numerisch ausgewertet wurden. Insgesamt konnten an 10 Proben, die von 9 CML-Patienten stammten, G-Bandenanalysen durchgeführt werden. 51 Zellen der CML-Zelllinie K562 wurden mittels der Cytovision Software karyotypisiert.

2.7 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

In dieser Arbeit wurden FISH-Untersuchungen an CML-Blastenkrise sowie an der CML-Zelllinie K562 durchgeführt. Parallel zu jedem FISH-Experiment wurden Kontrollen auf Lymphozyten normaler Spender durchgeführt. Die Präparate wurden durch Auftropfen aus den in Methanol/Eisessig fixierten Zellen hergestellt und zwei bis drei Tage lang bei Raumtemperatur gealtert. Eingesetzt wurden single copy-Proben, whole chromosome paintings (WCPs), die ganze Chromosomen nachweisen, Zentromer-Proben (Chromosome enumerations probes, CEPs) und Telomer-Sonden. Die DNA-Proben waren zum Teil direkt, zum Teil indirekt markiert. Durchgeführt wurde Interphase-FISH, Metaphase-FISH und Hypermetaphase-FISH.

Für die Technik des „Hypermetaphase“-FISH wird durch eine zusätzliche Colcemid-Gabe niedriger Konzentration im Verlauf der Zellkultur die Zahl der Metaphasen entscheidend erhöht, so daß eine quantitative Analyse der Hybridisierung anhand von Metaphasen möglich wird (siehe 1.3.1; 2.5.3). Diese Technik wurde hier, ergänzend zum Interphase-FISH, zur Analyse der BCR/ABL-Translokation, des Auftretens des Isochromosoms 17q und zur Untersuchung von Aneuploidien eingesetzt.

2.7.1 Vorbereitung und Denaturierung der Präparate

Auf den Präparaten wird eine für die Hybridisierung geeignete Region markiert (mittels Diamantschreiber von der Unterseite des Objektträgers her). Zur Denaturierung der chromosomalen DNA werden die Objektträger für 2 min in 70% Formamid/2 x SSC bei 73 ± 1 °C eingestellt. Anschließend wird das Präparat in einer aufsteigenden, bei – 20 °C vorgekühlten Alkoholreihe dehydriert: Es wird jeweils 2 min in 70, 80 bzw. 100%igem Ethanol eingestellt und anschließend luftgetrocknet.

2.7.2 Vorbereitung und Denaturierung der DNA-Proben

1. Vysis-Proben: Pro Hybridisierung werden 7 μ l Hybridisierungspuffer (vom Hersteller mitgeliefert), 2 μ l Aqua dest. und 1 μ l DNA-Sonde gemischt. Zur Hybridisierung von bis zu drei Sonden gleichzeitig werden von jeder Sonde 1 μ l eingesetzt und entsprechend weniger Aqua dest. verwendet. Durch Kombinieren von Spectrum green- bzw. Spectrum orange-markierter DNA derselben Probe kann eine gelbe Mischfarbe erzeugt werden. Die Proben werden durch Erhitzen für 5 min bei 73 ± 1 °C denaturiert und bis zum Gebrauch bei 40 – 45 °C aufbewahrt.
2. Oncor-Proben: Die bcr/abl 1 S-FISHTM Translocation DNA Probe und die bcr/abl 1 D-FISHTM Translocation DNA Probe sind direkt einsetzbar. Je 1,5 μ l der Satelliten-Proben werden mit 30 μ l Hybrisol VI gemischt. Die Proben werden durch Erhitzen für 5 min bei 73 ± 1 °C denaturiert. Die BCR/ABL-Sonden werden vor Gebrauch 5 min bei 37 °C inkubiert, die Satelliten-Sonden werden bis zum Gebrauch auf Eis gelagert.
3. BAC *bk295D5*, PAC *1132H12*: Die in Hybridisierungsgemisch (50% Formamid/10% Dextransulfat/2 x SSC) gelösten Proben werden für 5 min bei 72 °C denaturiert und 10 – 15 min bei 37 °C prähybridisiert.

2.7.3 Hybridisierung

Je Präparat wird 10 μ l DNA-Probe aufgetragen, mit einem 22 x 22 mm Deckgläschen eingedeckt und mit Fixogum versiegelt. Die Hybridisierung erfolgt in einer feuchten Kammer bei 37 °C für ein bis drei Tage. Für die CEP-Proben der Firma Vysis ist vom Hersteller eine Hybridisierungstemperatur von 42 °C angegeben, in Doppelhybridisierungsexperimenten mit CEP-Proben und WCP-Proben hat sich allerdings eine Temperatur von 37 °C bewährt.

2.7.4 Waschen (und Detektion bei indirekter Markierung)

1. Vysis-Proben: Die Präparate werden für 2 min in 4 x SSC/0,3% NP 40 bei 73 ± 1 °C und anschließend für 5 sec bis 1 min in 2 x SSC/0,1% NP 40 bei Raumtemperatur gewaschen.
2. Oncor-Proben: Die Präparate werden für 5 min in 0,5 x SSC (BCR/ABL-Probe) bzw. 0,25 x SSC (Satelliten-Proben) bei 72 ± 2 °C gewaschen und für 1 bis 2 min in 1 x PBD bei Raumtemperatur eingestellt. Bei den mit Digoxigenin markierten Sonden erfolgt im Anschluß die Detektion. Dazu werden 60 µl Rhodamin-markiertes Anti-digoxigenin aufgetragen, mit einem 24 x 50 mm Deckgläschen eingedeckt und in der feuchten Kammer bei 37 °C für 30 bis 60 min inkubiert. Danach wird 3 x 2 min in 1 x PBD bei Raumtemperatur gewaschen. Eine Amplifikation der Signale kann durch Verwenden von Rabbit Anti-Sheep Antibody I und anschließend Rodamin Anti-Rabbit Antibody II (Durchführung analog wie Nachweis) erreicht werden, ist aber nicht in jedem Fall erforderlich.
3. BAC bk295D5, PAC 1132H12: Die Präparate werden 3 x 5 min in 50% Formamid/2 x SSC bei 42 °C schüttelnd gewaschen, anschließend 3 x 5 min in 0,1 x SSC bei 60 °C. Zum Abdecken unspezifischer Bindungen wird mit 200 µl 2 x SSC/0,1% Tween 20/3% BSA eingedeckt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Für die Detektion wird mit 60 µl Rhodamin-markiertem Anti-digoxigenin eingedeckt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird 3 x 5 min in 4 x SSC/0,1 % Tween 20 bei 42 °C im Schüttelwasserbad gewaschen.

Eindecken: 10 bis 15 µl DAPI/Antifade werden pro Objektträger aufgetragen, mit 24 x 50 mm Deckgläschen eingedeckt und mit Nagellack versiegelt.

2.7.5 Auswertung der FISH

Die mikroskopische Auswertung der FISH-Experimente erfolgte zum größten Teil an einem Leica DM RBE-Mikroskop (Leica, Cambridge, England). Für die Bildaufnahme wurde eine hochauflösende KOHU-Graustufen CCD (Charge Coupled Device)-Kamera und die Bildauswertungs-Software Cytovision Version 3.1 der Firma Applied Imaging (Santa Clara, CA), implementiert auf einem Dell Power Edge Sp 590-2-Rechner, eingesetzt. Ein kleiner Teil der Auswertungen wurde an einem Leica DM RXA-Mikroskop (Leica, Cambridge, England) durchgeführt, wobei die Aufnahmen mit einer hochauflösenden CCD-Sensys-Kamera (Photometrics, Tucson, Arizona) und der Leica Q-FISH Software Version Y2.3.1.Beta auf einem Leica Q 550 CW-Computer erstellt wurden.

In die Auswertung von Interphase-FISH-Experimenten gingen pro Fall 200 bis 300 Kerne ein, bei der Analyse von Metaphasen mittels FISH wurden einige bis 30 Metaphasen ausgewertet, bei der „Hypermetaphase“-FISH (siehe 1.3.1) wurden bis zu 200 Zellen analysiert.

2.8 Comparative genomische Hybridisierung (CGH)

2.8.1 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion aus peripherem Blut von Patienten in der CML-Blastenkrise und männlichen Normalpersonen sowie aus den vier durch die Zellseparation gewonnenen Fraktionen (CD34-positive Zellen, Granulozyten, Monozyten und T-Zellen) (siehe 2.2) wurde mit Hilfe des DNA-Isolierungskits für Säugerblut der Firma Roche (Mannheim) durchgeführt. Dazu werden jeweils 30 ml Lysis-Puffer für Erythrozyten mit 10 ml Blut überschichtet, 10 min auf einem Taumeltisch gemischt und bei 875 x g für 10 min zentrifugiert. Der klare rote Überstand wird vom Pellet aus weißen Blutkörperchen getrennt. Die Erythrozyten-Lyse ist bei den fraktionierten Zellen nicht erforderlich. Anschließend gibt man 5 ml Lysis-Puffer für weiße Blutkörperchen hinzu, mischt sorgfältig und inkubiert für 10 min bei 65 °C. Optional kann man nun RNase A in einer Endkonzentration von 0,02 µg/µl hinzufügen und 15 min bis 1 h bei 37 °C inkubieren, um etwaige RNA-Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend gibt man 2,6 ml Proteinfällungslösung zur Probe, mischt sorgfältig und zentrifugiert bei 4500 x g für 10 min (damit wurden gute DNA-Ausbeuten erzielt, wenngleich laut Hersteller bei 12000 x g zentrifugiert werden sollte). Der DNA-haltige Überstand wird in ein neues Röhrchen überführt. Nach Zugabe von zwei Volumeneinheiten Ethanol (Raumtemperatur) und Mischen durch Inversion wird die DNA in Form von weißen Strängen sichtbar. Diese können mit einem stumpfendigen Glasstab aus der Flüssigkeit „gefischt“ werden und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 70%igem Ethanol überführt werden. Nach Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 min wird der Überstand verworfen, das DNA-Pellet an der Luft getrocknet und die DNA in 50 – 1000 µl TE-Puffer aufgenommen (je nach Größe des Pellets). Die in TE-Puffer gelöste DNA kann bis zu mehrere Jahre lang bei – 20 °C aufbewahrt werden.

2.8.2 Nick-Translation zur Markierung von Test- und Referenz-DNA

Die erhaltenen gesamtgenomischen DNAs werden mit Hilfe des CGH Nick Translation Kits der Firma Vysis mit Biotin-16-dUTP oder DIG-11-dUTP markiert.

Bei der Nick-Translation [118] wird doppelsträngige DNA unter Zuhilfenahme der DNase I sowie der E. coli-Polymerase I markiert: Die DNase I setzt „nicks“ in den DNA-Doppelstrang, also offene Phosphodiesterbrücken, die als Ansatzpunkt für die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Pol I dienen, die vom 5'-Ende her Nukleotide abbaut, so daß die DNA einzelsträngig wird. Die Polymerasefunktion der Pol I schließt die Lücke vom 3'-OH-Ende her. Geschieht dies unter Anwesenheit markierter Nukleotide (Digoxigenin- oder Biotin-markiert), so wird die DNA gleichmäßig markiert.

a) Markierung mit Biotin-16-dUTP (Tumor- bzw. Test-DNA)

- X μ l DNA (1 – 3 μ g)
- X μ l Aqua dest. (ergibt zusammen mit der DNA 19,6 μ l)
- 5 μ l 10 x Puffer
- 10 μ l dNTP-Mix (je 0,1 mM dATP, dGTP sowie dCTP)
- 3,31 μ l 0,1 mM dTTP
- 2,1 μ l 0,1 mM Biotin-16-dUTP
- 10 μ l Enzymmix

b) Markierung mit DIG-11-dUTP (Referenz-DNA)

- X μ l DNA (1 – 2 μ g)
- X μ l Aqua dest. (ergibt zusammen mit der DNA 15,0 μ l)
- 5 μ l 10 x Puffer
- 10 μ l dNTP-Mix (je 0,1 mM dATP, dGTP sowie dCTP)
- 6,66 μ l 0,1 mM dTTP
- 3,33 μ l 0,1 mM DIG-11-dUTP
- 10 μ l Enzymmix

Zur Digoxigenin-Markierung haben sich Mehrfach-Ansätze bewährt, da Referenz-DNA in größerer Menge benötigt wird. Die Ansätze werden 2 – 4 h bei 15 °C

inkubiert, anschließend wird die Reaktion durch 10minütiges Erhitzen auf 70 °C abgestoppt.

c) Gel-Elektrophorese nach Nick-Translation:

Für den Einsatz zur CGH sollten die Fragmentlängen zwischen 200 und 1000 bp liegen, mit einem Maximum bei 500 bp. Dies wird in einem 1%igen Agarosegel getestet. 500 mg Agarose werden mit 50 ml TBE-Puffer in der Mikrowelle solange erhitzt, bis keine Schlieren mehr sichtbar sind, kurz abkühlen gelassen und mit einem Tropfen Ethidiumbromid versetzt. Die offenen Enden der Gelkammer werden mit Klebeband zugeklebt, die Kammer wird mit der noch flüssigen Agarose gefüllt und der Kamm eingesetzt. Nach Erhärten der Agarose werden die Klebestreifen entfernt, die Kammer in das Elektrophoresegerät eingesetzt und die Geltaschen beschickt: 7 µl aus jedem Nick-Translations-Ansatz werden mit 2 µl Aqua dest. und 1 µl Blaumarker gemischt und anschließend durch Inkubation bei 95 °C für 3 min denaturiert, gefolgt von 3 min auf Eis. 3 µl Längenstandard werden mit 6 µl Aqua dest. und 1 µl Blaumarker gemischt. Es werden also pro Geltasche 10 µl aufgetragen. An die Elektrophoresekammer wird eine Spannung von 100 V angelegt, die Laufzeit beträgt 30 bis 45 min. Zum Schluß wird das Gel unter UV-Licht betrachtet und fotografiert.

2.8.3 Fällung der markierten DNA

Da gesamtgenomische DNA neben Einzelkopie-DNA auch repetitive Sequenzen enthält, die zu unerwünschten Bindungen der DNA-Probe an verwandte Sequenzen führen würde, ist die Hybridisierung unter Suppressionsbedingungen erforderlich (= chromosomal *in situ* suppression (CISS)-Hybridisierung, auch „chromosome painting“, siehe 1.3.e). Dies wird durch Prähybridisierung mit Cot 1-DNA erreicht, die durch Extraktion aus menschlicher Plazenta-DNA gewonnen wird und sich nahezu ausschließlich aus repetitiven Sequenzen zusammensetzt. Diese repetitive DNA „fängt“ bei der Prähybridisierung die repetitive DNA aus Test- bzw. Referenz-DNA ab (siehe 1.3.2). Die Fällung von Test-DNA + Referenz-DNA + Cot 1-DNA erfolgt im Verhältnis 1 + 1 + 50 bis 100, d. h. es werden z. B. 1 µg Test-DNA, 1 µg Referenz-DNA und 100

μg Cot 1-DNA gemischt. Anschließend gibt man 10 % (v/v) 3M Natriumacetat, pH 5,2 sowie 2 Volumeneinheiten eiskalten Ethanol hinzu, mischt und inkubiert über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dann wird 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand dekantiert und mit eisgekühltem 70%igem Ethanol gewaschen (Zugabe von 500 μl 70%igem Ethanol, dann 10 min bei 14000 rpm zentrifugieren, schließlich den Überstand dekantieren). Nach dem Trocknen wird das Pellet in 10 μl deionisiertem Formamid aufgenommen und einige Stunden bis über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Schütteln gelöst. Anschließend werden 10 μl 20%iges Dextransulfat in 4 x SSC hinzugegeben, so daß das Hybridisierungsgemisch aus 50% Formamid/10% Dextransulfat/2 x SSC besteht. Eine bis mehrere Stunden lang wird weiter gelöst.

2.8.4 Ansatz der CGH

Nach Markierung einer für die Hybridisierung geeigneten Region des Objektträgers mittels Diamantschreiber werden die Präparate zur Denaturierung der chromosomalen DNA für 2 min in 70% Formamid/2 x SSC bei $73 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingestellt. Vysis-Präparate werden 5 min lang denaturiert. Anschließend werden die Präparate in einer aufsteigenden, eisgekühlten Alkoholreihe dehydriert (siehe 2.7.1). Die Proben-DNA (Test- + Referenz- + Cot 1-DNA) wird durch Erhitzen für 5 min bei $73 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturiert und anschließend 25 bis 35 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ prähybridisiert. Dann werden 10 μl Probe pro Objektträger aufgetragen, mit einem 22 x 22 mm-Deckgläschen eingedeckt und mit Fixogum versiegelt. Die Hybridisierung erfolgt in einer feuchten Kammer bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für ein bis drei Tage.

2.8.5 Waschen und Detektion der CGH

Nach der Hybridisierung werden die Präparate 1 x 10 min sowie 3 x 5 min in 50% Formamid/2 x SSC bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Schüttelwasserbad und anschließend 3 x 5 min bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ohne Schütteln in 0,1 x SSC stringent gewaschen. Zum Abdecken unspezifischer Bindungsstellen wird dann jeder Objektträger mit 200 μl 4 x SSC/0,1% Tween 20/3%

BSA eingedeckt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Proben-Nachweis erfolgt durch Auftragen von jeweils 60 µl Avidin/FITC – Anti-dig/Rhodamin-Lösung und Inkubation bei 37 °C für 30 bis 60 min. Anschließend wird 3 x 5 min in 4 x SSC/0,1% Tween 20 bei 42 °C im Schüttelwasserbad gewaschen. Zur Gegenfärbung werden 10 bis 15 µl DAPI/Antifade pro Präparat aufgetragen. Dann wird mit 24 x 50 mm Deckgläschen eingedeckt und mit Nagellack versiegelt.

2.8.6 Auswertung der CGH

Die mikroskopische Auswertung der CGH-Experimente erfolgte an einem Leica DM RBE-Mikroskop (Leica, Cambridge, England). Für die Bildaufnahme wurde eine hochauflösende KOHU-Graustufen CCD-Kamera und die Bildauswertungs-Software Cytovision Version 3.1 der Firma Applied Imaging (Santa Clara, CA), implementiert auf einem Dell Power Edge Sp 590-2-Rechner, eingesetzt. Zum Vorgehen bei der CGH-Auswertung siehe Kapitel 1.3.2.

2.9 Multiplex-Fluoreszenz in situ Hybridisierung (M-FISH)

2.9.1 PCR zur Amplifizierung durchfluß-zytometrisch hergestellter DNA-Pools

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR), die 1985 von Mullis präsentiert wurde [191;192], ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA *in vitro*, die dem Vorgang der *in vivo* DNA-Replikation nachempfunden ist: Zwei synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die antiparallel an die beiden Stränge der DNA hybridisieren, dienen als Primer, so daß sie die zu amplifizierende DNA-Sequenz beiderseits flankieren. Weiterhin werden eine DNA-Polymerase und eine Mischung der vier Deoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP's) benötigt. Bei der PCR wechseln sich thermische Denaturierung der zu amplifizierenden DNA, Hybridisieren der Primer und die Synthese von Komplementärsträngen durch die Taq-DNA-Polymerase zyklisch ab. Durch die 25 – 50fache Wiederholung dieses Zyklus' wächst die Kopienzahl der Zielsequenz exponentiell an [92]. Die Taq-Polymerase stammt aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* und eignet sich aufgrund ihrer Thermostabilität gut für die PCR [193].

Bei der von Telenius et al. 1992 vorgetellten PCR mit degenerierten Primern (degenerate oligonucleotid-primed PCR, DOP-PCR) [194] verwendet man als Primer Oligonukleotide mit teilweise degenerierter Sequenz (sechs Positionen der Primer-Sequenz sind zufällig mit einem der vier Nukleotide besetzt) und wählt in den ersten Zyklen niedrige Hybridisierungs-Temperaturen. Dadurch hybridisiert der Primer in kurzen, gleichmäßigen Abständen an die Ziel-DNA. Es entstehen relativ kurze Fragmente, die die gesamte eingesetzte DNA gleichmäßig abdecken.

Die hier verwendeten durchflußzytometrisch hergestellten DNA-Pools wurden von Michael Speicher vom Institut für Humangenetik der Ludwig Maximilian-Universität München zur Verfügung gestellt. Aus diesen Pools wurden durch DOP-PCR zweite und dritte Generationen von DNA erzeugt. Durch differentielle Markierung dieser Pools und deren gemeinsame Hybridisierung in der M-FISH wird jedes Chromosom mit einer Kombination aus bis zu drei Fluorochromen markiert (Vgl. Abb. 6).

Die einzelnen Pools setzen sich wie folgt zusammen:

FITC-Pool:	Chromosomen 1, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 16, 18, 21 und Y
Cy3-Pool:	Chromosomen 3, 5, 8, 9, 11, 13, 15, 19, 20, 22 und X
Cy5-Pool:	Chromosomen 1, 5, 6, 7, 8, 12, 14, 15, 16 und 22
Biotin (Cy3.5)-Pool:	Chromosomen 1, 3, 4, 7, 10, 11, 15, 17, 19 und Y
Dig (Cy5.5)-Pool:	Chromosomen 2, 3, 5, 6, 9, 10, 12, 21, X und Y

Der PCR-Ansatz zur Amplifizierung der Pools setzt sich wie folgt zusammen:

Reagenzien	Volumen [μ l]	Endkonzentrationen
Aqua dest.	17,8	
10 x Puffer	2,5	1 x
50 mM MgCl ₂	1	2 mM
10 mM dATP	0,5	0,2 mM
10 mM dTTP	0,5	0,2 mM
10 mM dCTP	0,5	0,2 mM
10 mM dGTP	0,5	0,2 mM
100 μ M degenerierter Primer	0,5	2 μ M
Taq-Polymerase	0,2	1 U/25 μ l
DNA-Pool	1	

Das Programm für die PCR zur Amplifizierung der DNA-Pools sieht folgendermaßen aus:

Zyklus	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [min]
1	94	3
2 – 36	94	1
	56	1
	72	4
37	72	20

2.9.2 PCR zur Markierung der DNA-Pools

Im Anschluß an die Amplifizierung erfolgt die spezifische Markierung der einzelnen Pools. Dazu wird ein zusätzliches modifiziertes Nukleotid, neben dem jeweiligen normalen, angeboten. Abgesehen davon sind alle Reaktionsbedingungen mit denen für die PCR ohne Markierung identisch.

a) PCR zur Markierung der Biotin (Cy3.5)- und Cy3-Pools:

Reagenzien	Volumen [μ l]	Endkonzentrationen
Aqua dest.	16,2	
10 x Puffer	2,5	1 x
50 mM MgCl ₂	1	2 mM
10 mM dATP	0,5	0,2 mM
10 mM dGTP	0,5	0,2 mM
10 mM dCTP	0,5	0,2 mM
10 mM dTTP	0,38	0,15 mM
1 mM Biotin- bzw. Cy3-dUTP	1,25	0,05 mM
100 μ M degenerierter Primer	0,5	2 μ M
Taq-Polymerase	0,2	1 U/25 μ l
DNA-Pool	1	

b) PCR zur Markierung der DIG (Cy5.5)- und Cy5-Pools:

Reagenzien	Volumen [μ l]	Endkonzentrationen
Aqua dest.	15,6	
10 x Puffer	2,5	1 x
50 mM MgCl ₂	1	2 mM
10 mM dATP	0,5	0,2 mM
10 mM dGTP	0,5	0,2 mM
10 mM dCTP	0,5	0,2 mM
10 mM dTTP	0,25	0,1 mM
1 mM DIG- bzw. Cy5-dUTP	2,5	0,1 mM
100 μ M degenerierter Primer	0,5	2 μ M
Taq-Polymerase	0,2	1 U/25 μ l
DNA-Pool	1	

c) PCR zur Markierung des FITC-Pools:

Reagenzien	Volumen [μ l]	Endkonzentrationen
Aqua dest.	15,6	
10 x Puffer	2,5	1 x
50 mM MgCl ₂	1	2 mM
10 mM dATP	0,5	0,2 mM
10 mM dGTP	0,5	0,2 mM
10 mM dTTP	0,5	0,2 mM
10 mM dCTP	0,25	0,1 mM
1 mM FITC-dCTP	2,5	0,1 mM
100 μ M degenerierter Primer	0,5	2 μ M
Taq-Polymerase	0,2	1 U/25 μ l
DNA-Pool	1	

Die PCR erfolgte nach dem gleichen Programm wie in Kapitel 2.9.1 dargestellt.

Gel-Elektrophorese nach PCR:

Die erfolgreiche Amplifizierung wird durch Auftrennung der PCR-Produkte in einem 1%igen Agarose-Gel überprüft (siehe 2.8.2). Dazu werden 3 μ l PCR-Produkt im Gel eingesetzt.

2.9.3 Fällung der markierten DNA-Pools

11 μ l Biotin-Pool, 22 μ l DIG-Pool, 18 μ l Cy2-Pool, 24 μ l Cy5-Pool und 24 μ l FITC-Pool werden mit 40 μ l Cot 1-DNA, 5 μ l Lachsspermien-DNA, 15 μ l 3 M Natrium-Acetat pH 5.2 und 400 μ l Ethanol gemischt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Dann wird 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand dekantiert und mit eisgekühltem 70%igem Ethanol gewaschen (Zugabe von 500 μ l 70%igem Ethanol, dann 10 min bei 14000 rpm zentrifugieren, schließlich den Überstand dekantieren). Nach dem Trocknen wird das Pellet in 22 μ l deionisiertem Formamid aufgenommen und einige Stunden bis über Nacht bei 37 °C unter Schütteln gelöst. Anschließend werden 22 μ l 30%iges Dextransulfat in 4 x SSC hinzugegeben, so daß das

Hybridisierungsgemisch aus 50% Formamid/15% Dextransulfat/2 x SSC besteht. Eine bis mehrere Stunden lang wird weiter gelöst.

2.9.4 Ansatz der M-FISH

Die zu hybridisierenden Metaphase-Präparate werden zur Verbesserung der Hybridisierungsqualität mit RNase und Pepsin vorbehandelt. Dazu werden sie kurz in 2 x SSC hydriert, mit 200 µl RNase-Lösung (1 µg/µl in 2 x SSC) eingedeckt, 1h bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert und 3 x 5 min in 2 x SSC bei 37 °C unter Schütteln gewaschen. Anschließend werden die Objektträger mit 200 µl Pepsin-Lösung (8,5 x 10⁻⁴% Pepsin in Aqua dest., pH 2) eingedeckt, 4 bis 10 min bei 37 °C inkubiert, 3 x 5 min bei 37 °C mit PBS unter Schütteln gewaschen und zum Schluß in einer eiskalten Ethanolreihe dehydriert (je 2 min in 70, 80 sowie 100%igen Ethanol). Nachdem die Präparate an der Luft getrocknet sind, erfolgt ihre Denaturierung für 1 min 45 sec bis 2 min in Denaturierungspuffer bei 70 °C, gefolgt von Dehydrierung in einer aufsteigenden eiskalten Ethanolreihe (s. o.). Die markierte und aus den fünf Pools kombinierte DNA wird für 7 min bei 75 °C denaturiert und mindestens 30 min bei 42 °C prähybridisiert. Pro Objektträger werden 8,5 µl denaturierte DNA aufgetragen. Es wird jeweils mit einem 18 x 18 mm Deckgläschen eingedeckt, mit Fixogum versiegelt und zur Hybridisierung zwei Tage in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert.

2.9.5 Waschen der M-FISH-Präparate und Detektion der indirekt markierten Sonden

Nach Entfernen des Fixogums werden die Deckgläschen in 4 x SSC/0,1% Tween 20 bei 45 °C abgeschwemmt. Anschließend werden sie 3 x 5 min in 1 x SSC bei 60 °C im Schüttelwasserbad gewaschen und einige sec in 4 x SSC/0,1% Tween 20 bei 45 °C inkubiert. Dann werden sie zur Blockierung der unspezifischen Bindungen mit 200 µl 4 x SSC/0,1% Tween 20/3% BSA eingedeckt (24 x 50 mm Deckgläschen) und 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach werden die Präparate kurz in 4 x

SSC/0,1% Tween 20 bei 45 °C gewaschen, mit 200 µl Detektionslösung (Cy3.5-Avidin (1:300) und Anti-DIG-Cy5.5 (1:200) in 4 x SSC/0,1%) eingedeckt und mindestens 45 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Detektion werden die Präparate 3 x 5 min in 4 x SSC/0,1% Tween 20 bei 45 °C im Schüttelwasserbad gewaschen, mit DAPI gegengefärbt, mit 24 x 50 mm Deckgläschen eingedeckt und mit Nagellack versiegelt.

2.9.6 Auswertung der M-FISH

Die Bildaufnahme erfolgte mit einer hochauflösenden Sensys-CCD (Charge Coupled Device) -Kamera (Photometrics, Tucson, Arizona) und der Leica Q-FISH software version Y2.3.1.Beta auf einem Leica Q 550 CW-Computer an einem Leica DM RXA-Mikroskop (Leica, Cambridge, England). Das Leica DM RXA-Mikroskop ist mit einem Filterrad mit acht Positionen ausgestattet, so daß für jedes in der M-FISH eingesetzte Fluorochrom ein separater Anregungs-, Teilungs- und Emissionsfilter zur Verfügung steht. Sowohl Kamera als auch Mikroskop werden durch die Leica Q-FISH software gesteuert. Die Bildanalyse ist in die Leica MCK image analysis software eingebunden. Zum Vorgehen bei der Auswertung der M-FISH siehe Kapitel 1.3.3.

3. Ergebnisse

3.1 CML-Zelllinie K562

Durch die kombinierte Anwendung von G-Banden-Analyse, M-FISH, FISH und CGH wurde die CML-Zelllinie K562 detailliert zytogenetisch charakterisiert. Der Einfachheit halber werden im Folgenden aberrante Chromosomen als "Marker" bezeichnet, obwohl dies nicht der Definition i. e. S. entspricht. Als Marker-Chromosom wird normalerweise ein strukturell abnormales Chromosom bezeichnet, dessen Zusammensetzung völlig unbekannt ist (ISCN 1995 [190], Seite 63). Die hier als Marker charakterisierten Chromosomen sind eigentlich als Derivative zu bezeichnen, wie in Tabelle 1 ja auch geschehen. Zur Kurzbezeichnung ist die Benennung "Marker" jedoch sinnvoll.

3.1.1 G-Banden-Analyse

Die G-Banden-Analyse ergab einen hypotriploiden Karyotyp mit einer modalen Chromosomenzahl von 67 (64 bis 69 Chromosomen). Der in Abb. 8 dargestellte Karyotyp wurde in 40 von 51 untersuchten Zellen gefunden und weist 21 verschiedene Markerchromosomen auf (Abb. 8), eines davon (M16) in zwei Kopien. Dieser Klon wird als Stammlinie bezeichnet. In zwei der verbleibenden 11 Zellen trat ein zusätzlicher Marker (M22) in einer bzw. zwei Kopien auf. In diesen Zellen war M19 = $\text{der}(21)\text{t}(1;21)(1\text{qter}\rightarrow 1\text{q}23::21\text{p}11\rightarrow 21\text{qter})$ (Tabelle 1) nicht vorhanden. M22 läßt sich als Isochromosom $i(1\text{q}23\rightarrow 1\text{qter})$ charakterisieren und ist möglicherweise von M19 abgeleitet. Die beiden M22 enthaltenden Zellen können daher als Seitenlinie betrachtet werden (zu den Begriffen "stemline" und "sideline" siehe ISCN 1995 [190], Seite 79). Acht Zellen enthielten ein bis drei zusätzliche nichtklonale Marker, die nicht identifiziert werden konnten. Eine weitere Zelle unterschied sich lediglich in der Anzahl der Autosomen vom Hauptklon. D. h. 45 von 51 Zellen besaßen mindestens die 21 für die Stammlinie beschriebenen Marker.

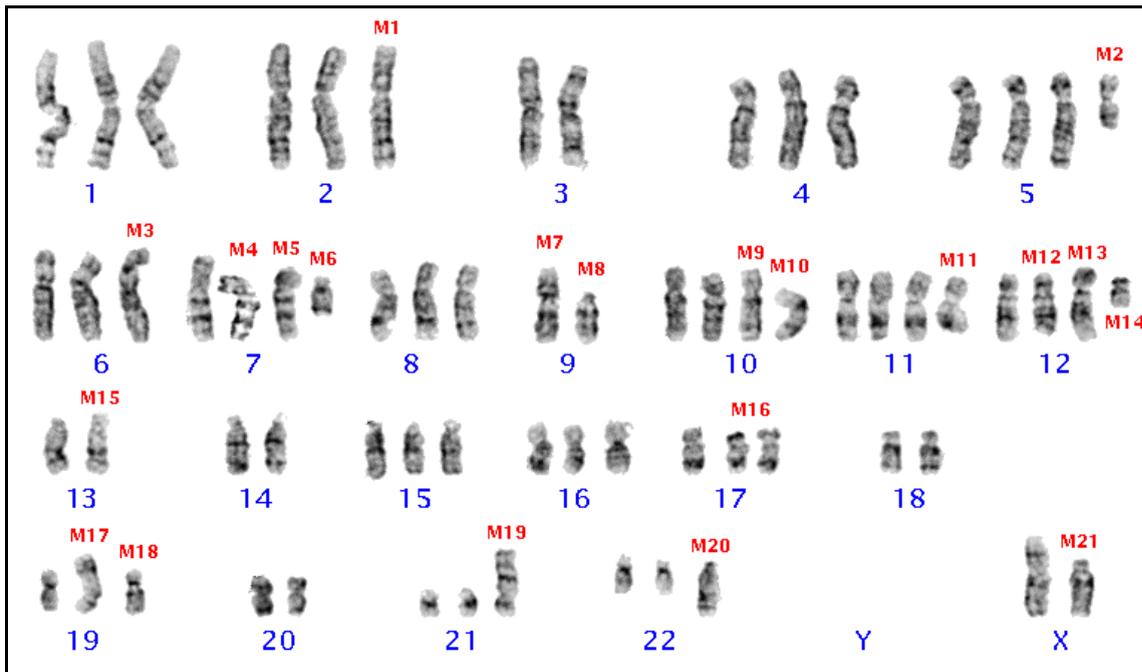


Abb. 8: G-Banden-Analyse der Zelllinie K562.

