



Sarah Volpert

**Comparative genomische Hybridisierung und  
Fluoreszenz in situ Hybridisierung  
beim multiplen Myelom**

-2003-

Mikrobiologie

**Comparative genomische Hybridisierung und  
Fluoreszenz in situ Hybridisierung  
beim multiplen Myelom**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
Sarah Volpert, geb.: Stachowski  
aus Lippstadt

-2003-

---

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. A. Steinbüchel
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. F. Meinhardt
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. J. Horst
Tag der mündlichen Prüfungen:	27.11.2003 / 03.12.2003
Tag der Promotion:	03.12.2003

meinem Mann

## Danksagungen

Herrn Prof. Dr. J. Horst danke ich für die interessante Themenstellung dieser Arbeit, die Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. F. Meinhardt danke ich ganz herzlich für die Mitbetreuung dieser Arbeit im Fachbereich Biologie.

Herrn Prof. Dr. I. Kennerknecht danke ich für die Unterstützung und Diskussionsbereitschaft in Bezug auf tumor-/zytogenetische Fragestellungen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. J. Tchinda Ndjukem für die Einführung in die Tumorzytogenetik, die fortwährende Unterstützung, die konstruktiven Diskussionen und Hilfestellungen. Durch ihr persönliches Engagement trug sie zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Für die freundschaftliche Atmosphäre, die vielen lustigen Momente und stetes Verständnis möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen des Tumorzytogenetischen Labors -Katja Poorthuis, Marcelina Skrobek, Irina Boos und Vera Raid- bedanken.

Den Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben sei an dieser Stelle mein Dank ausgesprochen.

Herr Prof. Dr. M. Mesters, Herr Dr. A. Grote und Herr Dr. M. Kropff haben mich bei den klinischen Aspekten dieser Arbeit unterstützt.

Sabine Chantré, Christof Volpert und Christian Otte haben zur formgerechten Erstellung dieser Arbeit ihre knappe Freizeit geopfert. Vielen herzlichen Dank dafür.

Bedanken möchte ich mich vor allem bei meinen Eltern, die mir das Absolvieren eines Studiums ermöglicht und mich stets darin bestärkt haben.

Mein größter Dank gilt meinem Mann, der immer auch in turbulenten Zeiten für mich da war, mich motiviert hat und mir in vielen Gesprächen Kraft gegeben hat.

## Abkürzungsverzeichnis

ABL	Abelson-Maus-Leukämie-Gen
add	Addition
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
Aqua dest.	destilliertes Wasser ( <i>aqua destillata</i> )
BAC	künstliches Bakterienchromosom ( <i>bacterial artificial chromosome</i> )
<i>BCR</i>	<i>breakpoint cluster region</i>
<i>BCL-1</i>	<i>B-cell leukemia/lymphoma 1</i>
BMPC	Plasmazellanteil im Knochenmark
CC	konventionelle Zytogenetik
CCD-Kamera	<i>charge-coupled device camera</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cen	Zentromer
CGH	Comparative genomische Hybridisierung
CLL	chronische lymphatische Leukämie
<i>c-MAF</i>	<i>musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog</i>
CML	chronische myeloische Leukämie
<i>c-MYC</i>	<i>human homologue of the MC29 avian myelocytomatosis virus oncogene</i>
C-Region	konstante Region
CRP	C-reaktives Protein
DAPI	4,6-diamino-2-phenyl-indole
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat
del	Deletion
der	Derivatchromosom
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dic	dizentrisch
DLCL	diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dmin	„ <i>double minute</i> “ Chromosom
dNTP	Desoxynukleotide
D-Region	<i>density-region</i>
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
dup	Duplikation
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure-Dinatriumsalz
FCS	Fötales Kälberserum
FGFR3	<i>fibroblast growth factor receptor 3</i>
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FL	föllikuläres Lymphom
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GTG	Giemsa-Trypsin-Giemsa
Hb	Hämoglobin
HLA-DR	<i>human leukocyte antigen</i>
hsr	homogen gefärbte Region ( <i>homogeneously stained region</i> )
idem	<i>lateinisch</i> = dasselbe
Ig	Immunglobulin

<i>IgH</i>	Immunglobulin-Schwerkettenlocus
IL-6	Interleukin 6
ins	Insertion
ISCN	Internationales System für Humanzytogenetische Nomenklatur
ISH	in situ Hybridisierung
J-Region	<i>joining-region</i>
k.A.	keine Angaben
kb	Kilobasenpaare
LDH	Laktatdehydrogenase
mar	Markerchromosom
Mb	Megabasenpaare
m-FISH	Vielfarben-FISH ( <i>multiplex-fluorescence in situ hybridization</i> )
MGUS	monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz
MM	multiples Myelom
MOPS	3-[N-morpholino]propanesulfonicacid
<i>MMSET</i>	<i>nuclear set domain protein</i>
M-Protein	Sammelbezeichnung für die Paraproteine beim multiplen Myelom
PCLI	Plasmazell-Labeling-Index
PHA	Phytohämagglutinin
PZL	Plasmazell-Leukämie
<i>RBI</i> -Gen	Retinoblastom 1-Gen
R.E.A.L.	Revised European American Lymphoma
RNA	Ribonukleinsäure
RNaseA	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rotations per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SSC	Saline-Natriumcitrat ( <i>saline sodium citrat</i> )
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SKY	Spektrale Karyotypisierung ( <i>spectral karyotyping</i> )
SMM	Smouldering Myelom
$\beta_2$ -M	$\beta_2$ -Mikroglobulin
t	Translokation
tel	Telomer
Tris	Tris[hydroxymethyl]-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-isothiocyanat
U	Einheit ( <i>unit</i> )
UKM	Universitätsklinikum Münster
ü.N.	über Nacht
VF	Verdünnungsfaktor
V-Region	Variable Region
v/v	Volumenprozent ( <i>volume per volume</i> )
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organization</i> )
w/v	Gewichtsprozent ( <i>weight per volume</i> )
YAC	künstliches Hefechromosom ( <i>yeast artificial chromosome</i> )
ZNS	Zentralnervensystem

Allgemein gebräuchliche Maßeinheiten und Abkürzungen sind nicht angegeben.



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Plasmazellerkrankungen	1
1.1.1 Monoklonale Gammopathien	1
1.1.2 Die Entwicklung der normalen Plasmazelle	2
1.1.3 Maligne Transformation	4
1.1.4 Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome	6
1.1.5 Monoklonale Gammopathien unbestimmter Signifikanz (MGUS)	9
1.1.5.1 Definition, Inzidenz und Epidemiologie	9
1.1.5.2 Klinik	9
1.1.6 Multiples Myelom (MM)	10
1.1.6.1 Definition, Inzidenz und Epidemiologie	10
1.1.6.2 Klinik	11
1.1.6.3 Zellmorphologie	11
1.1.6.4 Immunphänotyp	12
1.1.6.5 Diagnose, Stadieneinteilung und Prognosekriterien	12
1.1.7 Formvarianten des multiplen Myeloms/Plasmozytoms	14
1.1.7.1 Smouldering Myelom (SMM)	14
1.1.7.2 Indolentes Myelom	15
1.1.7.3 Osteosklerotisches Myelom	15
1.1.7.4 Nichtsklerotisches Myelom	15
1.1.7.5 Plasmazell-Leukämie (PZL)	15
1.1.7.5.1 Definition und Inzidenz, Epidemiologie	15
1.1.7.5.2 Klinik	16
1.1.7.5.3 Zellmorphologie	16
1.1.7.5.4 Immunphänotyp	16
1.1.7.5.5 Prognose	17
1.1.7.6 Plasmozytom	17
1.1.7.6.1 Solitäres Plasmozytom des Kochens	17
1.1.7.6.2 Extramedulläres Plasmozytom	17
1.2 Tumorzytogenetik	18
1.2.1 Historische Entwicklung	18
1.2.2 Die klassische Zytogenetik	19
1.2.2.1 Konventionelle Zytogenetik beim multiplen Myelom (MM)	21
1.2.2.2 Konventionelle Zytogenetik bei der Plasmazell-Leukämie (PZL)	22
1.2.2.3 Konventionelle Zytogenetik bei den monoklonalen Gammopathien unbestimmter Signifikanz (MGUS)	23
1.2.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	23
1.2.3.1 Prinzip	23
1.2.3.2 FISH bei MM, PZL und MGUS	24

1.2.3.2.1 Nachweis aberranter Karyotypen mit der FISH.....	25
1.2.3.2.2 IgH-Rearrangements und Deletionen im Chromosom 13.....	25
1.2.4 Comparative genomische Hybridisierung (CGH).....	26
1.2.4.1 Prinzip.....	26
1.2.4.2 CGH bei MM, PZL und MGUS.....	27
1.2.5 Spektrale Karyotypisierung oder multiplex-FISH.....	28
1.2.5.1 Prinzip.....	28
1.2.5.2 SKY/M-FISH bei MM, PZL und MGUS.....	30
1.3 Zielsetzung.....	30
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>31</b>
2.1 Material.....	31
2.2 Methoden.....	31
2.2.1 Morphologie.....	31
2.2.2 Konventionelle Zytogenetik (CC).....	32
2.2.2.1 Metaphasenpräparation aus Knochenmarkaspirat.....	32
2.2.2.2 Giemsa-Trypsin-Bänderung (GTG).....	33
2.2.2.3 Lichtmikroskopische Karyotypanalyse.....	34
2.2.3 Comparative genomische Hybridisierung (CGH).....	35
2.2.3.1 Zellkulturen und Metaphasenpräparation für die CGH.....	35
2.2.3.2 DNA-Isolierung.....	36
2.2.3.2.1 DNA-Isolierung aus fixierten Zellen.....	36
2.2.3.2.2 DNA-Isolierung aus Vollblut.....	37
2.2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	38
2.2.3.4 Nicktranslation.....	38
2.2.3.5 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	40
2.2.3.6 Herstellung der CGH-Sonde und Hybridisierung.....	41
2.2.3.7 Detektion.....	43
2.2.3.8 Bildaufnahme und –Verarbeitung.....	43
2.2.3.9 Auswertung.....	45
2.2.4 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH).....	46
2.2.4.1 FISH mit kommerziellen DNA-Sonden.....	46
2.2.4.1.1 Vorbehandlung und Denaturierung der Präparate.....	47
2.2.4.1.2 Hybridisierung und Auswertung.....	47
2.2.4.2 FISH mit nicht kommerziellen DNA-Sonden.....	47
2.2.4.2.1 Herstellung eigener Gensonden.....	47
2.2.4.2.1.1 Anzucht von BACs und PACs.....	48
2.2.4.2.1.2 Isolierung von BAC- und PAC-DNA.....	49
2.2.4.2.1.3 Anzucht von YACs.....	50
2.2.4.2.1.4 Gesamt-DNA-Isolierung aus Hefezellen.....	51
2.2.4.2.1.5 Anlegen von Gefrierkulturen.....	52
2.2.4.2.1.6 ALU-PCR.....	52

2.2.4.2.1.7 DNA-Markierung.....	54
2.2.4.2.1.8 Aufreinigung der markierten DNA.....	55
2.2.4.2.1.9 Herstellung der DNA-Sonde und Hybridisierung.....	56
2.2.4.2.1.10 Detektion und Auswertung.....	57
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>58</b>
3.1 Klinische Parameter.....	58
3.2 Konventionelle Zytogenetik.....	60
3.2.1 Ergebnisse der CC bei MM, MGUS und PZL.....	60
3.3 CGH.....	66
3.3.1 CGH eines Patienten mit Veränderungen.....	66
3.3.2 Ausschluss von Artefakten.....	69
3.3.3 Ergebnisse der CGH bei Patienten mit MM/MGUS.....	69
3.3.4 Korrelation CGH-CC.....	71
3.3.4.1 Ergebnisse der CGH bei Patienten mit normalem Karyotyp.....	71
3.3.4.2 Ergebnisse der CGH bei Patienten ohne Resultat in der CC.....	71
3.3.4.3 Ergebnisse der CGH bei Patienten mit aberrantem Karyotyp.....	71
3.4 FISH.....	73
3.4.1 Korrelation FISH-CGH.....	73
3.4.2 Ergebnisse der FISH im IgH- und D13S319-Locus.....	77
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>81</b>
4.1 Konventionelle Zytogenetik.....	81
4.1.1 Chromosom 1.....	84
4.1.2 Chromosom 13.....	84
4.1.3 Chromosom 14.....	85
4.2 CGH.....	86
4.2.1 Methodische Aspekte.....	86
4.2.2 Korrelation CGH/konventionelle Zytogenetik.....	88
4.2.3 Zugewinne und Verluste bei Myelompatienten.....	89
4.2.3.1 Chromosom 7, 8 und 15.....	91
4.2.3.2 Chromosom 9.....	91
4.2.3.3 Chromosom 11.....	93
4.2.3.4 Chromosom 21.....	95
4.2.3.5 Chromosom 13 und 22.....	96
4.3 FISH.....	97
4.3.1 Aberrationen der Region 14q32.3.....	97
4.3.2 Deletionen der Region 13q14.3.....	101
4.3.3 Korrelation del(13)/14q32.3-Aberrationen.....	103
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>104</b>
<b>6. LITERATUR.....</b>	<b>105</b>

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Plasmazellerkrankungen

Unter dem Terminus Plasmazelldyskrasien werden alle monoklonalen Plasmazellproliferationen im Knochenmark zusammengefasst. Ihr gemeinsames Charakteristikum ist eine Proliferation von Plasmazellen mit identischer Immunglobulin-Leicht- und -Schwerkettenproduktion. Innerhalb der Plasmazelldyskrasien werden benigne Formen von malignen Plasmazelltumoren unterschieden. Der Übergang von einer benignen in eine maligne Form ist nach Jahren möglich (Kyle, 1997). Die größte Gruppe der Plasmazelldyskrasien, die Monoklonalen Gammopathien, beinhaltet sowohl maligne als auch benigne Entitäten (Axelsson et al., 1966).

#### 1.1.1 Monoklonale Gammopathien

Die klonale Plasmazellproliferation geht in der Regel mit der Bildung eines Paraproteins einher. Das Spektrum der Erkrankungen, die sich hinter einer monoklonalen Gammopathie verbergen, ist groß und umfasst neben malignen Erkrankungen auch Veränderungen, deren Dignität zum Zeitpunkt der Feststellung der Paraproteinämie nicht eindeutig einzustufen ist. Außerdem sind Plasmazellvermehrungen abzugrenzen, die keine Bildung eines Paraproteins zeigen (Diebold, 2002).

Monoklonale Gammopathien werden sowohl bei gesunden Personen als auch bei unterschiedlichen Erkrankungen beobachtet und sind nicht in jedem Fall Ausdruck einer malignen Plasmazellerkrankung (Draube et al., 1999). Es werden folgende Gruppen unterschieden:

- a) Passagere monoklonale Gammopathien: diese verlaufen asymptomatisch und treten nur für einen begrenzten Zeitraum auf.
- b) Monoklonale Gammopathien unbestimmter Signifikanz (MGUS): oft als benigne monoklonale Gammopathie bezeichnet; können nach Jahren in eine maligne Plasmazellerkrankung übergehen.
- c) Monoklonale Begleitgammopathien: diese kommen als Begleiterscheinung verschiedener maligner hämatopoetischer Erkrankungen vor.
- d) Maligne monoklonale Gammopathien: die größte Gruppe stellt hier das multiple Myelom dar (Bartl & Wilmanns, 2000).

Es werden die Gruppen der Monoklonale Gammopathien unbestimmter Signifikanz (MGUS) als prämaligene Form und das multiple Myelom (MM) als maligne monoklonale Gammopathie, die Gegenstand dieser Arbeit sind, näher beschrieben.

### 1.1.2 Die Entwicklung der normalen Plasmazelle

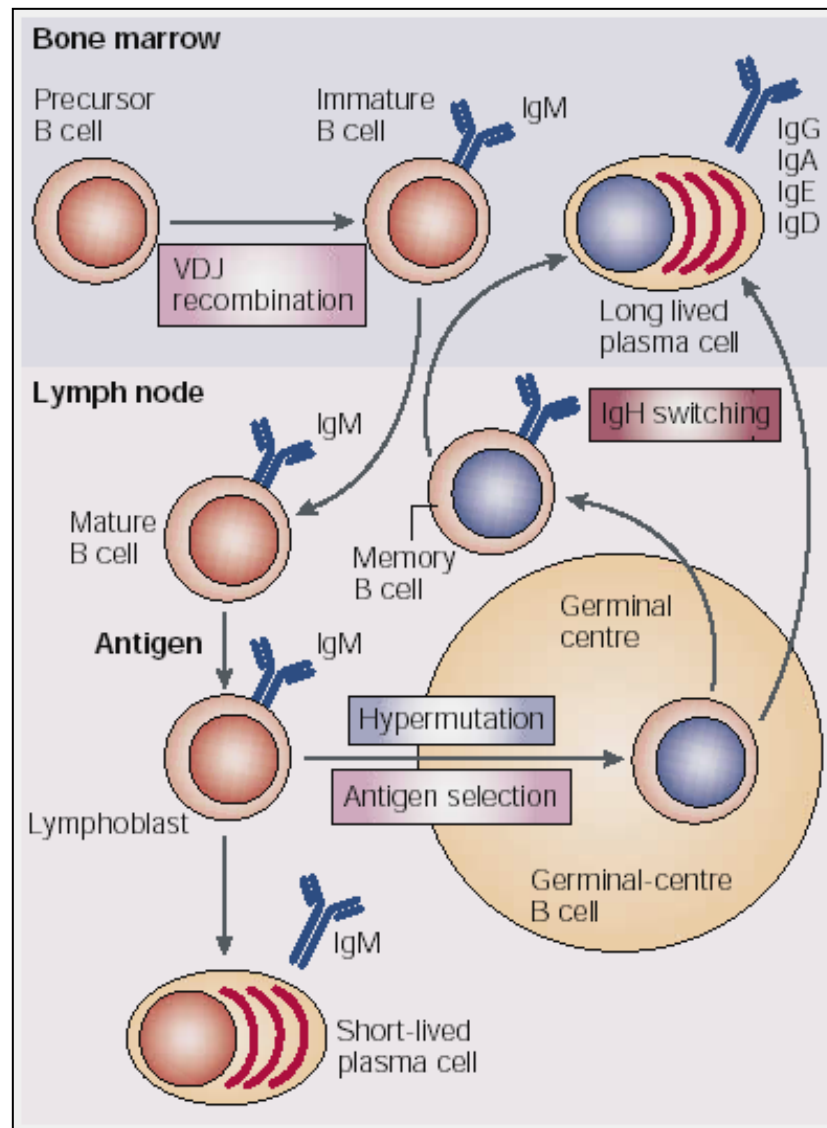
Das MM und die MGUS sind durch eine Störung der normalen Plasmazelldifferenzierung gekennzeichnet.

Die Entwicklung von B-Zellen lässt sich in vier Abschnitte (I.-IV.) unterteilen, die drei Mechanismen von zentraler Bedeutung für die Plasmazelldifferenzierung beinhalten: VDJ-Rekombination, somatische Hypermutationen und Umschaltung der Ig-Synthese (*switch*-Rekombination).

- I. Entstehung von B-Zell-Rezeptoren im Knochenmark durch VDJ-Rekombination
  - II. Induktion der Toleranz durch Autoantigene im Knochenmark
  - III. B-Zell-Aktivierung durch Fremdanitigen in der Milz oder den Lymphknoten
  - IV. Antikörpersekretion in der Milz, den Lymphknoten oder dem Knochenmark durch somatische Hypermutationen und Umschaltung der Ig-Synthese (*switch*-Rekombination).
- 
- I. Die Stadien der frühen B-Zell-Entwicklung sind durch eine Umordnung und Expression der Immunglobulingene der schweren (H-) und der leichten (L-) Ketten, der **VDJ-Rekombination**, gekennzeichnet (Tonegawa, 1983). In der frühesten Vorläuferzelle, der Pro-B-Zelle, findet die Umordnung der Gensegmente für die H-Kette statt. Auf die  $D_H-J_H$ -Verknüpfung in den frühen Pro-B-Zellen folgt die  $V_HDJ_H$ -Verknüpfung in den späten Pro-B-Zellen. Nach der  $VDJ_H$ -Verknüpfung schließt sich durch die vorübergehende Expression der  $\mu$ -Kette in Kombination mit der Expression einer Ersatz-L-Kette die Entwicklung zur Prä-B-Zelle an. Es kommt zu einer starken Proliferation der Prä-B-Zellen mit intakter  $V_HDJ_H$ -Verknüpfung, und die Umordnung der H-Ketten-Loci wird eingestellt. Aus den Prä-B-Zellen entstehen kleine Prä-B-Zellen, die sich nicht weiter teilen und keinen Prä-B-Zell-Rezeptor mehr präsentieren. Anschließend kommt es zur Umordnung der L-Ketten-Gene (Ehrlich und Küppers, 1995; Kuehl & Bergsagel, 2002).
  - II. Mit dem Abschluss der Genumlagerung der schweren Ketten differenzieren die Prä-B-Zellen zu den unreifen B-Zellen aus die in der Lage sind funktionelles IgM auf der Zelloberfläche zu exprimieren. In diesem Stadium werden die B-Zellen auf Selbsttoleranz selektiert. Die Zellen, die durch Antigene stimuliert werden, werden entweder inaktiviert oder deletiert.

- III. Die selektierten B-Zellen, die nicht mit Autoantigenen reagieren, verlassen das Knochenmark in die Peripherie und differenzieren weiter zu reifen B-Zellen, die außer IgM auch IgD exprimieren. Nach dem Verlassen des Knochenmarks und der Besiedlung sekundärer lymphatischer Gewebe, kommt es durch Antigen-Stimulation zur Proliferation der B-Zellen.
- IV. Nach erfolgter Zellteilung differenziert sich ein Großteil der B-Zellen zu Plasmoblasten und ein kleinerer Teil entwickelt sich zu Gedächtnis-B-Zellen. Diese kurzlebigen Plasmoblasten stellen antikörpersezernierende Plasmazellen dar, die nach einer Lebensdauer von 2-3 Tagen in Apoptose übergehen. Die Ig-Produktion beschränkt sich in dieser Phase zum Großteil auf IgM. Zu einem geringeren Anteil treten einige antigenstimulierte B-Zellen in das Lymphknoten-Keimzentrum ein, in dem multiple **somatische Hypermutationen** der rearrangierten Ig-Gen-Sequenzen stattfinden. Diese Hypermutationen beinhalten Punktmutationen, Deletionen und Duplikationen insbesondere in der V-Region. Durch diesen Vorgang werden unterschiedliche Antigenrezeptoren produziert. Die Zellen, die einen Antigenrezeptor mit hoher Affinität exprimieren, überleben den Selektionsdruck und differenzieren zu Gedächtnis-B-Zellen oder Keimzentrumsplasmoblasten (Küppers & Dalla-Favera, 2001). In diesen Keimzentrumsplasmoblasten kommt es zur **Umschaltung der Ig-Synthese** („*switch*-Rekombination“) von IgM zu anderen Isoformen, wie IgG, IgA, IgD und IgE. Die Rekombinationsprozesse finden in der konstanten Region des IgH-Locus ( $C_H$ -Region) statt. Die konstanten Gene  $C\mu$  und  $C\delta$ , die ursprünglich von den naiven B-Zellen exprimiert werden, werden durch die stromabwärts liegenden  $C_H$ -Gene  $C\gamma$ ,  $C\alpha$  und  $C\epsilon$  ersetzt. Stromaufwärts der  $C_H$ -Gene liegen repetitive DNA-Sequenzen, die als „*Switch*-Region“ ( $\mu$ ) bezeichnet werden. Der Rekombinationsvorgang beinhaltet Deletionen zwischen der  $\mu$ -Region und stromaufwärts der rekombinierten  $C_H$ -Gene. Anschließend wandern diese Zellen ins Knochenmark und differenzieren zu langlebigen, nicht-proliferierenden Plasmazellen mit einer durchschnittlichen Lebensdauer von 30 Tagen aus (Ho et al., 1986; Tew et al., 1992; Küppers et al., 1999; Calame, 2001; Küppers & Dalla-Favera, 2001).

Die Abbildung 1.1 zeigt schematisch die Entwicklung der normalen Plasmazelle mit den drei Mechanismen der Plasmazelldifferenzierung.



**Abbildung 1.1:** Die Entwicklung der normalen Plasmazelle mit den drei B-Zell-spezifischen DNA-Modifikationsmechanismen: VDJ-Rekombination, somatische Hypermuation und Umschaltung der Ig-Synthese (*switch recombination*) (aus Kuehl & Bergsagel, 2002).

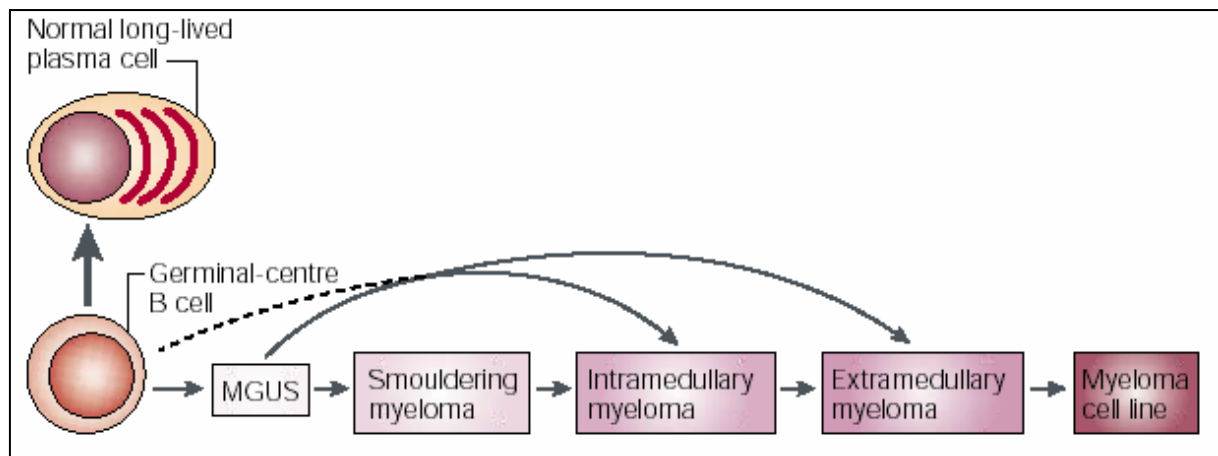
### 1.1.3 Maligne Transformation

Die malignen Plasmazellen entsprechen langlebigen malignen Zellen mit einer niedrigen Teilungsaktivität bzw. Plasmazell-Labeling-Index (PCLI = 1-2 %) (Hallek, et al., 1998). Mittels des PCLI wird die Proliferationsrate monoklonaler Plasmazellen durch Fluoreszenz-konjugierte Antikörper mikroskopisch bestimmt (Greipp et al., 1985). Die maligne Plasmazelle des MM befindet sich im Knochenmark in enger Assoziation mit den Stromazellen.

Für die maligne Plasmazelle postulierten Hallek et al. einen mehrstufigen Transformationsprozess (Hallek et al., 1998).

- I. Die Progression der normalen Plasmazelle zu einer prämaligen Monoklonalen Gammopathie der MGUS, bei der die Zellen zwar nicht in Apoptose übergehen aber auch nicht zu malignen Zelle transformieren.
- II. Die Progression zum intramedullären Myelom, bei dem die Zellen im Knochenmarkskompartiment lokalisiert sind und die maligne Transformation durchlaufen, akkumulieren und Knochendestruktionen verursachen.
- III. Die Progression zum extramedullären Myelom, bei dem die malignen Plasmazellen stark proliferieren und in extramedulläre Regionen (z.B. Blut) ausschwemmen.

Eine schematische Darstellung der Pathogenese des multiplen Myeloms in einem mehrstufigen Prozess mit verschiedenen Stadien ausgehend von der Keimzentrum-B-Zelle zeigt Abbildung 1.2.



**Abbildung 1.2: Mehrschritt-Pathogenese des multiplen Myeloms mit den verschiedenen Stadien ausgehend von der Keimzentrums-B-Zelle (*germinal centre B cell*) (aus Kuehl & Bergsagel, 2002).**

Die maligne Plasmazelle des MM entspricht in vielen Merkmalen der langlebigen normalen Plasmazelle nach Antigen-Stimulation (Vescio et al., 1995; Drach, 1999). Die Myelomzellen weisen multiple Hypermutationen der rearrangierten Ig-Gene auf, wobei dieser Prozess mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht dauerhaft anhält (Vescio et al., 1995; Hallek, et al., 1998). Myelomzellen zeigen gegenüber den normalen Plasmazellen eine signifikant niedrigere Ig-Sekretion (Hallek, et al., 1998). Gestützt von zahlreichen Studien (Kubagawa et al., 1979; Caligaris-Cappio et al., 1985; Epstein et al., 1990) wurde postuliert, dass Myelomzellen letztlich von niedrig differenzierten B-Zellen oder pluripotenten Vorläufer Stammzellen, die im peripheren Blut zirkulieren, ausgehen. Da die somatischen Hypermutationen der  $V_H$ -Gene in einer späten Phase der B-Zellen Entwicklung stattfinden, stellt das Vorhandensein dieser



Mutationen einen guten Indikator dafür dar, wo sich der Ursprung der malignen Stammzelle in B-Zell-Neoplasien befindet. Da die  $V_H$ -Gene keine klonalen Unterschiede zeigen (Bakkus et al., 1992), und die  $V_H$ -Sequenzen während des Krankheitsverlaufs stabil bleiben, stammt der maligne Klon des MM mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer Zelle der terminalen B-Zell-Entwicklung ab (Vescio et al., 1995, Ludwig et al., 1999). Das initiale neoplastische Ereignis findet demnach anscheinend vor der Umschaltung der Ig-Synthese von IgM zu anderen Isoformen in einem einzelnen IgM-positiven Keimzentrumsplasmoblasten statt. Wie bei anderen Tumorarten wird auch hier von einem Mehrstufenprozess ausgegangen. So ist mindestens ein weiteres genetisches Ereignis zum Erlangen des malignen Status in einer einzelnen Zelle notwendig (Ludwig et al., 1999).

Die transformierte Zelle exprimiert unterschiedliche Adhäsionsmoleküle, die ihr die Fähigkeit verleihen, sich im Knochenmark anzusiedeln. Dort wird sie in enger Interaktion mit Knochenmarkstromazellen und durch Einwirkung lokal produzierter Zytokine zur Ausdifferenzierung in nicht oder nur noch gering proliferierende Plasmazellen stimuliert. Die Osteoklastenstimulation wird durch Zytokine, die sowohl von den Myelomzellen, als auch von den Stromazellen freigesetzt werden, ausgelöst (Hallek et al., 1998).

#### 1.1.4 Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome

Die malignen Lymphome stellen eine sehr heterogene Tumorentität dar, die 1994 erstmals in ein weltweit akzeptiertes einheitliches System eingeordnet werden konnte, die *Revised European American Lymphoma*-(R.E.A.L.-) Klassifikation (Harris et al., 1994). 1997 wurde eine aktuelle Fassung dieser Klassifikation vorgestellt, die heute weitgehende Akzeptanz findet: die WHO-Klassifikation (Harris et al., 1999). Die 2001 erschienene aktuellste Fassung der WHO-Klassifikation unterscheidet zwischen Lymphomen der B- und der T-Zell-Reihe sowie zwischen Lymphomen, die von Vorläuferzellen unterschiedlichen Reifungsgrades der Lymphopoese ausgehen (Vorläufer Neoplasie, Reifzellige Neoplasie) (Jaffe et al., 2001). Der Formenkreis der Plasmazellneoplasien wurde lange als gesonderte Krankheitsentität geführt und erst durch die R.E.A.L.-Klassifikation als eigene Entität innerhalb der Lymphome aufgenommen. Neben der größten Gruppe, dem multiplen Myelom/Plasmazellmyelom, werden innerhalb der WHO-Klassifikation auch Subtypen und Varianten der Plasmazellerkrankungen detailliert aufgeführt. In der Tabelle 1.1 werden beide Klassifikationssysteme gegenübergestellt.

## Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome

Tabelle 1.1: Gegenüberstellung der Klassifikationen der B-Zell-Lymphome: die R.E.A.L. - (Harris et al., 1994) und die WHO-Klassifikation (Jaffe et al., 2001).

R.E.A.L.-Klassifikation	WHO-Klassifikation
B-Zell-Neoplasien	B-Zell-Neoplasien
I. Vorläufer-B-Zell-Neoplasien Vorläufer B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom	I. Vorläufer-B-Zell-Neoplasien Vorläufer B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom
II. Periphere B-Zell-Neoplasie B-zell-chronische lymphatische Leukämie (B-CLL)/prolymphozytische Leukämie (B-PLL)/kleinzelliges lymphatisches Lymphom (B-SLL)	II. Reifzellige (Periphere) B-Zell-Neoplasie B-zell-chronische lymphatische Leukämie(B-CLL)/kleinzellige lymphatische Leukämie Variante: mit monoklonaler Gammopathie/plasmazytoider Differenzierung  B-Zell-prolymphozytische Leukämie (B-PLL)
Lymphoplasmozytoides Lymphom/Immunozytom	Lymphoplastisches Lymphom
Marginalzonen-B-Zell-Lymphom der Milz	Marginalzonen-B-Zell-Lymphom der Milz
Haarzell-Leukämie (HCL)	Haarzell-Leukämie, Variante: Haarzell-Leukämie-Variante
<b>Plasmozytom/Plasmazellmyelom/Multiples Myelom</b>	<b>Plasmazellerkrankungen</b> <b>Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz (MGUS)</b> <b>Plasmazellmyelom/Multiples Myelom/Plasmozytom</b> <b>Multiples Myelom</b> <b>Varianten</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Indolentes Myelom</li> <li>• Smouldering Myelom (SMM)</li> <li>• Osteosklerotisches Myelom (POEMS Syndrom)</li> <li>• Plasmazelleukämie (PZL)</li> <li>• Nichtsklerotisches Myelom</li> </ul> <b>Plasmozytom</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Solitäres Plasmozytom des Kochens</li> <li>• Extramedulläres Plasmozytom</li> </ul>

## Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome

---

### Marginalzonen-B-Zell-Lymphom

- Extranodal (MALT-Typ +/- monozytoide B-Zellen)
- Vorläufiger Subtyp: Nodal (+/- monozytoide B-Zellen)

### Folikuläres Keimzentrums-Lymphom

- Grad I (kleinzellig)
  - Grad II (gemischt klein- und großzellig)
  - Grad III (großzellig)
- Vorläufiger Subtyp: diffus, vorwiegend kleinzelliger Typ

### Mantelzell-Lymphom

#### Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom

- Subtyp:  
Primär mediastinales (thymisches) B-Zell-Lymphom

### Burkitt-Lymphom

hochmalignes B-Zell-Lymphom vom Burkitt-Typ

Extranodales Marginalzonen-B-Zell-Lymphom des mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes (MALT-Lymphom)

### Nodales Marginalzonen-B-Zell-Lymphom

#### Folikuläres Lymphom, Grad 1, Grad 2, Grad 3a, Grad 3b

##### Varianten

- Kutanes follikuläres-Keimzentrums-Lymphom
- Diffuses follikuläres-Keimzentrums-Lymphom (Grad 1, Grad 2)

### Mantelzell-Lymphom, Variante: blastisch

#### Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom

##### Morphologische Varianten

- zentroblastisch
- immunoblastisch
- T-Zell/Histiozyten-reich
- lymphomatoider granulomatöser Typ
- anaplastische großzellige B-Zellen
- plasmoblastisch

##### Subtypen

- Mediastinales großzelliges B-Zell-Lymphom (des Thymus)
- Primäres Lymphom der primären Körperhöhlen
- Intravaskuläres großzelliges B-Zell-Lymphom

### Burkitt-Lymphom

##### Morphologische Varianten:

- hochmalignes B-Zell-Lymphom vom Burkitt-Typ
- Burkitt-Lymphom mit plasmozytoider Differenzierung

##### Subtypen

- endemisch
  - sporadisch
- mit Immundefekten assoziiert

**1.1.5 Monoklonale Gammopathien unbestimmter Signifikanz (MGUS)**

**1.1.5.1 Definition, Inzidenz und Epidemiologie**

Die Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz (MGUS) ist durch einen erhöhten Anteil von monoklonalen Proteinen in Serum gekennzeichnet, ohne dass sonstige Symptome auftreten, die auf eine andere ursächliche Erkrankung wie dem multiplen Myelom, Morbus Waldenström, primärer Amyloidose oder verwandter Erkrankungen schließen lassen (Kyle, 1997). Die MGUS ist demnach durch eine klonale Expansion von Plasmazellen ohne Zeichen der Malignität gekennzeichnet. Es kommt jedoch in 10-30 % der Fälle zu einer Transformation in eine lymphatische Neoplasie (Blade et al., 1992; Lloveras et al., 2002).

Zur Einstufung der MGUS können folgende Kriterien zu Grunde gelegt werden (Durie, 1986):

**Tabelle 1.2: Definition der MGUS (verändert nach Durie, 1986)**

I.	Monoklonale Gammopathie	
II.	Plasmazellanteil im Knochenmark	< 10 % (PCLI meist <1 %)
III.	Monoklonales Immunglobulin für Leichtkettenausscheidung	IgG ≤ 35g/l ≤ 1,0 g/24 Std bei fehlender Amyloidose in der Urinelektrophorese
IV.	Keine Osteolysen	
V.	Keine Symptome	

Die Inzidenz der MGUS steigt mit zunehmendem Alter an und liegt in Europa und den USA bei 3 % in der Altersgruppe der über 70jährigen. In der Altersgruppe der 75-84jährigen steigt die Inzidenz auf bis zu 23 % (Kyle, 1997).

**1.1.5.2 Klinik**

Obwohl die MGUS bei einem Großteil der Patienten zeitlebens asymptomatisch verläuft, handelt es sich dennoch um eine echte Präkanzerose (Draube et al., 1999). Unter der Berücksichtigung, dass sich die Plasmazellen der MGUS in einem frühen Stadium der Autonomie befinden (Sahota et al., 1996), jedoch bereits ähnliche zellbiologische, genetische und immunologische Charakteristika der Plasmazellen des multiplen Myeloms zeigen, ist ein Übergang der MGUS in eine echte Neoplasie bei ausreichend langer Lebenserwartung sehr wahrscheinlich.

Solange keine Zeichen für einen Übergang in eine Neoplasie erkennbar sind, ist keine Therapie des MGUS indiziert (Draube et al., 1999).

## **1.1.6 Multiples Myelom (MM)**

### **1.1.6.1 Definition, Inzidenz und Epidemiologie**

Beim multiplen Myelom (MM) handelt es sich um eine monoklonale Erkrankung der B-Lymphozyten mit neoplastischer Vermehrung von terminal differenzierten Plasmazellen. Das MM ist an vielen Stellen im Knochenmarkskompartiment lokalisiert (Kuehl und Bergsagel, 2002) und ist durch eine starke Vermehrung von identischen Immunglobulinen und/oder Immunglobulinfragmenten der Klassen G, A, D, M oder E gekennzeichnet (Meran et al., 1999; Bartl & Wilmanns, 2000). Die Produktion dieser monoklonalen Immunglobuline verteilt sich unterschiedlich stark auf die einzelnen Klassen: IgG 54 %, IgA 21 %, IgD 2 %, IgM/IgE sehr selten, Leichtketten 18 % (Malpas, 1995).

Die Begriffe multiples Myelom und Plasmozytom werden häufig synonym verwendet. Im engeren Sinne wird als Plasmozytom eine solitäre meist auch primär extramedulläre Manifestation der Erkrankung ohne erkennbare Knochenmarkinfiltration bezeichnet. Die Bezeichnung multiples Myelom charakterisiert dagegen den wesentlich häufigeren primär generalisierten Befall des Knochenmarks. Als weiteres Synonym bezeichnet der Begriff Plasmazellmyelom die gleiche Erkrankung. Der veraltete Terminus „Morbus Kahler“ findet heute keine Verwendung mehr. Auf Grund des mehrjährigen Krankheitsverlaufs macht das MM etwa 1 % aller malignen Erkrankungen und 10 % der hämatologischen Neoplasien aus. Unter den lymphoproliferativen Erkrankungen des Knochenmarks ist das MM mit 42 % der häufigste B-Zell-Tumor (Bartl & Wilmanns, 2000). Die Erkrankung kommt vorwiegend bei älteren Menschen vor und hat ihren Altersgipfel zwischen dem 6. und 7. Lebensjahrzehnt. Nur 2 % der Patienten sind jünger als 40 Jahre, wogegen etwa 75 % der Patienten über 60 Jahre alt sind. Die Inzidenz liegt bei 3-4 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen (1,1-1,5:1) (Herrinton et al., 1995). In der schwarzen Bevölkerung wird jedoch etwa doppelt so häufig die Diagnose eines MM gestellt als in den weißen Bevölkerungsschichten (Malpas et.al. 1998).

