

16. Tumorzytogenetische Arbeitstagung

15.–17. Mai 2003
Schloss Celle, bei Hannover

Die Tumorzytogenetische Arbeitstagung wurde dieses Jahr erstmals durch das Institut für Zell- und Molekularpathologie der Medizinischen Hochschule Hannover organisiert.

120 Teilnehmer aus Deutschland, Österreich, der Schweiz, Schweden und Dänemark trafen sich vom 15. bis 17.5.2003 im Schloss Celle.



Die Tagung wurde von der Deutschen José Carreras Leukämie-Stiftung e.V. und der Stefan-Morsch-Stiftung unterstützt.

Prof. Dr. Brigitte Schlegelberger
Institut für Zell- und Molekularpathologie
Medizinische Hochschule Hannover
Carl-Neuberg-Str. 1
30625 Hannover
Schlegelberger.Britte@mh-hannover.de

Themenschwerpunkte

Qualitätssicherung
(Moderation: H. Rieder)

Lymphome I und II
(Moderation: A. Rosenwald und N. von Neuhoff)

Akute Lymphoblastische Leukämien
(Moderation: O. Haas)

Kindliche Tumoren
(Moderation: H. Tönnies)

Myeloische Neoplasien
(Moderation: C. Schoch) und

Solide Tumoren I und II
(Moderation: H.-C. Duba und S. Joos).

Hauptvorträge wurden von H. Rieder, Marburg, über „Datenverarbeitung in der Tumorzytogenetik“ und L. Füzezi, Göttingen, über „Zytogenetik solider Tumoren“ gehalten.

Ein besonders wichtiges Ergebnis der 16. Tumorzytogenetischen Arbeitstagung ist, dass erstmals konkrete Maßnahmen zur Qualitätssicherung in der Tumorzytogenetik beschlossen wurden. In einer Pilotphase soll ein Panel-Review-Prozess zur Beurteilung von Karyogrammen initiiert werden. Dazu wurden Patienten des sog. Intergroup-Arms der deutschen multizentrischen Therapiestudien zur Behandlung der akuten myeloischen Leukämie ausgewählt. Außerdem waren die Teilnehmer einig, einen Ringversuch zur Qualitätssicherung der FISH-Diagnostik durchzuführen. Dazu sollen Zellsuspensionen aus Zelllinien mit bekannten Chromosomenaberrationen und normalen Zellen verschickt und die Ergebnisse verglichen werden. Die Pilotprojekte werden von H. Rieder, Marburg, und R. Siebert, Kiel, koordiniert. Die Ergebnisse sollen auf der nächsten Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik in Marburg vorgestellt werden.

Programmübersicht

Donnerstag, 15. Mai 2003

Qualitätssicherung
Vorsitzender: Harald Rieder, Marburg

Qualitätssicherung in der Tumorzytogenetik. Das Problem der Identifikation kleiner Zellklone bei der Diagnose Myelodysplastischer Syndrome (A 1)
Christian Steidl, Göttingen

FISH-Analyse in der Tumorzytogenetik: Kritischer Erfahrungsbericht (A 2)
Barbara Heinze, Ulm

Erfahrungen bei der Anwendungen des Multicolor-FISH Tests zur Diagnose von Harnblasenkarzinomen (A 3)
Lieselotte Lübbecke, Cottbus

Analyse von Metaphasechromosomen - Vorschlag zu konkreten Maßnahmen zur Qualitätssicherung
Harald Rieder, Marburg

Analyse von Interphasechromosomen - Vorschlag zu konkreten Maßnahmen zur Qualitätssicherung
Reiner Siebert, Kiel

Plenardiskussion und Konsensbildung über Maßnahmen zur Qualitätssicherung in der tumorzytogenetischen Diagnostik

Übersichtsvortrag
Datenverarbeitung in der Tumorzytogenetik (A 4) Harald Rieder, Marburg

Freitag, 16. Mai 2003

Lymphome 1
Vorsitzender: Andreas Rosenwald, Würzburg

Inaktivierung der ARF - MDM2 - p53-Signaltransduktion bei sporadischen Burkitt-Lymphomen im Kindesalter (A 5)
Jochen Bruch, Gießen

Zugewinne auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 mit Beteiligung des REL-Locus korrelieren mit der nukleären Akkumulation des c-Rel Proteins in den neoplastischen Zellen des klassischen M. Hodgkin (A 6)
Thomas Barth, Ulm

Nachweis von zwei spezifischen Translokationen, t(8;22) und t(14;18), bei zwei Patienten mit B-zelligen Non-Hodgkin Lymphomen mit unterschiedlicher Histologie und Krankheitsverlauf (A 7)
Susanna Koskela, Wien

Zytogenetische Charakterisierung der Mantelzell-Lymphom-Zelllinie GRANTA-519 mittels Spektraler Karyotypisierung (SKY) (A 8)
Cornelia Rudolph, Hannover

Die prognostische Bedeutung einer erhöhten MALT1 Gendosis bei t(11;18)-negativen gastrointestinalen B-Zell-Lymphomen (A 9)
Martin Erdel, Innsbruck

Deletionen von HLA-Klasse II-Genen in der Chromosomenbande 6p21 bei primären Lymphomen des zentralen Nervensystems (A 10)
Reina Zühlke-Jenisch, Kiel

Lymphome 2

Vorsitzender: Nils von Neuhoff, Hannover

Identifizierung zytogenetischer Subgruppen und chromosomaler Pathways bei Plasmazytomen, Mantelzellymphomen und follikulären Lymphomen durch multivariate statistische Analysen (A 11)
Reiner Siebert, Kiel

Neue FISH-Sonden zum Nachweis von B-Zell Neoplasien (A 12)
Eveline Fiedler, Wiesbaden

Interphase-FISH Screening nach Monosomie 13 bzw. Deletionen in 13q14 und 14q32 involvierenden Translokationen in 31 Multiplen Myelom-Patienten (A 13)
Claudia Wieland, Düsseldorf

Interphase-FISH in der CLL Diagnostik. Ein Zwischenbericht aus der Schweiz (A 14)
Friedel Wenzel, Basel

Interphase-FISH zum Nachweis von Deletionen in der Chromosomenbande 13q14 bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) mit einem Set kommerzieller Microsatelliten-Marker (A 15)
Brigitte Mohr, Dresden

Interphase-Cytogenetik der chronisch lymphatischen Leukämie (B-CLL) - Korrelation mit ZAP-70 mRNA-Expression (A 16)
Elisabeth Krömer, Wien

Altersabhängige Telomerverkürzung beim Menschen in vivo (A 17)
Susanne Mayer, Ulm

ALL

Vorsitzende: Oskar Haas, Wien

Spektrum rekurrenter chromosomaler Aberrationen bei der ALL der Erwachsenen: zytogenetische Befunde von 647 Studienpatienten der GMALL-Studie 05/93 (A 18)
Jutta Bradtke, Marburg

„Jumping“ Translokation von Chromosom 1q bei einem Patienten mit bcr/abl-positiver ALL (A 19)
Antje-Friederike Pelz, Magdeburg

Die Inversion inv(19)(p13q13) bei Kindern mit prä-B-ALL führt zu einem heterozygoten gerichteten Bruch von E2A (A 20)
Silja Röttgers, Gießen

Retrospektive FISH-Analyse zum Nachweis einer AML1-Amplifikation bei Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) (A 21)
Carsten Reichelt, Gießen

Die PAX5/ETV6 Fusion ist das molekular-genetische Äquivalent der dic(9;12)(p13;p13) (A 22)
Margit König, Wien

Kindliche Tumoren

Vorsitzender: Holger Tönnies, Berlin

Zytogenetische Veränderungen bei Kindern mit therapieabhängigem MDS (t-MDS) (A 23)
Andrea Teigler-Schlegel, Gießen

Chromosomenimbancen bei kindlichen Phäochromozytomen und Nebennierenkarzinomen (A 24)
Ivan Loncarevic, Jena

Aberrationsmuster von richtig-positiven und falsch-negativen Neuroblastomen nach Screening (A 25)
Rüdiger Spitz, Köln

Genomische Imbalancen in unilateral isolierten Retinoblastomen (A 26)
Stephanie Schneider, Marburg

Klonale chromosomale Imbalancen in Zellen des Knochenmarks von Fanconi Anämie Patienten: Zugewinne von 3q26q29 als ungünstiger prognostischer Faktor (A 27)
Holger Tönnies, Berlin

Myeloische Neoplasien

Vorsitzende: Claudia Schoch, München

Patient mit chronisch-myeloischer Leukämie und persistierender t(2;11) nach Behandlung mit STI-571 (A 28)
Barbara Hildebrandt, Düsseldorf

Überexpression und Amplifikation von BCR/ABL bei einer Patientin mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) unter Imatinib-Therapie (A 29)
Dorothea Gadzicki, Hannover

SKY-Analysen bei MDS Patienten mit 5q Anomalie im Rahmen komplexer Chromosomenaberrationen (A 30)
Detlef Trost, Düsseldorf

Detektion von NUP98 Rearrangements bei Leukämien (A 31)
Karin Nebral, Wien

Perizentrische Inversion 3 bei einem Patient mit AML M1 (A 32)
Rotraud Wieser, Wien

Trisomien bei akuten myeloischen Leukämien (AML): Inzidenz und prognostische Relevanz (A 33)
Mirjam Klaus, München

Mutationen in den Genen für die Transkriptionsfaktoren PU.1 und C/EBP α bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (A 34)
Viola Conrad, München

Karyotyp und Therapie-assoziierte akute myeloische Leukämie (t-AML) sind unabhängige prognostische Faktoren: Eine Analyse von 93 Patienten mit t-AML und 1091 Patienten mit de novo AML (A 35)
Claudia Schoch, München

Samstag, 17. Mai 2003

Solide Tumoren 1

Vorsitzender: Hans-Christoph Duba, Linz

Nachweis von mitotischer Instabilität unterschiedlicher Chromosomen in Gliomzelllinien (A 36)
Alexandra Klein, Homburg/Saar

Zytogenetische Marker für die Ansprechrate von Chemotherapien am Beispiel von TMZ bei high grade Gliomen (A 37)
Steffi Urbschat, Homburg/Saar

Mikrodeletionen auf Chromosom 22q in zytogenetisch unauffälligen Meningeomen (A 38)
Alexandra Prowald, Homburg/Saar

Chromosomaler Veränderungen bei nicht familiären Paragangliomen (A 39)
Simone Braun, Tübingen

Nachweis von Chromosom 11-Verlusten bei sporadischen Paragangliomen der Kopf-Hals-Region mittels LOH und Interphase-FISH (A 40)
Kathrin Riemann, Tübingen

Chromosomale Instabilität und Aneuploidie in hepatozellulären Carcinomen in Korrelation zur Morphologie (A 41)
Ludwig Wilkens, Hannover

Solide Tumoren 2

Vorsitzender: Stefan Joos, Heidelberg

dim(9p21) im Gesamtmuster genomischer Imbalancen bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle (A 42)
Erich Gebhart, Erlangen

Untersuchungen von Onkogen-Amplifikationen in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region mittels Gewebemikroarrays (A 43)
Stefan Joos, Heidelberg

Korrelation von CGH identifizierten genetischen Alterationen und deren Expressionsprofilen in Brustkrebszelllinien (A 44)
Norbert Arnold, Kiel

Identifizierung eines Fusionsgens für Schilddrüsenadenome mit 2p21-Aberrationen (A 45)
Gazanfer Belge, Bremen

Zytogenetische Analyse des Nierenzellkarzinoms durch vergleichende Untersuchung mittels CGH, M-FISH und Giemsa-Bänderung (A 46)
Jimsgene Sanjmyatav, Jena

Molekularzytogenetische Charakterisierung von Tumorgewebe bei Patienten mit Nicht kleinzelligen Lungentumoren (A 47)
Hans-Christoph Duba, Innsbruck

Übersichtsvortrag

Zytogenetik solider Tumoren (A 48)
Laszlo Füzesi, Göttingen

Session: Qualitätssicherung

A 1 Qualitätssicherung in der Tumorzytogenetik. Das Problem der Identifikation kleiner Zellklone bei der Diagnose Myelodysplastischer Syndrome

Steidl Christian, Steffens R., Trümper L. und Haase D.

Abteilung für Hämatologie und Onkologie, Georg-August-Universität Göttingen, Robert-Koch-Str. 40, 37075 Göttingen

Hämatologische Erkrankungen und insbesondere Myelodysplastische Syndrome (MDS) zeigen bei Erstdiagnose in der Metaphasenanalyse typischerweise Mosaikkaryotypen, entsprechend einer erst geringen Knochenmarksinfiltration durch den malignen Klon. Der Karyotyp ist beim MDS der wichtigste unabhängige Prognoseparameter mit entscheidenden Auswirkungen auf das therapeutische Vorgehen. Er ist weiterhin bedeutender Bestandteil differenzialdiagnostischer Überlegungen, insbesondere bei der Unterscheidung von nicht-klonalen reaktiven Knochenmarksveränderungen und klonalen myelodysplastischen Syndromen. Abhängig von der Prognoseeinschätzung ist das therapeutische Spektrum zur Behandlung eines MDS extrem breit und reicht von rein supportiver Behandlung über intensive AML-ähnliche Therapieregime bis hin zu myeloablativen Radio- oder Chemotherapien mit Retransfusion autologer oder allogener Stammzellen. Deshalb ist es von besonderer Bedeutung, wieviele Metaphasen unter Berücksichtigung des analytischen Aufwandes in der Routinediagnostik untersucht werden müssen, um auch kleinere Zellklone sicher zu detektieren. 1986 errechneten Heim und Mittelman modellhaft, dass bei 25 komplett analysierten Metaphasen das Risiko, einen existierenden Zellklon mit einem Infiltrationsgrad von 9% nicht zu erkennen bei etwa 10% liegt, bei einem Infiltrationsgrad von 17% liegt das Risiko hingegen bei nur 1%. In einer retrospektiven Pilot-Studie wurden Knochenmarkspröben von insgesamt 119 Patienten mit vermutetem oder gesichertem MDS mit Mosaikkaryotypen untersucht. Hierbei wurde der analytische Aufwand (Anzahl analysierter Metaphasen) bestimmt, der nötig war, um den aberranten Zellklon zu identifizieren und zu bestätigen. Im Mittel mussten 2,9 Metaphasen (Spannweite: 1-25) analysiert werden, um die erste und 5,9 Metaphasen (Spannweite: 2-30) um die zweite (bei isoliertem Chromosomenverlust die dritte) aberrante Zelle zu identifizieren. Die Untersuchung zeigte weiterhin, dass die Sensitivität bei der Detektion eines zytogenetisch veränderten Klons gesteigert wurde, je mehr Metaphasen untersucht wurden. Die Detektionsrate eines aberranten Klones betrug bei 5 untersuchten Metaphasen 75%, bei 10 Metaphasen 85%, bei 20 Metaphasen 94%, bei 25 Metaphasen 96% und bei 30 und mehr Metaphasen (plus eventuelle FISH-Analysen), definiert als analytischer Maximalaufwand 100%. Zusätzliche Untersuchungen zur Identifikation von Zell-Subklonen zeigten, dass bei weniger als 25 analysierter Metaphasen die Wahrscheinlichkeit, einen relevanten Subklon zu verpassen, sich deutlich erhöhte. Zur Bestätigung der Ergebnisse konnte an einem großen multizentrischen Kollektiv von 529 MDS-Patienten mit erfolgter Karyotypisierung gezeigt werden, dass bei Analysen mit 10 oder weniger ausgewerteten Metaphasen die Rate der als normal befundenen Karyotypen mit 69% deutlich höher lag als im Durchschnitt (ca. 50%). Es ist zu diskutieren, zumindest in Bezug auf myelodysplastische Syndrome, bis zu welchem Grad der analytische

Aufwand reduziert werden kann, ohne die Sensitivität der zytogenetischen Analyse entscheidend zu vermindern mit zum Teil ernsthaften Konsequenzen für die sich anschließende Therapie.

A 2 FISH-Analyse in der Tumorzytogenetik: Kritischer Erfahrungsbericht

Heinze Barbara (1), Hahntow I (2), Locher M (3), Greulich-Bode KM (4)

1) Tumorzytogenetisches Labor, Innere Medizin III, Universität Ulm, barbara.heinze@medizin.uni-ulm.de; 2) Hämatolog, Forschungslabor, Innere Medizin III, Klinikum Rechts der Isar, München ines.hahntow@lrz.tu-muenchen.de, 3) Labor für Medizinische Genetik, Martinsried locher@medizinische-genetik.de, 4) Abteilung für Haut Karzinogenese (A110), DKFZ, Heidelberg, kgreulich@debibel.net

Zielsetzung. Die Aussagekraft der tumorzytogenetischen Analyse ist oft beeinträchtigt durch niedrigen Mitose Index und/oder schlechte Metaphasen-, Chromosomenqualität des Tumormaterials. Die FISH-Technik hat hier Abhilfe geschaffen und heute stehen eine ganze Reihe von verschiedenen FISH-basierten Methoden zur Verfügung. Wir berichten über eigene praktische Erfahrungen in der Anwendung der „dual-colour“ FISH, der „multicolour“ FISH (mFISH) und der „Comparative Genomic Hybridization“ (CGH). Methoden und Patienten. Knochenmarksaspirate oder peripheres Blut von Patienten mit Chronischer Myeloischer Leukämie (CML) oder mit Akuter Lymphatischer Leukämie wurde routinemäßig zytogenetisch aufgearbeitet. Die FISH-Analyse wurde nach erfolgter Karyotypisierung durchgeführt, um z.B. nicht sicher beurteilbare chromosomale oder genetische Aberrationen aufzuklären oder um sog. Marker Chromosomen identifizieren zu können. Als FISH-Sonden verwendeten wir Chromosomen-sonden (whole chromosome painting probes, WCP), „single locus“-Sonden (LSI) oder Zentromersonden (CEP), alle käuflich erwerbbar (Vysis, Oncor, Metasystems). Die tumorzytogenetischen Analyse zielt auf die Suche nach dem leukämischen Zellklon, die Beschreibung von Aberrationen und/oder Abschätzung der Restleukämie nach Therapie. Von diesen Zielen wurde die Wahl der FISH-Methoden und der Sonden bestimmt. Ergebnisse: i) „Single-locus“-Sonden wurden den Chromosomensonden vorgezogen, weil damit bei der Analyse neben den Metaphasen auch die Interphasekerne mit einbezogen werden können. ii) „Dual-colour“ oder „three-colour“ Sonden haben gegenüber den „one-colour“ Sonden den Vorteil, dass Gewinn oder Verlust auch von Chromosomenbruchstücken entdeckt werden kann. Für die Entdeckung und Überprüfung von Chromosomentranslokationen sind besonders die „fusion“-Sonden geeignet, wie z.B. bei dem Nachweis der Philadelphia-Translokation. Hierbei sollten die „double fusion“-Sonde zum Nachweis des BCR/ABL-Rearrangements bevorzugt werden, zur Absicherung gegenüber Kosignalen, zur Kennzeichnung beider aberranter Chromosomenpartner und zur Aufdeckung komplexer Translokationen. iii) Die FISH-Analyse mit Chromosomensonden, sehr hilfreich für die Identifizierung von Markerchromosomen oder neuer Aberrationen, ist jedoch nicht sensitiv für kleinere Deletionen und Translokationen und entdeckt auch keine Inversionen, unabhängig davon, ob es „dual colour“ oder mFISH-Sonden sind. Die CGH ist bei ausreichend vorhandener Tumor-DNA eine sehr gute Methode zum

Aufdecken subchromosomaler Gewinne oder Verluste. Jedoch werden Imbalancen im Heterochromatin- und Telomerbereich unterschätzt. Beispiele für typische Interpretationsartefakte bei der Verwendung der verschiedenen FISH-Methoden einerseits und Vorteile der kombinierten Verwendung der FISH-Methoden andererseits werden aufgezeigt. Schlussfolgerungen: Vier Parameter beeinflussen die Aussagekraft der verwendeten FISH-Methoden: i) Die Qualität des Untersuchungsmaterials, ii) die Wahl der Sonden, iii) die Wahl der FISH-Methode und iv) die kombinierte Verwendung verschiedener FISH-Methoden. Neuere Entwicklungen in den einzelnen Methoden, z.B. bei FISH-Sonden (Chromosomenarm Sonden, Telomer Sonden, „three-colour“ FISH, „multicolour“ FISH mit 7 Farben) und in der CGH (drei Farben) versuchen die hier aufgezeigten Schwächen auszugleichen, müssen jedoch erst im Routinebetrieb ausgetestet werden.