Karyogramm einer repräsentativen Metaphase. Dieser Karyotyp wurde in 40 von 51 ausgewerteten Zellen gefunden. Das Ergebnis der Charakterisierung der Marker-Chromosomen durch kombinierte Auswertung von G-Banden-Analyse, M-FISH, FISH und CGH ist in Tabelle 2 dargestellt.

3.1.2 Multiplex-Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (M-FISH)

15 von 19 durch M-FISH untersuchten K562-Zellen gehörten zur Stammlinie, in Abb. 9 ist ein repräsentativer Karyotyp gezeigt. Zwei Zellen enthielten den Marker M22 (nicht gezeigt, Vgl. 3.1.1.). Die verbleibenden zwei Metaphasen besaßen nicht identifizierbare Marker. Die chromosomale Zusammensetzung einer Reihe von Marker-Chromosomen, die durch G-Bänderung nicht aufgedeckt werden konnte, ließ sich durch die M-FISH-Analyse ermitteln (M2, M4 – M6, M8 – M10, M17, M19 und M21), ebenso die Zusammensetzung von M15 und M16, die durch G-Banden-Analyse nur teilweise aufgedeckt worden war. Für die Aufdeckung zweier Marker war die M-FISH von besonderer Bedeutung: M11 konnte durch G-Banden-Analyse nicht mit Sicherheit als Marker bestimmt werden, M13 wäre ohne M-FISH nicht als Marker identifiziert worden.

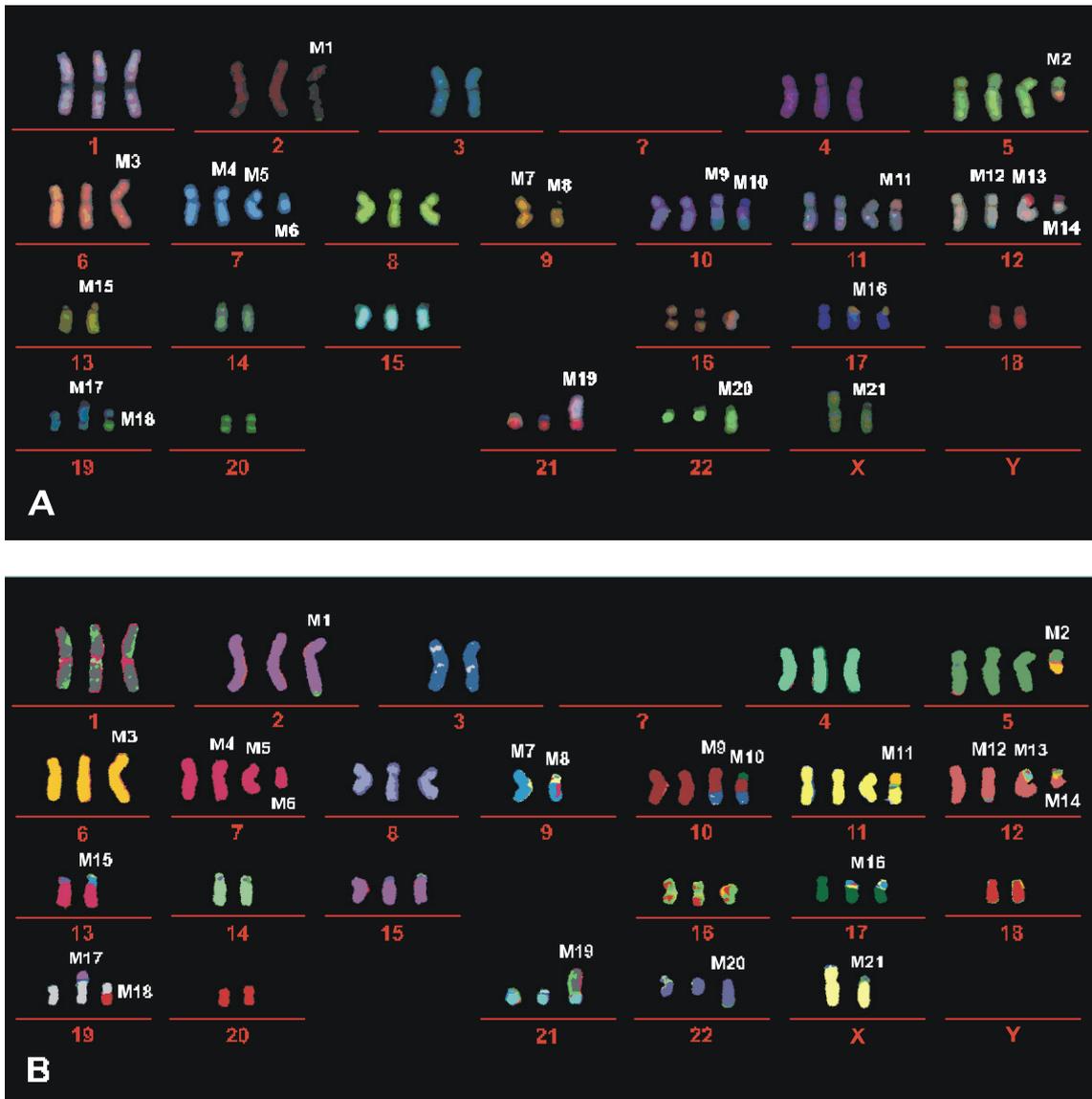


Abb. 9: M-FISH der Zelllinie K562.

Karyogramm einer repräsentativen Metaphase. (A) Karyogramm in "rendered colors" (Vgl. 1.3.3). (B) Karyogramm in Klassifizierungsfarben ("classified colors"). Die chromosomale Zusammensetzung der Marker M2, M4 – M6, M8 – M10, M17 und M21 wurde durch M-FISH aufgedeckt, so z. B. die Beteiligung von #5- und #6-Material an M2 oder die Zusammensetzung von M17 aus #3- und #19-Material. Ebenso wurde die #9-Beteiligung an M15 sowie M16 nachgewiesen. M11 konnte durch M-FISH als Marker bestätigt werden, der Marker M13 wurde durch M-FISH als Marker identifiziert.

3.1.3 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Zur Verifizierung der Herkunft mehrerer Marker-Chromosomen, deren Herkunft durch M-FISH aufgedeckt worden war, wurden FISH-Experimente mit Einzelkopie-Sequenz-Proben (für die BCR- und ABL-Gene), Proben zur Markierung ganzer Chromosomen (whole chromosome painting probes, WCPs) und Zentromer-Proben (chromosome enumeration probes, CEPs) durchgeführt. Folgende Proben-Kombinationen wurden eingesetzt: BCR + ABL, WCP13, WCP6 + WCP11, WCP12 + WCP21, WCP2 + WCP19, WCP19 + WCP20, WCPX, WCP5 + CEP6, WCP10 + CEP10, WCP10 + CEP17, WCP11 + CEP6, WCP12 + CEP12, WCP19 + CEP12, WCP9 + CEP17. Im Folgenden werden einige dieser Experimente demonstriert.

Die simultane Hybridisierung der BCR- und ABL-Proben auf Metaphasen der Zelllinie K562 ergab BCR/ABL-Fusionssignale auf einem Derivat des Chromosoms 2 (M1) distal von Bande q33 sowie multiple gelbe Fusionssignale entlang eines akrozentrischen Chromosoms (M20). Weiterhin drei einzelne ABL-Signale (rot), von denen zwei an den beiden Enden eines Derivativs 9 (M7) lagen und eines auf dem langen Arm eines deletierten Chromosoms 9 (M8). Zwei grüne BCR-Signale wurden auf den beiden normalen Chromosomen 22 nachgewiesen (Abb. 10). Die Hybridisierung mit der WCP13-Probe resultierte in Signalen auf drei Chromosomen, von denen eines identisch mit M20 ist (Abb. 12). Die Existenz des Markers M20 wurde also durch FISH-Analyse aufgedeckt. Im Anschluß daran konnte M20 dann mit Hilfe der DAPI-Gegenfärbung im G-Banden-Karyotyp identifiziert werden (Abb. 8). M20 besteht also aus amplifizierten hintereinandergeschalteten BCR/ABL-Fusionsgenen plus eingestreutem Material des Chromosoms 13, der CGH-Analyse zufolge möglicherweise aus der Bande 13q31 (siehe 3.1.4).

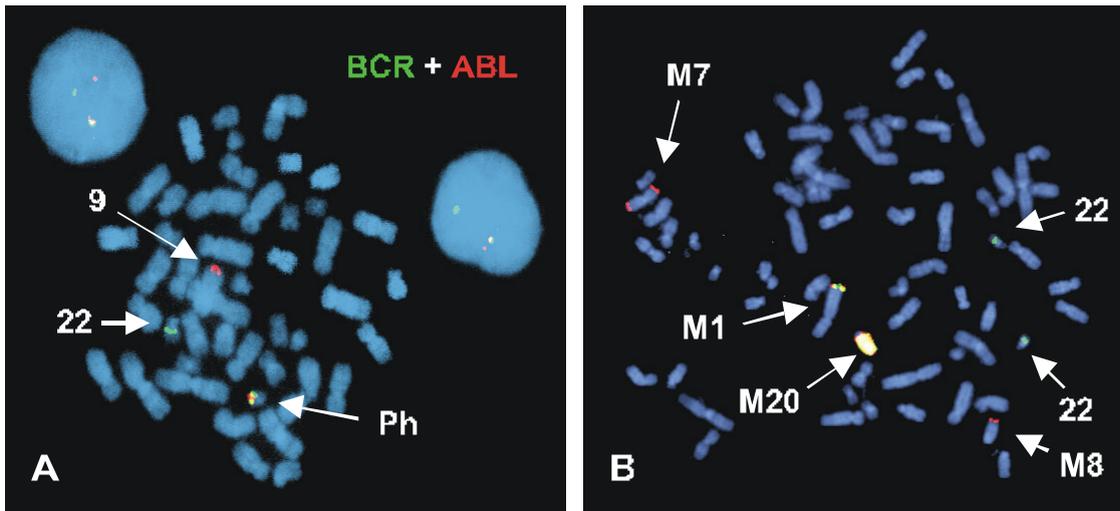


Abb. 10: FISH mit den BCR- und ABL-Gen-Proben (LSITM *bcr/abl* translocation probe, Vysis).

(A) Das Hybridisierungsmuster auf Chromosomen eines CML-Patienten mit klassischer Translokation 9;22. Es liegen ein Fusionssignal auf dem verkürzten Philadelphia-Chromosom vor sowie zwei Einzelsignale, eines auf dem normalen Chromosom 9 (rot) sowie eines auf dem normalen Chromosom 22 (grün). (B) Hybridisierung auf eine Metaphase der Zelllinie K562. Gelbe BCR/ABL-Fusionssignale liegen auf M1 distal von Bande q33 sowie entlang eines akrozentrischen Chromosoms (M20). Zwei ABL-Signale (rot) liegen auf M7, eines auf M8. Zwei grüne BCR-Signale liegen auf den beiden normalen Chromosomen 22.

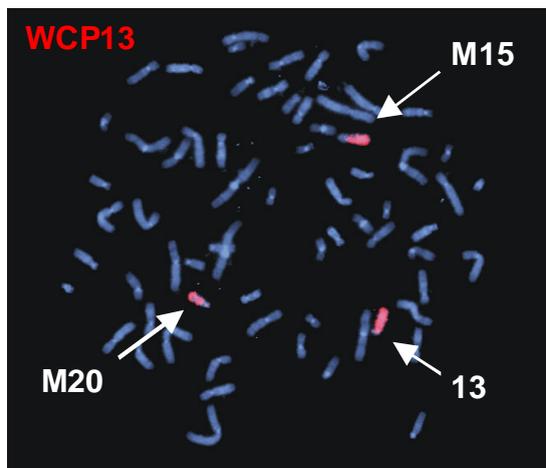


Abb. 11: FISH mit einer WCP13-Probe auf eine K562-Metaphase.

Neben dem normalen Chromosom 13 und dem Marker M15 trägt ein drittes Chromosom Signale, der Marker M20.

Nach G-Banden-Analyse und M-FISH war die Herkunft der Zentromere mehrerer Marker unklar (M2, M10, M11, M13, M14, M16 und M18). Zum Nachweis der Zentromer-Herkunft

wurden FISH-Analysen unter Verwendung von Zentromerproben (CEPs) durchgeführt, sofern diese für die betreffenden Chromosomen erhältlich waren. Die Herkunft der Zentromere von M10, M13 und M16 konnte eindeutig geklärt werden. Die Ergebnisse M10 und M16 betreffenden FISH-Analysen sind in den Abb. 12 und 13 gezeigt. Durch FISH mit WCP10- plus CEP10-Proben sowie WCP10- plus CEP17-Proben wurde gezeigt, daß M10 (zusammengesetzt aus Material der Chromosomen 3, 10 und 17) Zentromermaterial sowohl des Chromosoms 10 als auch des Chromosoms 17 besitzt (Abb. 12). Die simultane Hybridisierung einer WCP9- und einer CEP17-Probe lieferte

den Beweis, daß es sich bei dem aus #9- und #17-Material zusammengesetzten Marker M16 um ein #17-Derivat handelt (Abb. 13).

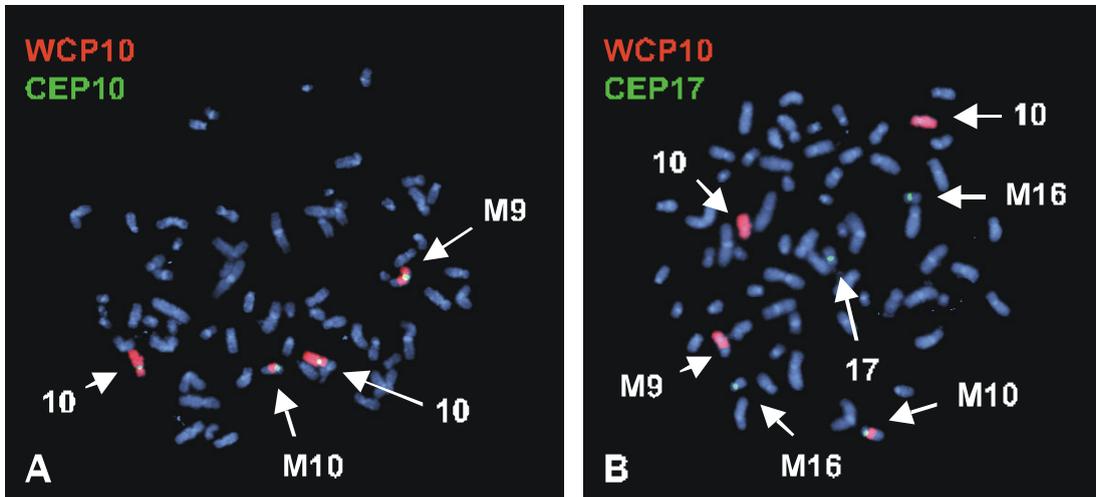


Abb. 12: FISH-Analyse zur Untersuchung des K562-Markers M10 [t(3;10;17)].

(A) FISH mit WCP10 (rot) und CEP10 (grün). (B) FISH mit WCP 10 (rot) und CEP17 (grün).

Die beiden normalen Chromosomen sind ganz, die Marker M9 und M10 teilweise durch die WCP10-Probe (rot) markiert. Die CEP 10-Probe (grün) führt zu Signalen in den Zentromeren dieser vier Chromosomen, die bei den #10 und M9 durch die Überlagerung gelb sind (A). Die CEP17-Sonde hybridisierte, neben den Zentromerregionen des normalen Chromosoms 17 und der beiden Marker M16, ebenfalls im Zentromerbereich des Markers M10 (B). Somit handelt es sich bei M10 sowohl um ein Derivat des Chromosoms 10 als auch des Chromosoms 17.

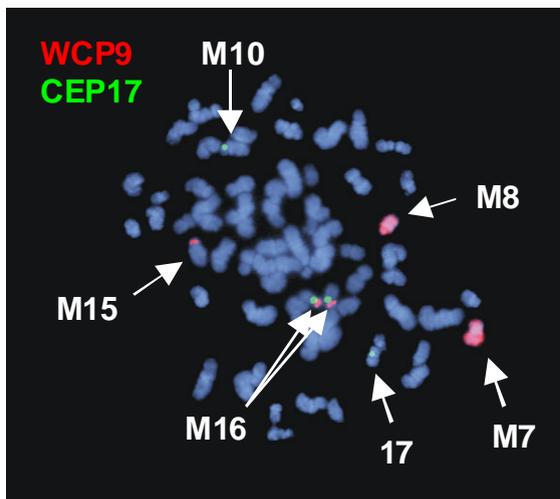


Abb. 13: FISH mit einer WCP9-Probe (rot) und einer CEP17-Probe (grün) zur Untersuchung des K562-Markers M16.

Die WCP9-Probe hybridisierte auf den Markern M7, M8, M15 und M16. Die CEP17-Probe lieferte Signale auf dem normalen #16, dem Marker M10 und in den Zentromerregionen der beiden Marker M16. Somit ist bewiesen, daß die Marker M16 #17-Derivative sind.

Zur Bestätigung der Zusammensetzung mehrerer Marker (M11, M13, M17, M18 und M21)

wurden weitere FISH-Experimente durchgeführt. So wurde z. B. durch Hybridisierung mit einer WCP12- und einer WCP21-Sonde die Zusammensetzung des durch M-FISH-Analyse entdeckten Markers M13 bestätigt werden (Abb. 14A). Durch die Auswertung von 30 Metaphasen wurde das durchgehende Vorhandensein dieses Markers in den K562-Zellen bewiesen. Dies war besonders wichtig, da der Marker in der G-Banden-

Analyse zunächst gar nicht gefunden worden war und auch nach Entdeckung nur schwer von den normalen Chromosomen 12 unterscheidbar war. Ebenso wurde die Beteiligung von #19- und #20-Material an der Bildung des Markers M18 sowie dessen durchgängiges Vorhandensein in der Zelllinie K562 durch FISH bestätigt (Abb. 14B).

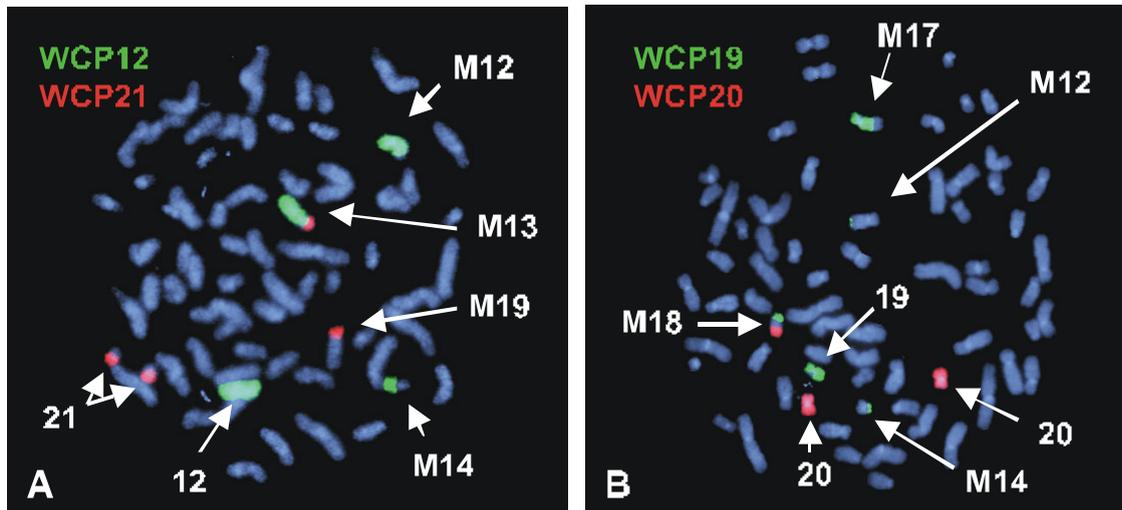


Abb. 14: FISH-Experimente zur Bestätigung der Zusammensetzung von Marker-Chromosomen der Zelllinie K562.

(A) FISH mit einer WCP12-Probe (grün) und einer WCP21-Probe (rot). Das normale #12 sowie die Marker M12, M13 und M14 tragen grüne Signale, rot markiert sind die normalen #22 sowie Teile von M13 und M19. Somit ist die Entstehung des Markers M13 aus #12- und #21-Material bestätigt. (B) FISH mit einer WCP19-Probe (grün) und einer WCP20-Probe (rot). Das normale #19 und Teile der Marker M14, M17 und M18 sind grün markiert, die beiden normalen #20 und ein Teil des Markers M18 sind rot markiert. Die Zusammensetzung des Markers M19 aus #19- und #20-Material ist damit bestätigt.

3.1.4 Comparative genomische Hybridisierung (CGH)

Durch die CGH-Analyse der CML-Zelllinie K562 wurden Gewinne und Verluste chromosomalen Materials ermittelt (Abb. 15). Da die Zelllinie hypotriploid ist, werden durch die Analyse Abweichungen vom triploiden Zustand nachgewiesen, d. h. Gewinne chromosomalen Materials, wenn in der Zelllinie mehr als drei Kopien der betreffenden Chromosomenregion vorliegen und Verluste, wenn weniger als drei Kopien vorhanden sind. So spiegelt z. B. der Wert 1 für das Mittelprofil des Chromosoms 4 in der CGH (Abb. 15B) das Vorhandensein von drei normalen Kopien dieses Chromosoms wider (Abb. 8 und 9). Ein weiteres Beispiel ist das Chromosom 11, das in drei normalen Kopien vorkommt sowie im Marker M11, der 11q enthält. Dementsprechend liegt das

Mittelprofil in der CGH für 11p bei 1 und zeigt in 11q einen Gewinn an. Anhand des Mittelprofils in Abb. 16 wurden Gewinne chromosomalen Materials in den Regionen 1p13, 1q23→qter, 2q23→q31, 3p21→pter, 5p, 6p21.1→pter, 6q23→qter, 7q22→qter, 9q22→qter, 10q11.2→q22, 11q12→qter, 15q, 16q22→qter, 21q11.2→qter und 22q11.2 festgestellt. Verluste wurden in 3p14→qter, 9p12→pter, 10q23→qter, 12p12→pter, 13q12→q22, 13q32→qter, 14q, 17p11→pter, 18q12→qter, 20p11.2→pter und 22q13 gefunden. Ursprünglich stammt die Zelllinie von einer weiblichen Spenderin, die hier zur CGH eingesetzte Referenz-DNA ist männlich. Daher ist das Mittelprofil für das X-Chromosom als Verlust für das gesamte X-Chromosom zu werten, insbesondere für den kurzen Arm (lägen drei Kopien des X-Chromosoms vor, so läge das Mittelprofil bei 2).

Die CGH-Ergebnisse stehen im Allgemeinen mit den Resultaten aus den anderen Methoden im Einklang. Problematisch ist die Deutung der CGH-Mittelprofile für die Chromosomen 15, 16 und 18: Das Mittelprofil für Chromosom 15 deutet tendenziell auf einen Gewinn chromosomalen Materials hin, es existieren jedoch nur drei Kopien dieses Chromosoms. Drei normale Kopien des Chromosoms 16 sind nachgewiesen, ausgehend vom CGH-Ergebnis läßt sich ein Zugewinn im distalen langen Arm jedoch nicht ausschließen. Das Chromosom 18-Mittelprofil, das einen Verlust nur für 18q zeigt, läßt sich nicht mit dem Vorhandensein von lediglich zwei Kopien dieses Chromosoms in Einklang bringen. Eine weitere Unstimmigkeit, das Chromosom 13 betreffend, ließ sich durch eine zusätzliche FISH-Analyse klären: Der mit dem Vorhandensein von nur zwei Kopien von 13q übereinstimmende Verlust von Material des Chromosoms 13 betrifft die Region 13q31 nicht. Die FISH-Analyse mit einer WCP13-Sonde ergab Signale auf drei Chromosomen statt auf zwei, wie zu erwarten gewesen wäre (siehe 3.1.3, Abb. 11).

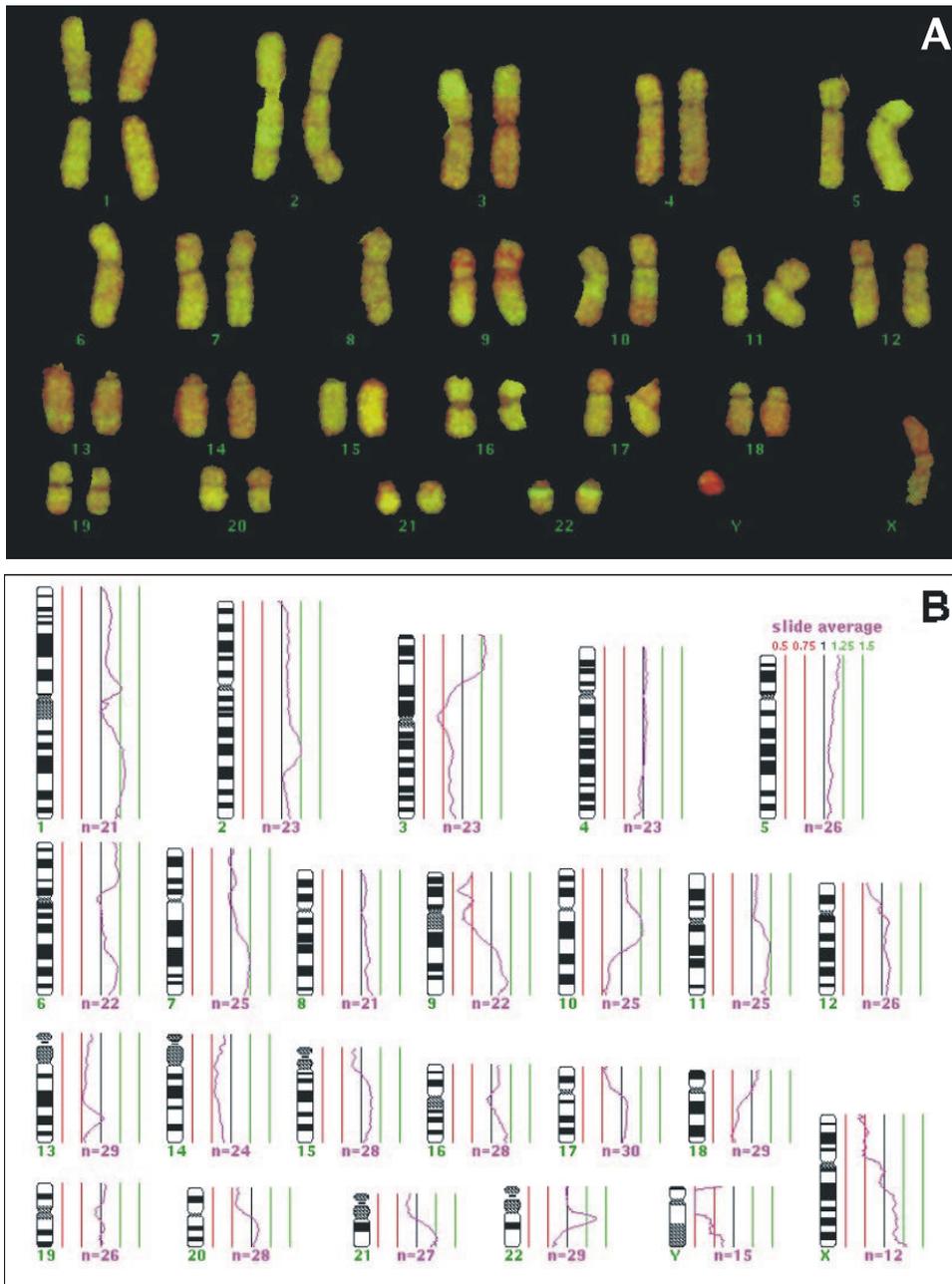


Abb. 15: Comparative genomische Hybridisierung (CGH) der Zelllinie K562.

Bei der CGH wird der Quotient der Fluoreszenz-Intensitäten von Test- (K562-) zu Referenz-DNA gebildet. (A) Karyogramm. Gewinne chromosomalen Materials sind als stärkere Grünfärbung zu erkennen, z. B. für 3p21→pter oder für 22q11.2, Verluste sind als Rotfärbungen zu erkennen, wie für 9p oder Xp. (B) Mittelprofil. Das Mittelprofil errechnet sich hier als der Mittelwert der Quotienten von 15 Zellen. Da die Zelllinie hypotriploid ist, spiegelt das CGH-Ergebnis Abweichungen der Kopienanzahl vom triploiden Zustand wieder, d. h. liegt das Mittelprofil bei 1, so liegt die entsprechende Chromosomenregion triploid vor, z. B. das gesamte Chromosom 4. Abweichungen nach links spiegeln Verluste (z. B. 9p), Abweichungen nach rechts Gewinne (z. B. 11q) chromosomalen Materials wieder.

3.1.5 Marker-Chromosomen der CML-Zelllinie K562

In diesem Abschnitt ist das Ergebnis der Marker-Analyse der Zelllinie K562 durch kombinierte Anwendung von G-Banden-Analyse, M-FISH, FISH und CGH dargestellt. In Tabelle 2 sind die Marker-Chromosomen ausführlich charakterisiert. Hierzu wurde der Überschaubarkeit halber die für die Bänderungsanalyse übliche Nomenklatur verwendet (ISCN 1995)[190]. Wollte man die ausführliche Nomenklatur verwenden, so ließe sich beispielsweise allein über den Marker M11 sagen:

- FISH-Analyse: ish.der(?)(wcp6+,wcp11+,cep6-,cep11-)
- CGH-Analyse: +mar.rev ish der(?)(t(6;11)(?:q12)enh(11p))
- G-Banden-Analyse: der(?)(t(6;11)(?:11q12→11qter))
- M-FISH-Analyse: Hierzu sind im ISCN 1995 keine Angaben gemacht, es bleibt also, auf die nächste Auflage zu warten.

Da diese ausführliche Schreibweise, auf alle strukturellen Veränderungen der Zelllinie K562 angewendet, zu weit mehr Verwirrung als Klarheit führen würde, wird hier darauf verzichtet und die G-Banden-Schreibweise zur Beschreibung der Marker verwendet, auch wenn die Charakterisierung nicht allein auf der Bänderungsanalyse basiert.

Tabelle 2: Marker-Chromosomen der Zelllinie K562

Marker	Karyotyp
M1	der(2)add(2)(q33)
M2	der(5?)t(5;6)(5pter→5p?11::?)
M3	dup(6)(pter→p12::p22→qter)
M4	inv(7)(pter→p22::p11→p22::p11→qter)
M5	del(7)(:p15→qter)
M6	der(7)rea del(7)
M7	dup(9)(9q34::9p24→9qter)
M8	del(9)(:p12→qter)
M9	der(10)t(3;10)(10pter→10q23::3p21→3pter)
M10	der(10;17)t(3;10;17)(17pter→17q11::10p11→10q23::3p21→3pter)
M11	der(?)t(6;11)(?:11q12→11qter)
M12	der(12)t(12;19)(12pter→12q23-24::?)
M13	der(12)t(12;21)(21qter→q11::12p11→12qter)
M14	der(?)t(12;19)(?:?)
M15	der(13)t(9;13)(?:13p11→13qter)
M16, 2 x	der(17)t(9;17)(?:17p11→17qter)
M17	der(19)t(2;19)(?:rea?dup19)
M18	der(?)t(19;20)(19pter→19p11::? →cen→?:20q11→20qter)
M19	der(21)t(1;21)(1qter→1q23::21p11→21qter)
M20	amplifizierte BCR/ABL-Fusionsgene + #13-Material, vermutl. aus 13q31
M21	del(X)(:p11→qter)

3.2 CML-Blastenkrisen

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Analysen aus peripherem Blut von CML-Patienten in der Blastenkrise dargestellt. Insgesamt handelt es sich um Material von 15 Patienten (CML1 bis CML15), denen jeweils ein bis drei mal Blut abgenommen wurde. Diese Proben wurden mittels G-Bänderung, CGH und FISH untersucht. Die Probe CML1 und CML3 lagen nur als DNA vor, so daß hier nur die CGH-Analyse durchgeführt werden konnte. Von den anderen Proben wurden zusätzlich zur CGH-Analyse, wenn möglich, G-Banden-Analyse und FISH zum Nachweis der BCR/ABL-Umlagerung durchgeführt. FISH-Analysen mit weiteren Proben wurden vorgenommen, sofern sinnvoll. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Untersuchung der CML-Blastenkrisen zusammengefaßt.