### 1.1.6.2 Klinik

Die klinischen Symptome des multiplen Myeloms lassen sich durch die Biologie der malignen Plasmazellproliferation erklären. Als Hauptmerkmal gelten neben der Knochenmarkinfiltration mit Myelomzellen die monoklonale Gammopathie und die osteolytischen Läsionen. Als Leitsymptome des MM werden unspezifische Rückenschmerzen und starke Knochenschmerzen angesehen. Ursächlich für die Knochenschmerzen sind die Hemmung der Knochenneubildung und die knochendestruktiven Vorgänge (Osteoklasten-Stimulation), die durch die Infiltration des Knochenmarks mit malignen Plasmazellen hervorgerufen werden (Meran et al., 1999). Häufig führen die Skelettdestruktionen zu pathologischen Frakturen (Radaszkiewics & Vesely, 1997).

Als weitere häufige klinische Symptome des MM gelten Müdigkeit in Folge der normochromen, normozytären Anämie im Rahmen der Hämatopoesehemmung, die durch die Knochenmarkinfiltration mit Myelomzellen verursacht wird; Infekte durch die Suppression der normalen Immunglobuline, da der maligne Klon nur monoklonale, nicht funktionsfähige Immunglobuline produziert; Neurologische Symptome; Blutungsneigung als Zeichen der Thrombopenie; Niereninsuffizienz („Myelomniere“) und Amyloidablagerungen (Meran et al., 1999). Unter Amyloidose versteht man extrazelluläre Ablagerungen von pathologischen, unlöslichen, fibrillären Proteinen. Im Falle des MM kommt es zur Ablagerung von Immunglobulin-Leichtketten (Falk et al., 1997). Zudem kommt es bei etwa 2 % der Patienten durch die massive monoklonale Immunglobulinvermehrung zur Veränderung der Viskosität des Blutes, dem so genannten Hyperviskositätssyndrom, das sich in Kopfschmerzen, Schwindel, Ataxie, Krampfanfällen, Schleimhaut-/Netzhautblutungen bis hin zu komatösen Zuständen und/oder Herzinsuffizienz äußern kann. Durch die Hyperkalzämie, die durch die vermehrte Knochenresorption verursacht wird, können zentralnervöse Symptome bis hin zu psychotischen Reaktionen entstehen (Meran et al., 1999).

### 1.1.6.3 Zellmorphologie

Eine Zytologie an Knochenmarkaspirat, peripherem Blut und einer Stanzbiopsie wird als klassische Vorgehensweise zur Diagnosestellung beim MM eingesetzt (Wutke et al., 1981).

Die Beurteilung des Knochenmarkausstrichs wird durch den fokal unterschiedlichen Infiltrationsgrad des Marks mit Myelomzellen erschwert. Der Plasmazellanteil zeigt erhebliche Schwankungen (10-90 %) (Meran et al., 1999). Beim MM wird im Aspirat die absolute Plasmazellmenge häufig unterschätzt, da die Myelomzellen in ihrem Fasernetz nur schwer aspirierbar sind (Terpstra et al., 1992). Dies muß bei der Beurteilung berücksichtigt werden.

Neben dem Plasmazellanteil wird anhand der Morphologie der Anteil atypischer/unreifer Plasmazellen bestimmt. Die morphologische Klassifizierung grenzt sechs Zelltypen gegeneinander ab, die mit unterschiedlicher Häufigkeit auftreten (Bartl et al., 1987; Draube et al., 1999).

Im peripheren Blutausschlag ist neben einer häufig vorkommenden Anämie eine geldrollenartige Erythrozytenbildung zu beobachten, deren Ausmaß mit dem Typ des monoklonalen Paraproteins korreliert. Es finden sich jedoch bei nur 15 % der Patienten zirkulierende Plasmazellen, wogegen bei einer stärkeren Ausschwemmung eine Plasmazell-Leukämie vorliegt (Meran et al., 1999). Durch die histologische Beurteilung der Stanzbiopsie wird zusätzlich die Histotopographie, die Veränderung der Hämatopoese und des Knochenmarkstromas sowie die umgebende Knochenmorphologie beurteilt (Bartl et al., 1995). Anhand der Knochenmarkhistologie wird der Infiltrationsgrad und das Infiltrationsmuster, das sich diffus, fokal oder interstitiell darstellt, bestimmt. Im Bereich der Zytochemie können keine charakteristischen Färbungen zur Diagnosesicherung eingesetzt werden (Draube et al., 1999).

#### **1.1.6.4 Immunphänotyp**

Die malignen Plasmazellen ähneln in Bezug auf ihren Immunphänotyp in vielerlei Hinsicht den normalen Plasmazellen. Normale Plasmazellen exprimieren neben dem Plasmazellmarker CD<sub>138</sub> sehr stark CD<sub>38</sub> und sind in der Lage, einen sehr heterogenen Phänotyp zu exprimieren, z.B. die verschiedenen B-Zell Marker CD<sub>19</sub>, CD<sub>20</sub>, CD<sub>10</sub>, myeloische Antigene CD<sub>13</sub>, CD<sub>33</sub>, HLA-DR, CD<sub>45</sub> und die Adhäsionsmoleküle CD<sub>11b</sub>, CD<sub>11c</sub> (Terstappen et al., 1990; Wijdenes et al., 1996). Diese Antigene können auch von Myelomzellen exprimiert werden (Epstein et al., 1990). Im Wesentlichen unterscheiden sich die Myelomzellen von normalen Plasmazellen durch die Expression des Adhäsionsmoleküls CD<sub>56</sub>, das nur von den malignen Plasmazellen sezerniert wird. Das Adhäsionsmolekül CD<sub>56</sub> ist in besonderem Maße an der Interaktion zwischen den Myelomzellen und den Knochenmarkstromazellen beteiligt (Van Camp et al., 1990; Drach et al., 1991; Drach, 1999).

#### **1.1.6.5 Diagnose, Stadieneinteilung und Prognosekriterien**

Für das multiple Myelom wurden von Durie und Salmon klare Diagnosekriterien aufgestellt (Durie & Salmon, 1975), die von Durie (Durie, 1986) weiterentwickelt wurden (Tabelle 1.3):

**Tabelle 1.3: Diagnosekriterien des multiplen Myeloms (verändert nach Durie & Salmon, 1975)**

<b>Hauptkriterien</b>	
I.	Histologisch gesichertes Myelom
II.	Plasmazellvermehrung im Knochenmark >30 %
III.	M-Gradient in der Serumelektrophorese IgG > 3,5 g/dl oder IgA > 2,0 g/dl oder Bence-Jones Protein* > 1g/24h
<b>Nebenkriterien</b>	
a.	Knochenmarkinfiltration 10-30 %
b.	M-Gradient in der Serumelektrophorese, jedoch unter den oben geforderten Werten (Ig > 3,5 g/dl oder IgA > 2,0 g/dl)
c.	Osteolysen
d.	Sekundärer Antikörpermangel IgM < 0,05 g/dl; IgA < 0,1 g/dl; IgG < 0,6 g/dl

\* kappa oder lamda Leichtketten in der Urinelektrophorese

Zur Diagnosestellung müssen zumindest ein Hauptkriterium und ein Nebenkriterium oder drei Nebenkriterien, wobei die ersten beiden Nebenkriterien enthalten sein müssen, erfüllt sein.

Die Stadieneinteilung des multiplen Myeloms geht ebenfalls auf Durie und Salmon (Durie & Salmon, 1975) zurück und beruht auf der Schätzung der Tumormasse nach röntgenologischen und laborchemischen Parametern und ist in Tabelle 1.4 aufgeführt.

**Tabelle 1.4: Stadieneinteilung des multiplen Myeloms (verändert nach Durie & Salmon, 1975)**

<b>Stadium I</b>	Hb > 10 g/dl; IgG < 5 g/dl; IgA < 3 g/dl; normaler Kalziumwert Ausscheidung des monoklonalen Proteins < 4 g/24h Keine ausgeprägten Osteolysen oder Osteoporose
<b>Stadium II</b>	weder I noch III
<b>Stadium III</b>	Eines der folgenden Merkmale: Hb < 8,5 g/dl; IgG > 7g/dl; IgA > 5g/dl; Kalziumwert über 12 mg/dl; Ausscheidung des monoklonalen Proteins > 12 g/24h; ausgeprägte (>3) Osteolysen
<b>A</b>	normale oder gering eingeschränkte Nierenfunktion
<b>B</b>	eingeschränkte Nierenfunktion



Die Einschätzung der Prognose des multiplen Myeloms erfolgt heute nicht in erster Linie anhand der Stadieneinteilung, sondern unter zur Hilfenahme verschiedener prognostischer Parameter, wie der Plasmazellmorphologie, des Plasmazell-Labeling-Indexes (PCLI), der Plasmazellmenge, des Wachstumsmusters, der Serumwerte für das  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2$ -M), der Werte für das Kreatinin, der LDH, des IL6 und des C-reaktives Proteins (CRP) (Boccardo & Pileri, 1997; Peest et al., 1993). Der PCLI bestimmt den prozentualen Anteil der Myelomzellen, die sich in der S-Phase befinden. Die Bestimmung erfolgt mittels Inkorporation von  $^3\text{H}$ -Thymidin oder Fluoreszenz-konjugierter Antikörper (Greipp et al., 1985), wobei ein Wert von über 1 % als prognostisch ungünstig gilt (Greipp et al., 1993; Zulian, 1997). Der PCLI ist bisher nicht weit verbreitet, da die Bestimmung wegen des Laboraufwandes in der Routinediagnostik nur schwer durchführbar ist (Schambeck et al., 1996).

Parameter, die mit einer ungünstigen Prognose assoziiert werden, stellen folgende Faktoren dar (ergänzt nach Schmitt et al., 1999; Dietzfelbinger et al., 2002):

- Erhöhte  $\beta_2$ M-, LDH-, CRP-, Kreatinin- und/oder Kalziumwerte
- Hoher Plasmazell-Labelingindex (PCLI)
- Plasmazellmorphologie; blastärer Charakter der Plasmazellen
- Angiogenese
- Hypalbuminurie
- Hohes Lebensalter
- Monosomie 13/Deletion 13q; komplexe Chromosomenaberrationen
- Anämie
- Thrombozytopenie
- Resistenz auf die initiale Chemotherapie

## **1.1.7 Formvarianten des multiplen Myeloms/Plasmozytoms**

### **1.1.7.1 Smouldering Myelom (SMM)**

Das smouldering Myelom erfüllt die Diagnosekriterien des MM, bleibt jedoch über viele Jahre konstant, ohne Zeichen einer Progression oder Bedarf einer Chemotherapie (Kyle & Greipp, 1980; Kyle, 1997). Der Anteil der Patienten mit SMM liegt bei 2 % der multiplen Myelome (Draube, 1999). Im Knochenmark finden sich meist interstitiell infiltrierende, reife Plasmazellen (Bartl et al., 1995). Der PCLI und das  $\beta_2$ -Mikroglobulin sind niedrig (Draube, 1999). Die Diagnosekriterien des SMM sind eine relativ niedrige Konzentrationen des M-Proteins (IgG über 35g/l IgA über 20g/l), das Bence-Jones-Protein im Urin liegt über 1 g/24 h, die Plasmazellin-

filtration im Knochenmark liegt zwischen 10 und 20 % und ungünstige Prognosekriterien wie Anämie, Hyperkalzämie, Knochenläsionen und Niereninsuffizienz fehlen (Kyle & Greipp, 1980).

### **1.1.7.2 Indolentes Myelom**

Das indolente Myelom unterscheidet sich nur wenig von dem SMM. Es zeigt sich eine leichte Anämie und kleinere Osteolysen. Die meisten indolenten Myelome zeigen jedoch innerhalb von drei Jahren einen Übergang in ein manifestes MM. Die Diagnosekriterien des indolenten Myeloms sind eine Konzentration des M-Proteins zwischen 50 g/l (IgA) und 70 g/l (IgG), das Bence-Jones-Protein im Urin liegt unter 1 g/24 h, die Plasmazellinfiltration im Knochenmark liegt zwischen 20 und 30 % und es liegt keine Hyperkalzämie oder Niereninsuffizienz vor (Zulian, 1997).

### **1.1.7.3 Osteosklerotisches Myelom**

Diese Variante des multiplen Myeloms ist durch osteosklerotische Läsionen in Kombination mit einer Polyneuropathie gekennzeichnet und repräsentiert weniger als 1 % der Myelome (Kelly et al., 1983). Die Prognose der osteosklerotischen Variante ist relativ gut (Bartl & Wilmanns, 2000).

### **1.1.7.4 Nichtsklerotisches Myelom**

Die malignen Plasmazellen des Nichtsklerotischen Myeloms sind zwar in der Lage Immunglobuline zu produzieren, sie werden jedoch nicht sezerniert. Auf Grund des fehlenden M-Proteins wird diese Formvariante des MM in der Regel erst spät diagnostiziert und repräsentiert nur 1 % der multiplen Myelome (Bartl & Wilmanns, 2000).

### **1.1.7.5 Plasmazell-Leukämie (PZL)**

#### **1.1.7.5.1 Definition, Inzidenz und Epidemiologie**

Die Plasmazell-Leukämie (PZL) ist eine seltene Erkrankung und macht nur etwa 0,3 % aller Leukämien aus (Jehn, 2002). Der Altersmedian der Patienten mit PZL liegt bei 67 Jahren.

Sie stellt eine seltene Form des MM dar und repräsentiert ca. 2-4 % der Erstdiagnosen innerhalb der Myelome (Kyle et al., 1974; Dimopoulos et al., 1994). Als diagnostisches Kriterium der PZL gilt eine Plasmazellzahl von mehr als 2000/ $\mu$ l und ein Plasmazellanteil von mehr als 20 % im

peripheren Blutaussstrich (Noel & Kyle, 1987). Es werden eine primäre und eine sekundäre Form unterschieden. Bei der primären PZL liegt das leukämische Bild schon bei der initialen Diagnose vor (Dimopoulos et al., 1994). Bei der sekundären Form wird die PZL als Progress im Sinne eines terminalen „Blastenschubs“ bei bestehendem MM verstanden (Draube, 1999). Bei 60 % der Patienten mit einer PZL liegt die primäre Form vor (Jehn, 2002).

#### **1.1.7.5.2 Klinik**

Die PZL zeigt ein ungünstigeres klinisches Bild als das MM mit hoher Frequenz einer extramedullären Manifestation. Es treten häufiger Anämien, Thrombozytopenien, Hyperkalzämien und Nierenversagen als beim MM auf (Blade & Kyle, 1999). Bei jüngeren Patienten wird in der Regel eher die primäre Form diagnostiziert. Diese weisen im Gegensatz zu Patienten mit sekundärer PZL häufiger eine Hepatosplenomegalie und Lymphknotenvergrößerungen, höhere Thrombozyten-werte, seltener lytische Knochenläsionen und einen geringeren M-Proteingradienten auf.

#### **1.1.7.5.3 Zellmorphologie**

Die massive Ausschwemmung maligner Plasmazellen in die Peripherie ist das Hauptmerkmal der PZL. Im Blutaussstrich überwiegen kleine bis gekerbte Plasmazellen, die auch in der Histologie als sehr zellreiche Infiltrate auffallen. Es können aber auch lymphozytoide oder lymphoblastische Zellen vorherrschen (Bartl et al., 1995).

#### **1.1.7.5.4 Immunphänotyp**

Die immunphänotypische Expression von MM und PZL ist im Hinblick auf CD<sub>38</sub>, CD<sub>138</sub>, CD<sub>2</sub>, CD<sub>3</sub>, CD<sub>16</sub>, CD<sub>10</sub>, CD<sub>13</sub> und CD<sub>15</sub> ähnlich. Beide Erkrankungen unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der CD<sub>56</sub>, CD<sub>9</sub>, HLA-DR, CD<sub>177</sub> und CD<sub>20</sub>- Expression. Im Gegensatz zum MM exprimieren die malignen Zellen der PZL kein CD<sub>56</sub> (Pellat-Deceunynck et al., 1998).

### **1.1.7.5.5 Prognose**

Die primäre Form der PZL hat eine bessere Prognose als die sekundäre Form. Die mediane Überlebenszeit beträgt bei der primären Form etwa 6,8 Monate und bei der sekundären Form nur etwa 1,3 Monate (Noel & Kyle, 1987). Die Inzidenz ungünstiger Prognosekriterien ist signifikant höher (García-Sanz et al., 1999), insbesondere der  $\beta$ 2-Mikroglobulinspiegel und der PCLI (Jehn, 2002). Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit der PZL liegt bei 13 %. Die Prognose ist demnach sehr schlecht (Taniwaki et al., 1996).

### **1.1.7.6 Plasmozytom**

Als Plasmozytom wird eine solitäre, meist auch primär extramedulläre Manifestation der malignen Plasmazellerkrankung ohne erkennbare Knochenmarkinfiltration bezeichnet.

In der Gruppe der Plasmozytome werden zwei Formen unterschieden.

#### **1.1.7.6.1 Solitäres Plasmozytom des Knochens**

Das solitäre Plasmozytom des Knochens stellt ein echtes Plasmozytom dar, da es sich um eine solitäre, extramedulläre Manifestation, die sich auf den Knochen beschränkt, handelt. Durch eine entsprechend intensive Lokalthherapie gilt das solitäre ossäre Plasmozytom als heilbar (Bolek et al., 1996; Draube, 1999). Der Anteil innerhalb der plasmazellulären Neoplasien liegt bei ca. 3 % (Draube, 1999)

#### **1.1.7.6.2 Extramedulläres Plasmozytom**

Das solitäre extramedulläre Plasmozytom gilt als die prognostisch günstigste Form und ist vorzugsweise im HNO-Bereich (Nasen/Nasennebenhöhlen, Kieferhöhlen, Mund-Rachenraum, Kehlkopf) lokalisiert (Bolek et al., 1996; Draube, 1999). Es macht einen Anteil von ca. 4 % der Plasmazellneoplasien aus (Draube, 1999).

## 1.2 Tumorzytogenetik

### 1.2.1 Historische Entwicklung

Der Ursprung der Tumorzytogenetik lässt sich bis in das 19. Jahrhundert zurückverfolgen, als der Forscher J. Arnold zum ersten Mal Mitoseanomalien in Tumorzellen beobachtete (Arnold, 1879). Der deutsche Pathologe David von Hansemann vertrat bereits 1890 die These, dass alle Karzinome durch asymmetrische „Karyokinesen“ charakterisiert seien, was zur ungleichen Chromatinverteilung und damit zu Krebs führe (Hansemann, 1890). Diese Erkenntnis geriet etwa ein viertel Jahrhundert in Vergessenheit und fand ihre Bestätigung erst 1914, als Theodor Boveri in seiner Arbeit „Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren“ den Zusammenhang von genetischen Veränderungen und Krebs postulierte (Boveri, 1914). In dieser Arbeit stellte Boveri die These auf, wonach das Gleichgewicht der auf den Chromosomen lokalisierten Vererbungseinheiten die Voraussetzung für die normale Funktion von Zellen sei und eine Störung dieses Gleichgewichtes zur Tumorentstehung führen könnte. Er folgerte aus seinen Beobachtungen, dass Tumorzellen eine abnorme Chromosomenkonstitution besitzen müssten und dass aus den veränderten Zellen immer wieder Zellen mit entsprechenden Veränderungen hervorgehen (Boveri, 1914). Die Überprüfung dieser Theorie war jedoch erst Jahrzehnte später möglich, da die Darstellung der Chromosomen sowohl in normalen als auch in neoplastischen Zellen auf Grund technischer Schwierigkeiten bis dahin nicht gelungen war. Durch Verbesserung der technischen Verfahren wie die Verwendung der Colchizin-Behandlung, die die Arretierung der mitotischen Teilung bewirkte, wie auch die hypotone Behandlung der Zellen, verbesserte die Metaphasenqualität in hohem Maße. Einzelne Chromosomen konnten nun gezählt und analysiert werden (Heim & Mitelman, 1995). Diese Verbesserungen der Methodik führten im Jahre 1956 durch Tjio & Levan zur korrekten Bestimmung der Chromosomenzahl des Menschen (Tjio & Levan, 1956). Ein entscheidender Fortschritt in der Tumorzytogenetik wurde 1960 durch Nowell & Hungerford erreicht. Als erste spezifische Chromosomenveränderung einer malignen Erkrankung beschrieben sie mit dem Philadelphia-Chromosom eine wiederkehrende Chromosomenaberration bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML) (Nowell & Hungerford, 1960). Bei einer zunehmenden Zahl von Neoplasien wurden in dieser Zeit unterschiedlichste Chromosomenmuster beschrieben und erst Mitte der sechziger Jahre wurde durch Levan und van Steenis eine Ordnung in die Datenfülle der Chromosomenanomalien gebracht (Levan, 1966; van Steenis, 1966). Ein entscheidender Fortschritt in der Zytogenetik wurde durch die Einführung der Bänderungstechnik 1970-71 erreicht, die eine Identifizierung einzelner Chromosomen und Chromosomenabschnitte ermöglichte (Caspersson, 1970; Schnedl 1971; Seabright, 1971). Durch die Entwicklung der modernen Bänderungstechnik fand Janet

Rowley 1973 heraus, dass beim Philadelphia-Chromosom der fehlende Abschnitt des Chromosoms 22 auf das Chromosom 9 und ein kleinerer Teil des Chromosoms 9 auf das Chromosom 22 transloziert war (Rowley, 1973). Bis zu diesem Zeitpunkt wurde eine Deletion auf dem veränderten Chromosom 22 vermutet. Durch die Einführung der hochauflösenden Bänderungstechnik 1976 durch Yunis wurde eine detailliertere Analyse der Chromosomenaberrationen ermöglicht (Yunis, 1976).

### 1.2.2 Die klassische Zytogenetik

Für das bessere Verständnis der Pathogenese maligner Erkrankungen stellt die Identifizierung und Charakterisierung chromosomaler Veränderungen einen wichtigen Faktor dar. In den letzten Jahren konnten für eine Vielzahl maligner Erkrankungen charakteristische chromosomale Aberrationen identifiziert werden. Chromosomenanalysen im Rahmen hämatologischer Neoplasien und zunehmend auch solider Tumore geben einen Einblick in die Vielfalt der genetischen Veränderungen, die bei der malignen Zelltransformation von Bedeutung sind (Rowley, 2000). Für bestimmte Tumorentitäten, insbesondere für hämatologische Neoplasien, konnte eine Reihe spezifischer Chromosomenaberrationen identifiziert werden, die pathogenetisch von Bedeutung sind. So konnten Chromosomenveränderungen identifiziert werden, die für bestimmte Subgruppen von Leukämien und Lymphomen charakteristisch sind (Rowley, 1998). Zu den bei der Tumorgenese maßgeblich beteiligten Genklassen gehören die Protoonkogene und die Tumorsuppressorgene. Auf chromosomaler Ebene werden verschiedene Mechanismen unterschieden, die innerhalb der malignen Transformation von Bedeutung sind und die genannten Genklassen tangieren:

- Translokationen

Bei einer Translokation wird genetisches Material zwischen zwei oder mehreren Chromosomen ausgetauscht, wobei die translozierten chromosomalen Regionen in direkte Nachbarschaft miteinander gebracht werden.

- Inversionen

Bei der Inversion kommt es zum Bruch eines Chromosomenabschnittes mit anschließender Drehung um 180°.

- Insertionen

Bei der Insertion wird genetisches Material an anderer Stelle integriert

- Deletionen

Deletionen beschreiben den Verlust von chromosomalem Material

- Amplifikationen/Duplikationen

Amplifikationen bzw. Duplikationen haben eine Vervielfältigung bzw. Verdoppelung einer chromosomalen Region zur Folge. Als eine besondere Art der Amplifikationen gelten die so genannten homogen gefärbten Regionen (hsr = *homogeneously stained regions*) oder auch kleine, chromosomenähnliche Strukturen ohne Zentromer, die als „*double minute*“ Chromosomen (dmin) bezeichnet werden. Diese Strukturen treten insbesondere bei soliden Tumoren auf.

Chromosomale Aberrationen können sowohl die Genexpression als auch das Genprodukt beeinflussen. Die Aktivierung eines Protoonkogens kann als Folge eines Rearrangements z.B. durch Translokationen, Inversionen oder Amplifikationen unter dem Einfluss regulatorischer Sequenzen anderer Gene verstärkt oder inadäquat exprimiert werden. Als erstes chromosomales Rearrangement, das zu einer erhöhten Genexpression in einer Neoplasie führte, wurde die Translokation t(8;14) beim Burkitt-Lymphom beschrieben, bei der das Onkogen *c-MYC* unter die Kontrolle regulatorischer Sequenzen (Enhancer oder Promotorsequenzen) gebracht wurde (Dalla-Favera et al., 1982; Klein, 1989).

Oft kommt es auch zur Fusion von Genen, die für eine Hybrid-mRNA und entsprechende Fusionsproteine codieren, die veränderte funktionelle Eigenschaften aufweisen. Paradigmatisch für die Bildung eines neuen chimären Genprodukts steht die t(9;22) der chronischen myeloischen Leukämie (CML), bei der die Translokation des *ABL*-Onkogens zum *BCR*-Gen zur Transkription des *BCR/ABL*-Hybridgens und zur Produktion eines Proteins mit veränderter Funktion führt (Groffen et al., 1984; Rowley, 1990).

Einen weiteren Mechanismus, bei dem chromosomale Veränderungen oft durch den Verlust von genetischem Material, d.h. Deletionen und Monosomien oder durch strukturelle unbalancierte Veränderungen zum malignen Prozess beitragen, stellt die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen dar (Mitelman et al., 1997). Der spezifische Verlust von chromosomalem Material legt nahe, dass diese Regionen Gene enthalten, deren Funktionsverlust oder Inaktivierung für die Initiation oder Progression malignes Wachstums von Bedeutung sind (Döhner et al., 2001). Dass Deletionen mit einem bestimmten Krankheitsbild assoziiert sein können, wurde anhand des ersten klonierten Tumordispositionsgens, des Retinoblastom-Gens (*RBI*), nachgewiesen (Knudson, 1971).

Zytogenetische Veränderungen lassen sich in primäre und sekundäre klonale Aberrationen unterteilen (Heim & Mitelman, 1986 und 1989). Primäre Aberrationen werden häufig als alleinige Karyotypanomalie in malignen Zellen gesehen und sind in der Regel spezifisch für eine bestimmte Tumorentität (Heim & Mitelman, 1989). Die primäre Anomalie muss nicht zwingend

die erste sichtbare Veränderung des Karyotyps darstellen, sie steht vielmehr in kausalem Zusammenhang mit der Tumorgenese (Heim & Mitelman, 1995). Sekundäre Aberrationen treten selten als alleinige Veränderung auf, sondern werden häufig in malignen Zellen als zusätzliche Veränderung zu primären Anomalien meist in einem späteren Krankheitsstadium gesehen. Es wird davon ausgegangen, dass sekundäre Anomalien in die Progression maligner Erkrankungen involviert sind. Sie sind weniger typisch für bestimmte Tumorentitäten und können als zusätzliche Veränderungen in unterschiedlichsten Neoplasien auftreten (Heim & Mitelmann, 1986).

### 1.2.2.1 Konventionelle Zytogenetik beim multiplen Myelom (MM)

Die konventionelle zytogenetische Analyse beim MM gestaltet sich schwieriger als bei anderen hämatologischen Neoplasien, wie z.B. den akuten und chronischen Leukämien. Das zytogenetische Muster ist beim MM weniger gut charakterisiert als bei anderen Leukämie- und Lymphomarten (Calasanz et al., 1997). Auf Grund der niedrigen Teilungsaktivität der Myelomzellen *in vitro* und dem unterschiedlichen Infiltrationsgrad mit malignen Plasmazellen im Knochenmark liegen bisher vergleichsweise wenige Daten über genetische Veränderungen beim MM vor. Bis 1997 wurden nur etwa 800 Fälle zytogenetisch analysiert (Calasanz et al., 1997). Bei der konventionellen zytogenetischen Analyse wird demnach die Häufigkeit der Karyotypveränderungen stark unterschätzt. Im Rahmen der konventionellen zytogenetischen Analyse sind bei ca. 40 % der Myelompatienten klonale Chromosomenaberrationen nachweisbar, wobei die prozentualen Angaben der Aberrationen je nach Studie zwischen 20 % und 50 % schwanken (Ranni et al., 1987; Gould et al., 1988; Lisse et al., 1988; Clark et al., 1989; Kowalczyk et al., 1991; Weh et al., 1993; Lai et al., 1995; Sawyer et al., 1995; Tricot et al., 1995; Calasanz et al., 1997; Seong et al., 1998; Smadja et al., 2001). Die Häufigkeit, mit der Chromosomenaberrationen beim MM nachgewiesen werden sowie die Komplexität des Karyotyps korreliert mit dem Stadium der Erkrankung, der Erkrankungsdauer und dem Ansprechen auf die Therapie. Im Stadium I des MM zeigen ca. 20 % der Patienten einen veränderten Karyotyp, aber schon 60 % der Patienten im Stadium III haben Karyotypanomalien (Hallek et al., 1998).

Beim MM finden sich sowohl strukturelle als auch numerische Aberrationen (Heim & Mitelman, 1995). In 9-11 % der Patienten zeigen sich strukturelle Aberrationen des Karyotyps als alleinige Veränderung (Sawyer et al., 1995; Zandecki et al., 1996), wobei bisher kein spezifisches Muster zu erkennen ist (Pratt, 2002). Es werden häufig Hyperdiploidien in einer Frequenz von ca. 46-68 % festgestellt, außerdem, wenn auch seltener, pseudodiploide oder hypodiploide Karyotypen (Gould et al., 1988; Weh et al., 1993; Lai et al., 1995; Calasanz et al., 1997;



Smadja et al., 1998). Als rekurrente Chromosomenaberrationen sind partielle oder vollständige Trisomien/Tetrasomien der Chromosomen 9q, 3, 12q, 19, 15q, 11q, 7, 5, 17q, 18, 21 und 22q beschrieben. Partielle oder vollständige Monosomien beziehen sich auf die Chromosomen/-regionen 13q, das X-Chromosom bei Frauen, 14, 6q, 8, 16 oder auf eine Nullisomie Y. Strukturelle Veränderungen werden im Bereich der Chromosomen/-regionen 14q, 16p oder 16q, 1p oder 1q, 11q13, 19q13 oder 19p13, 6q, 17q, 2p12 oder 22q11 und 7q beobachtet (Heim & Mitelman, 1995; Pratt, 2002). Die Aufzählung der veränderten Chromosomen erfolgt mit abnehmender Häufigkeit.

Bei mehr als 25 % der Myelompatienten mit aberrantem Karyotyp wird ein derivatives Chromosom 14q identifiziert, das zu einem Drittel aus einer  $t(11;14)(q13;q32)$  entsteht, die in der Regel mit dem Mantelzell-Lymphom und der chronischen lymphatischen Leukämie vom B-Zell-Typ (B-CLL) assoziiert wird (Heim & Mitelman, 1995; Avet-Loiseau et al., 1998). In aktuellen Untersuchungen werden verschiedene Bruchpunkte auf Partnerchromosomen von 14q-Veränderungen, die eventuell für die Pathogenese des MM interessante Gene flankieren, analysiert (Bergsagel & Kuehl, 2001). Strukturelle Aberrationen von Chromosom 1 treten bei ca. 40 % der Myelompatienten mit Karyotypveränderungen auf, wobei die Hälfte Translokationen mit unterschiedlichen Translokationspartnern und Bruchpunkten sind. In neueren Studien scheint die chromosomale Region 1q12, ein konstitutiver Heterochromatinbereich, in der Pathogenese des MM involviert zu sein (Sawyer et al., 1998b; Baccon et al., 2001).

### **1.2.2.2 Konventionelle Zytogenetik bei der Plasmazell-Leukämie (PZL)**

Die Häufigkeit, mit der zytogenetische Aberrationen bei der PZL festgestellt werden, variiert innerhalb der verschiedenen Untersuchungsreihen ebenso wie beim MM. Der Anteil der PZL-Patienten mit klonalen Chromosomenaberrationen liegt zwischen 33 und 100 % (Ueshima et al., 1983; Dewald et al., 1985; Lisse et al., 1988; Smadja et al., 1991; Jonveaux & Berger, 1992; Weh et al., 1993; Dismopoulos et al., 1994; Calasanz et al., 1997; Avet-Loiseau et al., 2001). Auf Grund der Seltenheit der Erkrankung liegen bei der PZL weitaus weniger zytogenetische Daten vor als beim MM. Die Mehrheit der PZL-Patienten mit Chromosomenaberrationen zeigen hypo- und pseudodiploide Karyotypen (Avet-Loiseau et al., 2001). In ca. 50 % zeigen sich Veränderungen, die den langen Arm eines Chromosoms 14 betreffen, wobei die  $t(8;14)(q24;q32.3)$  und  $t(11;14)(q13;q32.3)$ , die auch beim MM festgestellt worden sind, beschrieben werden (Fonseca et al., 1999). Zwei Drittel aller zytogenetischen Aberrationen bei der PZL betreffen das Chromosom 1. Die Aberrationen sind auch hier sehr variabel und reichen von Translokationen bis zu Deletionen sowohl des langen als auch des kurzen Armes mit

unterschiedlichen Bruchpunkten. Häufig beschrieben werden auch Deletionen im langen Arm von Chromosom 6 mit ebenfalls unterschiedlichen Bruchpunkten (Heim & Mitelman, 1995), die jedoch in der umfangreichen Studie von Avet-Loiseau et al. (2001) nicht beschrieben werden.

### **1.2.2.3 Konventionelle Zytogenetik bei der monoklonalen Gammopathie unbestimmter Signifikanz (MGUS)**

Der Anteil zytogenetisch veränderter Karyotypen ist bei der MGUS weitaus niedriger als beim MM oder bei der PZL. In einer großen zytogenetischen Studie liegt der Anteil der Fälle mit Chromosomenaberrationen bei der MGUS bei ca. 25 % (11/44) (Calasanz et al., 1997), wogegen in einer weiteren Studie alle 54 Fälle, die unter anderem mit konventioneller zytogenetischer Analyse untersucht worden sind, einen normalen Karyotyp zeigen (Lloveras et al., 2002). Bei den zytogenetisch veränderten Fällen werden sowohl numerische als auch strukturelle Aberrationen beschrieben, wobei bisher auf Grund der geringen Anzahl von Daten keine rekurrenten Veränderungen auszumachen sind.

## **1.2.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)**

### **1.2.3.1 Prinzip**

Die Technik der in situ Hybridisierung (ISH) geht anfänglich sowohl auf Gall & Pardue als auch auf John et al. zurück (Gall & Pardue, 1969; John et al., 1969), denen es in den 60er Jahren unabhängig voneinander gelang, radioaktiv markierte Nukleinsäuren mit dieser Methode darzustellen. In den darauf folgenden Jahren führte die Entwicklung der molekularen Klonierung von Nukleinsäuren zu weitreichenden Möglichkeiten in der ISH. DNA Sequenzen von mehreren hundert Basenpaaren konnten mittels Autoradiographie in Metaphasechromosomen nachgewiesen werden (Harper et al., 1981; Jhanwang et al., 1984; Rabin et al., 1984) und mRNA-Moleküle mit niedriger Kopienanzahl konnten in bestimmten Zellen sichtbar gemacht werden (Harper et al., 1986). Obwohl die radioaktive Methode der ISH nicht zuletzt auf Grund ihrer hohen Sensitivität in den vergangenen Jahren eine breite Anwendung fand, bringt der Einsatz radioaktiver Substanzen in Bezug auf Sicherheitsvorschriften begrenzte Halbwertszeiten u.a. einige Nachteile mit sich. Durch die Weiterentwicklung der ISH mit stabilen nichtradioaktiven Markierungssystemen konnten diese Probleme umgangen werden. Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH), die heute u.a. im Rahmen der Tumorzytogenetik ein breites Anwendungsspektrum findet, wurde letztlich mit der Entwicklung nichtradioaktiver Markierungstechniken von DNA ermöglicht (Langer et al., 1981).

Das Prinzip der FISH beruht im Wesentlichen auf der spezifischen Bindung von DNA/RNA-Einzelstrangfragmenten (Sonden) an komplementäre DNA-Zielsequenz der zu untersuchenden (Tumor-) Zelle. Die Sonde wird durch den Einbau modifizierter Nukleotide markiert, die ein kovalent gebundenes Reportermolekül tragen, das nach der Hybridisierungsreaktion mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes detektiert wird. Bei der indirekten Methode wird das Reportermolekül wie z.B. Biotin oder Digoxigenin indirekt durch den Einsatz spezifischer Fluoreszenzgekoppelter Antikörpersysteme detektiert (Langer et al., 1981; Van Prooijen-Knegt, 1982), wogegen bei der direkten Methode der Fluoreszenzfarbstoff direkt an die Sonde gebunden ist (Baumann et al., 1980; Renz et al., 1984) und das Resultat unmittelbar durch den Einsatz spezifischer Filter mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet werden kann. Die bei der FISH verwendeten DNA-Sonden werden mittels Klonierungsvektoren wie z.B. Cosmide, Plasmide oder Phagen sowie aus künstlichen Hefechromosomen (YAC's) und künstlichen Bakterienchromosomen (BAC's) generiert. In der Molekularzytogenetik werden DNA-Sonden verwendet, die das vollständige Chromosom darstellen oder nur mit spezifischen Chromosomenregionen hybridisieren. Es stehen zentromer-, telomer- und sequenzspezifische Sonden zur Verfügung (Nederlof et al., 1990).

Die FISH stellt im Bereich der Tumorzytogenetik eine wichtige Ergänzung zur konventionellen zytogenetischen Analyse dar. Ein entscheidender Vorteil dieser Methode ist, dass bei der Untersuchung menschlicher Tumorzellen zytogenetische Aberrationen nicht nur an Metaphasechromosomen, sondern auch an Interphasezellkernen nachgewiesen werden können. Die Interphasezytogenetik ist somit nicht von der Existenz mitotisch aktiver Zellen und von qualitativ gut beurteilbaren Metaphasen abhängig. Eine Einschränkung der FISH stellt die Tatsache dar, dass die zu analysierende Sequenz bekannt sein muss. Es ist demnach mit dieser Methode nicht möglich einen Überblick über das gesamte Genom zu erhalten.

### **1.2.3.2 FISH bei MM, PZL und MGUS**

In jüngsten Studien werden maligne Plasmazellerkrankungen verstärkt mittels der FISH-Technik untersucht, da die Frage beantwortet werden soll, ob es sich bei den Fällen mit normalem Karyotyp um Zellen handelt, die den malignen Klon repräsentieren oder ob sie Zellen der normalen Hämatopoese darstellen. Mit chromosomenspezifischen Zentromer-Sonden und locusspezifischen Sonden konnten im Rahmen verschiedener Arbeiten in 67-97 % aller MM und PZL chromosomale Veränderungen nachgewiesen werden (Drach et al., 1995; Flactif et al., 1995; Tabernero et al., 1996; Zandecki et al., 1996; Pérez-Simón et al., 1998; García-Sanz et al., 1999; Avet-Loiseau et al., 2001).

### 1.2.3.2.1 Nachweis aberrater Karyotypen mit der FISH

Mit Hilfe der FISH werden bei 61-66 % der Myelompatienten Hyerdiploidien festgestellt, bei 9-20 % Pseudodiploidien und bei 10-30 % Hypodiploidien (Pratt, 2002). Bei der MGUS zeigen 20-50 % der Patienten numerische Chromosomenaberrationen (Drach et al., 1995; Zandecki et al., 1995b und 1997; Lloveras et al., 2002), wobei dieselben Chromosomen involviert sind wie beim MM. Die Diskrepanzen zwischen den verschiedenen Studien sind auf die Tatsache zurückzuführen, dass bei einigen Untersuchungen angereichertes Plasmazellmaterial für die FISH verwendet worden ist (Drach et al., 1995; Zandecki et al., 1995b) und in anderen Arbeiten das Material aus der konventionellen zytogenetischen Analyse eingesetzt worden ist (Lloveras et al., 2002). Am häufigsten werden beim MM und der MGUS Trisomien der Chromosomen 3, 5, 7, 9, 11, 15 und 19 sowie Monosomie der Chromosomen 6, 8, 13, 14 und X beobachtet. Trisomien kommen hierbei wesentlich häufiger vor als Monosomien. In strukturelle Veränderungen sind vielfach die Chromosomen 1, 6, 11 und 14 involviert (Lai et al., 1995; Taberero et al., 1996; Pratt, 2002). Numerische Aberrationen bei der primären PZL wurden bisher in nur einer Studie untersucht, und es zeigten sich Trisomien der Chromosomen 1 und 18 sowie Monosomien der Chromosomen 1, 13 und X. Einige numerische Aberrationen, die beim multiplen Myelom auftreten, wie etwa +3, +6, +9, +11 und +15 wurden bisher mit der FISH bei der PZL nicht gesehen (García-Sanz et al., 1999).