A 3 Erfahrungen bei der Anwendung des Multicolor-FISH Tests zur Diagnose von Harnblasenkarzinomen

Lübbe, Lieselotte (1), May, M. (2), Nowack, R. (3), Ullmann, K. (3), Gunia, S. (1), Kaufmann, O. (1)

1) Institut für Pathologie, CTK, Cottbus, L.Luebbe@CTK.de

2) Urologische Klinik, CTK, Cottbus, 3) Institut für klinische Chemie, CTK, Cottbus, Deutschland

Harnblasenkarzinome sind eine der häufigsten urologischen Tumorerkrankungen und zu 95% sind es Transitional Cell Carcinoma (TCC). Man unterscheidet beim TCC 4 klinisch relevante Untergruppen. Sie stellen sich als papillär oberflächlich wachsende nichtinvasive Tumore (pTa) dar und werden unter Organerhalt reseziert. TCC treten häufig multifokal auf und in 50-70% werden Rezidive beobachtet. Bei immerhin 20-30% der Rezidive kann eine Progression zum invasivem Wachstum beobachtet werden, wobei oft nicht sicher ist, ob der Ursprung tatsächlich ein papilläres TCC war. Als nichtinvasive Methode zum Nachweis von Tumorzellen aus dem Urin werden z.B. die Urinzytologie und u.a. der Urinary Bladder Cancer Test angewendet. Mit der Entstehung und Progression von Harnblasenkarzinomen sind genetische Veränderungen assoziiert. Es sind eine Reihe nicht zufälliger numerischer Aberrationen beschrieben worden, die eine neue nichtinvasive Nachweismethode an Epithelzellen aus dem Urin erlauben. Es handelt sich dabei um Polysomien der Chromosomen 3, 7 und 17 und eine Deletion des kurzen Arms von Chromosom 9 (9p21). Man kann diese Veränderungen in den Tumorzellen des Harnblasenepithels, die mit dem Urin ausgeschwemmt werden, durch die FISH nachweisen. An 6 zufällig ausgewählten Patienten/innen wurden an Epithelzellen vor der Resektion (OP) und am Op-Material die gleichen Signalmuster in der FISH-Analyse gefunden. In einem Fall konnte an Epithelzellen einige Wochen nach der OP (aber vor der üblichen Nachresektion) in der FISH-Analyse das Muskel invasive Carcinom rpT2a, das nicht gänzlich bei der ersten Operation ausgeräumt worden oder nachgewachsen war, gefunden werden. Wichtig für die Arbeit mit dem UroVysion-Multicolor-Test ist die richtige Auswahl der Filter, um falsch positive Signale zu vermeiden.

Übersichtsvortrag

A 4 Datenverarbeitung in der Tumorzytogenetik

Rieder Harald

Institut für Klinische Genetik, Klinikum der Philipps-Universität, Marburg

Die im Internet verfügbare Datenbank „Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer“ ist für jeden in der Tumorzytogenetik Tätigen ein unverzichtbares Nachschlagewerk. Mit über 43.000 erfassten Chromosomenbefunden der unterschiedlichsten neoplastischen Entitäten steht derzeit keine tumorzytogenetische Datenbank ähnlichen Umfangs zur Verfügung. Sie basiert auf Chromosomendaten aus Veröffentlichungen, die einem Begutachtungsverfahren unterworfen sind, so dass eine relativ große Korrektheit der Daten zu erwarten ist. Molekularzytogenetische Daten sind nur indirekt enthalten, als sie für die Aufklärung der Veränderungen an gebänderten Metaphasechromosomen notwendig waren. Die Datenbank kann nach chromosomalen Veränderungen durchsucht werden. Die Ausgabe erstreckt sich auf einzelne Fälle. Das Abspeichern von Fallsammlungen und die Auswertung nach einzelnen Gruppen von Krankheitsentitäten oder chromosomalen Veränderungen ist nicht vorgesehen. Für Daten, die mit Hilfe der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) gewonnen wurden, steht die Datenbank [progenetix.net] (<http://www.progenetix.net/>) zur Verfügung. Dort sind über 7400 publizierte CGH-Daten nach einzelnen Tumorentitäten in einer Datenbank erfasst. Die genetischen Veränderungen können in einem Überblick in Projektion auf Chromosomenideogramme abgefragt werden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, eine hierarchische Clusteranalyse der Chromosomenveränderungen automatisch erzeugen zu lassen. Es besteht eine Verknüpfung der in den Ideogrammen dargestellten Banden zu dem Genome Browser „ensemble-cytoview“, so dass z.B. passende Klone aus der interessierenden Region für weitere Analysen direkt ausgewählt werden können. Der für die Generierung der grafischen Darstellung verwendete Konverter benutzt eine der ISCN-Nomenklatur angelehnte Notation. Der Konverter kann für eigene CGH-Daten verwendet werden. Für die automatische Analyse von Befunden an gebänderten Chromosomen sind mehrere Versuche publiziert. Mit der Entwicklung einer auf die „Normalisierung“ von Chromosomenbefunden zielenden Notation ist eine solche Automatisierung der Analyse von Chromosomenbefunden in den Bereich des Möglichen gerückt (BMC Bioinformatics 2003, 4:6). Die Erfassung von molekularzytogenetischen Daten an Interphasechromosomen in einer öffentlich zugänglichen Datenbank ist bisher in keiner Form in Angriff genommen. Gefördert durch das BMBF, Förderkennzeichen 01G19974

Session: Lymphome 1

A 5 Inaktivierung der ARF - MDM2 - p53-Signaltransduktion bei sporadischen Burkitt-Lymphomen im Kindesalter

Bruch, Jochen (1), Wilda, M. (1), Busch, K. (1), Harder, S. (2), Harbott, J. (1), Reiter, A. (1), Borkhardt, A. (1), Woessmann, W. (1)

1) Abt. Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Justus-Liebig-Universität, Gießen; 2) Abt. Humangenetik, Christian-Albrechts-Universität, Kiel; Email: jochen.bruch@paediat.med.uni-giessen.de

Burkitt-Lymphome (BL) sind durch eine Aktivierung des c-MYC-Onkogens charakterisiert. Von diesem geht einerseits ein konstitutives proliferatives Signal aus, andererseits initiiert es eine Aktivierung von p53 sowie Apoptose. Befunde aus Experimenten an BL-Zellkulturen und -Tiermodellen legen den Verdacht nahe, dass eine Inaktivierung der ARF - MDM2 - p53-Signalkaskade ein notwendiges zweites Ereignis für die Entstehung von Burkitt-Lymphomen sein könnte. Allerdings liegen aus Studien an Patientenmaterial nur wenige Daten vor, die diese Hypothese bestätigen. Wir untersuchten daher die Gene ARF, MDM2 und p53 an Proben von 14 Kindern mit sporadischem BL/B-ALL, die in der NHL-BFM 95-Studie registriert waren. In vier der untersuchten Burkitt-Lymphome ergab die Sequenzanalyse eine Punktmutation im p53-Gen. Mittels real-time quantitativer PCR (RQ RT-PCR) wurde in fünf BL-Proben eine Überexpression von MDM2 nachgewiesen. Eine Probe zeigte sowohl eine Mutation in p53 als auch eine Überexpression von MDM2. Eine Deletion des CDKN2A-Locus, der sowohl für ARF als auch für p16INK4a codiert, konnte in keinem der untersuchten Fälle nachgewiesen werden. Jeweils ein Lymphom-assoziiierter Todesfall trat in der Gruppe mit inhibierter p53-Signalkaskade als auch in der Gruppe ohne Inaktivierung auf. Unsere Untersuchungen zeigen, dass die c-MYC-induzierte Apoptose in ca. 60% der Kinder mit sporadischen Burkitt-Lymphomen entweder durch eine Mutation im p53-Gen oder durch eine MDM2-Überexpression inhibiert ist. Eine Deletion des CDKN2A-Locus wurde in keiner der acht untersuchten BL-Proben nachgewiesen. Wir vermuten daher, dass in einem großen Teil der Fälle andere anti-apoptotische Mutationen vorliegen könnten.

A 6 Zugewinne auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 mit Beteiligung des REL - Locus korrelieren mit der nukleären Akkumulation des c-Rel Proteins in den neoplastischen Zellen des klassischen M. Hodgkin

Barth Thomas F.E. (1)*, Martin-Subero J.I. (2)*, Joos S. (3), Menz C.K. (1), Hasel C. (1), Ehrlich S. (1), Rother J.U. (1), Weniger M. (1), Mechttersheimer G. (4), Parwaresch R.M. (5), Lichter P. (3), Siebert R. (2), und Möller P. (1)

1) Abteilung für Pathologie des Universitätsklinikums Ulm, Albert-Einstein-Allee 11, D-89081 Ulm; 2) Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel, Schwannenweg 24, D-24105 Kiel; 3) Deutsches Krebsforschungszentrum, Abteilung Organisation komplexer Genome, Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg; 4) Pathologisches Institut der Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 220/221, D-69120 Heidelberg; 5) Institut für Hämatopathologie, Universitätsklinikum

Schleswig-Holstein Campus Kiel, Niemannsweg 11, D-24105 Kiel.

*beide Autoren haben gleichermaßen beigetragen

Strukturelle Aberrationen des kurzen Arms von Chromosom 2 inklusive Zugewinnen der Region 2p12-16 sind rekurrente Veränderungen in Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS) Zellen des klassischen M. Hodgkin (cHL). Da diese Zugewinne mit einer erhöhten Kopienzahl des REL Onkogens einhergehen, untersuchten wir die c-Rel Protein Expression in einer Serie von 30 cHL mit bekanntem REL Gen-Status, der durch vergleichende genomische Hybridisierung und Interphasezytogenetik bestimmt worden war. Die Expression des c-Rel Proteins wurde immunhistologisch in 26 Biopsien untersucht. Unterschiedliche Färbemuster mit fehlender, zytoplasmatischer, und/oder nukleärer Färbung wurden in HRS Zellen nachgewiesen. Alle 13 Biopsien mit zusätzlichen Kopien des REL Locus zeigten eine nukleäre Färbung von c-Rel, während 13 Biopsien ohne 2p Zugewinne eine signifikant niedrigere Proportion oder Negativität hinsichtlich einer nukleären c-Rel Färbung zeigten. Mittels kombinierter Immunphänotypisierung und Interphasezytogenetik konnte ebenfalls gezeigt werden, dass REL Zugewinne mit nukleärer c-Rel Akkumulation einhergehen. Zusätzlich konnte in zwei cHL mit Translokationsbruchpunkten in 2p13-16 eine nukleäre Färbung von c-Rel nachgewiesen werden. Dabei wurde in einem cHL ein Färbemuster beobachtet, welches auf ein trunkiertes c-Rel Protein hinweist. Die Korrelation zwischen strukturellen Aberrationen des REL Locus und der nukleären Akkumulation von c-Rel weist auf REL als ein Zielgen der wiederkehrenden 2p Zugewinne in cHL hin. Die Daten suggerieren, dass REL Aberrationen einen genetischen Mechanismus zur konstitutiven Aktivierung von NF- κ B/Rel in cHL darstellen. Unterstützt durch: Tumorzentrum Heidelberg/Mannheim (I.I.2.), Deutsche Krebshilfe (70-2859-Ba2), Landesforschungsschwerpunkt Baden Württemberg D.1526.1.4, und das „Interdisziplinäre Zentrum für klinische Krebsforschung“.

A 7 Nachweis von zwei spezifischen Translokationen, t(8;22) und t(14;18), bei zwei Patienten mit B-zelligen Non-Hodgkin Lymphomen mit unterschiedlicher Histologie und Krankheitsverlauf

Koskela Susanna (1), Koller E. (2), Grüner H. (2), Nowotny H. (1), Reisner R. (2), Nader A. (3), Grill R. (3), Möstl M. (2), Knapp W. (4), Hopfinger G. (2), Pfeilstöcker M. (1)

1) Ludwig Boltzmann-Institut für Leukämieforschung und Hämatologie, Hanuschkrankenhaus, Heinrich-Collin-Straße 30, 1140 Wien. E-mail: koskela@gmx.at

2) 3. Medizinische Abteilung - Hanuschkrankenhaus, Wien

3) Pathologisches Institut - Hanuschkrankenhaus, Wien

4) Institut für Immunologie, Wien.

Das gleichzeitige Auftreten der bei follikulären Lymphomen spezifischen Karyotypanomalie t(14;18) und der für Burkitt-Lymphome spezifischen Aberration t(8;22) ist ein seltener zytogenetischer Befund bei Lymphomen. Die Mehrheit der bisher in der Literatur beschriebenen Fälle wurde als B-zellige akute lymphatische Leukämie oder Burkitt Leukämie/Lymphom klassifiziert. Zwei unserer Patienten wiesen gleichzeitig diese spezifischen Translokationen, sowie weitere zusätzliche Karyotypveränderungen auf. Bei ähnlichen immunhistochemischen

Befunden wurden jedoch histologisch verschiedene Lymphom-Entitäten diagnostiziert. Bei einem 64 Jahre alten Mann wurde im Dezember 2002 ein Burkitt-Lymphom bzw. eine ALL L3 festgestellt. Die Blasten im peripheren Blut zeigten als klonale Karyotypveränderung: 47,XY,dup(1)(q12q23)/(q12q34),del(1)(q41),+t(8;22)(q24;q11),t(14;18)(q32;q21). Die nachweisbare Tandemduplikation am langen Arm vom Chromosom 1 ist eine häufig zu beobachtende sekundäre Aberration bei Burkitt-like Lymphomen/ Leukämien. Bei einer 77-jährigen Frau wurde im Januar 2003 ein Non-Hodgkin Lymphom, follikulär Grad 3 diagnostiziert. Die Karyotypanalyse der Zellen einer Lymphknotenbiopsie ergab: 41-47,XX,der(3)inv(3?),der(4)(p,t(8;22)(q24;q11),+12,del(13)(q13q21),t(14;18)(q32;q21). Trisomie 12 und Deletion am 13q sind charakteristische sekundäre Veränderung bei diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen und follikulären Lymphomen. Die zytogenetischen Befunde unserer Patienten ermöglichen einen Einblick in die B-Zell-Onkogenese und zeigen die Bedeutung der Karyotypanalyse bei lymphatischen Systemerkrankungen auf.

A 8 Zytogenetische Charakterisierung der Mantelzell-Lymphom-Zelllinie GRANTA-519 mittels Spektraler Karyotypisierung (SKY)

Rudolph Cornelia (1), Steinemann D (1), von Neuhoff N (1), Wilkens L (1), Emura M (1), Drexler HG (2), Schröck E (3), Schlegelberger B (1)

1) Institut für Zell- und Molekularpathologie, Medizinische Hochschule Hannover
2) DSZM, Braunschweig
3) Institut für Medizinische Genetik, Charité, Berlin

Die detaillierte zytogenetische Charakterisierung humaner und Maus-Tumoren ist unabdingbar für das Auffinden der für diese Erkrankungen relevanten Gene. Die oft komplexen Karyotypen sind allein mit herkömmlichen Bänderungstechniken meist nur unzureichend auflösbar und erfordern weiterführende Untersuchungen. SKY, als neue molekularzytogenetische Technik, erlaubt die simultane Darstellung und Differenzierung aller humanen und Maus-Chromosomen. Dadurch wird eine im Vergleich zur Bandendarstellung detailliertere chromosomale Interpretation möglich. Wir demonstrieren die Aussagekraft von R-Bänderung, SKY und FISH anhand der Mantelzell-Lymphom-Zelllinie GRANTA-519 mit der charakteristischen Translokation t(11;14)(q13;q32). Die Kombination der genannten Techniken ermöglichte uns, die bereits von Jadayel et al. (1997) beschriebenen Rearrangements zu spezifizieren und weitere Veränderungen aufzudecken. So zeigen wir klonale chromosomale Veränderungen in 1p, 1q, 3cen, 9p, 11q, 12p, 12q, 13q und 17p, sowie eine Amplifikation in 18q, in die das BCL2 Gen involviert ist. Unsere Ergebnisse bilden die Basis für molekulargenetische Analysen zur Identifizierung neuer Kandidatengene und für weiterführende funktionelle Untersuchungen in deletierten oder amplifizierten Regionen, die zum Verständnis hämatologischer Erkrankungen beitragen.

A 9 Die prognostische Bedeutung einer erhöhten MALT1 Gendosis bei t(11;18)-negativen gastrointestinalen B-Zell-Lymphomen

Erdel, Martin (1); Tzankov, A. (2); Dirnhofer, S. (3); Fend, F. (4); Siebert, R. (5); Krugmann, J. (2)

1) Institut für Medizinische Biologie und Humangenetik, Innsbruck, Austria
2) Institut für Pathologie, Innsbruck, Austria

3) Institut für Pathologie, Basel, Schweiz

4) Institut für Pathologie, München, Deutschland

5) Institut für Humangenetik, Kiel, Deutschland

Im Gegensatz zu dem niedrigmalignen MALT-Lymphom mit der charakteristischen Translokation (11;18)(q21;q21) (API2/MALT1-Rearrangement) repräsentieren die t(11;18) negativen Vertreter des gastrointestinalen B-Zell-Lymphoms eine heterogene Gruppe mit niedrig- bis hochmalignen Formen. Zu den häufig beschriebenen chromosomalen Veränderungen dieser Gruppe gehört unter anderem die Trisomie 18. Die dadurch verursachte Überrepräsentierung des MALT1 Genlokus auf 18q21 wie auch eine kürzlich beschriebene MALT1 Deregulation aufgrund von Amplifikation werden neben den bekannten MALT1-Rearrangements als alternativer Mechanismus der MALT1 Aktivierung vermutet. Um retrospektiv die Häufigkeit und prognostische Bedeutung einer erhöhten MALT1-Gendosis mit gut dokumentierten Verlaufsdaten zu korrelieren, wurde eine MALT1-spezifische Interphase-FISH an isolierten Zellkernen archivierter Tumorresekte von gastrointestinalen B-Zell-Lymphomen durchgeführt. In 7 (24%) der 29 untersuchten t(11;18) negativen Lymphome fand sich eine Trisomie 18 (n=3) oder eine partielle Trisomie 18q21 (n=4), d.h. allen gemeinsam war zumindest eine Trisomie des 18q21 MALT1 Genlokus. Während eine Trisomie 18q21 etwa gleichhäufig in der niedrigmalignen (2/10) und der hochmalignen Gruppe (5/19) zu finden war, zeigte sich eine signifikant kürzere krankheitsbedingte Überlebenszeit der Patienten bei Trisomie 18q21 im gesamten Tumorkollektiv (p=0,0458), als auch in der hochmalignen Untergruppe (p=0,0447). Diese Daten präsentieren eine partielle Trisomie 18q als schlechten Prognosefaktor bei den gastrointestinalen B-Zell-Lymphomen, mit MALT1 als wahrscheinlichem Kandidatengen.

A 10 Deletionen von HLA-Klasse II-Genen in der Chromosomenbande 6p21 bei primären Lymphomen des zentralen Nervensystems

Zühlke-Jenisch, Reina (1); Montesinos-Rongen, M (2); Mungall, A (3); Martin-Subero, JI (1); Geske, S (1); Schaller, C (4); Van Roost, D (4); Wiestler, OD (5); Deckert, M (2); Siebert, R (1)

1) Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel, Kiel; 2) Institut für Neuropathologie, Universität Köln, Köln; 3) The Wellcome Trust Sanger Centre, Hinxtun, UK; 4) Klinik für Neurochirurgie, Universität Bonn, Bonn; 5) Institut für Neuropathologie, Universität Bonn, Bonn.