Tabelle 3: Zytogenetische und molekular-zytogenetische Analysen von Blutproben von CML-Patienten in der Blastenkrise

Probe	CGH	Zytogenetik	BCR/ABL-FISH ¹⁾	FISH mit anderen Proben ²⁾
CML1	normal	kein Material		
CML2	tendenziell: 9+	keine Metaphasen	Ph-	29,6 % +9 (CEP9 -Probe)
CML3	normal	kein Material		
CML4	nicht möglich (DNA degeneriert)	46,XX	Ph-	
CML5	Y-	keine Metaphasen	80,7 % Ph+	95,6 % X0 (CEPX/CEPY -Probe)
CML6A	8+, 17p-, 17q+	keine Metaphasen	79,1 % Ph+ (7,1 % +Ph)	80,5 % +8; 75,1 % i(17q)
CML6B	8+, 17p-, 17q+	47,XY,+8,t(9;22),i(17q)[20]	62,8 % Ph+ (3,5 % + Ph)	72,0 % +8; 72,0 % i(17q)
CML7	nicht möglich (DNA kontaminiert)	45,XX,t(9;22) [20]	78,1 % Ph+	
CML8	normal	keine Metaphasen	52,7 % Ph+	
CML9A	17p-, 17q+	keine Metaphasen	81,9 % Ph+	69,7 % i(17q)
CML9B*	17p-, 17q+	keine Metaphasen	83,1 % Ph+	77,3 % i(17q)

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 3, Fortsetzung

Probe	CGH	Zytogenetik	BCR/ABL-FISH ¹⁾	FISH mit anderen Proben ²⁾
CML9C*	17p-,17q+	46,XY,t(9;20;22)(q34;q13;q11),i(17q)[21]	78,1 % Ph+	76,5 % i(17q)
CML10	normal	46,XY,t(9;11;22)(q34;p15;q11)[20]	91,0 % Ph+	
CML11*	21+	46,XX[1]/46,XX,t(9;22)[16]/47,XX,t(9;22),+21[15]	82,0 % Ph+	Metaphase: 55 % + 21 (WCP21-Probe)
CML12A	tendenziell: 8+, 17p-,17q+	46,XY,t(9;22)[5]/ 47,XY,+8,t(9;22),i(17q)[33]	73,3 % Ph+ [Metaphase: 100 % (4 % +Ph)]	37,3 % i(17q) [Metaphase: 97,3 %] 36,9 % +8 [Metaphase: 97,0 %]
CML12B*	tendenziell: 8+, 17p-,17q+	46,XY,t(9;22)[2]/47,XY,+8,t(9;22), i(17q)[24]/48,idem,+Ph[2]	84,0 % Ph+ [Metaphase: 100 % (3 % +Ph)]	52,4 % i(17q) [Metaphase:97,3 %] 50,2 % Trisomie 8 [Metaphase: 90,0 %]
CML13*	normal	46,XX,t(9;22)[21]	93,2 % Ph+	
CML14	mormal??	keine Metaphasen	98,2 % Ph+ (84,9 +Ph)	
CML15*	17p-,17q+	46,XX,t(5;9;22)(q13;q31;q11),i(17q)[22]	98,0 % Ph+	68,9 % i(17q)

¹⁾ Für diese Analysen wurde die LSITM bcr/abl translocation probe der Firma Vysis zum Nachweis der BCR/ABL-Fusion eingesetzt.

²⁾ DNA-Proben: Alpha satellite 9-Probe (Oncor) → Nachweis der Trisomie 9 (+9); CEP X/CEPY-Probe (Vysis) → XO-Status; LSI HER-2/neu/CEP17-Probe (Vysis) → Isochromosom 17q [i(17q)]; CEP8-Probe (Vysis) → Trisomie 8; WCP21-Probe → Trisomie 21.

* Diese Proben wurden in verschiedene Fraktionen aufgetrennt, deren Reinheit durch FACS-Analyse festgestellt wurde. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels CGH auf sekundäre Mutationen hin untersucht (siehe Tabelle 4).

In den Fällen mit komplexen Ph-Translokationen (CML9, CML10 und CML15) wurden weitere FISH-Experimente durchgeführt (siehe 3.3).

Die in Tabelle 3 vorgestellten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: Die in fünf der 15 hier untersuchten Fälle gefundenen sekundären Aberrationen gehören zu den häufigsten mit der Progression der CML zur Blastenkrise assoziierten Mutationen ("major route changes", siehe 1.2.2) (CML6, 9, 12, 14 und 15). In zwei Fällen (CML5 und 11) traten seltenere sekundäre Chromosomenveränderungen auf ("minor route changes"). In fünf weiteren Fällen (CML1, 7, 8, 10 und 13), die positiv für die BCR/ABL-Umlagerung waren, ließen sich keine sekundären Mutationen nachweisen. Die BCR/ABL-Fusion im Fall CML1 war mittels RT-PCR nachgewiesen worden (Daten nicht gezeigt). Insgesamt drei Ph-negative CML-Fälle wurden analysiert (CML2, 3 und 4). Zwei davon zeigten auch keine sonstigen Mutationen (CML3 und 4), während in einem Fall mit einer Trisomie 9 eine für CML untypische Aberration auftrat (CML2). Drei der für die BCR/ABL-Fusion positiven Fälle (CML9, 10 und 15) weisen komplexe Philadelphia-Translokationen auf. Diese werden in Kapitel 3.3 behandelt.

Folgende "major route changes" wurden hier gefunden: i(17q) bei CML9 und 15; ein zusätzliches Philadelphia-Chromosom (+Ph) bei CML14; +8, i(17q) und +Ph in den Fällen CML6 und CML12 (siehe Tabelle 3). In Abb. 16 ist das G-Banden-Karyogramm einer Zelle mit allen genannten Aberrationen gezeigt. Das Ergebnis einer CGH-Analyse ist in Abb. 17 dargestellt.

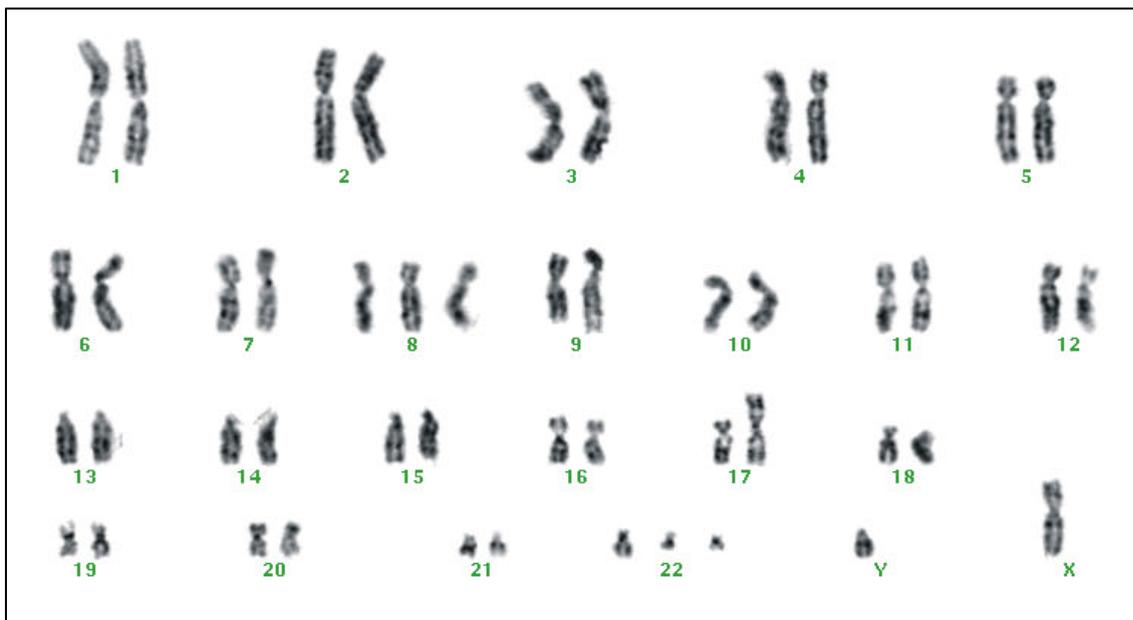


Abb. 16: G-Banden-Analyse der Probe CML12B.

Der Karyotyp dieser Zelle lautet 48,XY,t(9;22),+8,i(17q),+Ph. Der vollständige Karyotyp dieser Probe ist der Tabelle 3 zu entnehmen.

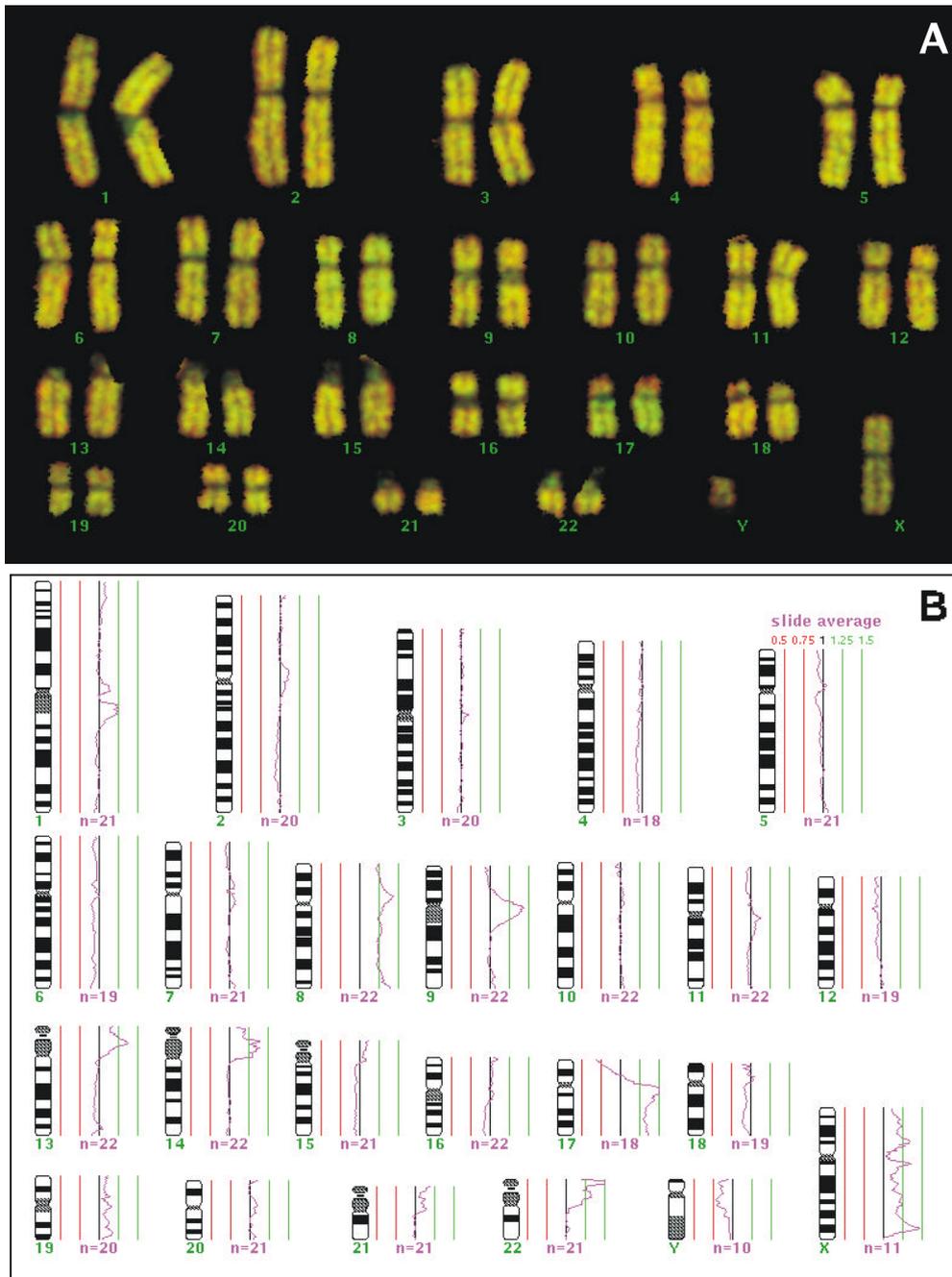


Abb. 17: Comparative genomische Hybridisierung (CGH) der Probe CML6B.

(A) Karyogramm. Die gemeinsame Hybridisierung von FITC-markierter Tumor-DNA (grün) und Rhodamin-markierter Referenz-DNA (rot) auf normale Chromosomen führt zu einer relativ gleichmäßigen Gelbfärbung der gesamten Metaphase. Zugewinne chromosomalen Materials führen zu einer Grünfärbung (#8 und 17q), Verluste zu einer Rotfärbung (17p). (B) Mittelprofil. Der mittlere Quotient aus den Fluoreszenzintensitäten von Tumor- und Referenz-DNA bei Auswertung von 11 Metaphasen. Ein Zugewinn chromosomalen Materials führt zu einer Rechtsverschiebung des Mittelprofils (#8 und 17q), ein Verlust zu einer Linksverschiebung (17p).

Die per CGH und/oder G-Banden-Analyse gefundenen “major route changes” (+8, i(17q), +Ph) ließen sich durch FISH mit den entsprechenden DNA-Proben bestätigen (siehe Tabelle 3). Anhand von jeweils 200 bis 300 Interphase-Kernen wurden

die FISH-Experimente quantitativ ausgewertet. In Abb. 18 ist der Nachweis einer Trisomie 8 zu sehen, in Abb. 19 ist der Nachweis des Isochromosoms 17 im selben Fall zu sehen.

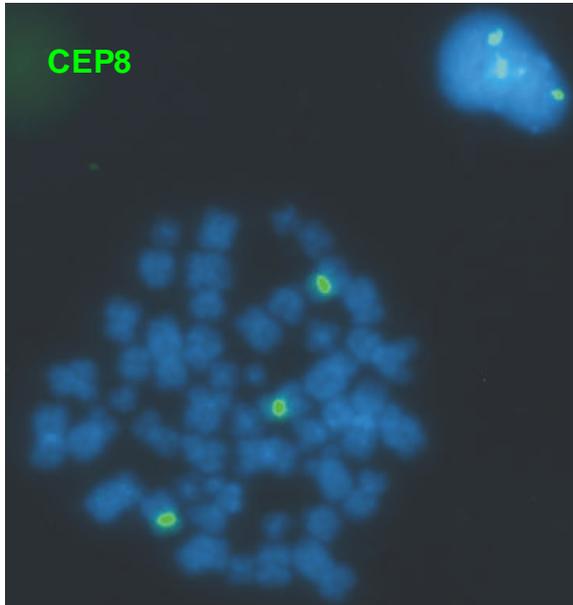


Abb. 18: FISH-Analyse der Probe CML6B mit einer CEP8-Sonde.

Sowohl auf den Interphase-Kernen als auch auf der Metaphase sind drei Signale der Chromosom 8-Zentromerprobe zu sehen. Anhand der Metaphase ließ sich bestätigen, daß es sich tatsächlich um eine Trisomie 8 handelt, die quantitative Auswertung erfolgte anhand der Auszählung von mehr als 200 Interphase-Kernen.

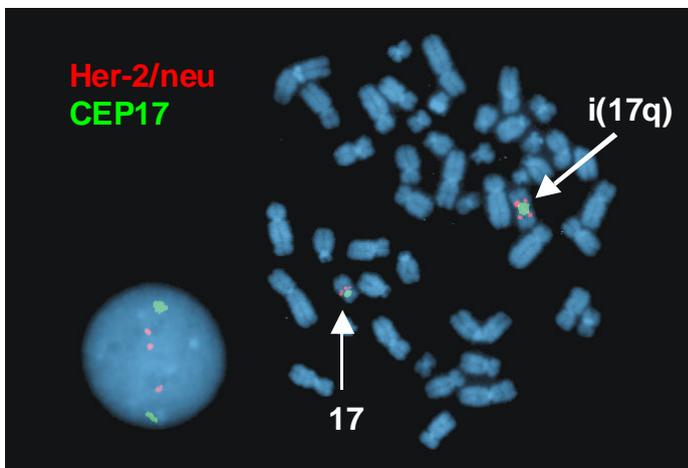


Abb. 19: FISH-Analyse der Probe CML6B zum Nachweis des Isochromosoms 17q.

Doppel-Hybridisierung mit einer Einzelkopie-Probe für 17q (Her-2/neu, rot) und einer Chromosom 17-Zentromersonde (grün). Zwei grüne und drei rote Signale auf dem Interphasekern bestätigen das i(17q). Auf der Metaphase sind entsprechend der Anzahl der Chromatiden sechs rote Signale zu sehen, neben den beiden grünen Zentromer-Signalen.

Im Fall CML12 wurden, neben der Interphase-FISH, zusätzlich quantitative Auswertungen durch Analyse von jeweils mindestens 200 Metaphasen durchgeführt. Dies war durch die Technik der sogenannten Hypermetaphase-FISH möglich (siehe 1.3.1). Die Anwendung der Hypermetaphase-FISH im Fall CML12 ergab einen höheren Prozentsatz aberranter Zellen als die Interphase-FISH, das Auftreten zusätzlicher Ph-Chromosomen wurde durch Hypermetaphase-FISH, jedoch nicht durch Interphase-

FISH ermittelt (siehe Tab. 2). In Abb. 20 ist der Nachweis eines zusätzlichen Ph-Chromosoms auf Metaphase und Interphase dargestellt.

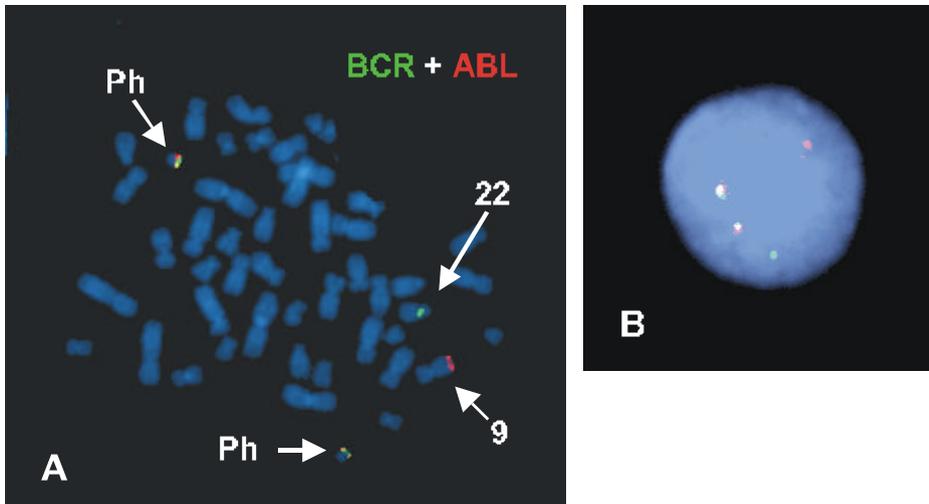


Abb. 20: FISH mit der LSITMbcr/abl translocation probe der Firma Vysis zum Nachweis der Ph-Translokation.

Dieses Probengemisch führt zu einem Fusionssignal, auf dem Philadelphia-Chromosom. Zusätzliche Signale weisen auf zusätzliche Ph-Chromosomen hin. (A) Hypermetaphase-FISH im Fall CML12A, Metaphase mit zwei Ph-Chromosomen. (B) Interphase-FISH im Fall CML6A.

In zwei Fällen wurden seltenere bei der CML auftretende sekundäre Mutationen nachgewiesen (minor route changes): Bei CML5, der Probe eines männlichen Patienten, wurde mittels CGH und FISH-Analyse das Fehlen des Y-Chromosoms festgestellt (Abb. 21 und 22). Das im Fall CML11 vorliegende zusätzliche Chromosom 21 war in der G-Bänderung (Abb. 22) nicht immer eindeutig von einem zusätzlichen Ph-Chromosom unterscheidbar. Durch Hypermetaphase-FISH mit einer WCP21-Probe (Abb. 23) wurde die Trisomie 21 bestätigt.

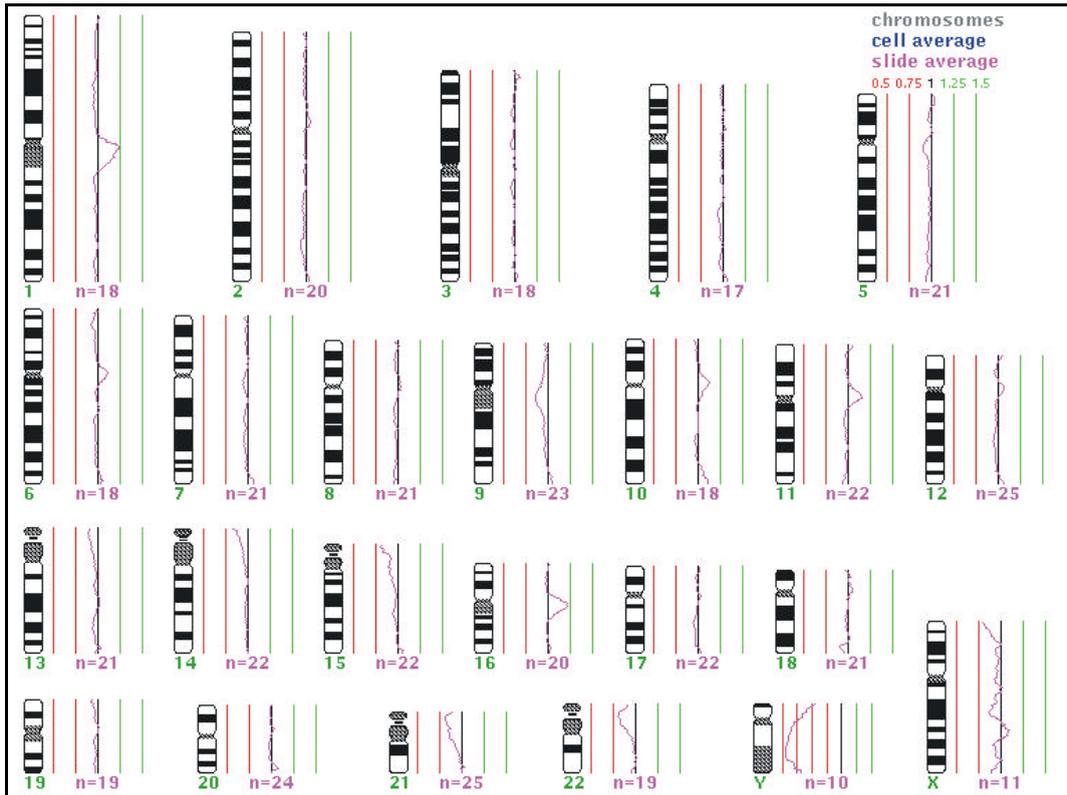


Abb. 21: CGH-Mittelprofil des Falles CML5.

Das CGH-Ergebnis weist auf das Fehlen des Y-Chromosoms hin, da das Mittelprofil für das Y-Chromosom annähernd bei Null liegt. Zu beachten ist, daß heterochromatische Bereiche (in den Ideogrammen schraffiert dargestellt) nicht in die Auswertung eingehen (Vgl. 1.3.2).

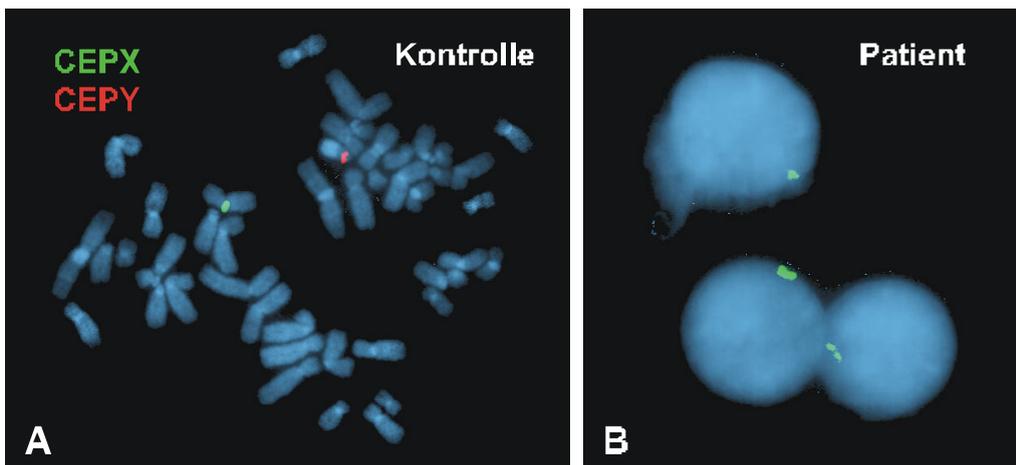


Abb. 22: FISH mit der CEPX/CEPY-Sonde der Firma Vysis.

(A) Normale männliche Kontrolle. Zu sehen sind ein rotes Zentromer-Signal auf dem Y-Chromosom, ein grünes auf dem X-Chromosom und dementsprechend auf dem Interphase-Kern eine rotes sowie ein grünes Signal. (B) CML5. Die Kerne zeigen jeweils nur ein grünes Signal, das Y-Chromosom ist also verloren gegangen.

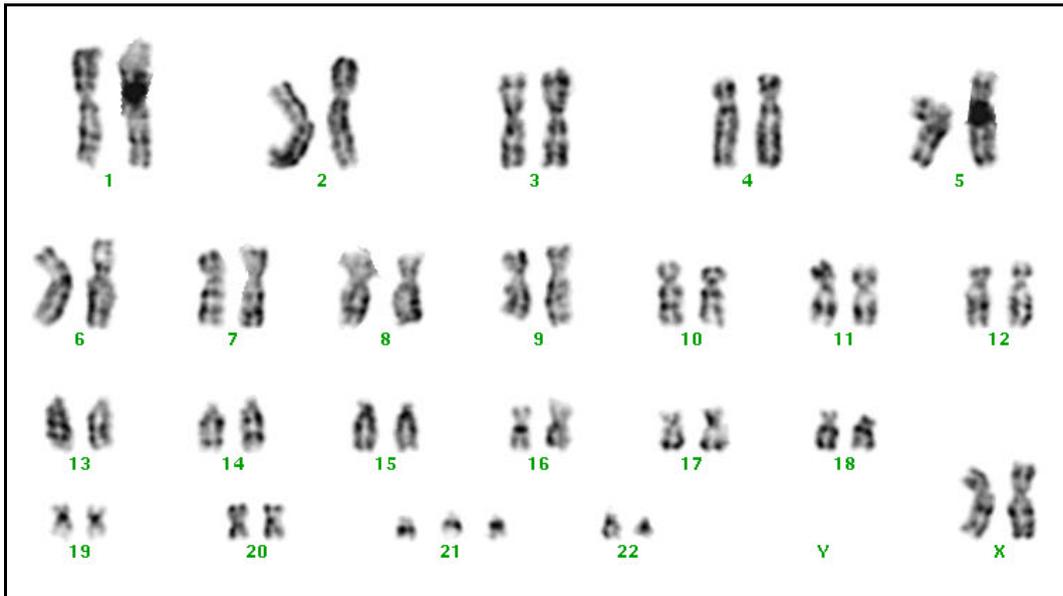


Abb. 23: G-Bänderung im Fall CML11: 47,XX,t(9;22),+21.

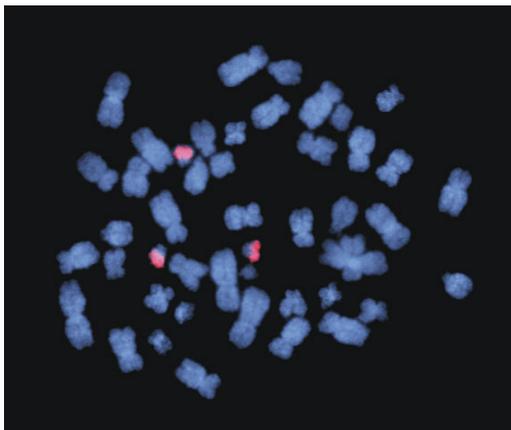


Abb. 24: FISH im Fall CML11 mit einer WCP21-Probe.

Es sind eindeutig drei Chromosomen 21 nachgewiesen.

Im Ph-negativen Fall CML2 ergab die CGH-Analyse den Hinweis auf Trisomie 9, die mittels Interphase-FISH mit einer CEP9-Probe bestätigt wurde (siehe Tabelle 3).

In einigen der Fälle (CML9B, CML9C, CML11, CML12B, CML13, CML15) wurden verschiedene Fraktionen des Blutes separiert (CD34-positive Zellen, T-Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten), deren Reinheit mittels FACS-Analyse festgestellt wurde (mit Ausnahme der Probe CML9B). Die einzelnen Fraktionen wurden mit CGH auf sekundäre Mutationen hin untersucht.

Tabelle 4: CGH-Untersuchung an Blutfraktionen von CML-Patienten in der Blastenkrise

Probe	CD34+	T-Zellen	Granulozyten	Monozyten	Vollblut
CML9B	[-] 17p-,17q+	[-] 17p-,17q+	[-] 17p-,17q+	[-] 17p-,17q+	17p-,17q+
CML9C	[100] 17p-,17q+	[33] 17p-,17q+	[70] 17p-,17q+	[-] ¹⁾ 17p-,17q+	17p-,17q+
CML11	[99] +21	[84] normal	[99] +21	[17] ²⁾ +21	+21
CML12B	[98] +8,17p-,17q+	[92] normal	[94] +17	[-] ¹⁾ +8, 17q+	+8, 17q+
CML13	[80] -	[70] -	[97] -	[82] -	normal
CML15	[60] 17p-,17q+	[60] +17	[99] normal	[39] 17p-,17q+	17p-,17q+

In eckigen Klammern ist die Reinheit der jeweiligen Fraktion in Prozent angegeben.

¹⁾ FACS-Analyse nicht möglich wegen Dynabeads

²⁾ Die ungenügende Reinheit ist auf die Art der Aufreinigung zurückzuführen (Absetzenlassen der Monozyten über Nacht)

Die Reinheit der CD34-positiven Zellen lag bei vier von fünf Messungen bei 80 % oder darüber, die der T-Zellen in drei von fünf Fällen sowie die der Granulozyten in jedem Fall bei 70 % oder darüber (siehe Tabelle 4). Die FACS-Analyse der über Dynabeads fraktionierten Monozyten (siehe 2.4.5) war nicht möglich. Um diese zu ermöglichen, wurde im Fall CML11 die Monozyten-Aufreinigung über das Absetzen in der Kultur über Nacht versucht, allerdings sehr auf Kosten der Reinheit. Im weiteren Verlauf des Projektes erfolgte die Monozyten-Fraktionierung über MicroBeads (siehe 2.4.6), die die FACS-Analyse nicht stören.

Da die für die Fraktionierung eingesetzten Methoden ein Zellwachstum nahezu unmöglich machen, war die CGH für die Untersuchung der Fraktionen die Methode der Wahl. In den Fällen, in denen eine Fraktionierung möglich war, ergab die CGH-Analyse folgende sekundäre Aberrationen: i(17q) in CML9 und CML15, +21 in CML11 sowie +8 und i(17q) in CML12 (Tabelle 4). Da im Fall CML13 sowohl durch CGH als auch G-Banden-Analyse das Auftreten sekundärer Mutationen ausgeschlossen werden konnte, wurde hier von einer Untersuchung der einzelnen Fraktionen abgesehen.

Sowohl die Probe CML9B als auch CML9C zeigt für alle untersuchten Fraktionen im CGH-Ergebnis einen Verlust von 17p und einen Gewinn von 17q, so daß auf ein Isochromosom 17q geschlossen werden kann (Abb. 25). Das Auftreten der Trisomie 21 im Fall CML11 konnte in allen Fraktionen außer den T-Lymphozyten nachgewiesen werden (Abb. 26). Die CGH-Analyse der Fraktionen der Probe CML12B ergab in allen Fraktionen außer den T-Zellen Hinweise auf sekundäre Aberrationen (Abb. 27). Im Fall CML15 gilt dies für alle Fraktionen außer den Granulozyten (Abb. 28).

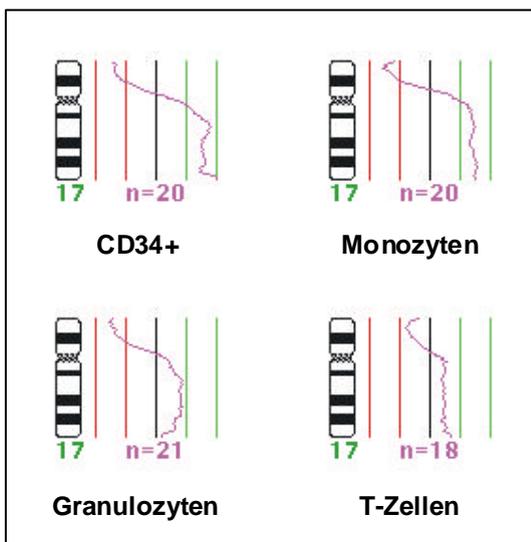


Abb. 25: CGH der Fraktionen bei CML9B. Mittelprofile der Chromosomen 17.