### 1.2.3.2.2 IgH-Rearrangements und Deletionen im Chromosom 13

Besonders hervorzuheben sind Translokationen, die den Immunglobulin-Schwerkettenlocus in der Chromosomenregion 14q32 betreffen (Bergsagel et al., 1996; Nishida et al., 1997), deren Häufigkeit mit zunehmender Progression der Erkrankung zunimmt: In 50 % der MGUS-Fälle, in 60-65 % der intramedullären MM, in 70-80 % der extramedullären MM und in mehr als 90 % der MM-Zell-Linien werden 14q32-Translokationen festgestellt (Bergsagel & Kuehl, 2001). Die Translokationen sind hinsichtlich der Partnerchromosomen sehr heterogen. Bezüglich primärer Translokationen des IgH-Locus werden am häufigsten die Regionen 11q13 (*BCL-1*), 6p21 (*Cyclin D3*), 4p16.3 (*FGFR3* und *MMSET*) sowie 16q23 (*c-MAF*) beschrieben (Bergsagel & Kuehl, 2001). Gegenstand vermehrter Untersuchungen mittels FISH ist in jüngster Zeit der Verlust von chromosomalem Material im langen Arm von Chromosom 13. Deletionen von 13q lassen sich mit der FISH bei etwa 45 % der Patienten erfassen, wobei der Verlust eines Tumorsuppressorgens in der Region 13q14 diskutiert wird (Desikan et al., 2000; Königsberg et al., 2000; Zojer et al., 2000; Facon et al., 2001; Avet-Loiseau et al., 2002). Außerdem werden

beim MM gehäuft Deletionen der Region 17p13 in 25 % und 11q-Anomalien in 15 % der Patienten festgestellt (Tricot et al., 1995; Drach et al., 1998; Königsberg et al., 2000).

Bei der PZL werden 14q32-Aberrationen und Deletionen der Region 13q14 häufiger beobachtet als beim MM: 80 % der PZL-Veränderungen betreffen den *IgH*-Locus gegenüber 60 % der MM im Stadium III; 68 % der PZL zeigen Deletionen der Region 13q14 gegenüber 42 % der MM im Stadium III (Avet-Loiseau et al., 2001).

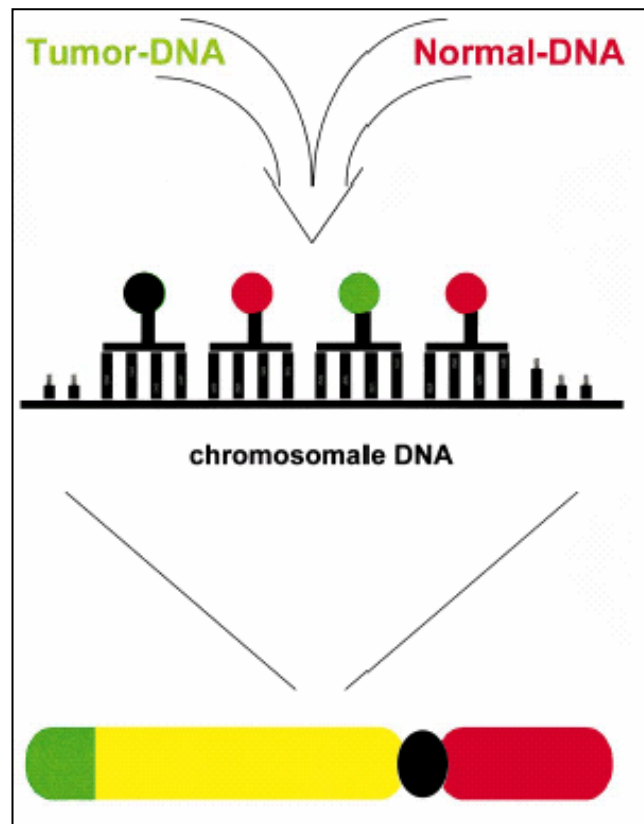
## 1.2.4 Comparative genomische Hybridisierung (CGH)

### 1.2.4.1 Prinzip

Eine weitere Technik basierend auf der FISH-Methodik, die eine Weiterentwicklung insbesondere im tumorzytogenetischen Bereich darstellt, ist die comparative genomische Hybridisierung (CGH) (Kallioniemi et al., 1992). Die CGH basiert auf einer quantitativen Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit zwei unterschiedlich fluoreszierenden Farbstoffen. Mittels der CGH können Tumorzellen auf chromosomale Imbalancen untersucht werden, ohne auf die Verfügbarkeit von Metaphasechromosomen des Tumors oder auf spezifische DNA-Sequenzen angewiesen zu sein. Ein einziges Hybridisierungsexperiment erlaubt einen Überblick über das gesamte Genom.

Das Prinzip der CGH beruht auf dem quantitativen Vergleich der Tumor-DNA mit einer normalen Referenz-DNA, die als interner Standard dient. Die zu untersuchende (Test-DNA) und die normale DNA (Kontroll-DNA) werden mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert und zu gleichen Teilen zur Hybridisierung auf normale Metaphasechromosomen eingesetzt (Du Manoir et al., 1993) (Abbildung 1.3). Enthält die zu untersuchende Tumor-DNA zusätzliches chromosomales Material (Trisomien, Tetrasomien, Duplikationen, etc.) oder ist Material verlorengegangen (Monosomien, Deletionen), ergibt sich eine quantitative Differenz entsprechend der Über- oder Unterrepräsentationen von Chromosomensequenzen des veränderten Genoms (Ried et al., 1994), die mittels digitaler Bildanalyseverfahren in Bezug auf die Fluoreszenzintensitäten quantifiziert wird (Du Manoir et al., 1995; Piper et al., 1995). Aberrationen, bei denen keine quantitativen Differenzen zwischen Test- und Kontroll-DNA vorliegen, wie bei balancierten Translokationen, Inversionen oder Polyploidisierung des gesamten Genoms, können mit der CGH-Technik dagegen nicht erfasst werden. Da bei der CGH die Hybridisierung auf Metaphasechromosomen erfolgt, ist ihr Auflösungsvermögen durch die Kondensation dieser Referenz-Chromosomen limitiert. Die Sensitivität der Methode schwankt in Abhängigkeit der Kopienzahl der veränderten Region und liegt für den Zugewinn von genetischem Material im Bereich von 2 Mb bis zu 50 kb bei hochamplifizierten Bereichen (Ried et al., 1997). Für Verluste liegt die Detektionsgrenze in einer Größenordnung von 10-20 Mb (Piper et al., 1995). Die CGH

stellt somit ein Verfahren dar, das die Identifizierung neuer kritischer Regionen sowohl in hämatologischen Neoplasien als auch in soliden Tumoren ermöglicht.



**Abbildung 1.3:** Das Prinzip der comparativen genomischen Hybridisierung (CGH) (aus: Bockmühl et al., 1998). Mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Tumor- und Referenz-DNAs werden auf normale Metaphasenchromosomen hybridisiert und konkurrieren dabei um homologe Bindungsstellen.

#### 1.2.4.2 CGH bei MM, PZL und MGUS

Zytogenetische Veränderungen, die mittels CGH detektiert wurden, liegen bisher nur in sehr begrenzter Anzahl vor. In verschiedenen Studien, die sowohl MM- und wenige PZL-, MGUS-Patienten (Avet-Loiseau et al., 1997a; Cigudosa et al., 1998; Gutierrez et al., 2001) als auch Zell-Linien (Avet-Loiseau et al., 1997a) einschlossen, wurden Verluste und Amplifikationen innerhalb verschiedener chromosomaler Regionen mit unterschiedlicher Frequenz festgestellt. Avet-Loiseau et al. beschreiben Trisomien 7 und 8 (25 %) sowie den Zugewinn von chromosomalem Material im Bereich +1q, +2q, +9q und +8q (63 %). Den Verlust von genetischem Material gibt er im Bereich 13q (63 %) und 14q (38 %) an (Avet-Loiseau et al., 1997a). In der Studie von Cigudosa et al. werden dagegen als am häufigsten amplifizierte Bereiche das gesamte Chromosom 19 und 19p (30 %) und 11q angegeben. Monosomien und Verluste von chromosomalem Material werden in den Regionen bzw. Chromosome 13 (30 %), 6q (13 %) und 16 (17 %)

beschrieben (Cigudosa et al., 1998). Die neuste Studie von Gutierrez et al. fokussiert die Zugewinne dagegen auf die Chromosomenregionen 15q (48 %), 11q (44 %), 3q (40 %), 9q (40 %), 1q (36 %) und die Verluste auf die Chromosome bzw. Regionen 13q (80 % PZL/28 % MM), 16 (80 % PZL/16 % MM) und 2q, 6p nur bei der PZL (Gutierrez et al., 2001).

## 1.2.5 Spektrale Karyotypisierung oder multiplex-FISH

### 1.2.5.1 Prinzip

Eine weitere Methode der molekularen Zytogenetik basierend auf der Fluoreszenz in situ Hybridisierung, die die jüngste Weiterentwicklung darstellt, ist die Spektrale Karyotypisierung (SKY, *spectral karyotyping*) (Schröck et al., 1996) bzw. die Vielfarben-FISH (m-FISH, *multiplex-fluorescence in situ hybridization*) (Speicher et al., 1996). Diese Methoden erlauben die Darstellung und Analyse aller Chromosomen in verschiedenen Farben in einem einzigen Experiment. Zur Veranschaulichung der menschlichen Chromosomen in unterschiedlichen Farben werden N Fluorochrome miteinander kombiniert, um  $2^N - 1$  verschiedener Farbkombinationen zu erhalten. Zur Erfassung der 24 Chromosomen des Menschen sind fünf Fluoreszenzfarbstoffe erforderlich (Schröck et al., 1996; Speicher et al., 1996). Die mit unterschiedlichen Kombinationen von Fluoreszenzfarbstoffen markierten Gesamtchromosomen-Sonden werden gemischt und in einer FISH auf die zu analysierenden (Tumor-)Metaphasen eingesetzt. Ein entscheidender Unterschied bei der SKY und der m-FISH liegt in der Bildaquirierung. Der wichtigste Aspekt bei der SKY ist die Messung des kompletten Emissionsspektrums zwischen 400 und 800 nm mittels einer Kombination eines Interferometers und einer CCD-Kamera. Für jeden Bildpunkt wird ein Bild mit der spezifischen spektralen Information aufgenommen und die Fluoreszenzintensitäten werden in einem rot/grün/blau-Bild dargestellt. Bei der m-FISH Methode erfolgt die Bildaquirierung mit einem Epifluoreszenzmikroskop mittels verschiedener Filterkombinationen. Nacheinander wird für jeden Fluoreszenzfarbstoff ein einzelnes Bild mit Hilfe spezifischer Filter und einer CCD-Kamera aufgenommen. Die Verhältnisse der Bilder zueinander werden durch nachträgliche Übereinanderlagerung verglichen.

Nach der digitalen Bildaufnahme erfolgt die Auswertung mit speziellen Computerprogrammen. Auf diese Weise lassen sich Chromosomenaberrationen, insbesondere Translokationen, durch Abweichungen von den üblichen Farbgebungen erkennen. Ein Vorteil dieser Methode liegt in der Detektion von kryptischen Translokationen, der Beschreibung von komplex rearrangierten Chromosomen sowie der Charakterisierung von hsr, dmin und Markerchromosomen. Ein Nachteil der SKY/m-FISH ist zum einen die Tatsache, dass Tumormetaphasen vorhanden sein

müssen und zum anderen, dass ein Nachweis von Inversionen, kleinen Deletionen, Insertionen oder Translokationen, die kleiner als 500 kb sind, mit dieser Methode nicht möglich ist. Die SKY/mFISH stellt insbesondere im Bereich der Tumorzytogenetik eine sinnvolle Ergänzung zur konventionellen Bänderungsanalyse dar (Veldmann et al., 1997; Padilla-Nash et al., 1999).

Abbildung 1.4 zeigt eine vergleichende schematische Darstellung der CGH und der SKY (Ried et al., 1997). Beide Methoden dienen zum Nachweis komplexer zytogenetischer Aberrationen. Die CGH ist in der Lage genetische Alterationen in Form von Über- und Unterrepräsentation genetischen Materials nachzuweisen ohne auf teilungsfähige Zellen angewiesen zu sein. Die SKY dagegen benötigt Metaphasen der Tumorzellen zum Nachweis insbesondere von Translokationen, die mit der CGH nicht detektiert werden können. Beide Methoden ergänzen sich gegenseitig und werden je nach Fragestellung eingesetzt.

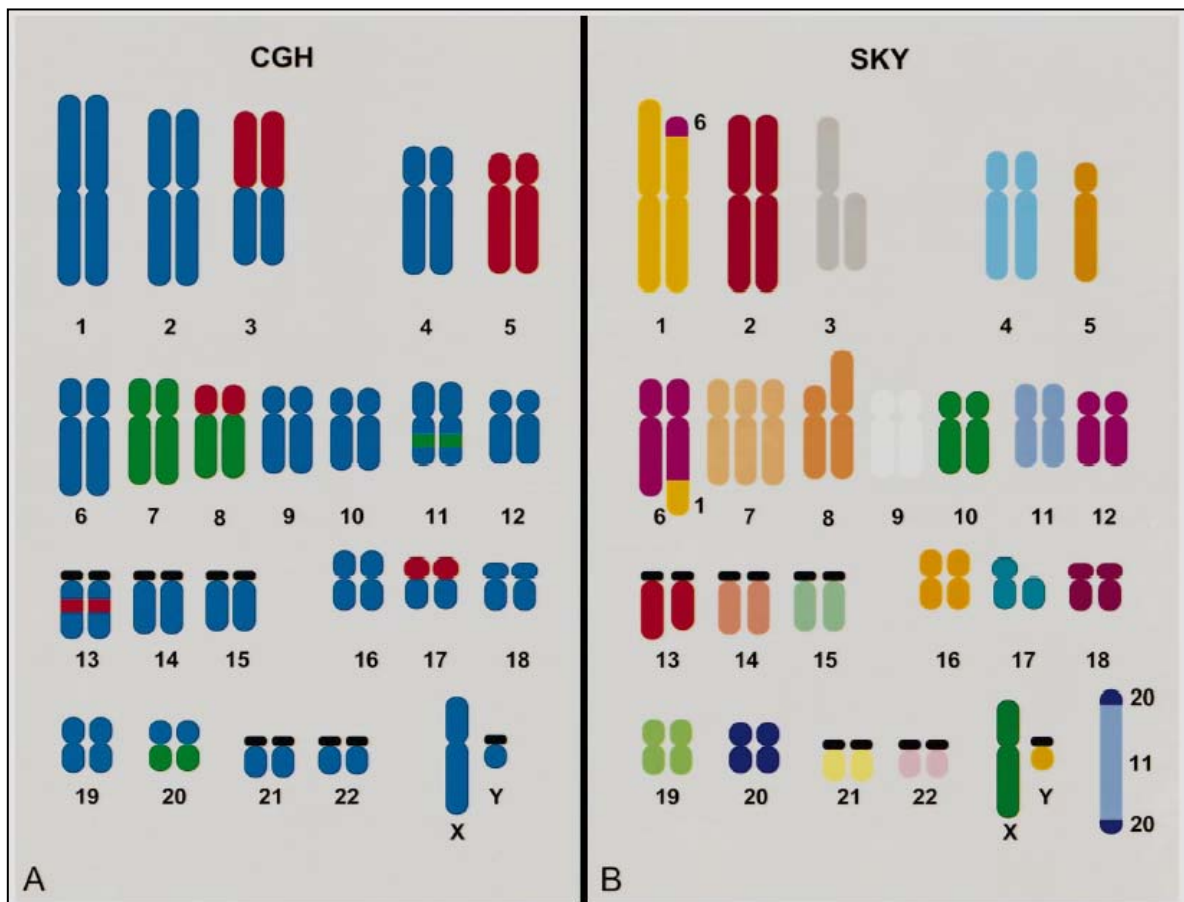


Abbildung 1.4: Die schematische Darstellung der CGH (A) und der SKY (B) (aus Ried et al., 1997). Beide Methoden haben den Vorteil, dass das Test-Genom in einem einzelnen Experiment untersucht werden kann. (A) Grün repräsentiert die Amplifikation der entsprechenden chromosomalen Region, rot den Verlust der entsprechenden chromosomalen Region und blau ein ausgeglichenes Verhältnis von Referenz- und TumordNA. (B) Die SKY erlaubt die simultane Darstellung aller Chromosomen in unterschiedlichen Fluoreszenzfarben und ist dadurch in der Lage einen komplexen Chromosomensatz zu charakterisieren.



### 1.2.5.2 SKY/M-FISH bei MM, PZL und MGUS

Mittels der SKY wurden bisher in erster Linie MM-Patienten mit komplexen Chromosomenaberrationen untersucht. Die Studie von Rao et al. beschrieb neue rekurrente Bruchpunkte im Bereich der Chromosomenregionen 3q27, 17q24-q25 und 20q11. Außerdem wurden in MM-Zell-Linien die 14q32-Aberrationen  $t(12;14)(q24;q32)$  und  $t(14;20)(q32;q11)$  identifiziert (Rao et al, 1998). In einer zweiten Studie wurden 50 Knochenmarkproben von Myelompatienten analysiert und die  $t(14;16)(q32;q22-q23)$  bei sechs Patienten und  $t(9;14)(p13;q32)$  bei zwei Patienten identifiziert. Acht Patienten zeigten Deletionen im kurzen Arm von Chromosom 8, was den Verlust eines Tumorsuppressorgens vermuten läßt (Sawyer et al., 1998a).

### 1.3 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein morphologisch und klinisch gut charakterisiertes Patientengut untersucht werden. Die konventionelle Zytogenetik (CC) und die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) mit den DNA-Sonden für die Loci 13q14.3 und 14q32.3 wurden im Rahmen der Diagnostik durchgeführt. Ziel dieser Arbeit war es nach möglichen genetischen Veränderungen mittels der comparativen genomischen Hybridisierung (CGH) zu suchen, die mit der CC nicht detektiert werden konnten. Außerdem sollte die Spezifität der Aberrationen, die mit der CC, der CGH und der FISH detektiert worden sind, vor dem Hintergrund der bisher bekannten Chromosomenveränderungen diskutiert werden. Hinweise auf ein zytogenetisches Muster und eventuell in Chromosomenaberrationen involvierte Gene, die für die Tumorphogenese von Bedeutung sein könnten, sollten herausgearbeitet werden. Zudem sollten klinisch relevante Parameter mit definierten zytogenetischen und molekularzytogenetischen Gruppen korreliert werden.

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Material**

Es wurden 126 Patienten untersucht, 48 Frauen und 78 Männer. Der Mittelwert des Patientenalters war 58,5 Jahre (Frauen: 60, Männer: 57) und die Altersspanne lag zwischen 32 und 78 Jahren (Frauen von 41 bis 74 Jahren, Männer von 32 bis 78 Jahren). Für die konventionelle zytogenetische und die FISH-Analysen wurden Patienten ausgewählt, deren heparinisiertes Knochenmarkaspirat in dem Zeitraum von 1999 bis 2003 an das Institut für Humangenetik des UKM eingesandt wurde. Die Auswahl der Patienten für die CGH-Untersuchungen erfolgte zum überwiegenden Teil nach dem Vorliegen eines normalen Karyotyps. Eine zytogenetische Analyse wurde aufgrund der medizinischen (Verdachts-) Diagnose einer Plasmazell Dyskrasie veranlasst. Alle Knochenmarkproben wurden nach der Aspiration innerhalb von 24 Stunden zur zytogenetischen Analyse eingesandt.

### **2.2 Methoden**

#### **2.2.1 Morphologie**

Im Rahmen der Routinediagnostik wurde bei allen Patienten eine morphologische Analyse durchgeführt. Diese lichtmikroskopische Diagnostik erfolgte an May-Grünwald-Giemsagefärbten Knochenmarkausstrichen. Für die Diagnose galten folgenden Parameter:

- Der Plasmazellanteil, d.h. der Anteil von Plasmazellen im Verhältnis zu den kernhaltigen Zellen im Knochenmarkausstrich.
- Morphologische Besonderheiten der Plasmazellen, wie z.B. Doppelkernigkeit, Zytoplasma- oder Kernvakuolisierung.

Morphologisch zeigten die Plasmazellen einen kugelrunden und exzentrisch in der Zelle gelegenen Kern und ein basophiles Zytoplasma, das eine deutliche perinukleäre Aufhellung aufwies.

## 2.2.2 Konventionelle Zytogenetik (CC)

### 2.2.2.1 Metaphasenpräparation aus Knochenmarkaspirat

Lösungen und Medien:

Kulturmedium	100 ml	RPMI 1640 Medium w 2,0 g/l NaHCO <sub>3</sub> w 0,532 g/l n-Acetyl-L-alanyl-L-glutamine (Biochrom, Berlin)
	20 ml	Fötales Kälberserum (Biochrom, Berlin)
Colcemid-Stammlösung	10 µg/ml	Colcemid (Gibco BRL, Karlsruhe)
Methotrexat-Stammlösung	0,5 mg/ml	4-Amino-10-methylfolic acid (Sigma, Deisenhofen) in Aqua dest.
Zytokine-Mix	50 ml	Gigant Cell Tumor Conditioned-Medium (TEBU GmbH, Frankfurt a.M.)
	50 µl	Human SCF (10 µg/100 µl) (TEBU GmbH, Frankfurt a.M.)
	50 µl	Human Flt-3-Ligand (10 µg/100 µl) (TEBU GmbH, Frankfurt a.M.) in 1 ml Aliquots, Lagerung bei -20°C
Waschlösung		RPMI 1640 Medium (Biochrom, Berlin)
KCl-Lösung	75 mM	KCl (Merck, Darmstadt)
Carnoy's Fixativ	3 Teile	100%iges Methanol (Riedel-de Haen, Seelze)
	1 Teil	100%ige Essigsäure (Roth, Karlsruhe)

Für die Zellkultur wurde das heparinisierte Knochenmark unter sterilen Bedingungen in Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 1500 rpm für 5 min ohne automatische Bremse zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus, Düsseldorf). Nach Trennung des Zellmaterials vom Serum wurde die Schicht kernhaltiger Zellen (*buffy coat*) mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und in 1 ml Kulturmedium gegeben. Der *buffy coat* wurde je nach Anteil kernhaltiger Zellen so auf die Kulturflaschen verteilt, dass pro Kultur ca.  $1 \times 10^7$  Zellen in 10 ml warmen Kulturmedium (37°C)

vorlagen. Es wurden je nach vorhandener Zellmasse bis zu drei Kulturen ohne weitere Zusätze angelegt. In eine weitere Kultur wurde 50 µl Colcemid gegeben. Eine zusätzliche Kultur wurde mit 50 µl Methotrexatlösung und 1000 µl Zytokine-Mix versetzt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 17-72 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde Colcemid in einer Endkonzentration von 0,05 µg/ml zugegeben und für weitere 30 min inkubiert. Durch das Colcemid, ein synthetisches Analogon des Pflanzengiftes Colchizin, wird die Zellteilung in der Metaphase arretiert. Colcemid verhindert die Ausbildung der Kernteilungsspindel, die zur Trennung der Homologen in der Anaphase notwendig ist. Die Zellsuspension wurde nach der Colcemidbehandlung für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das Zellsediment wurde durch leichtes Klopfen am Zentrifugenröhrchen resuspendiert und durch Zugabe einer 37°C warmen Waschlösung (Kulturmedium ohne FCS) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Absaugen des Überstandes wurden die Zellen mit 10 ml einer 37°C warmen hypotonischen KCl-Lösung resuspendiert und für 20 min in einem Wasserbad (37°C) inkubiert. Die Behandlung der Zellen mit einer hypotonen Salzlösung führte zur Lyse der Zellmembran und zur Freisetzung des Kernmaterials. Nach der Inkubation wurde zur Vorfixierung der Zellen pro Röhrchen ca. 1 ml Carnoy's Fixativ zur Zellsuspension gegeben. Diese Lösung wurde direkt zentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet durch Klopfen resuspendiert. Unter ständigem Mischen des Pellets wurden vorsichtig einige Tropfen Fixativ zugegeben. Die Röhrchen wurden auf einen automatischen Schüttler (GFL, 3006, Burgwedel) gestellt und es folgte die Fixierung der Zellen durch langsame Zugabe von 10 ml Carnoy's Fixativ über einen Zeitraum von 20 Minuten. Das fixierte Zellpellet wurde erneut mit 10 ml Carnoy's Fixativ versetzt und direkt zentrifugiert. Dieser Fixierschritt wurde mindestens einmal wiederholt bis das Kernsediment weiß wurde. Das saubere Zellpellet wurde in Carnoy's Fixativ resuspendiert und aus der Zellsuspension wurden Metaphasenpräparate hergestellt. Auf saubere, fettfreie und mit Aqua dest. benetzte Objektträger wurden 1-2 Tropfen Kernsuspension aufgetropft. Nach Ablauf des überschüssigen Wassers wurden die Präparate bei RT getrocknet. Die verbleibende Kernsuspension wurde bis zum weiteren Gebrauch mit Carnoy's Fixativ aufgefüllt und bei -80°C gelagert.

#### 2.2.2.2 Giemsa-Trypsin-Bänderung (GTG)

Lösungen:

Trypsin-Lösung	0,25 g	Trypsin (Difco, Detroit, USA, 1:250)
	100 ml	NaCl-Lösung (0,9%ig)
		ca. 1h bei 37°C lösen

Sørensen-Puffer	500 ml	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (9,08 g/l)
	500 ml	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O (11,88 g/l) pH-Wert 6,8
NaCl-Lösung (0,9%ig)	9 g	NaCl (Merck, Darmstadt)
	ad 1000 ml	Aqua dest.
Fötale Kälberserum (FCS) (Biochrom, Berlin)		
Giemsa-Lösung (5%ig)	2,5 ml	Giemsa (Merck, Darmstadt)
	ad 50 ml	Sørensen-Puffer filtrieren (Filterpapier, Schleicher & Schuell)

Für die GTG-Bänderung wurden die Metaphasenpräparate 3-4 Tage bei RT gelagert. Der enzymatische Verdau der Chromosomen erfolgte durch die Behandlung der Präparate mit einer 0,25%igen Trypsin-Lösung bei RT. Je nach Alter der Präparate wurden die Chromosomen ca. 120 sec in der Trypsin-Lösung verdaut und anschließend in 0,9%iger NaCl-Lösungen, zuerst mit ca. 0,5 ml Fötale Kälberserum (FCS) versetzt und dann ohne FCS, gespült. Die Färbung erfolgte in 5%iger Giemsa-Lösung für 5 min. Zuletzt wurden die gefärbten Objektträger gründlich mit Aqua dest. gespült und bei RT getrocknet.

### 2.2.2.3 Lichtmikroskopische Karyotypanalyse

Die einzelnen Präparate wurden bei 10×10-facher Vergrößerung nach geeigneten Metaphasen mit ausreichender Länge und Spreitung durchgemustert. Die Anzahl der Chromosomen und das G-Bandenmuster wurde anschließend bei 10×100-facher Vergrößerung bestimmt bzw. beurteilt. Nach den Regeln der Internationalen Humanzytogenetischen Nomenklatur (ISCN, 1995) wurden mindestens 20 Metaphasen pro Fall auf strukturelle und numerische Chromosomenaberrationen untersucht. Die computergestützte Karyotypisierung erfolgte mit Geräten der Firma MetaSystems (Althusheim, BRD). Dafür wurden die einzelnen Metaphasen bei einer 1000-fachen Vergrößerung mit einer gekühlten CCD-Kamera (*cooled charge-coupled device camera* JAM M300, JAI Corporation, Japan), die mit einem Computer verbunden war, aufgenommen und gespeichert. Das erstellte Bild der Metaphase wurde mit Hilfe eines speziellen Computerprogramms bearbeitet (ikaros, MetaSystems, Althusheim) und die Analyse erfolgte durch den direkten Vergleich der Chromosomenpaare nach deren Anordnung in einem Karyogramm.

### 2.2.3 Comparative genomische Hybridisierung (CGH)

Die comparative genomische Hybridisierung (CGH) ist eine molekularzytogenetische Methode, die auf der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) basiert. Ein Test- und Referenz-Genom, d.h. Tumor- und Normalgewebe-DNA, wurden extrahiert und mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen mittels einer Nicktranslation markiert. Die markierten DNAs wurden nachfolgend auf normale Metaphasechromosomen hybridisiert. Test- und Referenz-DNA konkurrieren dabei um homologe Bindungsstellen auf den Chromosomen. Nach Detektion wurden Digitalbilder von geeigneten Metaphasen aufgenommen und mit Hilfe eines speziellen Datenverarbeitungsprogramms ausgewertet. Die über die Differenz der Fluoreszenzsignale detektierbaren Veränderungen lassen sich als DNA-Gewinne (Amplifikationen) oder DNA-Verluste (Deletionen) des Testgenoms klassifizieren.

#### 2.2.3.1 Zellkulturen und Metaphasenpräparation für die CGH

Lösungen und Medien:

Kulturmedium	100 ml	RPMI 1640 Medium (Biochrom, Berlin) w 2,0 g/l NaHCO <sub>3</sub> w 0,532 g/l n-Acetyl-L-alanyl-L-glutamine
	20 ml	Fötales Kälberserum (Biochrom, Berlin)
PHA-Stammlösung	1,2 mg ad 5 ml	Phytohämagglutinin L (Biochrom, Berlin) Aqua dest.
Colcemid-Stammlösung	10 µg/ml	Colcemid (Gibco BRL, Karlsruhe)
Waschlösung		RPMI 1640 Medium (Biochrom, Berlin)
KCl-Lösung	75 mM	KCl (Merck, Darmstadt)
Carnoy's Fixativ	3 Teile 1 Teil	100%iges Methanol (Riedel-de Haen, Seelze) 100%ige Essigsäure (Roth, Karlsruhe)

Für die CGH wurden zunächst Lymphozyten aus dem peripheren Blut eines gesunden Probanden kultiviert und Metaphasenpräparate hergestellt. Dazu wurden 10 Tropfen heparinisiertes Vollblut pro Kulturflasche in 10 ml warmes (37°C) Kulturmedium gegeben. Zur Stimulation der

Lymphozyten wurden je Kulturansatz 0,5 ml Phytohämagglutinin (PHA) gegeben. Das PHA regt durch Rezeptorbindung die T-Lymphozyten zur Teilung an. Nach einem Inkubationszeitraum von 72 h bei 37°C wurden die Kulturansätze mit 500 µl Colcemid versetzt. Nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus, Düsseldorf) und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Die weiteren Aufarbeitungsschritte erfolgten bis zur Herstellung der Objektträger wie unter 2.2.2.1 beschrieben. Es wurden ca. 100 Präparate hergestellt und bei RT getrocknet. Nach 14 Tagen bei RT wurden die Objektträger bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.2.3.2 DNA-Isolierung

#### 2.2.3.2.1 DNA-Isolierung aus fixierten Zellen

Lösungen und Reagenzien:

1×TNE-Puffer	0,1 M	NaCl
	10 mM	Tris-HCl
	1 mM	EDTA
		pH-Wert 8,0
1×PBS	6,9 g	PBS (Gibco BRL, Karlsruhe)
	ad 1000 ml	Aqua dest.
SDS-Lösung	20 % (v/w)	SDS (Sigma, Deisenhofen)
Proteinase K-Lösung	20 mg	Proteinase K (ROCHE, Mannheim)
	ad 1 ml	Aqua dest.
		Lagerung bei -20 °C
Phenol		Roti-Phenol (ROTH, Karlsruhe)
Chloroform/Isoamylalkohol	24 Teile	Chloroform (Merck, Darmstadt)
	1 Teil	2-Propanol (Merck, Darmstadt)

Die Isolierung genomischer Tumor-DNA erfolgte aus der Zellsuspension, die für die konventionelle zytogenetische Analyse angefertigt worden war. Es wurde 500-1000 µl Zellkernsuspension ( $1-5 \times 10^6$  Zellen) in einem Reaktionsgefäß bei 1500 rpm (Sigma 2-16K, SIGMA Laborzentrifu-

gen GmbH, Osterode) zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit jeweils 1 ml 1×PBS gewaschen und anschließend in 500 µl TNE-Puffer resuspendiert. Danach wurde dem Ansatz 20 µl 10%ige SDS-Lösung sowie 12,5 µl Proteinase K-Lösung zugegeben. Dieses Reaktionsgemisch wurde ü.N. bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert (Grant Instruments, Cambridge). Nach dem Proteinase K-Verdau wurde dem Ansatz 500 µl Phenol zur Entfernung von Zelltrümmern und Proteinen zugesetzt und die Emulsion für 15 min durch Schwenken durchmischt. Durch die nachfolgende Zentrifugation für 3 min bei 13000 rpm kam es zur Phasentrennung in eine obere, wässrige, DNA-haltige und eine untere, milchige, proteinhaltige Schicht. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 250 µl Phenol und 250 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Die Emulsion wurde erneut geschüttelt und zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß mit 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol zur Entfernung von Phenolrückständen versetzt. Nach Durchmischen und Zentrifugation wurde die obere, DNA-haltige Schicht in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde anschließend durch Zugabe von 0,1-fachen Volumen Natriumacetat und dem 2,5-fachen Volumen eiskaltem 100%igem Ethanol (-20°C) versetzt und für 1 h bei -20°C präzipitiert. Die gefällte DNA wurde bei 13000 rpm und 4°C für 30 min zentrifugiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde bei RT getrocknet und ü.N. in sterilem, bidestilliertem Wasser gelöst. Die gelöste DNA wurde bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 2.2.3.2.2 DNA-Isolierung aus Vollblut

Lösungen:

Lysispuffer	155 mM	NH <sub>4</sub> Cl
	10 mM	KHCO <sub>3</sub>
	0,1 mM	Na <sub>2</sub> EDTA
		pH-Wert 7,4

Zur Gewinnung der Referenz-DNA wurde Vollblut eines gesunden Probanden, das mit EDTA als Gerinnungshemmer versetzt wurde, verwendet. Es wurden 46 ml Lysispuffer zu 4 ml Vollblut in einem 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde nach mehrmaligem Schwenken in einem Eisbad für 15 min inkubiert. Anschließend wurde das Lysat für 15 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert (Sigma 2-16K, SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode). Das Kernsediment wurde durch vorsichtiges Abgießen der Flüssigkeit vom Überstand getrennt



und eventuell vorhandene Erythrozytenreste durch Auswischen mit einem sauberen Papiertuch entfernt. Das Kernsediment wurde zweimal mit 5 ml Lysispuffer gewaschen und anschließend in 6,5 ml TNE-Puffer resuspendiert. Dieses Gemisch wurde mit 350 µl 10%iger SDS-Lösung und mit 100 µl Proteinase K-Lösung versetzt und ü.N. bei 50-55°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Ab diesem Schritt erfolgte die DNA-Isolierung analog zur Phenol-Chloroform-Methode mit den entsprechenden Mengen an Chemikalien (2.2.3.2.1). Die gefällte DNA wurde in sterilem Aqua dest. bei 37°C gelöst und bei 4°C gelagert.

### 2.2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum der DNA. Der Reinheitsgrad der Probe wurde durch photometrische Messung bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, bestimmt. Die Grundabsorption wurde bei 310 nm gemessen. Der Reinheitsgrad der Probe wurde durch den Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  ermittelt, der einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 annehmen sollte. Abweichungen von diesem Wert weisen auf Verunreinigung des Isolates hin. Zur photometrischen Messung wurde eine Verdünnung von 5 µl DNA mit 100 µl Aqua dest. (Verdünnungsfaktor:  $VF = 20$ ) hergestellt und ein Leerwert mit 100 µl Aqua dest. eingesetzt. Die Messung im Photometer (Pharmacia) erfolgte in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm. Die Berechnung der DNA-Konzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$C_{DNA}[\mu\text{g/ml}] = 0,05 \times VF \times (A_{260} - A_{310})$$

$A_{260}$  = Absorptionsmaximum der DNA

$A_{280}$  = Absorptionsmaximum von aromatischen Aminosäuren

$A_{310}$  = Grundabsorption der Probe

0,05 = Extinktionskoeffizient der DNA bei 260 nm

VF = Verdünnungsfaktor

### 2.2.3.4 Nicktranslation

Die Markierung der Tumor- und Referenz-DNAs für die Hybridisierung erfolgte mit einer Nicktranslation. Bei der Nicktranslation wurden Einzelstrangbrüche mit einer DNase induziert und anschließend wurden Nukleotide in 5' → 3'-Richtung mit der DNA-Polymerase I abgebaut. Die entstandenen Lücken wurden danach mit der DNA-Polymerase in 3' → 5'-Richtung wieder ergänzt. Für die CGH erfolgte die Markierung über den Einbau der mit den Fluoreszenzfarbstoff-

fen SpectrumGreen-dUTP und SpectrumRed-dUTP modifizierten Nukleotide während der DNA-Polymerisation. Um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern, wurden die nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte möglichst unter Lichtausschluss auf Eis durchgeführt. Für die Nicktranslation wurde ein Reaktionskit verwendet (Vysis, Bergisch Gladbach).

Lösungen und Reagenzien:

dNTP Mix (0,1 mM)	100 µl	0,3 mM	dATP
	100 µl	0,3 mM	dCTP
	100 µl	0,3 mM	dGTP
dTTP (0,1mM)	100 µl	0,3 mM	dTTP
	200 µl	steriles Aqua dest.	

10×Nicktranslations-Puffer

SpectrumRed/SpectrumGreen-Stammlösung (1 mM)	50 nmol	SpectrumRed/Green-dUTP (lyophilisiert) (Vysis, Bergisch Gladbach)
	50 µl	steriles Aqua dest. Lagerung bei -20°C unter Lichtausschluss
SpectrumRed/SpectrumGreen-Gebrauchslösung (0,2 mM)	10 µl	SpectrumRed/Green-Stammlösung
	40µl	steriles Aqua dest.

Nicktranslationsenzyme

In Tabelle 2.1 ist die Zusammensetzung der Ansätze aufgeführt, die pro Nicktranslationsreaktion pipettiert wurden.

**Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Nicktranslation zur Markierung der Test- und Referenz-DNA.**

Reagenzien	Volumina	Endkonzentration
10×Nicktranslations-Puffer	5,0 µl	1×Nicktranslations-Puffer
dNTP-Mix	10,0 µl	0,02 mM (von jedem)
dTTP	5,0 µl	0,01 mM
DNA-Lösung	x µl	1,00 µg
SpectrumRed/SpectrumGreen	2,5 µl	0,01 mM
10×Nicktranslations-Enzyme	10,0 µl	1×Nicktranslation-Enzyme
Nuclease-freies Aqua dest.	ad 50,0 µl	--

Das Reaktionsgemisch wurde kurz gemischt und danach in einem Wasserbad bei 15°C inkubiert. Die Inkubationszeit lag je nach Länge der vorhandenen DNA-Fragmente zwischen 2 und 3 Stunden. Lag die DNA in einem hochmolekularen Zustand vor, verlängerte sich die Inkubationszeit, bei entsprechend fragmentierter DNA wurde eine kürzere Reaktionszeit gewählt. Zur Unterbrechung der Reaktion wurde der Ansatz auf Eis gelagert.

### 2.2.3.5 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Elektrophorese in Agarosegelen ist ein Standardverfahren zur Auftrennung von Nukleinsäuren. Nach dem Anlegen einer Spannung wandern die negativ geladene Nukleinsäuremoleküle vom negativen zum positiven Spannungspol. Die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld hängt von verschiedenen Faktoren ab. Lineare, doppelsträngige DNA-Moleküle bewegen sich durch die wie ein Molekularsieb wirkende Agarose-Matrix mit einer Geschwindigkeit, die invers proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist (Helling et al., 1974). Zudem hängt die Wanderung der DNA-Fragmente durch das Agarosegel von der Stromstärke, den Pufferbedingungen und der Agarosekonzentration des Gels ab.