Email: rsiebert@medgen.uni-kiel.de

Primäre Lymphome des zentralen Nervensystems (PCNSL) gehören zur heterogenen Gruppe der diffus-großzelligen B-Zell-Lymphome (DLBCL). Im Gegensatz zu extrazerebralen DLBCL ist über die molekularen Mechanismen, die der Pathogenese von PCNSL insbesondere bei immunkompetenten Patienten zugrunde liegen, nur wenig bekannt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass bei über der Hälfte der DLBCL, die in den immprivilegierten Organen ZNS und Hoden auftreten, aber nur in etwa 10% der nodalen DLBCL ein Verlust der HLA-Expression nachweisbar ist. In einem Teil der Fälle war der Verlust der HLA-Expression mit Deletionen im HLA-Gencluster in 6p21, insbesondere Deletionen der HLA-Klasse II-Gene assoziiert. Da bisher insgesamt nur weniger als ein Dutzend PCNSL hinsichtlich solcher Deletionen untersucht wurden, haben wir FISH-Analysen mit zwei Sonden für

die HLA-Klasse II Gene DQA1 und DRA an stereotaktisch gewonnenen Biopsien von 19 PCNSL durchgeführt. Als Kontrolle diente eine Zentromerprobe für das Chromosom 6. Deletionen beider Gene konnten in 5 der 19 PCNSL nachgewiesen werden. In einem PCNSL fand sich eine Deletion, die nur mit der Sonde für HLA-DQA1 nachweisbar war. Insgesamt wurden somit Verluste der untersuchten HLA-Klasse II Gene in 6 von 19 PCNSL detektiert. 2 der 6 Deletionen waren durchgehend biallelisch (homozygot). Unsere Befunde legen nahe, dass ein signifikanter Anteil von PCNSL Deletionen der HLA-Klasse II Gene aufweist. Welche pathogenetische Bedeutung der Verlust der HLA-Expression bei PCNSL bzw. DLBCL in immprivilegierten Organen besitzt, muss durch künftige Untersuchungen geklärt werden.

Gefördert durch die Deutsche Krebshilfe (10-1641-De 1)

Session: Lymphome 2

A 11 Identifizierung zytogenetischer Subgruppen und chromosomaler Pathways bei Plasmazytomen, Mantelzelllymphomen und follikulären Lymphomen durch multivariate statistische Analysen

Sáez, Borja (1,2); Martín-Subero, J.I. (1); Höglund, M. (3); Guillen, F. (4); Harder, L. (1); Calasanz, M.J. (2); Horsman, D. (5); Siebert, R (1)

1) Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel, Kiel, Deutschland; 2) Department of Genetics, University of Navarra, Pamplona, Spain; 3) Department of Clinical Genetics, University of Lund, Sweden; 4) Department of Health Sciences, Public University of Navarra, Pamplona, Spain; 5) British Columbia Cancer Agency, Vancouver, Canada

Email: rsiebert@medgen.uni-kiel.de

Konventionelle Untersuchungen zur pathogenetischen oder klinisch-prognostischen Bedeutung zytogenetischer Befunde bei malignen Tumoren betrachten in der Regel lediglich die An- und Abwesenheit individueller chromosomaler Aberrationen. Dabei bleibt weitgehend unberücksichtigt, ob die entsprechende Aberration die einzige Veränderung des Tumorklons oder aber Teil eines komplexen Karyotyps ist. Eine systematische Betrachtung, welche Chromosomenaberrationen regelmäßig oder aber quasi nie gemeinsam auftreten, erfolgt ebenfalls zumeist nicht. Einen umfassendere Analyse chromosomaler Pathways bei malignen Tumoren ist durch die Anwendung multivariater statistischer Methoden möglich, wie sie z.B. auch zur Identifizierung komplexer Muster bei CHIP-basierten Genexpressionsanalysen Anwendung finden. So konnten Höglund und Mitarbeiter (2001) chromosomale Wege der klonalen Evolution durch Principal Component Analysen (PCA) identifizieren. Im Rahmen verschiedener Studien haben wir PCA- und hierarchische Cluster-Analysen für genomische Imbalancen bei lymphatischen Neoplasien der B-Zell-Reihe durchgeführt, wobei sowohl in unseren eigenen Arbeitsgruppen erhobene Befunde als auch publizierte Karyotypen eingeschlossen wurden. Die Analyse von 43 zytogenetischen Variablen bei 276 Plasmazytomen mit aberrantem Karyotyp identifizierte mit verschiedenen Algorithmen zwei zytogenetische Hauptgruppen von Plasmazytomen. Die Cluster-Analyse der Karyotypen von 49 t(11;14)-positiven Mantelzelllymphomen konnte aufgrund der sekundären Chromosomen-

Veränderungen vier Subgruppen definieren, welche auch in einer Metaanalyse von CGH-Karyotypen aus vier publizierten Studien durchaus reflektiert wurden. Ähnlich konnten durch Principal Component Analysen bei follikulären Lymphomen verschiedene Wege der klonalen Evolution identifiziert werden. Die multivariate Karyotyp-Analysen bieten nicht nur neue Einblicke in das Verständnis der klonalen Evolution lymphatischer Neoplasien, die durch die Analysen definierten zytogenetischen Subgruppen können jetzt auch hinsichtlich ihrer klinisch-prognostischen Relevanz evaluiert werden.

A 12 Neue FISH-Sonden zum Nachweis von B-Zell-Neoplasien

Fiedler, Eveline

Abbott GmbH & Co. KG, Diagnostika, Max-Planck-Ring 2, Delkenheim, 65205 Wiesbaden; e-mail: eveline.fiedler@abbott.com

Die klassische Technik zum Nachweis von Neoplasien ist die Chromosomen-bänderungsanalyse von Kurzzeitkulturen. Probleme bei der Analyse der CLL bereiten die niedrige in-vitro-Mitoserate und die häufig suboptimale Qualität der Chromosomen. Durch die Entwicklung molekularzytogenetischer Techniken, wie der FISH, konnte die Diagnostik genetischer Aberrationen in den Tumorzellen erheblich verbessert werden. Mit Hilfe der Chromosomenbänderung wurden bisher als häufigste Aberrationen bei der CLL die Trisomie 12, Deletionen und seltener Translokationen in 13q, Deletionen 6q, 11q, 17p, partielle oder komplette Trisomien 3 und Translokationen mit Bruchpunkt in der Bande 14q32 beschrieben. Durch die Anwendung von FISH-Sonden in großen Patientenaufkommen wurde deutlich, dass genetische Veränderungen bei der CLL viel häufiger als angenommen auftreten. Die häufigste Aberration ist die Deletion 13q14 (~50%), gefolgt von der Deletion 11q22-q23 (ATM-Gen), der Trisomie 12 und der Deletion 17p13 (p53-Gen). Damit gehören chromosomale Veränderungen zu den wichtigsten, unabhängigen Prognoseparametern bei der CLL. P53-Deletionen sind mit negativer Prognose und Therapieversagen, sowohl bei standardcytotoxischer als auch monoklonaler Antikörpertherapie (Rituximab), verbunden. Bei Patienten mit Deletionen 13q14 und 11q22.3 hingegen beobachtet man ein hohes Ansprechen auf eine Rituximab-Behandlung. Abbott Diagnostics bietet jetzt einen „CLL Probe Panel“ für die hämatologische Diagnostik an, bei dem mit Hilfe von fünf direkt-markierten FISH-Sonden, und zwar LSI p53 (17p13.1), LSI ATM (11q22.3), LSI D13S319 (13q14.3), LSI 13q34 und CEP 12 (12p11.1-q11) eine simultane Detektion aller fünf wichtigen Chromosomenbereiche in nur zwei Hybridisierungen möglich ist. Somit wird eine schnelle und zuverlässige hämatologische Diagnostik gesichert, um Voraussagen über Prognose und Therapieerfolg zu ermöglichen.

A 13 Interphase-FISH Screening nach Monosomie 13 bzw. Deletionen in 13q14 und 14q32 involvierenden Translokationen in 31 Multiplen Myelom-Patienten

Wieland, Claudia (1), Schneider, P. (2), Fenk, R. (2), Hildebrandt, B. (1), Redmann, A. (1) und Royer-Pokora, B. (1)

1) Institut für Humangenetik und Anthropologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Universitätsstr. 1, D-40225 Düsseldorf; 2) Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Moorenstrasse 5, D-40225 Düsseldorf, Claudia.Wieland@uni-duesseldorf.de, royer@uni-duesseldorf.de

Das Ziel unserer Arbeit bestand darin, Deletionen in der Region 13q14, sowie Monosomie 13 und 14q32 involvierende Translokationen bei multiplen Myelom (MM)-Patienten zu identifizieren. Wir haben eine Gruppe von 31 selektionierten MM-Patienten mit einem Plasmazellanteil von >20% klassisch zytogenetisch untersucht. Davon wurden dann Patienten ohne zytogenetisch sichtbare Aberrationen, der Chromosomen 13 und 14 mit BAC-Proben aus den Regionen 13q14 (D13S272 und D13S319) und einer 13q Telomerprobe sowie 14q32-Proben mittels Interphase Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung analysiert. Es wurde eine detaillierte genomische Karte der Region 13q14.2-3 etabliert. Die 31 selektionierten MM-Knochenmark (KM)-Proben des ersten Aspirates wurden mit 4 BAC-Klonen aus dieser Region je einzeln, in Kombination mit einer 13q-Telomerprobe mittels Interphase-FISH analysiert. Dafür wurden Methanol/Essigsäure fixierte KM-Proben verwendet. Pro Hybridisierung wurden mindestens 300 Kerne ausgezählt. Alle BAC-Klone wurden vorher auf Präparate von vier Kontrollpersonen hybridisiert um den „cut off“-Wert zu bestimmen. 11 Patienten von 31 (35,5%) wiesen eine klonale Monosomie oder eine klonale terminale, 13q14 einschließende Deletion auf. 1 Patient von 31 (3,2%) zeigte eine klonale interstielle Deletion in 13q14 die mindestens 1,9 Mb groß ist. Zusätzlich wurden mit BAC-Proben aus der variablen und konstanten IGH-Region (Immunoglobulin heavy chain-Region) in 14q32.3 nach 14q32 beteiligten Translokationen gesucht. Diese Interphase-FISH-Untersuchungen wurden am gleichen Patientenmaterial wie die 13q14-FISH-Analysen durchgeführt. 9 (29%) von den 31 selektionierten MM-Patienten wiesen eine 14q32 involvierende Translokation auf. 2 Patienten hatten eine monoallelische Deletion der konstanten IGH-Region. Somit wiesen insgesamt 11 von 31 Patienten (35,5%) eine 14q32 involvierende Veränderung auf. Zusammengefasst hatten von den 31 MM-Patienten insgesamt 17 (55%) eine Veränderung. Davon hatten 12 Patienten (38,7%) eine Veränderung an Chromosom 13. Von diesen hatten 7 Patienten eine schlechte klinische Prognose. 11 Patienten (35,5%) hatten eine 14q32 involvierende Veränderung. Zu diesen beiden Gruppen gehörten 5 Patienten, die beide Aberrationen aufwiesen und alle eine klinisch schlechte Prognose hatten. Diese Daten sprechen dafür, dass das gleichzeitige Vorkommen von Monosomie 13 und 14q32 involvierenden Veränderungen bei MM mit einer schlechten Prognose korrelieren. Ob die geringe Überlebenszeit bei dem Vorhandensein einer Monosomie 13 durch das zusätzliche Auftreten einer 14q32 involvierenden Translokation noch vermindert wird, wie in dieser Studie bei 16,1% der Patienten der Fall war, muss noch gezeigt werden. Weiterhin lassen die Ergebnisse vermuten, dass Deletionen in der Region 13q14 bei MM nur sehr selten auftreten und das es sich bei den meisten Aberrationen des Chromosoms 13 um eine Monosomie 13 handelt.

Zur Zeit werden die Daten noch statistisch ausgewertet.

A 14 Interphase-FISH in der CLL Diagnostik Ein Zwischenbericht aus der Schweiz

Wenzel Friedel (1), Jenni Sandra (1), Etter Lydia (1), Buser Andreas (2), Meyer-Monard Sandrine (2), Tichelli André (2), Miny Peter (1)

1) Abt. Medizinische Genetik, Universitätskinderhospital beider Basel, Basel, Schweiz; 2) Abt. Hämatologie, Kantonsspital Basel, Schweiz

Die zytogenetische Untersuchung bei CLL Patienten ist oft beeinträchtigt durch geringe oder fehlende mitotische Aktivität, durch eingeschränkte Qualität der Chromosomen sowie der Ungewissheit über den klonalen Ursprung der gefundenen Metaphasen. Seit Ende 2001 haben wir in Anlehnung an Döhner (2000) die zytogenetische Untersuchung durch ein Interphase-FISH-Screening an Interleukin-stimulierten 72h-Kulturen ergänzt. Eingesetzt werden dabei kommerziell erhältliche Sonden der Firmen Vysis, QBiogene und Cytocell. Aktuell wird zu jedem untersuchten Locus eine chromosomenspezifische Kontrollsonde co-hybridisiert. Von den bisher untersuchten 70 CLL-Patienten war bei 11 Patienten keine konventionelle Chromosomenanalyse möglich (16%), 52 Patienten zeigten einen normalen Chromosomensatz (74%) bei z.T. reduzierter Metaphasenzahl und 7 Patienten auffällige Chromosomensätze (10%). Letztere waren nur teilweise CLL-typisch. Nach Interphase-FISH konnte bei 53 der 70 CLL-Patienten eine auffällige Signalverteilung (76%) festgestellt werden. Als häufigste Anomalie wurde eine del13q14 gefunden (36 Patienten/51%); dabei konnte unterschieden werden zwischen Deletionen, die die beiden Loci D13S25 und D13S319/D13S272 betreffen, und Deletionen, bei denen zusätzlich auch der RB1-Locus betroffen war, sowie Nullisomien bezüglich D13S25 und D13S319/D13S272 (5 Patienten). Als weitere Chromosomenstörungen wurden gefunden: del11q22 (ATM2, cep 11) (10 von 63 untersuchten Patienten; 16%), tris12 (GLI3, cep12) (9 von 70 Patienten; 13%), del17p13 (p53, cep17) (6 von 70 Patienten; 9%), del6q21 (6q21, cep 6) (1 von 9 Patienten; 11%), amp8q24 (c-myc, cep 8) (5 von 70 Patienten; 7%) und tris3 (hTERC, cep 3) (2 von 70 Patienten; 3%). Fälle mit Trisomien zeigten sowohl für die locuspezifische als auch die zentromerspezifische Sonde jeweils 3 Signale pro Kern, was auf eine vollständige Trisomie hinweist. Bei der amp8q24 fanden sich dagegen zwischen 3 und 5 c-myc-Signale bei jeweils 2 cep8-Signalen (Kontrolle). Bisher wurden keine t(11;14)(CCND1;IGH) und t(14;18)(IGH;BCL2) nachgewiesen. In einem Fall konnte allerdings ein Bruch im IGH-Locus (14q32) gezeigt werden. 16 Patienten (23%) zeigten multiple Signalauffälligkeiten nach Interphase-FISH. Pathologische Befunde liessen sich auch an unstimulierten sowie PHA-stimulierten Parallelkulturen mit teilweise leicht abweichenden Häufigkeiten nachweisen. 8 von 10 Patienten mit einem pathologischen Interphase-FISH-Befund zeigten normale Metaphasen nach FISH. Das beschriebene Interphase-FISH-Screening gilt als Ergänzung zur zytogenetischen Untersuchung bei CLL-Patienten und findet damit auch direkten Eingang in die Therapieansätze der Betroffenen. Offene Fragen aus Sicht der Genetik: Auswahl des Untersuchungsmaterials (v.a. bei Verlaufskontrollen), Wahl der Kulturansätze, alternative Kulturstimulationen zur Verbesserung der mitotischen Aktivität u.a. Döhner et al (2000): Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *New Engl J of Med* 343 (16), 1910-1916

A 15 Interphase-FISH zum Nachweis von Deletionen in der Chromosomenbande 13q14 bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) mit einem Set kommerzieller Microsatelliten-Marker
 Mohr, Brigitte; Schäkel U, Prange-Krex G, Oelschlägel U, Ehninger G, Bornhäuser M
Universitätsklinikum „Carl Gustav Carus“ Dresden, Medizinische Klinik und Poliklinik I, Fetscherstr. 74, 01307 Dresden
 mohr@mk1.med.tu-dresden.de

Bei Patienten mit CLL sind Interphase-FISH-Analysen ein wichtiger Bestandteil in der Untersuchung von Chromosomenaberrationen. Deletionen im langen Arm von Chromosom 13, Bande 13q14, gehören zu den häufigsten Veränderungen. In einer größeren Studie (Döhner et al. N Engl J Med 2000) konnte unter Verwendung von Proben für RB1 und den Microsatelliten-Marker D13S25 gezeigt werden, dass eine 13q14-Deletion mit einer guten Prognose assoziiert ist. Dies trifft vor allem dann zu, wenn es sich um eine singuläre Aberration handelt. Die Größe des deletierten 13q14-Segmentes ist bei den einzelnen Patienten verschieden (Bullrich et al. Blood 1996). Anzahl und Art der involvierten Microsatelliten-Marker sind variabel, so dass sich für die CLL-Diagnostik die Frage nach einem optimalen DNA-Probenstet zum Nachweis oder Ausschluss einer 13q14-Deletion stellt. Dazu wurden bei 31 Patienten (Alter: Median / Range = 59 / 43 bis 73 Jahre) mit bekannter 13q14-Deletion retrospektiv die kommerziell verfügbaren Loci RB1, D13S319, D13S272 und D13S25 (Testumfang: 3 Loci pro Patient im Median) eingesetzt. Häufig waren zwei Microsatelliten (n=17 Pat.) von der Deletion betroffen. Drei Deletionen wurden bei 9 und vier Deletionen bei 3 Patienten gesehen. Bei einem Patienten war nur einer der vier Loci (RB1) betroffen. Ein Patient hatte eine Monosomie 13. Die Wahrscheinlichkeit, eine 13q14-Deletion zu erkennen, war mit den einzelnen DNA-Proben unterschiedlich:

| | RB1 | D13S319 | D13S272 | D13S25 |
|--|-------|---------|---------|--------|
| Anzahl Tests/ Anzahl Deletion | 27/14 | 31/29 | 11/10 | 26/22 |
| Wahrscheinlichkeit Nachweis Deletion | 0,52 | 0,94 | 0,91 | 0,85 |
| Anzahl Tests/ bialelele Deletion | 27/1 | 31/9 | 11/1 | 26/4 |
| Häufigkeit Nachweis bialelele Deletion | 0,04 | 0,29 | 0,09 | 0,15 |

Der Mikrosatellit D13S319 war am häufigsten sowohl von den mono- als auch biallelen Deletionen betroffen. Zusatzaberrationen wurden bei 32% (10/31) der Patienten nachgewiesen. Die bialelele 13q14-Deletion (n=9 Patienten) war in zwei Fällen (2/9=22%) mit einer Zusatzaberration gekoppelt. Insgesamt 5 Patienten (16%) hatten eine p53-Deletion. Zusammenfassend ist ein Set aus den Microsatelliten D13S319 und RB1 für das Screening nach 13q14-Deletionen zu empfehlen, wobei eine sequenzielle Analytik, beginnend mit D13S319, am sinnvollsten erscheint. Bei allen untersuchten Patienten (n= 31) wären diese Proben ausreichend gewesen, um mono- oder bialelele 13q14-Deletionen zu erfassen.