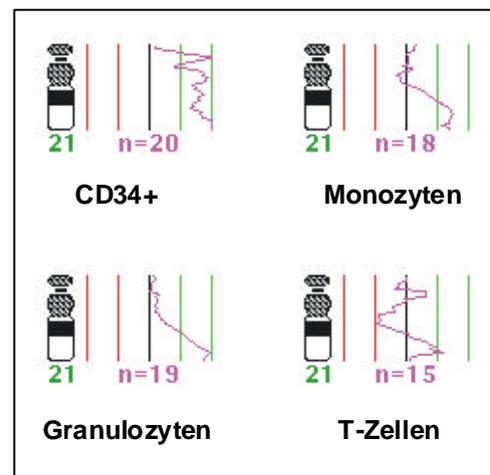


Abb. 26: CGH der Fraktionen bei CML11. Mittelprofile der Chromosomen 21.

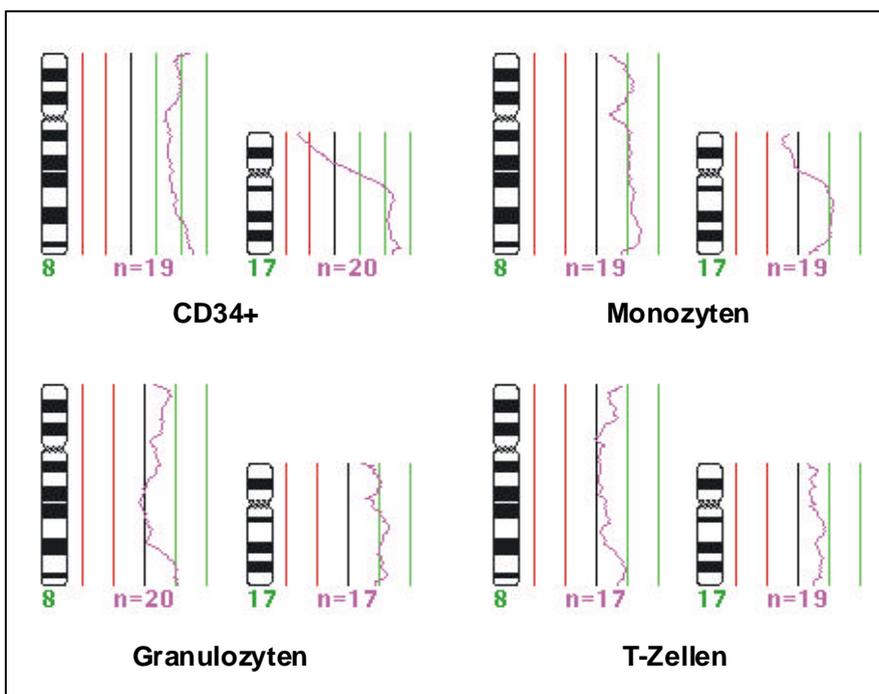


Abb. 27: CGH der Fraktionen bei CML12B. Mittelprofile der Chromosomen 8 und 17.

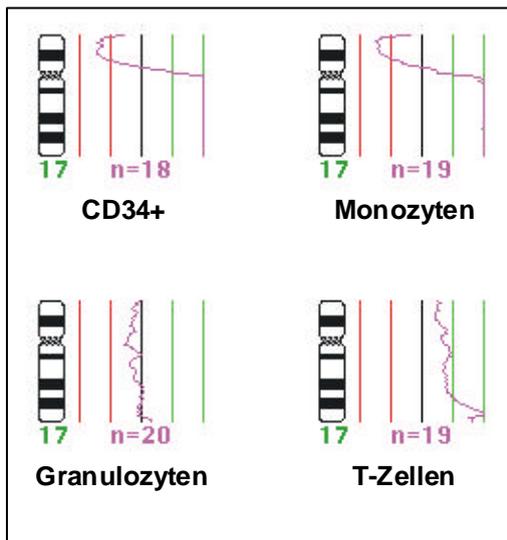


Abb. 28: CGH der Fraktionen bei CML15.
Mittelprofile der Chromosomen 17.

3.3 Komplexe Translokationen

Die G-Banden-Analyse ergab bei drei CML-Blastenkrisen (CML9, 10 und 15) variante Ph-Translokationen, die durch FISH-Analyse bestätigt wurden. Zur FISH-Analyse wurden neben WCP und CEP-Proben auch die sogenannte D-FISH-Probe der Firma Oncor verwendet. Im Fall CML15 wurden zusätzliche Einzelkopie-Sonden eingesetzt. Bei allen drei Fällen handelt es sich um Dreiwegs-Translokationen, bei denen neben den Chromosomen 9 und 22 ein weiteres Chromosom beteiligt ist: Im Fall CML9 um eine Translokation 9;20;22 (Abb. 29), im Fall CML10 um eine Translokation 9;11;22 (Abb. 30) und bei CML15 um eine Translokation 5;9;22 (Abb. 31). Bei allen drei Fällen war die routine-diagnostische Untersuchung per RT-PCR auf die BCR/ABL-Fusion hin positiv (siehe 2.2, Tabelle 1).

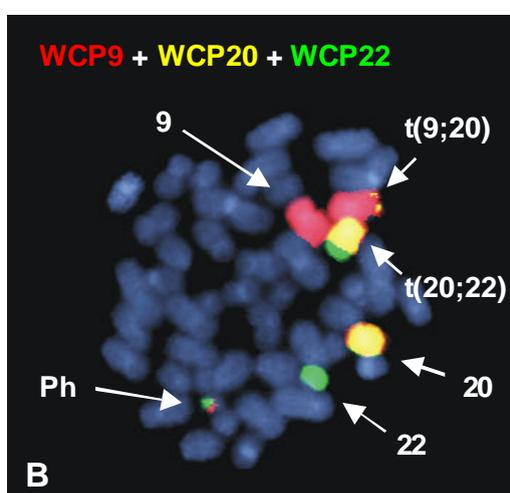
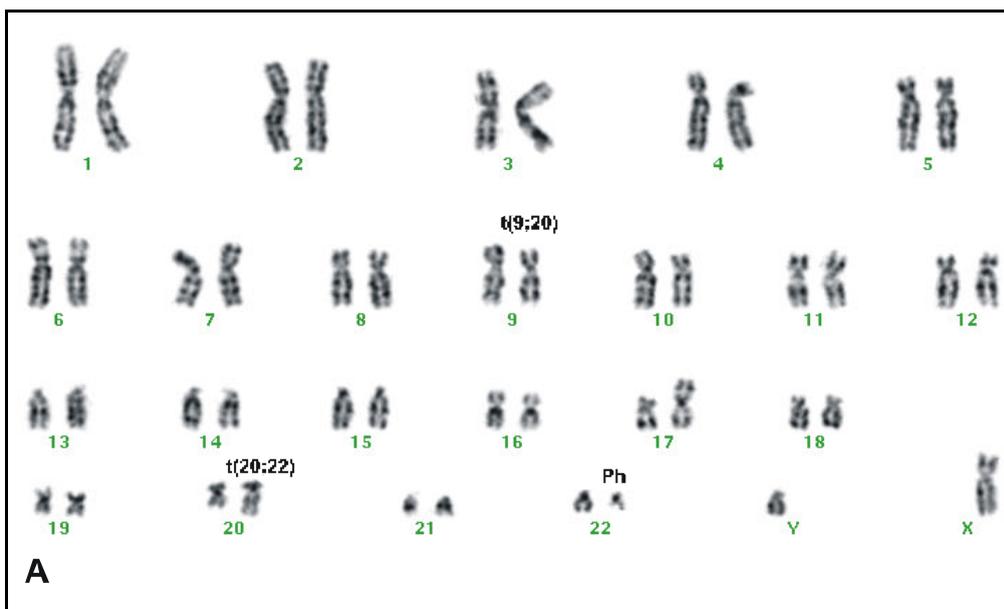


Abb. 29: CML9C, $t(9;20;22)(q34;q13;q11)$.

(A) G-Banden-Karyogramm. (B) Tripel-FISH mit einer WCP9-Probe (orange), einer WCP20-Probe (gelb) und einer WCP22-Probe (grün). Der G-Banden-Analyse zufolge scheint es sich um eine einfache variante Translokation 20;22 zu handeln. Durch FISH-Analyse wurde die Beteiligung des Chromosoms 9 gezeigt.

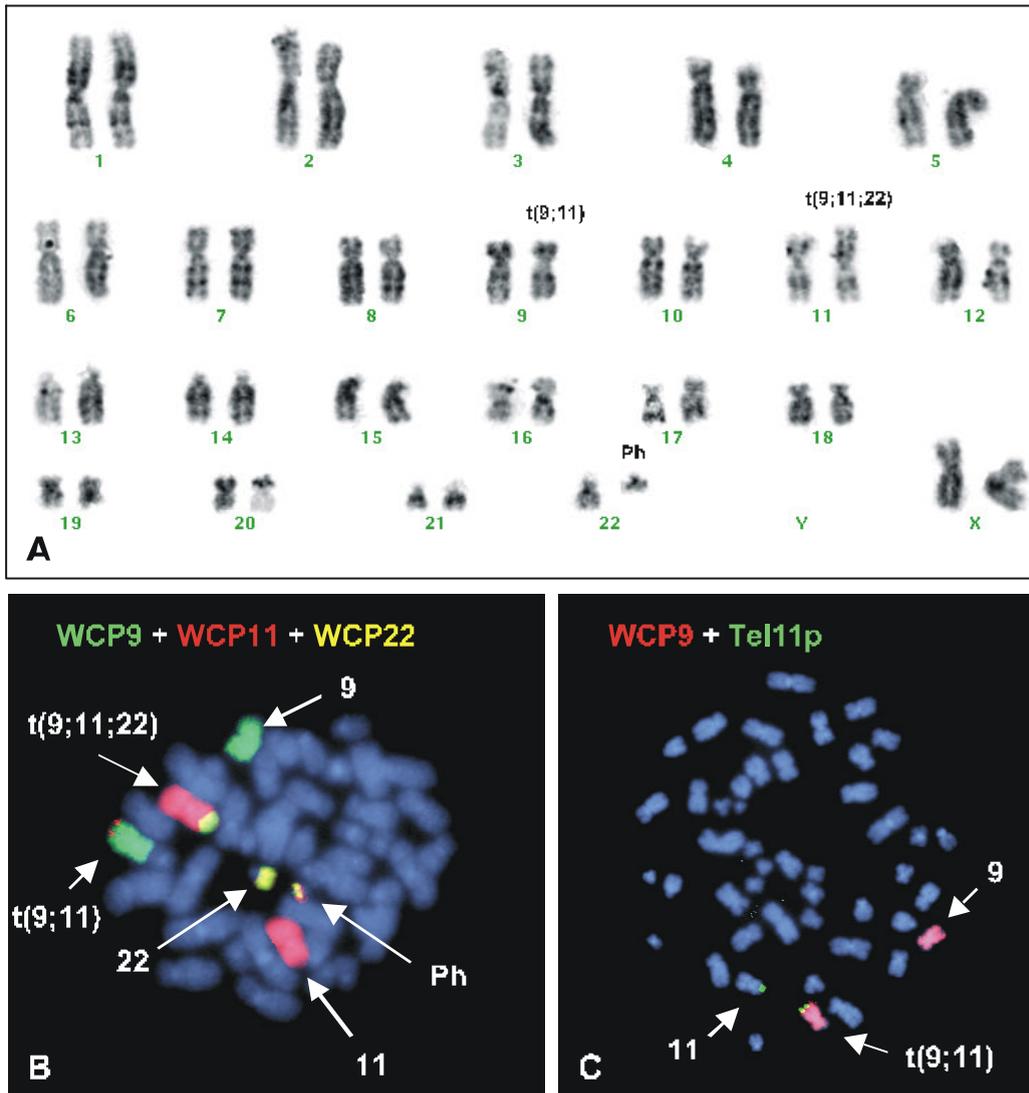


Abb. 30: CML10, t(9;11;22)(q34;p15;q11).

(A) G-Banden-Karyogramm. Es scheint sich um eine einfache variante Translokation 11;22 zu handeln. (B) Tripel-FISH mit einer WCP9-Probe (grün), einer WCP11-Probe (rot) und einer WCP22-Probe (gelb) zeigt die Beteiligung des Chromosoms 9. (C) FISH mit einer Telomerprobe 11p (grün) und einer WCP9-Probe (rot). Telomersequenzen von 11p sind an Chromosom 9 transloziert.

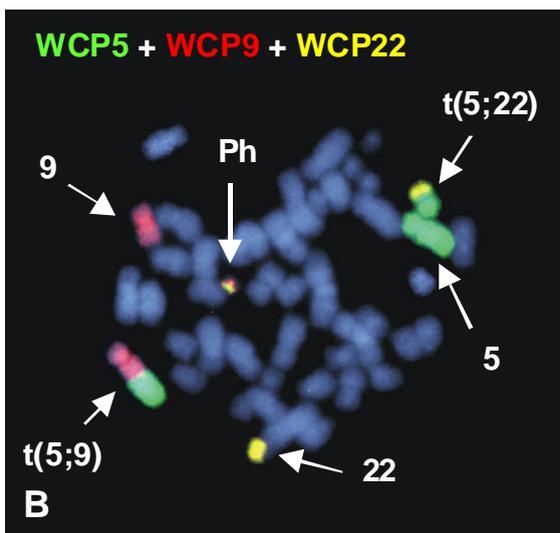
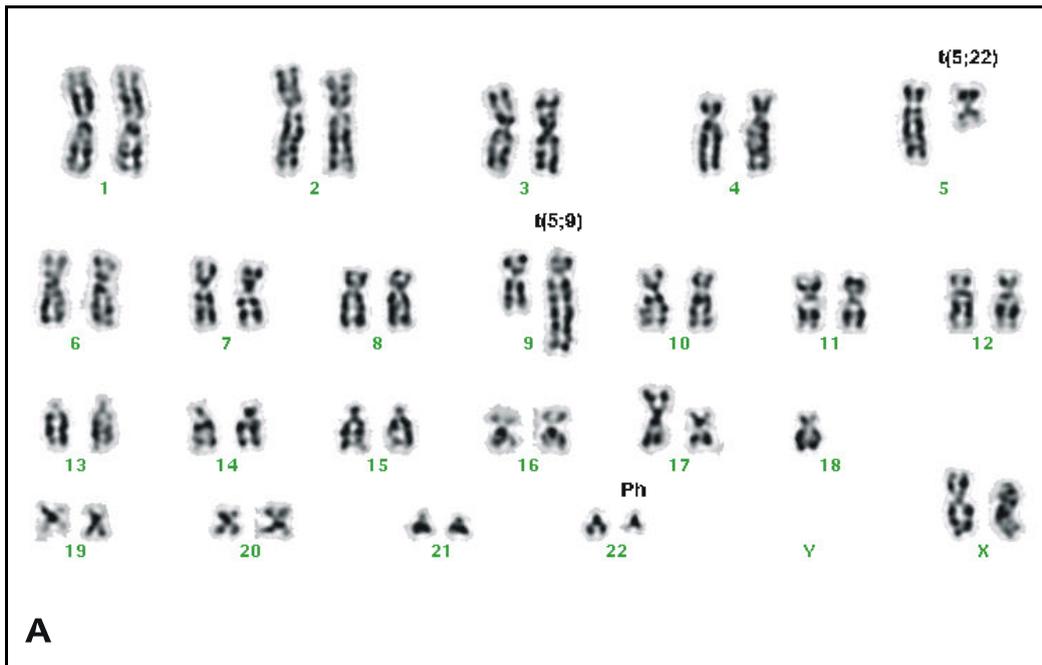


Abb. 31: CML15, t(5;9;22)(q34;q13;q11).

(A) G-Banden-Karyogramm. (B) Tripel-FISH mit einer WCP5-Probe (grün), einer WCP9-Probe (orange) und einer WCP22-Probe (gelb). Der durch G-Banden-Analyse gefundene Karyotyp wurde durch FISH bestätigt.

Die FISH-Analyse mit Bruchpunkt-übergreifenden BCR- und ABL-Proben (BCR/ABL D-FISH-Probe der Firma Oncor) ergab in den drei Fällen mit varianten Ph-

Translokationen Hybridisierungsmuster, die von dem der klassischen Ph-Translokation abweichen. Das Probengemisch ist so gewählt, daß im Falle einer klassischen Ph-Translokation zwei Fusionssignale auftreten (Abb. 32). Beim Fall CML9 trug nur das Ph-Chromosom ein Fusionssignal (Abb. 33), im Fall CML10 wurden zwei Fusionssignale nachgewiesen, auf dem Ph-Chromosom und auf einem der durch die Dreiwegs-Translokation entstandenen Derivate (Abb. 34).

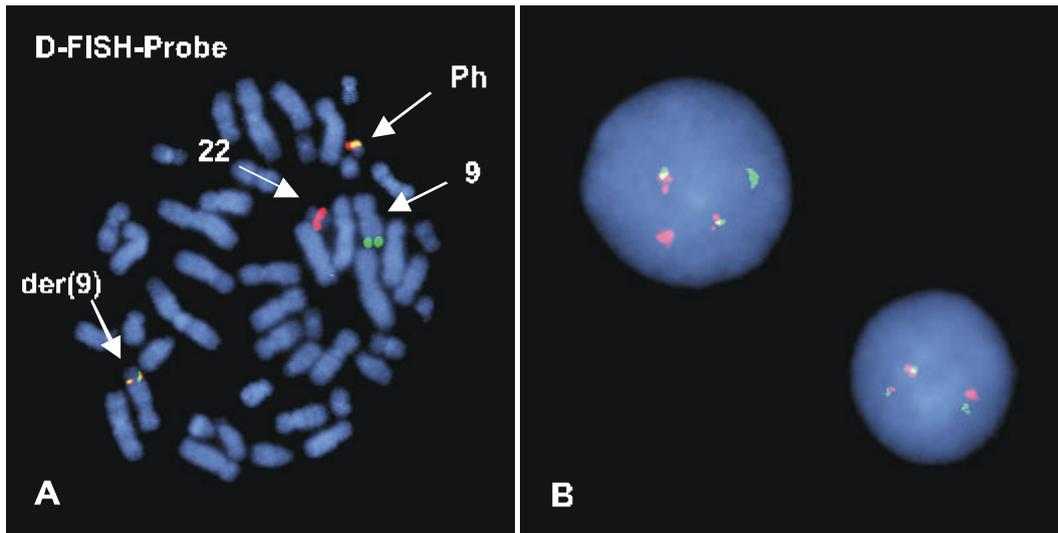


Abb. 32: FISH mit Bruchpunkt-überspannenden Proben für die BCR- und ABL-Gene (D-FISH Probe, Oncor) bei einem Fall mit klassischer Ph-Translokation (CML12A).
Sowohl auf Metaphase (A) als auch auf Interphase (B) sind zwei Einzelsignale und zwei Fusionsignale zu sehen.

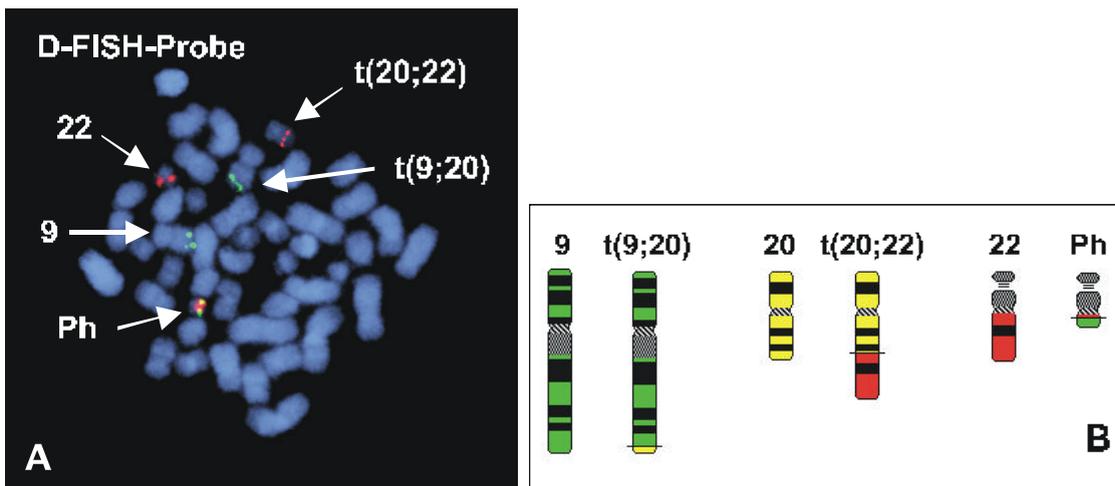


Abb. 33: CML9C, t(9;20;22)(q34;q13;q11).

(A) FISH mit Bruchpunkt-überspannenden Proben für die BCR- und ABL-Gene (D-FISH-Probe der Firma Oncor). Neben jeweils zwei einzelnen BCR-Signalen (rot) und ABL-Signalen (grün) ergab die Hybridisierung lediglich ein Fusionsignal auf dem Ph-Chromosom. (B) Schema der Dreiwegstranslokation.

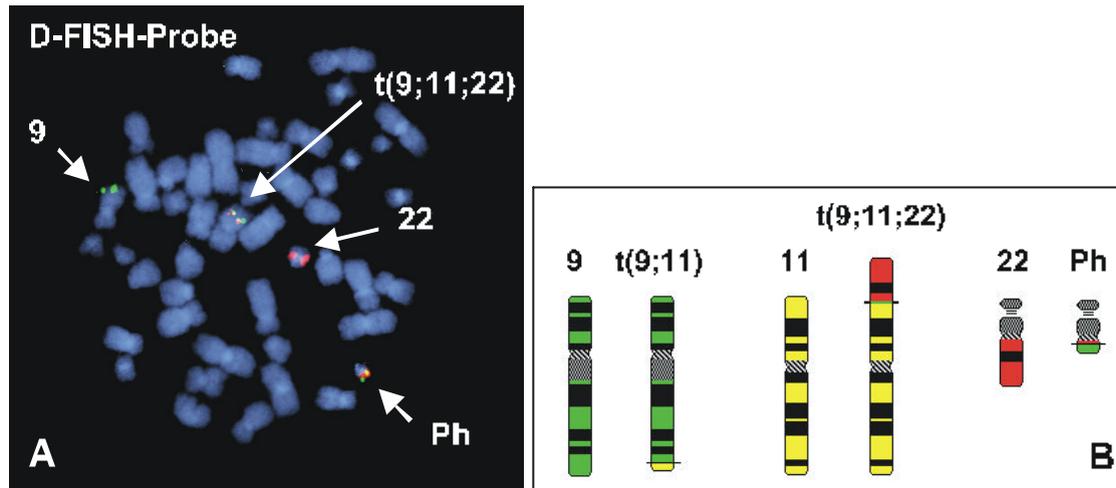


Abb. 34: CML10, t(9;11;22)(q34;p15;q11).

(A) FISH mit Bruchpunkt-überspannenden Proben für die BCR- und ABL-Gene (D-FISH-Probe der Firma Vysis). Neben zwei Einzelsignalen auf den normalen Chromosomen 9 und 22 sind zwei Fusions-signale zu sehen, eines auf dem Ph-Chromosom, das zweite auf dem Translokationschromosom 9;11;22. Die Beteiligung von BCR-Sequenzen an diesem Translokationschromosom wurde ausschließlich durch Hybridisierung mit der D-FISH-Probe nachgewiesen. (B) Schema der Dreiwegstranslokation.

Im dritten Fall mit varianter Ph-Translokation, CML15, ergab die FISH mit Bruchpunkt-übergreifenden Proben statt der zu erwartenden vier oder fünf Signale lediglich drei Signale (Abb. 35). Durch FISH mit zwei weiteren Proben wurde die Ursache dafür bestätigt: Mittels Hybridisierung mit einer PAC (P1 artificial chromosome)-Sonde, die aus dem ersten ABL-Intron nahe dem Exon 2 stammt, wurde die Deletion der centromerwärts an den Bruchpunkt angrenzenden Region auf Chromosom 9 nachgewiesen (Abb. 36). Die Hybridisierung mit einer BAC (bacterial artificial chromosome)-Sonde, die 200 kb telomerwärts des BCR-Gens liegt, ergab den Hinweis, daß die an den Bruchpunkt auf Chromosom 22 angrenzende Region deletiert ist (Abb. 37).

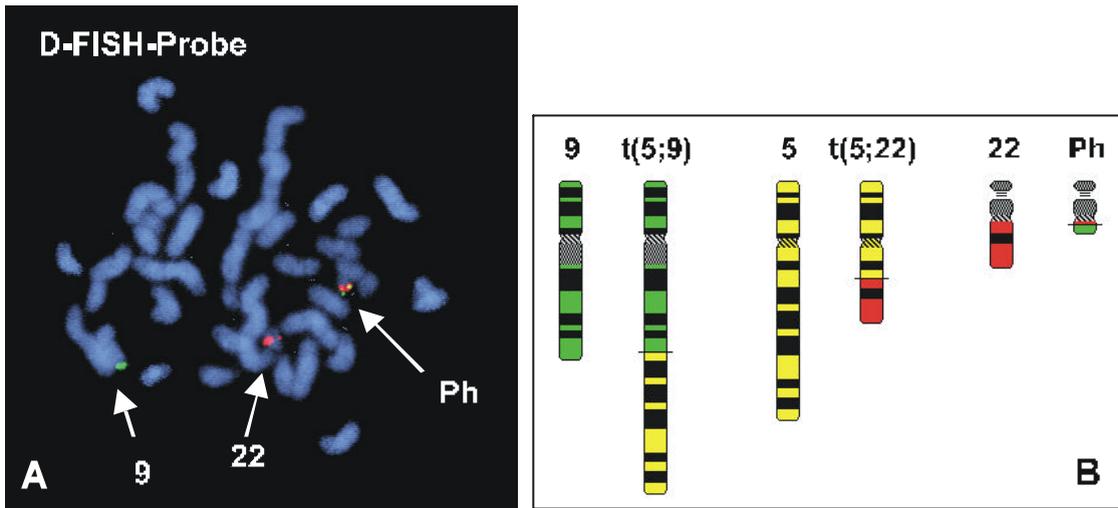


Abb. 35: CML15, t(5;9;22)(q13;q34;q11).

(A) FISH mit Bruchpunkt-übergreifenden Proben für die BCR- und ABL-Gene (D-FISH-Probe der Firma Oncor). Lediglich ein Fusionsignal, auf dem Ph-Chromosom, ist zu sehen. (B) Schema der Dreiwegstranslokation.

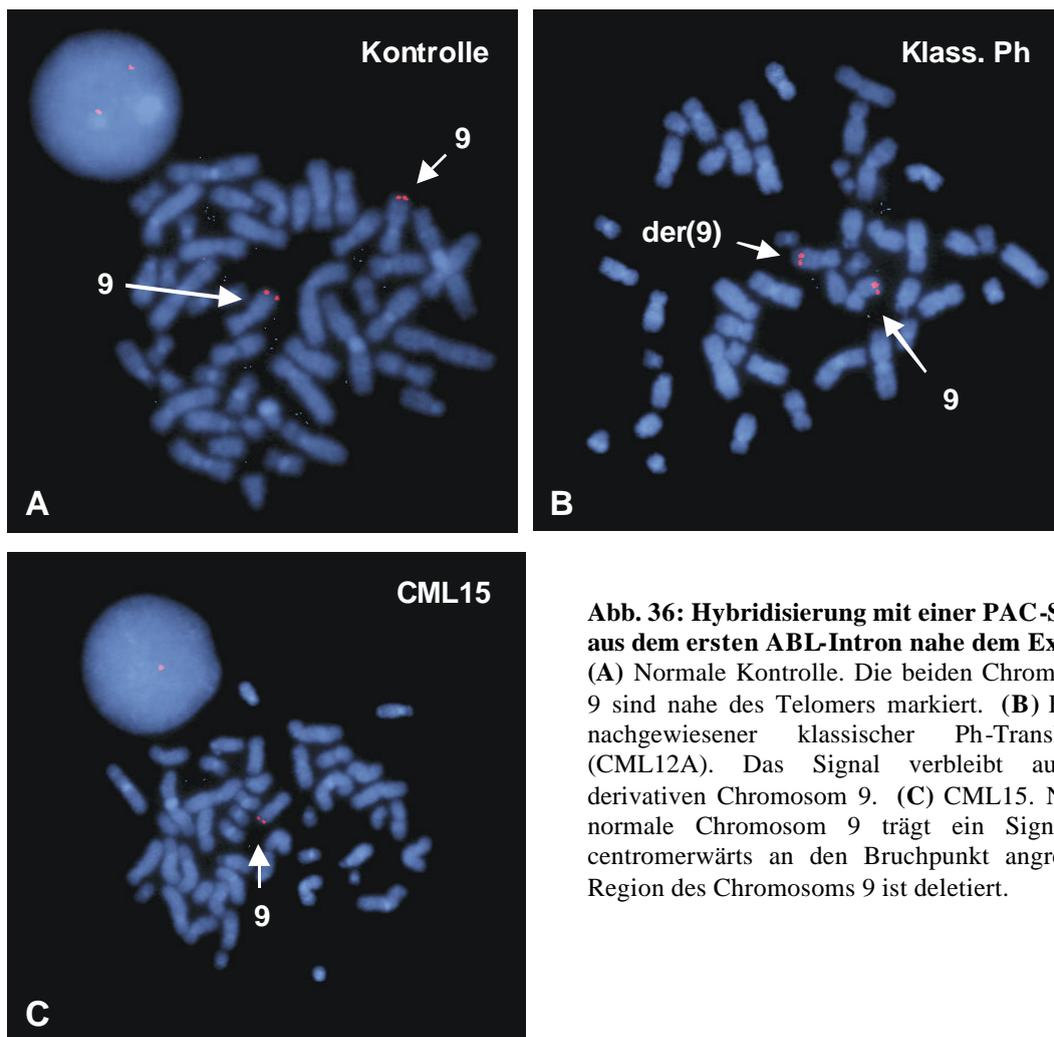


Abb. 36: Hybridisierung mit einer PAC-Sonde aus dem ersten ABL-Intron nahe dem Exon 2.

(A) Normale Kontrolle. Die beiden Chromosomen 9 sind nahe des Telomers markiert. (B) Fall mit nachgewiesener klassischer Ph-Translokation (CML12A). Das Signal verbleibt auf dem derivativen Chromosom 9. (C) CML15. Nur das normale Chromosom 9 trägt ein Signal. Die centromerwärts an den Bruchpunkt angrenzende Region des Chromosoms 9 ist deletiert.

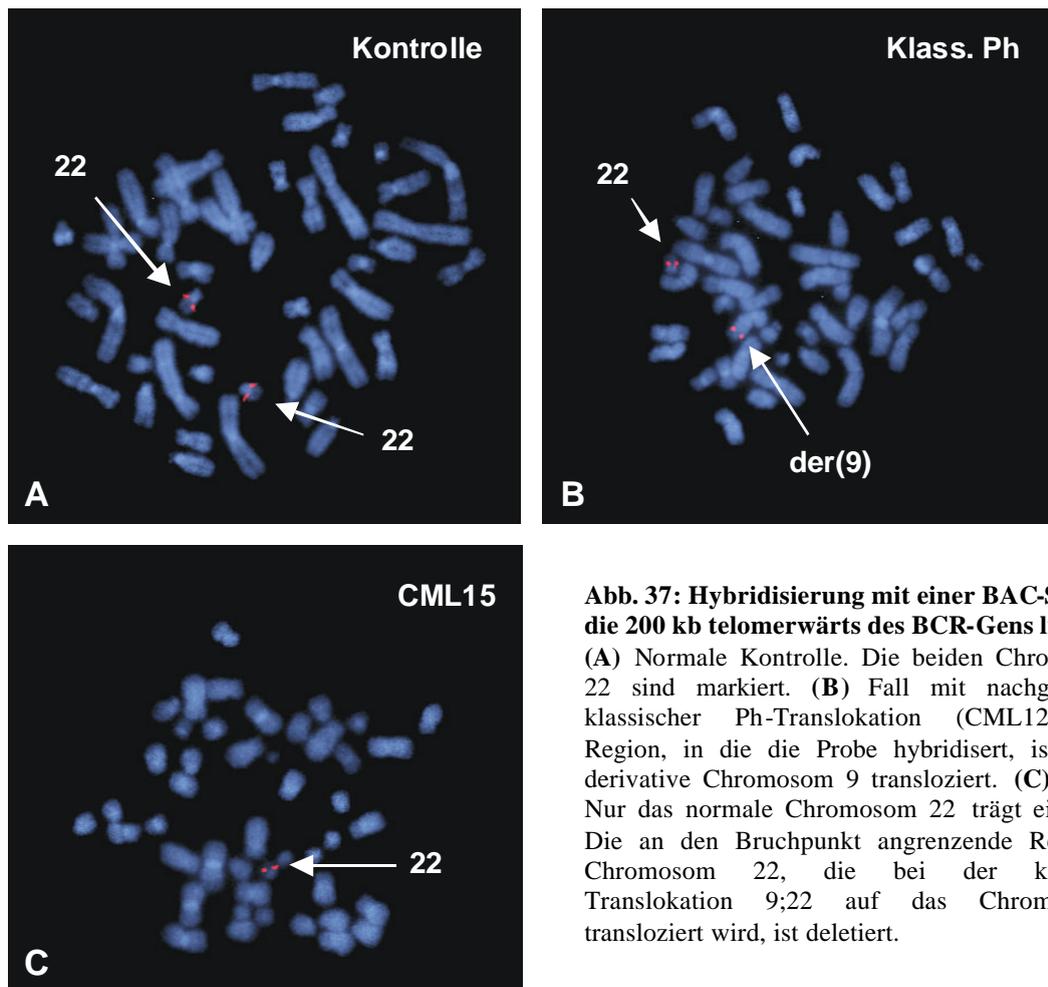


Abb. 37: Hybridisierung mit einer BAC-Sonde, die 200 kb telomerwärts des BCR-Gens liegt.