Lösungen und Reagenzien:

1×TBE-Laufpuffer	0,1 M	Tris/HCl
	83 mM	Borsäure
	1 mM	EDTA
		pH-Wert 8,0
Gelladepuffer (10×)	20 mM	EDTA
	40 % (w/v)	Saccharose
	0,25 % (v/v)	Bromphenolblau
	0,25 % (v/v)	Xylencyanol
Ethidiumbromidlösung	1 g	EtBr
	ad 100 ml	1×TBE-Puffer

Die Nicktranslation wurde durch das Auftrennen der DNA-Fragmente in einem 1%igen Agarosegel überprüft, wobei die optimale Fragmentlänge zwischen 300 und 1000 bp liegen sollte. Für die Elektrophorese wurde die Agarose in der gewünschten Konzentration (1 %) in 1×TBE durch Erhitzen in Lösung gebracht. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 70°C, wurde

pro 1 ml Agaroselösung 0,1 µl einer 1%igen Ethidiumbromidlösung beigemischt. Die Agaroselösung wurde anschließend möglichst luftblasenfrei in eine Gelkammer mit entsprechendem Geltaschenkamm gegossen. Nach der Auspolymerisation des Gels und dem Entfernen des Kamms wurde der Gelträger in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt, die mit TBE-Laufpuffer bis ca. 1 mm über dem Gel befüllt wurde. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen Gelladepuffer versetzt und in die Probentaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese erfolgte je nach Agarosekonzentration, Größe des Gels und Zusammensetzung der Fragmente bei einer Feldstärke von 0,5 bis 5 V/cm. Durch das Interkalieren des Ethidiumbromids in die DNA wurde diese nach Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht. Die Auftrennung der DNA-Proben wurde mit einer Polaroid MP-4 Kamera (Polaroid GmbH, Offenbach) dokumentiert. Zur Fragmentlängenbestimmung nach der Nicktranslationsreaktion wurde ein Aliquot von 10 µl der Reaktionsansätze in der Elektrophorese eingesetzt. Der Molekulargewichtsstandard XIV (ROCHE, Mannheim) wurde als Längenstandard mit aufgetrennt. Bei ausreichender Fragmentlänge wurde der Nicktranslationsansatz zum Reaktionsabbruch bei 70 °C für 10 min erhitzt und danach sofort auf Eis gelagert, um die Renaturierung der DNA zu verhindern. Die markierte DNA wurde bis zum Gebrauch bei -20°C unter Lichtausschluss gelagert.

### 2.2.3.6 Herstellung der CGH-Sonde und Hybridisierung

Zur Herstellung der DNA-Sonden, die zur CGH eingesetzt werden sollten, wurden die mit SpectrumRed markierte Referenz- und die mit SpectrumGreen markierte Tumor-DNA unter dem Zusatz von Cot-1-DNA gefällt. Cot-1-DNA stellt eine Fraktion der gesamten genomischen DNA mit einem hohen Anteil an hochrepetitiven Sequenzen dar, die zur Signalunterdrückung in der Hybridisierung eingesetzt wurde.

Lösungen und Chemikalien:

Cot-1-DNA (Invitrogen, Karlsruhe) 1 mg/ml

Natriumacetat-Puffer	3 M	NaAc, pH-Wert 5,3
20×SSC-Puffer	3 M	NaCl
	300 mM	Na-Citrat, pH-Wert 5,3

Hybridisierungs-Puffer	20 % (w/v)	Dextransulfat (Sigma, Deisenhofen) in 4×SSC
Hybridisierungsmix	7,0 µl 3,5 µl	Hybridisierungs-Puffer deionisiertes Formamid
Denaturierungslösung	17,5 ml 2,5 ml 5,0 ml	Formamid 20×SSC Aqua dest. pH-Wert 7,0 Lagerung 7 Tage bei 4°C

Zur Fällung der Fluoreszenz-markierten DNA wurde der in Tabelle 2.2 aufgeführte Ansatz pipettiert.

**Tabelle 2.2: Reaktionsansatz zur Fällung der DNA für die Herstellung der CGH-Sonde.**

Reagenzien	Volumina	Menge
SpectrumGreen markierte Tumor-DNA	20 µl	400 ng
SpectrumRed markierte Referenz-DNA	20 µl	400 ng
Cot-1-DNA	20 µl	200 µg
Natriumacetat-Puffer	6 µl	0,1-faches Volumen
Ethanol (100%, -20°C)	165 µl	2,5-faches Volumen

Nach dem Durchmischen und kurzem Zentrifugieren wurde das Gemisch bei -70°C für 30 min inkubiert. Die präzipitierte DNA wurde anschließend für 30 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig - ohne das DNA-Pellet zu lösen - abpipettiert. Nach der Trocknung des Pellets bei RT wurde dieses in 10,5 µl Hybridisierungsmix resuspendiert und für 10 min bei 37°C gelöst. Die Hybridisierung der CGH-Sonde erfolgte auf Metaphasechromosomen eines gesunden Probanden. Die dazu hergestellten Präparate wurden zunächst für 3,5 min bei 73°C in eine Denaturierungslösung gegeben, anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70, 80 und 100%igem Ethanol (-20°C) für jeweils 2 min dehydriert und bis zum Abdampfen des Ethanols bei 50 bis 60 °C getrocknet. Zur Denaturierung der Sonde wurde die Probe für 5 min bei 72°C erhitzt und direkt auf den denaturierten Objektträger pipettiert. Die Hybridisierungsfläche wurde mit einem 18×18 mm großen Deckglas bedeckt. Die Ränder des Deckglases wurden mit einem elastischen Klebstoff (Fixogum Rubber

Cement, Marabuwerke, Tamm) versiegelt um das Verdunsten des Hybridisierungsgemisches zu verhindern. Der so präparierte Objektträger wurde für 3 Tage bei 37°C in einer abgedunkelten, feuchten Kammer inkubiert.

### 2.2.3.7 Detektion

Lösungen:

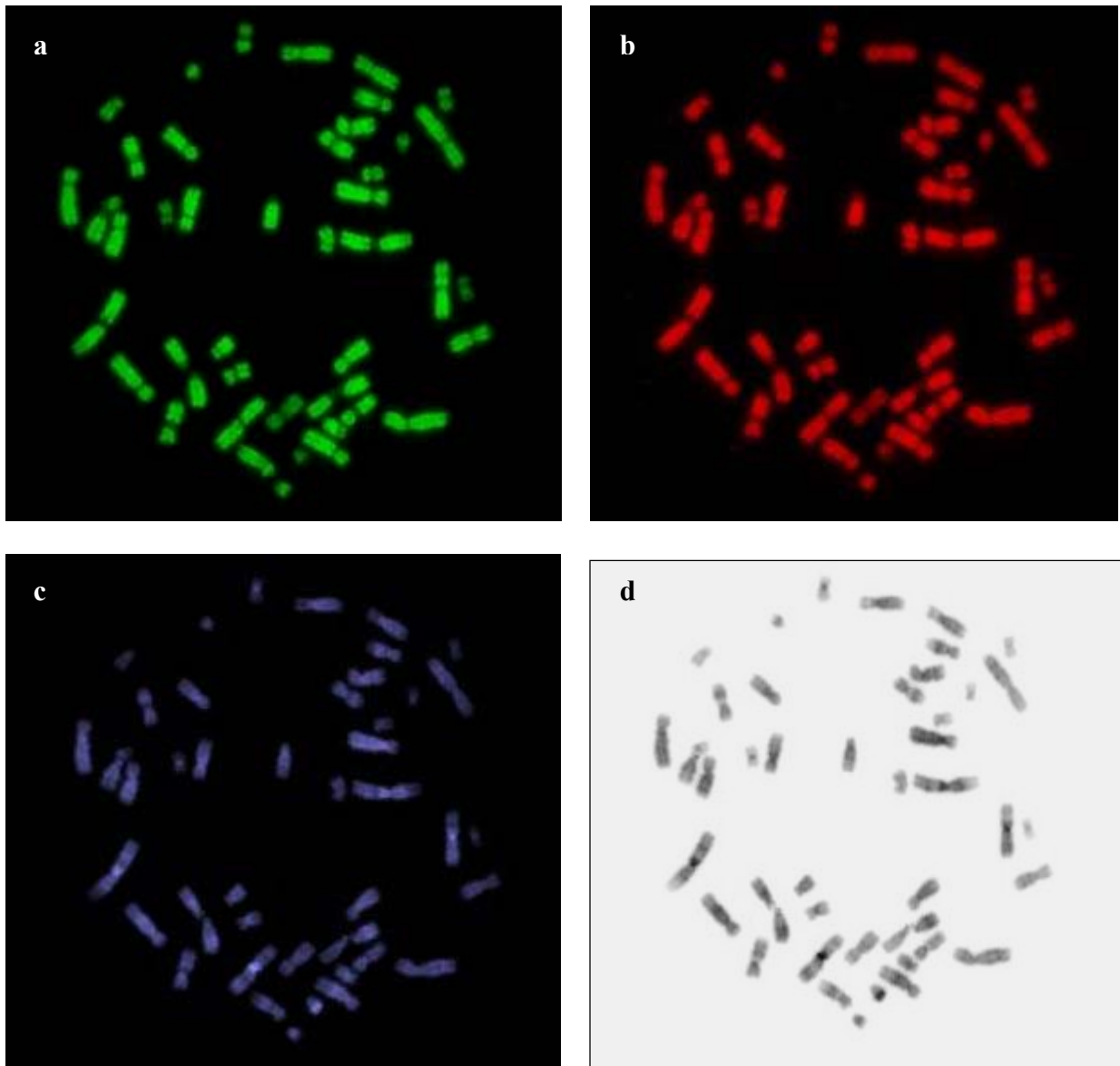
Waschlösung I	30 ml	0,4×SSC
	0,3 %	Nonidet P-40 (ROCHE, Karlsruhe)
Waschlösung II	30 ml	2×SSC
	0,1 %	Nonidet P-40 (ROCHE, Karlsruhe)
DAPI-Antifade	400 µl	DAPI(4,6-diamino-2-phenyl-indole)/ Antifade (0,1 µg/ml) (Oncor, Heidelberg)
	600 µl	Antifade (Oncor, Heidelberg) Lagerung bei -20°C

Am Ende der Hybridisierungszeit wurde das Fixogum und das Deckglas vorsichtig vom Objektträger entfernt. Danach wurde das Präparat in die Waschlösung I bei 73°C gegeben, 3 sec geschüttelt und für 2 min gewaschen. Anschließend wurde der Objektträger in die Waschlösung II bei RT gegeben, 3 sec geschüttelt und für 1 min gewaschen. Der Objektträger wurde unter Lichtausschluss für 20 min bei RT getrocknet. Zur Gegenfärbung der Zellkerne und zur Konservierung der Hybridisierungsfläche wurde zuletzt 10 µl DAPI-Antifade auf den Objektträger pipettiert und dieser mit einem 24×24 mm großen Deckglas eingedeckt.

### 2.2.3.8 Bildaufnahme und Verarbeitung

Zur Bildaufnahme wurde der mit DAPI-Antifade eingedeckte Objektträger unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Jena), das mit einer 100-W-Quecksilber-Dampflampe ausgestattet war, analysiert. Gut gespreitete Metaphasen wurden zunächst in einer 10×20-fachen Vergrößerung mit Hilfe eines DAPI-Filters ausgesucht und in der Vergrößerung 10×100 wurden pro Fall 10-15 Metaphasen aufgenommen. Von jeder Metaphase wurden drei monochrome Bilder entsprechend den Fluorochromen aufgenommen. Die Bildaufnahme erfolgte über eine mit dem Mikroskop verbundene gekühlte CCD-Kamera (*cooled charge-coupled device camera* JAM

M300, JAI Corporation, Japan). Es wurden die DAPI- (4,6-diamino-2-phenyl-indole), FITC- (Fluorescein-isothiocyanat) und TRITC- (Tetramethylrhodamin-isothiocyanat) Fluoreszenz-Signale jeweils separat als Graustufenbilder digital aufgenommen und gespeichert (Abbildung 2.1 a-c). Die digitale Bildauswertung erfolgte anhand eines speziellen CGH-Analyseprogramms (isis, MetaSystems, Althusheim). Die aufgenommenen Metaphasen wurden anhand des DAPI-Bildes karyotypisiert, wobei zur besseren Sichtbarmachung des Bandenmusters eine inverse Darstellung gewählt wurde (Abbildung 2.1 d).

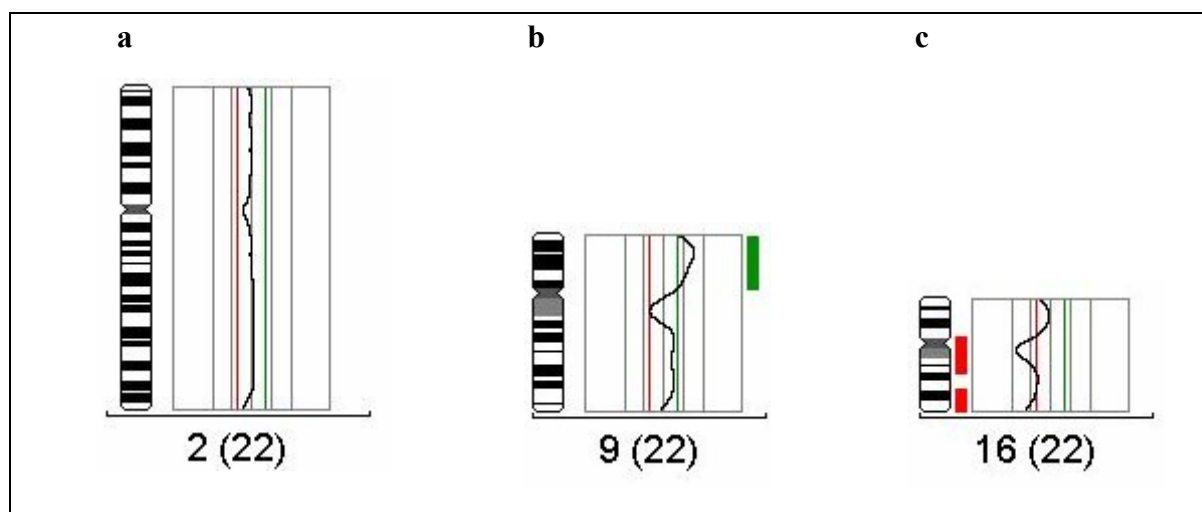


**Abbildung 2.1 a-d:** FITC- (a), TRITC- (b), DAPI- (c) und inverses DAPI-Bild (d) einer Metaphase in der CGH. Die Tumor-DNA wurde mit SpectrumGreen, die Referenz-DNA mit SpectrumRed markiert. Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI, anhand dessen ein inverses Graustufen-DAPI-Bild erstellt wurde, das die Identifizierung der Chromosomen ermöglichte.

### 2.2.3.9 Auswertung

Zur Auswertung der CGH-Daten wurden in Anlehnung an verschiedene Autoren folgende Kriterien berücksichtigt (Kallioniemi et al., 1994; du Manoir et al., 1995):

1. Bei der Evaluierung der genetischen Veränderungen wurde nach Identifizierung der Chromosomen für jede Metaphase ein Karyogramm erstellt.
2. Für die statistische Auswertung wurden pro Fall mindestens 10 Metaphasen analysiert. Aus diesen wurde anschließend ein Summen-Karyogramm errechnet.
3. Neben den Chromosomen-Ideogrammen sind die DNA-Veränderungen als Profile angegeben. Die einzelnen Profile müssen gleichmäßig verlaufen (Abbildung 2.2 a).
4. Die mittlere der drei Linien verdeutlicht das Gleichgewicht zwischen Tumor- und Referenz-DNA. Die linke (rote) bzw. rechte (grüne) Linie repräsentiert den theoretischen Wert für eine Mono- bzw. Trisomie in 50 % der Tumorzellen, wenn ein Schwellenwert von 0,75 bzw. 1,25 festgelegt wurde (Kallioniemi et al., 1994). Für die Auswertung in der vorliegenden Arbeit wurden die Schwellenwerte bei 0,85 und 1,17 definiert (Larramendy et al., 1998). Abbildung 2.2 a-c zeigt beispielhaft drei Profile mit und ohne Zugewinn bzw. Verlust von genetischem Material.



**Abbildung 2.2 a-c:** CGH-Profile der Chromosomen 2, 9 und 16. Das Profil von Chromosom 2 zeigt keinen Zugewinn/Verlust an, da das Profil entlang der Mittellinie (schwarz) verläuft. Chromosom 9 zeigt den Zugewinn von 9p, da das Profil die rechte Grenze (grün) überschreitet. Der grüne Balken kennzeichnet den Zugewinn in dieser Region. Chromosom 16 zeigt den Verlust von 16q, da das Profil die linke Grenze (rot) überschreitet. Der rote Balken kennzeichnet den Verlust in dieser Region.



5. Bei der Auswertung der Daten wurden folgende Chromosomenabschnitte nicht berücksichtigt: die Zentromere, die heterochromatinreichen kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen, die telomerischen Bereiche.
6. Als Kontrollexperiment wurden eine Referenz-DNA rot bzw. grün markiert und jeweils gegeneinander hybridisiert. Die daraus resultierenden Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten sollten für jedes Chromosom einen Näherungswert von 1 ergeben.

## 2.2.4 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

### 2.2.4.1 FISH mit kommerziellen DNA-Sonden

Es wurden folgende DNA-Sonden verwendet:

indirekt markierte, zentromerspezifische-Sonden (Oncor, Heidelberg):

DXZ1, DYZ3, D3Z1, D4Z1, D10Z1

indirekt markierte, telomerspezifische bzw. locusspezifische Sonden (Oncor, Heidelberg):

1p36, 1q44-1qter, 4ptel, 8ptel, 8q24, 12qtel, 19ptel

direkt markierte telomerspezifische bzw. locusspezifische Sonden (Oncor, Heidelberg):

BCR/ABL D-FISH™(9q34; 22q11), 19q13.1

direkt markierte locusspezifische Sonden (Vysis, Bergisch Gladbach):

LSI ALK DC (2p23), LSI BCL 6 DCBP (3q27), LSI EGR1 SO/D5S23 (5q31;5p15.2),  
 LSI D7S522 CEP7 (7q31;7p11.1), LSI ETO AML1 (8q22;21q22),  
 LSI 9p21 CEP-9 DC (9p21;9cen), LSI MLL DC (11q23), LSI IgH CCND1 (11q13;14q32.3),  
 LSI TEL/AML1 ES DC (12p13;21q22), LSI D13S319 (13q14.3), LSI IgH DCBP (14q32.2),  
 LSI IgH BCL2 (14q32.3;18q22), LSI PML RARA (15q22;17q21),  
 LSI CBFβ DC inv16 (16q22), LSI TNF217 (20q13.2)

Lösungen:

2×SSC-Puffer	100 ml	20×SSC
	ad 1000 ml	Aqua dest., pH-Wert 7,0
Denaturierungslösung	17,5 ml	Formamid
	2,5 ml	20×SSC
	5,0 ml	Aqua dest.
		pH-Wert 7,0; Lagerung 7 Tage bei 4°C

### **2.2.4.1.1 Vorbehandlung und Denaturierung der Präparate**

Für die FISH-Analysen wurden die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Kernsuspensionen aus der konventionellen zytogenetischen Analyse auf RT erwärmt und auf fettfreie, saubere Objektträger getropft. Nach 2-stündiger Trocknung der Präparate wurden diese in  $2\times\text{SSC}$  für 30 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  gegeben. Die Behandlung mit  $2\times\text{SSC}$ -Puffer diente der künstlichen Alterung der Präparate, da die Kerne und Chromosomen vor einer Überdenaturierung geschützt werden mussten. Anschließend wurden die Objektträger für jeweils 2 min in 70-, 80- und 100 %igem Ethanol (RT) dehydriert und bei RT getrocknet. Die gealterten Präparate wurden zunächst für 2 min bei  $70^{\circ}\text{C}$  in eine Denaturierungslösung gegeben, erneut in einer aufsteigenden Alkoholreihe von eiskaltem 70-, 80- und 100%igem Ethanol ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) für jeweils 2 min dehydriert und bis zum Abdampfen des Ethanols bei 50 bis  $60^{\circ}\text{C}$  getrocknet.

### **2.2.4.1.2 Hybridisierung und Auswertung**

Die Vorbehandlung, Hybridisierung und Detektion der kommerziell erhältlichen Sonden erfolgten nach Angaben der Hersteller.

Zur Auswertung der FISH wurde das mit DAPI-Antifade gegengefärbte Präparat unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Jena), das mit einer 100-W-Quecksilber-Dampflampe ausgestattet war, analysiert. Die Zellkerne wurden im DAPI-Filter aufgesucht und in der Vergrößerung  $10\times 100$  eingestellt. Pro Fall wurden mindestens 250 Zellkerne ausgewertet. Es wurden mittels eines FITC- bzw. TRITC-Fluoreszenzfilters die Anzahl der Fluoreszenzsignale pro Kern ermittelt.

## **2.2.4.2 FISH mit nicht kommerziellen DNA-Sonden**

### **2.2.4.2.1 Herstellung eigener Gensonden**

Nicht für alle Genloci, die zur Evaluation der CGH untersucht werden sollten, waren entsprechende Sonden kommerziell erhältlich. Zur Herstellung dieser DNA-Sonden wurden DNA-Sequenzen, die in YACs, BACs und PACs inkloniert wurden, verwendet. Die Herstellung der BACs/PACs, die zu Forschungszwecken zur Verfügung gestellt wurden, erfolgte in der Arbeitsgruppe von Dr. Mariano Rocchi an der Universität Bari in Italien. Die Herstellung der YACs erfolgte im *Centre d'Etude du Polymorphisme Humain* (CEPH) in Paris (Frankreich) und waren ebenfalls zu Forschungszwecken erhältlich.

**2.2.4.2.1.1 Anzucht von BACs und PACs**

Lösungen und Medien:

LB-Medium	10 g	Bacto-Tryptone (Difco, Detroit, USA)
(Luria-Bertani-Medium)	5 g	Bacto-Yeast-Extrakt (Difco, Detroit, USA)
	10 g	NaCl
	ad 1000 ml	Aqua dest.
		pH-Wert 7,0, autoklavieren
LB-Agar	1000 ml	LB-Medium
	15 g	Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA)
		autoklavieren
selektives LB-Medium	1000 ml	LB-Medium
	1 ml	Chloramphenicol-Stammlösung (BAC) bzw.
	5 ml	Kanamycin-Stammlösung (PAC)
Chloramphenicol- Stammlösung	12,5 g	Chloramphenicol (ROCHE, Mannheim)
	1 ml	100 % Ethanol (J.T.Baker, Deventer, NL)
		Lagerung bei -20°C
Kanamycin- Stammlösung	10 mg	Kanamycin (ROCHE, Mannheim)
	1 ml	Aqua dest.
		sterilfiltrieren
		Lagerung bei -20°C

Die BAC- und PAC-Klone wurden in Form von Agar-Stichkulturen versandt. Zur Anzucht der Klone wurden zunächst Vereinzelausstriche der BAC/PAC-Klone auf selektiven LB-Agarplatten hergestellt. Die BAC-Klone wurden mit einer sterilen Platinöse auf LB-Agarplatten, die Chloramphenicol in einer Konzentration von 12,5 µg/ml enthielten, ausgestrichen. Der Vereinzelausstrich der PAC-Klonen erfolgte auf Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten, die das Antibiotikum in einer Konzentration von 50 µg/ml enthielten. Die Agarplatten wurden ü.N. bei 37°C inkubiert. Zur Kultivierung der Klone wurden 5 ml selektives LB-Medium mit einer Einzelkolonie der Agarplatten beimpft. Diese Starterkultur wurde in einem Schüttler bei 37°C bis zur logarithmischen Wachstumsphase (~8 h) kultiviert. Zur Kultivierung wurden 250 ml selektives LB-Medium in 1l-Erlenmeyerkolben mit 1 ml der Starterkultur beimpft und für

12-16 h bis zu einer Zelldichte von  $4 \times 10^9$  Zellen/ml bei 37°C geschüttelt (250 rpm). Die Zellernte erfolgte durch Überführen der Kultur in 500 ml Zentrifugenbehälter und Zentrifugation bei 5000 rpm (Sorvall GSA, Beckmann) für 15 min bei 4°C.

#### 2.2.4.2.1.2 Isolierung von BAC- und PAC-DNA

Die Isolierung wurde mittels eines QIAGENE-Kits (*Large-Construct-Kit*, Qiagene, Hilden) für die Isolierung von genomischer DNA-freier BAC-, PAC-, P1- und Cosmid-DNA durchgeführt.

Puffer und Lösungen:

P1-Puffer (Resuspensionspuffer)	50 mM	Tris/HCl
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNaseA
		Lagerung bei 4°C
P2-Puffer (Lysispuffer)	200 mM	NaOH
	1 %	SDS
P3-Puffer (Neutralisierungspuffer)	3 M	Kaliumacetat, pH-Wert 5,5
QBT-Puffer (Equilibrierungspuffer)	750 mM	NaCl
	50 mM	MOPS
	15 %	Isopropanol
	15 %	Triton X-100
		pH-Wert 7,0
QC-Puffer (Waschpuffer)	1 M	NaCl
	50 mM	MOPS
	15 %	Isopropanol
		pH-Wert 7,0
QF-Puffer (Elutionspuffer)	1,25 M	NaCl
	50 mM	Tris/HCl
	15 %	Isopropanol
		pH-Wert 8,5

1×TE-Puffer	10 mM	Tris/HCl
	1 mM	EDTA
		pH-Wert 8,0

Der Überstand der zentrifugierten Kultur wurde vollständig dekantiert und das Zellpellet in 20 ml P1-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 2×10 ml Aliquots auf 50 ml Falcon-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Den Ansätzen wurde jeweils 10 ml P2-Puffer zugegeben und die Suspension durch 4- bis 6-maliges Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei RT bis das Lysat zähflüssig war. Nach Zugabe von jeweils 10 ml kaltem P3-Puffer (4°C) und 4- bis 6-maligem Mischen wurde der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Durch den Zusatz des P3-Puffers fiel weißes, flockiges Material aus, das genomische DNA, Proteine und Zelltrümmer enthielt. Nach der Zentrifugation bei 13000 rpm (Sigma 2-16K, SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode) und 4°C für 30 min wurde der Überstand, der die BAC/PAC-DNA enthält, dekantiert und durch einen mit Aqua dest. angefeuchteten Faltenfilter filtriert. Die Säule zur DNA-Isolierung/Reinigung (QUIAGEN-tip 500, Quiagen, Hilden) wurde mit 10 ml QBT-Puffer equilibriert. Der Equilibrierungspuffer sollte vollständig ablaufen. Die equilibrierte Säule wurde mit dem filtrierten Überstand beladen, wobei die BAC/PAC-DNA an die Säulen-matrix bindet. Nach 2-maligem Waschen der Säule mit 2×30 ml QC-Puffer wurde die DNA durch Zugabe von 15 ml warmen QF-Puffer (65°C) eluiert. Die DNA wurde durch den Zusatz von 10,5 ml (0,7-faches Volumen) Isopropanol bei RT zum Eluat präzipitiert. Nach dem Mischen wurde der Ansatz direkt bei 13000 rpm und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen. Das DNA-Pellet wurde mit 5 ml 70%igem Ethanol (RT) gewaschen und zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das DNA-Pellet für 10 min bei RT getrocknet und in 1×TE-Puffer gelöst.

#### 2.2.4.2.1.3 Anzucht von YACs

Medien:

YPD-Medium	10 g	Yeast-Extrakt (Difco, Detroit, USA)
	20 g	Bacto-Pepton (Difco, Detroit, USA)
		pH-Wert 7,8, autoklavieren
	20 g	D-Glucose (Merck, Darmstadt), sterilfiltrieren
YPD-Agar	1000 ml	YPD-Medium
	15 g	Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA)

Es wurde zunächst eine Kultur in 5 ml YPD-Medium angelegt und ü.N. bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert. Mit einer Platinimpföse wurden Vereinzlungsausstriche auf LB-Agarplatten angelegt und zwei Tage bei 30°C inkubiert. Zur Kultivierung wurden 100 ml YPD-Medium in einem 250 ml Erlenmeyerkolben -eine Schikane- mit einer Einzelkolonie beimpft und zwei Tage bei 30°C geschüttelt.

#### 2.2.4.2.1.4 Gesamt-DNA-Isolierung aus Hefezellen

Lösungen und Reagenzien:

Saline-EDTA	0,15 M	NaCl
	0,1 M	EDTA
		pH-Wert 8,0
10×TE-Puffer	0,33 M	Tris/HCl
	0,01 M	EDTA
		pH-Wert 7,5
1×TE mit Sorbitol		1×TE-Puffer
	164 g	Sorbitol
		pH-Wert 7,5
Lysozym	20 mg/ml	Lysozym (ROCHE, Mannheim)
Zell-Lysispuffer		1×TE-Puffer
	1 %	SDS
	100 µg/ml	Proteinase K

10 ml der Hefekulturen wurden in einem Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 2500 rpm (Sigma 2-16K, SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und das Zellpellet in 10 ml Saline-EDTA resuspendiert und anschließend erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 900 µl 1×TE-Puffer mit Sorbitol resuspendiert und 9 µl Lysozym zugegeben. Dieser Ansatz wurde bei 37°C für 2h unter ständigem Schütteln inkubiert. Die sphäroblastisierten Zellen wurden zentrifugiert und in 1 ml Zell-Lysispuffer für 3h oder ü.N. geschüttelt. Zu dem Lysat wurden 1 ml (1 Volumen) Phenol gegeben. Diese Emulsion wurde 15 min auf einem Schüttler (GFL, 3006, Burgwedel) gemischt und anschließend bei 3000 rpm

für 10 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit Ethanol (2.2.3.2.1) gefällt.

#### 2.2.4.2.1.5 Anlegen von Gefrierkulturen

700 µl der Starterkultur der YAC-Klone wurden unter sterilen Bedingungen mit 300 µl autoklavierten 100%igen Glycerin (Merck, Darmstadt) durch Vortexen vollständig gemischt und in luftdichte Kryogefäße überführt. Die Gefrierkulturen wurden bei -80°C gelagert.

850 µl der BAC und PAC Kulturen wurden mit 150 µl Glycerin gemischt und wie oben beschrieben eingefroren.

#### 2.2.4.2.1.6 ALU-PCR

Lösungen und Reagenzien:

Primer CL1/CL2-Stammlösung	200 µM	CL1/CL2 lyophilisiert (Biosource, Nivelles, Belgien) in nucleasefreiem sterilem Aqua dest. Lagerung bei -20°C
Primer CL1/CL2-Gebrauchslösung (20 µM)	10 µl ad 100 µl	Stammlösung Aqua dest. Lagerung bei -20°C
dNTP-Mix (ROCHE, Mannheim)	10 mM 10 mM 10 mM 10 mM ad 100 µl	dATP (100 mM) 10 µl dGTP (100 mM) 10 µl dCTP (100 mM) 10 µl dTTP (100 mM) 10 µl nucleasefreies steriles Aqua dest.
MgCl <sub>2</sub> -Puffer (AppliedBiosystems, Weiterstadt)	25 mM	MgCl <sub>2</sub>
Taq-Polymerase	5 U/ µl	AmpliTaq Gold Polymerase (AppliedBiosystems, Weiterstadt)

Zur weiteren Vermehrung der humanen Anteile der YAC, BAC und PAC Klone wurde die isolierte DNA in einer ALU-PCR amplifiziert. Es wurden Primer mit folgender Sequenz verwendet:

**CL1: 5' TCC CAA AGT GCT GGG ATT AC 3'**

**CL2: 5' CTG CAC TCC AGC CTG GG 3'**

In Tabelle 2.3 ist die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes aufgeführt, der für die ALU-PCR auf Eis pipettiert wurde.

**Tabelle 2.3: PCR-Reaktionsansatz der ALU-PCR zur Amplifikation humaner Sequenzen aus YAC-, BAC- und PAC-DNA.**

Reagenzien	Volumina	Endkonzentration
10×PCR-Puffer	5,0 µl	1×PCR-Puffer
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	8,0 µl	4,0 mM
dNTP-Mix	2,0 µl	10,0 mM (von jedem)
CL1-Primer (20 pmol/µl)	2,0 µl	0,8 µM
CL2-Primer (20 pmol/µl)	2,0 µl	0,8 µM
Nucleasefreies Aqua dest.	30,5 µl - Template	--
Taq-Polymerase	0,5 µl	0,05 U/µl
Template	1,0 - 2,0 µl	100 - 200 ng/50 µl

Zur Amplifikation in der ALU-PCR wurde die DNA eingesetzt, die aus dem Zellmaterial der YAC-, BAC- und PAC-Kulturen isoliert wurde. (2.2.4.2.1.2 / 2.2.4.2.1.4). Zur Vermehrung der humanen Anteile der DNA, wurden die Reaktionsansätze verschiedenen Temperaturzyklen ausgesetzt. Tabelle 2.4 stellt die Programmparameter der PCR-Reaktion dar.

**Tabelle 2.4: Programmparameter der ALU-PCR**

Reaktionsschritt	Temperatur in °C	Reaktionszeit in min
1. Denaturierung	96	4
2. Denaturierung	96	1
3. Hybridisierung	40	1
4. DNA-Synthese	72	3
Die Reaktionsschritte 2. bis 4. wurden 30-mal wiederholt		
5. Extensionsphase	72	5
6. Lagerung	4	bis zum Herausnehmen



Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel durchgeführt (Maxi-Cycler PTC 100, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf). Die Reaktionsansätze wurden nach Beendigung der Temperaturprogramme auf 4°C gekühlt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die PCR-Produkte bei 4°C gelagert.

Zur Kontrolle der Amplifikation in der ALU-PCR wurde ein Aliquot von 5 µl der Reaktionsansätze in einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch (2.2.3.5) aufgetrennt. Zur Bestimmung der Fragmentlänge wurde der Molekulargewichtsstandard XIV (ROCHE, Mannheim) mit aufgetrennt.

#### 2.2.4.2.1.7 DNA-Markierung

Reagenzien und Lösungen:

2,5×Random Primer Solution	125 mM	Tris/HCl, pH-Wert 6,8
	12,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	25 mM	2-Mercaptoethanol
	750 µg/ml	Oligodeoxyribonukleotide Primer
10×dNTP-Mix	1 mM	Biotin-14-dCTP
	1 mM	Biotin-14-dATP
	1 mM	Biotin-14-dGTP
	1 mM	Biotin-14-dTTP
		in Tris/HCl, pH-Wert 7,5
Klenow-Fragment	1 mM	EDTA
	40 U/µl	großes Fragment der DNA Polymerase I
	50 mM	in Kaliumacetat, pH-Wert 7,0
	100 mM	KCl
	1 mM	DTT
Stopp-Puffer	50 %	Glycerol
	0,5 M	EDTA, pH-Wert 8,0

Die Markierung der ALU-PCR-Produkte erfolgte mittels der Oligo-Prime-Markierungsmethode (Feinberg & Fogelstein, 1983) mit einem Markierungssystem der Firma Invitrogene (BioPrime-

DNA *labeling systems*, Invitogene GmbH, Karlsruhe). Für die Markierung wurde der in Tabelle 2.5 aufgeführte Reaktionsansatz pipettiert und entsprechend inkubiert.

**Tabelle 2.5: Reaktionsansatz zur Markierung humaner DNA-Anteile der YAC-, BAC- und PAC-Klone (ALU-PCR-Produkte).**

Reagenzien	Volumen
PCR-Produkt	5-10 µl (25-500 ng)
Aqua dest.	ad 24 µl
2,5×Random Primer Solution	20 µl
Lösung 5 min in einem kochenden Wasserbad denaturieren, auf Eis stellen; weitere Schritte auf Eis pipettieren	
10×dNTP-Mix	5 µl
Lösung kurz mischen	
Klenow-Fragment	1 µl
Lösung kurz mischen und zentrifugieren; Ansatz für 4-5 Stunden bei 37°C inkubieren	
Stopp-Puffer	5 µl

Nach der Zugabe des Stopp-Puffers wurde die Reaktion beendet und die Reaktionsprodukte mittels einer Agarosegelelektrophorese überprüft. Dazu wurde ein Aliquot von 5 µl mit Gelladepuffer gemischt und in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch (2.2.3.5) aufgetrennt. Die Fragmentlänge sollte nach ausreichender Reaktionszeit bei etwa 200 bp liegen.

Die markierte DNA wurde mit Ethanol gefällt und das Pellet in 50 µl Aqua dest. gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei -20°C gelagert.

#### 2.2.4.2.1.8 Aufreinigung der markierten DNA

Materialien und Puffer:

Sephadex G-50-Suspension	10 g	Sephadex G-50
(Pharmacia, Uppsala, Schweden)	ad 160 ml	Aqua dest.

30 min zum Quellen stehen lassen und anschließend bei 400 g für 4 min zentrifugieren. Der Überstand mit Schwebstoffen wurde dekantiert und die Zellulose mehrmals mit Aqua dest. gewaschen. Die Suspension wurde vor jedem Gebrauch geschüttelt.

Säulen-Puffer	10 mM	Tris/HCl, pH-Wert 8,0
	1 mM	EDTA
	0,1 %	SDS

Vor der Verwendung der DNA als FISH-Sonde musste diese gegebenenfalls aufgereinigt werden um das Auftreten eines zu hohen, unspezifischen Hintergrundes zu vermeiden. Dazu wurde die DNA mittels einer Sephadex-Säule gereinigt. Als Säule wurde eine 1 ml-Einwegspritze mit Glaswolle (Supelco, Bellefonte, PA, USA) bis ca. 0,1 ml und einer Sephadex-Suspension bis ca. 0,9 ml gefüllt. Diese Säule wurde dreimal mit jeweils 100 µl Säulen-Puffer gewaschen. Beim vierten Mal erfolgte das Waschen mit 100 µl Aqua dest. Anschließend wurde die zu reinigende Probe auf die Säule pipettiert, die dann für 5 min bei 2200 rpm (Sigma 2-16K, SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode) zentrifugiert wurde. Die gereinigte Probe wurde nochmals mit Ethanol gefällt, in 50 µl Aqua dest. gelöst und bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert.

#### 2.2.4.2.1.9 Herstellung der DNA-Sonde und Hybridisierung

Lösungen:

50 %-Mastermix	2,5 ml	Formamid
	1,25 ml	40 % Dextransulfat
	0,5 ml	20×SSC-Puffer
	ad 5 ml	Aqua dest.

Zur Herstellung der Sonde wurde zuerst humane Cot-1-DNA gefällt. Dazu wurden 100 µl (100 µg) Cot-1-DNA mit 10 µl 3 M NaAc und 300 µl 100%igem Ethanol versetzt. Zur vollständigen Fällung wurde die DNA bei -80°C für 30 min präzipitiert. Durch anschließende Zentrifugation für 30 min bei 13000 rpm und 4°C wurde die DNA pelletiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 9 µl 50 %-Mastermix aufgenommen.

Zur Hybridisierung wurde 1 µl markierte DNA (2.2.3.4) mit 9 µl gefällter Cot-1-DNA gemischt. Das Gemisch wurde kurz zentrifugiert. Die für die Hybridisierung verwendeten Präparate wurden wie unter 2.2.4.1.1 beschrieben vorbehandelt. 1,5 µl der Sonde wurden auf ein Deckglas (ø 12 mm) pipettiert, der Objektträger wurde angedrückt und der Deckglasrand mit Fixogum verschlossen. Das Präparat wurde anschließend für 7 min bei 75°C auf einer Heizplatte denaturiert und ü.N. in einer feuchten Kammer inkubiert.

### 2.2.4.2.1.10 Detektion und Auswertung

Lösungen:

0,1×SSC-Waschlösung	50 ml	2×SSC
	ad 1000 ml	Aqua dest.
		pH-Wert 7,0

Nach der Hybridisierung wurde das Deckglas vorsichtig vom Objektträger entfernt und dieser dreimal für 5 min in 0,1×SSC bei 60°C gewaschen. Danach wurde das Präparat in Tween-Waschlösung bei RT gegeben.

Die Detektion der mit Biotin markierten Sonden erfolgte mit dem Fluorescein-markierten Avidin/Anti-Avidin-System (Oncor, Heidelberg). Zur Gegenfärbung wurde DAPI-Antifade (Oncor, Heidelberg) eingesetzt.