A 16 Interphase-Cytogenetik der chronisch lymphatischen Leukämie (B-CLL) - Korrelation mit ZAP-70 mRNA-Expression
 Krömer; Elisabeth (1); Heintel, D. (2); Gaiger, A. (2); Jäger, U (2); Fonatsch, C. (1)

1) Institut für Medizinische Biologie der Universität Wien, Österreich
2) Universitätsklinik für Innere Medizin I, AKH Wien, Österreich

E-mail: elisabeth.kroemer@univie.ac.at

Die chronisch lymphatische Leukämie (B-CLL) ist die häufigste bei Erwachsenen diagnostizierte Leukämieform. Aufgrund des charakteristisch niedrigen Proliferationsindex ist die Chromosomenbandenanalyse aus unstimulierten Kulturen nur in 40-50% der Fälle erfolgreich. Da sich einige B-CLL-spezifische Chromosomenaberrationen als wichtige unabhängige Prognosefaktoren erwiesen haben, ist es für ein Risiko-adaptiertes klinisches Management der Patienten von großer Bedeutung, bei Diagnosesstellung eine cytogenetische Analyse mittels Interphase-FISH durchzuführen. Wir haben mononukleäre Zellen von 60 CLL-Patienten auf folgende Aberrationen untersucht: Deletionen der Chromosomenbanden 13q14 (RB1-Gen bzw. D13S272-Locus), 11q22-23 (ATM-Locus) und 17p13 (p53-Gen), Trisomie 12 bzw. der Bande 12q13 und Translokationen mit Bruchpunkt in 14q32 (IgH-Gen). Mit diesem Sonden-Panel konnten wir in knapp 80% der Fälle Anomalien nachweisen: eine Aberration in 48%, zwei Aberrationen in 41% und drei Aberrationen in 11% der Patienten mit Chromosomenveränderungen. Die häufigste Anomalie war die Deletion in 13q14, gefolgt von der Deletion in 11q22-23 und der Trisomie 12. In rezenten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression des IGTVH-Gen Mutationsstatus anzeigenden Markerproteins ZAP-70 signifikant mit der prognostischen Bedeutung der beobachteten Chromosomenaberrationen korreliert und somit einen weiteren potentiellen Prognosefaktor für die B-CLL darstellt.

A 17 Altersabhängige Telomerverkürzung beim Menschen in vivo

Mayer, Susanne; Brüderlein, S.; Ciloglu, N.; Waibel, I.; Holdenried, A.; Fay, R.; Perner, S.; Möller, P.

Institut für Pathologie, Universität Ulm, Albert-Einstein-Allee 11, D-89081 Ulm. Abteilung Neuroinformatik, Universität Ulm, Albert-Einstein-Allee 11, D-89081 Ulm.
 E-mail: silke.brüderlein@medizin.uni-ulm.de

Telomere sind repetitive Sequenzen an den Enden linearer eukaryontischer Chromosomen, die beim Menschen aus Wiederholungen der Hexanukleotidsequenz TTAGGG bestehen. In vitro verkürzen sich die Telomere normaler Zellen mit jeder Teilung um etwa 100 Basenpaare, so dass nur eine begrenzte Anzahl von Zellzyklen durchlaufen werden kann. Unterschreitet die Telomerlänge eine kritische Grenze, wird nach allgemeiner Ansicht die Seneszenz der Zellen ausgelöst. Auch in vivo vermutete man lange einen Zusammenhang zwischen Altern und Telomerverkürzung. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, untersuchten wir Phytohämagglutinin-stimulierte periphere Blutlymphozyten von null- bis hundert-jährigen Probanden. Für die Messungen wurde das Telomermessprogramm der Firma MetaSystems verwendet, mit dem die Telomere jedes einzelnen Chromosomes isoliert erfasst werden. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, werden aus den Absolutwerten unter Zuhilfenahme einer Referenzsonde relative Werte, sogenannte T/C-Werte, berechnet. Eine

Gerade, die durch Southern-Blot-Analyse ermittelt wurde, ermöglicht es zudem, dass diese relativen Werte der Basenzahl zugeordnet werden können, aus der sich die betrachteten Telomere zusammensetzen. Diese Gerade lässt sich durch die Formel $y = 2507 + 204 \cdot x$ beschreiben, wobei y die Anzahl der Basen und x den T/C-Wert darstellt. Die Untersuchungen zeigten, dass der T/C-Wert mit zunehmendem Alter immer weiter absinkt. Während die Telomerlänge bei Säuglingen im Mittel 14 kb beträgt, erreicht sie bei 100-Jährigen durchschnittlich nur noch Werte von 5 bis 6 kb. Hieraus ergibt sich eine abfallende Kurve, welche deutlich von bereits publizierten Resultaten abweicht. Da diese Kurve keinen exponentiellen Verlauf mit steilestem Abfall in der Kindheit aufweist, scheint die Telomerverkürzung in vivo nicht direkt mit der Anzahl der Zellteilungen korreliert zu sein. Somit ist das „Hayflick-Phänomen“, das in vitro die Replikation begrenzt, in vivo offenbar nicht zuträffend.

Session: ALL

A 18 Spektrum rekurrenter chromosomaler Aberrationen bei der ALL der Erwachsenen: zytogenetische Befunde von 647 Studienpatienten der GMALL-Studie 05/93

Bradtke Jutta (1), Fonatsch, C. (2), Göckbuget, N. (3), Harder, L. (4), Heinze, B. (5), Schoch, C. (6), Hoelzer, D. (3), Rieder, H. (1)

1) Institut für Klinische Genetik, Philipps-Universität Marburg, bradtke@med.uni-marburg.de;

2) Institut für Medizinische Biologie, Wien, Österreich; 3) Universitätsklinikum Frankfurt/M.;

4) Institut für Humangenetik, Kiel; 5) Klinik für Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Ulm; 6) Labor für spezielle Labordiagnostik,

Universitätsklinikum München Großhadern

Die akute lymphatische Leukämie ist mit einer Inzidenz der Neuerkrankungen von ca. 1/100000 Personen eine bei Erwachsenen eher seltene Erkrankung. Der Anteil an Patienten mit chromosomalen Aberrationen liegt bei etwa 50-85 %. Am häufigsten und von höchster prognostischer Relevanz ist die Philadelphia-Translokation. Im Rahmen der Deutschen multizentrischen Therapiestudie der ALL der Erwachsenen 05/93 wurden im Zeitraum 01/93 bis 10/99 insgesamt 647 ALL-Patienten zytogenetisch untersucht. Das Spektrum und die Häufigkeit wiederkehrender chromosomaler Rearrangements und numerischer Aberrationen wurden mittels einer vereinfachten computerlesbaren zytogenetischen Notation (SCCN) und geeigneter Software analysiert. Von 647 Patienten hatten 270 (41,7%) einen normalen und 310 Patienten (47,9%) einen aberranten Karyotyp. Bei 67 Patienten (10,4%) konnte kein verwertbarer Chromosomenbefund erstellt werden. Von den 310 Patienten mit aberrantem Karyotyp waren 155 (50%) pseudodiploid, 42 (13,6%) hypodiploid, 64 (20,7%) hyperdiploid (47-50 Chromosomen), 36 (11,6%) hoch-hyperdiploid (51-65 Chromosomen), 7 (2,3%) nahezu triploid (66-80 Chromosomen) und 6 nahezu tetraploid (>80 Chromosomen). Eine Philadelphia-Translokation konnte bei 35,5% (110) der Patienten mit aberrantem Karyotyp nachgewiesen werden. Zusatzaberrationen waren in 59,1% dieser Patienten vorhanden. Eine t(4;11)(q21;q23) lag bei 21 Patienten vor (6,8%), davon bei 5 Patienten in Kombination mit weiteren Aberrationen. Translokationen unter Beteiligung von 8q24 wurden bei 9 Patienten ge-

funden (2,9%), davon hatten 6 Patienten eine t(8;14)(q24;q32). Eine t(1;19)(q23;p13) hatten 4 Patienten (1,3%), eine t(10;14)(q24;q11) hatten 3 (1,0%). Bei 40 Patienten (12,9%) konnte ein Verlust von 9p, hervorgerufen u.a. durch i(9)(q10), del 9p oder dic(9;*), beobachtet werden. Deletionen von 6q oder 12p fanden sich bei 14 (4,5%) bzw. 6 (1,9%) Patienten. Eine Trisomie 21 konnte in 25 Fällen (8,1%); eine Trisomie 8 bzw. Monosomie 7 konnte bei je 16 Patienten (5,2%) mit hyperdiploidem Chromosomensatz gefunden werden. Hoch-hyperdiploide bis tetraploide Karyotypen wurden bei 49 Patienten gefunden (15,8%); bei 14 in Verbindung mit einer Ph-Translokation und bei 25 ohne eine gleichzeitige strukturelle Aberration. 139 Patienten (44,8%) hatten einen Aberrationsgrad (Summe der Aberrationsereignisse) von 1, 70 (22,6%) von 2 und 93 (30,0%) von >2 inkl. der Fälle mit hochhyperdiploidem Karyotyp. Ein komplex aberranter Karyotyp (Aberrationsgrad ≥ 3 , davon ≥ 1 strukturelle Aberration) fand sich bei 78 Patienten (25,2%). Davon hatten 30 (38,5%) eine Philadelphia-Translokation. Bei 48 Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp wurden weder eine t(9;22) noch eine t(4;11) gefunden. Insgesamt betrachtet konnten wir die bei der ALL der Erwachsenen typischen Aberrationen in bisher beschriebenen Häufigkeiten wiederfinden. Wir konnten erstmals zeigen, dass ein nennenswerter Anteil der Patienten komplexe Karyotypveränderungen aufweist.

A 19 „Jumping“ Translokation von Chromosom 1q bei einem Patienten mit bcr/abl-positiver ALL

Pelz Antje-Friederike (1), Müller Gerd (2), Weilepp Gisela (1), Wieacker Peter (1)
1) Institut für Humangenetik der Otto von Guericke Universität Magdeburg, Leipziger Strasse 44, D-39120 Magdeburg

2) Gemeinschaftspraxis für Hämatologie und Internistische Onkologie Magdeburg, Hasselbachplatz 2, D-39104 Magdeburg

„Jumping“ Translokationen (JT) sind seltene chromosomale Auffälligkeiten, bei denen ein spezifisches chromosomales Segment an die Enden unterschiedlicher Chromosomen transloziert wird. Dabei ist die Region distal von 1q21 bevorzugter Donor. JT mit Teilen des langen Arms von Chromosom 1 (1q) sind mit einer schlechten Prognose assoziiert. Wir berichten über einen 72-jährigen Patienten mit bcr/abl-positiver akuter lymphatischer Leukämie (c-ALL, FAB L2) sowie weiteren strukturellen und numerischen chromosomalen Auffälligkeiten. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung konnten bei der konventionellen Chromosomenanalyse vier Zellklone mit 3 bis 4 Aberrationen ermittelt werden. Drei der vier Klone enthielten u.a. Aberrationen unter Beteiligung von 1q, die zu einer partiellen Trisomie bzw. Tetrasomie von 1q führten. Die partielle Trisomie 1q entstand durch eine JT von 1q auf die lange Arm vom Chromosom 3 bzw. 8, die partielle Tetrasomie 1q durch die Bildung eines Isochromosoms 1q. Bei einer Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) mit Chromosomenarm-spezifischen Sonden für 1p und 1q konnte dann ein dritter Klon mit einer partiellen Trisomie 1q ermittelt werden. Dabei entstand eine JT durch 1q auf Chromosom 22. Bei der Kontrolle zum Zeitpunkt des ersten Knochenmarkrezidivs, 9,5 Monate nach Diagnosestellung, waren mit der konventionellen Chromosomenanalyse keine JT-enthaltenden Klone, dagegen jedoch eine Duplikation 1q [dup(1)(q23q43)] nachweisbar. Der Patient verstarb im zweiten Rezidiv drei Monate später. Bisher für c-ALL-Patienten nicht beschrieben und somit das Besondere an dieser

Kasuistik ist: a) Die JT zwischen 1q und Chromosom 3, b) die JT zwischen 1q und Chromosom 22. Unser Patient liefert einen zusätzlichen Bericht über die bevorzugte Involvierung von 1q in JT und die damit verbundene Assoziation mit einer schlechten Prognose.

A 20 Die Inversion inv(19)(p13q13) bei Kindern mit prä-B-ALL führt zu einem heterozygoten gerichteten Bruch von E2A
Röttgers Silja (1), Bungaro Silvia (2), Harbott Jochen (1), Privitera Enrica (2), Biondi Andrea (3)

1) Universitätskinderklinik Giessen, Deutschland, 2) Dip.Genetica e Biologica Microorganismi, Università Milano, Italien, 3) M.Tettamanti Res. Centre, Università Milano-Bicocca, Italien
 e-mail: silja.roettgers@paediat.med.uni-giessen.de

Das Gen TCF3 (E2A) ist an verschiedenen chromosomalen Translokationen beteiligt, die zu malignen Erkrankungen der B-Reihe lymphoblastischer Zellen führen. Die bekanntesten sind die Translokationen t(1;19)(q23;p13) (PBX1/E2A) und t(17;19)(q22;p13) (HLF/E2A). Vor kurzem konnte bei Patienten mit prä-B-ALL ein neuer Translokationspartner dieses Gens identifiziert werden, das auf 19q13.4 lokalisierte TFB1 (FB1) Gen. Das homologe Gen bei Ratten, dessen Produkt („Amida“) ca. 90% Übereinstimmung mit dem von E2A codierten Protein aufweist, scheint Apoptose zu induzieren, wenn es in Zellkulturen überexprimiert wird. Seine Funktion beim Menschen ist bislang nicht geklärt. Wir haben Knochenmark bzw. Blut von 86 Kindern im Alter von 1,1 bis 16,9 Jahren (Median 4,2 Jahre) mit prä-B-ALL auf die inv(19) hin untersucht. Bei 16/86 Patienten (18,6%) konnte mittels RT-PCR ein E2A-FB1-Rearrangement nachgewiesen werden. Mit einem YAC Klon (902b2) der FB1 überspannt, wurde ein FISH-Assay etabliert. 12 von den 16 positiven Patienten konnten mit der FISH untersucht werden, bei 11 von ihnen konnte die inv(19) nachgewiesen werden. Die Klonegröße schwankte zwischen 13,0 und 68,5% (Median 36,5%), der Cut-off lag bei 10,6%. Um herauszufinden, ob aus der FB1-E2A Genfusion ein inkomplettes E2A Protein resultiert, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Es konnte kein verkürztes E2A codiertes Protein nachgewiesen werden. Das deutet darauf hin, dass eine FB1-E2A Genfusion zum Verlust einer E2A Allelfunktion führt. Im Mausmodell führt solch ein Verlust zu Hyperproliferation in Lymphoblasten mit pro-B-Phänotyp. Unseres Wissens wäre damit die inv(19) das erste Beispiel einer Aberration bei Leukämien von Kindern, die durch eine gerichtete Spaltung eines Onkogens zu dessen Haploinsuffizienz führt.

A 21 Retrospektive FISH-Analyse zum Nachweis einer AML1-Amplifikation bei Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL)

Reichelt, Carsten; Röttgers, S.; Bruch, J.; Teigler-Schlegel, A.; Harbott, J.
Onkogenetisches Labor, Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Giessen
 e-mail: carsten-reichelt@freenet.de

Chromosomale Aberrationen sind wichtige Parameter bei der Diagnose und Prognose von Leukämien. Meist handelt es sich dabei um balancierte Translokationen, und unbalancierte strukturelle (del, dup, add) oder numerische Veränderungen (Trisomien, Monosomien) sind eher selten. Bei akuten Leukämien im Kindesalter kommen Aberrationen, in die das Chromo-

som 21 oder das in 21q22 lokalisierte Onkogen AML1 involviert sind relativ häufig vor, wie beispielsweise bei den Translokationen t(12;21) bei ALL und t(8;21) bei AML, den jeweils häufigsten strukturellen Veränderungen in ihrer Gruppe oder als Trisomie (oft auch Tetra- oder Pentasomie) 21 bei hyperdiploiden Karyotypen. Eine AML1-Amplifikation wurde dagegen bisher selten beschrieben. Um die Häufigkeit dieser Aberration bei Kindern mit ALL festzustellen, wurde eine retrospektive Studie begonnen, mit der bei einer großen, einheitlich therapierten Gruppe von Kindern die Inzidenz und mögliche klinische Bedeutung dieser Veränderung festgestellt werden sollte. Weiterhin sollte untersucht werden, in welcher Form die Amplifikation vorliegt (z.B. Amplifikation des Gens, eines Chromosomenstücks, des ganzen Chromosoms). Zu diesem Zweck wurden Knochenmark oder peripheres Blut von 200 Patienten mit einer gesicherten, neudiagnostizierten ALL untersucht. Alle Proben wurden zwischen Januar und Dezember 2000 zur genetischen Diagnostik ins Onkogenetische Labor eingesandt. Ausgeschlossen von dieser Untersuchung wurden alle Proben bei den zuvor ein TEL/AML1-Rearrangements festgestellt worden war. Die benutzte Untersuchungsmethode war eine FISH-Analyse mittels LSI TEL/AML1 ES Dual Color Translocation Probe (Abbott, Wiesbaden). Ausgewertet wurden sowohl Inter- (jeweils 200 Kerne) als auch Metaphasen. Außerdem wurde im Fall einer Amplifikation ein Vergleich mit der klassischen Zytogenetik durchgeführt. In der laufenden Untersuchung konnte bei den ersten 135 Patienten zweimal die gesuchte Amplifikation nachgewiesen werden. Das entspricht einem Anteil von ca. 1,5%. Die zytogenetische Auswertung zeigte in beiden Fällen ein vergrößertes Chromosom 21. Zusätzlich konnten bei vier weiteren Patienten eine AML1-Amplifikation nachgewiesen werden. Diese waren aufgrund eines auffälligen Karyotyps (-21,+mar) ausgewählt worden. Bei den insgesamt sechs Patienten/innen mit Amplifikation handelt es sich um vier Jungen und zwei Mädchen und das Alter bei Erstdiagnose liegt zwischen 6,3 und 13,5 Jahren (Median: 8,5 Jahre). Da es sich bei der AML1-Amplifikation um eine seltene chromosomale Aberration handelt, sollen weitere Patienten gescreent werden, um Ergebnisse auf einer breiten Grundlage zu erhalten.

A 22 Die PAX5/ETV6 Fusion ist das molekulargenetische Äquivalent der dic(9;12)(p13;p13)

Margit König, S. Strehl und O.A. Haas
CCRI am St. Anna Kinderspital, Wien, Österreich; margit.koenig@stanna.at

Die dic(9;12)(p13;p13) findet man in knapp 1% aller kindlichen lymphoblastoiden Leukämien (ALL). Diese spezifische Veränderung kommt fast ausschließlich in prä-B-ALLs vor und ist im Gegensatz zu vielen anderen spezifischen Translokationen mit einer auffallend guten Prognose assoziiert. Auf Grund dieser klinischen Relevanz und der Tatsache, dass die dic(9;12)(p13;p13) mit Hilfe der klassischen Zytogenetik oft schwierig zu erkennen ist, wäre es wichtig, einen zusätzlichen Test (FISH, RT-PCR) zur Verfügung zu haben, um diese Patientengruppe eindeutig abgrenzen zu können. Jedoch wurden die zugrundeliegenden molekularen Veränderungen bisher noch nicht beschrieben. Wir haben bei zwei Patienten mit dic(9;12) FISH mit exonspezifischen Sonden für ETV6 und PAX5 durchgeführt und dabei einen Hinweis für die Beteiligung beider Gene erhalten. Das PAX5/ETV6 Fusionstranskript konnte auch mittels RT-PCR nachgewiesen werden. In beiden Fällen ergab

die nachfolgende Sequenzierung der PCR-Produkte eine Fusion von PAX5 Exon 4 mit ETV6 Exon 3. Die PAX5/ETV6 Fusion entspricht somit dem molekularen Äquivalent der dizentrischen Translokation dic(9;12) (p13;p13).