(A) Normale Kontrolle. Die beiden Chromosomen 22 sind markiert. (B) Fall mit nachgewiesener klassischer Ph-Translokation (CML12A). Die Region, in die die Probe hybridisiert, ist auf das derivative Chromosom 9 transloziert. (C) CML15. Nur das normale Chromosom 22 trägt ein Signal. Die an den Bruchpunkt angrenzende Region auf Chromosom 22, die bei der klassischen Translokation 9;22 auf das Chromosom 9 transloziert wird, ist deletiert.

4 Diskussion

4.1 Methodik

4.1.1 Zellseparation aus peripherem Blut

In dieser Arbeit wurden erstmals verschiedene Fraktionen des peripheren Blutes von CML-Patienten mittels CGH untersucht. Die Gewinnung der neutrophilen Granulozyten erfolgte über einen Dextran-Dichtegradienten, die T-Lymphozyten wurden durch Rosettierung mit Schaf-Erythrozyten separiert [195], die Monozyten sowie die CD34-positiven Zellen wurden durch magnetische Separierung (MACS) aufgereinigt [196]. Mit Hilfe dieser Methoden konnte aus peripherem Blut in der Regel eine für die CGH ausreichende Menge DNA jeder Fraktion gewonnen werden. Im Fall CML14 wurde mit Ausnahme der Granulozyten auf eine Fraktionierung verzichtet, da die Anzahl der gewonnenen mononukleären Zellen (PBMNCs) mit ca. 40 Millionen für eine erfolgreiche Separierung der drei anderen Fraktionen zu gering war.

Die FACS-Analyse wurde nur in Fällen mit genügend hoher Zellausbeute in der in Kapitel 2.4.7 beschriebenen Ausführlichkeit durchgeführt. Ziel dabei war es, im Falle möglicher Kontaminationen deren Herkunft zu ermitteln. Die Reinheit der Fraktionen war nicht in jedem Fall so hoch wie wünschenswert (siehe 3.2, Tabelle 4). Als ausreichend, d. h. keine falsch-positiven Resultate in der CGH liefernd, ist eine Reinheit von mindestens 70 % zu betrachten. Die Methode zur Aufreinigung der Monozyten wurde im Verlauf der Arbeit gewechselt, um eine anschließende Analyse der Reinheit mittels FACS-Analyse zu ermöglichen. Da die nach immunomagnetischer Separation an den Zellen verbleibenden Dynabeads eine FACS-Analyse unmöglich machen, wurde die Separierung der Monozyten durch MACS eingeführt.

In einigen Fällen war die Reinheit einzelner oder mehrerer Fraktionen nicht hoch genug. Die extrem niedrige Reinheit der Monozyten-Fraktion im Fall CML11 (3.2, Tabelle 4) lässt sich leicht erklären. Hier wurde eine Aufreinigung der Monozyten durch Sammeln der nach Übernacht-Kultur adhärenen Zellen angestrebt, die sich darüber im Kulturmedium befindlichen Zellen wurden jedoch nicht ausreichend abgespült. Im Fall CML15 ist die Reinheit von drei Fraktionen geringer als 70 % (3.2, Tabelle 4). Die

FACS-Analyse deutet für die Fraktion der T-Zellen auf eine Verunreinigung mit Granulozyten hin, während für die CD34-positiven Zellen keine Verunreinigung nachgewiesen werden konnte. Für die Monozyten-Fraktion wurden in diesem Fall nicht alle möglichen Verunreinigungen mittels FACS-Analyse überprüft, da dafür keine ausreichend große Menge an Zellen zur Verfügung stand.

Möglicherweise ist die FACS-Analyse zur Analyse der Reinheit der Fraktionen nicht in jedem Fall aussagekräftig, so sind z. B. Verfälschungen aufgrund eines Anteils beschädigter Zellen oder durch eine unzureichende Antikörper-Bindung denkbar.

4.1.2 G-Bänderung

In dieser Arbeit wurden Metaphasen aus CML-Blastenkrisen und der CML-Zelllinie K562 mit Hilfe der GTG-Technik (G-Banden mit Trypsin und Giemsa) [114] gebändert. Die G-Bänderung ist nach wie vor die erste Untersuchungsmethode bei der Suche nach Chromosomen-Aberrationen. Sie ist zur Zeit noch die genaueste Methode zur Bruchpunktbestimmung bei komplexen Rearrangements [197].

Die Metaphase-Präparation konnte in einem großen Teil der kultivierten CML-Blastenkrisen erfolgreich durchgeführt werden, so daß eine G-Banden-Analyse möglich war. Wahrscheinlich liegt in der CML-Blastenkrise ein gegenüber der chronischen Phase erhöhter Anteil an teilungsfähigen Zellen im peripheren Blut vor, wodurch eine Erntung von Metaphasen erleichtert wird.

4.1.3 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Die FISH-Analyse wurde hier u. a. zum Nachweis der BCR/ABL-Fusion bei CML-Blastenkrisen sowie zur Bestätigung von mit anderen Methoden gefundenen sekundären Aberrationen eingesetzt. Für die Fälle CML6B, CML7, CML9C, CML10, CML11, CML12A, CML12B, CML13 und CML15 war ein Vergleich der Ergebnisse aus G-Banden-Analyse und FISH möglich. Das Ph-Chromosom wurde in jedem dieser Fälle in 100 % der mittels G-Bänderung untersuchten Zellen gefunden, mit Ausnahme

des Falles CML11 (96,9 % Ph-positiv). In der FISH-Analyse dagegen lag der Anteil Ph-positiver Zellen bei ca. 60 – 98 %. Bei den Fällen CML6B, CML9C und CML15 lag der durch Interphase-FISH gefundene Anteil von Zellen mit sekundären Aberrationen bei ca. 70 % der in der G-Bänderung für diese Aberrationen positiven Zellen. Die im Fall CML12 (Proben CML12A und CML12B) ermittelten Anteile von Interphase-Zellen mit Trisomie 8 oder Isochromosom 17q lagen bei ca. 40 – 55 % der in der G-Banden-Analyse positiven Metaphasen. Derartige Unterschiede bezüglich des Anteils von Zellen mit spezifischen Chromosomenaberrationen bei FISH-Analyse und G-Bänderung wurden auch von Nguyen et al. beschrieben, die bei der Untersuchung von CML-Patienten mit Trisomie 8 häufig einen niedrigeren Anteil dieser Aberration auf Interphase als bei Analyse durch klassische Zytogenetik fanden [198]. Cuneo et al. postulieren jedoch den Prozentsatz Ph-positiver Zellen betreffend eine weitgehende Übereinstimmung zwischen konventioneller Chromosomenanalyse und Interphase-FISH [80].

Die hier gefundenen Unterschiede der Ergebnisse von Interphase- und Metaphase-Analyse lassen sich zum einen methodisch erklären anhand möglicher Schwächen der Hybridisierungsqualität oder einer sehr restriktiven Auswertung, die eher zu falsch-negativen als falsch-positiven Ergebnissen führt. Wahrscheinlicher ist, daß mit den beiden Methoden unterschiedliche Zell-Populationen erfaßt werden: Mit der klassischen Zytogenetik, sprich G-Bänderung, werden unreife Vorläufer-Zellen, die mitotisch aktiv sind, erfaßt. Mittels Interphase-FISH werden alle Zelltypen erreicht, auch die reiferen, nicht mehr teilungsaktiven Zellen. Somit sind die Ergebnisse die Interphase-FISH repräsentativer für den *in vivo*-Zustand.

Bei der Metaphase-FISH liegen, analog zu den Ergebnissen aus der G-Bänderung, die Anteile von Zellen mit Aberrationen höher als bei der Interphase-FISH. Dies trifft für das Auftreten des Ph-Chromosoms sowie für die Trisomie 8 und das Isochromosom 17q in beiden Proben des Falles CML12 zu. Interessanterweise wurde für diesen Fall das Auftreten eines zusätzlichen Ph-Chromosoms in einem kleinen Prozentsatz der Zellen (4 bzw. 3 %) nur in der Metaphase-FISH entdeckt. Dies ist ein Hinweis auf die Nützlichkeit der Metaphase-FISH für die Diagnostik auch parallel zur G-Banden-Analyse.

Neben der Validisierung von Ergebnissen aus der G-Banden-Analyse ist die FISH auch sehr hilfreich zur Ergänzung von M-FISH-Analysen u. a. bei der Charakterisierung komplexer Karyotypen, wie hier an der CML-Zelllinie K562 durchgeführt (siehe 3.1).

4.1.4 Multiplex-Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (M-FISH)

Mit Hilfe der sogenannten 24-Farben-FISH lassen sich bekannte Chromosomenaberrationen bestätigen, kryptische Rearrangements aufdecken und Chromosomen unbekannter Herkunft identifizieren. Damit sind diese Methoden von unschätzbarem Wert für die Charakterisierung komplexer Karyotypen [197].

Auch bei der hier durchgeführten Karyotyp-Analyse der CML-Zelllinie K562 hat sich die Bedeutung der M-FISH für die Aufdeckung der Zusammensetzung von Marker-Chromosomen gezeigt (siehe 4.2). Allerdings wurde auch eine Limitation dieser Methode deutlich, den Nachweis von Amplifikationen kleiner Chromosomenabschnitte betreffend: Gemäß FISH mit Bruchpunkt-angrenzenden Proben für die BCR- und ABL-Gene sowie mit einer WCP-Probe für das Chromosom 13, in Verbindung mit dem Ergebnis der CGH-Analyse, besteht der Marker M20 aus hintereinander angeordneten amplifizierten Kopien der BCR- und ABL-Gene sowie einer aus 13q31 stammenden Region. Die M-FISH-Analyse jedoch ergab, daß M20 ausschließlich aus vom Chromosom 22 stammendem Material besteht (siehe 4.2). Die amplifizierten, von den Chromosomen 9 und 13 stammenden Regionen des Markers M20 sind vermutlich zu klein, als daß sie mit M-FISH nachweisbar wären. Die genaue Nachweisgrenze der 24-Farben-FISH bedarf noch der Klärung [197].

Die M-FISH bietet potentiell die Möglichkeit der vollautomatischen Karyotyp-Analyse [132;185-187]. Bisher ist wohl noch eine ausführliche Nachbearbeitung des Ergebnisses der automatischen Klassifizierung vonnöten, wie auch in dieser Arbeit geschehen. Von verschiedenen in der benutzten Software (Leica MCK image analysis software) enthaltenen Kontrollmöglichkeiten wurde reger Gebrauch gemacht. Dazu gehören das "single chromosome window", in dem ein Chromosom in den verschiedenen Farben dargestellt wird, der "probe meter", eine Möglichkeit der Darstellung der Fluorochrom-Zusammensetzung in jedem Punkt der Metaphase, sowie

die Darstellung des Karyogramms im invertierten DAPI-Bandenmuster (siehe auch 1.3.3). Die Notwendigkeit der Benutzung dieser Hilfsmittel beruht möglicherweise zum Teil auf einem in der Färbung des FITC-Pools (siehe 2.9.1) beobachteten Hintergrund, der eine Prüfung nach erfolgter automatischer Karyotypisierung unerlässlich machte. Aber auch abgesehen von einem möglichen Hintergrund in der Färbung einzelner Fluorochrome ist eine nachträgliche Kontrolle der automatischen Karyotypisierung durch einen erfahrenen Untersucher nicht wegzudenken.

4.1.5 Comparative genomische Hybridisierung (CGH)

Die CGH wurde in dieser Arbeit eingesetzt zum einen zum Nachweis sekundärer Aberrationen bei CML-Blastenkrise, sowohl aus verschiedenen Fraktionen des peripheren Bluts als auch aus Vollblut, zum anderen für die Karyotyp-Analyse der CML-Zelllinie K562. Im Folgenden werden methodische Aspekte der CGH anhand der hier erhobenen Daten beleuchtet.

Wie bekannt, werden durch die CGH Aberrationen nachgewiesen, die in der untersuchten Zellpopulation häufig auftreten, während seltenere Aberrationen herausgemittelt werden [133]. Hier stellt sich die Frage, in einem wie großen Anteil der untersuchten Zellen eine Aberration vorhanden sein muß, um in der CGH nachweisbar zu sein. Im Fall CML2 wurde durch Interphase-FISH mit einer Chromosom 9-Zentromerprobe für 30 % der Zellen eine Trisomie 9 nachgewiesen. Die CGH lieferte hierzu einen Hinweis, ohne die Validisierung mit FISH stünde dieses Ergebnis jedoch nicht mit absoluter Sicherheit fest. Dementsprechend ist eine Aberration dann nachweisbar, wenn sie mindestens 30 % der Zellen betrifft, besser mehr. Häufig wird bei einer Monosomie oder Trisomie eine Nachweisgrenze von 50 % betroffener Zellen einer Zellpopulation gesetzt, das entspricht einem theoretischen Wert des Mittelprofils von 0,75 (50 % Zellen mit Monosomie) bzw. 1,25 (50 % Zellen mit Trisomie) [199]. Dementsprechend werden Mittelprofile von unter 0,75 bzw. über 1,25 als Aberrationen gewertet [163;169;199-203]. Ebenfalls häufig werden Mittelprofil-Werte von kleiner als 0,8 als Verluste bzw. größer als 1,2 als Gewinne interpretiert [170;174;175;204;205]. du Manoir et al. schlagen untere Grenzwerte zwischen 0,75 und 0,90 und obere Grenzwerte

zwischen 1,10 und 1,25 vor. Dabei sehen sie die engeren Grenzen von 0,90 bis 1,10 als geeignet für CGH-Experimente unter Benutzung von direkt markierten Nukleotiden. Die weiteren Grenzen von 0,75 bis 1,25 sind ihrer Meinung für Aberrationen, die nur in einem Teil der Zellen eines Tumors auftreten, möglicherweise nicht geeignet [206]. Weiterhin möglich ist der Einsatz statistischer Schwellenwerte wie z. B. des 95 % - Konfidenzintervalls (= Mittelprofil +/- die 1,96fache Standardabweichung) [158;199;207] oder von t-Grenzwerten [165]. Während in die Berechnung des Konfidenzintervalls die Variation innerhalb normaler chromosomaler Regionen in ein und demselben Experimentes eingeht, werden für die Festlegung einer t-Wert-Grenze Kontroll-Hybridisierungen herangezogen.

Je nach eingesetzten Nachweisgrenzen des Mittelprofils für Gewinne und Verluste sollten, bei entsprechend guter Hybridisierungsqualität, Veränderungen der Kopienzahl nachweisbar sein, auch wenn sie weniger als 50 % der Zellen betreffen. Gebhart et al. geben für die Untersuchung von myeloiden neoplastischen Erkrankungen an, mittels CGH Aberrationen nachweisen zu können, die mindestens 25 % einer Zellpopulation betreffen [208].

Die Ergebnisse der CGH werden als Verluste, Zugewinne und Amplifikationen von Chromosomenregionen bezeichnet. Ein Verlust kann naturgemäß entweder eines oder zwei von zwei homologen Chromosomen betreffen. Ist die Aberration in 100 % der untersuchten Zellen vorhanden, so sollte das Mittelprofil einen Wert von 0,5 (ein homologes Chromosom betroffen) oder 0,0 (beide homologen Chromosomen betroffen) aufweisen. Liegt ein Chromosomenabschnitt bis zum Zweifachen des normalen diploiden Zustands vermehrt vor (das bedeutet eine Kopienzahl von 200 % oder 4 Kopien), so spricht man von einem Zugewinn. Darüber hinausgehende Zugewinne werden als Amplifikationen bezeichnet. Die in dieser Arbeit durchgeführte CGH-Analyse der CML-Zelllinie K562 zeigte für die ABL- und BCR-Regionen Zugewinne (siehe 3.1.4, Abb. 15), während durch FISH mit Proben für die BCR- und ABL-Gene hochgradige Amplifikationen dieser Regionen bewiesen wurden (3.1.3, Abb. 10). Dies läßt sich möglicherweise dadurch erklären, daß sich zwar der Grad eines Zugewinnes von bis zu vier Kopien im Mittelprofil quantitativ unterscheiden läßt, die Höhe des Ausschlages bei einer Amplifizierung jedoch nicht den Grad der Amplifizierung widerspiegelt [133]. Hierzu sollte man bedenken, daß Amplifizierungen häufig kleinere Chromosomenregionen betreffen. Neben dem Prozentsatz betroffener Zellen ist für die

Nachweisbarkeit von Verlusten, Zugewinnen und Amplifikationen die Größe des betroffenen Chromosomenabschnittes von entscheidender Bedeutung. Laut Piper et al. errechnet sich die untere Nachweisgrenze für Zugewinne/Amplifikationen aus dem Produkt der Kopienzahl und der Größe der amplifizierten Region. Sie legen diesen Wert auf etwa 2 Mb fest [207]. Diese Annahme geht konform mit der Nachweisbarkeit einer Trisomie von 2 Mb Größe, einer in acht Kopien vorliegenden 250 kb großen Region [207] sowie einer 100 kb großen Region, die in mindestens 20 Kopien vorliegt [209;210]. Der Grad der Amplifizierung der BCR- und ABL-Gene in der Zelllinie K562 konnte in dieser Arbeit aus technischen Gründen nicht bestimmt werden (da die Signale den betreffenden Marker, M20, kontinuierlich einfärben). Es ist jedoch davon auszugehen, daß beim gegebenen Grad der Amplifizierung die amplifizierten Regionen zu klein sind, um in der CGH mehr als nur einen Zugewinn nachzuweisen, geschweige denn den Grad der Amplifizierung anzuzeigen.

Wichtig für die Analyse der CML-Zelllinie K562 ist die Tatsache, daß mit Hilfe der CGH nur relative Gewinne und Verluste angezeigt werden, jedoch nicht der Grad der Ploidie [211]. Da die Triploidie der Zelllinie durch die Ergebnisse anderer Methoden (G-Bänderung, FISH, M-FISH) bekannt ist, konnte das CGH-Ergebnis dementsprechend korrekt interpretiert werden: Gewinne und Verluste sind als Abweichungen vom triploiden Status zu bewerten (Vergleich 3.1.4). Für die Deutung des CGH-Mittelprofils eines gegebenen Tumors ist daher im Allgemeinen die Kenntnis des Ploidie-Grades unerlässlich. Anhand dieser lassen sich geeignete Schwellenwerte für die Charakterisierung von Gewinnen und Verlusten festlegen [199]. Der 50 %-Grenzwert ist für diploide Zellen entworfen worden und hat eine niedrigere Sensitivität für den Nachweis genetischer Imbalancen bei Zellpopulationen mit einem Vorherrschen von triploiden oder tetraploiden Zellen. du Manoir et al. schlagen für triploide Zellpopulationen Grenzwerte von 0,84 für den Verlust einer Kopie und 1,17 für den Gewinn einer Kopie vor [199].

Verschiedene Regionen sind von der CGH-Analyse auszuschließen: Die Zentromerregionen aller Chromosomen, die zentromernahen heterochromatischen Regionen der Chromosomen 1, 9 und 16, die p-Arme der akrozentrischen Chromosomen sowie der heterochromatische Bereich des Y-Chromosoms sind aufgrund der Blockierung repetitiver Sequenzen durch unmarkierte Cot 1-DNA von der Auswertung ausgenommen (siehe 1.3.2) [160;199]. In den Telomerregionen können

unzuverlässige Ergebnisse auftreten, da die Fluoreszenzintensitäten an den Telomeren graduell abnehmen [160].

In der Literatur werden verschiedene "variable Regionen" der CGH-Analyse beschrieben. Zu diesen gehören die Regionen 1p32→pter, 16p, 19 und 22 [160;212;213]. Kallioniemi et al. berichten über falsch-positive Verluste, Bryndorf et al. über falsch-positive Gewinne chromosomalen Materials in diesen Regionen [160;212]. Derartige Probleme werden möglicherweise durch verschiedene Hybridisierungseigenschaften von Digoxigenin- bzw. Biotin-markierter Proben verursacht und sollten demnach durch die Verwendung direkt markierter Proben zu beheben sein [160;212]. Auch in dieser Arbeit traten in manchen CGH-Experimenten falsch-positive Gewinne in den oben genannten Regionen auf, zusammen mit diversen zusätzlichen falsch-positiven Gewinnen oder Verlusten, so daß der Eindruck eines Bandenmusters entstand. CGH-Experimente unter direkter Markierung der Proben wurden durchaus angestrebt, führten aber nicht zu derselben Hybridisierungs-Intensität wie bei indirekter Markierung. Aus diesem Grund wurde letztere hier beibehalten. Da die beobachteten "Bandenmuster" jedoch eindeutig als Artefakte erkennbar waren, konnten sie problemlos von der Analyse ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse der CGH mit aus fraktionierten Zellen gewonnener DNA waren nicht immer so klar zu interpretieren wie die mit aus Vollblut extrahierter DNA (siehe 3.2, Tabelle 4, Abb. 27 und 28). Möglicherweise unterscheidet sich die nach den verschiedenen Fraktionierungsschritten gewonnene DNA von auf andere Weise gewonnener DNA, so daß die CGH nicht immer einwandfrei funktioniert. Hierzu gibt es noch keine Daten aus der Literatur.

4.2 Die CML-Zelllinie K562

Zellen der Zelllinie K562 werden in zahlreichen Untersuchungen verwendet. K562 ist als Lieferant menschlicher Leukämie-Zellen ein wichtiges Hilfsmittel u. a. für die Entwicklung der Immuntherapie von Leukämien [214], die Analyse der Differenzierung hämatopoetischer Zellen [103] und für die Tumorprogression der CML. Seit der erstmaligen Publikation [102] wurden K562-Zellen in mehreren Tausend Untersuchungen eingesetzt.

Die Karyotyp-Analyse der Zelllinie K562 mit Hilfe konventioneller und molekularer Zytogenetik verdeutlichte die Anwendbarkeit und das Zusammenspiel der verschiedenen Methoden in der Marker-Charakterisierung: Die Zusammensetzung einer Reihe von Marker-Chromosomen, die durch G-Bänderung nicht oder nur teilweise aufgedeckt werden konnte, wurde durch M-FISH ermittelt (M2, M4 - M6, M8 - M10, M15 - M17, M19, und M21). Für die Aufdeckung der Marker M11 und M13 war die M-FISH von besonderer Wichtigkeit.

Die FISH-Analyse erwies sich als wertvoll sowohl zur Verifizierung der durch M-FISH aufgedeckten Zusammensetzung mehrerer Marker als auch zur Feststellung der Herkunft der Zentromere einiger Marker-Chromosomen. Die G-Banden-Analyse konnte zur Auswertung einer größeren Anzahl von Zellen (51) eingesetzt werden und damit zur Ermittlung der Klonalität von Markern und zur Charakterisierung von Haupt- und Seitenlinie (siehe 3.1.1). Wichtig war die G-Banden-Analyse zudem für die Festlegung von Bruchpunkten innerhalb der Marker-Chromosomen. Die CGH bildete eine Ergänzung zu den anderen Methoden, indem auch sie hilfreich zur Bruchpunkt-Analyse war oder auch Hinweise auf die Amplifizierung kleinerer Chromosomenregionen gab, z. B. in 22q11.2. Das CGH-Mittelprofil trägt jedoch für sich allein genommen wenig zur Aufdeckung eines so komplexen Karyotyps bei. Der Marker M20 ist ein Beispiel für die Charakterisierung eines Marker-Chromosoms anhand von FISH-Analysen: Die Analyse mittels M-FISH ergab einen vergrößerten akrozentrischen Marker, der aus Chromosom 22-Material besteht. Die Beteiligung von Chromosom 9-Material, die durch M-FISH nicht nachgewiesen wurde, konnte durch Zweifarben-FISH mit den Locus-spezifischen Proben für die Gene BCR und ABL bewiesen werden. Anhand der DAPI-Bänderung wurde der entsprechende Marker in G-Banden-Karyotyp ermittelt.

Die Chromosom 13-Beteiligung wurde durch FISH mit einer WCP 13-Probe festgestellt. Aus diesen Experimenten läßt sich schließen, daß der Marker M20 aus hintereinander angeordneten, amplifizierten Regionen der Chromosomen 9, 13 und 22 besteht. Die von den Chromosomen 9 und 22 stammenden Bereiche enthalten mindestens die durch die FISH-Sonden abgedeckten Bereiche der ABL- und BCR-Gene (siehe 2.3.3). Der Chromosom 13-Anteil läßt sich unter Zuhilfenahme des CGH-Ergebnisses auf die Bande 13q31 eingrenzen. Dies ist ein Beispiel für die Limitationen der M-FISH-Technik. Die amplifizierten, von den Chromosomen 9 und 13 stammenden Regionen des Markers M20 sind vermutlich zu klein, als daß sie mit M-FISH nachweisbar wären.

In der Vergangenheit wurden verschiedene zytogenetische und molekularzytogenetische Untersuchungen zur Charakterisierung des K562-Karyotyps durchgeführt [78;102;104;107-111]. In dieser Arbeit wurde mittels M-FISH, G-Bänderung, FISH und CGH der Karyotyp der Zelllinie K562 vollständig aufgedeckt. In Tabelle 5 sind die in dieser Arbeit gefundenen Marker-Chromosomen im Vergleich mit früheren zytogenetischen Analysen aufgelistet [78;102;104;107-109]. 16 der 21 hier gefundenen Marker-Chromosomen scheinen Pendanten in früheren Veröffentlichungen zu haben. 11 dieser 16 Marker wurden ähnlich interpretiert, wobei ihre Zusammensetzung in dieser Arbeit entweder bestätigt (M1, M3, M4, M7, M8 und M20) oder voll aufgedeckt wurde (M9, M10, M15, M15 und M19). Fünf weitere Marker dieser Arbeit haben keine Gegenstücke in der Literatur (M5, M6, M11 - M13). M11, M12 und M13 wurden in anderen Arbeiten möglicherweise aufgrund der Begrenzungen konventioneller Zytogenetik nicht gefunden.

Tabelle 5: Marker-Chromosomen der Zelllinie K562, Vergleich mit veröffentlichten Karyotypen.

Marker	Veröffentlichungen, die den Marker enthalten	
	Gleiche Interpretation	Unterschiedliche Interpretation ¹⁾
M1 = der(2)add(2)(q33)	[107;109]	
M2 = der(?)t(5;6)		[107-109]
M3 = dup(6)(p12→p22)	[107-109]	
M4 = inv(7)	[108;109]	
M5 = del(7)(p15)		
M6 = der(7)rea del(7)		
M7 = dup(9)(q34)	[107-109]	
M8 = del(9)(p12)	[107-109]	
M9 = der(10)t(3;10)	[109]	<i>[108]</i>
M10 = der(10,17)t(3;10;17)	[109]	<i>[107;108]</i>
M11 = der(?)t(6;11)		
M12 = der(12)t(12;19)		
M13 = der(12)t(12;21)		
M14 = der(?)t(12;19)		[107]
M15 = der(13)t(9;13)	[107;108]	[109]
M16 = der(17)t(9;17), x 2	[107;109]	
M17 = der(19)t(2;19)		[109]
M18 = der(?)t(19;20)		[109]
M19 = der(21)t(1;21)	[107;109]	<i>[108]</i>
M20 = BCR/ABL-Fusionsmarker	[78;104;107-109]	[102]
M21 = del(X)(p11)		[109]

¹⁾ Zitate von Veröffentlichungen, in denen der Marker gar nicht charakterisiert wurde, sind kursiv gedruckt.

Kürzlich wurde eine M-FISH-Analyse der Zelllinie K562 veröffentlicht [111]. Der von Gribble et al. erstellte M-FISH-Karyotyp von K562 zeigt Gemeinsamkeiten mit und Unterschiede zu der K562-Charakterisierung in dieser Arbeit. 12 Marker-Chromosomen traten in beiden Arbeiten auf (hier bezeichnet als M2 - M9, M13, M16, M19 und M20), neun der hier gefundenen Marker waren im Karyotyp von Gribble et al. nicht vorhanden

(hier bezeichnet als M1, M10 - M12, M14, M15, M17, M18 und M21) und 4 der Marker von Gribble et al. wurden hier nicht gefunden (bei Gribble et al. bezeichnet als mar18, mar1/18, mar20 und mar16/6/20). Interessanterweise weisen der hier gefundene Karyotyp und der von Gribble et al. mehrere Marker-Chromosomen auf, die in früheren Veröffentlichungen nicht gefunden worden waren. Dazu gehören zwei Chromosomen 7-Marker (M5 und M6) sowie M11 - M13. Dies zeigt wiederum die Bedeutung der M-FISH für die Marker-Charakterisierung.

Der hier als M20 bezeichnete Marker ist von besonderem Interesse, da er schon in den frühesten Publikationen beschrieben wird und möglicherweise die Ursache für die Immortalisierung der Zelllinie K562 darstellt [109]. Die Bildung von Tandem-Wiederholungen des BCR/ABL-Hybridgens führt zu einer erhöhten Menge an Fusionsprotein und damit einer erhöhten Tyrosinkinase-Aktivität ("genetic dosage effect") [215]. M20 wurde ursprünglich als Translokation 15;17 beschrieben [102], später wurde die Beteiligung der BCR- und ABL-Gene nachgewiesen und der Marker als mutmaßlich vom Ph-Chromosom abstammend charakterisiert [78;104;107-109]. Schließlich wurde die zusätzliche Beteiligung von Chromosom 13-Material aufgedeckt [111;216]. In den genannten Publikationen wurden jeweils ein oder zwei solcher maskierter Ph-Chromosomen beschrieben.

Die von Rodley et al. durchgeführte CGH-Analyse der Zelllinie K562 stimmt in weiten Teilen mit dem Resultat dieser Arbeit überein, die Gewinne in 1q, 3p, 5p, 6p, 9q34, 16q, 21q, 22q11.2 und die Verluste in 3p, 9p, 10q, 13q, 14q, 17p, 22q und X betreffend [110]. Ein Teil der CGH-Ergebnisse stimmt nicht überein, so wurden z. B. die hier gefundenen Gewinne in 2q und 11q sowie die Ausgeglichenheit für Chromosom 8 bei Rodley et al. nicht nachgewiesen. Diese CGH-Ergebnisse konnten hier jedoch mit Hilfe der anderen Methoden bestätigt werden.

Zusammenfassend kann den K562-Karyotyp betreffend gesagt werden, daß Gemeinsamkeiten und Unterschiede vorhanden sind zwischen dem hier ermittelten Karyotyp und den früher veröffentlichten Karyotypen [78;104;107-109;111] sowie auch zwischen den veröffentlichten Karyotypen. Die verschiedenen Charakterisierungen der Zelllinie unterscheiden sich teilweise in der Marker-Ausstattung, haben aber auch viele Merkmale gemeinsam. So weisen sie mindestens einen akrozentrischen, vom Ph-

Chromosom abgeleiteten Marker auf (s. o.), haben eine große Zahl anderer Marker gemeinsam und sind hypotriploid. Folglich ist der K562-Karyotyp über einen Zeitraum von drei Dekaden der Subkultivierung relativ stabil geblieben. Möglicherweise existieren verschiedene Sublinien, die sich leicht in ihrer Marker-Ausstattung unterscheiden.

4.3 CML-Blastenkrisen

4.3.1 Nachweis von Progressions-Markern

In 75 – 85 % der CML-Fälle treten, vor oder gleichzeitig mit der Progression in die akzelerierte Phase oder Blastenkrise, zusätzliche Chromosomenaberrationen auf. Diese sekundären Aberrationen gelten als Progressionsmarker, d. h. als Hinweise für das Fortschreiten der Erkrankung.

Hier wurden 15 Fälle von CML-Blastenkrisen mittels CGH und, soweit möglich, G-Bänderung und FISH, auf Progressionsmarker hin untersucht. Die CGH-Analyse war mit der Intention eingesetzt worden, neue Progressionsmarker zu finden, so z. B. Amplifikationen, die durch konventionelle Zytogenetik möglicherweise bisher nicht nachweisbar waren.

Die CGH ist neben der Untersuchung solider Tumoren auch für die Leukämie-Forschung von Bedeutung. Es gibt CGH-Untersuchungen an Leukämien, in denen im Vergleich zur G-Banden-Analyse keine zusätzlichen Aberrationen gefunden wurden, so z. B. bei Akuter Myeloischer Leukämie (AML) [178;217] und bei Chronischer Lymphatischer Leukämie (CLL) [182]. In einer Reihe anderer Untersuchungen wurden durch CGH zusätzliche, mit G-Bänderung nicht gefundene, Aberrationen aufgedeckt: Bei der AML [179], bei chronischer lymphatischer B-Zell-Leukämie (B-CLL) [177], bei chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) [182] sowie bei kindlicher akuter lymphatischer Leukämie (ALL) [181]. Wilkens et al. sehen eine Bedeutung der Untersuchung von Leukämien mittels CGH sowohl für die Forschung als auch für die Diagnostik [218]. Während Huhta et al. eine diagnostische Anwendung der CGH bei ALL nicht befürworten [217], betrachten andere dies als sinnvoll [219-221]. Diese Ergebnisse machen die Wichtigkeit der CGH als Quelle zusätzlicher Informationen für die Erforschung von Leukämien deutlich.