Die Auswertung erfolgte wie für die kommerziell erhältlichen Sonden unter 2.2.4.1.2 beschrieben.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Klinische Parameter

Die Diagnosestellung und Stadieneinteilung der Patienten erfolgte nach den Kriterien von Salmon und Durie (Durie & Salmon, 1975). Es wurden insgesamt 116 Patienten mit MM in die Studie eingeschlossen, davon wurden 11 im Stadium I, 12 im Stadium II, 73 im Stadium IIIA und 4 im Stadium IIIB diagnostiziert. Bei 4 MM-Patienten lagen keine Angaben in Bezug auf das Erkrankungsstadium vor. Es wurden außerdem 6 MGUS und 4 PZL-Patienten untersucht (Tabelle 3.2).

Die im Rahmen der klinisch-chemischen Diagnostik erhobenen Parameter der Patienten sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Neben dem Altersmedian und dem Geschlecht wurde der Therapiestatus angegeben. Dieser bezeichnet ob die Knochenmarkpunktion zu einem Zeitpunkt erfolgte an dem der Patient bereits eine Chemotherapie erhalten hatte oder ob er noch unbehandelt war. Als weitere diagnostische Parameter wurden der Immunglobulin-Subtyp und die Mediane des Plasmazellanteils im Knochenmark (BMPC), der Laktatdehydrogenase (LDH), des Beta-2-Mikroglobulins ( $\beta$ 2-M), des C-reaktiven Proteins (CRP), des Kreatinins sowie des Kalziums angegeben. Die Bestimmung des BMPC erfolgte mikroskopisch an May-Grünwald-Giemsafärbten Knochenmarkausstrichen. Die LDH-,  $\beta$ 2-M-, CRP-, Kreatinin- und Kalzium-Bestimmung erfolgte aus dem Blutserum. Zum Zeitpunkt der zytogenetischen Untersuchung lagen nicht in jedem Fall alle klinischen Parameter vor. Unter „keine Angaben“ (k.A.) wurde die Anzahl der Patienten angegeben bei denen zum Zeitpunkt der Knochenmarkpunktion der entsprechende Parameter nicht bekannt war.

Die Auswertung der klinischen Daten erfolgte nicht unter statistischen Gesichtspunkten, da bei einem größeren Teil der Patienten nicht alle Parameter vorlagen. Die Aussagen im Zusammenhang mit diesen klinischen Daten sind daher unter dem Gesichtspunkt einer Tendenz zu sehen.

Die Normbereiche der Laborwerte wurden wie folgt definiert:

LDH:	< 240 U/l
$\beta$ 2-M:	0-2,0 mg/l
CRP:	< 0,5 mg/dl
Kreatinin:	< 1,4 mg/dl
Kalzium:	2,10-2,65 mmol/l

**Tabelle 3.1: Klinische Parameter der gesamten Patienten und in den verschiedenen Patientengruppen**

Klinische Parameter	Patienten gesamt	Patienten mit normalem Karyotyp	Patienten mit aberrantem Karyotyp	Patienten mit normalem CGH-Profil	Patienten mit Zugewin/Verlust in der CGH	Patienten mit del(13)	Patienten mit der(14)(q32)
Geschlecht: (m/w)	126 (78/48)	79 (53/26)	31 (19/12)	31 (22/9)	26 (16/10)	34 (22/12)	34 (18/16)
Altersmedian	60 (32-78)	56 (32-74)	63 (48-78)	56 (32-71)	56 (39-74)	57 (42-70)	57 (43-71)
Therapiestatus: vor	63	48	8	17	16	13	11
nach	61	29	23	14	9	20	13
k.A.	2	2			1	1	
BMPC [%]	45 (3-100)	38 (3-100)	56 (0-95)	23 (0-90)	45 (5-95)	65 (15-95)	62 (4-100)
k.A.	7	6		3	2	2	
LDH [U/l]	198 (88-656)	184 (88-525)	257 (121-656)	177 (103-375)	215 (88-525)	190 (93-382)	218 (88-656)
k.A.	37	24	11	8	8	11	9
β2-M [mg/l]	4,3 (0,7-64,0)	2,7 (0,7-12,3)	9,2 (1,8-64,0)	2,2 (0,7-8,1)	4,5 (1,5-13,0)	3,1* (0,7-5,9)	6,9* (1,4-64,0)
k.A.	57	36	17	15	11	17	12
CRP [mg/dl]	1,4 (<0,5-12,5)	1,4 (<0,5-12,5)	1,7 (<0,5-11,9)	1,5 (<0,5-12,5)	1,7 (<0,5-8,6)	0,9 (<0,5-3,2)	1,0 (<0,5-6,3)
k.A.	47	32	15	12	8	14	13
Kreatinin [mg/dl]	1,2 (0,7-4,0)	1,2 (0,7-3,5)	1,6 (0,8-4,5)	1,3 (0,7-3,5)	1,3 (0,8-3,2)	1,1 (0,8-1,7)	1,5 (0,8-4,0)
k.A.	35	21	12	8	7	12	11
Kalzium [mmol/l]	2,45 (1,66-4,1)	2,4 (1,82-3,15)	2,31 (1,66-3,5)	2,38 (2,03-2,72)	2,46 (2,02-3,15)	2,45 (1,82-2,72)	2,50 (2,06-4,1)
k.A.	37	23	12	8	7	13	9
Ig-Subtyp: IgAκ	13	10	2	2	1	4	4
IgAλ	9	2	6	1	1	5	2
IgGκ	58	38	13	13	15	16	16
IgGλ	22	11	7	6	5	6	7
L-Ketten	11	7	2	4	1	0	4
Sonstige	3	3	0	3	3	1	0
k.A.	10	8	1	2	0	2	1

m/w = männlich/weiblich; k.A. = keine Angaben; BMPC = Plasmazellanteil im Knochenmark; LDH = Laktatdehydrogenase; β2-M = β2-Mikroglobulin; CRP = C-reaktives Protein; L-Ketten = Leichtketten; \* Der Median für den β2-M-Spiegel lag bei den Patienten ohne del(13) bei 4,5 mg/l und bei den Patienten ohne 14q32-Aberration bei 2,6 mg/l.

### 3.2 Konventionelle Zytogenetik

#### 3.2.1 Ergebnisse der CC bei MM, MGUS und PZL

Die Karyotypisierung wurde sowohl an Metaphasen aus unstimulierten als auch aus stimulierten Kurzzeitkulturen durchgeführt. Im Rahmen der konventionellen zytogenetischen Analyse war in 87 % (110/126) der untersuchten Fälle eine Karyotypisierung möglich. Mittels GTG-Bänderung konnten in 28 % (31/110) der karyotypisierbaren Fälle klonale Chromosomenaberrationen nachgewiesen werden. Bei 72 % (79/110) der Patienten fand sich ein normaler Karyotyp. In Tabelle 3.2 sind die Daten der CC in Bezug auf das Auftreten von Karyotypveränderungen getrennt nach den einzelnen Erkrankungsgruppen aufgeführt.

**Tabelle 3.2: Resultate der CC in den einzelnen Erkrankungsgruppen**

Erkrankung	normaler Karyotyp	aberranter Karyotyp	kein Wachstum	gesamt
MM (gesamt)	77	25	14	<b>116</b>
Stadium I	7	2	2	11
Stadium II	9	1	2	12
Stadium IIIA	45	19	9	73
Stadium IIIB	11	4	1	16
Sonstige	3	1	0	4
MGUS	4	1	1	<b>6</b>
PZL	0	3	1	<b>4</b>
<b>gesamt</b>	<b>79</b>	<b>31</b>	<b>16</b>	<b>126</b>

Bei Patienten mit multiplen Myelom zeigte sich in 18 % (2/11) im Stadium I, 8 % (1/12) im Stadium II und in 26 % (23/89) im Stadium III ein aberranter Karyotyp. Bei Patienten mit einer PZL fanden sich in 100 % (3/3) Veränderungen im Karyotyp. Die Fälle mit MGUS zeigten in 16 % (1/6) Karyotypveränderungen. Die mit „Sonstige“ bezeichneten Fälle beinhalten drei MM ohne Stadieneinteilung und ein solitäres Plasmozytom (Fall Nr. 1524).

Bei Patienten die im Vorfeld der zytogenetischen Analyse keine Chemotherapie erhalten hatten, fanden sich in 14 % (8/56) klonale Veränderungen. In der Gruppe der Patienten die zum Zeitpunkt der zytogenetischen Analyse bereits eine Chemotherapie erhalten hatten, zeigte sich in 43 % (23/53) der analysierten Fälle ein veränderter Karyotyp. Die Tabelle 3.3 gibt einen Überblick über alle aberranten Karyotypen die im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert wurden. Die Beschreibung der Karyotypen erfolgte nach dem Internationalen System für Humanzytogenetische Nomenklatur (ISCN, 1995).

Bei 13 % (4/31) der Fälle mit aberrantem Karyotyp zeigten sich strukturelle Aberrationen als alleinige Veränderungen. Bei 16 % (5/31) der veränderten Karyotypen lagen nur numerische Aberrationen, d.h. Zugewinn oder Verlust ganzer Chromosomen vor. 71 % (22/31) der aberranten Karyotypen waren sowohl durch strukturelle als auch durch numerische Aberrationen gekennzeichnet. Hyperdiploide Karyotypen fanden sich in 35 % (11/31) der Fälle mit aberrantem Karyotyp. Hypodiploidien und Pseudodiploidien wurden in 39 % (12/31) bzw. in 26 % (8/31) der Patienten mit Chromosomenveränderungen beobachtet. Bei den hypodiploiden Karyotypen lag bei 16 % (5/31) die Chromosomenzahl mit 40 bis 44 deutlich unter 46 Chromosomen.

Ein komplexer Karyotyp, d.h. drei oder mehr Aberrationen, wurde in 61 % (19/31) der Fälle mit zytogenetischen Aberrationen festgestellt. Bei 39 % (12/31) der Patienten ergab sich ein Karyotyp mit ein oder höchstens zwei Aberrationen. Bei 42 % (13/31) der aberranten Karyotypen traten ein oder mehrere Markerchromosomen auf, d.h. Chromosomen deren Herkunft nicht näher charakterisiert werden konnte.

Die Chromosomen 1, 16, 11, 8, 9, 14, 13 und 15 waren am häufigsten von numerischen und strukturellen Aberrationen betroffen. Besonders häufig waren der kurze und der lange Arm von Chromosom 1 an strukturellen Veränderungen beteiligt. Trisomien zeigten sich vermehrt bei den Chromosomen 9, 11, 3, 7 und 15. Monosomien betrafen besonders oft die Chromosomen 13, 16, 8 und 22. Die Aufzählung der veränderten Chromosomen erfolgte mit abnehmender Häufigkeit.



**Tabelle 3.3: Aberrante Karyotypen aller Patienten nach der ISCN-Nomenklatur (ISCN, 1995).**

Patient Nr.	Alter	Erkrankung	Therapie-status	BMPC %	Karyotyp
130	51	MM IIIA	nach	5	47,XY,del(22)(q1?3),+mar[7]/46,XY[13]
238	66	MM IIIB	nach	85	41~42,X,-X,del(1)(p11p32),del(4)(q31),add(6)(q27),add(8)(p23),-9,del(11)(q23),del(12)(q11q15),-13,-14,add(15)(p13),-15,-16,-18,-22,+mar[cp9]/46,XX[7]
319	57	MM I	vor	15	45,X,-Y[3]/46,XY[16]
320	60	MM IIIA	nach	20	46,XY,del(7)(q3?3),der(11)t(7;11)(q3?3;p15),+11,-12,-14,+mar[5]/46,XY[15]
336	71	MM IIIA	nach	60	42,XX,der(X),der(2),der(4),-6,-8,-10,der(12),-15,der(16),der(17),-18,+mar1,+mar2[2]/46,XX[14]
425	55	MM IIIA	nach	4	46,XX,del(17)(p11)[3]/46,XX[18]
478	48	MM IIIA	nach	90	90~95,XX,YY,+der(1)del(1)(p31)x2,+2x2,+3x2,+4x2,+5x2,+del(6)(q21)x2,+7x2,+8x2,der(9),+10x2,+11x2,+12x2,+13x2,+add(14)(q32)x2,+15x2,+der(16),+17x2,+add(18)(q23)x2,+19x2,+20x2,+add(21)(p13),+22x2,+mar1x2,+mar2x2,+mar3x2[3]/46,XY,del(1)(p31),del(6)(q21),add(14)(q32),der(15)(q?),der(16)(q?),add(18)(q23),add(22)(p13),-22,+mar1[4]/46,XY[13]
498	58	MM IIIA	nach	70	46,XX,der(7)t(7;7)(q36;p1?5)del(7)(p1?3p1?5),del(21)(q22)[12]/46,XX[8]
521	48	PZL	vor	95	44,X,der(X)t(X;8;4)(p10;q10q24;q31),+der(1)t(1;16)(q10;p11),del(4)(q31),-8,-13,ins(13;?),-16,t(16;19)(q2?4;?)[14]/46,XX[3]
540	58	MM IIIB	nach	95	51,X-X,+2,+3,-4,+8x2,+9,+12,-13,add(14)(p1?1),-15,+20,+mar1,+mar2[7]46,XX[3]
685	61	MM IIIA	nach	45	46,XY,der(7)ins(7;14)(q11.2;q12q22)del(7)(q11.2q21)t(7;?)(q22;?),der(11)t(11;?)(p15;q?),der(11)t(11;?),+11,-12,del(14)(q12)[3]/46,idem,der(1)t(1;11)(q22;q13),del(5)(q13q33),der(17),der(18)t(1;18)(q22;p11)[6]/46,XY[7]
694	57	MM IIIA	nach	85	47,XY,+mar[2]/46,XY[8]
753	64	MM IIIA	nach	60	45,X,-Y,t(1;16)(q32;p13)[8]/46,XY[12]
804	63	MM IIIA	nach	50	45,X,-Y,[1]/46,XY[1]
1006	49	MM IIIA	nach	95	46,XY,-1,der(1),+der(3),der(5),der(6),-7,-9,-11,-13,+der(18),der(19),+mar1,+mar2,+mar3[12]/46,XY[8]
1017	57	MM IIIA	nach	10	41~43,XY,der(1)t(1;?)(q22;?),t(2;4)(q35;q35),-3,del(5)(q13q33),der(7)ins(7;14)(q11.2;q12q22)del(7)(q11.2q21)t(7;?)(q22;?),der(11)t(11;?)(q10;?),-12,-13,del(14)(q12),add(15)(p12),+der(16)add(16)(q24),-16,-17,del(17)(p12),der(18)t(1;18)(q22;p11),add(19)(q13),-21,+mar1,+mar2[cp16]/46,XY[2]
1081	78	MGUS	vor	10	47,XY,+22[3]/46,XY[17]

Tabelle 3.3: Fortsetzung Seite 62

Patient Nr.	Alter	Erkrankung	Therapie-status	BMPC %	Karyotyp
1100	62	MM IIIA	vor	95	45,X,-X,-2,+der(3)(p?),-7,-11,+add(14)(q32.3),-17,add(19)(q13.5),+mar1,+mar2[5]/46,XX[15]
1119	66	PZL	nach	35	46,XX,der(14)t(8;14)(q24;q32),der(14)del(14)(q32),der(15)t(1;15)(q25;q2?5),der(16)t(15;16)(q2?5;q24)[16]/45,idem,-X,der(1)t(X;1)(?;p3?4),+der(2),-5[2]
1215	70	MM IIIA	nach	50	53~54,XX,+der(1),+3,+4,+der(7)t(7;?)(q32;?),der(8),+9,+11,der(13)t(9;13)(?;q10),+15,der(16),der(17),+21x2,-22[cp5]/46,XX[15]
1422	57	MM II	vor	85	46,XY,del(13)(q32)[6]/46,XY[23]
1464	61	MM IIIA	nach	90	46,X,der(Y)[19]/46,XY[1]
1524	58	MM	nach	4	47,XX,+15[2]/46,XX[18]
1535	50	PZL	nach	90	48~51,X,-X,+der(X)t(X;8;4)(p10;q10q24;q31)del(X)(q10)x2,+der(1)t(1;16)(q10;p11),der(2)t(2;5)(q32;q13),del(4)(q31),+der(4)t(4;8)(p10;?),der(5)t(5;11)(q13;?),der(6;14)(q10;q10),add(6)(q24),+7x2,-8,-9,+der(11)t(11;11)(p15;q21),+der(12),-13,ins(13;?),+15,der(16)t(16;19)(q24;?),der(16)t(16;20)(q?;?),+18,+20,-21,t(22;22)(q10;q10)[cp14]/46,XX[5]
1558	50	MM I	nach	0	45,X,-Y[4]/46,XY[16]
1581	65	MM IIIA	nach	50	45,X,-Y,t(1;16)(q32;p13)[3]/45,XY,dic(11;15)(q25;p11)[2]/46,XY[15]
1848	62	MM IIIA	vor	30	46,X,-Y,+5,+9,+11,-16,+19,+mar[4]/46,XY[16]
1973	58	MM IIIB	vor	50	44~45,X,-X,der(1),der(1),+der(1)t(1;?)(p11;?),del(1)(q23),del(2)(p13),add(3)(p26),del(3)(p13),+6,-8x2,del(9)(p13),del(11)(q21q23),add(13)(q34),add(14)(q?)x2,der(16)t(16;?),del(17)(p11.1),del(18)(p11),add(18)(q22.3),-20,-21,+21,+mar1,+mar2[cp7]/46,XX[13]
2284	71	MM IIIB	vor	90	55,XX,+3,+4,+5,+6,+7,+9,+17,+19,-22,+mar1,+mar2[5]/46,XX[15]
2362	78	MM IIIA	nach	70	53~55,X,-Y,t(1;18)(q10;q10)x2,t(1;18)(p10;p10),+3,+5,+der(5)t(X;5)(q11;?)del(5)(q11);t(6;8;9)(p2?3;q24;q22),+7,-8,+9,del(9)(q22),+11x2,dic(8;12;8;12)(p23q10;q10q1?3;?,q21q24),+17,+der(19)t(X;19)(?;q13),+21x2[cp14]/46,XY[6]
2505	68	MM IIIA	nach	90	50~51,XY,+t(1;16)(q10;p10),+5,+7,der(8)t(8;?20)(p23;p11),+9x2,der(10)t(10;?20)(p1?4;q1?2),-13,-14,+15,-16,+17,der(19),del(20)(q11),+der(?)t(?;20)(?;p11),+mar1,+mar2,+mar3[cp19]/46,XY[1]

Veränderungen der Chromosomen 1, 13 und 14 traten besonders häufig auf. Chromosom-1-Aberrationen wurden bei 45 % (14/31), Chromosom-13-Aberrationen bei 32 % (10/31) und Chromosom-14-Aberrationen ebenfalls bei 32 % (10/31) der Patienten mit aberrantem Karyotyp festgestellt. In Tabelle 3.4 ist eine Übersicht der charakterisierten Aberrationen die Chromosom 1, 13 und 14 betrafen dargestellt.

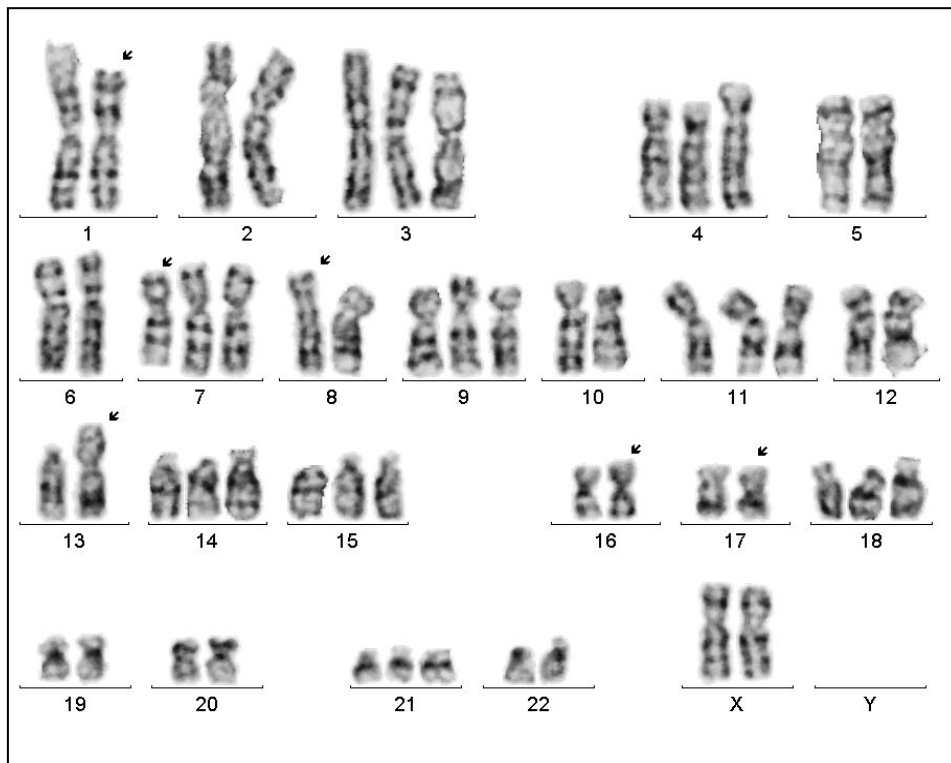
**Tabelle 3.4: Chromosom 1-, 13- und 14-Aberrationen bei Myelompatienten.**

Chromosom 1	Chromosom 13	Chromosom 14
del(1)(p11q32)	-13	-14
+der(1)del(1)(p31)×2	+13×2	-14
+der(1)t(1;16)(q10;p11)	-13,ins(13;?)	+der(14)add(14)(q32)×2
t(1;16)(q32;p13)	-13	der(14)add(14)(p1?1)
-1,der(1)	-13	der(7)ins(7;14)(p11.2;q12q22)
der(1)t(1;11)(q22;q13)	-13	der(14)del(14)(q12)
der(1)	der(13)t(9;13)(?;q10)	+der(14)add(14)(q32.3)
der(1)t(1;?)(q22;?)	del(13)(q32)	der(14)t(8;14)(q24;q32)
der(1)t(X;1)(?;p3?4)	der(13)add(13)(q34)	der(14)del(14)(q32)
+der(1)	+13	der(14)t(6;14)(q10;q10)
der(1)t(1;?)(p11;?)	-13	der(14)add(14)(q?)
del(1)(q23)		-14
t(1;18)(q10;q10)		
t(1;18)(p10;p10)		
+t(1;16)(q10;p10)		

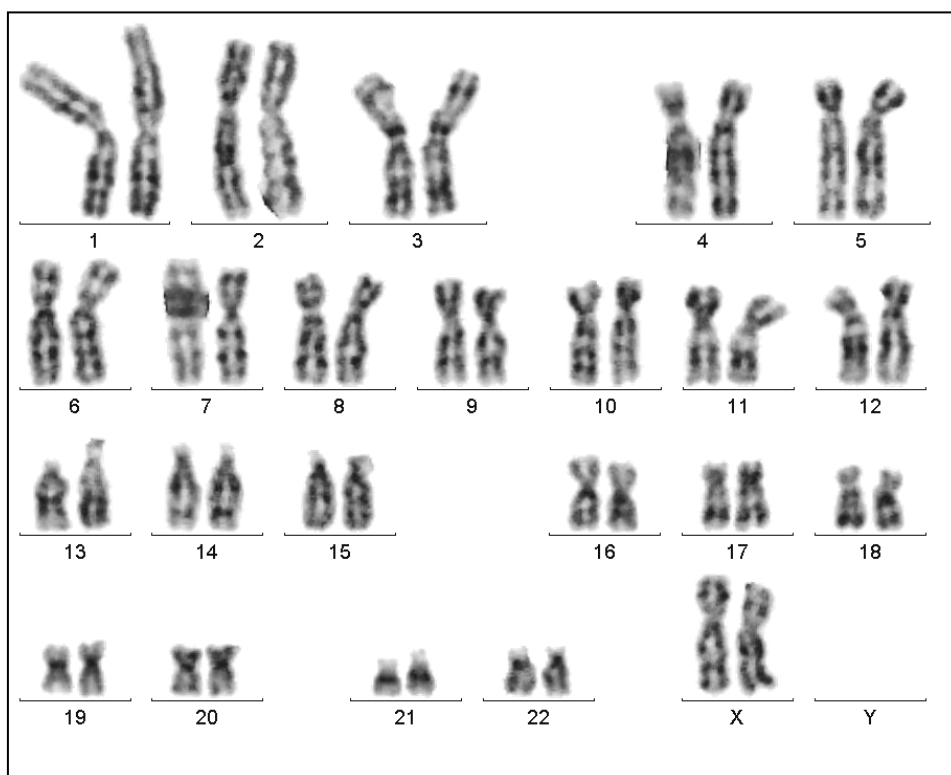
Abbildung 3.1 zeigt einen weiblichen, hyperdiploiden Chromosomensatz einer Patientin mit MM nach GTG-Bänderung mit komplexen Aberrationen. Es lag bei dieser Patientin eine Trisomie der Chromosomen 4, 9, 11, 14, 15, 18 und 21 vor. Strukturelle Aberrationen wurden mit Pfeilen gekennzeichnet und betrafen die Chromosomen 1, 7, 8, 13, 16 und 17. Der Karyotyp nach der ISCN-Nomenklatur lautete:

54,XX,+der(1)t(1;?)(p21;?),+3,+4,+der(7)t(7;?)(q32;?),der(8),+9,+11,der(13)  
t(9;13)(?;q10),+14,+15,der(16),der(17)inv(17)(q24q21),+18,+21

Abbildung 3.2 zeigt ein Karyogramm einer MM-Patientin ohne zytogenetische Aberrationen. Der Karyotyp nach der ISCN-Nomenklatur lautete: 46,XX.



**Abbildung 3.1:** Hyperdiploider, komplex veränderter Chromosomensatz einer Patientin mit multiplem Myelom nach der GTG-Bänderungsanalyse. Die strukturell veränderten Chromosomen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

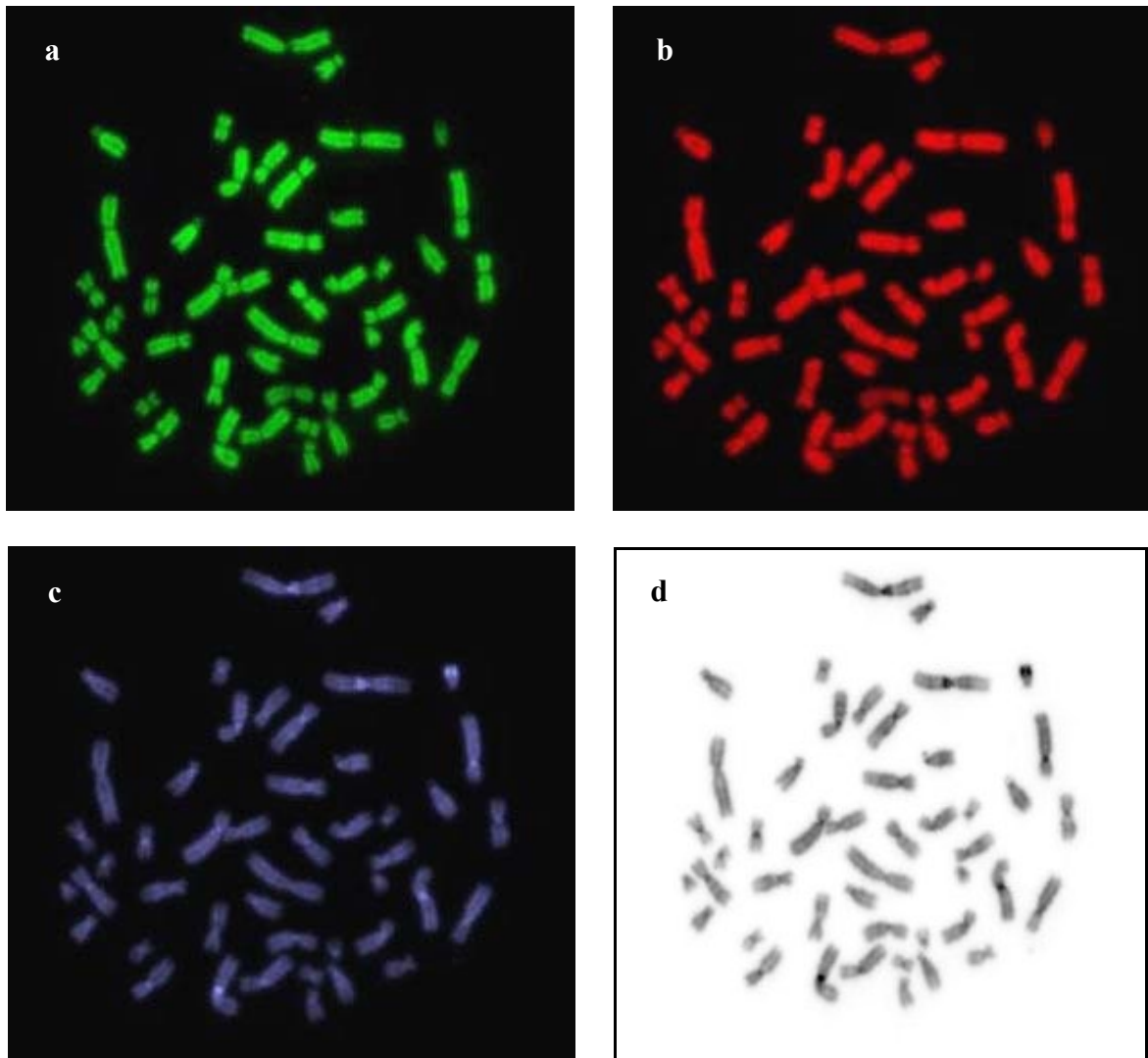


**Abbildung 3.2:** Normaler Chromosomensatz einer Patientin mit multiplem Myelom nach der GTG-Bänderungsanalyse.

### 3.3 CGH

Die comparative genomische Hybridisierung (CGH) wurde in 57 von 126 Fällen durchgeführt. Von diesen 57 wurden 53 Fälle anhand der GTG-Bänderung erfolgreich analysiert.

#### 3.3.1 CGH eines Patienten mit Veränderungen

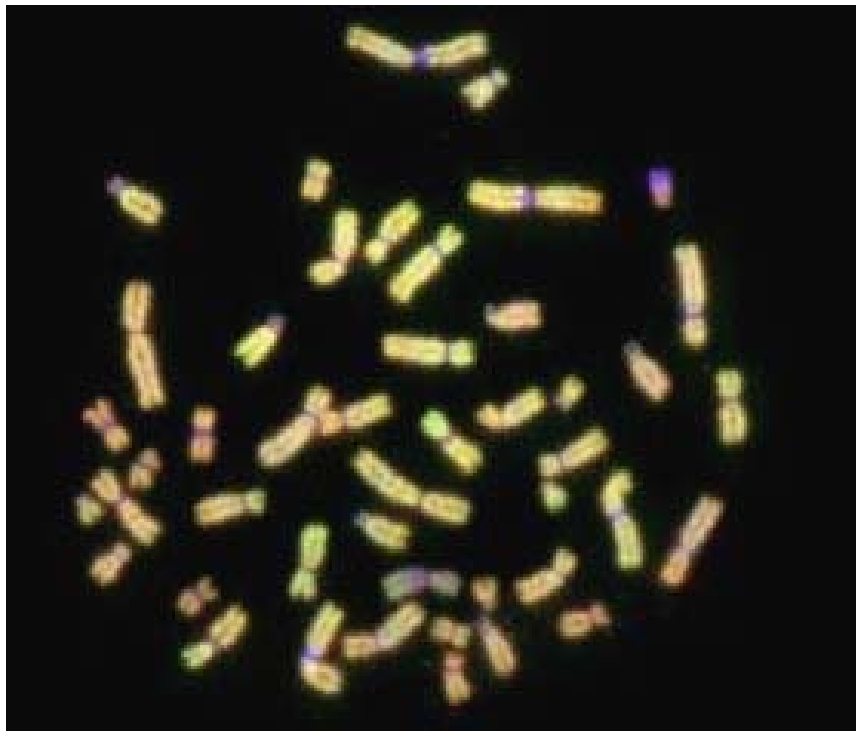


**Abbildung 3.3 a-d:** FITC- (a), TRITC- (b), DAPI- (c) und inverses DAPI-Bild (d) einer Metaphase eines veränderten Falls in der CGH. Die Tumor-DNA wurde mit SpectrumGreen, die Referenz-DNA mit SpectrumRed markiert. Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI, anhand dessen ein inverses Graustufen-DAPI-Bild erstellt wurde, das die Identifizierung der Chromosomen ermöglichte.

Die digitalen Bildaufnahmen der verschiedenen Farbkanäle einer Metaphase eines Falls mit Zugewinn und/oder Verlust von genetischem Material sind in Abbildung 3.3 dargestellt. Das FITC-Bild eines veränderten Falls zeigt Abbildung 3.3a wobei die SpectrumGreen-Färbung die Tumor-DNA repräsentiert. Das TRITC-Bild eines veränderten Falls wobei die Referenz-DNA mit

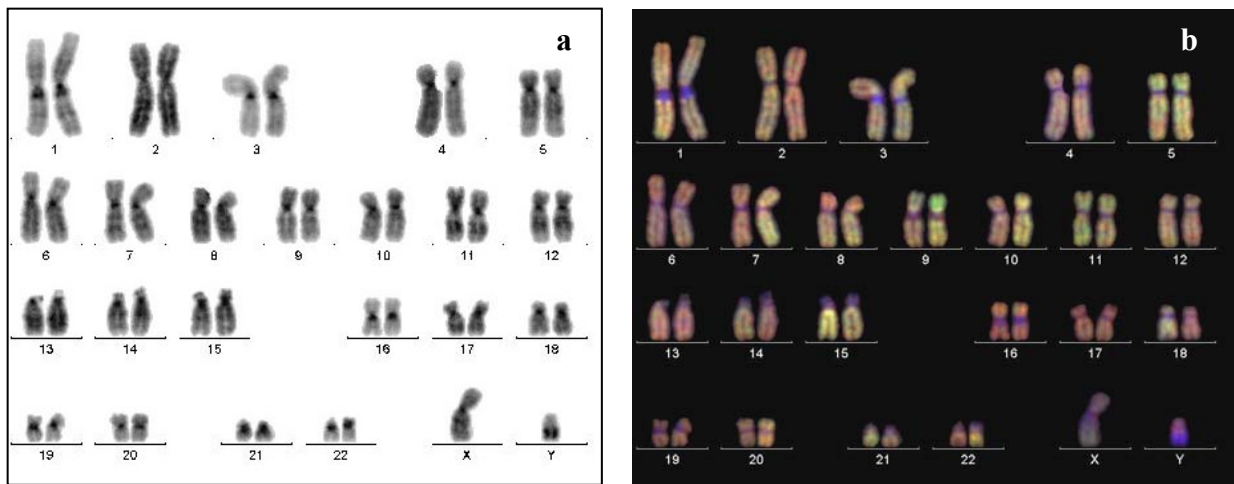
SpectrumRed markiert wurde, ist in Abbildung 3.3b dargestellt. Abbildung 3.3c zeigt die Bildaufnahme der Metaphase nach einer Gegenfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI, anhand dessen ein inverses Graustufenbild der Metaphasen erstellt wurde. Das inverse DAPI-Bild zeigt Abbildung 3.3d.

Die drei Fluoreszenz-Bilder der verschiedenen Farbkanäle eines veränderten Falls wurden übereinander gelagert und es entstand ein Dreifarben-Bild. Abbildung 3.4 zeigt dieselbe Metaphase wie in Abbildung 3.4 in der Dreifarben-Darstellung. Die Überlagerung der verschiedenen Fluoreszenzfarben ergab bei Regionen mit Zugewinn oder Verlust von genetischem Material eine ungleichmäßige Verteilung der Fluoreszenzfärbung. Zugewinne von genetischem Material erschienen im Dreifarbenbild stärker grün und Verluste äußerten sich in einer stärkeren Rotfärbung der veränderten chromosomalen Regionen.



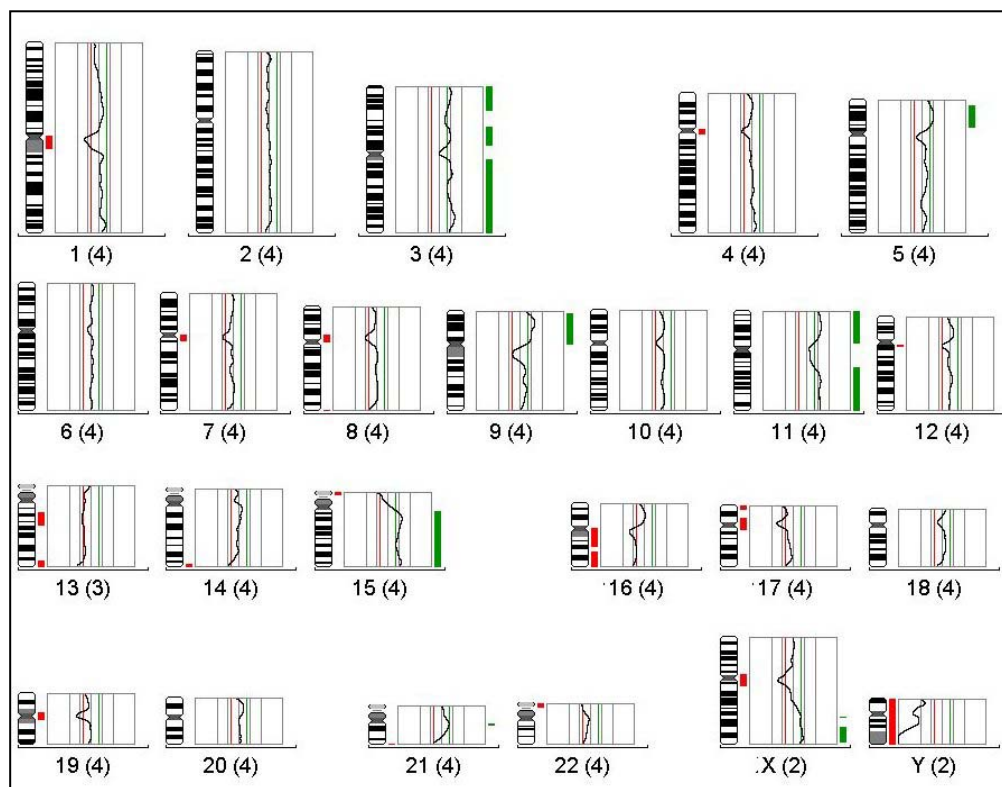
**Abbildung 3.4: Dreifarben-Bild einer Metaphase eines Falls mit multiplen Veränderungen in der CGH. Der Zugewinn bzw. der Verlust von genetischem Material erscheint stärker grün bzw. rot.**

Zur Auswertung der CGH erfolgte zunächst die Karyotypisierung der ausgewählten Metaphasen. Es wurde die DAPI-Bänderung anhand des Graustufen-Bildes identifiziert und zur Klassifizierung der Chromosomen herangezogen. Abbildung 3.5 zeigt das Karyogramm der inversen DAPI-Bänderung eines veränderten Falls (a) und das zum Inversen-DAPI-Bild entsprechende Dreifarben-Karyogramm (b).



**Abbildung 3.5 a-b:** (a) Inverses DAPI-Karyogramm eines veränderten Falls in der CGH. Anhand der inversen Bänderung wurde die Karyotypisierung der Chromosomen durchgeführt. (b) Entsprechendes Dreifarben-Karyogramm.

Aus den karyotypisierten Metaphasen wurde für jeden Fall ein Summen-Karyogramm errechnet, das in einem Profil dargestellt wurde. Ein Beispiel für einen Fall mit multiplen Veränderungen zeigt Abbildung 3.6.



**Abbildung 3.6:** CGH-Profil eines veränderten Falls. Das Profil errechnet sich aus einem Summenkaryogramm der analysierten Metaphasen und stellt den Mittelwert aus den Verhältnissen der Fluoreszenzintensitäten dar. Die schwarze, mittlere Linie repräsentiert ein ausgeglichenes Verhältnis mit einem Wert von 1,0, die linke rote Linie den Verlust von chromosomalem Material mit einem Schwellenwert von 0,85 und die rechte grüne Linie den Zugewinn von chromosomalem Material mit einem Schwellenwert von 1,7.