Session: Kindliche Tumoren

A 23 Zytogenetische Veränderungen bei Kindern mit therapieabhängigem MDS (t-MDS)

Teigler-Schlegel, Andrea (1), Bruch, J. (1), Niemeyer, C. (2), Harbott, J. (1)

Universitätskinderkliniken 1) Gießen, 2) Freiburg

email: andrea.teigler-schlegel@paediat.med.uni-giessen.de

Das therapieabhängige MDS (t-MDS) ist ein klinisches Syndrom, welches nach Behandlung maligner und nicht maligner Erkrankungen mit Chemo- oder Radiotherapie auftritt. Die Latenzzeit zwischen Erstdiagnose und therapieabhängiger Erkrankung reicht von einigen Monaten bis zu mehreren Jahren und scheint in Zusammenhang mit der Gesamtdosis, der Dosisintensität und der Art des verwendeten Wirkstoffs zu stehen. Der klinische Verlauf ist normalerweise progressiv und relativ resistent gegen konventionelle Therapien, die bei primären Leukämien Anwendung finden. Zytogenetisch kommt bei Erwachsenen ein hoher Anteil der auch bei primärem MDS oder AML beobachteten Veränderungen, wie -5, 5q-, 7q- oder -7 vor. Die Häufigkeit veränderter Karyotypen ist jedoch höher, auch sind diese oft komplex bzw. es kommen mehrere unabhängige Klone nebeneinander vor. Abhängig von der vorangegangenen Therapie können die zytogenetischen Veränderungen in zwei Gruppen eingeteilt werden. Während unbalancierte Aberrationen wie z.B. vollständige oder teilweise Verluste von Chromosom 5 und 7 vorwiegend nach Behandlung mit alkylierenden Agenzien auftreten, sind balancierte Veränderungen wie z. B. Translokationen unter Beteiligung von 11q23, die zu einem MLL-Rearrangement führen, oder auch die inv(16), vorwiegend nach Behandlung mit Topoisomerase II-Inhibitoren nachzuweisen. Da bis jetzt noch wenig über die zytogenetischen Veränderungen bei Kindern mit t-MDS bekannt ist, haben wir in dieser Untersuchung die zytogenetischen Daten von 45 Kindern mit sekundärem MDS aus der EWOG-MDS-Studie zusammengefasst. In 34 von 41 erfolgreich durchgeführten Analysen traten erworbene chromosomale Aberrationen auf. Dabei kamen balancierte Karyotypen äußerst selten vor (2/34). Als häufigste Aberration traten komplette oder partielle Verluste von Chromosom Nr. 7 auf. Dagegen waren Veränderungen unter Beteiligung von Chromosom Nr. 5 wesentlich seltener nachweisbar als es bei Erwachsenen der Fall ist. Andere häufige numerische Aberrationen bei Kindern mit primärem MDS wie die Trisomien 8 und 21 waren bei Kindern mit t-MDS lediglich sehr selten (2/34 bzw. 1/34) nachweisbar.

A 24 Chromosomenimbilanzen bei kindlichen Phäochromozytomen und Nebennierenkarzinomen

Swoboda Antje (1), Michel S (1), Ernst G (1), Clausen U (1), Kloetzer Ch (2), Parlowsky T (3), Bucsky P (3), Loncarevic IF (1)

1) Institut für Humangenetik und Anthropologie, FSU Jena; ilon@mti-n.uni-jena.de 2) Klinik für Urologie, FSU Jena, 3) Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Medizinische Universität Lübeck

Das Phäochromozytom (PCC) und das Nebennierenkarzinom (ACC) sind seltene Tumore im Kindesalter. Der Grad der Malignität ist schwer beurteilbar und der Krankheitsverlauf damit nicht vorhersehbar. Anhand von Paraffinschnitten und gefrorenen Tumorproben wurden 12 PCCs, 14 ACCs und 1 Nebennierenadenom mittels der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) untersucht, um diagnose- und prognoserelevante zytogenetische Marker zu entdecken. Die Untersuchung ist Teil der Datenakquirierung innerhalb der interdisziplinären, multizentrischen Studie GPOH-MET 97 (Gesellschaft für Pädiatrische und Onkologische Hämatologie Maligner Endokriner Tumore). In 80% der PCC wurde ein gemeinsamer Verlust der p-Arme der Chromosomen 3 und 11 gefunden. Der Verlust von 3p- und 11p ist damit charakteristisch, allerdings nicht spezifisch. Beide Aberrationen scheinen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des PCC zu haben. Ein Vergleich der CGH-Daten mit entsprechenden Daten von Erwachsenen ergab eine hohe Übereinstimmung, allerdings nur zu Daten von PCC Patienten mit einer familiären VHL-Mutation. In 2 von 3 rezidierten Tumoren war der charakteristische Verlust von 3p und 11p nicht nachweisbar. Die CGH-Analyse von kindlichen ACCs ergab ein vielfältiges Aberrationsmuster. Die häufigsten Aberrationen waren +1p (42%), +1q (57%), +7q (42%), +9q (42%), +12p (42%), -4q (57%), -11q (57%), -4p (42%), -16q (42%). Die Berücksichtigung der klinischen Daten lässt erkennen, daß Tumore im Stadium T4 deutlich mehr Aberrationen aufwiesen als die im Stadium T1 oder T2. Der Zugewinn von 3p22-pter und ein Verlust in 16p, 16q11-21 und 20q wurden vorläufig als Marker für einen ungünstigen Krankheitsverlauf eingestuft.

A 25 Aberrationsmuster von richtig-positiven und falsch-negativen Neuroblastomen nach Screening

Spitz, Rüdiger (1), Hero B. (1), Schilling FH (2), Ertmann R (3), Ernestus K (1), Berthold F (1) Kinderkliniken der Universitäten 1) Köln und 3) Hamburg (Eppendorf), 2) Olghospital, Stuttgart

Ruediger.Spitz@medizin.uni-koeln.de

Im Rahmen des Neuroblastom-Screenings in Deutschland ('95-'00) wurden ca. 2,6 Millionen Kleinkinder auf Catecholaminmetaboliten im Urin getestet, um Neuroblastome präklinisch zu diagnostizieren. In 149 Kindern mit positivem Testergebnis wurden tatsächlich Tumoren entdeckt (richtig-positiv, RP) wohingegen 55 trotz negativem Ergebnis in den folgenden Jahren Neuroblastome entwickelten (falsch-negativ, FN). Klinisch sind die FN- im Gegensatz zu den RP-Tumoren charakterisiert durch fortgeschrittene Stadien sowie eine ungünstige Prognose. Zur Untersuchung möglicher Unterschiede im Karyotyp der beiden Screeningentitäten analysierten wir 5 chromosomale Regionen, die in Neuroblastomen häufig Aberrationen zeigen: 1p36, 3p26, 11q23, 17q23 sowie die Amplifikation von MYCN. Aufgrund der engen Assoziation zur prognostisch relevanten Ploidie wurde ebenfalls die Anzahl der Chromosomen 1 bestimmt. Untersucht wurden 50 FN- und 59 RP-Tumoren mittels Interphase-FISH. Zusätzlich führten wir CGH an jeweils 3 dieser Screening-Tumoren durch. Die FN-Tumoren zeigten eine signifikant höhere Frequenz an prognostisch relevanten chromosomalen Aberrationen gegenüber den RP: MYCN-Amplifikation: 40% versus 3% (p>0.001), Deletion 1p36: 38% versus 8% (p>0.001), Deletion 3p26: 26% versus 4% (p=0.03), Deletion 11q23: 28% versus

14% (p=0.09). Der Anteil von Tumoren mit mindestens einer der 4 Aberrationen betrug 16% bei den RP gegenüber 58% bei den FN. Zugewinne in 17q waren in beiden Gruppen sehr häufig (89% versus 68%). 39% der RP-Tumoren zeigten eine Trisomie 1 gegenüber 3% der FN-Tumoren (p>0.001). Die CGH ergab als einzige unbalancierte Aberration der RP-Tumoren eine Monosomie 16p bzw. eine Monosomie 14 in jeweils einem Tumor. Dagegen zeigten die FN-Tumoren eine Vielzahl von Gewinnen und Verlusten: gain in 1p, 2p, 7q, 9p, 16p, 17q, 20q, loss in 1p, 6q, 11q. Die durch das Screening gefundenen prognostisch günstigen Neuroblastome (RP) zeigten mit Ausnahme des Zugewinns in 17q nur wenige strukturelle chromosomale Veränderungen wohingegen die Mehrzahl der durch das Screening verpassten Tumoren (FN) zahlreiche Zugewinne und Verluste aufweist. Die beiden Gruppen stellen somit klinisch und genetisch unterschiedliche Entitäten dar.

A 26 Genomische Imbalancen in unilateral isolierten Retinoblastomen

Schneider Stephanie, Lohmann, D., Herzog, S., Gratijs, S., Lieth, E., Rieder, H.

Institut für Klinische Genetik, Philipps-Universität Marburg, Deutschland schneidb@mail.uni-marburg.de

Es ist allgemein anerkannt, dass Mutationen beider Allele des Retinoblastogens (RB1) der Entstehung eines Retinoblastoms vorausgehen. Von anderen Tumoren ist bekannt, dass die Progression der Erkrankung mit zusätzlichen genomischen Veränderungen verbunden ist. Über diese zusätzlichen Veränderungen ist bei Retinoblastomen jedoch nur sehr wenig bekannt. Wir benutzten die Comparative Genomische Hybridisierung (CGH), um chromosomale Aberrationen in isolierten unilateralen Retinoblastomen aufzudecken. Eine Serie von 44 Patienten mit Retinoblastomen und somatischen Mutationen in beiden RB1-Allelen wurde untersucht. Genomische Imbalancen wurden bei 32 Tumoren aufgedeckt. Die mediane Anzahl von Veränderungen pro aberrantem Tumor betrug 4. Der Verlust von 13q14, dem Genort von RB1, konnte nur in 2 Tumoren nachgewiesen werden. Häufig auftretende Imbalancen betrafen Zugewinne bei 6p (20/44), 1q (16/44), 17q (7/44), 2p(6/44), 13q (6/44), den Zugewinn des gesamten Chromosoms 19 (6/44) und den Verlust von Chromosom 16q (14/44). Die Anzahl der genomischen Imbalancen pro Tumor korrelierte positiv mit dem Alter bei Operation. Zusammenfassend bestätigen unsere Untersuchungen die Beobachtung, dass die Anzahl zusätzlicher chromosomaler Aberrationen in unilateral isolierten Retinoblastomen mit zunehmendem Alter der Patienten ansteigt. Gefördert durch die DFG, Ri-1123/1-1

A 27 Klonale chromosomale Imbalancen in Zellen des Knochenmarks von Fanconi Anämie Patienten: Zugewinne von 3q26q29 als ungünstiger prognostischer Faktor

Tönnies, Holger (1); Huber, S (1); Volarikova, E (1); Kühl, JS (2); Gerlach, A (1); Ebell, W (2); Neitzel, H (1)

1) Institut für Humangenetik, Chromosomendiagnostik und Molekulare Zytogenetik, Charité, Campus-Virchow, Humboldt-Universität, Berlin.

2) Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Transplantationszentrum, Charité, Campus-Virchow, Humboldt-Universität, Berlin.

E-mail: Holger.Toenies@charite.de

Die Fanconi Anämie (FA) ist ein Chromosomenstabilitätssyndrom mit einer Prädisposition zu

Knochenmarkversagen, myelodysplastischem Syndrom (MDS) und akuter myeloischer Leukämie (AML). Unsere zytogenetischen und molekularzytogenetischen Analysen an Zellen des peripheren Blutes und des Knochenmarks von 53 FA-Patienten zeigten eine hohe Inzidenz (18 von 53 Patienten) für das Auftreten expandierender klonaler Aberrationen mit partiellen Tri- und Tetrasomien für Chromosom 3q. Um die klinische und prognostische Relevanz dieser am häufigsten detektierten Aberration zu bestimmen, wurden die zytogenetischen und morphologischen Daten des Knochenmarks und der klinische Verlauf der Patienten mit und ohne 3er-Aberration gegenübergestellt. Beide Gruppen unterschieden sich nicht signifikant in Bezug auf Alter, Geschlecht und Komplementationgruppe. Es konnte festgestellt werden, dass Patienten ohne 3er-Aberration eine geringere Wahrscheinlichkeit für die Progression in ein MDS oder eine AML zeigten, als Patienten mit 3er-Aberration. Ebenso lag die Mortalität der Patienten mit 3er-Aberration im Untersuchungszeitraum deutlich über der der Kontrollgruppe. Finanzielle Förderung durch die Deutsche Fanconi Anämie Hilfe e.V. und die Charité Forschungsförderung (Nr.2000-627), Humboldt-Universität, Berlin.

Session: Myeloische Neoplasien

A 28 Patient mit chronisch-myeloischer Leukämie und persistierender t(2;11) nach Behandlung mit STI-571

Hildebrandt, Barbara (1); Wieland, C. (1); Müller, N. (1); Redmann, A. (1); Kronenwett, R. (2); Royer-Pokora, B. (1)

1) Institut für Humangenetik und Anthropologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Universitätsstr. 1, D-40225 Düsseldorf

royer@uni-duesseldorf.de

2) Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Moorenstr. 5, D-40225 Düsseldorf

Die chronisch-myeloische Leukämie (CML) ist eine klonale Erkrankung von pluripotenten Stammzellen, die zytogenetisch bei 90 % der Patienten durch das Auftreten einer reziproken Translokation 9;22 charakterisiert ist. Daraus resultiert eine Fusion des ABL-Gens auf Chromosom 9q34 mit dem BCR-Gen auf Chromosom 22q11, die zu einer Aktivierung der ABL-Tyrosinkinase führt. Mit fortschreitendem Krankheitsprozess treten bei 75-80 % der Patienten Sekundäraberrationen auf, die mit dem Beginn der akzelerierten Phase bzw. Beginn der Blastenkrise in Zusammenhang gebracht werden. Neben den konventionellen Therapieformen und der KMT steht den Patienten neuerdings eine neue Therapieform zur Verfügung. Es wurde eine synthetische Substanz (ein 2-Phenylaminopyrimidin-Derivat genannt STI-571, Glivec, Imatinib-mesylat, Novartis) entwickelt, die spezifisch an die ATP-Bindestelle der ABL-Kinase bindet und dadurch deren Aktivität kompetitiv inhibiert. Erste Untersuchungen zeigten, dass nach fünf Monaten 45 % der Patienten eine zytogenetische Remission aufwiesen und 10 % keine komplette zytogenetische Remission erreichten. Allerdings scheint das Auftreten von Sekundäraberrationen ein negativer Prognosefaktor zu sein, der mit dem Nichterreichen einer zytogenetischen Vollremission bzw. dem Wiederauftreten zytogenetischer Aberrationen bzw. dem Auftreten von klonalen Veränderungen in Ph-negativen Zellen korreliert. Wir möchten

einen Patienten vorstellen, der zum Zeitpunkt der ersten zytogenetischen Analyse in [20/20] Mitosen eine t(9;22) und eine t(2;11) aufwies (46,XY,t(2;11)(q21;q23),t(9;22)(q34;q11) [20]). Nach 28 Monaten Therapie mit STI-571 konnten neben drei unauffälligen Mitosen 19 aufgefunden werden, die die t(2;11) isoliert zeigten. Eine PHA-stimulierte Blutkultur zeigte einen Anteil von 16,5 % Mitosen mit t(2;11), während in 220 analysierten Zellen einer Fibroblastenkultur die Translokation nicht nachweisbar war. Seit dem Behandlungsbeginn mit STI-571 befindet sich der Patient in kompletter hämatologischer Remission. Durch den Einsatz der kommerziellen MLL-Sonde konnte eine Beteiligung des MLL-Gens an der Translokation ausgeschlossen werden. Da es sich bei der t(2;11) um eine rekurrente Translokation bei hämatopoetischen Erkrankungen handelt, soll durch den Einsatz von BAC-Proben aus der 11q23-Telomerregion der exakte Bruchpunkt der t(2;11) charakterisiert werden.

A 29 Überexpression und Amplifikation von BCR/ABL bei einer Patientin mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) unter Imatinib-Therapie

Gadzicki Dorothea (1), von Neuhoff N (1), Steinemann D (1), Just M (2), Kreipe H (3), Wilkens L (1), Schlegelberger B (1)

1) Institut für Zell- und Molekularpathologie, Medizinische Hochschule Hannover (MHH);

2) Innere Medizin, Hämatologie und Internistische Onkologie, Bielefeld, 3) Institut für Pathologie, MHH

Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist charakterisiert durch das Auftreten einer Philadelphia (Ph)-Translokation, welche zur Fusion der beiden Gene BCR und ABL führt. Während der Progression der Erkrankung erscheinen häufig zusätzliche sekundäre chromosomale Aberrationen. Wir berichten über eine Patientin, bei der unter Therapie mit Imatinib eine Amplifikation des BCR/ABL Fusionsgens mit einer Überexpression des Fusionstranskripts auftrat. Imatinib ist ein spezifischer Tyrosinkinase-Inhibitor, der die ATP-Bindungsstelle des für die chronisch myeloische Leukämie charakteristischen BCR/ABL-Fusionsproteins blockiert. Imatinib führt beim überwiegenden Teil der CML-Patienten zu einer Remission der Erkrankung, allerdings entwickelt sich nicht selten nach unterschiedlich langer Behandlung eine Resistenz. In der Histologie des Knochenmarks unserer Patientin zeigte sich neben hypoplastischen Bereichen eine herdförmige Vermehrung von Blasten. In der Chromosomenanalyse wurden verschiedene Klone mit je ein oder zwei Kopien entweder eines einzelnen oder eines dizentrischen Ph-Chromosoms, sowie zusätzliche chromosomale Aberrationen gesehen. Darunter ein Isochromosom 17 und ein derivatives Chromosom 18 mit überzähligem Material von 2p. Die FISH-Untersuchung bestätigte das Vorhandensein von Zellen mit ein oder zwei Kopien des Ph-Chromosoms. Daneben zeigten sich Zellen mit ein oder zwei geclusterten Fusionsignalen, als Korrelat einer BCR/ABL Genamplifikation. Mittels quantitativer real time-PCR wurde eine BCR/ABL Überexpression nachgewiesen. Die Transkriptmenge ähnelte der der Zelllinie K562 mit einer BCR/ABL Amplifikation und war, verglichen mit einem Kontrollpatienten mit nur einer einzelnen Kopie des Ph-Chromosoms, stark erhöht. Wir nehmen an, dass die Überexpression des BCR/ABL Fusionstranskripts resultierend aus der Genamplifikation für die Akzeleration unter der Therapie mit Imatinib verantwortlich war. Dieser Mechanismus

der Resistenzentwicklung gegen Imatinib ist in Zelllinien bereits bekannt und wurde hiermit erstmals bei einem Patienten beschrieben.

A 30 SKY-Analysen bei MDS Patienten mit 5q Anomalie im Rahmen komplexer Chromosomenaberrationen

Trost, Detlef (1); Hildebrandt, B (1); Gerding, U (2); Royer-Pokora, B (1)

1) Institut für Humangenetik,

2) Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie

Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf,

Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf

royer@uni-duesseldorf.de

Detlef.Trost@uni-duesseldorf.de

Komplexe Chromosomenaberrationen (CCA) finden sich bei bis zu 30 % der Patienten mit myelodysplastischen Syndromen (MDS). Die vollständige Analyse komplexer Karyotypen ist durch eine konventionelle zytogenetische Analyse nur begrenzt möglich. Eine Subgruppe der Patienten zeigt im Rahmen der CCA 5q Anomalien in der konventionellen Analyse, diese haben bei MDS anders als isolierte 5q Anomalien keine günstige Prognose. Es wurden bei 14 MDS- und 4 AML-Patienten mit CCA und 5q Anomalien zusätzlich zur konventionellen Zytogenetik spektrale Karyotypisierungen (SKY) durchgeführt. Außerdem wurden locus-spezifische FISH-Proben aus 5q zur Charakterisierung der Anomalien eingesetzt, sowie eine MLL spezifische Sonde aus 11q23. Zugewinn einer Kopie des MLL-Gens ist als Prognosemarker bei CCA mit 5q- beschrieben worden. Bei 8 der Patienten lagen unbalancierte Translokationen eines Chromosoms 5 vor. 10 Patienten zeigten interstitielle Deletionen in 5q. FISH Analysen ergaben, dass in allen Fällen die minimalen kritischen Regionen für AML und MDS in 5q31 bzw 5q33 deletiert vorlagen. Die Bruchpunkte der Translokationen in 5q sind heterogen und liegen zwischen 5q11.2 und 5q15. Zugewinn einer Kopie des MLL Gens lagen bei vier Patienten vor. Balancierte Translokationen sind selten, meist finden sich unbalancierte Strukturveränderungen. Es wird zur Zeit geprüft, ob die zytogenetischen Subgruppen mit spezifischen Therapieverläufen korrelieren.