Die in dieser Arbeit durch CGH bei CML-Blastenkrisen erhobenen Ergebnisse korrelierten gut mit denen aus den anderen Methoden, es wurden jedoch keine zusätzlichen, mit klassischer Zytogenetik nicht gefundenen, Aberrationen nachgewiesen. In Veröffentlichungen über CGH-Untersuchungen an CML-Patienten wird jedoch deutlich, daß mittels CGH prinzipiell auch bei der CML zusätzliche, über die G-Banden-Analyse hinausgehende, Aberrationen nachweisbar sind, die sich

anschließend mittels FISH-Analyse näher erklären lassen [222;223]. So konnte z. B. mehrere unbalancierte Translokationen, die in der CGH zu einem Gewinn in 1q12→q21 führten, nachgewiesen werden [223].

Alles in allem gilt, daß CGH-Ergebnisse sich prinzipiell gut mit Daten aus der klassischen Zytogenetik sowie aus anderen molekular-zytogenetischen Methoden korrelieren lassen, zum Teil jedoch darüber hinaus Informationen liefern.

Die hier gefundenen sekundären Aberrationen gehörten in fünf Fällen zu den sogenannten major route changes und in zwei Fällen zu den minor route changes. In sieben der untersuchten Fälle wurden keine sekundären Aberrationen gefunden, zwei von diesen waren sowohl Ph-negativ als auch negativ für die BCR/ABL-Umlagerung (siehe 3.2, Tabelle 3). In einem weiteren Ph-negativen, BCR/ABL-negativen Fall wurde eine für CML atypische Aberration, Trisomie 9, gefunden (Fall CML2, 3.2, Tabelle 3). Die sogenannte Ph-negative CML macht etwa 5 – 10 % aller Fälle aus. Patienten mit Ph-negativer CML, die für die BCR/ABL-Fusion positiv sind, weisen dieselben klinischen und hämatologischen Eigenschaften auf wie Patienten mit BCR/ABL-positiver CML [25;35;36]. Da die drei hier untersuchten Ph-negativen-Fälle auch für die BCR/ABL-Fusion negativ sind, sind sie möglicherweise in andere diagnostische Kategorien als die CML einzuordnen [37;38].

4.3.2 Progressions-Marker in verschiedenen Fraktionen des Blutes

Es gibt Ansätze zur Untersuchung der Zellinienspezifität sowohl der BCR/ABL-Fusion [224-228] als auch sekundärer Chromosomen-Aberrationen [198;229] bei der CML. Zu diesem Zweck ist z. B. die FISH in Kombination mit verschiedenen Methoden zur Unterscheidung der hämatologischen Zelltypen einsetzbar. Eine Möglichkeit ist die morphologische Unterscheidung von Zelltypen mit Hilfe von Färbemethoden wie des sogenannten Wright's stain [229-231] oder der Färbung mit May-Grünwald-Giemsa [226;232], gefolgt von einem FISH-Experiment. Weiterhin läßt sich die FISH mit einer gleichzeitigen Immunophänotypisierung der Zielzellen kombinieren [226;233;234]. Auch eine Aufreinigung der Zelltypen durch FACS-

Sortierung mit anschließender Herstellung von Cytospin-Präparaten und FISH-Analyse ist möglich [227;228]. Gemäß der Tatsache, daß die CML charakterisiert ist durch die klonale Expansion einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle [11], sollte die BCR/ABL-Fusion in einer solchen pluripotenten Stammzelle stattfinden und somit in allen Zelltypen des hämatopoetischen Systems zu finden sein. Tatsächlich wurde diese Fusion in Zellen der myeloiden, monozytären und der erythrozytären Reihe sowie in B- und T-Lymphozyten gefunden [225-227]. In einigen Veröffentlichungen sind Fälle berichtet, in denen T-Lymphozyten negativ für die BCR/ABL-Fusion waren [225;228]. Probleme beim Nachweis der BCR/ABL-Fusion in T-Zellen bei Ph-positiver CML könnten u. a. begründet sein in einem Selektionsnachteil BCR/ABL-positiver T-Lymphozyten in der Zellkultur [225] oder einer fehlenden Differenzierung ihrer Vorläuferzellen [228]. Für letzteres spricht bei Takahashi et al., daß die BCR/ABL-Fusion in T-Zell-Vorläufern gefunden wurde. Die lange Lebensdauer von T-Zellen schließen Takahashiki et al. als Ursache für die fehlende Nachweisbarkeit der BCR/ABL-Fusion aus. Der Zeitraum zwischen dem Erwerb der Ph-Translokation und dem Auftreten der ersten offensichtlichen klinischen Symptome zuzüglich der Krankheitsdauer der in ihrer Studie untersuchten Patienten sei so lang, daß auch die T-Lymphozyten das Ph-Chromosom erworben haben sollten [228].

In dieser Arbeit wurde die Zellinienspezifität sekundärer Mutationen untersucht. Dazu wurden erstmals verschiedene Fraktionierungstechniken, die eine hohe Ausbeute an Zellen ermöglichen, in Verbindung mit CGH eingesetzt. Die Gewinnung von T-Lymphozyten aus dem peripheren Blut von CML-Patienten durch Rosettierung mit Schaf-Erythrozyten wurde von Jonas et al. beschrieben [225]. Die Separierung der neutrophilen Granulozyten erfolgte hier mit Hilfe eines Dextran-Dichtegradienten. Sowohl Monozyten als auch CD34-positive Zellen wurden durch magnetische Separierung (MACS) aufgereinigt [196]. Die hier eingesetzten Methoden wurden der zeitaufwendigen FACS-Sortierung vorgezogen. Zudem erbringt FACS eine relativ geringe Zellausbeute, die eine anschließende PCR oder Zellkultur zur Amplifizierung nötig machen würde. Da bei der FACS-Aufreinigung eine leichte Kontamination jedoch nicht vermeidbar ist, würden PCR oder Zellkultur die Interpretation der Ergebnisse erschweren [228]. Eine Zellkultur wäre außerdem zeitaufwendig und auch nicht bei allen Fraktionen ohne weiteres erfolgreich durchführbar. Die oben beschriebene

Möglichkeit der morphologischen Unterscheidung verschiedener Zelltypen anhand von Färbetechniken mit anschließender FISH hat den Nachteil, daß nicht immer genügend Zellen jeder Fraktion der Analyse zugänglich sind.

Hier wurde das periphere Blut von fünf Patienten in CD34-positive Zellen, T-Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten aufgetrennt. In vier dieser Fälle wurden die einzelnen Fraktionen mittels CGH auf sekundäre Mutationen hin untersucht (siehe 3.2, Tabelle 4), im Fall CML13 wurde dies unterlassen, da keine sekundäre Aberration vorlag (3.2, Tabellen 3 und 4). Bei einem der hier untersuchten Fälle wurde ein sekundäres Rearrangement, ein Isochromosom 17q, in allen vier Fraktionen nachgewiesen (CML9) (3.2, Abb. 25). In diesem Fall ist die Reinheit der Lymphozyten-Fraktion jedoch nicht bewiesen: Die aus der ersten der beiden untersuchten Proben (CML9B) gewonnenen Fraktionen wurden mangels einer ausreichenden Zellzahl nicht auf ihre Reinheit hin untersucht, bei der zweiten Probe (CML9C) ist die Reinheit laut FACS-Analyse unzureichend. In zwei Fällen wurden sekundäre Aberrationen in allen untersuchten Fraktionen außer den T-Lymphozyten gefunden: Eine Trisomie 21 im Fall CML11 (Abb. 26) sowie Trisomie 8 und Isochromosom 17q bei CML12B. Im letzteren Fall ist das Ergebnis für die Fraktion der Granulozyten nicht ganz eindeutig, der Zugewinn des Chromosoms 17 zeigt jedoch deutlich eine Aberration an (Abb. 27). Damit korrelieren die Ergebnisse von Nguyen et al., die mittels FISH bei sieben CML-Patienten in allen von ihnen untersuchten Zelltypen eine Trisomie 8 nachgewiesen haben, jedoch nicht in Lymphozyten [198]. Anastasi et al. haben in vier von acht untersuchten Fällen sekundäre Rearrangements in fast allen anderen untersuchten Fraktionen gefunden, mit Ausnahme der Lymphozyten. In der anderen Hälfte der Fälle wiesen sie sekundäre Aberrationen nahezu ausschließlich in den Blasten nach [229]. Die CGH-Analyse der Fraktionen ergab im Fall CML15 für alle untersuchten Fraktionen außer den Granulozyten ein Isochromosom 17q (Abb. 28).

Die hier erhobenen Daten ermöglichen, zusammen mit den Ergebnissen aus der Literatur, das Aufstellen verschiedener Modelle zur CML-Progression:

1. Das "klassische Modell", demzufolge sekundäre Aberrationen nach der Differenzierung der Stammzelle erfolgen (Abb. 38). Von diesem ausgehend ist das Auftreten sekundärer Aberration ausschließlich in Blastenzellen zu erwarten.

2. Das erste alternative Modell gründet auf der Vorstellung, daß sekundäre Aberrationen vor der Differenzierung der hämatopoetischen Stammzelle stattfinden und daher in allen Fraktionen des Blutes auftreten (Abb. 39).
3. Im zweiten alternativen Modell wird davon ausgegangen, daß sich sekundäre Aberrationen nach der Differenzierung der Lymphozyten ereignen (Abb. 40).

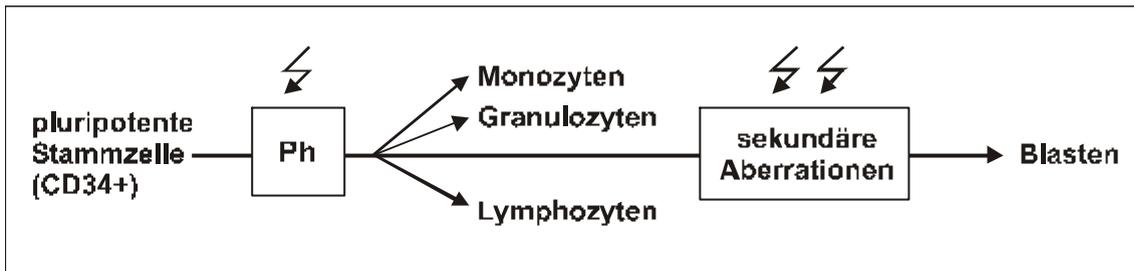


Abb. 38: "Klassisches" Modell der CML-Progression.

Sekundäre Aberrationen finden nach der Differenzierung der hämatopoetischen Stammzelle statt und treten daher ausschließlich in den Blasten auf.

Die von Anastasi et al. bei 3 von 8 untersuchten CML-Patienten erhobenen Daten weisen auf das hier als klassisch bezeichnete Modell der CML-Progression hin (Abb. 38). Bei diesen Patienten fanden sie sekundäre Mutationen tatsächlich nahezu ausschließlich in den Blastenzellen (in zwei Fällen Monosomie 7, in einem Fall Hyperdiploidie). Ihrer Auffassung zufolge sind nur diese sekundären Aberrationen mit der Progression der CML verknüpft, da sie zeitgleich mit dem Blastenschub auftreten [229].

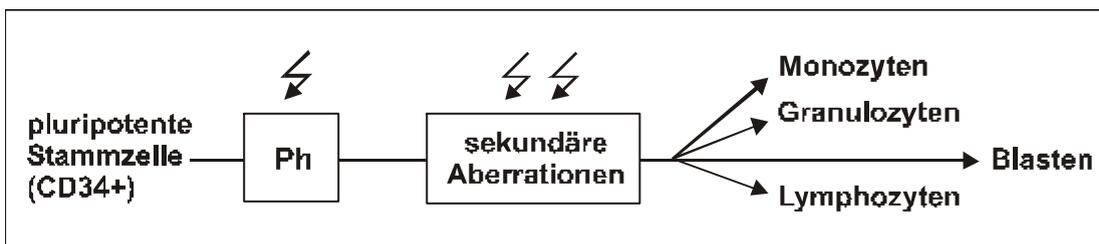


Abb. 39: Erstes alternatives Modell der CML-Progression.

Sekundäre Aberrationen finden nach der Differenzierung der hämatopoetischen Stammzelle statt und sind daher in allen untersuchten Fraktionen des peripheren Blutes nachweisbar.

Das erste hier beschriebene alternative Modell der CML-Progression (Abb. 39) ist auf den Fund sekundärer Aberrationen in allen vier untersuchten Fraktionen im Fall CML9 gegründet. Da die Reinheit der Lymphozyten-Fraktion in diesem Fall nicht

gesichert ist (die erste Probe wurde nicht auf die Reinheit hin untersucht, bei der zweiten Probe ist die Reinheit der FACS-Analyse zufolge nicht ausreichend) und auch in der Literatur keine analogen Ergebnisse gefunden wurden, bedarf diese Theorie der weiteren Untersuchung.

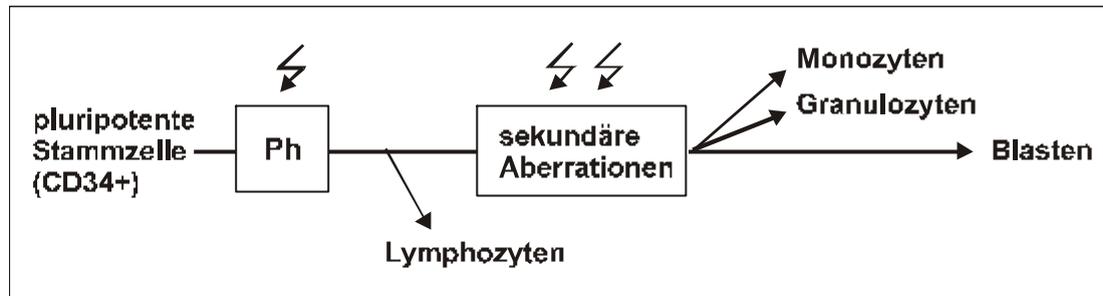


Abb. 40: Zweites alternatives Modell der CML-Progression.

Sekundäre Aberrationen finden nach der Differenzierung der Lymphozyten statt und sind daher in allen untersuchten Fraktionen mit Ausnahme der Lymphozyten nachzuweisen.

Das zweite hier aufgestellte alternative Modell der CML-Progression (Abb. 40) basiert auf dem Fund sekundärer Aberrationen in allen Fraktionen außer den T-Zellen in den Fällen CML11 und CML12 (3.2, Tabelle 4) sowie auf Daten aus der Literatur. Nguyen et al. wiesen bei sieben CML-Patienten mit nachgewiesener Trisomie 8 in allen von ihnen untersuchten Fraktionen diese Aberration nach, mit Ausnahme der Lymphozyten [198]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Anastasi et al. bei vier der acht von ihnen untersuchten CML-Patienten: Bei drei Patienten traten sekundäre Aberrationen (in einem Fall ein zusätzliches Ph-Chromosom, in zwei Fällen eine Trisomie 8) in nahezu allen untersuchten Blut-Fraktionen auf, mit Ausnahme der Lymphozyten. Ein weiterer Patient wies eine Trisomie 8 in allen Fraktionen mit Ausnahme von Lymphozyten und Blasten auf [229]. Anastasi et al. betrachten diese sekundären Mutationen als nicht zeitgleich mit der Progression oder in einem anderen Subklon als die Blasten auftretend und daher nicht als mit der Progression verknüpft, sondern auf genomischer Instabilität beruhend.

Die von Anastasi et al. als mit der Progression verknüpft betrachteten Aberrationen, u. a. Monosomie 7 und Hyperdiploidie, treten häufig in Fällen akuter lymphatischer Leukämie auf und können ihrer Meinung nach eine direkte Rolle bei der Progression der CML spielen. Die von ihnen in verschiedenen Fraktionen gefundenen Aberrationen (+Ph, +8) sind ihrer Ansicht nach nicht unmittelbar mit der Entwicklung

der Blastenkrise verknüpft. In solchen Fällen könnten andere molekulare Rearrangements eine direktere Rolle bei der Transition zur akuten Phase spielen [229]. In Anbetracht der Tatsache, daß gerade ein zusätzliches Ph-Chromosom sowie eine Trisomie 8 sehr häufig vor oder zeitgleich mit der Progression der CML auftreten (siehe 1.2), scheint diese Argumentation nicht ohne weiteres einleuchtend. Zudem stellt sich die Frage, warum, geht man vom Auftreten von auf genomischer Instabilität beruhenden sekundären Aberrationen bei der CML aus, nicht häufiger unterschiedliche Mutationen einer größeren Bandbreite nachgewiesen werden.

Ausgehend vom Fall CML15, in dem ein sekundäres Rearrangement in allen Fraktionen mit Ausnahme der Granulozyten gefunden wurde (3.2, Tabelle 4), wurde kein weiteres Modell der CML-Progression aufgestellt. In diesem Fall zeigte zwar die Granulozyten-Fraktion eine sehr hohe Reinheit, die der anderen drei Fraktionen, besonders der Monozyten, liegt jedoch zu niedrig.

Die Zellinienpezifität sekundärer Aberrationen bei der CML betreffend kann zusammenfassend gesagt werden, daß diese wahrscheinlich in unterschiedlichen Mustern in den verschiedenen Fraktionen auftreten. Dies läßt auf unterschiedliche Wege der CML-Progression in verschiedenen Fällen schließen (s. o.). Bei der Betrachtung der Lymphozyten ist zu beachten, daß diese möglicherweise aufgrund ihrer hohen Lebensdauer zum Zeitpunkt der Untersuchung die sekundäre Mutation noch nicht oder noch nicht in ausreichendem Maß erworben haben: Buckton et al. berichten von einer mittleren Lebensdauer zirkulierender Lymphozyten von 4,3 Jahren [235].

Eine weitere mögliche Erklärung ist, daß sekundäre Mutationen die Differenzierung der T-Zellen beeinträchtigen und somit in reifen T-Zellen kaum nachweisbar sind, analog zum Vorschlag von Takahashi et al. die BCR/ABL-Fusion betreffend [228]. Weiterhin sollte das Augenmerk darauf gerichtet werden, daß in den hier aufgestellten Modellen zwar von Lymphozyten allgemein die Rede ist, jedoch nur die T-Zellen untersucht wurden. Die hier aufgestellten Modelle erfordern der weiteren Prüfung in einer größeren Anzahl von Experimenten. Dabei wäre die zusätzliche Untersuchung der B-Lymphozyten sowie der lymphoiden Vorläufer sinnvoll.

4.4 Komplexe Translokationen

In 5 - 10 % aller Fälle ist das Philadelphia-Chromosom die Folge varianter Translokationen. Diese werden auf der Grundlage der Bänderungs-Analyse in einfache und komplexe variante Translokationen unterteilt, wobei an den einfachen neben dem Chromosom 22 nur ein weiteres Chromosom beteiligt ist, während bei den komplexen neben den Chromosomen 9 und 22 ein bis drei weitere Chromosomen involviert sind [25;26]. Genauere zytogenetische sowie molekulargenetische Untersuchungen weisen jedoch auf eine Beteiligung des Chromosoms 9 auch bei einfachen varianten Translokationen hin [25] (siehe auch 1.2.2).

Drei der hier untersuchten CML-Fälle, CML9, 10 und 15, zeigten komplexe Ph-Translokationen (siehe 3.3). Dies wurde mittels G-Banden-Analyse festgestellt und durch FISH bestätigt. Die Fälle CML9, eine Translokation 9;20;22, und CML10, eine Translokation 9;11;22, hätten in der G-Banden-Analyse als einfache variante Translokationen charakterisiert werden können, d. h. im Fall CML9 als t(20;22) und im Fall CML10 als t(11;22). Bei genauerem Hinsehen ist das jeweils an der Translokation beteiligte Chromosom 9-Derivat leicht verkürzt. Da feine Chromosomen-Aberrationen in der G-Bänderung nicht in jeder Metaphase gleich gut zu erkennen sind, ist in derartigen Fällen die zusätzliche FISH-Analyse von Bedeutung. FISH mit whole chromosome painting-Proben (WCPs) und im Fall CML10 auch einer Telomer-Probe machten für CML9 und CML10 eine eindeutige Interpretation möglich (siehe 3.3, Abb. 29 und 30). Die für CML15 in der G-Bänderung gefundene Translokation 5;9;22 ließ sich durch FISH mit WCP-Proben bestätigen (Abb. 31). In jedem der drei Fälle mit komplexer Translokation wurde, wie auch bei Yehuda et al. beschrieben, die Chromosom 22-“painting”-Probe auf dem dritten, an der Translokation beteiligten Chromosom nachgewiesen [236].

Um nähere Information über Art und Entstehung der nachgewiesenen komplexen Translokationen zu erhalten, wurde zusätzlich FISH mit Bruchpunkt-übergreifenden Proben für die BCR- und ABL-Gene durchgeführt, namentlich der BCR/ABL D-FISH (Dual-fusion-FISH)-Probe der Firma Oncor. Dieses Probengemisch führt im Falle einer klassischen Ph-Translokation sowohl auf Meta- als auch auf Interphase zu zwei Fusionssignalen, eines auf dem Ph-Chromosom sowie eines auf dem derivativen Chromosom 9 (3.3, Abb. 32). Bei Nutzung der D-FISH-Probe in der Diagnostik nähert

sich sowohl die Zahl falsch-positiver als auch falsch-negativer Zellen Null [86;87;237]. Von Bedeutung hier ist die Möglichkeit, mit Hilfe dieser Bruchpunkt-überspannenden Proben variante Ph-Translokationen nachzuweisen [86;87;237].

Die Hybridisierung mit der D-FISH-Probe ergab im Fall CML9, einer Translokation 9;20;22, nur ein Fusionssignal, auf dem Ph-Chromosom, sowie zwei einzelne BCR- und zwei einzelne ABL-Signale (siehe 3.3; Abb. 33). Dies läßt auf einen Ein-Schritt-Mechanismus der Entstehung der komplexen Translokation schließen. Das bedeutet den simultanen Bruch der Chromosomen-Regionen 9q34, 20q13 und 22q11, gefolgt von der falschen Verknüpfung der Enden. Dies geht konform mit der Vorstellung von Fitzgerald & Morris, derzufolge komplexe Translokationen das Resultat eines einzigen Ereignisses sind, das zum gleichzeitigen Bruch in drei oder mehr DNA-Strängen führt, die dicht beieinander liegen. Im Anschluß kommt es dann zu einer falschen Verknüpfung, als Funktion der Anzahl der Bruchstellen [238]. Die Routine-Zytogenetik des Falles CML9 untermauert den hier angenommenen Ein-Schritt-Mechanismus: Sowohl bei Erst-Diagnose als auch nach der Progression 1,5 Jahre später wurde die Translokation 9;20;22 nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Im Fall CML10, einer Translokation 9;11;22, führte die D-FISH-Probe zu zwei Fusionssignalen, auf dem Ph-Chromosom und dem Translokationschromosom 9;11;22, sowie zu zwei Einzelsignalen auf den normalen Chromosomen 9 und 22 (siehe 3.3; Abb. 34). Dies läßt für CML10 auf einen Zwei-Schritt-Mechanismus der Entstehung schließen: Der erste Schritt war die klassische Translokation 9;22, nach der das derivative Chromosom 9 ein Fusionssignal trägt. In einem zweiten Ereignis erfolgte die Translokation zwischen dem derivativen 9 und einem Chromosom 11, was zur Translokation des Fusionssignals auf das Derivat 11 sowie einem normal erscheinenden Derivat 9 (Translokation 9;11) führte. Die Ergebnisse der Routine-Zytogenetik lassen hier keinerlei Zweifel an einem Zwei-Schritt-Mechanismus zu: Während zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eine klassische Ph-Translokation 9;22 vorlag, wurde sechs Monate später zum Zeitpunkt der Progression eine Translokation 11;22 diagnostiziert (Daten nicht gezeigt). Diese stellte mit Sicherheit die hier beschriebene Translokation 9;11;22 dar, da in diesem Fall der G-Banden-Karyotyp durchaus als Translokation 11;22 interpretiert werden, das derivative Chromosom 9 war vom normalen kaum unterscheidbar (s. o.). Solche Zwei-Schritt-Mechanismen wurden in der Literatur wiederholt postuliert [28;31;32;236;239;240]. So ist auch denkbar, daß im Anschluß an

die Standard-Translokation eine Rücktranslokation zwischen dem derivativen 9 und dem Ph stattfinden könnte, in deren Folge zwei zytogenetisch normal aussehende Chromosomen 9 und 22 entstehen, wobei das BCR/ABL-Fusionsgen jedoch auf dem derivativen Chromosom 22 verbleibt [28;31]. Weiterhin ist im Anschluß an die Standard-Aberration eine Mehrwegs-Translokation zwischen dem derivativen 9, einem dritten Chromosom und dem Ph denkbar, so daß das derivative 22 wieder normal erscheint [239]. Ishihara & Minamihisamatsu postulieren für die Entstehung komplexer Ph-Translokationen generell einen Mehrschritt-Mechanismus mit einer initialen Standard-Translokation, gefolgt von einer oder mehreren weiteren Translokationen [240].

Laut Yehuda et al. sind sowohl Ein- als auch Mehr-Schritt-Modelle der Entstehung komplexer Translokationen denkbar, die möglicherweise unterschiedliche Implikationen haben [236].

Der dritte in dieser Arbeit beschriebene Fall mit komplexer Ph-Translokation, CML15, zeigt in der D-FISH-Analyse ein unerwartetes Muster: Lediglich ein Fusionsignal, auf dem Ph, sowie zwei Einzel-Signale auf den normalen Chromosomen 9 und 22 sind zu sehen (siehe 3.3; Abb. 35). Dies läßt die Deletion des ABL/BCR-Fusionsgens auf Chromosom 9 vermuten. Zusätzliche FISH-Analysen mit einer PAC-Sonde, die auf dem Chromosom 9 im ersten ABL-Intron nahe Exon 2 lokalisiert ist (3.3; Abb.36) sowie einer BAC-Sonde, die 200 kb telomerwärts des BCR-Gens auf Chromosom 22 liegt (3.3; Abb. 37) bestätigten das Auftreten von Deletionen Bruchpunkt-angrenzender Regionen auf dem derivativen Chromosom 9. Sinclair et al. fanden bei 16 von 56 CML-Patienten an den Bruchpunkt auf dem derivativen 9 angrenzende Deletionen einer Größe von bis zu mehreren Mb. Diese Deletionen traten bei Patienten mit komplexen Ph-Translokationen häufiger auf [241]. Das Auftreten von Bruchpunkt-angrenzenden Deletionen auf dem derivativen 9 trägt vermutlich dazu bei, daß in ca. einem Drittel aller CML-Fälle das ABL/BCR-Fusionsgen nicht exprimiert wird [242;243]. Bislang ist eine Funktion des ABL/BCR-Fusionsgens bei der malignen Transformation nicht bewiesen.

Loncarevic et al. betonen die Wichtigkeit der Auswertung von Metaphasen für die Hybridisierung mit der D-FISH-Probe, um Falsch-Interpretationen der durch Interphase-FISH erhaltenen Daten zu vermeiden [244]. Auf Interphase hätte nur einer der drei hier gezeigten komplexen Fälle, CML10, ein "normales"

Hybridisierungsmuster gezeigt, d. h. zwei Fusionssignale sowie zwei Einzelsignale. Das Auftreten nur eines Fusionssignals in den Fällen CML9 und CML15 hätte zu falsch-negativen Wertungen führen können. Die Anzahl der Signale bei CML9 deuten jedoch auf eine komplexe Translokation hin, eine entsprechend gute Qualität der Hybridisierung vorausgesetzt. In beiden Fällen sollte das häufige Auftreten eines Fusionssignals in der Interphase aufmerksam machen.

Die Nachweisbarkeit von an den Bruchpunkt auf dem derivativen 9 angrenzenden Deletionen durch die BCR/ABL D-FISH-Probe [241;244] wurde somit in dieser Arbeit bestätigt. Erstmals wurden anhand von FISH-Analysen mit der D-FISH-Probe Aussagen über die Entstehungsgeschichte komplexer Translokationen getroffen, namentlich über die mutmaßliche Entstehung in einem oder zwei Schritten.

Interessant ist nun die Frage einer möglichen prognostischen Relevanz dieser verschiedenen Mechanismen. Das Auftreten von Deletionen zusätzlich zur Philadelphia-Translokation ist mit einer verringerten mittleren Überlebenszeit der Patienten und damit einer schlechteren Prognose gekoppelt [241]. Die Ursache hierfür könnte sein, daß zusätzlich zur Aktivierung des c-ABL-Protoonkogens die Inaktivierung eines oder mehrerer Tumor-Suppressorgene erfolgt [241].

Die Frage, ob die Entstehung komplexer Translokationen in einem oder mehreren Schritten eine prognostische Relevanz hat, ist nicht so klar zu beantworten. Neueren Arbeiten zufolge haben Patienten mit komplexen Ph-Translokationen sowie Patienten mit Ph-negativer CML keine schlechtere Prognose als solche mit klassischen Ph-Translokationen [14;25;37;236]. Somit ist möglicherweise auch die Unterscheidung zwischen Ein- oder Mehr-Schritt-Mechanismus prognostisch nicht relevant. Bisher wurden jedoch keine größeren Fallzahlen komplexer Translokationen mit der hier beschriebenen Methode auf den Entstehungsmechanismus hin untersucht. Daher ist eine Assoziation des Entstehungsmechanismus mit Prognose oder klinischem Verlauf nicht von vornherein auszuschließen und bedarf weiterer Analyse. Zudem wäre es interessant, zu ermitteln, wie vom Interphase-Hybridisierungsmuster auf den Entstehungsmechanismus komplexer Translokationen geschlossen werden kann. Auch dazu sollte eine größere Anzahl von Fällen untersucht werden.

4.5 Ausblick

Ausgehend von den in dieser Arbeit erhobenen Daten sind verschiedene Weiterführungen oder Neuansätze der Projekte denkbar, die Untersuchung komplexer Translokationen, die Analyse der Zelllinien-Spezifität sekundärer Mutationen und möglicherweise auch die Untersuchung sekundärer Mutationen an sich betreffend.

Die Analyse komplexer Ph-Translokationen bei der CML mit Bruchpunkt-übergreifenden Proben für die BCR- und ABL-Gene führte zu drei möglichen Mechanismen der Entstehung komplexer Translokationen (siehe 4.4). Die Untersuchung einer großen Anzahl von CML-Patienten, möglicherweise parallel zur Routine-Diagnostik, würde Aufschluß geben über die Häufigkeit der verschiedenen Entstehungsmechanismen und eine mögliche prognostische Relevanz (hierzu siehe auch 4.4). Für komplexe Ph-Translokationen, die von Deletionen der an die Bruchpunkte auf Chromosom 9 angrenzenden Regionen begleitet sind, ist bereits eine prognostische Relevanz nachgewiesen [241]. Hier wäre es interessant herauszufinden, durch welche Mechanismen die schlechtere Prognose zustande kommt, welche angrenzenden Gene beteiligt sein könnten.

Anhand der Daten aus der Untersuchung der Zelllinienspezifität sekundärer Aberrationen wurden verschiedene Modelle der Tumorprogression bei der CML entwickelt (siehe 4.3.2). Diese Ansätze bedürfen der Verifizierung durch die Untersuchung einer höheren Anzahl von CML-Blastenkrisen. Da dank der modernen Therapie nur relativ wenige CML-Patienten in die Blastenkrise eintreten, wäre hier eine Multi-Center-Studie von Nutzen. Der hier gemachte Ansatz ließe sich weiterentwickeln: Die Methoden der Fraktionierung könnten variiert werden, so daß sich die Ergebnisse aus verschiedenen Methoden vergleichen ließen. Neben der CGH könnten weitere Analyse-Methoden verwendet werden, wie z. B. FISH auf Cytospin-Präparaten aus den verschiedenen Fraktionen. Auch die zusätzliche Untersuchung von B-Lymphozyten sowie lymphoider Vorläuferzellen wäre sinnvoll. Letzere würde Hinweise darauf geben, ob die mangelnde Nachweisbarkeit sekundärer Aberrationen in Lymphozyten möglicherweise Folge einer längeren Lebensdauer der Lymphozyten ist oder auf einem Selektionsnachteil von Lymphozyten-Vorläufern mit sekundären Aberrationen beruht. Weiterhin interessant wäre die Untersuchung, in welchen Fraktionen die BCR/ABL-Umlagerung auftritt und der Vergleich mit den Daten für sekundäre Aberrationen.

Natürlich geschähe dies nicht mit CGH, da diese den Nachweis balancierter Aberrationen nicht erlaubt, sondern mittels FISH.

Nicht zuletzt ist auch die weitere Suche nach Progressionsmarkern bei der CML sinnvoll, da Daten aus der Literatur durchaus beweisen, daß durch CGH prinzipiell neue sekundäre Aberrationen gefunden werden können, auch bei der CML [222;223].