Neben den Chromosomenideogrammen wurden die DNA-Veränderungen als Profile angegeben. Detektiert wurde ein Zugewinn von genetischem Material der Chromosom/-regionen Xq, 3, 5p, 9p, 11, 15 und 21. Verluste von genetischem Material wurden für die Chromosomen/-regionen 13, 16q und 17p angezeigt. Die Telomer- und Zentromer-Bereiche sowie das Y-Chromosom wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

### 3.3.2 Ausschluss von Artefakten

Bei der Hybridisierung von Tumor- gegen Referenz-DNA traten in einigen Fällen Artefakte der CGH-Methode auf, die nach Kontrollanalysen mittels der FISH als solche identifiziert werden konnten. In einigen Fällen traten die Artefakte nach erneuter Hybridisierung nicht mehr, oder nur noch in geringem Maße auf. Falsch-positive Ergebnisse betrafen besonders häufig den Zugewinn der Chromosomen/-regionen 2q21-q32, 3q13.1-q13.3, 4, 5p, 5q21-q23, 6q, 7p15-p21, 7q21-31, 9, 13q und 18q. Verluste, die als Artefakte beobachtet wurden, betrafen die Chromosomen/-regionen 1p33-pter, 16, 17, 19, 20q und 22. Bei der Auswertung der CGH wurden die Artefakte der Methode nicht berücksichtigt.

### 3.3.3 Ergebnisse der CGH bei Patienten mit MM/MGUS

Nach Auswertung von mindestens 10 Metaphasen und der Errechnung eines Summenkaryogramms wurden in 46 % (26/57) der untersuchten Fälle chromosomale Imbalancen, d.h. Zugewinne und/oder Verluste von genetischem Material, festgestellt. Es wurden nur Aberrationen mit einbezogen, die mit der FISH bestätigt worden waren. Bei 54 % (31/57) der untersuchten Fälle wurden keine chromosomalen Imbalancen festgestellt. Die CGH-Ergebnisse sind schematisch in Abbildung 3.7 zusammengefasst. Jede vertikale Linie repräsentiert eine Alteration. Die roten Linien auf der linken Seite eines Chromosomenideogramms stehen für eine Deletion dieser Region, während die grünen, rechtsseitigen Linien Duplikationen/Amplifikationen repräsentieren. Eine einfache Linienbreite steht für die Duplikationen einer Chromosomenregion, eine doppelte Linienbreite für eine amplifizierte Region, die in mehr als drei Kopien vorlag. Zugewinne ganzer Chromosomen fanden sich besonders häufig für die Chromosomen 11, 9, 3, 5, 7, 8 und 15. Chromosom 11 wies mit 9/57 Fällen die höchste Frequenz von Zugewinnen ganzer Chromosomen auf. Verluste ganzer Chromosomen betrafen besonders häufig die Chromosomen 22 und 19, wobei Chromosom 22 in 7/57 Fällen besonders oft betroffen war. Zudem waren die Chromosomenregionen 12q, 16q und 17p in 3/57 Fällen und 13q in 2/57 Fällen deletiert. Einen besonders häufig amplifizierten chromosomalen Abschnitt stellte der kürzer Arm des Chromosoms 9 dar (14/57).



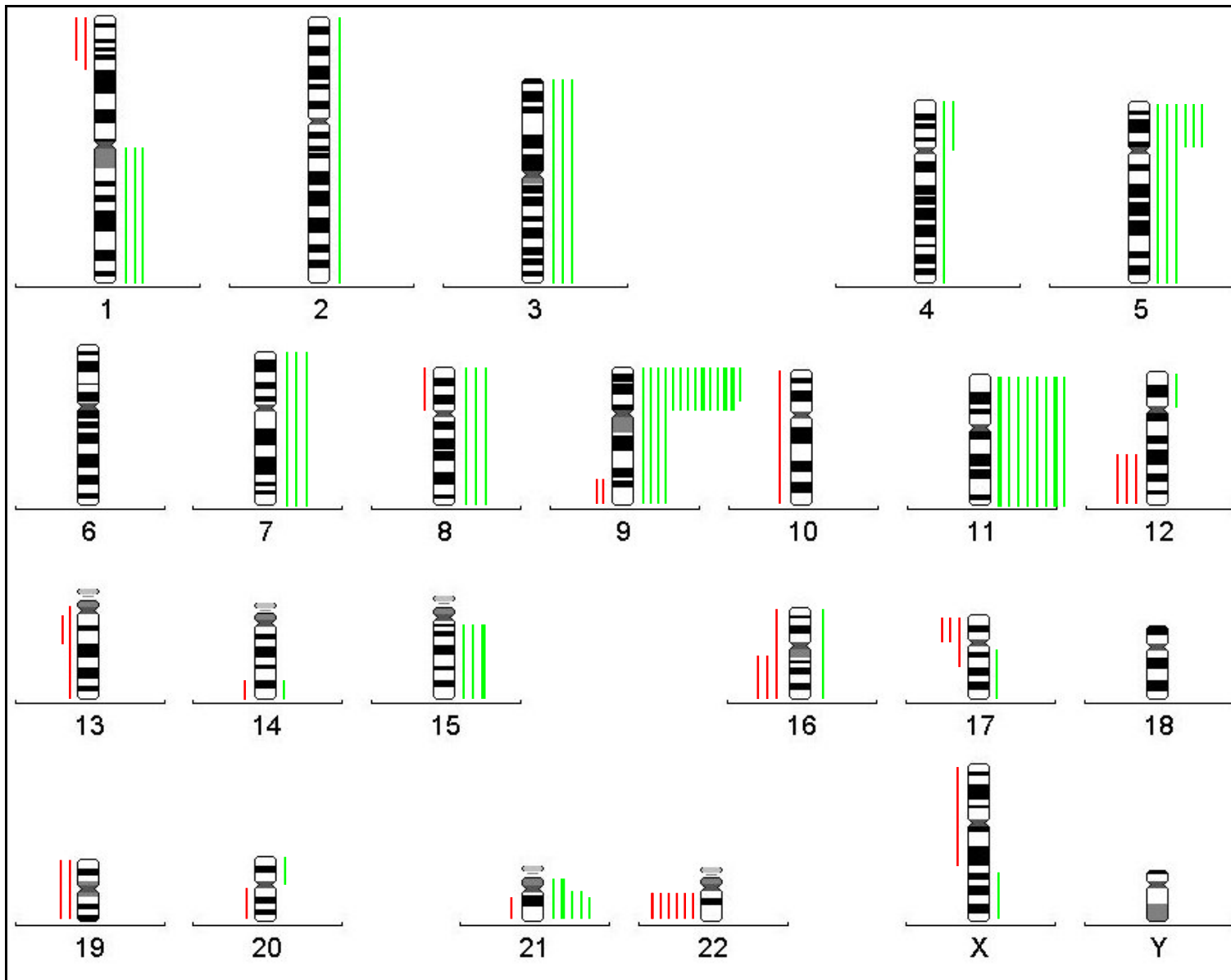


Abbildung 3.7: Übersichtsdarstellung aller Zugewinne und Verluste von 57 MM/MGUS-Patienten, die mittels CGH detektiert wurden. Die rechtsseitig der entsprechenden Chromosomenabschnitte in grün dargestellten Linien repräsentieren DNA-Zugewinne. DNA-Verluste werden durch die linksseitig in rot eingezeichneten Linien repräsentiert. Linien in doppelter Breite stehen für Zugewinne von mehr als drei Kopien.

### **3.3.4 Korrelation CGH-CC**

#### **3.3.4.1 Ergebnisse der CGH bei Patienten mit normalem Karyotyp**

Es wurden 48 Patienten, die in der CC-Analyse einen normalen Karyotyp zeigten, mit der CGH untersucht. Bei 60 % (29/48) der Fälle stimmten die Ergebnisse der CGH und der CC überein. Bei 40 % der Fälle (19/48) ergab die CGH Zugewinne und/oder Verluste von genetischem Material, die in der CC nicht festgestellt worden waren. Eine Gegenüberstellung der CC- und CGH-Ergebnisse ist in Tabelle 3.5 aufgeführt.

#### **3.3.4.2 Ergebnisse der CGH bei Patienten ohne Resultat in der CC**

Bei 4 Patienten, die mit der CGH untersucht wurden konnte keine G-Bänderung durchgeführt werden. Alle 4 Fälle zeigten nach Auswertung der CGH zytogenetische Aberrationen. Es traten sowohl Zugewinne als auch Verluste von genetischem Material auf. Eine Zusammenfassung der CC- und CGH-Ergebnisse ist in Tabelle 3.6 dargestellt.

#### **3.3.4.3 Ergebnisse der CGH bei Patienten mit aberrantem Karyotyp**

Es wurden 5 Patienten, die in der CC-Analyse einen veränderten Karyotyp zeigten, mit der CGH untersucht. Bei 3 von 5 Patienten ergab die Auswertung der CGH ebenfalls zytogenetische Aberrationen. In einem Fall stimmte das Ergebnis der CGH mit dem der CC überein. In drei Fällen fanden sich Diskrepanzen zwischen den Methoden. Die Ergebnisse der CC und der CGH sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst. Unterschiede im Karyotyp sind durch Fettdruck hervorgehoben. Bei zwei Patienten ergab die CC eine Nullisomie Y. Bei der Auswertung der CGH wurde das Y-Chromosom jedoch ausgeschlossen, so dass der Verlust des Y-Chromosoms in der CC und nicht in der CGH nicht als Diskrepanz gilt. Die Ergebnisse der CGH bei Patienten mit aberrantem Karyotyp sind in Tabelle 3.7 aufgeführt.

**Tabelle 3.5: Resultate der CGH bei Patienten mit normalem G-Banden-Karyotyp. Unterschiede im Karyotyp beider Methoden wurden durch Fettdruck hervorgehoben.**

Fall	Erkrankung	Therapie- status	BMPC %	CC	CGH
274	MM	k.A.	10	46,XX	<b>-9q32-qter,-12q23-qter</b>
411	MM I	nach	5	46,XY	normales Profil
430	MM IIIB	nach	k.A.	46,XX	normales Profil
444	MM IIIB	nach	5	46,XY	<b>+9p11-pter</b>
456	MM IIIA	vor	k.A.	46,XY	normales Profil
499	MM IIIA	nach	70	46,XY	<b>+1q11-qter,-13q12-q14</b>
544	MM IIIA	nach	k.A.	46,XX	<b>-12q23-qter,-19,-22</b>
562	MM IIIA	vor	30	46,XY	normales Profil
636	MM IIIA	nach	90	46,XY	normales Profil
680	MM IIIB	vor	80	46,XY	<b>+5p11-pter,+9p11-pter,+9p11-pterx2,+11,+11x2, +21q11-qter,-22</b>
735	MM, AL	vor	k.A.	46,XX	<b>+9p11-pter,-21q22-qter</b>
781	MM IIIB	nach	60	46,XY	<b>+3,+5p11-pter,-8p11-pter,+9,+9p11-pterx2,+11, +11x2,-13,+15,+15x2,-16q11-qter,-17p11-pter,+21</b>
790	MM IIIA	vor	95	46,XX	<b>+14q31-qter</b>
834	MM IIIA	vor	25	46,XY	<b>-1p33-pter,-17,-22</b>
874	MM IIIA	nach	10	46,XY	normales Profil
886	MM IIIA	vor	90	46,XX	<b>-12q23-qter,-20q11.1-qter</b>
892	MM IIIA	vor	70	46,XY	<b>+9p11-pter,+11</b>
896	MM IIIA	vor	65	46,XY	normales Profil
1015	MM I	vor	20	46,XY	normales Profil
1019	MM IIIA	nach	25	46,XX	<b>+9p11-pter</b>
1028	MM IIIA	nach	10	46,XY	normales Profil
1218	MM IIIA	vor	5	46,XX	normales Profil
1241	MM IIIB	vor	3	46,XY	normales Profil
1246	MM IIIA	nach	20	46,XY	normales Profil
1248	MM IIIA	vor	5	46,XX	<b>+5q11.1-q23.3,+9p11-pter</b>
1278	MM I	vor	5	46,XX	normales Profil
1308	MM IIIA	vor	80	46,XY	<b>+5,+7,+9,+11,+15,-16q11-qter,+21q11-qter</b>
1341	MGUS	vor	3	46,XX	normales Profil
1356	MM I	vor	10	46,XY	<b>+7,+8</b>
1371	MM I/MGUS	vor	5	46,XY	<b>+16</b>
1433	MM IIIA	nach	50	46,XY	normales Profil
1438	MM IIIA	nach	65	46,XY	normales Profil
1477	MM IIIB	nach	35	46,XY	<b>+12p11-pter,-14q31-qter,-21q22.1-qter</b>
1489	MM I	vor	10	46,XX	normales Profil
1493	MM IIIA	vor	10	46,XX	normales Profil
1499	MM IIIA	nach	50	46,XX	normales Profil
1502	MM IIIB	vor	50	46,XY	normales Profil
1518	MM IIIB	nach	75	46,XY	<b>+8,+9p11-pter,+11,+21q11-qter</b>
1529	MM IIA	nach	15	46,XY	normales Profil
1617	MM IIIA	nach	k.A.	46,XX	normales Profil
1620	MM IIIA	vor	5	46,XY	normales Profil
1643	MM IIIA	vor	10	46,XX	normales Profil
1684	MGUS	vor	10	46,XY	normales Profil
1718	MM I	vor	4	46,XY	normales Profil
1724	MM IIIA	nach	5	46,XY	normales Profil
1756	MM IIIA	vor	35	46,XY	<b>+9p11-pter,+9p11-pterx2,-10,-16,-19,-22</b>
1831	MM IIIB	nach	65	46,XY	normales Profil
1932	MM II	vor	10	46,XY	normales Profil

k.A. = kein Angaben; BMPC = Plasmazellanteil im Knochenmark; MM = multiples Myelom; MGUS = monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz; CC = konventionelle Zytogenetik; CGH = comparative genomische Hybridisierung

**Tabelle 3.6: Resultate der CGH bei Patienten ohne Resultat in der CC. Unterschiede im Karyotyp beider Methoden sind durch Fettdruck hervorgehoben.**

Fall	Erkrankung	Therapie-status	BMPC %	CC	CGH
737	MGUS	vor	5	kein Resultat	<b>+4p11-pter,+8,+11</b>
882	MM I	vor	15	kein Resultat	<b>-1p32.2-pter,-9q34.1-qter</b>
956	MM IIIA	vor	25	kein Resultat	<b>+1q11-qter,-22</b>
1020	MM IIIA	nach	60	kein Resultat	<b>+Xq23-qter,+1q11-qter</b>

BMPC = Plasmazellanteil im Knochenmark; MM = multiples Myelom; MGUS = monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz; CC = konventionelle Zytogenetik; CGH = comparative genomische Hybridisierung

**Tabelle 3.7: Resultate der CGH bei Patienten mit aberrantem Karyotyp. Unterschiede im Karyotyp beider Methoden sind durch Fettdruck hervorgehoben.**

Fall	Erkrankung	Therapie-status	BMPC %	CC	CGH
319	MM I	vor	15	45,X,-Y[3]/46,XY[17]	normales Profil
1215	MM IIIA	nach	50	53~54,XX,+ <b>der(1)</b> ,+3,+4,+ <b>der(7)t(7;?)(q32;?)</b> , <b>der(8)</b> ,+9,+11, <b>der(13)t(9;13)(?;q10)</b> ,+15,der(16), <b>der(17)</b> ,+21×2,-22[cp5]/46,XX[15]	+3,+4,+7,+ <b>9p13-pter</b> ,+11,+21,+21×2,-22
1422	MM IIIB	vor	85	46,XY, <b>del(13)(q32)[6]</b> /46,XY[23]	<b>+2,+3,+5,+9,+11,+15,+20p11-pter,-22,-Xq22.1-pter</b>
1558	MM I	nach	0	45,X,-Y[4]/46,XY[16]	normales Profil
1848	MM IIIA	vor	30	49,X,-Y,+5,+9,+11,- <b>16,+19,+mar[4]</b> /46,XY[16]	+5,+9,+11

BMPC = Plasmazellanteil im Knochenmark; MM = multiples Myelom; CC = konventionelle Zytogenetik; CGH = comparative genomische Hybridisierung

### 3.4 FISH

#### 3.4.1 Korrelation FISH-CGH

Zur Validierung der CGH wurden die Ergebnisse mit der FISH überprüft. Es wurden 126 Hybridisierungen auf 30 Fälle verteilt durchgeführt und mindestens 250 Zellkerne pro Analyse ausgewertet. Bei 3 Hybridisierungen konnte auf Grund fehlender Signale bzw. einem zu hohen Signalhintergrund keine Auswertung vorgenommen werden. Die Ergebnisse der FISH-Analysen sind in Tabelle 3.8 detailliert aufgeführt. Mehr oder weniger als zwei Signale pro Zellkern wurden als aberrant gewertet. In 69 % (85/123) der FISH-Analysen konnte das Ergebnis der CGH bestätigt werden. Die Auswertung der FISH ermöglichte in 32 % (39/123) der Fälle die Identifizierung von Artefakten, d.h. das Ergebnis der CGH ließ sich mit der FISH nicht bestätigen.

**Tabelle 3.8: Ergebnisse der FISH-Analysen, die zur Validierung der CGH durchgeführt wurden. Durch Fettdruck sind die DNA-Loci hervorgehoben, die in der FISH eine Aberration zeigten. Ein nicht signifikanter Anteil veränderter Zellen ist mit „--“ gekennzeichnet.**

Fall Nr.	DNA-Locus	Anzahl der Signale pro Zellkern x ausgewertete Zellzahl	Anteil veränderter Zellen	Bestätigung der CGH
274	9p21	1 x 0 / 2 x 255 / 3 x 10	--	nein
	<b>9q34</b>	<b>1 x 50</b> / 2 x 220 / 3 x 0	<b>19 %</b>	<b>ja</b>
	<b>12q24.5</b>	<b>1 x 57</b> / 2 x 233 / 3 x 0	<b>20 %</b>	<b>ja</b>
	13q22	1 x 5 / 2 x 230 / 3 x 15	--	nein
	20q13	1 x 15 / 2 x 245 / 3 x 5	--	nein
444	<b>9p21</b>	1 x 0 / 2 x 220 / <b>3 x 30</b>	<b>14 %</b>	<b>ja</b>
499	<b>1q44</b>	1 x 5 / 2 x 180 / <b>3 x 75</b>	<b>29 %</b>	<b>ja</b>
	<b>13q14</b>	<b>1 x 85</b> / 2 x 162 / 3 x 3	<b>34 %</b>	<b>ja</b>
544	4q28.1	1 x 5 / 2 x 247 / 3 x 3	--	nein
	<b>12q24.33</b>	<b>1 x 35</b> / 2 x 235 / 3 x 0	<b>13 %</b>	<b>ja</b>
	13q22	1 x 1 / 2 x 247 / 3 x 2	--	nein
	<b>19q13.5</b>	<b>1 x 39</b> / 2 x 251 / 3 x 0	<b>13 %</b>	<b>ja</b>
	<b>22q11</b>	<b>1 x 54</b> / 2 x 196 / 3 x 0	<b>22 %</b>	<b>ja</b>
680	<b>5p15.2</b>	1 x 0 / 2 x 195 / <b>3 x 125</b>	<b>39 %</b>	<b>ja</b>
	5q31	1 x 5 / 2 x 245 / 3 x 0	--	ja
	<b>9p21</b>	2 x 102 / <b>3 x 80</b> / 4 x 78	<b>31 % / 30 %</b>	<b>ja</b>
	<b>11q23</b>	2 x 150 / <b>3 x 60</b> / 4 x 40	<b>24 % / 16 %</b>	<b>ja</b>
	20q13	1 x 15 / 2 x 255 / 3 x 0	--	nein
	<b>21q22</b>	1 x 0 / 2 x 180 / <b>3 x 100</b>	<b>36 %</b>	<b>ja</b>
	<b>22q11</b>	<b>0 x 100</b> / <b>1 x 25</b> / 2 x 125	<b>40 % / 10 %</b>	<b>ja</b>
735	8q22	1 x 5 / 2 x 242 / 3 x 3	--	nein
	<b>21q22</b>	<b>1 x 53</b> / 2 x 237 / 3 x 0	<b>18 %</b>	<b>ja</b>
	<b>9p21</b>	1 x 0 / 2 x 220 / <b>3 x 30</b>	<b>12 %</b>	<b>ja</b>
737	<b>4p16</b>	1 x 2 / 2 x 220 / <b>3 x 28</b>	<b>11 %</b>	<b>ja</b>
	<b>8p23.2</b>	1 x 3 / 2 x 250 / <b>3 x 27</b>	<b>10 %</b>	<b>ja</b>
	<b>11q23</b>	1 x 4 / 2 x 210 / <b>3 x 36</b>	<b>14 %</b>	<b>ja</b>
781	<b>3cen</b>	1 x 2 / 2 x 157 / <b>3 x 121</b>	<b>43 %</b>	<b>ja</b>
	<b>5p15.2</b>	2 x 130 / <b>3 x 110</b> / 4 x 50	<b>38 % / 17 %</b>	<b>ja</b>
	5q31	1 x 4 / 2 x 256 / 3 x 0	--	ja
	<b>9p21</b>	2 x 94 / <b>3 x 62</b> / 4 x 94	<b>25 % / 38 %</b>	<b>ja</b>
	<b>11q23</b>	2 x 140 / <b>3 x 100</b> / 4 x 40	<b>36 % / 14 %</b>	<b>ja</b>
	<b>13q14</b>	<b>1 x 105</b> / 2 x 145 / 3 x 0	<b>58 %</b>	<b>ja</b>
	<b>15q22</b>	2 x 105 / <b>3 x 104</b> / 4 x 56	<b>39 % / 21 %</b>	<b>ja</b>
	<b>21q22</b>	1 x 3 / 2 x 185 / <b>3 x 192</b>	<b>50 %</b>	<b>ja</b>
790	4q28.1	1 x 11 / 2 x 239 / 3 x 2	--	nein
	6q	kein Resultat	--	--
	13q22	1 x 3 / 2 x 246 / 3 x 4	--	nein
	18q22	1 x 5 / 2 x 244 / 3 x 6	--	nein
	<b>14q32</b>	1 x 2 / 2 x 143 / <b>3 x 105</b>	<b>42 %</b>	<b>ja</b>
	7q31	1 x 5 / 2 x 267 / 3 x 14	--	nein

Tabelle 3.8: Fortsetzung Seite 74

Fall Nr.	DNA-Locus	Anzahl der Signale pro Zellkern x ausgewertete Zellzahl	Anteil veränderter Zellen	Bestätigung der CGH
834	<b>1p36</b>	<b>1 x 35 / 2 x 215 / 3 x 0</b>	<b>14 %</b>	<b>ja</b>
	<b>17q21</b>	<b>1 x 30 / 2 x 230 / 3 x 0</b>	<b>12 %</b>	<b>ja</b>
	<b>22q11</b>	<b>1 x 20 / 2 x 225 / 3 x 0</b>	<b>12 %</b>	<b>ja</b>
874	11q23	1 x 0 / 2 x 244 / 3 x 6	--	nein
882	<b>1p36</b>	<b>1 x 40 / 2 x 220 / 3 x 0</b>	<b>15 %</b>	<b>ja</b>
	4q28.1	1 x 2 / 2 x 256 / 3 x 4	--	nein
	<b>9q34</b>	<b>1 x 50 / 2 x 250 / 3 x 0</b>	<b>17 %</b>	<b>ja</b>
	13q22	1 x 3 / 2 x 247 / 3 x 2	--	nein
	16	1 x 18 / 2 x 232 / 3 x 2	--	nein
	17q21	1 x 5 / 2 x 255 / 3 x 5	--	nein
	20p	1 x 3 / 2 x 249 / 3 x 0	--	nein
	22q11	1 x 17 / 2 x 243 / 3 x 5	--	nein
	<b>13q14.3</b>	<b>1 x 48 / 2 x 202 / 3 x 0</b>	<b>19 %</b>	<b>nein</b>
886	4q28.1	1 x 2 / 2 x 250 / 3 x 4	--	nein
	5p15.2	1 x 5 / 2 x 255 / 3 x 2	--	nein
	9p21	1 x 5 / 2 x 244 / 3 x 0	--	nein
	<b>12q24.33</b>	<b>1 x 70 / 2 x 210 / 3 x 0</b>	<b>25 %</b>	<b>ja</b>
	13q22	1 x 3 / 2 x 259 / 3 x 3	--	nein
	20q13	1 x 20 / 2 x 250 / 3 x 0	--	nein
892	<b>9p21</b>	<b>2 x 210 / 3 x 0 / 4 x 85</b>	<b>29 %</b>	<b>ja</b>
	<b>9cen</b>	<b>2 x 200 / 3 x 1 / 4 x 79</b>	<b>28 %</b>	<b>ja</b>
	<b>11q13</b>	<b>1 x 20 / 2 x 230 / 3 x 70</b>	<b>22 %</b>	<b>ja</b>
956	<b>1q44</b>	<b>1 x 0 / 2 x 80 / 3 x 170</b>	<b>68 %</b>	<b>ja</b>
	9p21	1 x 2 / 2 x 251 / 3 x 2	--	nein
	<b>22q11</b>	<b>1 x 70 / 2 x 180 / 3 x 0</b>	<b>28 %</b>	<b>ja</b>
1019	6q	kein Resultat	--	--
	<b>9p21</b>	<b>1 x 0 / 2 x 210 / 3 x 50</b>	<b>19 %</b>	<b>ja</b>
	<b>9cen</b>	<b>1 x 0 / 2 x 210 / 3 x 50</b>	<b>19 %</b>	<b>ja</b>
	19p13.3	1 x 22 / 2 x 244 / 3 x 22	--	nein
1020	<b>1q44</b>	<b>1 x 0 / 2 x 193 / 3 x 47</b>	<b>20 %</b>	<b>ja</b>
	9p21	2 x 247 / 3 x 10 / 4 x 3	--	nein
	<b>Xq28</b>	<b>1 x 2 / 2 x 177 / 3 x 81</b>	<b>31 %</b>	<b>ja</b>
1215	<b>3q27</b>	<b>1 x 0 / 2 x 148 / 3 x 92</b>	<b>38 %</b>	<b>ja</b>
	<b>4cen</b>	<b>1 x 2 / 2 x 158 / 3 x 80</b>	<b>33 %</b>	<b>ja</b>
	<b>7p11.1</b>	<b>1 x 3 / 2 x 297 / 3 x 120</b>	<b>29 %</b>	<b>ja</b>
	<b>9p21</b>	<b>4 x 0 / 2 x 186 / 3 x 65</b>	<b>25 %</b>	<b>ja</b>
	<b>11q23</b>	<b>1 x 0 / 2 x 200 / 3 x 70</b>	<b>26 %</b>	<b>ja</b>
	22q11	kein Resultat	--	--
1248	<b>9p21</b>	<b>1 x 2 / 2 x 215 / 3 x 93</b>	<b>30 %</b>	<b>ja</b>
	<b>5q14.3</b>	<b>1 x 3 / 2 x 220 / 3 x 80</b>	<b>26 %</b>	<b>ja</b>
1278	4q25	1 x 5 / 2 x 270 / 3 x 1	--	nein
	9p21	1 x 4 / 2 x 250 / 3 x 11	--	nein
	13q22	1 x 3 / 2 x 252 / 3 x 5	--	nein

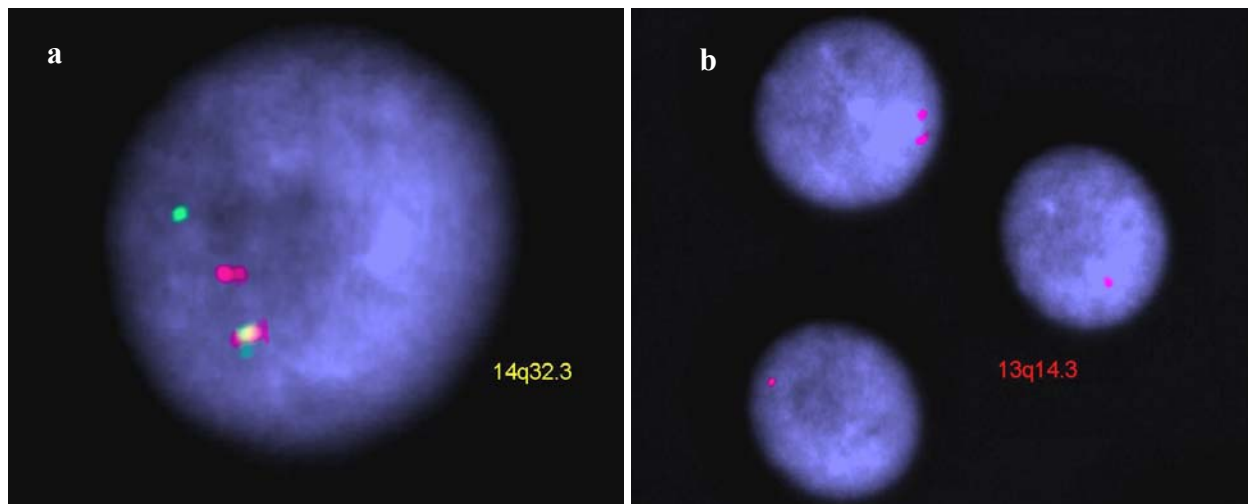
Tabelle 3.8: Fortsetzung Seite 75

Fall Nr.	DNA-Locus	Anzahl der Signale pro Zellkern x ausgewertete Zellzahl	Anteil veränderter Zellen	Bestätigung der CGH
1308	<b>5p15.2</b>	1 x 0 / 2 x 155 / <b>3 x 130</b>	<b>45 %</b>	<b>ja</b>
	<b>5q31</b>	1 x 0 / 2 x 155 / <b>3 x 130</b>	<b>45 %</b>	<b>ja</b>
	<b>7p11.1</b>	1 x 0 / 2 x 175 / <b>3 x 95</b>	<b>35 %</b>	<b>ja</b>
	<b>7q 31</b>	1 x 0 / 2 x 175 / <b>3 x 95</b>	<b>35 %</b>	<b>ja</b>
	<b>9p21</b>	1 x 3 / 2 x 178 / <b>3 x 89</b>	<b>33 %</b>	<b>ja</b>
	<b>9cen</b>	1 x 3 / 2 x 178 / <b>3 x 89</b>	<b>33 %</b>	<b>ja</b>
	<b>11p</b>	1 x 3 / 2 x 181 / <b>3 x 96</b>	<b>34 %</b>	<b>ja</b>
	<b>11q23</b>	1 x 0 / 2 x 140 / <b>3 x 110</b>	<b>44 %</b>	<b>ja</b>
	<b>15q</b>	1 x 2 / 2 x 156 / <b>3 x 132</b>	<b>46 %</b>	<b>ja</b>
	<b>21q</b>	1 x 4 / 2 x 271 / <b>3 x 101</b>	<b>37 %</b>	<b>ja</b>
1341	9p21	1 x 2 / 2 x 243 / 3 x 2	--	nein
1356	<b>8q24</b>	1 x 2 / 2 x 198 / <b>3 x 50</b>	<b>20 %</b>	<b>ja</b>
	15q22	1 x 6 / 2 x 244 / 3 x 0	--	nein
	<b>7q 31</b>	1 x 0 / 2 x 189 / <b>3 x 60</b>	<b>24 %</b>	<b>ja</b>
1371	<b>16q22</b>	1 x 0 / 2 x 220 / <b>3 x 40</b>	<b>16 %</b>	<b>ja</b>
	16p12.1	1 x 27 / 2 x 323 / 2 x 0	--	nein
	20q13	1 x 2 / 2 x 380 / 3 x 8	--	nein
1422	<b>2p23</b>	1 x 0 / 2 x 123 / <b>3 x 177</b>	<b>59 %</b>	<b>ja</b>
	<b>3p21.1</b>	1 x 3 / 2 x 120 / <b>3 x 157</b>	<b>56 %</b>	<b>ja</b>
	<b>3q26.1</b>	1 x 5 / 2 x 111 / <b>3 x 144</b>	<b>55 %</b>	<b>ja</b>
	<b>5p15.2</b>	1 x 3 / 2 x 142 / <b>3 x 185</b>	<b>56 %</b>	<b>ja</b>
	<b>5q31</b>	1 x 3 / 2 x 142 / <b>3 x 185</b>	<b>56 %</b>	<b>ja</b>
	<b>9p21</b>	1 x 2 / 2 x 122 / <b>3 x 126</b>	<b>50 %</b>	<b>ja</b>
	<b>9cen</b>	1 x 2 / 2 x 122 / <b>3 x 126</b>	<b>50 %</b>	<b>ja</b>
	<b>11p15.5</b>	1 x 3 / 2 x 190 / <b>3 x 108</b>	<b>64 %</b>	<b>ja</b>
	<b>15q26.3</b>	1 x 5 / 2 x 92 / <b>3 x 153</b>	<b>61 %</b>	<b>ja</b>
	<b>20p12.2</b>	1 x 10 / 2 x 113 / <b>3 x 147</b>	<b>54 %</b>	<b>ja</b>
	<b>22q11</b>	<b>1 x 100</b> / 2 x 160 / 3 x 0	<b>38 %</b>	<b>ja</b>
	<b>Xp21.1</b>	<b>1 x 80</b> / 2 x 170 / 3 x 0	<b>32 %</b>	<b>ja</b>
1477	<b>12p13</b>	1 x 4 / 2 x 216 / <b>3 x 45</b>	<b>17 %</b>	<b>ja</b>
	9p21	1 x 3 / 2 x 247 / 3 x 0	--	nein
	8q22	1 x 5 / 2 x 274 / 3 x 6	--	nein
	<b>21q22</b>	<b>1 x 50</b> / 2 x 250 / 3 x 0	<b>17 %</b>	<b>ja</b>
1518	8q22	1 x 10 / 2 x 220 / 3 x 10	--	nein
	<b>9p21</b>	1 x 0 / 2 x 251 / <b>4 x 59</b>	<b>19 %</b>	<b>ja</b>
	<b>11q13</b>	1 x 2 / 2 x 196 / <b>3 x 53</b>	<b>20 %</b>	<b>ja</b>
	<b>21q22</b>	1 x 0 / 2 x 200 / <b>3 x 50</b>	<b>20 %</b>	<b>ja</b>
1529	9p21	1 x 16 / 2 x 260 / 3 x 14	--	nein
1718	9p21	1 x 10 / 2 x 240 / 3 x 0	--	nein
1756	<b>9p21</b>	2 x 151 / <b>3 x 30</b> / 4 x 74	<b>29 %</b>	<b>ja</b>
	<b>9cen</b>	2 x 151 / <b>3 x 30</b> / 4 x 74	<b>29 %</b>	<b>ja</b>
	<b>10cen</b>	<b>1 x 65</b> / 2 x 200 / 3 x 0	<b>25 %</b>	<b>ja</b>
	<b>22q11</b>	<b>1 x 60</b> / 2 x 200 / 3 x 0	<b>23 %</b>	<b>ja</b>

### 3.4.2 Ergebnisse der FISH im *IgH*-Gen- und D13S319-Locus

Die Analyse der Chromosomenregion 14q32.3 erfolgte durch die FISH mit der direkt markierten, locusspezifischen DNA-Sonde LSI IgH DCBP, die in der telomernahen Region mit SpectrumGreen und in der zentromernahen Region mit SpectrumOrange markiert war (Vysis, Bergisch Gladbach). Mit der verwendeten DNA-Sonde war neben dem Nachweis von Deletionen oder Duplikationen/Amplifikationen auch die Identifizierung von Translokationen mit Beteiligung der Chromosomenregion 14q32.3 möglich. Eine Fusion der Signale zeigte, dass keine Translokation vorlag, wogegen ein Signalsplitt die Translokation nachwies. Abbildung 3.8a zeigt einen Interphasekern eines Patienten mit einer 14q32-Translokation.

Die Analyse der Chromosomenregion 13q14.3 erfolgte durch FISH mit der direkt markierten, locusspezifischen DNA-Sonde LSI D13S319 (Vysis, Bergisch Gladbach). Mit der mit Spectrum Orange markierten DNA-Sonde war der Nachweis von Amplifikationen und Deletionen dieser Region möglich. Ein Verlust mindestens eines der zwei Signale zeigte an, dass eine Deletion vorlag. Abbildung 3.8 b zeigt Interphasezellkerne eines Patienten mit einer Deletion der Chromosomenregion 13q14.3.



**Abbildung 3.8 a-b:** (a) Nachweis einer 14q32.3-Translokation eines Patienten mit MM. Das Fusionssignal ist auf dem normalen Chromosom 14 lokalisiert und das Splittsignal (rot und grün) weist auf das Vorliegen einer Translokation mit Beteiligung der Chromosomenregion 14q32.3 hin. (b) Nachweis einer 13q14.3-Deletion eines Patienten mit MM. Dargestellt sind sowohl normale Interphasekerne mit zwei Fluoreszenzsignalen des Locus 13q14.3 als auch Kerne mit nur einem Fluoreszenzsignal, was eine Deletion der Region 13q14.3 anzeigt.

Es wurden 116 Patienten in Bezug auf Rearrangements der Chromosomenregion 14q32.3 untersucht. In 29 % (34/116) der analysierten Fälle zeigten sich Veränderungen mit Beteiligung der Chromosomenregion 14q32.3. Translokationen mit Beteiligung der Region 14q32.3 wurden in 18 % (21/116) der untersuchten Fälle nachgewiesen. Bei 21 % (24/116) des Patientenkollektivs



konnten zumeist Deletionen oder Amplifikationen im Immunglobulin-Schwerkettenlocus identifiziert werden. Bei 9 % (11/116) der Fälle traten neben der Translokation zusätzliche 14q32-Deletionen und/oder -Amplifikationen auf.

Bei 82 % (28/34) der Fälle, die Veränderungen in der Region 14q32.2 zeigten, konnten die Ergebnisse der FISH mit der CC verglichen werden. In 21 % (6/28) der Fälle stimmten die Resultate der CC und der FISH überein. In 68 % (19/28) der Fälle korrelierten die Ergebnisse der CC nicht mit denen der FISH. Die CC ergab hier einen normalen Karyotyp. Bei 3 Patienten konnte eine Korrelation auf Grund der Komplexität des Karyotyps in der CC nicht eindeutig hergestellt werden.

Lediglich 15 % (5/34) der Patienten mit 14q32.3-Veränderungen in der FISH wurden mit der CGH untersucht. Bei drei Fällen ergab auch die CGH eine Veränderung in der Region 14q32.3. Bei zwei Fällen konnte mit der CGH keine 14q32.3-Aberration detektiert werden.

Es wurden 114 Patienten in Bezug auf Deletionen der Chromosomenregion 13q14.3 untersucht. In 30 % (34/114) der analysierten Fälle zeigte sich eine Deletion der Chromosomenregion 13q14.3. 16 % (18/114) der mittels FISH untersuchten Fälle zeigten sowohl 14q32-Rearrangements als auch eine Deletion der Region 13q14.

Bei 82 % (28/34) der Fälle, die Veränderungen in der Region 13q14.3 zeigten, konnten die Ergebnisse der FISH mit denen der CC verglichen werden. In 11 % (3/28) der Fälle zeigte die CC eine Deletion der Region 13q14.3 bzw. eine Monosomie 13, d.h. die FISH bestätigte das Ergebnis der CC. In 82 % (23/28) der Fälle korrelierten die Ergebnisse der CC nicht mit denen der FISH. Hier ergab die CC einen normalen Karyotyp. Bei zwei Fällen konnte eine Korrelation auf Grund der Komplexität des Karyotyps in der CC nicht eindeutig hergestellt werden.

29 % (10/34) der Patienten mit 13q14.3-Deletionen in der FISH wurden mit der CGH untersucht. Bei zwei Fällen konnte auch mit der CGH ein Verlust im langen Arm von Chromosom 13 festgestellt werden. Bei acht Fällen konnte mit der CGH keine Deletion der Region 13q14 detektiert werden.

Die Ergebnisse der FISH und die Korrelation mit den Resultaten der CGH und der CC in diesen Regionen sind in Tabelle 3.9 zusammenfassend dargestellt.