A 31 Detektion von NUP98 Rearrangements bei Leukämien

Nebral Karin, König M, Haas OA, Strehl S
CCRI, St. Anna Kinderspital, Wien,
Österreich; karin.nebral@stanna.at

NUP98 Gen-Rearrangements treten sowohl in de novo als auch in Therapie-assoziierten Leukämien, vor allem nach Behandlung mit Topoisomerase-II-Inhibitoren, auf und wurden im Zusammenhang mit akuten myeloischen Leukämien (AML), dem myelodysplastischen Syndrom (MDS), chronisch myeloischen Leukämien (CML) und akuten lymphoblastischen T-Zell Leukämien (T-ALL) beschrieben. Nachdem 1996 die relativ häufig auftretende erste NUP98 Genfusion (NUP98-HOXA9) beschrieben wurde, sind mittlerweile 15 Fusionspartnergene bekannt, von denen ein Großteil in die Gruppe der HOX-Gene gehört. NUP98 codiert für das Nucleoporin 98 kD Protein, das einen Teil des Nukleopore-Komplexes bildet und auf Chromosom 11p15.5 lokalisiert ist. Insgesamt wurden 71 Patienten/innen mittels FISH auf eine Veränderung von NUP98 hin untersucht. Es wurden 59 der 67 in der österreichischen AML-BFM93 Studie registrierten kindlichen AMLs und 12, aufgrund ihrer Zytogenetik ausgewählten Fälle, analysiert. Alle Proben wurden mit dem NUP98-spezifischen

den Bruchpunkt überspannenden Klon (PAC 1173K1) und einem 11p Subtelomer Klon (PAC 908H22) hybridisiert. Dies führt in normalen Interphasekernen zu einem 2/2 Hybridisierungsmuster und in NUP98 positiven Fällen zu einem 3/2 Muster. Von den 59 untersuchten Patient/innen mit kindlicher AML zeigte nur ein Fall, der bereits in einer früheren Studie als NUP98-NSD1 [t(5;11)(q35;p15.5)] positiv identifiziert worden war, das für ein NUP98 Rearrangement typische 3/2 FISH Hybridisierungsmuster. Diese Ergebnisse deuten auf eine relativ geringe Inzidenz von NUP98 Aberrationen in kindlichen AMLs hin. Die 12 aufgrund der Zytogenetik ausgewählten Fälle umfassten 5 Patienten/innen mit einer inv(11)(p15;q21-23), 2 Patienten/innen mit einer t(3;11)(p24-25;p15), einen mit einer t(11;20)(p15;q12) und 4 mit anderen 11p15 Translokationen. Interessanterweise zeigte nur einer der Fälle mit einer zytogenetisch determinierten inv(11)(p15;q21-23) auch tatsächlich ein auf eine NUP98-DDX10 Fusion hinweisendes NUP98 Rearrangement. Weiterhin konnte im Fall der t(11;20)(p15;q12) und bei einer t(3;11)(p24;p15) eine das NUP98 Gen involvierende Translokation nachgewiesen werden. Die t(3;11)(p24;p15) wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben und deutet auf das Vorhandensein eines weiteren Fusionspartners hin, das in der Chromosomenregion 3p24 lokalisiert ist.

A 32 Perizentrische Inversion 3 bei einem Patienten mit AML M1

Wieser, Rotraud, Schreiner, U., und Fonatsch, Ch.

Institut für Medizinische Biologie, Wien, Österreich; rotraud.wieser@univie.ac.at

Ein kürzlich von uns etablierter Interphase-FISH-Assay, der Rearrangements des EVI1-Lokus in der Chromosomenbande 3q26 detektiert, wurde zum routinemäßigen Screening von AML-Proben eingesetzt. Bei einem Patienten (58, M, AML M1), bei dem im G-Banden-Präparat eine Monosomie 7 als einzige Aberration gefunden worden war, zeigte dieser Assay aberrante Signale im Großteil der Interphasen. Die Untersuchung von Metaphasen aus der gleichen Hybridisierung ergab, dass eine perizentrische Inversion, inv(3)(p25q26), für das beobachtete Interphase-Hybridisierungsmuster verantwortlich war. Diese Inversion wurde nur in unstimulierten Kulturen gefunden, nicht aber in den Metaphasen von PHA-Kulturen, sodass eine konstitutionelle Chromosomenaberration ausgeschlossen werden kann. Wie aus den bisherigen Ergebnissen zu erwarten, wurden bei einer Hybridisierung mit Sonden für die Bruchpunktregion in 3q21, die bei der inv(3)(q21q26) betroffen ist, großteils normale Signalmuster gefunden. Weitere Hybridisierungen mit PAC-Klonen aus der Region 3q26 führten zu der Entdeckung, dass eine relativ große interstitielle Deletion mit der Inversion 3 vergesellschaftet ist. Diese Deletion liegt stromaufwärts, d.h. telomerisch, des EVI1-Gens, und inkludiert den MDS1-Lokus, dessen Transkript durch alternative 5'-End-Prozessierung mit der EVI1-mRNA fusioniert werden kann (MDS1/EVI1-Transkript). RT-PCR-Analyse an RNA des Patienten und an mehreren Kontrollen zeigte, dass EVI1, nicht aber MDS1/EVI1, infolge der inv(3)(p25q26) und/oder der assoziierten Deletion überexprimiert war. Da EVI1-Überexpression bei Patienten mit einer t(3;21) oder einer t(3;12) auch im Zusammenhang mit der Bildung von Fusionstranskripten mit Genen aus der jeweiligen Partnerregion beobachtet worden war, untersuchten wir mit Hilfe der RACE (rapid amplification of cDNA ends) -Technik, ob EVI1 bei un-

serem Patienten ein Fusionstranskript mit einem Partnergen aus 3p25 bildet, konnten jedoch keinen experimentellen Hinweis dafür erhalten.

A 33 Trisomien bei akuten myeloischen Leukämien (AML): Inzidenz und prognostische Relevanz

Klaus Mirjam, Haferlach T, Kern W, Schnittger S, Hiddemann W, Schoch C
Labor für Leukämiediagnostik, Medizinische Klinik III, Marchioninistrasse 15, 81371 München. Mirjam.klaus@med3.med.uni-muenchen.de

Einleitung: Trisomien als Einzelaberration bei AML lassen sich wiederkehrend finden. Die Inzidenz und die prognostische Relevanz verschiedener einzelner Trisomien bei AML ist bisher jedoch nur unzureichend charakterisiert. Ziel: Um die Häufigkeit und die klinische Relevanz von einzelnen Trisomien näher zu definieren, wurden 2214 de novo AML mittels klassischer Zytogenetik (G-Banden) untersucht. Ergebnisse: (I) Bei 151 de novo AML (6,8%) wurde eine Trisomie als alleinige zytogenetische Aberration für die Chromosomen 8 (3,7%), 13 (0,7%), 11 (0,6%), 14 (0,5%), 21 (0,5%), 4 (0,4%), 6 (0,2%), 5 (0,05%), 10 (0,05%), 12 (0,05%) und 22 (0,05%) beobachtet. (II) Bei insgesamt 577 de novo AML (26,1%) wurde eine Trisomie entweder als Einzelanomalie oder in Kombination mit anderen Karyotypanomalien beobachtet. Während die Trisomien 8, 11, 13 und 14 in mehr als 30% der Fälle als Einzelanomalie auftraten, wurde das Vorliegen einer Trisomie 10 oder 22 als Einzelanomalie nur selten, in Kombination mit weiteren Aberrationen jedoch häufiger beobachtet (Tabelle). (III) Zur Abschätzung der prognostischen Relevanz der häufigsten Trisomien als Einzelaberration untersuchten wir die klinischen Endpunkte von Patienten mit +8 (n=48), +11 (n=12), +13 (n=13) und +21 (n=9). Das Gesamtüberleben für AML mit +8, +11, +13, and +21 betrug: 14,5 Monate, 10 Monate, 3,5 Monate beziehungsweise 16 Monate. Im Vergleich zu 658 de novo AML mit anderen intermediärer einzuordnenden Karyotypen (definiert als normale Karyotyp oder andere Aberrationen, unter Ausschluss von t(15;17), t(8;21), inv(16), 5q-/5, 7q-/7, 3q21q26-Anomalien, 11q23-Anomalien und komplex aberrante Karyotypen) war das Gesamtüberleben für AML mit Trisomie +13 signifikant kürzer (14 Monate versus 3,5 Monate, p<0.004). Das Gesamtüberleben der Trisomien 8, 11 und 21 hingegen entsprach dem der Vergleichsgruppe mit prognostisch intermediär assoziierten Karyotypen (14,5 Monate, 10 Monate, 16 Monate bzw. 14 Monate). Um die prognostische Relevanz einzelner Trisomien zu evaluieren, wurde die Gruppe der AML mit intermediären Karyotypen einer multivariaten Analyse unterzogen. Unabhängige prognostische Faktoren bezüglich des Gesamtüberlebens waren Alter, Leukozyten und Trisomie 13 (p<0,0001, p=0,006, p=0,035). Zusammenfassung: Trisomien als Einzelaberration bei AML treten in ungefähr 7% auf. Trisomien 8, 11, 13, und 14 liegen am häufigsten ohne Zusatzaberrationen vor. Trisomie 13 definiert einen unabhängigen Parameter mit ungünstiger Prognose bezüglich des Gesamtüberlebens.

| Trisomie | Patienten n gesamt | Trisomie als Einzelaberration | Trisomie in Kombination mit weiteren Karyotypveränderungen |
|----------|--------------------|-------------------------------|--|
| +4 | 33 | 24% | 76% |
| +5 | 7 | 14% | 86% |
| +6 | 26 | 19% | 81% |
| +8 | 231 | 36% | 64% |
| +10 | 28 | 4% | 96% |
| +11 | 43 | 33% | 67% |

| | | | |
|-----|----|-----|-----|
| +12 | 6 | 17% | 83% |
| +13 | 44 | 34% | 66% |
| +14 | 26 | 42% | 74% |
| +21 | 80 | 15% | 85% |
| +22 | 53 | 2% | 98% |

Gefördert durch die Deutsche José Carreras Leukämie-Stiftung an M.K. (2001/NAT-4).

A 34 Mutationen in den Genen für die Transkriptionsfaktoren PU.1 und C/EBP (bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie

Conrad, Viola; Schoch, C; Hiddemann, W.; Haferlach, T.; Schnittger, S.
Labor für Leukämiediagnostik, Ludwig Maximilian Universität München, Klinikum Großhadern, Marchioninstr. 15, 81773 München

viola.conrad@med3.med.uni-muenchen.de, susanne.schnittger@med3.med.uni-muenchen.de

Etwa 45% aller Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) weisen einen normalen Karyotyp auf. Genetische Ursachen dieser AML könnten unter anderem Punktmutationen, Deletionen, bzw. Insertionen in Genen für Transkriptionsfaktoren, die eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung hämatologischer Zellen spielen, sein. In zwei für die myelozytäre und monozytäre Differenzierung wichtigen Transkriptionsfaktoren - C/EBP α und PU.1 - wurden bei Patienten mit normalen Karyotyp Punktmutationen beschrieben. C/EBP α ist ein CCAAT/ enhancer binding Protein, welches für die Differenzierung der granulozytären Zelllinien von großer Bedeutung ist. PU.1 regelt die Expression von einigen wichtigen myeloischen Genen (wie z.B. M-CSF, G-CSF, etc.) und wird zur regulären Entwicklung der monozytären, myeloischen und lymphatischen Zellen benötigt. Das Screening auf Mutationen in diesen Genen mittels Sequenzierung wurde auf mRNA-Ebene durchgeführt, wobei wir uns auf die codierende Region konzentrierten. Für die PCR, so wie für die Sequenzierreaktion wurde das Primerdesign aus Publikationen von Mueller et. al.¹ für PU.1 und Pabst et. al.² für C/EBP α übernommen. Das komplette Gen für PU.1 wurde mit einem PCR-Primerpaar amplifiziert und mit 7 internen Primern sequenziert. Für die Amplifizierung von C/EBP α wurden zwei sich überlappende Primerpaare verwendet, die auch für die Sequenzierung herangezogen wurde. Es wurden 24 unselektionierte Patienten mit de novo AML untersucht. Darunter fanden sich AML folgender FAB-Subtypen: 2x M0, 7x M1, 9x M2, 3x M4 und 3x M4eo; die unterschiedlichen Karyotypgruppen verteilten sich auf 13 Patienten mit normalem Karyotyp, 2 mit komplex aberrantem Karyotyp, 3x inv(16), 2x t(8;21) und 4 Patienten mit einzelnen Chromosomenzugewinnen. Im PU.1 Gen wurden bisher keine Mutationen gefunden. Auch von zwei anderen Arbeitsgruppen^{3,4} konnten bisher keine PU.1 Mutationen gefunden werden. Diese Diskrepanz zu den Daten von Mueller et al. mag darauf beruhen, dass diese Autoren ein japanisches AML-Kollektiv untersucht haben. Hier mögen ethnische Unterschiede eine Rolle spielen. Weitere Analysen an größeren Kollektiven sind hier zur Bestätigung der Daten notwendig. Im Gen für C/EBP α wurde bei 14/22 Patienten an Position 836 ein T zu G gefunden, wobei es sich anscheinend um einen Polymorphismus handelt. Eine echte Mutation wurde bisher nicht detektiert, so dass die absolute Frequenz von C/EBP α Mutationen im unselektionierten Kollektiv unter 5% zu liegen scheint. Analysen an weiteren Patienten selektiert für einen normalen Karyotyp befinden sich in Arbeit.

1 B.U. Mueller, et.al.; Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia.; Blood. 2002 Aug 1;100(3):998-1007
 2 Pabst, T. et.al.; Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia.; Nat Genet. 2001 Mar;27(3):263-70
 3 Lamandin, C. et.al.: Are PU.1 mutations frequent genetic events in acute myeloid leukemia (AML)? Blood. 2002 Dec 15;100(13):4680-1.
 4 Vegesna, V. et.al.; C/EBP-beta, C/EBP-delta, PU.1, AML1 genes: mutational analysis in 381 samples of hematopoietic and solid malignancies. Leuk Res. 2002 May;26(5):451-7

A 35 Karyotyp und Therapie-assoziierte akute myeloische Leukämie (t-AML) sind unabhängige prognostische Faktoren: Eine Analyse von 93 Patienten mit t-AML und 1091 Patienten mit de novo AML
 Schoch, Claudia; Kern W.; Schnittger S.; Hiddemann W.; Haferlach T.
Labor für Leukämie-Diagnostik, Medizinische Klinik III, Klinikum Grosshadern, Ludwig-Maximilians-Universität München, Marchioninistr. 15, 81377 München
 claudia.schoch@med3.med.uni-muenchen.de

Bei Patienten mit de novo AML wird die Therapiestrategie anhand des Risikoprofils des Patienten stratifiziert. Der Karyotyp der leukämischen Blasten stellt zur Zeit den wichtigsten unabhängigen prognostischen Parameter für das Überleben dar. Bei t-AML ist bisher wenig über die prognostische Bedeutung der Zytogenetik bekannt. Das Ziel dieser Studie war es, das Muster der zytogenetischen Veränderungen bei t-AML mit dem Muster bei de novo AML zu vergleichen und die Bedeutung für die Prognose zu überprüfen. Die Patienten wurden anhand der Zytogenetik in drei Gruppen eingeteilt: 1. günstig (t(8;21), inv(16), t(15;17)), 2. intermediär (normal, andere Aberrationen) und 3. ungünstig (5q-/5, 7q-/7, 3q21q26 Aberrationen, 11q23 Aberrationen, komplex aberrant (≥ 3 Aberrationen)). Karyotyp und klinische Verlaufsdaten lagen für 93 Patienten mit t-AML und 1091 Patienten mit de novo AML vor. 54 Patienten (58%) mit t-AML und 1037 (95.1%) mit de novo AML wurden im Rahmen der AMLCG Studien 1992 und 1999 bzw. in der APL-Studie behandelt, während die übrigen vergleichbare Therapien außerhalb von Studien erhielten. Ein aberranter Karyotyp lag bei 86% der t-AML und bei 57.6% der de novo AML vor ($p < 0.00001$). Günstige, intermediäre bzw. ungünstige Karyotypen fanden sich bei 25.8%, 28.0%, und 46.2% der t-AML und bei 22.2%, 57.3%, und 20.4% der de novo AML (günstig: n.s., intermediär: $p < 0.00001$, ungünstig: $p < 0.00001$). Das Gesamtüberleben (GS) der Patienten mit t-AML war kürzer als bei Patienten mit de novo AML (medianes GS 10 Monate vs. 15 Monate, $p = 0.0007$). Günstige und ungünstige Zytogenetik zeigten eine prognostische Bedeutung bezüglich des Gesamtüberlebens sowohl bei t-AML ($p = 0.001$ und $p = 0.0001$) als auch bei de novo AML ($p < 0.0001$ und $p < 0.0001$). Das mediane GS für Patienten mit t-AML und günstiger, intermediärer bzw. ungünstiger Zytogenetik war: 18 Monate, 11 Monate bzw. 6 Monate. Die entsprechenden Daten für de novo AML waren: nicht erreicht, 14 Monate und 6 Monate. Innerhalb der Gruppe mit günstiger Zytogenetik zeigten die Patienten mit t-AML ein signifikant kürzeres medianes GS im Vergleich zu Patienten mit de novo AML (18 Monate vs. nicht erreicht, $p < 0.0005$), während sich keine signifikanten Unterschiede im Gesamtüberleben innerhalb der

Gruppe mit intermediärem bzw. ungünstigem Karyotyp fand (intermediärer Karyotyp: t-AML vs. de novo AML: 11 Monate vs. 14 Monate, $p = 0.31$; Ungünstiger Karyotyp: 6 Monate vs. 6 Monate, $p = 0.06$). Zur Bestimmung des Einflusses von Zytogenetik und t-AML auf die Prognose insgesamt wurde eine multivariate Cox Regressionsanalyse bezüglich des Gesamtüberlebens mit folgenden Kovariaten durchgeführt: günstiger Karyotyp, ungünstiger Karyotyp, t-AML, Alter und Leukozyten-Zahl. Alle Parameter zeigten einen unabhängigen Einfluß auf das Gesamtüberleben ($p = 0.001$ für t-AML, $p < 0.0001$ für alle anderen Parameter). Innerhalb der Patienten mit t-AML fanden sich signifikante Korrelationen zwischen dem Gesamtüberleben und ungünstiger Zytogenetik ($p < 0.0001$) sowie günstiger Zytogenetik ($p = 0.001$), während Alter und Leukozyten-Zahl keinen Einfluß auf das Gesamtüberleben zeigten. Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die Zytogenetik einen unabhängigen prognostischen Parameter auch bei der t-AML darstellt. Außerdem stellt das Vorliegen einer t-AML ebenfalls einen unabhängigen prognostischen Faktor bezüglich des Gesamtüberlebens dar.

| Karyotype | t-AML (n=93) | de novo AML (n=1091) |
|---------------------|--------------|----------------------|
| t(8;21) | 6 (6.4%) | 82 (7.5%) |
| inv(16) | 13 (14.0%) | 73 (6.7%) |
| t(15;17) | 5 (5.4%) | 87 (8.0%) |
| normal | 13 (14.0%) | 463 (42.4%) |
| andere Aberrationen | 13 (14.0%) | 163 (14.9%) |
| 11q23 | 12 (12.9%) | 40 (3.7%) |
| komplex aberrant | 25 (26.9%) | 123 (11.3%) |
| andere ungünstige | 6 (6.4%) | 60 (5.5%) |

Session: Solide Tumoren 1

A 36 Nachweis von mitotischer Instabilität unterschiedlicher Chromosomen in Gliomzelllinien

Klein, Alexandra; Wemmert, S.; Jung, V.; Zang, K.D.; Urbschat, S.