5. Zusammenfassung

Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist eine maligne hämatopoetische Erkrankung, die von einer chronischen Phase zu einer akzelerierten Phase oder Blastenkrise fortschreitet. Zytogenetisch ist die Transformation zur chronischen Phase mit dem Auftreten des Philadelphia-Chromosoms (Ph) assoziiert.

Die (molekular-) zytogenetische Analyse der CML-Zelllinie K562 ergab einen hypotriploiden Karyotyp mit 67 Chromosomen und 21 verschiedenen Marker-Chromosomen. Zusammensetzung und Ursprung von Markern, die durch G-Banden-Analyse gefunden worden waren, wurden durch die kombinierte Anwendung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH), der Multiplex-FISH (M-FISH) und der Comparativen genomischen Hybridisierung (CGH) aufgedeckt.

Das Ph-Chromosom, das bei über 90 % der CML-Patienten nachgewiesen wird, entsteht durch die reziproke Translokation t(9;22)(q34;q11). Bei 5 – 10 % der Patienten resultiert das Ph-Chromosom aus varianten Translokation. Anhand der Untersuchung dreier varianter Translokation mittels Bruchpunkt-übergreifender FISH-Proben für die BCR- und ABL-Gene (bcr/abl D-FISH probe) werden drei verschiedene Mechanismen der Entstehung komplexer Translokationen dargestellt.

In ca. 80 % der Fälle treten vor oder gleichzeitig mit der Progression der CML typische zusätzliche Chromosomenaberrationen auf. Hier wurde das Auftreten sekundärer Aberrationen in 15 CML-Blastenkrisen untersucht. Zudem wurde anhand der CGH-Analyse von CD34-positiven Zellen, Monozyten, Granulozyten und T-Zellen die Zellinienspezifität sekundärer Aberrationen untersucht. Dabei wurden in einem Fall eine sekundäre Aberration in allen vier Fraktionen gefunden. In zwei weiteren Fällen traten sekundäre Aberrationen in allen untersuchten Fraktionen mit Ausnahme der T-Zellen auf. Aufgrund dieser Ergebnisse lassen sich zwei alternative Modelle der Tumor-Progression der CML ableiten: 1. Sekundäre Mutationen treten vor der Differenzierung der unreifen hämatopoetischen Stammzelle auf. 2. Sekundäre Mutationen treten in einer hämatopoetischen Vorläuferzelle nach der T-Zell-Differenzierung auf.

6. Literatur

1. Decker HJ, Schuler M: Grundlagen der internistischen Onkologie; in: Gerog W, Huber C, Meinertz Th, Zeidler H (eds): Die Innere Medizin. Stuttgart, New York, Schattauer Verlag 2000, pp 1223-1242.
2. Kozubek S, Lukasova E, Ryznar L, Kozubek M, Liskova A, Govorun RD, Krasavin EA, Horneck G: Distribution of ABL and BCR genes in cell nuclei of normal and irradiated lymphocytes. *Blood* 1997;89:4537-4545.
3. Lukasova E, Kozubek S, Kozubek M, Kjeronska J, Ryznar L, Horakova J, Krahulcova E, Horneck G: Localisation and distance between ABL and BCR genes in interphase nuclei of bone marrow cells of control donors and patients with chronic myeloid leukaemia. *Hum.Genet.* 1997;100:525-535.
4. Neves H, Ramos C, da Silva MG, Parreira A, Parreira L: The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RARalpha genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation [see comments]. *Blood* 1999;93:1197-1207.
5. Haber DA, Fearon ER: The promise of cancer genetics. *Lancet* 1998;351 Suppl 2:SII1-SII8.
6. Fearon ER, Vogelstein B: A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-767.
7. Kaboth W: Leukämien, Allgemeine Gesichtspunkte; in: Begemann H, Rastetter J (eds): Klinische Hämatologie. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag 2000, pp 477-488.
8. Rastetter J: Die chronische myeloproliferativen Erkrankungen (CMPE), Einleitung; in: Begemann H, Rastetter J (eds): Klinische Hämatologie. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag 1993, pp 543-544.
9. Hochhaus A, Hehlmann R: Chronische myeloproliferative Erkrankungen; in: Ostendorf PC, Seeber S (eds): Hämatologie Onkologie. München, Wien, Baltimore, Urban & Schwarzenberg 1997, pp 256-283.
10. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM: The biology of chronic myeloid leukemia. *N.Engl.J.Med.* 1999;341:164-172.
11. Pasternak G, Hochhaus A, Schultheis B, Hehlmann R: Chronic myelogenous leukemia: molecular and cellular aspects. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 1998;124:643-660.
12. Gale RP, Canaani E: An 8-kilobase abl RNA transcript in chronic myelogenous leukemia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1984;81:5648-5652.
13. Seliger B, Huber C: [Molecular biology in hematology/oncology]. *Internist (Berl)* 1994;35:130-138.
14. Kantarjian HM, Deisseroth A, Kurzrock R, Estrov Z, Talpaz M: Chronic myelogenous leukemia: a concise update. *Blood* 1993;82:691-703.
15. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian HM: Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. *Ann.Intern.Med.* 1999;131:207-219.
16. Nowell P, Hungerford DA: A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960;132:1497-1499.

17. Rowley JD: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973;243:290-293.
18. Bartram CR, de-Klein A, Hagemeijer A, van-Agthoven T, Geurts-van KA, Bootsma D, Grosveld G, Ferguson SM, Davies T, Stone M, et al: Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 1983;306:277-280.
19. de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeijer A, Bootsma D, Spurr NK, Heisterkamp A, Groffen J, Stephenson JR: A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 1982;300:765-767.
20. Heisterkamp N, Stephenson JR, Groffen J, Hansen PF, de-Klein A, Bartram CR, Grosveld G: Localization of the c-ab1 oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 1983;306:239-242.
21. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de-Klein A, Bartram CR, Grosveld G: Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 1984;36:93-99.
22. Martinazzo G, Bichi S, Marcolini S, Pelliccia A, Turchetti E: A Novel Nucleic Acid Detection System (C-Trak) for Detecting the t(14;18) and t(9;22) Chromosomal Translocation Associated to Haematological Malignancies; in: Borden EC, Goldman JM, Grignani F (eds): *Challenge of Modern Medicine, Volume 2: Molecular Diagnosis and Monitoring of Leukaemia and Lymphoma*. Ares-Seronoso Symposia Publications 1994, pp 221-239.
23. Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M: Chronic myelogenous leukemia: update on biology and treatment. *Oncology (Huntingt)* 1999;13:169-180.
24. Dhingra K, Talpaz M, Riggs MG, Eastman PS, Zipf T, Ku S, Kurzrock R: Hybridization protection assay: a rapid, sensitive, and specific method for detection of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *Blood* 1991;77:238-242.
25. Heim S, Mitelman F: *Cancer Cytogenetic*, ed Second Edition. New York; Chichester; Brisbane; Toronto; Singapore, Wiley-Liss, Inc., 1995.
26. Melo JV: The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 1996;10:751-756.
27. O'Brien S, Thall PF, Siciliano MJ: Cytogenetics of chronic myelogenous leukaemia. *Baillieres Clin.Haematol.* 1997;10:259-276.
28. Morris CM, Heisterkamp N, Kennedy MA, Fitzgerald PH, Groffen J: Ph-negative chronic myeloid leukemia: molecular analysis of ABL insertion into M-BCR on chromosome 22. *Blood* 1990;76:1812-1818.
29. Hochhaus A, Reiter A, Skladny H, Melo JV, Sick C, Berger U, Guo JQ, Arlinghaus RB, Hehlmann R, Goldman JM, Cross NC: A novel BCR-ABL fusion gene (e6a2) in a patient with Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1996;88:2236-2240.
30. van der Plas DC, Hermans AB, Soekarman D, Smit EM, de Klein A, Smadja N, Alimena G, Goudsmit R, Grosveld G, Hagemeijer A: Cytogenetic and molecular analysis in Philadelphia negative CML. *Blood* 1989;73:1038-1044.
31. Inazawa J, Nishigaki H, Takahira H, Nishimura J, Horiike S, Taniwaki M, Misawa S, Abe T: Rejoining between 9q+ and Philadelphia chromosomes results in normal- looking

- chromosomes 9 and 22 in Ph1-negative chronic myelocytic leukemia. *Hum.Genet.* 1989;83:115-118.
32. Morris C, Kennedy M, Heisterkamp N, Columbano-Green L, Romeril K, Groffen J, Fitzgerald P: A complex chromosome rearrangement forms the BCR-ABL fusion gene in leukemic cells with a normal karyotype. *Genes Chromosomes.Cancer* 1991;3:263-271.
 33. Macera MJ, Smith LJ, Frankel E, Szabo P, Verma RS: A Philadelphia negative chronic myelogenous leukemia with the chimeric BCR/ABL gene on chromosome 9 and a b3-a2 splice junction. *Cancer Genet.Cytogenet.* 1998;101:143-147.
 34. Reddy KS, Grove B: A Philadelphia-negative chronic myeloid leukemia with a BCR/ABL fusion gene on chromosome 9. *Cancer Genet.Cytogenet.* 1998;107:48-50.
 35. Morris CM, Reeve AE, Fitzgerald PH, Hollings PE, Beard ME, Heaton DC: Genomic diversity correlates with clinical variation in Ph⁻-negative chronic myeloid leukaemia. *Nature* 1986;320:281-283.
 36. Fitzgerald PH, Beard ME, Morris CM, Heaton DC, Reeve AE: Ph-negative chronic myeloid leukaemia. *Br.J.Haematol.* 1987;66:311-314.
 37. Martiat P, Michaux JL, Rodhain J: Philadelphia-negative (Ph⁻) chronic myeloid leukemia (CML): comparison with Ph⁺ CML and chronic myelomonocytic leukemia. *The Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique.* *Blood* 1991;78:205-211.
 38. van der Plas DC, Grosveld G, Hagemeijer A: Review of clinical, cytogenetic, and molecular aspects of Ph-negative CML. *Cancer Genet.Cytogenet.* 1991;52:143-156.
 39. Mertens F, Johansson B, Heim S, Kristoffersson U, Mandahl N, Turesson I, Malm C, Othzen A, Bartram CR, Catovsky D: Trisomy 14 in atypical chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 1990;4:117-120.
 40. Mancini M, Cedrone M, Nanni M, Rondinelli MB, Petti MC, De Cuia MR, Alimena G: Trisomy 14 in hematologic diseases. Another non-random abnormality within myeloid proliferative disorders. *Cancer Genet.Cytogenet.* 1993;66:39-42.
 41. Mitelman F: The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia. *Leuk.Lymphoma* 1993;11 Suppl 1:11-15.
 42. Morris CM, Heisterkamp N, Groffen J, Fitzgerald PH: Entire ABL gene is joined with 5'-BCR in some patients with Philadelphia-positive leukemia. *Blood* 1991;78:1078-1084.
 43. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E: Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 1985;315:550-554.
 44. 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* 1986;47:277-284.
 45. Kawasaki ES, Clark SS, Coyne MY, Smith SD, Champlin R, Witte ON, McCormick FP: Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1988;85:5698-5702.
 46. Ben Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson AM, Witte ON, Baltimore D: The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science* 1986;233:212-214.

47. Shtivelman E, Gale RP, Drezzen O, Berrebi A, Zaizov R, Kubonishi I, Miyoshi I, Canaani E: bcr-abl RNA in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1987;69:971-973.
48. Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Iwabuchi H, Tauchi T, Iwabuchi A, Toyama K: Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia with deleted fusion of BCR and ABL genes. *Jpn.J.Cancer Res.* 1990;81:35-42.
49. Lugo TG, Witte ON: The BCR-ABL oncogene transforms Rat-1 cells and cooperates with v-myc. *Mol.Cell Biol.* 1989;9:1263-1270.
50. McLaughlin J, Chianese E, Witte ON: In vitro transformation of immature hematopoietic cells by the P210 BCR/ABL oncogene product of the Philadelphia chromosome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1987;84:6558-6562.
51. McLaughlin J, Chianese E, Witte ON: Alternative forms of the BCR-ABL oncogene have quantitatively different potencies for stimulation of immature lymphoid cells. *Mol.Cell Biol.* 1989;9:1866-1874.
52. Young JC, Witte ON: Selective transformation of primitive lymphoid cells by the BCR/ABL oncogene expressed in long-term lymphoid or myeloid cultures. *Mol.Cell Biol.* 1988;8:4079-4087.
53. Daley GQ, Van-Etten RA, Baltimore D: Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 1990;247:824-830.
54. Elefanty AG, Hariharan IK, Cory S: bcr-abl, the hallmark of chronic myeloid leukaemia in man, induces multiple haemopoietic neoplasms in mice. *EMBO J.* 1990;9:1069-1078.
55. Pear WS, Miller JP, Xu L, Pui JC, Soffer B, Quackenbush RC, Pendergast AM, Bronson R, Aster JC, Scott ML, Baltimore D: Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood* 1998;92:3780-3792.
56. Zhang X, Ren R: Bcr-Abl efficiently induces a myeloproliferative disease and production of excess interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mice: a novel model for chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1998;92:3829-3840.
57. Hariharan IK, Harris AW, Crawford M, Abud H, Webb E, Cory S, Adams JM: A bcr-v-abl oncogene induces lymphomas in transgenic mice. *Mol.Cell Biol.* 1989;9:2798-2805.
58. Heisterkamp N, Jenster G, ten Hoeve J, Zovich D, Pattengale PK, Groffen J: Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. *Nature* 1990;344:251-253.
59. Maxwell SA, Kurzrock R, Parsons SJ, Talpaz M, Gallick GE, Kloetzer WS, Arlinghaus RB, Kouttab NM, Keating MJ, Gutterman JU: Analysis of P210bcr-abl tyrosine protein kinase activity in various subtypes of Philadelphia chromosome-positive cells from chronic myelogenous leukemia patients. *Cancer Res.* 1987;47:1731-1739.
60. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON: Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 1990;247:1079-1082.
61. Morgan GJ, Hernandez A, Chan LC, Hughes T, Martiat P, Wiedemann LM: The role of alternative splicing patterns of BCR/ABL transcripts in the generation of the blast crisis of chronic myeloid leukaemia. *Br.J.Haematol.* 1990;76:33-38.
62. Warmuth M, Danhauser-Riedl S, Hallek M: Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukemia: implications for new therapeutic strategies. *Ann.Hematol.* 1999;78:49-64.

63. Bedi A, Zehnbauser BA, Barber JP, Sharkis SJ, Jones RJ: Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1994;83:2038-2044.
64. Laneuville P, Timm M, Hudson AT: bcr/abl expression in 32D cl3(G) cells inhibits apoptosis induced by protein tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res.* 1994;54:1360-1366.
65. Maguer-Satta V: CML and apoptosis: the ceramide pathway. *Hematol.Cell Ther.* 1998;40:233-236.
66. Daley GQ, Baltimore D: Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1988;85:9312-9316.
67. Mandanas RA, Boswell HS, Lu L, Leibowitz D: BCR/ABL confers growth factor independence upon a murine myeloid cell line. *Leukemia* 1992;6:796-800.
68. Kabarowski JH, Allen PB, Wiedemann LM: A temperature sensitive p210 BCR-ABL mutant defines the primary consequences of BCR-ABL tyrosine kinase expression in growth factor dependent cells. *EMBO J.* 1994;13:5887-5895.
69. Andreeff M: Cell kinetics of leukemia. *Semin.Hematol.* 1986;23:300-314.
70. Gishizky ML, Witte ON: Initiation of deregulated growth of multipotent progenitor cells by bcr- abl in vitro. *Science* 1992;256:836-839.
71. Clarkson B, Strife A: Linkage of proliferative and maturational abnormalities in chronic myelogenous leukemia and relevance to treatment. *Leukemia* 1993;7:1683-1721.
72. Rowley PT, Keng PC, Kosciolk BA: The effect of bcr-abl antisense oligonucleotide on DNA synthesis and apoptosis in K562 chronic myeloid leukemia cells. *Leuk.Res.* 1996;20:473-480.
73. Gaiger A, Henn T, Horth E, Geissler K, Mitterbauer G, Maier Dobersberger T, Greinix H, Mannhalter C, Haas OA, Lechner K, et al: Increase of bcr-abl chimeric mRNA expression in tumor cells of patients with chronic myeloid leukemia precedes disease progression. *Blood* 1995;86:2371-2378.
74. Stuppia L, Calabrese G, Peila R, Guanciali-Franchi P, Morizio E, Spadano A, Palka G: p53 loss and point mutations are associated with suppression of apoptosis and progression of CML into myeloid blastic crisis. *Cancer Genet.Cytogenet.* 1997;98:28-35.
75. Skorski T, Nieborowska-Skorska M, Wlodarski P, Perrotti D, Martinez R, Wasik MA, Calabretta B: Blastic transformation of p53-deficient bone marrow cells by p210bcr/abl tyrosine kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996;93:13137-13142.
76. Sill H, Goldman JM, Cross NC: Homozygous deletions of the p16 tumor-suppressor gene are associated with lymphoid transformation of chronic myeloid leukemia. *Blood* 1995;85:2013-2016.
77. Arnoldus EP, Wiegant J, Noordermeer IA, Wessels JW, Beverstock GC, Grosveld GC, van der PM, Raap AK: Detection of the Philadelphia chromosome in interphase nuclei. *Cytogenet.Cell Genet.* 1990;54:108-111.
78. Tkachuk DC, Westbrook CA, Andreeff M, Donlon TA, Cleary ML, Suryanarayan K, Homge M, Redner A, Gray J, Pinkel D: Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogenous leukemia by in situ hybridization. *.Science* 1990;250:559-562.

79. Dewald GW, Schad CR, Christensen ER, Tiede AL, Zinsmeister AR, Spurbeck JL, Thibodeau SN, Jalal SM: The Application of Fluorescent In Situ Hybridization to Detect Mbc/abl Fusion in Variant Ph Chromosomes in CML and ALL. *Cancer Genet Cytogenet* 1993;71:7-14.
80. Cuneo A, Bigoni R, Emmanuel B, Smit E, Rigolin GM, Roberti MG, Bardi A, Piva N, Scapoli G, Castoldi G, Van den BH, Hagemeyer A: Fluorescence in situ hybridization for the detection and monitoring of the Ph-positive clone in chronic myelogenous leukemia: comparison with metaphase banding analysis. *Leukemia* 1998;12:1718-1723.
81. Kobzev Y, Domracheva E, Zakharova A, Khoroshko N, Turkina A, Dewald G: Fluorescence in situ hybridization studies of interphase nuclei for assessing response to therapy in patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet.Cytogenet.* 1998;106:128-134.
82. Yanagi M, Shinjo K, Takeshita A, Tobita T, Yano K, Kobayashi M, Terasaki H, Naoe T, OHNISHI K, OHNO R: Simple and reliably sensitive diagnosis and monitoring of Philadelphia chromosome-positive cells in chronic myeloid leukemia by interphase fluorescence in situ hybridization of peripheral blood cells. *Leukemia* 1999;13:542-552.
83. Lengauer C, Riethman HC, Speicher MR, Taniwaki M, Konecki D, Green ED, Becher R, Olson MV, Cremer T: Metaphase and interphase cytogenetics with Alu-PCR-amplified yeast artificial chromosome clones containing the BCR gene and the protooncogenes c-raf-1, c-fms, and c-erbB-2. *Cancer Res.* 1992;52:2590-2596.
84. Bentz M, Cabot G, Moos M, Speicher M, Ganser A, Lichter P, Döhner H, Speicher MR, Döhner H: Detection of Chimeric BCR-ABL Genes on Bone Marrow Samples and Blood Smears in Chronic Myeloid and Acute Lymphoblastic Leukemia by In Situ Hybridization Detection of chimeric BCR-ABL genes on bone marrow samples and blood smears in chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemia by in situ hybridization. *Blood* 1994;83:1922-1928.
85. Soto-Quintana, M., Rojas-Atencio, A., Alvarez-Nava, F., and Gonzalez, R. Detection of BCR-ABL Fusion by Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) in Patients With Philadelphia-Negative Chronic Myelogenous Leukemia. *The Journal of the Association of Genetic Technologists* 25(3), 61-64. 1999.
86. Buno I, Wyatt WA, Zinsmeister AR, Dietz-Band J, Silver RT, Dewald GW: A special fluorescent in situ hybridization technique to study peripheral blood and assess the effectiveness of interferon therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1998;92:2315-2321.
87. Dewald GW, Wyatt WA, Juneau AL, Carlson RO, Zinsmeister AR, Jalal SM, Spurbeck JL, Silver RT: Highly sensitive fluorescence in situ hybridization method to detect double BCR/ABL fusion and monitor response to therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1998;91:3357-3365.
88. Grand FH, Chase A, Iqbal S, Nguyen DX, Lewis JL, Marley SB, Davidson RJ, Goldman JM, Gordon MY: A two-color BCR-ABL probe that greatly reduces the false positive and false negative rates for fluorescence in situ hybridization in chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes.Cancer* 1998;23:109-115.
89. Seong DC, Kantarjian HM, Ro JY, Talpaz M, Xu J, Robinson JR, Deisseroth AB, Champlin RE, Siciliano MJ: Hypermetaphase fluorescence in situ hybridization for quantitative monitoring of Philadelphia chromosome-positive cells in patients with chronic myelogenous leukemia during treatment. *Blood* 1995;86:2343-2349.
90. Seong D, Giralto S, Fischer H, Hayes K, Glassman A, Arlinghaus R, Xu J, Kantarjian H, Siciliano M, Champlin R: Usefulness of detection of minimal residual disease by

- 'hypermetaphase' fluorescent in situ hybridization after allogeneic BMT for chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1997;19:565-570.
91. Seong D, Thall P, Kantarjian HM, Talpaz M, Swankowski J, Xu J, Shen Y, Glassman N A, Ramagli L, Siciliano MJ: Philadelphia chromosome-positive myeloid cells in the peripheral blood of chronic myelogenous leukemia patients: comparison with the frequency detected in cycling cells of the bone marrow. *Clin.Cancer Res.* 1998;4:861-867.
 92. Knippers R: *Molekulare Genetik*, ed 7. Auflage. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag, 1997.
 93. Shtalrid M, Talpaz M, Kurzrock R, Kantarjian H, Trujillo J, Gutterman J, Yoffe G, Blick M: Analysis of breakpoints within the bcr gene and their correlation with the clinical course of Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1988;72:485-490.
 94. Litz CE, McClure JS, Copenhaver CM, Brunning RD: Duplication of small segments within the major breakpoint cluster region in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1993;81:1567-1572.
 95. Yasukawa M, Ohminami H, Sada E, Yakushijin Y, Kaneko M, Yanagisawa K, Kohno H, Bando S, Fujita S: Latent infection and reactivation of human herpesvirus 6 in two novel myeloid cell lines. *Blood* 1999;93:991-999.
 96. Dobrovic A, Trainor KJ, Morley AA: Detection of the molecular abnormality in chronic myeloid leukemia by use of the polymerase chain reaction. *Blood* 1988;72:2063-2065.
 97. Roth MS, Antin JH, Bingham EL, Ginsburg D: Detection of Philadelphia chromosome-positive cells by the polymerase chain reaction following bone marrow transplant for chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1989;74:882-885.
 98. Nakamura K, Miyashita T, Ozaki M, Iwaya M, Nakazawa S, Okamura J, Kamada N, Tanaka K, Kobayashi N, Mizutani S: Molecular studies of chronic myelogenous leukemia using the polymerase chain reaction. *Cancer* 1991;68:2426-2430.
 99. Corsetti MT, Lerma E, Dejana A, Basta P, Ferrara R, Benvenuto F, Vassallo F, Abate M, Piaggio G, Parodi C, Sessarego M, Li PG, Manca F, Carella AM: Quantitative competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction for BCR-ABL on Philadelphia-negative leukaphereses allows the selection of low-contaminated peripheral blood progenitor cells for autografting in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 1999;13:999-1008.
 100. Preudhomme C, Chams-Eddine L, Roumier C, Duflos-Grardel N, Denis C, Cosson A, Fenaux P: Detection of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia (CML) using an in situ RT-PCR assay. *Leukemia* 1999;13:818-823.
 101. Preudhomme C, Revillion F, Merlat A, Hornez L, Roumier C, Duflos-Grardel N, Jouet JP, Cosson A, Peyrat JP, Fenaux P: Detection of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia (CML) using a 'real time' quantitative RT-PCR assay. *Leukemia* 1999;13:957-964.
 102. Lozzio CB, Lozzio BB: Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 1975;45:321-334.
 103. Lozzio BB, Lozzio CB, Bamberger EG, Feliu AS: A multipotential leukemia cell line (K-562) of human origin. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 1981;166:546-550.
 104. Collins SJ, Groudine MT: Rearrangement and amplification of c-abl sequences in the human chronic myelogenous leukemia cell line K-562. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1983;80:4813-4817.

105. Dimery IW, Ross DD, Testa JR, Gupta SK, Felsted RL, Pollak A, Bachur NR: Variation amongst K562 cell cultures. *Exp.Hematol.* 1983;11:601-610.
106. Ajmar F, Garre C, Sessarego M, Ravazzolo R, Barresi R, Scarra GB, Lituania M: Expression of erythroid acetylcholinesterase in the K-562 leukemia cell line. *Cancer Res.* 1983;43:5560-5563.
107. Selden JR, Emanuel BS, Wang E, Cannizzaro L, Palumbo A, Erikson J, Nowell PC, Rovera G, Croce CM: Amplified C lambda and c abl genes are on the same marker chromosome in K562 leukemia cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1983;80:7289-7292.
108. Chen TR: Modal karyotype of human leukemia cell line, K562 (ATCC CCL 243). *Cancer Genet.Cytogenet.* 1985;17:55-60.
109. Wu SQ, Voelkerding KV, Sabatini L, Chen XR, Huang J, Meisner LF: Extensive amplification of bcr/abl fusion genes clustered on three marker chromosomes in human leukemic cell line K-562. *Leukemia* 1995;9:858-862.
110. 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* 1997;19:36-42.
111. Gribble SM, Roberts I, Grace C, Andrews KM, Green AR, Nacheva EP: Cytogenetics of the chronic myeloid leukemia-derived cell line K562: karyotype clarification by multicolor fluorescence in situ hybridization, comparative genomic hybridization, and locus-specific fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet.Cytogenet.* 2000;118:1-8.
112. Tijo JH, Levon A: The chromosomes of man. *Hereditas* 1956;42:1-6.
113. Schuffenhauer S, Murken J: Moderne chromosomale Untersuchungstechniken. *der Kinderarzt* 1997;28:887-904.
114. Seabright M: A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 1971;ii:971-972.
115. Pardue ML, Gall JG: Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1969;64:600-604.
116. John HA, Birnstiel ML, Jones KW: RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 1969;223:582-587.
117. Pardue ML, Gall JG: Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* 1970;168:1356-1358.
118. Langer PR, Waldrop AA, Ward DC: Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *.Proc Natl.Acad Sci.U.S.A* 1981;78:6633-6637.
119. Manuelidis L, Langer-Safer PR, Ward DC: High-resolution mapping of satellite DNA using biotin-labeled DNA probes. *J.Cell Biol.* 1982;95:619-625.
120. Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC: Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 1988;80:224-234.
121. Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC, Manuelidis L: Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. *Hum Genet* 1988;80:235-246.

122. Dauwerse JG, Wiegant J, Raap AK, Breuning MH, van Ommen GJ: Multiple colors by fluorescence in situ hybridization using ratio-labelled DNA probes create a molecular karyotype. *Hum.Mol.Genet.* 1992;1:593-598.
123. Ried T, Baldini A, Rand TC, Ward DC: Simultaneous visualization of seven different DNA probes by in situ hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992;89:1388-1392.
124. Speicher MR, Gwyn BS, Ward DC: Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat.Genet.* 1996.
125. Speicher MR, Ballard SG, Ward DC: Computer image analysis of combinatorial multi-fluor FISH. *Bioimaging* 1996;4:52-64.
126. Schrock E, du MS, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T: Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes [see comments]. *Science* 1996;273:494-497.
127. Muller S, O'Brien PC, Ferguson-Smith MA, Wienberg J: Cross-species colour segmenting: a novel tool in human karyotype analysis. *Cytometry* 1998;33:445-452.
128. Koo SH, Kwon KC, Park JW, Lee YE, Kim JW: Characterization of chromosomal breakpoints in an ALL patient using cross-species color banding. *Cancer Genet.Cytogenet.* 2000;119:118-120.
129. Lichter P, Chang Tang G-J, Call K, Hermanson G, Evans GA, Housman D, Ward DC: High-Resolution Mapping of Human Chromosome 11 by in Situ Hybridization with Cosmid Clones. *Science* 1990;247:64-69.
130. Lengauer C, Speicher MR, Popp S, Jauch A, Taniwaki M, Nagaraja R, Riethman HC, Donis-Keller H, D'Urso M, Schlessinger D, Cremer T: Chromosomal bar codes produced by multicolor fluorescence in situ hybridization with multiple YAC clones and whole chromosome painting probes. *Hum Mol Genet* 1993;2:505-512.
131. Muller S, Rocchi M, Ferguson-Smith MA, Wienberg J: Toward a multicolor chromosome bar code for the entire human karyotype by fluorescence in situ hybridization. *Hum.Genet.* 1997;100:271-278.
132. Lichter P: Multicolor FISHing: what's the catch? *Trends Genet.* 1997;13:475-479.
133. 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* 1992;258:818-821.
134. Kessler C, Holtke HJ, Seibl R, Burg J, Muhlegger K: Non-radioactive labeling and detection of nucleic acids. I. A novel DNA labeling and detection system based on digoxigenin: anti-digoxigenin ELISA principle (digoxigenin system). *Biol.Chem.Hoppe Seyler* 1990;371:917-927.
135. Gray JW, Kallioniemi A, Kallioniemi O, Pallavicini M, Waldman F, Pinkel D: Molecular cytogenetics: diagnosis and prognostic assessment. *Curr Opin.Biotechnol.* 1992;3:623-631.
136. Hyytinen E, Visakorpi T, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Isola JJ: Improved technique for analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tumors by fluorescence in situ hybridization. *Cytometry* 1994;16:93-99.

137. Dierlamm J, Wlodarska I, Michaux L, La Starza R, Zeller W, Mecucci C, Van den BH: Successful use of the same slide for consecutive fluorescence in situ hybridization experiments. *Genes Chromosomes.Cancer* 1996;16:261-264.
138. Muller S, Stanyon R, O'Brien PC, Ferguson-Smith MA, Plesker R, Wienberg J: Defining the ancestral karyotype of all primates by multidirectional chromosome painting between tree shrews, lemurs and humans. *Chromosoma* 1999;108:393-400.
139. Cremer T, Landegent J, Brückner A, Scholl HP, Schardin M, Hager HD, Devilee P, Pearson P, van der Ploeg M: Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. *Hum Genet* 1986;74:346-352.
140. Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1986;83:2934-2938.
141. Hogan WJ, Tefferi A, Borell TJ, Jenkins R, Li CY, Witzig TE: Prognostic relevance of monosomy at the 13q14 locus detected by fluorescence in situ hybridization in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet.Cytogenet.* 1999;110:77-81.
142. Rowley JD, Diaz MO, Espinosa R, III, Patel YD, Van Melle E, Ziemin S, Taillon-Miller P, Lichter P, Evans GA, Kersey JH: Mapping chromosome band 11q23 in human acute leukemia with biotinylated probes: identification of 11q23 translocation breakpoints with a yeast artificial chromosome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1990;87:9358-9362.
143. 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. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991;88:4882-4886.
144. Selleri L, Hermanson GG, Eubanks JH, Lewis KA, Evans GA: Molecular localization of the t(11;22)(q24;q12) translocation of Ewing sarcoma by chromosomal in situ suppression hybridization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991;88:887-891.
145. van Dekken H, Pinkel D, Mullikin J, Trask B, van den EG, Gray J: Three-dimensional analysis of the organization of human chromosome domains in human and human-hamster hybrid interphase nuclei. *J.Cell Sci.* 1989;94 (Pt 2):299-306.
146. Popp S, Scholl HP, Loos P, Jauch A, Stelzer E, Cremer C, Cremer T: Distribution of chromosome 18 and X centric heterochromatin in the interphase nucleus of cultured human cells. *Exp.Cell Res.* 1990;189:1-12.
147. Cremer T, Kurz A, Zirbel R, Dietzel S, Rinke B, Schrock E, Speicher MR, Mathieu U, Jauch A, Emmerich P, et al, et al: Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 1993;58:777-792.
148. Eils R, Dietzel S, Bertin E, Schrock E, Speicher MR, Ried T, Robert-Nicoud M, Cremer C, Cremer T: Three-dimensional reconstruction of painted human interphase chromosomes: active and inactive X chromosome territories have similar volumes but differ in shape and surface structure. *J.Cell Biol.* 1996;135:1427-1440.
149. Julien C, Bazin A, Guyot B, Forestier F, Daffos F: Rapid prenatal diagnosis of Down's syndrome with in-situ hybridisation of fluorescent DNA probes [letter]. *Lancet* 1986;2:863-864.