## FISH

**Tabelle 3.9: Veränderungen der Regionen 14q32.3 und 13q14.3 mit der FISH; Korrelation der FISH-Ergebnisse mit den CC- und CGH-Resultaten. Aufgeführt sind der prozentuale Anteil veränderter Zellen sowie die Art der detektierten Aberration. Ein nicht signifikanter Anteil veränderter Zellen (< 5 %) ist mit -- gekennzeichnet.**

Fall Nr.	Erkrankung	Therapiestatus	t(14;?)(q32.3;?)	andere 14q32-Aberrationen		del(13)(q14.3)	Korrelation FISH/CC	Korrelation FISH/CGH
238	MM IIIB	nach	--	--		18 %	ja	n.d.
246	MM IIIA	nach	--	--		13 %	kein Wachstum	n.d.
356	MM IIIA	vor	--	del(14)(q32.3)	21 %	23 %	nein	n.d.
425	MM IIIA	nach	--	del(14)(q32.3cen)	9 %	--	nein	n.d.
478	MM IIIA	nach	--	del(14)(q32)	19 %	40 %	?	n.d.
498	MM IIIA	nach	7 %	del(14)(q32)	7 %	--	?	n.d.
499	MM IIIA	nach	29 %	--		34 %	nein	ja
521	PZL	vor	--	del(14)(q32tel)	49 %	64 %	ja	n.d.
540	MM IIIB	nach	50 %	--		36 %	nein	n.d.
636	MM IIIA	nach	6 %	dup(14)(q32tel)	15 %	19 %	nein	nein
676	MM III	nach	--	del(14)(q32)	6 %	--	nein	n.d.
680	MM IIIB	vor	--	--		45 %	nein	nein
685	MM IIIA	nach	--	--		89 %	?	n.d.
716	MM IIIA	nach	--	del(14)(q32)	6 %	--	kein Wachstum	n.d.
753	MM IIIA	nach	9 %	--		19 %	nein	n.d.
781	MM IIIB	nach	29 %	--		53 %	nein	ja
790	MM IIIA	vor	--	dup(14)(q32tel)	25 %	--	nein	ja
804	MM IIIA	nach	26 %	del(14)(q32tel)	26 %	23 %	nein	n.d.
845	MM IIA	vor	--	del(14)(q32cen)	7 %	--	nein	n.d.
882	MM IA	vor	--	--		19 %	kein Wachstum	nein
886	MM IIIA	vor	--	--		11 %	nein	nein
956	MM IIIA	vor	--	--		56 %	kein Wachstum	nein
1004	MM IIIB	nach	7 %	--		n.d.	kein Wachstum	n.d.
1006	MM IIIA	nach	6 %	dup(14)(q32)	30 %	n.d.	ja	n.d.
1024	MM IIA	vor	--	del(14)(q32)	8 %	--	kein Wachstum	n.d.

Tabelle 3.9: Fortsetzung Seite 79

Fall Nr.	Erkrankung	Therapiestatus	t(14;?)(q32.3;?)	andere 14q32-Aberrationen		del(13)(q14.3)	Korrelation FISH/CC	Korrelation FISH/CGH
1053	MM IIA	nach	13 %	--		n.d.	kein Wachstum	n.d.
1072	MM IIIB	nach	13 %	dup(14)(q32tel)	6 %	23 %	nein	n.d.
1100	MM IIIA	vor	52 %	del(14)(q32tel)	45 %	--	ja	n.d.
1119	PZL	nach	26 %	--		--	ja	n.d.
1144	MM IIIA	vor	19 %	--		34 %	nein	n.d.
1197	MM IIIA	vor	--	--		36 %	nein	n.d.
1236	MM IIIB	nach	29 %	dup(14)(q32)	14 %	32 %	nein	n.d.
1391	MM IIIA	nach	--	--		25 %	kein Wachstum	n.d.
1436	MM IIIA	nach	13 %	--		13 %	kein Wachstum	n.d.
1464	MM IIIA	nach	--	--		19 %	nein	n.d.
1477	MM IIIB	nach	11 %	del(14)(q32)	10 %	21 %	nein	nein
1499	MM IIIA	nach	--	--		18 %	nein	nein
1562	MM IIIA	vor	--	--		59 %	nein	n.d.
1574	MM	k.A.	--	--		21 %	nein	n.d.
1617	MM IIIA	nach	--	--		14 %	nein	nein
1946	MM IIA	vor	--	del(14)(q32tel)	6 %	--	nein	n.d.
1973	MM IIIB	vor	12 %	del(14)(q32tel)	12 %	--	ja	n.d.
1996	MM IIIA	nach	--	--		20 %	nein	n.d.
2284	MM IIIB	vor	12 %	del(14)(q32tel)	19 %	--	?	n.d.
2298	MM IIIA	vor	14 %	--		14 %	kein Wachstum	n.d.
2306	MM IIIA	vor	--	del(14)(q32tel)	43 %	6 %	nein	n.d.
2385	MM IIIA	vor	--	--		12 %	nein	n.d.
2484	MM IIIA	vor	--	del(14)(q32tel)	39 %	60 %	nein	n.d.
2502	MM IIIA	nach	25 %	del(14)(q32)	23 %	--	nein	n.d.
2505	MM IIIA	nach	--	del(14)(q32tel)	74 %	84 %	ja	n.d.

„n.d.“ = CGH nicht durchgeführt; „?“ = Korrelation FISH/CC auf Grund der Komplexität des Karyotyps nicht eindeutig festzustellen; „--“ = Anteil veränderter Zellen < 5 %; „k.A.“ = keine Angaben

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Konventionelle Zytogenetik

Die klassische Bänderungsanalyse ist nach wie vor der Goldstandard in der Zytogenetik benigner und maligner Erkrankungen. Die klassische zytogenetische Analyse (CC) ist das einzige Verfahren, das es ermöglicht einen umfassenden Überblick über chromosomale Aberrationen einer neoplastischen Zelle zu erhalten.

Die im Rahmen dieser Arbeit mittels der CC untersuchten Patienten, zeigten in 28 % (31/110) klonale Chromosomenaberrationen. Die Daten der bisher publizierten Studien über das MM/PZL beziffern die Frequenz der aberranten Karyotypen auf durchschnittlich 40 %. Die Angaben schwanken innerhalb der CC-Studien zwischen 20 % und 50 % (Ranni et al., 1987; Gould et al., 1988; Lisse et al., 1988; Clark et al., 1989; Kowalczyk et al., 1991; Weh et al., 1993; Lai et al., 1995; Sawyer et al., 1995; Tricot et al., 1995; Calasanz et al., 1997; Seong et al., 1998). Die Ergebnisse der zytogenetischen Analyse dieser Arbeit lagen im unteren Drittel dieses Schwankungsbereiches. Diese Tatsache lässt sich damit erklären, dass einige Studien bevorzugt Patienten einschließen, die sich in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung befinden. Mit zunehmendem Progress der Neoplasie steigt der prozentuale Anteil aberranter Karyotypen auf bis zu 80 % bei der extramedullären Manifestation wie z.B. der PZL (Hallek et al., 1998). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung werden dagegen nur bei etwa 20-35 % der Myelompatienten Chromosomenaberrationen festgestellt (Dewald et al., 1985; Gould et al., 1988; Weh et al., 1993; Sawyer et al., 1995; Tricot et al., 1995; Lai et al., 1995; Seong et al., 1998). Übereinstimmend zeigte sich in dieser Arbeit bei 26 % (23/89) der Stadium III-Patienten und 100 % (3/3) der PZL-Patienten ein aberranter Karyotyp. Lediglich bei 8 % (1/12) der Stadium II-Patienten fanden sich Chromosomenaberrationen. Bei den zwei Stadium I-Patienten mit aberrantem Karyotyp von den insgesamt 11 untersuchten (18 %) zeigte sich der Verlust eines Y-Chromosoms. Die Nullisomie Y wurde im Rahmen von CC-Studien mit erhöhter Frequenz bei gesunden Männern höheren Lebensalters gesehen (UKCCG, 1992a; Wiktor et al., 2000). Es wurde die These postuliert, dass der Verlust des Y-Chromosoms nicht in jedem Fall den malignen Zellklon repräsentiert (UKCCG, 1992a; Abeliovich et al., 1994). Außerdem kann die niedrige Frequenz aberranter Karyotypen durch verschiedene Kulturparameter, wie spezielle Zytokine, z.B. Interleukin-6 (IL-6), Granulozyten-stimulierender-Faktor (G-CSF) und die Kulturdauer beeinflusst werden. Es wird letztlich kontrovers diskutiert, ob sich die genannten Parameter positiv oder negativ auf die Detektion von Aberrationen auswirken (Facon et al., 1993; Lai et al., 1995; Smadja et al., 1995; Brigaudeau et al., 1997; Ho et al., 2002). Die

chromosomalen Aberrationen wurden in dieser Studie sowohl in den unstimulierten als auch in den mit Zytokinen stimulierten Kulturen detektiert, die neben anderen Wachstumsfaktoren auch IL-6 und G-CSF enthielten. Der überwiegende Teil der Patienten (72 %, 79/110) dieser Arbeit zeigte in der zytogenetischen Analyse einen normalen Karyotyp. Erfasst werden bei der CC nur teilungsfähige Zellen, sodass bei Tumoren mit niedriger Proliferationsrate häufig anstelle des malignen Klons normale Zellen des hämatopoetischen Systems mit normalem Karyotyp gesehen werden (Weh et al., 1990). Verschiedene Faktoren erweisen sich im Verständnis der Pathogenese des MM als schwierig, u.a. auch die Tatsache, dass die Karyotypen beim MM und der PZL häufig sehr komplexe Aberrationen zeigen. Sie stellen meist eine Kombination aus numerischen und strukturellen Veränderungen dar, wohingegen bei den akuten Leukämien häufig zu Erkrankungsbeginn nur eine zytogenetische Aberration auftritt (Zandecki et al., 1996). Der überwiegende Teil (71 %, 22/31) der Patienten, bei denen im Rahmen dieser Arbeit Aberrationen mittels der CC nachgewiesen wurden, zeigten ebenfalls eine Kombination aus komplexen strukturellen und numerischen Veränderungen. Die zytogenetischen Daten dieser Studie zeigten strukturelle Aberrationen als alleinige Veränderung des Karyotyps bei 13 % (4/31) der untersuchten Patienten und 16 % (5/31) zeigten nur numerische Aberration. Inwieweit diese Karyotypen den malignen Zellklon von Plasmazellerkrankungen repräsentieren ist nicht geklärt. Smadja et al. (2001) ordnen Fälle, die nur eine strukturelle oder numerische Aberration zeigen, als nicht Myelom-spezifische Veränderungen ein, sondern schließt bei der Auswertung seiner Studien nur komplex veränderte, pseudo-, hyper- oder hypodiploide Karyotypen ein. Er lässt jedoch die Frage offen, wie das Auftreten von einer klonalen numerischen oder strukturellen Veränderung erklärt werden kann, sofern es sich nicht um eine konstitutionelle Veränderung handelt. Einige Autoren postulieren jedoch die These, dass primäre Translokationen ein frühes, vielleicht sogar initiales Ereignis in der Pathogenese des MM darstellen (Zandecki et al., 1996; Bergsagel & Kuehl, 2001). Diese Aussage bietet einen schlüssigen Erklärungsansatz.

In Bezug auf die prognostische Relevanz vertreten einige Autoren die These, dass Hyperdiploidie beim MM und bei der MGUS einen günstigen prognostischen Faktor darstellt (Smith et al., 1985; Morgan et al., 1989; Garcia-Sanz et al., 1995; San Miguel et al., 1996). Anhand von FISH-Analysen mit zentromerspezifischen DNA-Sonden identifizierten Pérez-Simón et al. Trisomien der Chromosomen 6, 9 und 17 als günstigen prognostischen Faktor mit einer längeren medianen Überlebensrate als Trisomien anderer Chromosomen bzw. Patienten ohne Trisomie (Pérez-Simón et al., 1998). Als ein prognostisch relevanter, unanhängiger Marker gilt das  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2$ -M), das, wenn es erhöht ist, für eine ungünstigere Prognose spricht. (Boccardo & Pileri, 1995). Bei den Patienten dieser Arbeit mit normalem Karyotyp lag der

$\beta$ 2-M-Spiegel im Median niedriger (2,7 mg/l) als bei den Patienten mit aberrantem Karyotyp (9,2 mg/l). Da jedoch das Vorliegen normaler Karyotypen in den meisten Fällen auf die Tatsache zurückgeführt wird, dass diese mit der CC nicht detektiert werden, stellt sich die Frage, ob die Korrelation eines niedrigeren  $\beta$ 2M-Spiegels mit einem normalem Karyotyp hergestellt werden kann. Vielmehr scheint der normale Karyotyp einen niedrigen PCLI dieser Patientengruppe widerzuspiegeln, der mit einem längeren Gesamtüberleben assoziiert wird (Greipp et al., 1993; Rajkumar et al., 1999). Auch der Plasmazellanteil im Knochenmark (BMPC) lag bei der Gruppe mit normalem Karyotyp niedriger (38 %) als bei der Gruppe mit aberrantem Karyotyp (56%). Ein hoher BMPC spiegelt ebenfalls eine hohe Tumorlast und ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium wider, das das Auftreten von Karotypveränderungen begünstigt. Auf Grund dieser Tatsachen ist es sinnvoller innerhalb der Gruppe mit aberrantem Karyotyp nach spezifischen zytogenetischen Anomalien zu suchen, die zu einem aggressiveren Tumorzellwachstum führen könnten.

Die Karyotypen des MM ähneln eher denen der epithelialen Tumore oder der chronischen myeloischen Leukämie (CML) in der „Blastenkrise“ als anderen hämatologischen Neoplasien. Die zytogenetischen Daten dieser Arbeit ergaben einen hohen Anteil hyper-, hypo- und pseudodiploider, oft komplex veränderter Karyotypen, was auch in anderen zytogenetischen Studien festgestellt wurde. Die Chromosomen, die in der vorliegenden Studie am häufigsten von numerischen und strukturellen Aberrationen betroffen waren, wurden auch von anderen Autoren als besonders oft in zytogenetische Aberrationen involviert genannt. Es handelt sich unter anderem um die Chromosomen 1, 13 und 14. (Ranni et al., 1987; Gould et al., 1988; Lisse et al., 1988; Clark et al., 1989; Kowalczyk et al., 1991; Weh et al., 1993; Heim & Mitelman, 1995; Lai et al., 1995; Sawyer et al., 1995; Tricot et al., 1995; Calasanz et al., 1997; Seong et al., 1998; Pratt, 2002). Beim MM/PZL treten jedoch häufiger als bei den epithelialen Tumoren balancierte Translokationen auf. Ein krankheitsspezifisches Muster in Bezug auf den Karyotyp wie z.B. bestimmte Translokationen bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) konnte bisher nicht charakterisiert werden (Kuehl & Bergsagel, 2002) und ist auch anhand der hier gewonnenen zytogenetischen Daten nicht ersichtlich. Nicht zuletzt erschwert die Komplexität der Karyotypen und die späte Manifestation zytogenetischer Aberrationen in der malignen Transformation die Beantwortung der Frage, ob primäre zytogenetische Veränderungen in der Pathogenese des MM eine Rolle spielen, und ob ein einheitliches Muster im Chromosomensatz neoplastischer Plasmazellen besteht. Einen Hinweis auf ein charakteristisches zytogenetisches Muster wurde nach Analyse der zytogenetischen Daten dieser und anderer Studien in Bezug auf Chromosom 1, 13 und 14 festgestellt.

### 4.1.1 Chromosom 1

Das Chromosom 1 war in 45 % (14/31) der Fälle mit aberrantem Karyotyp vor allem in strukturelle Veränderungen involviert, die variierende Bruchpunkte auf dem kurzen und dem langen Arm zeigten. In der Literatur wurden strukturelle Aberrationen von Chromosom 1 bei etwa 40 % der Myelompatienten mit Karyotypveränderungen beschrieben (Smadja et al., 1998). Einen großen Teil stellen, wie auch in dieser Arbeit Translokationen mit unterschiedlichen Partner-chromosomen und Bruchpunkten dar (Heim & Mitelman, 1995; Sawyer et al., 1995, 1998b). Trotz des relativ hohen Anteils an Chromosom-1-Anomalien konnten bisher wie auch im Rahmen dieser Studie keine krankheitsspezifischen Bruchpunkte oder Partnerchromosomen beschrieben werden. Eine Erklärung kann möglicherweise die Tatsache liefern, dass sich die zytogenetischen Alterationen auf das größte menschliche Chromosom mit variablen Bruchpunkten verteilen, auf dem eine Vielzahl potentiell relevanter Onkogene lokalisiert sind. Eine Identifizierung bevorzugter Bruchpunkte auf Chromosom 1 kann eher im Rahmen großer Studien und über einen längeren Beobachtungszeitraum erreicht werden. Erste Hinweise lieferten zytogenetische Daten umfassender Studien aus dem Bereich der Lymphome, die ergaben, dass die Chromosomenregion 1q21-q23 häufiger an Aberrationen beteiligt war. 1q-Veränderungen wurden in 20 % der zytogenetisch veränderten folliculären Lymphome (FL) und diffus großzelligen B-Zell-Lymphome (DLCL) festgestellt (Offit et al., 1991). Im Bereich der Burkitt-Lymphome wurde eine Assoziation zwischen der typischen  $t(8;14)(q24;q32.3)$  und einer  $dup(1)(q21q32)$  in 44 % der Patienten mit Chromosomenveränderungen beobachtet (Douglass et al., 1980). 1q-Aberrationen treten nicht nur in lymphoiden Tumoren auf. Translokationen mit Beteiligung der Region 1q12-q23 werden ferner bei akuten Leukämien sowohl myeloischen als auch lymphatischen Ursprungs beobachtet (Johansson et al., 1997; Busson-Le Coniat et al., 1999). 1q21-Amplifikationen wurden bei soliden Tumoren, wie dem Mamma- und dem Ovarial-Karzinom gesehen (Mertens et al., 1997).

### 4.1.2 Chromosom 13

Zytogenetische Veränderungen, die Chromosom 13 betreffen und beim MM/PZL gehäuft auftreten (Heim & Mitelman, 1995), wurden in dieser Arbeit bei 32 % (10/31) der Patienten mit veränderten Karyotypen festgestellt. Unter den numerischen Aberrationen fand sich bei Myelompatienten insbesondere der Verlust eines Chromosoms 13. Die CC Daten dieser Studie ergaben eine Monosomie 13 bei 19 % (6/31) der Patienten mit aberrantem Karyotyp. Bei einem Patienten wurde eine Deletion der terminalen Region 13q32 erfasst. Weitere Deletionen im

langen Arm von Chromosom 13, die mit besonderem Interesse untersucht wurden und die neben der Monosomie 13 für das MM in Bezug auf die Prognose relevant sind (Tricot et al., 1995 und 1997), wurde in dieser Arbeit mit der CC nicht detektiert. Einen möglichen Grund könnte die Tatsache darstellen, dass kleine Deletionen im Bereich 13q mit der CC nicht in jedem Fall detektierbar sind, da hier das lichtmikroskopische Auflösungsvermögen und die Chromosomenlänge die begrenzenden Faktoren sind. Als die mögliche kleinste gemeinsame deletierte Region, die mit der CC festgestellt wurde, wurde die Region 13q14 definiert (Shaughnessy et al., 2000). Zudem war in dieser Studie die Gruppe der Patienten mit aberrantem Karyotyp nicht so groß, dass jede häufiger auftretende Veränderung auch in jedem Fall erfasst wurde.

#### 4.1.3 Chromosom 14

Besonders häufig ist auch das Chromosom 14 von zytogenetischen Veränderungen betroffen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei 32 % (10/31) der Fälle mit zytogenetischen Veränderungen Aberrationen eines Chromosoms 14 beobachtet. Strukturelle Aberrationen insbesondere des langen Arms traten bevorzugt auf, wobei bei 4 Fällen die Chromosomenregion 14q32 involviert war. Bei vielen Myelompatienten wurden Translokationen mit Beteiligung des *IgH*-Gens in der Region 14q32 durch CC-Analysen und insbesondere durch FISH-Analysen identifiziert. Als eine rekurrent auftretende Translokation in dieser Region wurde die  $t(11;14)(q13;q32)$  bei den Myelompatienten am häufigsten detektiert (Avet-Loiseau et al., 1998). Diese Translokation wurde mittels konventioneller GTG-Bänderungsanalyse bei 5 % (Dewald et al., 1985; Sawyer et al., 1995; Fonseca et al., 1998) und durch FISH-Analysen bei 15 % der Myelompatienten gefunden (Königsberg et al., 2000; Fonseca et al., 2002a). Neben anderen Translokationspartnern der Region 14q32 wurde, wenn auch weitaus seltener, die  $t(8;14)(q24;q32)$  bei Patienten mit MM/PZL beschrieben. Die für das Burkitt-Lymphom als typisch geltende Translokation (Zech et al., 1976) wurde in dieser Arbeit mittels CC bei einem Patienten detektiert. Außerdem wurden zwei Derivatchromosomen, die zusätzliches nicht näher zu charakterisierendes Material im langen Arm von Chromosom 14 in der Bruchpunktregion 14q32 zeigten, identifiziert. Diese Derivatchromosomen 14, die häufig aus Translokationen hervorgehen, werden in der Literatur bei 25 % der MM und 50 % der PZL mit aberrantem Karyotyp beschrieben (Heim & Mitelman, 1995).

Obwohl die klassische Bänderungsanalyse als Goldstandard in der Zytogenetik eine wichtige Rolle bei der Charakterisierung von malignen Plasmazellerkrankungen spielt, wird der Anteil von Patienten mit zytogenetischen Aberrationen in der Regel unterschätzt. Sowohl die niedrige



Proliferationsrate der malignen Zellen des MM und insbesondere der MGUS als auch der variable Infiltrationsgrad des Knochenmarks mit Myelomzellen erschweren die konventionelle zytogenetische Analyse. Der Einsatz neuerer molekularzytogenetischer Methoden bei der genetischen Charakterisierung des MM und verwandter Erkrankungen ermöglicht die Erfassung eines größeren Teils genetischer Alterationen dieser Neoplasien sowie eine bessere Charakterisierung der zytogenetischen Veränderungen.

## 4.2 CGH

Seit der Einführung der CGH im Jahre 1992 (Kallioniemi et al., 1992) steht im Bereich der Tumorforschung eine bedeutende molekularzytogenetische Methode zur Identifizierung spezifischer über- und unterrepräsentierter DNA-Sequenzen (Deletionen und Amplifikationen) im gesamten Tumorgenom zur Verfügung. Dies ist von biologischer Bedeutung, da ein DNA-Gewinn auf die Aktivierung eines Onkogens, der Verlust dagegen auf die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens hinweisen kann.

### 4.2.1 Methodische Aspekte

Die CGH ist im Vergleich zu anderen zytogenetischen Methoden ein technisch anspruchsvolles Verfahren, da sie auf dem Verhältnis unterschiedlicher Fluoreszenzintensitäten in jedem Chromosom einer Metaphase, zwischen verschiedenen Metaphasen eines Objektträgers und gegebenenfalls zwischen verschiedenen Objektträgern beruht (Karhu et al., 1997). Zum Erreichen eines optimalen Ergebnisses in der CGH-Analyse sollten folgende Schritte mit besonderer Sorgfalt durchgeführt werden: die Metaphasepräparation, die DNA-Markierung, die Hybridisierung, die Mikroskopie, die Bildanalyse und die Interpretation der gewonnenen Daten. Zur optimalen Durchführung der CGH sollten folgende von Kallioniemi et al. geforderten Voraussetzungen zur Qualitätssicherung beachtet werden (Kallioniemi et al., 1994):

- eine gleichmäßige Farbintensität der Chromosomen ohne „Granulierung“
- eine gleichmäßige Farbverteilung von rot und grün in den Schwesterchromatiden bzw. den Homologen einer Metaphase
- eine geringe und gleichmäßige Hintergrundfluoreszenz
- eine intensive DAPI-Bänderung
- eine geringe Bindung markierter DNA an Zentromere und Heterochromatinbereiche
- eine adäquate Chromosomenlänge
- wenige sich überlappende Chromosomen pro Metaphase

Die genannten Kriterien wurden in der vorliegenden Arbeit eingehalten und waren für alle Fälle erfüllt. In Anlehnung an einige Originalarbeiten wurde die hier verwendete Methode mehrfach in Bezug auf die Isolation und *in vitro* Amplifikation der genomischen DNA, der Markierungsarten der DNAs, Präparation der Referenz-Metaphasen und der Bildanalyse modifiziert und optimiert (Isola et al., 1994; Kallioniemi et al., 1994; Lundsteen et al., 1995; Piper et al., 1995; James & Varley, 1996). Insbesondere die Verwendung der direkten Markierungsmethode, die in dieser Arbeit eingesetzt wurde, hat sich in den letzten Jahren als qualitativ vorteilhafter und methodisch weniger aufwendig durchgesetzt (Isola et al., 1994).

Nach Auswertung der 57 CGH-Fälle, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, zeigten sich u.a. besonders häufig DNA-Verluste der chromosomalen Regionen 1p32-pter, 16, 19 und 22. Nachdem diese Verluste mittels der FISH überprüft worden waren, zeigte sich nur bei einem geringen Teil das Vorliegen eines echten DNA-Verlustes. Der überwiegende Teil der Verluste genetischen Materials dieser Regionen musste als Artefakt der Methode gewertet werden. Diese Regionen, die häufiger zur Bildung von Artefakten neigen, wurden bereits von anderen Autoren beschrieben (Isola et al., 1994; Kallioniemi et al., 1994; Ried et al., 1994; Schröck et al., 1994; Speicher et al., 1994; Struski et al., 2002). Auf Grund dieser Beobachtungen schließen die meisten Autoren wie auch in dieser Arbeit diese problematischen Regionen von der Beurteilung der CGH aus. Das verstärkte Auftreten von Artefakten in diesen Regionen konnte bisher nicht zufriedenstellend erklärt werden. Kallioniemi et al. vermuteten unterschiedliche Hybridisierungseigenschaften der Haptene Biotin und Digoxigenin bei der indirekten Markierungsmethode der CGH (Kallioniemi et al., 1994). Dagegen spricht jedoch heute, dass die Bildung von Artefakten auch bei Verwendung der direkten Markierungsmethode auftritt. Von du Manoir wurde das Vorliegen so genannter SINEs (kleine eingestreute repetitive Elemente; *small interspersed repetitive elements*), die sich insbesondere in Chromosom 19 befinden und möglicherweise durch die cot-1-DNA nur unzureichend supprimiert werden, als Erklärung angeboten (du Manoir et al., 1995). Auf Grund des besonders hohen GC-Gehaltes dieser Regionen besteht die Möglichkeit, dass es zu einer ungleichmäßigen Anlagerung der Referenz- und Tumor-DNA bei der Hybridisierung kommt (Zitzelsberger et al., 1997). Neben den genannten Bereichen stellte sich die unzureichende Blockierung der repetitiven Sequenzen der heterochromatischen Regionen und der zentromerischen Regionen sowie die nachlassende Hybridisierungsintensität der telomerischen Regionen als problematisch heraus (Kallioniemi et al., 1992 und 1994; Bryndorf et al., 1995) und wurden daher in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt.

In einzelnen Fällen dieser Studie fielen außerdem einige chromosomale Bereiche auf, die häufiger von Artefakten betroffen waren. Insbesondere die Chromosomen/-regionen 4, 5, 6q, 13q

und 18q zeigten häufiger DNA-Zugewinne. Verluste, die als Artefakte beobachtet wurden, betrafen die Chromosomen/-regionen 17 und 20q. Da diese Veränderungen mit spezifischen FISH-Sonden nicht bestätigt wurden und die geforderten Kriterien für eine ausreichende Qualitätssicherung der CGH in allen Fällen erfüllt war, wurden sie als Artefakte der CGH eingeordnet. Das Vorkommen von Artefakten, die nicht in der Literatur beschrieben sind, verdeutlicht die Bedeutsamkeit von Kontrollexperimenten zur Überprüfung von CGH-Resultaten.

#### 4.2.2 Korrelation CGH/Konventionelle Zytogenetik

Der überwiegende Teil der Patienten (84 %, 48/57), die mit der CGH untersucht wurden, zeigte in der CC einen normalen Karyotyp. Bei 60 % der Fälle (29/48) zeigte sich sowohl in der CC als auch in der CGH ein normaler Karyotyp bzw. ein normales Profil. Nach Auswertung der CGH-Daten wurden bei 40 % der Fälle (19/48), die in der CC-Analyse keine Veränderungen aufwiesen, Verluste und/oder Zugewinne von genetischem Material festgestellt. Auf Grund der niedrigen Teilungsaktivität der Myelomzellen *in vitro* sowie des unterschiedlichen Infiltrationsgrades des Knochenmarkes mit malignen Plasmazellen wurde die Häufigkeit der Karyotypveränderungen meist unterschätzt. Ein Vorteil der CGH stellt der Sachverhalt dar, dass im Gegensatz zur CC keine Metaphasen und somit keine proliferierenden Zellen benötigt werden. Dies könnte erklären, warum bei Patienten mit normalem Karyotyp in der CC dennoch Veränderungen mit der CGH nachgewiesen wurden.

Im Rahmen dieser CGH-Studie wurden 4 Patienten, die in der CC kein Resultat zeigten, mit der CGH untersucht. Diese zeigten sowohl Zugewinne als auch Verluste von genetischem Material. Bei 2 von 5 Patienten, die in der CC einen aberranten Karyotyp zeigten, ergab die Auswertung der CGH zusätzliche zytogenetische Aberrationen. Bei den Fällen Nr. 319 und Nr. 1558 ergab die CC eine Nullisomie Y. Bei der Auswertung der CGH wurde das Y-Chromosom auf Grund der hochrepetitiven Sequenzen dieser Region ausgeschlossen, so dass die nicht detektierte Nullisomie Y nicht als Diskrepanz zu bewerten ist. Der Fall Nr. 1422 zeigte in der CC eine Deletion der terminalen Region im langen Arm von Chromosom 13. Das Ergebnis der CGH ergab in diesem Fall dagegen einen hyperdiploiden Karyotyp mit dem Zugewinn und Verlusten ganzer Chromosomen oder chromosomaler Regionen. Die  $del(13)(q32)$  konnte dagegen mit der CGH nicht detektiert werden. Diese Ergebnisse könnten dafür sprechen, dass in diesem Fall zwei Myelomzell-Linien vorliegen. Die Diskrepanz zwischen CC und CGH ließe sich möglicherweise auch damit erklären, dass eine Fehlinterpretation des Bandenmusters von Chromosom 13 vorlag oder dass die CGH in der telomerischen Region im langen Arm von Chromosom 13 diese

Deletion nicht nachweisen konnte. Erschwerend kommt hinzu, dass die del(13)(q32) in nur 26 % (6/23) der Metaphasen vorlag. Gegen das erste Argument spricht jedoch, dass das Ergebnis der CC mit einer FISH-Sonde aus dieser Region bestätigt wurde. Gegen den zweiten Erklärungsansatz spricht dagegen, dass die vorhandene hyperdiploide maligne Zell-Linie in der CC ebenfalls nicht detektiert wurde. Denkbar wäre, dass mehrere Zell-Linien gleichen klonalen Ursprungs nebeneinander vorlagen. Die Deletion 13q, die nur in der CC detektiert wurde, könnte die primäre Aberration darstellen. Die Zell-Linie, die in der CGH erfasst wurde, könnte die klonale Evolution des Karyotyps repräsentieren, wobei die Deletion 13q auf Grund der telomernahen Lokalisation nicht identifiziert werden konnte. Der Fall Nr. 1215 ergab sowohl in der CC als auch in der CGH einen hyperdiploiden, komplex veränderten Chromosomensatz. In Bezug auf Veränderungen, die die Chromosomen 3, 4, 11, 21 und 22 betrafen, zeigte sich eine Konkordanz beider Methoden. Zusätzliche Informationen konnten in Bezug auf die Region 9p13-pter und Chromosom 7 erhalten werden, die nach dem CGH-Ergebnis amplifiziert vorlagen. Die CC zeigte dagegen eine Trisomie 9 und eine Translokation mit Beteiligung von Chromosom 7. Derivatchromosomen, die aus balancierten Translokationen hervorgegangen sind, können dagegen mit der CGH nicht identifiziert werden, was einen limitierenden Faktor dieser Methode darstellt. Das der(8) und das der(13) wurden daher nur in der G-Bandenanalyse gesehen. Dieser Fall verdeutlicht, dass die CGH insbesondere bei komplexen Chromosomenaberrationen zusätzliche Informationen liefern und zur exakteren Aufklärung des Karyotyps beitragen kann. Im Fall Nr. 1848 konnte mit der CGH der Verlust von Chromosom 16 und der Zugewinn von Chromosom 19 nicht detektiert werden. Außerdem konnte das Markerchromosom mit der CGH nicht näher charakterisiert werden. Chromosom 19 kann bei der CGH-Auswertung auf Grund des häufigen Auftretens von Artefakte nicht berücksichtigt werden. In Bezug auf die Monosomie 16 ist denkbar, dass sich Chromosom 16 Material innerhalb des Markerchromosoms befindet. Eine Übereinstimmung zeigte sich jedoch in der Detektion der Trisomien 5, 9 und 11 mit beiden Methoden.

#### **4.2.3 Zugewinne und Verluste bei Myelompatienten**

Obwohl hämatologische Neoplasien bisher mit der CGH weniger gut untersucht worden sind als solide Tumore, belegen doch eine Reihe von Studien, dass hämatologische Erkrankungen von den Erkenntnissen der CGH profitieren (Bentz et al., 1995; Bentz et al., 1996; Joos et al., 1996; Avet-Loiseau et al., 1997b; Paszek-Vigier et al., 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 57 Myelompatienten mit der CGH auf das Vorliegen von DNA-Zugewinnen und Verlusten untersucht. Nach Auswertung der CGH-Daten wurden bei

46 % (26/57) der untersuchten Fälle chromosomale Imbalancen festgestellt. In die Auswertung gingen ausschließlich Aberrationen ein, die mittels der FISH überprüft worden waren. Die bisher publizierten Studien von CGH-Analysen beim MM und verwandten Erkrankungen detektierten genetische Alterationen mit einer Frequenz von 70-100 % (Avet-Loiseau et al., 1997a; Cigudosa et al., 1998; Aalto et al., 1999; Gutierrez et al., 2001). Die Diskrepanz dieser Resultate ist ursächlich darauf zurückzuführen, dass zum einen überwiegend Patienten in die Studien eingeschlossen wurden, die in der CC bereits komplexe Aberrationen zeigten und/oder sich in einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium befanden, z.B. PZL-Patienten. Zudem wurden bei Avet-Loiseau et al. auch Zell-Linien eingeschlossen, die in jedem Fall chromosomale Veränderungen tragen (Avet-Loiseau et al., 1997a). Die Studie von Aalto et al. bezog sich ausschließlich auf Plasmazytome, dessen Untersuchungsmaterial eine direkte Tumorbiopsie aus Bereichen wie der Hirnhaut, der Haut, der Mundhöhle, der Muskulatur etc. mit über 80 % Tumorzellen darstellte (Aalto et al., 1999). Die aktuellste Studie von Gutierrez et al. verwendete Material, das mittels immunmagnetischer Separationstechnik angereichert worden war (Gutierrez et al., 2001). Diese Anreicherungsverfahren stellt einerseits ein sehr aufwändiges Verfahren dar, umgeht andererseits die Problematik eines zu niedrigen Plasmazellanteils. In der vorliegenden Studie lag der Plasmazellgehalt im Median in der Gruppe der CGH-Fälle mit normalem Profil bei 23 % und bei den Fällen mit verändertem Profil bei 45 %. Für die Detektion von Zugewinnen/Verlusten in der CGH ist ein möglichst hoher Anteil von malignen Zellen vorteilhaft. Außerdem wiesen die Patienten mit Veränderungen in der CGH im Vergleich zu denen mit normalem CGH-Profil einen erhöhten  $\beta$ 2-M-Spiegel auf (2,2 mg/l  $\leftrightarrow$  4,5 mg/l). Dies bestätigt die Tendenz, die auch bei der CC festgestellt wurde. Einschränkend ist zu sagen, dass dennoch bei einem normalem CGH-Profil nicht in jedem Fall von einem unveränderten Genom der Plasmazellen ausgegangen werden kann. Das Vorliegen von Translokationen oder kleinen Aberrationen ist möglich.

Ein Großteil der mit der CGH nachgewiesenen genetischen Alterationen dieser Arbeit deutete auf das Vorliegen komplexer Chromosomenveränderungen hin, da sich häufig mehr als drei Aberrationen pro Fall zeigten. Dies entsprach dem zytogenetischen Muster, das nach CC-Studien bei Myelompatienten festgestellt wurde (Gould et al., 1988; Weh et al., 1993; Lai et al., 1995; Calasanz et al., 1997; Smadja et al., 1998). Auch die konventionellen zytogenetischen Ergebnisse dieser Arbeit zeigten bei den MM-Patienten häufig komplexe Veränderungen. Zugewinne ganzer Chromosomen fanden sich mit abnehmender Häufigkeit insbesondere für die Chromosomen 11, 9, 3, 5, 7, 8 und 15. Die bisher publizierten CGH-Studien identifizierten verschiedene Trisomien beim MM. Die als Trisomie vorkommenden Chromosomen stimmten in den verschiedenen CGH-Studien nicht in jedem Fall überein. Während bei Avet-Loiseau et al.

(1997a) besonders Trisomien der Chromosom 7 und Chromosom 8 vorkommen, beschreiben Aalto et al. (1999) und Gutierrez et al. (2001) die Trisomie 15. Cigudosa et al. (1998) stellte dagegen Trisomien von Chromosom 19 und 22 fest. Trisomien wurden bei Myelompatienten in CC-Studien und in FISH-Untersuchungen mittels zentromerspezifischer Sonden nachgewiesen, obwohl mit der FISH nicht in jedem Fall zwischen partiellen und vollständigen Trisomien unterschieden werden konnte (Drach et al., 1995; Flactif et al., 1995; Tabernero et al., 1996; Zandecki et al., 1996; Pérez-Simón et al., 1998; García-Sanz et al., 1999; Avert-Loiseau et al., 2001).

#### **4.2.3.1 Chromosom 7, 8 und 15**

Trisomien/Tetrasomien der Chromosomen 7, 8 und 15q wurden in dieser Studie bei jeweils drei der untersuchten Patienten gefunden. Amplifikationen von 15q, 15q15-q21 und 15q24 wurden bei Myelom-Patienten und -Zell-Linien (Avert-Loiseau et al., 1997a; Gutierrez et al., 2001) beschrieben. Potentielle Kandidatengene in dieser Region sind bisher nicht bekannt. Die Region 15q wurde bislang nicht als typische Aberration beim MM beschrieben. Trisomien/Tetrasomien dieser Chromosomen wurden vorwiegend im Rahmen hyperdiploider Karyotypen beim MM/PZL beobachtet (Heim & Mitelman, 1995; Pratt, 2002).

Das Auftreten der von Cigudosa et al. (1998) in der CGH-Studie bei Myelompatienten beschriebenen Trisomie 19, konnte im Rahmen dieser Studie nicht nachvollzogen werden.

#### **4.2.3.3 Chromosom 9**

In der Literatur wurde in zwei CGH-Studien lediglich die Amplifikation des langen Arms von Chromosom 9 (Aalto et al., 1999; Gutierrez et al., 2001) oder die Region 9q34 als hochamplifizierter Bereich gesehen (Gutierrez et al., 2001). Zugewinne der Regionen 9p bzw. des gesamten Chromosoms 9 wurden mittels der CGH in nur wenigen malignen Erkrankungen detektiert. Häufiger traten Amplifikationen dieser Bereiche in Tumoren der Hypophyse (Daniely et al., 1998; Hui et al., 1999; Metzger et al., 1999), in Medulloblastomen (Schutz et al., 1996; Bayani et al., 2000) und in Lymphomen (Scarpa et al., 1999; Joos et al., 2000; Bentz et al., 2001) auf. Zugewinne in der Region 9p wurden von Bentz et al. in einer CGH-Studie von 43 Patienten mit primär mediastinalen B-Zell-Lymphom (MBL) gesehen (Bentz et al., 2001). Diese Erkrankung wird wie das MM bei den B-Zell-Lymphomen eingeordnet und stellt einen Subtyp der diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome dar (Jaffe et al., 2001). Die MBL zeigten neben Zugewinnen von Chromosom X und 12, Amplifikationen der Region 9p sowie in 50 % der untersuchten Fälle

Zugewinne eines gesamten Chromosoms 9 (Joos et al., 1996; Bentz et al., 2001). Ein Vergleich der CGH-Daten von 308 Non-Hodgkin-Lymphom Patienten anderer Entitäten ergab einen Zugewinn von 9p bei lediglich 6 Fällen (Bentz et al., 2001). In einer CGH-Studie von 12 Hodgkin-Lymphom-Patienten zeigten 4 Patienten eine Amplifikation der Region 9p (Joos et al., 2000). Als Kandidatengene, die in der Tumorgenese eine Rolle spielen könnten und in der Chromosomenregion 9p23-p24 lokalisiert sind, kommen die Gene *JAK2* (*janus kinase 2*) und *NFIB* (*nuclear factor I/B*) in Betracht. *JAK2* ist in der Chromosomenregion 9p24 lokalisiert (Pritchard et al., 1992) und besteht aus 24 Exons. *JAK2* codiert für eine Tyrosinkinase, die in der Lage ist, Transkriptionsfaktoren der *STAT*-Genfamilie zu phosphorylieren, damit zu aktivieren und dadurch Zellwachstum- und Differenzierungsprozesse zu beeinflussen (Saltzman et al., 1998; Weber-Nordt et al., 1998). Gene der *STAT*-Familie insbesondere *STAT5* werden in einer Reihe von hämatologischen Neoplasien aktiviert (Schwaller et al., 2000). Außerdem ist *JAK2* in Translokationen wie z.B. der t(9;12)(p24;p13) involviert, die in lymphoiden und myeloischen Neoplasien vorkommen (Lacronique et al., 1997; Peeters et al., 1997). *JAK2* fusioniert hier mit dem Oncogen *ETV6* (*ETS variant gene 6*), das auch als *TEL* bezeichnet wird. Das chimäre Genprodukt, das aus dieser Translokation resultiert, stellt eine kontinuierlich aktivierte Kinase mit Transformationsaktivität dar (Lacronique et al., 1997).