Institut für Humangenetik, Universität des Saarlandes, Gebäude 60, D-66421

Homburg/Saar

e-mail-Adresse: hgsmur@uniklinik-saarland.de

Eine Chromosomenfehlverteilung ist ein häufiges Ereignis in neoplastischen Zellen. Eine chromosomale Instabilität konnte in einer Vielzahl von Tumoren nachgewiesen werden. In Glioblastomen wurde in zytogenetischen Untersuchungen eine hohe Anzahl von numerischen Chromosomenaberrationen gefunden. Besonders charakteristisch ist dabei ein Gewinn von Chromosom 7 und ein Verlust von Chromosom 10. Obwohl Gewinne und Verluste von Chromosomen in Gliomen schon lange bekannt sind, weiß man bisher nur wenig über die Entstehungsmechanismen dieser mitotischen Instabilität. Diskutiert werden sowohl Fehler in der Ausbildung der mitotischen Spindel, als auch Zentrosomfehlbildung bzw. Zentrosomvermehrung oder Fehler in der Zytokinese. In einer früheren FISH-Studie unserer Arbeitsgruppe an Paraffinschnitten wurde die Verteilung der Chromosomen 7, 8, 10, 12, 17 und 18 in Glioblastomen untersucht, wobei Chromosom 7 nur Gewinne, die Chromosomen 10 und 17 nur Verluste und die Chromosomen 8, 12 und 18 sowohl Gewinne als auch Verluste zeigten. Ziel unserer Studie war es zu klären, ob diese unterschiedliche Art der Fehlverteilung der einzelnen Chromosomen auf einem Defekt im mitotischen Spindelapparat beruht. Untersucht wurden 6 Glioblastomzelllinien mittels kombinierter Immunhistochemie

(anti-a-Tubulin zur Färbung der mitotischen Spindel) und Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) wiederum mit zentromer-spezifischen Sonden für die Chromosomen 7, 8, 10, 12, 17 und 18. Während der Mitose werden die Chromosomen 10, 12, 17 und 18 jeweils in gleicher Anzahl durch die Spindelfasern zu den entgegengesetzten Spindelpolen gezogen und damit gleichmäßig auf die beiden Tochterzellen verteilt. Die Chromosomen 8 werden sowohl gleichmäßig als auch ungleichmäßig durch die Spindelfasern getrennt, wohingegen die Chromosomen 7 in fast allen untersuchten Gliomzellen nicht in gleicher Anzahl verteilt werden. In einem Fall zeigte sich eine Vermehrung der Spindelpole, welche in keiner der anderen Zelllinien zu finden war. Die mitotische Instabilität der Chromosomen 7 und 8 scheint demnach nicht ausschließlich auf einem Fehler in der Spindelstruktur zu beruhen, da die Spindel in 5 von 6 der untersuchten Gliomzelllinien unauffällig war, und die Chromosomen 10, 12, 17 und 18, die in Gliomzellen ebenfalls häufig fehlverteilt sind, durch die Spindelfasern gleichmäßig verteilt werden. Da jedoch in einem Fall eine Vermehrung der Spindelpole nachweisbar war, kann man vermuten, dass zumindest zwei unterschiedliche Mechanismen der Chromosomenfehlverteilung in Gliomzellen existieren.

A 37 Zytogenetische Marker für die Ansprechrate von Chemotherapien am Beispiel von TMZ bei high grade Gliomen

Urbschat S. (1), Wemmert S. (1), Zang K.D. (1), Ketter R. (2)

1) Institut für Humangenetik,

2) Neurochirurgische Klinik

Universität des Saarlandes, Homburg

hgsmur@uniklinik-saarland.de

Der klinische Verlauf diffuser Gliome wird durch das biologische Verhalten der Tumorzellen und die Ansprechrate auf Bestrahlung und Chemotherapie bestimmt. Temozolomid (TMZ), ein Imidazotetrazin-Derivat, wird palliativ bei Patienten mit hochgradigen diffusen Gliomen zur Verlängerung der Überlebenszeit und Verbesserung der Lebensqualität eingesetzt. Die Patienten sprechen unterschiedlich gut an. Wir untersuchten, ob das Ansprechverhalten der Gliome auf die TMZ-Chemotherapie von spezifischen genetischen Markern im Tumorgewebe abhängt. Dazu wurden 28 Gliome mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH) untersucht. 18 Patienten wurden nach initialer Resektion bestrahlt und mit TMZ behandelt, 10 Patienten, die nach der OP nur bestrahlt worden waren, bildeten die Kontrollgruppe. Statistische Analysen zeigten, dass die Überlebenszeit der Patienten in der TMZ- Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht war. Die am häufigsten gefundenen genetischen Veränderungen waren sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Temozolomidgruppe Gewinne von Chromosom 7 und 12q, Verluste von 9p, 10q und 13q. Weiterhin zeigte sich, dass der Verlust von 10q in der Kontrollgruppe mit einem schlechten klinischen Verlauf assoziiert ist, wohingegen die Überlebenszeit TMZ-behandelter Patienten mit einer 10q Deletion deutlich verlängert war. Wir nehmen an, dass der Verlust eines oder mehrerer Gene (MGMT) auf 10q die Inaktivierung von Temozolomid behindert und damit den Therapieerfolg verbessert. Diese Daten zeigen, dass zytogenetische Untersuchungen von Glioblastomen von diagnostischem Nutzen sind und als genetische Marker in Bezug auf das Ansprechen auf die angewandte Chemotherapie herangezogen werden können.

A 38 Mikrodeletionen auf Chromosom 22q in zytogenetisch unauffälligen Meningeomen
Prowald, Alexandra (1,2), Biehl, C. (2), Wemmert, S. (2), Reichardt, S. (2), Freiler, A. (2), Ketter, R. (1), Zang, K.D. (2), Steudel, W.-I. (1), Urbschat, S. (2)

1) Neurochirurgische Klinik, 2) Institut für Humangenetik; Universität des Saarlandes, Homburg; ncapro@uniklinik-saarland.de
Meningeome sind spontan entstehende, in der Regel langsam wachsende gutartige Tumore, die sich von den Hirnhäuten ableiten. Sie werden nach ihrer biologischen Wertigkeit morphologisch in drei Klassen eingeteilt: WHO-Grad I bis III. Bei WHO-Grad I findet man zytogenetisch entweder einen normalen Karyotyp oder in etwa 40% der Fälle den Verlust eines Chromosoms 22. Im Zuge der Malignisierung steigt der prozentuale Anteil mit Monosomie 22 deutlich an und es kommen weitere Chromosomenverluste, vor allem der Verlust von 1p, hinzu. Wegen der lichtmikroskopisch gut erkennbaren numerischen bzw. grobstrukturellen Chromosomenveränderungen ist davon auszugehen, dass durch sensitivere Methoden, wie z.B. Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung-Analyse (FISH), auch bei zytogenetisch unauffälligen Meningeomen aberrante Befunde erhoben werden können. Denn es bleibt die Frage, welche molekulargenetischen Veränderungen in den 60% der zytogenetisch unauffälligen Grad I-Meningeome insbesondere auf Chromosom 22 vorliegen. Bekannt ist, dass bei knapp der Hälfte von Grad I Meningeomen Mutationen des NF2-Gens vorliegen. Wir haben 12 Meningeome, wobei 6 zytogenetisch bezüglich Chromosom 22 unauffällig waren und 6 eine Monosomie 22 aufwiesen, mittels FISH mit 22q-spezifischen Sonden auf Mikrodeletionen hin untersucht. Wir konnten in allen Fällen mit einer Monosomie 22 den zytogenetischen Befund mit FISH bestätigen (6/6). Interessanterweise konnten in den Tumoren, in denen Chromosom 22 zytogenetisch unauffällig war, in allen Fällen molekulargenetische Veränderungen auf Chromosom 22 detektiert werden (6/6). In 5/6 Fällen wurden Mikrodeletionen nachgewiesen (22q13), in 1/6 zeigte sich eine Verdopplung des distalen Bereiches eines Chromosoms 22 (22q13). Somit konnte erstmals in einer FISH-Studie nachgewiesen werden, dass zytogenetisch unauffällige Meningeome ausnahmslos genetische Veränderungen auf dem langen Arm von Chromosom 22 aufwiesen. Unsere Befunde bestätigen die Annahme, dass für die Meningeomentstehung offenbar nicht der Verlust des kompletten Chromosoms 22 erforderlich ist, sondern der Verlust von bestimmten Genen ausreicht.

A 39 Chromosomale Veränderungen bei nicht familiären Paragangliomen

Braun Simone (1,2), Pfister Markus (1), Riemann Kathrin (1,2), Sotlar Karl (3), Blin Nikolaus (2), Zenner Hans Peter (1), Kupka Susan (1,2)

1) Hörforschungszentrum, Universität Tübingen; 2) Institut für Anthropologie und Humangenetik, Universität Tübingen; 3) Institut für Pathologie, Universität Tübingen

Paragangliome der Kopf-Hals-Region sind sehr seltene (1:100.000-1:1.000.000), langsam wachsende, meist gutartige Tumore, die sich aus paragangliären Chemorezeptoren entwickeln. Paragangliome treten meist sporadisch auf, bei 10-50% handelt es sich um familiäre Fälle. Viele der bisher beschriebenen Fälle zeigen Mutationen in der Untereinheit D der Succinatdehydrogenase (SDHD), dem mitochondriellen Enzym II

Komplex. Darüber hinaus wurde bei einigen dieser Fälle ein Verlust der Heterozygotie (LOH) in diesem Bereich beobachtet. In unserem Kollektiv nicht familiärer Fälle ergab sich beim Screening auf Mutationen des SDHD-Gens, dass nur 4 von 20 Patienten eine Mutation in diesem Gen aufweisen. Dies legt den Schluss nahe, dass in den restlichen Fälle weitere Gene an der Ausbildung der Paragangliome beteiligt sein müssen. Um Hinweise auf weitere beteiligte Gene zu bekommen, wurde ein Screening des gesamten Genoms mittels der CGH (Comparative Genomische Hybridisierung) durchgeführt, um die Tumorzellen auf Deletionen und Amplifikationen der DNA hin zu untersuchen. Diese Untersuchungen zeigten diverse Veränderungen. Es konnten Verluste chromosomaler Bereiche auf 1q, Chromosom 22 und X beobachtet werden. Die chromosomalen Regionen 4p und 4q zeigen Amplifikationen. Diese Ergebnisse weisen deutlich auf mögliche andere bei der Tumorentwicklung involvierte chromosomale Regionen hin.

A 40 Nachweis von Chromosom 11-Verlusten bei sporadischen Paragangliomen der Kopf-Hals-Region mittels LOH und Interphase-FISH

Riemann, Kathrin (1,2); Braun, S. (1,2); Pusch, C. M. (2); Blin, N. (2); Pfister, M. (1); Zenner, H.-P. (1); Sotlar, K. (3); Kupka, S. (1,2)

1) Hörforschungszentrum der Universität Tübingen, Abteilung Molekulare Genetik, Tübingen; 2) Institut für Anthropologie und Humangenetik, Abteilung Molekulare Genetik, Universität Tübingen 3) Institut für Pathologie, Universität Tübingen

e-mail: KathrinRiemann@gmx.de

Paragangliome sind sehr selten auftretende, von Paraganglien in der Kopf-Hals-Region ausgehende, in der Regel gutartige Tumore, die überwiegend parasymphatische Ursprungs sind. Nur in sehr wenigen Fällen kommt es zu einer malignen Progression. Obwohl Paragangliome meist sporadisch auftreten, sind die genetischen Grundlagen der Onkogenese vorwiegend an familiären Tumoren untersucht wurden. Die Vererbung familiärer Paragangliome basiert auf einem dominanten Erbgang, der durch Imprinting des maternalen Allels gekennzeichnet ist. Studien haben gezeigt, dass die beiden verantwortlichen Loci für familiäre Paragangliome auf 11q23 (PGL1) und 11q13 (PGL2) lokalisiert sind, wobei PGL1 der am häufigsten involvierte Locus ist. Es konnte ausserdem gezeigt werden, dass das auf 11q23.3 befindliche Gen SDHD in der Mehrzahl der familiären Fälle verändert ist. Um zu überprüfen, ob diese Loci auch bei der Entstehung sporadischer Paragangliome involviert sind, haben wir Tumor- und Normalgewebe von Patienten mit sporadischen Paragangliomen untersucht. Zwei der Patienten wiesen multiple und zwei weitere Patienten maligne Tumore auf. Das Chromosom 11 wurde mittels LOH-Analysen untersucht, wobei alle Tumore gemeinsame Verluste auf 11q23-24 sowie in der Zentromerregion zeigten. Daraufhin wurden Paraffingewebeschnitte derselben Patienten mit zentromerspezifischen Sonden für das Chromosom 11 untersucht, wobei zahlreiche numerische Abweichungen detektiert wurden. Die Entstehung von Paragangliomen aufzudecken, ist besonders im Hinblick auf ihre Seltenheit von grosser Bedeutung. Bisherige Untersuchungen haben nicht in allen Fällen eine Involvierung von SDHD zeigen können und somit fehlen immer noch überzeugende Beweise, dass Veränderungen in diesem Gen allein ausreichend sind, um

die Tumorbildung vor allem bei sporadischen Paragangliomen zu induzieren.

A 41 Chromosomale Instabilität und Aneuploidie in hepatocellulären Carcinomen in Korrelation zur Morphologie

Wilkens Ludwig (1), Flemming Peer (2), Terkamp Christof (3), Bleck Jörg (3), Gebel Michael (3), Herrmann Hartmut (4), Kreipe Hans Heinrich (2), Schlegelberger Brigitte (1)

1) Institut für Zell- und Molekularpathologie, 2) Institut für Pathologie, 3) Klinik für Gastroenterologie, 4) Abteilung für Biometrie, Medizinische Hochschule Hannover, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover

Eine chromosomale Instabilität (CIN) tritt in einer Vielzahl solider Tumoren auf. Die Mechanismen der CIN sind bisher kaum verstanden. Um mehr darüber zu erfahren, wie eine CIN zu einer Aneuploidierung in Tumorzellen führt, haben wir FISH-Analysen an 18 hepatocellulären Carcinomen (HCC) durchgeführt und die Ergebnisse mit den morphologischen Daten der gut, mäßig oder schlecht differenzierten Carcinome (HCC-G1, G2 oder G3) verglichen. FISH für die Chromosomen 1 und 8 an cytologischen Ausstrichpräparaten zeigte eine Aneuploidie in 18/18 Fällen. Die durchschnittliche Zahl der Signale in 50 ausgewerteten Zellkernen lag für Chromosom 1 zwischen 2 und 7,76 (range: 2-21, SD 0 - 3,49), für Chromosom 8 zwischen 1,16 und 14,66 (range: 1-28, SD 0 - 5,34). Wenn man die durchschnittlichen Zahl der Signale für die Chromosomen 1 und 8 in der Gruppe der gut differenzierten HCC und der Gruppe der mäßig oder schlecht differenzierten HCC vergleicht, zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,002$, Mann-Whitney-Test). Dabei nimmt nicht nur die Kopienzahl zu, sondern es zeigt sich auch eine zunehmende Variabilität bzw. Standardabweichung mit deutlich unterschiedlichen Signalmustern für die Chromosomen 1 und 8 ($p < 0,001$). Die morphologisch eindeutig als dedifferenziert erkennbaren Tumorzellen wiesen bis zu 40 Signalkopien für die Chromosomen 1 und 8 und die höchste Variabilität der Signalmuster auf. Im Gegensatz dazu fanden sich in den hochdifferenzierten Tumorzellen maximal 9 Signale und ein konstantes Verhältnis der beiden Chromosomen. Dabei konnten in einem Teil der HCC sowohl hoch- als auch dedifferenzierte Tumorzellpopulationen gesehen werden. Zusammenfassend zeigte sich damit, dass die Entdifferenzierung der HCC von einer zunehmenden chromosomalen Instabilität begleitet wird. Die hierfür verantwortlichen Mechanismen der Chromosomenfehlverteilung sind Gegenstand nachfolgender Untersuchungen.

Session: Solide Tumoren 2

A 42 dim(9p21) im Gesamtmuster genomischer Imbalancen bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle

Gebhart Erich (1), Wolff E. (1), Ries J. (2), Liehr T. (3)

1) Institut f. Humangenetik d. Universität, Schwabachanlage 10, 91054 Erlangen 2) Klinik u. Poliklinik f. Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie d. Universität, Glückstr 11, 91054 Erlangen; 3) Institut f. Humangenetik u. Anthropologie d. Universität, Kollegiengasse 10, 07743 Jena

Die Deletion der Bande 9p21 bei menschlichen Neoplasien hat in letzter Zeit nicht nur wegen der dort lokalisierten Zellzykluskontrollgene

CDKN2A und B, sondern auch wegen des Gens für die Methylthioadenosylphosphorylase (MTAP) zunehmend Interesse gefunden. Letzteres Gen wird mit Therapieresistenz-Phänomenen in Verbindung gebracht. Außerdem wurde der Deletion 9p21 auch eine prognostische Bedeutung bei Kopf-Hals-Tumoren zugeschrieben. Es erschien uns daher angebracht, unsere früher bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle erhobenen CGH-Daten unter dem Aspekt des Vorhandenseins von *dim(9p21)* zu revidieren und die Bedeutung dieses genomischen Verlustes in den Gesamtrahmen genomischer Imbalancen bei diesen Tumoren zu stellen. CGH-Daten lagen von 36 einschlägigen Tumoren vor, 10 davon wiesen einen Verlust im Bereich des kurzen Armes von Chromosom 9 unter Einschluss der Bande p21 auf, bei zwei weiteren fand sich ein grenzwertiger Verlust im Bereich dieser Bande. Vergleicht man die Imbalance-Muster der zehn *del(9p21)*-Tumoren mit jenem aller Tumoren, die diese Deletion nicht aufweisen, so zeigen sich zunächst insofern auffällige Unterschiede, als dem äußerst komplexen, aber konsistenten Imbalancemuster der deletionstragenden Tumoren ein relativ heterogenes Muster mit durchschnittlich deutlich niedrigerer Häufigkeit von Veränderungen der DNA-Kopienzahl (CNAs) gegenübersteht. Auch hinsichtlich klinischer Parameter, wie TNM-Klassifikation, Rezidivrate und Überlebensdauer traten bei diesem Vergleich mehr oder weniger signifikante Unterschiede zu Tage. Bezog man aus der Gruppe der nicht-deletionstragenden Tumoren jedoch nur jene 10 Fälle mit den höchsten Zahlen an CNAs in den Vergleich mit den 10 Deletions-Fällen ein, so änderte sich das Bild jedoch deutlich: Das Muster der häufigsten Imbalancen unterschied sich nur geringfügig zwischen beiden Gruppen, außerdem fanden sich nahezu keine Unterschiede in den klinischen Parametern mehr. Daraus ist zu schließen, dass es die Komplexität und Konsistenz des Gesamtmusters genomischer Imbalancen ist, welches die klinischen Parameter und die Prognose entscheidend beeinflusst, und nicht die Deletion 9p21 für sich allein. Letzterer kommt jedoch zweifellos bei Neoplasien eine besondere Bedeutung zu, die einer Therapie mit Zytostatika unterzogen werden, welche in den Purinstoffwechsel eingreifen. Andererseits dokumentiert unsere CGH-Studie die unveränderte Bedeutung einer Analyse des gesamtgenomischen Imbalancemusters bei soliden Tumoren. Gefördert aus Mitteln der Deutschen Krebshilfe

A 43 Untersuchungen von Onkogen-Amplifikationen in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region mittels Gewebemikroarrays.