150. Lichter P, Cremer T, Tang CJ, Watkins PC, Manuelidis L, Ward DC: Rapid detection of human chromosome 21 aberrations by in situ hybridization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1988;85:9664-9668.
151. Jauch A, Daumer C, Lichter P, Murken J, Schroeder Kurth T, Cremer T: Chromosomal in situ suppression hybridization of human gonosomes and autosomes and its use in clinical cytogenetics. *Hum Genet* 1990;85:145-150.
152. Kuo WL, Tenjin H, Segraves R, Pinkel D, Golbus MS, Gray J: Detection of aneuploidy involving chromosomes 13, 18, or 21, by fluorescence in situ hybridization (FISH) to interphase and metaphase amniocytes. *Am.J.Hum.Genet.* 1991;49:112-119.
153. Chang SS, Mark HF: Emerging molecular cytogenetic technologies. *Cytobios* 1997;90:7-22.
154. Chen Z, Morgan R, Berger C, Sandberg AA: Application of Fluorescence In Situ Hybridization in Hematological Disorders. *Cancer Genet Cytogenet* 1992;63:62-69.
155. Hogge DE: Cytogenetics and oncogenes in leukemia. *Curr.Opin.Oncol.* 1994;6:3-13.
156. Muhlmann J, THALER J, Hilbe W, Bechter O, ERDEL M, Utermann G, Duba HC: Fluorescence in situ hybridization (FISH) on peripheral blood smears for monitoring Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia (CML) during interferon treatment: a new strategy for remission assessment. *Genes Chromosomes.Cancer* 1998;21:90-100.
157. Raap T: Cytometry for CGH [editorial]. *Cytometry* 1995;19:1-3.
158. Speicher MR, du Manoir S, Schrock 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. *Hum Mol Genet* 1993;2:1907-1914.
159. Speicher MR, Jauch A, Walt H, du Manoir S, Ried T, Jochum W, Sulser T, Cremer T: Correlation of microscopic phenotype with genotype in a formalin- fixed, paraffin-embedded testicular germ cell tumor with universal DNA amplification, comparative genomic hybridization, and interphase cytogenetics. *Am.J.Pathol* 1995;146:1332-1340.
160. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D: Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;10:231-243.
161. Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J, Gray J: Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocation of chromosome 4. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1988;85:9138-9142.
162. Traut W: *Klassische und molekulare Cytogenetik*. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, Springer-Verlag, 1991.
163. Lundsteen C, Maahr J, Christensen B, Bryndorf T, Bentz M, Lichter P, Gerdes T: Image analysis in comparative genomic hybridization. *Cytometry* 1995;19:42-50.
164. Cher ML, MacGrogan D, Bookstein R, Brown JA, Jenkins RB, Jensen RH: Comparative genomic hybridization, allelic imbalance, and fluorescence in situ hybridization on chromosome 8 in prostate cancer. *.Genes Chromosomes Cancer* 1994;11:153-162.
165. Cher ML, BOVA GS, Moore DH, Small EJ, Carroll PR, Pin SS, Epstein JI, Isaacs WB, Jensen RH: Genetic alterations in untreated metastases and androgen- independent

- prostate cancer detected by comparative genomic hybridization and allelotyping. *Cancer Res.* 1996;56:3091-3102.
166. Visakorpi T, Kallioniemi AH, Syvanen AC, Hyytinen ER, Karhu R, Tammela T, Isola JJ, Kallioniemi OP: Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* 1995;55:342-347.
 167. Schrock E, Thiel G, Lozanova T, du MS, Meffert MC, Jauch A, Speicher MR, Nurnberg P, Vogel S, Janisch W: Comparative genomic hybridization of human malignant gliomas reveals multiple amplification sites and nonrandom chromosomal gains and losses. *Am.J.Pathol.* 1994;144:1203-1218.
 168. Weber RG, Sommer C, Albert FK, Kiessling M, Cremer T: Clinically distinct subgroups of glioblastoma multiforme studied by comparative genomic hybridization. *Lab Invest* 1996;74:108-119.
 169. Weber RG, Sabel M, Reifenberger J, Sommer C, Oberstrass J, Reifenberger G, Kiessling M, Cremer T: Characterization of genomic alterations associated with glioma progression by comparative genomic hybridization. *Oncogene* 1996;13:983-994.
 170. Harada K, Nishizaki T, Ozaki S, Kubota H, Ito H, Sasaki K: Intratumoral cytogenetic heterogeneity detected by comparative genomic hybridization and laser scanning cytometry in human gliomas. *Cancer Res.* 1998;58:4694-4700.
 171. Speicher MR, Schoell B, du Manoir S, Schrock E, Ried T, Cremer T, Storkel S, Kovacs A, Kovacs G: Specific loss of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17, and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization Specific loss of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17, and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization. *Am.J.Pathol* 1994;145:356-364.
 172. Decker HJ, Neuhaus C, Jauch A, Speicher M, Ried T, Bujard M, Brauch H, Storkel S, Stockle M, Seliger B, Huber C: Detection of a germline mutation and somatic homozygous loss of the von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene in a family with a de novo mutation. A combined genetic study, including cytogenetics, PCR/SSCP, FISH, and CGH. *Hum.Genet.* 1996;97:770-776.
 173. Moch H, Presti JC, Jr., Sauter G, Buchholz N, Jordan P, Mihatsch MJ, Waldman FM: Genetic Aberrations Detected by Comparative Genomic Hybridization Are Associated with Clinical Outcome in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res.* 1996;56:27-30.
 174. Presti JC, Jr., Moch H, Reuter VE, Huynh D, Waldman FM: Comparative genomic hybridization for genetic analysis of renal oncocytomas. *Genes Chromosomes.Cancer* 1996;17:199-204.
 175. Presti JC, Jr., Moch H, Reuter VE, Cordon-Cardo C, Waldman FM: Renal cell carcinoma genetic analysis by comparative genomic hybridization and restriction fragment length polymorphism analysis. *J.Urol.* 1996;156:281-285.
 176. Gronwald J, Störkel S, Holtgreve Grez H, Hadaczek P, Brinkschmidt C, Jauch A, Lubinski J, Cremer T: Comparison of DNA Gains and Losses in Primary Renal Clear Cell Carcinomas and Metastatic Sites: Importance of 1q and 3p Copy Number Changes in Metastatic Events. *Cancer Res.* 1997;57:481-487.
 177. Bentz M, Huck K, du Manoir S, Joos S, Werner CA, Fischer K, Dohner H, Lichter P: Comparative genomic hybridization in chronic B-cell leukemias shows a high incidence of chromosomal gains and losses. *Blood* 1995;85:3610-3618.

178. Bentz M, Dohner H, Huck K, Schutz B, Ganser A, Joos S, du Manoir S, Lichter P: Comparative genomic hybridization in the investigation of myeloid leukemias. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;12:193-200.
179. Nacheva E, Grace C, Holloway TL, Green AR: Comparative genomic hybridization in acute myeloid leukemia. A comparison with G-banding and chromosome painting. *Cancer Genet Cytogenet* 1995;82:9-16.
180. el Rifai W, Elonen E, Larramendy M, Ruutu T, Knuutila S: Chromosomal breakpoints and changes in DNA copy number in refractory acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1997;11:958-963.
181. Karhu R, Siitonen S, Tanner M, Keinanen M, Makiperna A, Lehtinen M, Vilpo JA, Isola J: Genetic aberrations in pediatric acute lymphoblastic leukemia by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet.Cytogenet.* 1997;95:123-129.
182. Karhu R, Knuutila S, Kallioniemi OP, Siitonen S, Aine R, Vilpo L, Vilpo J: Frequent loss of the 11q14-24 region in chronic lymphocytic leukemia: a study by comparative genomic hybridization. Tampere CLL Group. *Genes Chromosomes.Cancer* 1997;19:286-290.
183. Paszek-Vigier M, Talmant P, Mechinaud F, Garand R, Harousseau JL, Bataille R, Avet-Loiseau H: Comparative genomic hybridization is a powerful tool, complementary to cytogenetics, to identify chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br.J.Haematol.* 1997;99:589-596.
184. Cuneo A, Bigoni R, Negrini M, Bullrich F, Veronese ML, Roberti MG, Bardi A, Rigolin GM, Cavazzini P, Croce CM, Castoldi G: Cytogenetic and interphase cytogenetic characterization of atypical chronic lymphocytic leukemia carrying BCL1 translocation. *Cancer Res.* 1997;57:1144-1150.
185. Le Beau MM: One FISH, two FISH, red FISH, blue FISH [news]. *Nat.Genet.* 1996;12:341-344.
186. Speicher MR, Ward DC: The coloring of cytogenetics. *Nat.Med.* 1996;2:1046-1048.
187. Eils R, Uhrig S, Saracoglu K, Satzler K, Bolzer A, Petersen I, Chassery J, Ganser M, Speicher MR: An optimized, fully automated system for fast and accurate identification of chromosomal rearrangements by multiplex-FISH (M-FISH). *Cytogenet Cell Genet* 1998;82:160-171.
188. Macville M, Schrock E, Padilla-Nash H, Keck C, Ghadimi BM, Zimonjic D, Popescu N, Ried T: Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res.* 1999;59:141-150.
189. Tosi S, Giudici G, Rambaldi A, Scherer SW, Bray-Ward P, Dirscherl L, Biondi A, Kearney L: Characterization of the human myeloid leukemia-derived cell line GF-D8 by multiplex fluorescence in situ hybridization, subtelomeric probes, and comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes.Cancer* 1999;24:213-221.
190. Mitelman F: *ISCN 1995, An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1995)*. Basel, Karger, 1995.
191. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-1354.
192. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 1986;51 Pt 1:263-273.

193. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-491.
194. Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A: Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 1992;13:718-725.
195. Boldt DH, Armstrong JP: Rosette formation between human lymphocytes and sheep erythrocytes. Inhibition of rosette formation by specific glycopeptides. *J.Clin.Invest* 1976;57:1068-1078.
196. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A: High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990;11:231-238.
197. Harrison CJ, Gibbons B, Yang F, Butler T, Cheung KL, Kearney L, Dirscherl L, Bray-Ward P, Gregson M, Ferguson-Smith M: Multiplex fluorescence in situ hybridization and cross species color banding of a case of chronic myeloid leukemia in blastic crisis with a complex Philadelphia translocation. *Cancer Genet.Cytogenet.* 2000;116:105-110.
198. Nguyen PL, Arthur DC, Litz CE, Brunning RD: Fluorescence in situ hybridization (FISH) detection of trisomy 8 in myeloid cells in chronic myeloid leukemia (CML): a study of archival blood and bone marrow smears. *Leukemia* 1994;8:1654-1662.
199. du Manoir S, Schrock E, Bentz M, Speicher MR, Joos S, Ried T, Lichter P, Cremer T: Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 1995;19:27-41.
200. Ried T, Just KE, Holtgreve-Grez H, du MS, Speicher MR, Schrock E, Latham C, Blegen N H, Zetterberg A, Cremer T: Comparative genomic hybridization of formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumors reveals different patterns of chromosomal gains and losses in fibroadenomas and diploid and aneuploid carcinomas. *Cancer Res.* 1995;55:5415-5423.
201. Ried T, Knutzen R, Steinbeck R, Blegen H, Schrock E, Heselmeyer K, du MS, Auer G: Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes Chromosomes.Cancer* 1996;15:234-245.
202. Balsara BR, Sonoda G, du MS, Siegfried JM, Gabrielson E, Testa JR: Comparative genomic hybridization analysis detects frequent, often high- level, overrepresentation of DNA sequences at 3q, 5p, 7p, and 8q in human non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res.* 1997;57:2116-2120.
203. Agarwal SK, Schrock E, Kester MB, Burns AL, Heffess CS, Ried T, Marx SJ: Comparative genomic hybridization analysis of human parathyroid tumors. *Cancer Genet.Cytogenet.* 1998;106:30-36.
204. Dierlamm J, Rosenberg C, Stul M, Pittaluga S, Wlodarska I, Michaux L, Dehaen M, Verhoef G, Thomas J, de Kever W, Bakker-Schut T, Cassiman JJ, Raap AK, Wolf-Peeters C, Van den BH, Hagemeijer A: Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in marginal zone B cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Leukemia* 1997;11:747-758.
205. Getman ME, Houseal TW, Miller GA, Grundy PE, Cowell JK, Landes GM: Comparative genomic hybridization and its application to Wilms' tumorigenesis. *Cytogenet.Cell Genet.* 1998;82:284-290.
206. du Manoir S, Kallioniemi OP, Lichter P, Piper J, Benedetti PA, Carothers AD, Fantes JA, Garcia-Sagredo JM, Gerdes T, Giollant M: Hardware and software requirements for quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 1995;19:4-9.

207. Piper J, Rutovitz D, Sudar D, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D: Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 1995;19:10-26.
208. Gebhart E, Verdorfer I, Saul W, Trautmann U, Brecevic L: Delimiting the use of comparative genomic hybridization in human myeloid neoplastic disorders. *Int.J.Oncol.* 2000;16:1099-1105.
209. Joos S, Scherthan H, Speicher MR, Schlegel J, Cremer T, Lichter P: Detection of amplified DNA sequences by reverse chromosome painting using genomic tumor DNA as probe. *Hum Genet* 1993;90:584-589.
210. Hopman AH, Voorter CE, Ramaekers FC: Detection of genomic changes in cancer by in situ hybridization. *Mol.Biol.Rep.* 1994;19:31-44.
211. Lothe RA, Karhu R, Mandahl N, Mertens F, Saeter G, Heim S, Borresen Dale AL, Kallioniemi OP: Gain of 17q24-qter detected by comparative genomic hybridization in malignant tumors from patients with von Recklinghausen's neurofibromatosis. *Cancer Res.* 1996;56:4778-4781.
212. Bryndorf T, Kirchhoff M, Rose H, Maahr J, Gerdes T, Karhu R, Kallioniemi A, Christensen B, Lundsteen C, Philip J: Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *Am.J.Hum.Genet.* 1995;57:1211-1220.
213. Moore DH, Pallavicini M, Cher ML, Gray JW: A t-statistic for objective interpretation of comparative genomic hybridization (CGH) profiles. *Cytometry* 1997;28:183-190.
214. Lozzio BB, Lozzio CB: Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line. *Leuk.Res.* 1979;3:363-370.
215. Drexler HG, MacLeod RA, Uphoff CC: Leukemia cell lines: in vitro models for the study of Philadelphia chromosome-positive leukemia [editorial]. *Leuk.Res.* 1999;23:207-215.
216. Yokoyama Y, Ohsugi K, Kozaki T, Sakuragawa N: Microdissection-mediated selection of chromosome region-specific cDNAs. *Cytogenet.Cell Genet.* 1997;77:192-196.
217. Huhta T, Vettenranta K, Heinonen K, Kanerva J, Larramendy ML, Mahlamaki E, Saarinen-Pihkala UM, Knuutila S: Comparative genomic hybridization and conventional cytogenetic analyses in childhood acute myeloid leukemia. *Leuk.Lymphoma* 1999;35:311-315.
218. Wilkens L, Tchinda J, Burkhardt D, Nolte M, Werner M, Georgii A: Analysis of hematologic diseases using conventional karyotyping, fluorescence in situ hybridization (FISH), and comparative genomic hybridization (CGH). *Hum.Pathol.* 1998;29:833-839.
219. Haas O, Henn T, Romanakis K, du MS, Lengauer C: Comparative genomic hybridization as part of a new diagnostic strategy in childhood hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1998;12:474-481.
220. Avet-Loiseau H: Fish analysis at diagnosis in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk.Lymphoma* 1999;33:441-449.
221. Rice M, Breen CJ, O'Meara A, Breatnach F, O'Marcaigh AS, Stallings RL: Comparative genomic hybridization in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr.Hematol.Oncol.* 2000;17:141-147.
222. 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 Genet.Cytogenet.* 1999;111:7-17.
223. Su XY, Wong N, Cao Q, Yu LZ, Niu C, Wickham N, Johnson PJ, Chen Z, Chen SJ: Chromosomal aberrations during progression of chronic myeloid leukemia identified by cytogenetic and molecular cytogenetic tools: implication of 1q12-21. *Cancer Genet.Cytogenet.* 1999;108:6-12.
224. Cramer P, Vainchenker W, Brouet JC, Berger R: Cytogenetic study of myeloid and erythroid colonies in chronic myeloid leukaemia with stable Ph1 mosaicism. *Br.J.Haematol.* 1987;67:51-54.
225. Jonas D, Lubbert M, Kawasaki ES, Henke M, Bross KJ, Mertelsmann R, Herrmann F: Clonal analysis of bcr-abl rearrangement in T lymphocytes from patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1992;79:1017-1023.
226. Haferlach T, Winkemann M, Nickenig C, Meeder M, Rammetersen L, Schoch R, Nickelsen M, Weber-Matthiesen K, Schlegelberger B, Schoch C, Gassmann W, Loffler H: Which compartments are involved in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia: an answer at the single cell level by combining May Grunwald giemsa staining and fluorescence in situ hybridization techniques. *Br.J.Haematol.* 1997;97:99-106.
227. al Amin A, Lennartz K, Runde V, Seeber S, Opalka B, KLOKE O: Frequency of clonal B lymphocytes in chronic myelogenous leukemia evaluated by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet.Cytogenet.* 1998;104:45-47.
228. Takahashi N, Miura I, Saitoh K, Miura AB: Lineage involvement of stem cells bearing the philadelphia chromosome in chronic myeloid leukemia in the chronic phase as shown by a combination of fluorescence-activated cell sorting and fluorescence in situ hybridization. *Blood* 1998;92:4758-4763.
229. Anastasi J, Feng J, Le Beau MM, Larson RA, Rowley JD, Vardiman JW: The relationship between secondary chromosomal abnormalities and blast transformation in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 1995;9:628-633.
230. Anastasi J, Vardiman JW, Rudinsky R, Patel M, Nachman J, Rubin CM, Le Beau MM: Direct correlation of cytogenetic findings with cell morphology using in situ hybridization: an analysis of suspicious cells in bone marrow specimens of two patients completing therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1991;77:2456-2462.
231. Anastasi J, Feng J, Le Beau MM, Larson RA, Rowley JD, Vardiman JW: Cytogenetic clonality in myelodysplastic syndromes studied with fluorescence in situ hybridization: lineage, response to growth factor therapy, and clone expansion. *Blood* 1993;81:1580-1585.
232. van Lom K, Hagemeijer A, Smit EM, Lowenberg B: In situ hybridization on May-Grunwald Giemsa-stained bone marrow and blood smears of patients with hematologic disorders allows detection of cell-lineage-specific cytogenetic abnormalities. *Blood* 1993;82:884-888.
233. Kibbelaar RE, van Kamp H, Dreef EJ, Groot-Swings G, Kluin-Nelemans JC, Beverstock GC, Fibbe WE, Kluin PM: Combined immunophenotyping and DNA in situ hybridization to study lineage involvement in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 1992;79:1823-1828.
234. Gerritsen WR, Jagiello CA, Bourhis JH: Detection of chimerism in subpopulations of cells by fluorescence in situ hybridization and immunofluorescent staining of cell surface antigens. *Bone Marrow Transplant.* 1994;13:441-447.

235. Buckton KE, Brown WM, Smith PG: Lymphocyte survival in men treated with x-rays for ankylosing spondylitis. *Nature* 1967;214:470-473.
236. Yehuda O, Abeliovich D, Ben Neriah S, Sverdlin I, Cohen R, Varadi G, Orr R, Ashkenazi YJ, Heyd J, Lugassy G, Ben Yehuda D: Clinical implications of fluorescence in situ hybridization analysis in 13 chronic myeloid leukemia cases: Ph-negative and variant Ph-positive. *Cancer Genet.Cytogenet.* 1999;114:100-107.
237. Pelz, A. F., Wieacker, P., and Stumm, M. High reliability and sensitivity using the BCR/ABL D-FISH probe for the detection of BCR/ABL rearrangements. *Medizinische Genetik* 1, 130. 2000.
238. Fitzgerald PH, Morris CM: Complex chromosomal translocations in the Philadelphia chromosome leukemias. Serial translocations or a concerted genomic rearrangement? *Cancer Genet.Cytogenet.* 1991;57:143-151.
239. Bartram CR, Kleihauer E, de Klein A, Grosveld G, Teyssier JR, Heisterkamp N, Groffen J: C-abl and bcr are rearranged in a Ph1-negative CML patient. *EMBO J.* 1985;4:683-686.
240. Ishihara T, Minamihisamatsu M: The Philadelphia chromosome. Considerations based on studies of variant Ph translocations. *Cancer Genet.Cytogenet.* 1988;32:75-92.
241. Sinclair PB, Nacheva EP, Leversha M, Telford N, Chang J, Reid A, Bench A, Champion K, Huntly B, Green AR: Large deletions at the t(9;22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000;95:738-743.
242. Melo JV, Gordon DE, Tuszynski A, Dhut S, Young BD, Goldman JM: Expression of the ABL-BCR fusion gene in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993;81:2488-2491.
243. Melo JV: BCR-ABL gene variants. *Baillieres Clin.Haematol.* 1997;10:203-222.
244. Loncarevic, I, Starke, H., Bleck, C., Ziegler, M., Fiedler, W., Liehr, T., , H. J., Kelbova, C., and Claussen, U. Detection of 3'-BCR gene sequences on chromosome der(22)t(9;22) but not on der(9)t(9;22) by FISH in 4 patients with a conventional CML. *Medizinische Genetik* 1, 132. 2000.

7. Anhang

7.1 Verzeichnis der Abkürzungen

#	Chromosom
ABL	Abelson murine leukemia virus
AK	Antikörper
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AML/EVI-1	acute myelogenous leukemia associated gene/
aCML	atypische chronische myeloische Leukämie
BCR	breakpoint cluster region
BSA	bovine serum albumine
CML	chronische myeloische Leukämie
CMLE	chronische myeloproliferative Erkrankungen
CMML	chronische myelomonozytische Leukämie
cDNA	copy deoxyribonucleic acid
CD14, CD16, CD34	cluster of derivation 14, 16, 34
CEP	chromosome enumeration probe
CNL	chronische neutrophile Leukämie
CGH	comparative genomische Hybridisierung
CISS-Hybridisierung	chromosomal <i>in situ</i> suppression-Hybridisierung
Cy3, Cy5	Cyanin 3, 5
DAPI	Diamidino-Phenylindol
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytosintriphosphat
D-FISH	double fusion Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxygenin
DNA	deoxyribonucleic acid, Deoxyribonucleinsäure
DNase	Deoxyribonuclease
dNTPs	Deoxyribonukleotidtriphosphate
DOP-PCR	degenerate oligonucleotid-primed polymerase chain reaction
dTTP	Deoxytyrosintriphosphat
dUTP	Deoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
FAB	French-American-British classification
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum, fetales Kälber-Serum
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
1F FISH	one fusion Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
2F FISH	two fusion Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GTG	G-Banden mit Trypsin und Giemsa
Ig	Immunglobulin
IRS	interspersed repetitive sequences

jCML	juvenile chronische myeloische Leukämie
kb	kilo-Basenpaare
kD	kilo Dalton
MYC	Avian myelocytomatosis viral oncogene
Mb	Mega-Basenpaare
M-bcr	major breakpoint cluster region
m-bcr	minor breakpoint cluster region
μ-bcr	micro breakpoint cluster region
M-FISH	Multiplex- Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
MRD	minimal residual disease
mRNA	messenger ribonucleic acid
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
PBMNC	peripheral blood mononuclear nucleated cells
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
Ph-Chromosom	Philadelphia-Chromosom
PHA	Phytohämagglutinin
PWM	Pokeweed mitogene
RB1	Retinoblastomgen 1
RNase A	Ribonuclease A
RT-PCR	Reverse Transcription-Poylmerase Chain Reaction
SSC	sodium
S-FISH	single fusion Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
SKY	spectal karyotyping
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TRITC	Tetraethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
WCP probe	whole chromosome painting probe

7.2 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Die zur Entstehung des Philadelphia (Ph)-Chromosoms führende Translokation t(9;22)(q34.1;q11.2).....	5
Abb. 2: Translokation t(9;22)(q34;q11).	8
Abb. 3: Schema der comparativen genomischen Hybridisierung (CGH).....	20
Abb. 4: Beispiel einer comparativen genomischen Hybridisierung (CGH).....	22
Abb. 5: Multiplex Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (M-FISH).	24
Abb. 6: Multiplex-Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (M-FISH).	25
Abb. 7: Separierung von neutrophilen Granulozyten, T-Lymphozyten, CD34-positiven Zellen und Monozyten aus peripherem Blut von CML-Patienten in der Blastenkrise.	39
Abb. 8: G-Banden-Analyse der Zelllinie K562.	64
Abb. 9: M-FISH der Zelllinie K562.	65
Abb. 10: FISH mit den BCR- und ABL-Gen-Proben (LSI TM <i>bcr/abl</i> translocation probe, Vysis).	67
Abb. 11: FISH mit einer WCP13-Probe auf eine K562-Metaphase.	67
Abb. 12: FISH-Analyse zur Untersuchung des K562-Markers M10 [t(3;10;17)].	68
Abb. 13: FISH mit einer WCP9-Probe (rot) und einer CEP17-Probe (grün) zur Untersuchung des K562-Markers M16.	68
Abb. 14: FISH-Experimente zur Bestätigung der Zusammensetzung von Marker-Chromosomen der Zelllinie K562.	69
Abb. 15: Comparative genomische Hybridisierung (CGH) der Zelllinie K562.	71
Abb. 16: G-Banden-Analyse der Probe CML12B.	77
Abb. 17: Comparative genomische Hybridisierung (CGH) der Probe CML6B.	78
Abb. 18: FISH-Analyse der Probe CML6B mit einer CEP8-Sonde.	79
Abb. 19: FISH-Analyse der Probe CML6B zum Nachweis des Isochromosoms 17q.	79
Abb. 20: FISH mit der LSI TM <i>bcr/abl</i> translocation probe der Firma Vysis zum Nachweis der Ph-Translokation.	80
Abb. 21: CGH-Mittelprofil des Falles CML5.	81
Abb. 22: FISH mit der CEPX/CEPY-Sonde der Firma Vysis.	81
Abb. 23: G-Bänderung im Fall CML11: 47,XX,t(9;22),+21.	82
Abb. 24: FISH im Fall CML11 mit einer WCP21-Probe.	82
Abb. 25: CGH der Fraktionen bei CML9B. Mittelprofile der Chromosomen 17.	84
Abb. 26: CGH der Fraktionen bei CML11. Mittelprofile der Chromosomen 21.	84
Abb. 27: CGH der Fraktionen bei CML 12B. Mittelprofile der Chromosomen 8 und 17.	84
Abb. 28: CGH der Fraktionen bei CML15. Mittelprofile der Chromosomen 17.	85
Abb. 29: CML9C, t(9;20;22)(q34;q13;q11).	86
Abb. 30: CML10, t(9;11;22)(q34;p15;q11).	87
Abb. 31: CML15, t(5;9;22)(q34;q13;q11).	88
Abb. 32: FISH mit Bruchpunkt-überspannenden Proben für die BCR- und ABL-Gene (D-FISH-Probe, Oncor) bei einem Fall mit klassischer Ph-Translokation (CML12A).	89
Abb. 33: CML9C, t(9;20;22)(q34;q13;q11).	89
Abb. 34: CML10, t(9;11;22)(q34;p15;q11).	90
Abb. 35: CML15, t(5;9;22)(q13;q34;q11).	91
Abb. 36: Hybridisierung mit einer PAC-Sonde aus dem ersten ABL-Intron nahe dem Exon 2. 91	
Abb. 37: Hybridisierung mit einer BAC-Sonde, die 200 kb telomerwärts des BCR-Gens liegt. 92	
Abb. 38: "Klassisches" Modell der CML-Progression.	110
Abb. 39: Erstes alternatives Modell der CML-Progression.	110
Abb. 40: Zweites alternatives Modell der CML-Progression.	111

7.3 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: CML-Blastenkrisen, Patientendaten	28
Tabelle 2: Marker-Chromosomen der Zelllinie K562	73
Tabelle 3: Zytogenetische und molekular-zytogenetische Analysen von Blutproben von CML-Patienten in der Blastenkrise	75
Tabelle 4: CGH-Untersuchung an Blutfraktionen von CML-Patienten in der Blastenkrise.....	83
Tabelle 5: Marker-Chromosomen der Zelllinie K562, Vergleich mit veröffentlichten Karyotypen.	103

7.4 Danksagung

7.5 Lebenslauf

Name: Sabine Naumann

geboren: 28. Mai 1967 in Georgsmarienhütte

Staatsangehörigkeit: deutsch

wohnhaft: Karl-Zörgiebel-Str. 52, 55128 Mainz

Familienstand: ledig

Schulausbildung:

1973 – 1977	Marienschule (Grundschule)	Georgsmarienhütte
1977 - 1979	Orientierungsstufe	Georgsmarienhütte
1979 - 1987	Gymnasium Oesede	Georgsmarienhütte
01.06. 1987	Allgemeine Hochschulreife	

Studium:

10.1987	Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz;
09.11.1995	Erlangung des Grades einer Diplombiologin

Wissenschaftliche Beschäftigung/Berufstätigkeit:

WS 1994/95; SS 1995	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Anthropologie, Abteilung Humangenetik, der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz;
01.1995 – 12.1995	Wissenschaftliche Hilfskraft an der Universitätsklinik Mainz;
01.1996 – 12.1996	Tätigkeit in der zytogenetischen Abteilung einer Laborarztpraxis.
01.01.97 – 30.06.2000	Wissenschaftliche Angestellte an der Universitätsklinik Mainz
ab 08.01.2001	Wissenschaftliche Tätigkeit am University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska, USA

7.6 Veröffentlichungen

Posterbeiträge auf Kongressen

Reifenrath C, **Naumann S**, Ernst S, Spring H, Fischer T, Huber C, Decker HJ: Autologous transplantation in chronic myelogenous leukemia (CML): detection of tumor cell contamination in leukaphereses by interphase and metaphase cytogenetics and RT-PCR for BCR/ABL. *Ann Hematol* 1998; 77, suppl II: 474 (Seite 120).

Naumann S, Speicher M, Reutzel D, Reifenrath C, Schroeck E, Fischer T, Huber C, Decker HJ: Genetic analysis of the chronic myelogenous leukemia-derived K562 cell line using G-banding, comparative genomic hybridization (CGH) and multiplex-fluorescence in situ hybridization (M-FISH)”. *Ann Hematol* 1998; 77, suppl II: 508 (Seite 128).

Brieger J, Schreiner S, Naumann A, **Naumann S**, Weidt EJ, Fischer T, Weidtmann E, Huber C, Decker HJ: The von Hippel-Lindau tumorsuppressor gene protein is expressed in the cytoplasm of myeloid leukemias and might be cell type specific localized. *Ann Hematol* 1998; 77, suppl II: 522 (Seite 132).

Reutzel D, **Naumann S**, Kleikamp S, Mende M, Puranakanittha C, Baak U, Gansen K, Brenner W, Huber Ch, Decker H.-J: Conventional cytogenetic, molecular cytogenetics (FISH, CGH, M-FISH) and LOH Studies on solid tumors – the combinational genetic characterization results in a highly complementary approach. *Cytogenet Cell Genet* 1999; 85 (1-2): P149 (Seite 42).

Naumann S, Reutzel D, Brieger J, Reifenrath C, Fischer T, Huber C, Decker HJ: Comparative genomic hybridization reveals a novel aspect of tumor cell type specific progression in blast crisis of chronic myelogenous leukemia. *Cytogenet Cell Genet* 1999; 85 (1-2): P318 (Seite 81).

Reutzel D, **Naumann S**, Puranakanitsha C, Weidt E, Löbber R, Holl M, Brenner W, Zabel B, Huber C, Decker HJ: Comparative Genomic Hybridization, Cytogenetics and molecular studies on a Wilms tumor cell line, and epithelial renal tumors. 6th European Conference on Cytogenetics and Molecular Genetics of human solid tumors, Oct 15 – 18th 1998, Saarbrücken, Germany.

Naumann S, Reutzel D, Fischer T, Decker HJ: Investigation of three cases of chronic myelogenous leukemia (CML) with variant translocations by G-banding and fluorescence in situ hybridization (FISH)”. *Medizinische Genetik* 2000; 1: P-II-7.16

Artikel in Fachzeitschriften

Hess G, Reifenrath C, Friedrich-Freksa A, Beyer V, **Naumann S**, Schuch B, Huber C, Fischer T, Decker HJ. Autologous transplantation of in vivo purged PBSC in CML: comparison of FISH, cytogenetics, and PCR detection of Philadelphia chromosome in leukapheresis products. *Cancer Genet Cytogenet*, 117(1):1-8, 2000

Naumann S, Reutzel D, Speicher M, Decker HJ. Complete karyotype characterization of the K562 cell line by combined application of G-banding, multiplex-fluorescence *in situ* hybridization, fluorescence *in situ* hybridization, and comparative genomic hybridization. *Leuk Res* 25 (2001) 313–322

Reutzel D, Mende M, **Naumann S**, Störkel S, Brenner W, Zabel B, Decker J. Genomic imbalances in 61 renal cancers from the proximal tubulus detected by comparative genomic hybridization. *Cytogenet Cell Genet* (2001), in press

Diplomarbeit

Die Anwendung von Mikrodissektionsproben in der Interphase-Cytogenetik

Promotion

Transformation, Progression und Zellinienspezifität der chronischen myeloischen Leukämie. Zytogenetische und molekular-zytogenetische Untersuchungen