Stefan Joos (1), Kolja Freier (1,2), Christa Flechtenmacher (3), Frauke Devens (1), Axel Benner (4), Franz X. Bosch (5), Peter Lichter (1), and Christof Hofele (2)

1) Deutsches Krebsforschungszentrum, Abt. Molekulare Genetik (B060), Heidelberg;
2) Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Heidelberg, Heidelberg;
3) Pathologisches Institut, Universitätsklinikum Heidelberg, Heidelberg;
4) Deutsches Krebsforschungszentrum, Abt. f. Biostatistik, Heidelberg;
5) Molekularbiologisches Labor der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Heidelberg, Heidelberg

An einem Gewebemikroarray (TMA) mit insgesamt 609 Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region, darunter 511 primären Karzinomen sowie 98 Rezidiven, wurde mittels FISH die Häu-

figkeit von Amplifikationen von fünf Onkogenen (CCND1, MYC, EGFR, ERBB2 und ZNF217) untersucht. CCND1-Amplifikationen wurden signifikant häufiger in primären pharyngealen Karzinomen als in primären oralen oder laryngealen Tumoren gefunden ($p < 0.001$). Darüber hinaus konnte eine größere Anzahl an CCND1 Amplifikationen in primären Tumoren des Stadium IV verglichen mit den Stadien I-III nachgewiesen werden ($p < 0.001$). ZNF217-Amplifikationen zeigten sich dagegen häufiger in primären Karzinomen der Mundhöhle ($p = 0.02$). Insgesamt deuten die Untersuchungen auf einen Einfluss von Onkogen-Amplifikationen auf den unterschiedlichen klinischen Verlauf von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region in verschiedenen anatomischen Lokalisationen und klinischen Stadien hin. Sie zeigen außerdem, wie effektiv TMAs für das Auffinden prognostischer Marker eingesetzt werden können.

A 44 Korrelation von CGH identifizierten genetischen Alterationen und deren Expressionsprofilen in Brustkrebszelllinien
 Arnold Norbert (1), Jacobsen A. (1), Weimer J. (1), Jonat W. (1), Scherneck S. (2), Seitz S. (2)

1) Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel, 24105 Kiel; email: nkarold@email.uni-kiel.de

2) Abteilung für Tumorgenetik, Max-Delbrück-Zentrum, 13122 Berlin

Im Rahmen dieser Studie sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen chromosomalen Veränderungen und des mRNA Expressionsmusters mit Hilfe der vergleichenden Genomhybridisierung (CGH) und der cDNA Microarray-Technologie untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde eine CGH und ein mRNA Expressionsprofiling mit der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 und einer, nach Mikrozell-Transfer von Chromosom 8 entstandenen, nicht-tumorigenen Transfektanten etabliert. Die zuerst durchgeführte CGH mit weiblicher Kontroll-DNA diente zur Abklärung der genomischen Stabilität der Ausgangszelllinie MDA-MB-231. Die gewonnenen Ergebnisse zeigten eine große Übereinstimmung mit den bisher zu dieser Zelllinie veröffentlichten CGH-Daten. Um Informationen über weitere chromosomale Veränderungen in der nicht-tumorigenen Hybridzelllinie zu erhalten, wurde eine CGH gegen MDA-MB-231 als Kontrolle durchgeführt. Dieser Vergleich ergab insgesamt zehn Veränderungen. Neben Chromosom 8 zeigten noch 14q und 16q einen Zugewinn. Verluste wurden bei den Chromosomenarmen 3p, 6p, 7p, 10p, 10q und 15q nachgewiesen. Die Expressionsprofile der entsprechenden chromosomalen Regionen, ermittelt mit dem Humanen Genome U133A Chip (Affymetrix), ergaben korrelierende Resultate. Im Vergleich zu der Ausgangszelllinie konnte für die transfizierte Zelllinie eine mehr als 2-fache Überexpression bei 8p, 8q, 14q und 16q und eine um 2-fach verminderte mRNA-Expression bei 3p, 7p, 10p, 10q und 12p detektiert werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, dass chromosomale Imbalancen einen direkten Einfluss auf das Genexpressionsmuster ausüben.

A 45 Identifizierung eines Fusionsgens für Schilddrüsenadenome mit 2p21-Aberrationen

Belge, Gazanfer, Drieschner, N., Hommes, J., Meiboom, M., Rippe, V., Bullerdiek, J.

Zentrum für Humangenetik, Universität Bremen, belge@uni-bremen.de Bremen

Schilddrüsenhyperplasien (Strumen) und Adenome gehören zu den häufigen Veränderungen des Schilddrüsenfollikel epithels. Sowohl die Hy-

perplasien als auch die benignen Tumoren der Schilddrüse gehören mittlerweile zu den zytogenetisch gut untersuchten Gewebeveränderungen (Belge et al., 1998). Bei zytogenetischen Untersuchungen von mehr als 500 Läsionen wurden in ca. 20% der Fälle klonale Chromosomenaberrationen gefunden. Diese Läsionen mit klonalen Veränderungen lassen sich in drei große zytogenetische Subgruppen einteilen. Die größte Gruppe ist durch eine Trisomie 7 als einzige Veränderung oder als Teil einer charakteristischen Sequenz von Trisomien charakterisiert. Die häufigsten strukturellen Aberrationen stellen Veränderungen des Chromosoms 19 in der Bande 19q13 und Veränderungen des Chromosoms 2 in der Bande 2p21 dar. Nach Etablierung von Zelllinien mit 2p21-Translokationen wurde diese Bruchpunktregion zunächst mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) molekulargenetisch analysiert. Die Bruchpunkte der benignen Schilddrüsenläsionen mit 2p21-Translokationen konnten in einem genomischen Bereich von ca. 316 kb zwischen zwei BAC-Klonen eingegrenzt werden. Molekulargenetische Untersuchungen der Bruchpunktregion führten zur Identifizierung eines neuen Kandidatengens für diese Tumoren, das wir als THADA (Thyroid Adenoma Associated) bezeichnet haben. THADA kodiert für ein mit dem „Death Receptor“ (DR5) interagierendes Protein. Durch 3'-RACE-PCR-Untersuchungen konnten an zwei Zelllinien aberrante THADA-Transkripte identifiziert werden. In beiden Zelllinien gehen durch die Translokationen die terminalen Sequenzen von THADA nach Exon 28 verloren und werden durch Fusionssequenzen ersetzt. Wir gehen davon aus, dass das trunkierte THADA-Protein DR5 blockiert und dadurch die Induktion der Apoptose beeinträchtigt. Dadurch kann es zum veränderten Wachstum von Follikel epithelzellen und damit zur histologischen Veränderung der Schilddrüsenadenome, wie z.B. Bildung einer Pseudokapsel und Ausbildung microfollikulärer Strukturen, kommen. Daher kann das zum Adenom führende Wachstum von Schilddrüsenzellen auch als gestörte Homöostase zwischen Wachstum und Induktion der Apoptose interpretiert werden.

A 46 Zytogenetische Analyse des Nierenzellkarzinoms durch vergleichende Untersuchung mittels CGH, M-FISH und Giemsa-Bänderung

Sanjmyatav, Jimsgene; Ilse, B.; Jeschke, J.; Schubert, J.; Junker, K.

Klinik für Urologie FSU Jena, BRD, jimsgene.sanjmyatav@med.uni-jena.de

Einführung: Die komparative genomische Hybridisierung (CGH) ist eine sehr effektive Methode, welche die Identifizierung aller unbalancierten chromosomalen Aberrationen erlaubt und in der Tumorzytogenetik weite Verbreitung gefunden hat. Die verschiedenen Grundtypen des Nierenzellkarzinoms (NZK) sind in der Vergangenheit mit der CGH-Technik umfassend untersucht worden. Für die Detektion der balancierten Umordnungen im Genom eignen sich die M-FISH-Technik (multicolor-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) und die klassischen Bänderungstechniken. Um mehr Kenntnisse über die spezifischen genetischen Veränderungen der Nierenzellkarzinome zu erhalten ist es wichtig, verschiedene Methoden in Kombination einzusetzen. Deshalb haben wir uns das Ziel gestellt, die Nierenzelltumore mit den obengenannten Methoden umfassend zu analysieren und zu zeigen, inwieweit die Methoden sich gegenseitig ergänzen und/oder bestätigen. Material und Methoden: In der folgenden Arbeit wurden 7

klarzellige und 5 papilläre Nierenzellkarzinome untersucht. Bei allen Nierenzellkarzinomen wurden Kurzzeitkulturen durchgeführt und davon Präparate mit Metaphasenchromosomen angefertigt. Die Hälfte der Zellen der Kurzzeitkulturen wurde für die DNA-Isolierung eingesetzt. Parallel dazu wurden aus den Tumor-positiven Regionen der tiefgefrorenen Gewebeschnitte der Nierentumore auch DNA isoliert. Die aus Zellkulturen und Schnitten isolierten DNA-Proben wurden für die CGH-Technik weiter verwendet. Mit den Präparaten der Metaphasenchromosomen wurden M-FISH und Giemsa-Bänderung durchgeführt. Ergebnisse: Bei 8 analysierten Nierenzellkarzinomen wurden sowohl in den Schnitten als auch in den Zellkulturen unbalancierte Aberrationen festgestellt. Bei diesen 8 Nierenzellkarzinomen waren die Gewinne und Verluste der DNA, die in den CGH-Profilen der Gewebsschnitte schwach angedeutet zu sehen sind, sehr viel deutlicher bei den CGH-Profilen der Zellkulturen ausgeprägt. Die Gewinne und Verluste, die in den CGH-Profilen der Zellkulturen deutlich ausgeprägt waren, konnten auch durch Karyotypisierung der Zelltypen mittels M-FISH und Giemsa-Bänderung bestätigt werden. Die M-FISH-Analyse konnte die Art der unbalancierten Alterationen und den Mechanismus der Entstehung von Verlust oder Zugewinn des jeweiligen Chromosomenabschnitts aufzeigen. Man konnte auch bei einigen NZK-en balancierte Translokationen feststellen. Bei 4 NZK wurden nur in den Gewebsschnitten Gewinne und Verluste der DNA festgestellt. Bei den Zellkulturen konnte keine Änderung im CGH-Profil registriert werden. Durch M-FISH und Giemsa-Bänderungsergebnisse wurden ebenfalls keine Veränderungen nachgewiesen. Schlussfolgerung: Es ist anzunehmen, dass im Tumorgewebe eine heterogene Zellpopulation vorhanden sein muss, wodurch die Änderungen in den CGH-Profilen schwächer erscheinen, während in der Zellkultur nur bestimmte Zelltypen selektiert und angereichert werden. Bei dieser Untersuchung des Nierenzellkarzinoms konnten wir zeigen, dass sich die molekularzytogenetischen Methoden CGH und M-FISH in Kombination mit der klassischen Bänderungstechnik sehr gut gegenseitig ergänzen und bestätigen. Diese 3 Methoden liefern zusammen ein umfassenderes Bild über Art und Entstehungsmechanismus von genetischen Alterationen in den spezifischen Tumorentitäten.

A 47 Molekularzytogenetische Charakterisierung von Tumorgewebe bei Patienten mit Nicht kleinzelligen Lungentumoren

Hilbe W. (1), Egerth B. (2), Rammesmayr G. (2), Wöll E. (1), Dirrhofer S. (3), Schmid T. (4), Mildner A. (5), Amann K.H. (4), Erdel M. (2), Utermann G. (2) und Duba H.C. (2,6)

1) Universitätsklinik für Innere Medizin, Innsbruck, Austria; 2) Institut für Medizinische Biologie und Humangenetik, Universität, Innsbruck, Austria; 3) Institut für Pathologie, Universität Basel, Switzerland; 4) Universitätsklinik für Chirurgie, Innsbruck, Austria, 5) Chirurgische Abteilung, Landeskrankenhaus Natters, Austria; 6) Humangenetische Untersuchungs- und Beratungsstelle, Landesfrauenklinik Linz, Austria

Einleitung: Zahlreiche Studien haben sich bis dato mit der Identifizierung und Charakterisierung von genetischen Veränderungen beim Nicht-kleinzelligen Lungencarcinom beschäftigt. Ziel dieser Studien ist es unter anderem - unter

Anwendung neuer diagnostischer Methoden - molekulare Marker zu finden, mit denen das individuelle Rezidivrisiko für jeden Patienten ermittelt werden kann. Die Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH) ist eine einfache und sensitive Methode um Deletionen und Amplifikationen zu diagnostizieren. Sie könnte in Zukunft als Routinemethode im Rahmen von Screening Tests eingesetzt werden. Methoden: In dieser Studie wurden 130 Lungenschnitte von 76 Patienten untersucht die an einem Nicht-kleinzelligen Lungencarcinom erkrankt waren. Zusätzlich wurde bei 54 Patienten dem Tumor benachbartes, offensichtlich normales Gewebe untersucht. Lungenschnitte von Autopsien von „lungengesunden“ Patienten dienten als Kontrolle. Alle Gewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff gefriergetrocknet und bei -80°C bis zum Schneiden aufbewahrt. Nach Durchführung einer Kernextraktionsmethode wurde eine FISH mit folgenden Proben durchgeführt: a) Locus-spezifische Proben: LSI[®]p16 (9p21)/CEP[®]9 Dual Color Probe; LSI[®]13 (RB1) 13q14 Probe; LSI[®]p53 (17p13.1) Locus specific probes for 3p14.2, 3p21, 3p21.3, 3p25.3. b) Zentromerproben: CEP[®]4, CEP[®]7; CEP[®]11, CEP[®]16, CEP 17[®]; Probes c) LAVision[™] Multi-color Probe: LSI EGFR (7p12) labeled with SpectrumRed[™], LSI C MYC (8q24.12) probe labeled with SpectrumGold[™], LSI D5S23 and D5S271 (5p15.2) labeled with SpectrumGreen[™], CEP 6 (centromere of chromosome 6, 6p11.1-q11) labeled with SpectrumAqua[™]. Resultate: 1. Tumorgewebe: Deletionen wurden bei 37% der Tumorproben in 13q14 (RB), in 35% in 17p13.1 (p53) und in 18% in 9p21 (p16) gefunden. Monosomie von Chromosom 16 wurde in 12%, und von Chromosom 17 in 8% entdeckt. 3p Veränderungen fanden sich zwischen 77% und 94%. Amplifikationen mit der Multicolor Probe fanden sich in 45% bis 96% der Proben. Alle Tumorproben zusammengefasst (100%) fand sich mindestens eine chromosomale Veränderung (Median 8, Bandbreite 2 - 14). 2. Tumorfrees Gewebe: Im Vergleich mit den Tumorproben fanden sich die signifikantesten Unterschiede mit der Multicolor Probe (Amplifikation in 0 - 17%). Veränderungen mit den Zentromerproben und 3p-Veränderungen fanden sich seltener als bei den Tumorgeweben. Zusammengefasst fanden sich in tumorfrees Geweben molekularzytogenetische Veränderungen in 87% der Fälle (Median 4, Bandbreite 0-7). 3. Statistik: Keiner der getesteten Parameters zeigte prognostische Signifikanz mittels univariater Cox Analyse. Zusammenfassung: FISH mit Multicolorstrategien ist eine potente Methode um molekularzytogenetische Veränderungen beim Nicht-kleinzelligen Lungencarcinom darzustellen. Sogar im „tumorfrees“ Nachbargewebe von Tumorpatienten zeigten sich molekularzytogenetische Veränderungen. Dies könnte man sich in Zukunft beim Einsatz von Screening-Tests zu Nutzen machen.

Übersichtsvortrag

A 48 Zytogenetik solider Tumoren
Füzesi, Laszlo
Zentrum Pathologie, Georg-August-Universität, D-37075 Göttingen
fuezesi@med.uni-goettingen.de

Die Anzahl der zytogenetisch untersuchten soliden Tumoren ist in den letzten zwei Dekaden stark gestiegen. Bei vielen Tumoren sind die primären, für die Tumorentstehung verantwortlichen chromosomalen Aberrationen bekannt geworden. Bei einigen Tumoren sind auch zytogenetische Modelle entwickelt worden, die

zytogenetische Tumorprogression beschreiben. Hierbei wird weiterhin das Ziel bleiben, prognoserelevante genetische Aberrationen zu entdecken, die klinisch verwertbar sind und Anlässe für weiter molekulargenetische Analysen ergeben. In dem Übersichtsreferat werden folgende Aspekte der Tumorzytogenetik solider Tumoren angesprochen: Technik, Umgang mit primären und sekundären chromosomalen Aberrationen und mathematische Modellierung zytogenetischer Ergebnisse. Technik: Über lange Zeit ist angenommen worden, dass die soliden Tumoren schwer zu kultivieren sind. Das grundsätzliche Problem hierbei ist, dass die makroskopische und mikroskopische Erfahrung mit soliden Tumoren häufig bei Pathologen liegt und über die Erfahrung mit Zellkultur in der Regel die Genetiker verfügen. Es gibt wenige Orte, an denen die Entnahme des Materials und dessen Aufarbeitung in einer Hand liegen. An mehreren Beispielen werden Erfahrungswerte gezeigt, worauf man grundsätzlich bei der Gewebeentnahme für Zellkultur achten sollte. Entscheidende Faktoren sind hierbei die kurzen Wege von Operationsaal bis zur Zellkultur, die Vitalität des Tumors, Kenntnisse über Histopathologie der Tumoren mit oder ohne Fibrosierung bei der Gewebeentnahme, die optimale Kollagenasezeit und die anfängliche Zelldichte. Primäre chromosomale Aberrationen sind bei vielen soliden Tumoren bekannt. Dennoch bleiben einige häufige oder viele seltene Tumoren übrig, bei denen noch keine oder unzureichende Kenntnisse vorliegen, wie bei Prostata-, Mamma- oder kolorektalen Karzinomen. Es wird weiterhin eine große Herausforderung bleiben, die primären genetischen Aberrationen bei allen soliden Tumoren zu definieren. Sekundäre chromosomale Aberrationen haben aus klinischer Sicht einen sehr hohen Stellenwert. Sie sind die Veränderungen, die die zytogenetische Tumorprogression vorgeben. Hierbei stellt sich nur die Frage, welche Veränderungen hierbei tatsächlich von klinischer Bedeutung sind. Bei der Überprüfung der prospektiven Bedeutung der einzelnen Aberrationen wurden bis vor kurzem uni- und multivariate Analysen eingesetzt. In den letzten Jahren kam die hierarchische Clusteranalyse dazu. Am Beispiel der Nierenzellkarzinome und der gastrointestinalen Stromatumoren wird die Anwendbarkeit der Clusteranalyse gezeigt. Mathematische Modellierung zytogenetischer Tumorprogression wurde in der Vergangenheit bei vielen soliden Tumoren versucht. Das bekannteste Modell ist das von Vogelstein entwickelte Modell für Dickdarmtumoren. Bei den meisten Modellen hat man die Laborerfahrung mit genetischen Veränderungen genommen und daraus ein sequenzielles Modell konstruiert. Diese Modelle wurden mit der Zeit immer wieder überprüft und ergänzt. Es gibt z. Zt. Ansätze, in Zusammenarbeit mit Mathematikern stochastische Modelle zu entwickeln, die eine hohe Flexibilität der genetischen Ereignisse zulassen. In dem Referat werden die Grundsätze der jetzigen gängigen mathematischen Modellierungen gezeigt.