*NFIB* ist in der Region 9p24.1 lokalisiert (Qian et al., 1995), hat eine Größe von 226,35 kb und besteht aus 9 Exons. *NFIB* codiert für ein 47,5 kDa schweres Protein, das zur Genfamilie der nukleären-Faktor-1-Transkriptionfaktoren gehört. Das *NFIB*-Gen ist in Translokationen und anderen Veränderungen involviert, die in pleomorphen Adenomen der Speicheldrüsen vorkommen (Geurts et al., 1998), wie z.B. der t(9;12)(p24.1;q13q15) und der ins(9;12)(p23;q12q15).

Ein weiteres Kandidatengen stellt *PAX5* (*paired box gene5*) dar, das zuerst in der Maus identifiziert wurde (Walther et al., 1991) und durch FISH der Chromosomenregion 9p13 zugeordnet werden konnte (Stapleton et al., 1993). *PAX5* hat eine Größe von 195,95 kb mit 10 Exons und codiert für ein B-Zell-Linien-spezifisches aktivierendes Protein (BSAP). BSAP mit einer relativen Molmasse von 42,1 kDa fungiert als Transkriptionsfaktor und wird in der frühen Phase der B-Zell-Differenzierung exprimiert. Nutt et al. (1999) wiesen in der Maus eine Allelspezifische Regulation während der B-Zell-Entwicklung nach. In den frühen Vorläuferzellen und reifen B-Zellen wird *PAX5* vorwiegend von einem Allel exprimiert, wogegen es in unreifen B-Zellen zu einer biallelischen Transkription kommt. *PAX5* ist zudem in der t(9;14)(p13;q32) involviert, die bei verschiedenen Lymphomen vorkommt. Neben dem *PAX5*-Gen ist hier zudem das *IgH*-Gen in der Region 14q32 betroffen (Ohno et al., 1990; Busslinger et al., 1996). Ursprünglich wurde diese Translokation mit Lymphomen assoziiert, die einen niedrigmalignen,

reifen B-Zell-Phänotyp mit plasmazytoider Differenzierung zeigten wie z.B. dem lymphoblastischen Lymphom, dem multiplen Myelom, der Plasmazell-Leukämie und der chronischen lymphatischen Leukämie (Offit et al., 1992; Iida et al., 1996).

Bezüglich der Trisomie 9 und anderer Trisomien wurde von Pérez-Simón et al. die These vertreten, dass diese beim MM einen prognostisch günstigen Faktor darstellen. Als Erklärungsansatz nennen sie die Tumorsuppressorgene *p16* und *p15* in der Chromosomenregion 9p21 als bedeutsam (Pérez-Simón et al., 1998). Die Proteine p16 und p15, benannt nach ihrer relativen Molmasse, fungieren als Inhibitoren der Cyclin D1 Kinase-Inhibitoren (CDK4 und CDK6), woraus ein Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase resultiert. Die Gene *p16* und *p15* unterliegen beim MM häufig einer Hypermethylierung und damit einer Deaktivierung (Ng et al., 1997). Dies ermöglicht den Plasmazellen den Übergang in die S-Phase. Liegt eine Trisomie 9 vor könnte durch die zusätzlich vorhandenen funktionsfähigen *p15* und *p16* Gene die Menge an nichtmethylierten Genkopien steigen. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass es zu einer normalen Interaktion zwischen den Tumorsuppressorgenen *p15/p16* und dem Komplex CDK4/6-Cyclin D1 kommt. Dieser Zustand führt dazu, dass der Zellzyklus der malignen Plasmazellen in der G1-Phase arretiert wird. Daraus könnte das bessere Gesamtüberleben der Patienten mit einer Trisomie 9 resultieren (Pérez-Simón et al., 1998). Die Patienten dieser Arbeit, die in der CGH einen Zugewinn in Chromosom 9 zeigten, wiesen dagegen keinen höheren oder niedrigeren  $\beta$ 2-M-Spiegel auf als die Patienten mit anderen Aberrationen in der CGH.

#### 4.2.3.2 Chromosom 11

In der vorliegenden Studie wies Chromosom 11 bei 9 von 57 Fällen die höchste Frequenz von Zugewinnen eines ganzen Chromosoms auf. In der Literatur wurden beim MM bisher vorwiegend Zugewinne des langen Arms von Chromosom 11 gesehen. Die Frequenz der Detektion von 11q-Zugewinnen lag zwischen 20 und 44 %, wobei Aalto in seiner CGH-Untersuchung auch Zugewinne des gesamten Chromosoms 11 gesehen hatte (Avet-Loiseau et al., 1997a; Cigudosa et al., 1998; Aalto et al., 1999; Gutierrez et al., 2001). Die Hälfte der 11q-Zugewinne stellten hier Zugewinne des gesamten Chromosoms 11 dar. Avet-Loiseau et al. vertraten die These, dass die CGH-Ergebnisse entgegen den FISH-Resultaten (Drach et al., 1995) für eine Amplifikation des langen Arms von Chromosom 11 und gegen eine vollständige Trisomie 11 sprächen (Avet-Loiseau et al., 1997a). Diese These lässt sich durch die vorliegende Studie nicht stützen. Bei zwei Fällen wurde zudem das Auftreten einer Tetrasomie von Chromosom 11 beobachtet. Drach et al. (1995) konnten in ihren Untersuchungen jedoch keinen partiellen Zugewinn von Chromosom 11 ausschließen, da sie ihre Daten anhand von Analysen mit zentromerspezifischen Sonden



gewonnen hatten. Der Zugewinn des gesamten Chromosoms 11 wurden in CGH-Studien bei malignen Tumoren unterschiedlichster Entitäten detektiert. Identifiziert wurden Zugewinne des gesamten Chromosoms 11 bei Kopf-Hals-Tumoren (Komiyama et al., 1997), Ösophaguskarzinomen (Tada et al., 2000), Tumoren des ZNS (Kros et al., 1999; Jeuken et al., 2001) und Lymphomen (Monni et al., 1996; Barth et al., 1998; Rickert et al., 1999).

Ein Onkogen auf Chromosom 11 stellt *H-RAS* (*harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*) in der Chromosomenregion 11p15.5 dar. *H-RAS* gehört zur *RAS*-Genfamilie (*H-RAS*, *K-RAS*, *N-RAS*). Die *RAS*-Gene codieren für drei membranassoziierte Guanosinetriphosphatasen (GTPasen), die in Signalwegen verschiedenster Wachstumsfaktoren involviert sind. *RAS*-Proteine spielen bei der Signalübertragung von Tyrosinkinase eine zentrale Rolle. *RAS*-Gene gehören zu den Genen, die in menschlichen Tumoren am häufigsten mutiert sind und betreffen sowohl solide als auch hämatologische Tumore. Mutationen der *RAS*-Gene wurden in 39 % der neu diagnostizierten MM detektiert, wobei die Frequenz mit dem Progress der Erkrankung steigt. *RAS*-Mutationen sind mit einem schlechten klinischen Verlauf assoziiert. Der Großteil der Studien in Bezug auf *RAS*-Mutationen beim MM wurde bisher an *K-RAS* (*kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog*) und *N-RAS* (*neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog*) durchgeführt und eine Unabhängigkeit von IL-6 und einer Supprimierung der Apoptose festgestellt. Es wurde die These postuliert, dass in einem frühen Erkrankungsstadium, in dem die Myelomzellen von IL-6 abhängig sind, die parakrine Sekretion von IL-6 im Knochenmarkkompartiment den *RAS*-Signalweg aktiviert. (Portier et al., 1992; Corradini et al., 1993; Pratt, 2002).

Ein weiteres Gen, das bei Leukämien und Lymphomen der B-Zellreihe von Bedeutung ist, ist das *BCL1*-Gen (*B-cell leukemia/lymphoma 1*), das auch als *CCND1* (*cyclin D1*) und als *PRAD1*-Gen (*parathyroid adenomatosis 1*) bezeichnet wird (Motokura et al., 1991; Rosenberg et al., 1991). *BCL1* ist in der Region 11q13 lokalisiert und codiert für das Protein cyclin D1, das in die Kontrolle des Zellzyklus involviert ist. Abhängig vom Zellzyklus wird *BCL1* in der G1-Phase maximal und in der S-Phase minimal exprimiert und steuert über eine Komplexbildung von cyclin D1 mit *CDK4* (*cyclin dependent kinase 4*) den Übergang von der G1- in die S-Phase. Im Rahmen der Onkogenese führt die Überexpression von *BCL1* zur Beschleunigung des Überganges in die G1-Phase (Hunter & Pines, 1994). Eine Überexpression von cyclin D1 wird außer in B-Zell-Lymphomen (Rosenberg et al., 1991; Bosch et al., 1994; Rimokh et al., 1993) in Adenomen der Nebenschilddrüse (Motokura et al., 1991) sowie in Mamma-, Ösophagus- und Magenkarzinomen (Hunter & Pines, 1994) beobachtet. Die Überexpression von cyclin D1 in B-Zell-Lymphomen ist auf die t(11;14)(q13;q32) zurückzuführen, durch die das für cyclin D1

codierende *BCL1*-Gen unter den Einfluß des Immunglobulin-Schwerketten-Enhancers gebracht wird (Withers et al., 1991). Die t(11;14)(q13;q32) gilt für das Mantelzell-Lymphom als typisch, wird aber auch beim MM und der PZL beschrieben (Avet-Loiseau et al., 1998; Fonseca et al., 1998).

#### 4.2.3.4 Chromosom 21

Die Amplifikation von 21q bzw. des gesamten Chromosoms 21 wurden innerhalb von CGH-Studien bei malignen Erkrankungen vergleichsweise selten detektiert. Identifiziert wurden Amplifikationen dieser Bereiche bei Kopf-Hals-Tumoren (Welkoborsky et al., 2000), Mammakarzinomen (Aubele et al., 2000), Urogenitaltumoren (Ottesen et al., 1997; Rosenberg et al., 1999; Verhagen et al., 2000) sowie bei akuten myeloischen (Wilkens et al., 1998; Castuma et al., 2000; Heller et al., 2000) und lymphatischen Leukämien (Karhu et al., 1997; Jarosova et al., 2000). Der Zugewinn von Chromosom 21 stellt bei der kindlichen ALL die häufigste mit der CGH detektierte Veränderung dar. Eine CGH-Studie von 285 ALL-Patienten ergab den Zugewinn von Chromosom 21 in 32 % der Fälle (Jarosova et al., 2000). Ein Gen, das für einen Regulator der normalen Hämatopoese codiert und sich in der Chromosomenregion 21q22 befindet, ist das *AML1*-Gen (*acute myeloid leukemia 1*), das auch als *CBFA2*-Gen (*core binding factor A2*) bezeichnet wird. 1991 wurde festgestellt, dass *AML1* für ein Protein codiert, das eine DNA-bindende Untereinheit des Transkriptionskomplexes *AML1/CBFB*-Core-bindender-Faktor darstellt (Miyoshi et al., 1991). Dieser Transkriptionskomplex stellt einen wichtigen Regulator der normalen Hämatopoese dar. Es wurden Amplifikationen des *AML1*-Gens bei Patienten mit ALL gesehen (Busson-Le Coniat et al., 2001; Dal Cin et al., 2001). Zudem wurde mittels FISH eine Hochamplifikation des *AML1*-Gens innerhalb eines Markerchromosoms bei einem Fall mit kindlicher ALL beschrieben (Morel et al., 2002). *AML1* ist ferner in die t(12;21)(p13;q22) involviert, die das häufigste Rearrangement mit einer Frequenz von 20-25 % bei kindlicher B-Vorläufer-ALL darstellt (Golub et al., 1995; Romana et al., 1995; Shurtleff et al., 1995).

Ein weiteres Onkogen der Region 21q ist das *ERG*-Gen (*v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene related*), das in der Chromosomenregion 21q22 lokalisiert ist. *ERG* gehört zur *ETS*-Onkogen-Familie, die für eine Gruppe von Proteinen codieren, die wiederum als Transkriptionsfaktoren fungieren (Delattre et al., 1992). *ERG*-Proteine kommen in verschiedenen Isoformen vor und bilden *in vitro* Homo- und Heterodimerkomplexe (Carrere et al., 1998). *ERG* ist in die t(16;21)(p11;q22) involviert, die bei der AML und der CML in der „Blastenkrise“ (Ichikawa et al., 1994) sowie in Zusammenhang mit der t(21;22)(q22;q12) beim Ewing-Sarkom (Zucman et al., 1993) beschrieben wurde.

#### 4.2.3.5 Chromosom 13 und 22

Verluste ganzer Chromosomen betrafen besonders häufig (10 %, 6/57 Fälle) das Chromosom 22. In drei der vier veröffentlichten CGH-Studien beim MM wurde der Verlust von Chromosom 22 oder 22q beschrieben, jedoch mit einer Frequenz von weniger als 10 bzw. 20 % (Cigudosa et al., 1998; Aalto et al., 1999; Gutierrez et al., 2001). Eventuell relevante Tumorsuppressorgene, die in dieser Region lokalisiert sind und bei lymphoiden Neoplasien oder Plasmazellneoplasien von Bedeutung sein könnten, wurden bisher nicht beschrieben. Häufiger wurde in der Literatur der Verlust von Chromosom 13 oder 13q, der mittels CGH festgestellt wurde, beschrieben. Im Rahmen dieser Studie wurde eine Monosomie 13 nur in einem Fall (Nr. 781) detektiert. In einem weiteren Fall (Nr. 499) wurde außerdem eine Deletion in der Region 13q12-q14 nachgewiesen. In den Fällen Nr. 680 und 956 konnte eine mit der FISH nachgewiesene Deletion im langen Arm von Chromosom 13 in der CGH nicht identifiziert werden, obwohl diese mit der FISH in ca. 50 % der Interphasekerne detektiert wurde. Dies ließe vermuten, dass diese Deletionen sehr klein waren und unterhalb der Nachweisgrenze der CGH (10 Mb) lagen. Das vermehrte Auftreten einer Monosomie 13 bzw. einer Deletionen im langen Arm von Chromosom 13 wurde bisher in verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Methoden nachgewiesen und als biologisch relevant und prognostisch ungünstig eingestuft (Tricot et al., 1995; Pérez-Simón et al., 1998). Das *RBI*-Gen (**R**etinoblastom **1**-Gen) in der Region 13q14 wird in einigen B-Zell-Neoplasien als ein für die Tumorgenese relevantes Gen beschrieben (Morris et al., 1991; Liu et al., 1993; Dao et al., 1994). Das Vorhandensein weiterer bekannter oder bisher unbekannter Tumorsuppressorgene auf Chromosom 13 ist jedoch denkbar, da häufig das gesamte Chromosom 13 oder andere Teilbereiche deletiert vorliegen (Aalto et al., 1999). Als potentielle Tumorsuppressorgene, die in die Pathogenese von Myelomzellen involviert sein könnten, wurde u.a. das Gen *DBM* genannt (Dao et al., 1994; Hallek et al., 1998; Pérez-Simón et al., 1998; Chang et al., 1999). Das Tumorsuppressorgen *DBM* (*disrupted in B cell neoplasia*) ist in der Region 13q14.2-q14.3 lokalisiert und wird auch mit dem Synonym TSG13B (*tumor suppressor gene chromosome 13*) bezeichnet. Deletionen des *DBM*-Gens wurden bei Patienten mit B-CLL (Brown et al., 1993; Newcomb et al., 1995; Garcia-Marco et al., 1997), prolymphozytischer T-Zell-Leukämie (Soulier et al., 2001), Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals Region (Mastero et al., 1996) und akuter lymphatischer Leukämie (ALL) festgestellt (Liu et al., 1995). Außerdem ist dieses Gen in Translokationen und Deletionen beim MM involviert (Dao et al., 1994; Hallek et al., 1998; Pérez-Simón et al., 1998; Chang et al., 1999). Zudem wurde in Bezug auf *DBM* ein Heterozygotieverlust (LOH, *loss of heterozygosity*) bei Prostatakarzinomen (Melamed et al., 1997; Yin et al., 1999) und Plattenepithelkarzinomen der Haut (O'Connor et al.,

2001) gesehen. Als weitere Kandidatengene, die bei der Leukämogenese von B-Zellen insbesondere der B-CLL eine Rolle zu spielen scheinen, kommen *DLEU1* (*deleted in lymphocytic leukemia 1*) und *DLEU2* (*deleted in lymphocytic leukemia 2*) in Betracht. Beide Gene sind in der Chromosomenregion 13q14.2-q14.3 lokalisiert, die bei mehr als 40 % der B-CLL-Patienten deletiert vorliegt (Liu et al., 1995). *DLEU1* ist 23,1 kb groß, beinhaltet zwei Exons und codiert für ein 8,2 kDa schweres Protein. *DLEU2* ist 38,54 kb groß, besteht aus fünf Exons und codiert für ein Protein mit einem Gewicht von 10,2 kDa. Beide Gene codieren für Proteine, die als Tumorsuppressoren zu wirken scheinen. Die gemeinsame deletierte Region bei der B-CLL wurde auf 400 kb eingegrenzt, die *DLEU1* und *DLEU2* beinhalten, obgleich ein pathogenetischer Zusammenhang bisher nicht geführt werden konnte. Liu et al. (1997) zeigten, dass bei B-CLL-Patienten mit einer del(13)(q14) Teile von *DLEU1* und 2 entweder homozygot oder heterozygot deletiert vorlagen. Sie wiesen für Exon 1 von *DLEU1* und 2 homozygote Deletionen nach, wogegen der übrige Teil der Gene entweder nur heterozygot oder gar nicht deletiert war. Diese Arbeitsgruppe beschrieb damit die Größe der kleinsten relevanten Region der Deletion mit nur 10 kb. Rondeau et al. (1999) schlossen dagegen *DLEU1* und 2 als Tumorsuppressorgene für 13q14.3 deletierte B-CLL-Patienten aus. Wolf et al. (2001) vertraten dagegen die These, dass *DLEU1* nur einen kleinen Teil eines großen Gens darstellt, das sie als *BCMS*-Gen bezeichneten (*designated B-cell neoplasia-associated gene with multiple splicing*).

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit weitaus mehr DNA-Zugewinne als Verluste beobachtet. Gleiches stellten auch Gutierrez et al. in ihren CGH-Untersuchungen fest (Gutierrez et al., 2001). Bisher konnte jedoch keine spezifische numerische Veränderung identifiziert werden.

## 4.3 FISH

### 4.3.1 Aberrationen der Region 14q32.3

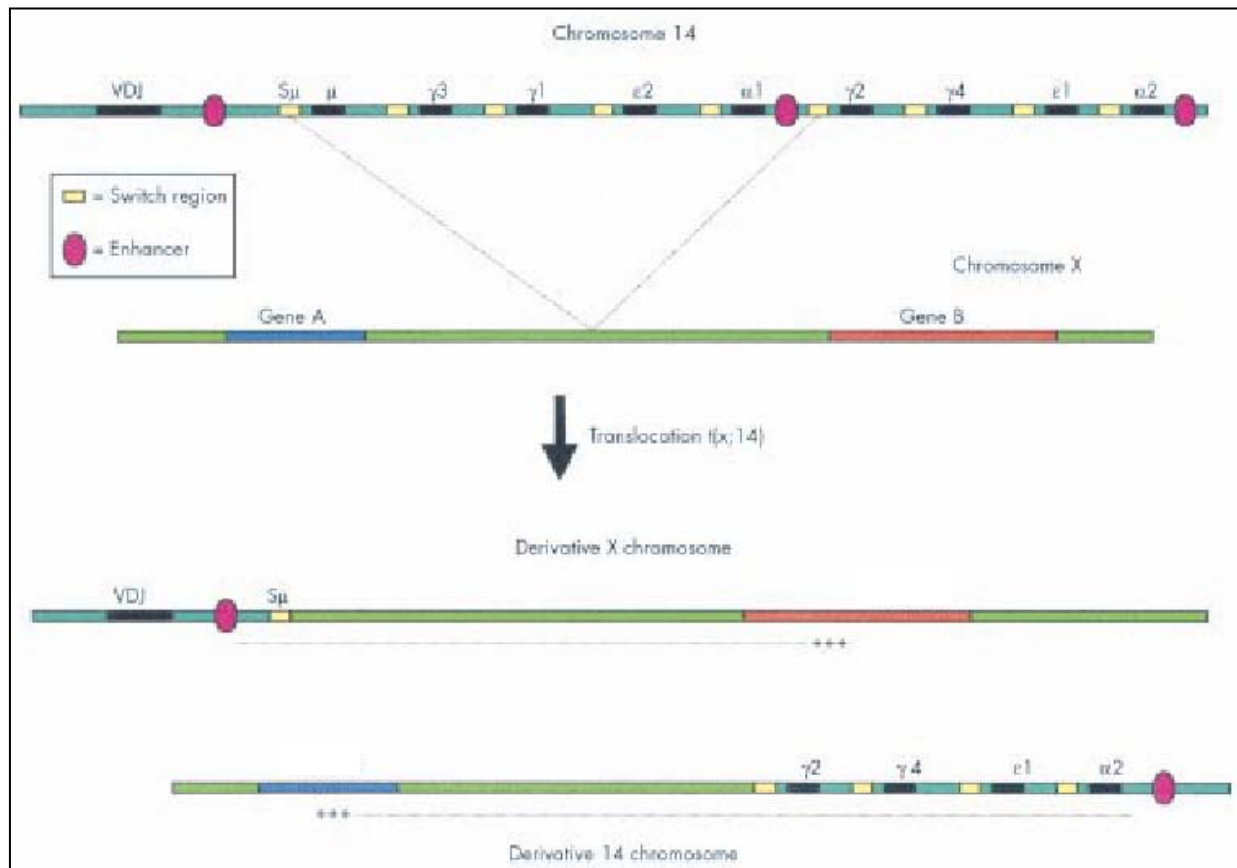
Translokationen mit Beteiligung des Immunglobulin-Schwerkettenlocus (IgH-Locus) in der Chromosomenregion 14q32 stellen mit großer Wahrscheinlichkeit ein entscheidendes, frühes Ereignis in der Pathogenese des MM dar (Bergsagel & Kuehl, 2001). Es wurden unterschiedliche Chromosomen als Translokationspartner des IgH-Locus identifiziert. In der Regel wird das Auftreten von IgH-Translokationen in der CC unterschätzt, was mehrere Ursachen haben kann. Zum einen können auf Grund des niedrigen mitotischen Indexes der Myelomzellen *in vitro* nur wenige Mitosen maligner Zellen erhalten werden, zum anderen werden häufig sehr komplexe Aberrationen gesehen, die eine exakte Identifizierung der Chromosomen erschweren. Zudem liegt der IgH-Locus in der telomerischen Region von Chromosom 14 und viele Bruchpunkte der

Translokationspartner befinden sich in telomerischen bzw. subtelomerischen Bereichen wie z.B. in den Regionen 4p16, 6p25, 16q23, so dass solche kryptische Translokationen schwierig zu erfassen sein können (Bergsagel & Kuehl, 2002). Außerdem können kleine Deletionen oder Duplikationen auf Grund ihrer geringen Größe in der CC nicht gesehen werden. Eine Lösung dieser Probleme wurde durch den Einsatz der FISH-Methodik erreicht. Anhand von FISH-Analysen mit DNA-Sonden, die den 1 Mb großen IgH-Locus flankieren und bei dem Vorliegen einer Translokation ein Splittsignal in zwei Fluoreszenzfarben liefern, wurde eine größere Anzahl von 14q32-Aberrationen beim MM erfasst (Bergsagel et al., 1996; Bergsagel & Kuehl, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurden 116 Myelompatienten mittels FISH auf 14q32-Aberrationen untersucht, wobei Veränderungen im IgH-Locus mit einer Frequenz von 29 % (34/116) detektiert wurden. Translokationen mit Beteiligung der Region 14q32 wurden bei 18 % (21/116) der untersuchten Patienten festgestellt. In der CC wurden dagegen lediglich bei 2,5 % (3/126) der untersuchten Patienten Veränderungen mit Beteiligung der Region 14q32 beobachtet. Die Inzidenz der IgH-Translokationen nimmt mit höherem Erkrankungsstadium zu: 50 % der MGUS, 60-65 % der intramedullären MM, 70-80 % der extramedullären MM und >90 % der MM-Zell-Linien zeigen IgH-Translokationen (Bergsagel et al., 1996; Bergsagel & Kuehl, 2002). Translokationen im Immunglobulin-Leichtkettenlocus sind weitaus seltener: Igλ-Translokationen treten bei ~10 % der MGUS- und bei 20 % der MM-Patienten auf. Igκ-Translokationen sind sehr selten (Kuehl & Bergsagel, 2002). Als Translokationspartner des IgH-Locus kommen eine Vielzahl von Chromosomenregionen in Frage, jedoch wurden einige Gengruppen beschrieben, die am häufigsten von IgH-Translokationen betroffen sind (Bergsagel & Kuehl, 2002):

1. 11q13 (cyclin D1), 6p21 (cyclin D3) und 12p13 (cyclin D2) werden in 20 % der Tumore als Partnerloci von 14q32 gesehen.
2. 4p16 (*MMSET*, *nuclear set domain protein* und *FGFR3*, *fibroblast growth factor receptor 3*) werden in ~15 % der Tumore als Partnerloci von 14q32 gesehen.
3. 16q23 (*c-MAF*) (*musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog*) und 20q11 (*MAFB*) (*musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B*) (B-Zip-Transkriptionfaktoren) werden in 10 % der Tumore als Partnerloci von 14q32 gesehen.

Als wiederholt auftretende rekurrente Translokationen werden folgende Aberrationen beschrieben: t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16;q32), t(6;14)(p21;q32) und t(14;16)(q32;q23). Sie werden als primäre Translokationen angesehen, wogegen weniger zahlreich auftretende rekurrente Partnerloci von IgH, wie die t(8;14)(q24;q32), t(14;18)(q32;q21) und andere meist komplexere Aberrationen beim MM für sekundäre Ereignisse sprechen (Pratt, 2002). Sekundäre Translokati-

onen, die z.B. die Region 8q24 mit dem *c-MYC*-Locus betreffen, haben keinen Einfluss auf die Störung der B-Zell-spezifischen-DNA-Modifikationsmechanismen (Bergsagel & Kuehl, 2001). Im Rahmen dieser Studie wurden bei 21 % (24/116) des Patientenkollektivs mit der FISH zumeist Deletionen oder Duplikationen im Immunglobulin-Schwerkettenlocus gesehen, die demnach als sekundäre Veränderungen, die im Laufe der Progression der Erkrankung auftreten, gewertet werden können. In FISH-Studien zeigte sich jedoch bei wenigen Patienten das Vorliegen einer nicht reziproken Translokation, so dass nicht in jedem Fall von einem reziproken Ereignis bezüglich der IgH-Translokationen ausgegangen werden kann (Pratt, 2002). Anhand einer Myelomzell-Linie wurde auch gezeigt, dass ein Teil der IgH-Region als Insertion in der Region 11q13 vorliegen kann, woraus eine Überexpression des Cyclin-D1-Onkogens resultiert (Gabrea et al., 1999). Zudem wurden von anderen Autoren Deletionen im IgH-Locus gesehen (Pratt, 2002). In Anbetracht dieser Beobachtungen wurde die These aufgestellt, dass das Auftreten dieser IgH-Aberrationen für die Instabilität der „Switch-Region“ im MM spricht und dass die Dysregulation von Genen neben den Translokationen auch von Deletionen oder Insertionen in der IgH-Region ausgelöst werden kann (Pratt, 2002). Bei 9 % (11/116) der Patienten traten neben der IgH-Translokation zusätzliche Aberrationen mit Beteiligung des Locus 14q32 auf. Dies spricht wahrscheinlich für einen Progress in der Tumorentwicklung. IgH-Translokationen stellen nicht nur ein wichtiges Ereignis beim MM dar, sondern sind bei anderen B-Zell-Neoplasien wie dem Mantelzell-Lymphom (MCL), dem folliculären Lymphom und dem Burkitt-Lymphom von Bedeutung (Korsmeyer, 1992). Auf molekularer Ebene bieten die IgH-Translokationen beim MM jedoch besondere Charakteristika. In der IgH-Region befinden sich drei Enhancer-Sequenzen, die bei der Transkriptionsregulation der B-Zellen von Bedeutung sind:  $E_{\mu}$  (*intronic enhancer*), der sich im Intron zwischen der JH-Region und der  $S_{\mu}$ -Sequenz ( $S_{\mu}$ ) befindet;  $E_{\alpha 1}$  und  $E_{\alpha 2}$  (*3' IgH-enhancer*), die sich stromabwärts der konstanten Gene ( $C_H$ ) der  $\alpha$ -Region befinden (Max, 1999). Beim MM finden die Bruchereignisse in der Regel innerhalb der „Switch-Region“ statt. Die „Switch-Region“ besteht aus nicht-codierenden, hochrepetitiven Sequenzen, die 5' von den  $C_H$ -Genen lokalisiert und an der Umschaltung der Ig-Synthese („Switch“-Rekombination) beteiligt sind. Resultierend aus den reziproken Translokationen in der „Switch-Region“ werden diese Enhancer geteilt und auf jeweils ein derivatives Chromosom übertragen. Dieses führt zur potentiellen Dysregulation von Onkogenen auf beiden Chromosomen (Bergsagel & Kuehl, 2001; Pratt, 2002). Abbildung 4.1 beschreibt am Beispiel einer t(X;14) die Bruchereignisse bei IgH-Translokationen beim MM.



gelbe Balken = Switch Regionen; schwarze Balken = Exons; dunkelgrüne Balken = Introns; rote Elipsen = Enhancer

**Abbildung 4.1: Molekularer Mechanismus der 14q32-Translokationen beim multiplem Myelom am Beispiel einer t(X;14). Die Bruchereignisse finden beim MM innerhalb von zwei „Switch-Regionen“ im IgH-Locus statt, wodurch es zum Verlust der dazwischenliegenden DNA-Sequenzen kommt. Beide Derivatchromosomen erhalten einen Enhancer. Dies führt zur Dysregulation von Genen auf beiden derivativen Chromosomen (aus Pratt, 2002).**

In Bezug auf die prognostische Relevanz von IgH-Translokationen wurden in der jüngsten Zeit Daten vorgestellt, die darauf hindeuten, dass die t(4;14) mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Avet-Loiseau et al., 2002; Moreau et al., 2002). Wie zunächst angenommen wurde besitzt die t(11;14) anscheinend keine ungünstige prognostische Relevanz (Fonseca et al., 1999 und 2002a; Moreau et al., 2002), wie zunächst angenommen wurde (Fonseca et al., 1998; Lai et al., 1998). Moreau et al. assoziierten die t(11;14) mit einem längeren Gesamtüberleben dieser MM-Patienten. Für die Gruppe der Patienten mit 14q32-Translokationen ohne bekannte Partnerchromosomen konnte er dagegen keine spezifische prognostische Entwicklung feststellen. In der gleichen Studie zeigte diese Arbeitsgruppe für die Patienten mit einem  $\beta$ 2-M-Wert über 3,1 mg/l, mit einem IgA-Subtyp oder mit einem Hämoglobinspiegel über 10,9 g/dl ein signifikant kürzeres Überleben (Moreau et al., 2002).

Avet-Loiseau et al. (2002) stellte ebenfalls eine Assoziation zwischen dem  $\beta$ 2-M-Spiegel und den 14q32-Aberrationen her. Insbesondere die Patienten mit einer t(4;14) und einer t(14;16) zeigten überwiegend hohe  $\beta$ 2-M-Werte ( $>3$  mg/dl). Patienten mit einer t(11;14) wiesen dagegen niedrige Werte für das  $\beta$ 2-M auf (Avet-Loiseau et al., 2002). Die MM-Patienten mit 14q32-Aberrationen dieser Arbeit zeigten ebenfalls im Median einen erhöhten  $\beta$ 2-M-Spiegel von 6,9 mg/l, gegenüber der Patientengruppe ohne 14q32-Aberrationen, die im Median einen  $\beta$ 2-M-Spiegel von 2,6 mg/l aufwiesen. Bei der Gesamtzahl aller Patienten lag der  $\beta$ 2-M-Wert bei durchschnittlich 4,3 mg/l. Hier wurde dagegen keine weitere Differenzierung der 14q32-Aberrationen vorgenommen, so dass diese Werte nur als Tendenz zu sehen sind.

### 4.3.2 Deletionen der Region 13q14.3

Die Deletion der Region 13q stellt die häufigste Anomalie beim MM dar. Die Frequenz der 13q-Deletionen steigt mit zunehmender Aggressivität der Plasmazellerkrankung von der MGUS bis zur PZL, was vermuten lässt, dass es sich um ein frühes genetisches Ereignis in der Tumorgenese handelt (Avet-Loiseau et al., 1999b und 2002). Die Region 13q14 scheint die kleinste, gemeinsam deletierte Region bei Myelompatienten zu sein (Kuehl & Bergsagel, 2002). Um das Vorliegen einer Deletion im Chromosom 13 zu überprüfen, wurden innerhalb dieser Arbeit FISH-Analysen an 114 Patienten mit einer Sonde spezifisch für den locus 13q14.3 durchgeführt. Außerdem wurden die Daten der CC in Bezug auf Aberrationen von Chromosom 13 ausgewertet.

Chromosom 13-Aberrationen wurden in der CC bei 32 % (10/31) der Patienten mit aberrantem Karyotyp gesehen. Eine Monosomie 13 lag bei 5 Patienten und eine del(13)(q32) wurde bei einem Patienten festgestellt. Die bisher veröffentlichten CC-Studien beziffern die Frequenz der Monosomie 13 und der Deletion 13q beim MM auf 15-20 % (Dewald et al., 1985; Sawyer et al., 1995; Smadja et al., 1995). Im Rahmen CC-Studien wurde die Detektion einer Monosomie 13 bereits als ungünstiger prognostischer Faktor eingeordnet (Tricot et al., 1995 und 1997).

In dieser Studie zeigte sich mit der FISH eine Deletion 13q14 in 30 % (34/114) der analysierten Fälle. Mittels FISH detektierte Deletionen von 13q werden in der Literatur bei 30-50 % der Patienten gesehen (Juneau et al., 1998; Avet-Loiseau et al., 1999b; Königsberger et al., 2000; Zojer et al., 2000; Facon et al., 2001). Jüngste Studien zur Prognose von MM-Patienten, bei denen eine 13q-Deletion mit der FISH detektiert wurde, zeigten ebenfalls eine schlechte prognostische Entwicklung (Königsberg et al., 2000; Zojer et al., 2000; Facon et al., 2001; Fonseca et al., 2002b). Als aussagekräftigste prognostische Faktoren beim MM werden auf Grund dieser Erkenntnisse das  $\beta$ 2-Mikroglobulin und die 13q-Deletionen genannt (Facon et al.,



2001). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die del(13) unabhängig vom  $\beta$ 2-M-Spiegel mit einer kürzeren Überlebenszeit der Patienten assoziiert wird. Es konnte demnach keine direkte Korrelation zwischen dem  $\beta$ 2-M und dem Vorliegen einer del(13) hergestellt werden (Desikan et al., 2000; Zojer et al., 2000; Facon et al., 2001; Avet-Loiseau et al., 2002). Die klinischen Daten dieser Studie zeigten einen  $\beta$ 2-M-Median von 3,1 mg/l bei den Patienten mit einer del(13). Bei den Patienten ohne del(13) zeigte sich ein  $\beta$ 2-M-Median von 4,5 mg/l und für alle Patienten ein  $\beta$ 2-M-Median von 4,3 mg/l. Eine FISH-Studie mit elf locusspezifischen DNA-Sonden verteilt über den gesamten Bereich 13q ergab, dass die Frequenz von 13q-Deletionen mit 86 % weitaus höher lag als bei FISH-Analysen bei denen nur 1-2 DNA-Sonden verwendet wurden (Shaughnessy et al., 2000). Diese hohe Inzidenz verdeutlicht, dass eine Eingrenzung des deletierten Bereiches, der mit einer ungünstigen Prognose assoziiert werden kann, in weiteren Studien untersucht werden muss. Außerdem ist die Identifizierung von Tumorsuppressorgenen, die für die Entwicklung maligner Plasmazellen von Bedeutung sind, erforderlich. 13q14-Deletionen wurden auch vermehrt bei der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) detektiert. Im Gegensatz zum MM besteht hier allerdings keine Korrelation mit einer ungünstigen Prognose sondern wird als prognostisch günstig eingestuft (Hawthorn et al., 1995; Döhner et al., 1999; Kipps, 2000). Auf Grund dieser Beobachtung wurde postuliert, dass sich in der Region 13q ein für das MM spezifisches Tumorsuppressorgen befindet. Zunächst wurde das *RBI*-Gen in der Region 13q14 als Kandidatengen beim MM genannt. *RBI* codiert für ein nukleäres Phosphoprotein (pRB), das in Zellwachstums- und Differenzierungsprozesse involviert ist. pRB unterdrückt den Übergang von der G1- in die S-Phase im Zellzyklus (Weinberg, 1995). Der Funktionsverlust von *RBI* spielt bei der Entwicklung des Retinoblastoms eine entscheidende Rolle und ist außerdem an der malignen Transformation anderer solider Tumoren beteiligt (Knudson et al., 1993). Anhand von Studien anderer Tumorentitäten zeigte sich, dass zur Eliminierung der Tumorsuppressorfunktion beide *RBI*-Genloci inaktiviert sein müssen (Zandecki et al., 1995a; Juge-Morineau et al., 1997). Beim MM sind jedoch biallelische Deletionen, Inaktivierung durch Mutationen und ein Fehlen der *RBI*-Expression selten (Hallek et al., 1998). Eine andere Art der Inaktivierung des pRB bei Plasmazellneoplasien, z.B. durch Phosphorylierung, ist jedoch denkbar (Urashima et al., 1996). Weitere mögliche Tumorsuppressorgene wurden in dem Abschnitt 4.2.3.5 diskutiert.

### 4.3.3 Korrelation del(13)/14q32.3-Aberrationen

In dieser Studie zeigte sich bei 16 % (18/114) der mittels FISH untersuchten Fälle sowohl ein 14q32-Rearrangement als auch eine Deletion 13q14. In verschiedenen Untersuchungen wurden diese Beobachtungen bestätigt und eine Korrelation von spezifischen 14q32-Translokationen mit 13q-Deletionen festgestellt. Bevorzugt scheint die Deletion 13q mit der t(4;14) und der t(14;16) assoziiert zu sein (Avet-Loiseau et al., 1999a und 2002; Fonseca et al., 2001). Avet-Loiseau stellte auf Grund seiner Erkenntnisse ein Mehrstufenmodell für die Onkogenese der Plasmazelle vor. In diesem Modell werden die 14q32-Translokationen als frühestes genetisches Ereignis in der Entwicklung der malignen Plasmazelle gesehen. Die Deletion 13q wird als sekundäres aber ebenfalls frühes Ereignis in der Tumorgenese eingeordnet, eventuell begünstigt durch 14q32-Translokationen wie t(4;14) oder t(14;16). Dieses Modell geht von zwei unterschiedlichen Gruppen aus: erstens einer Gruppe ohne 14q32-Rearrangements und zweitens einer Gruppe die 14q32-Rearrangements aufweisen. Weiterhin werden beide Gruppen nach dem Auftreten einer 13q-Deletion eingeteilt und zudem nach der Art des Translokationspartners von 14q32. Anhand der Identifikation von 14q32-Translokationen und deren Partnerloci wird versucht ein *de novo* MM und ein sekundäres MM, z.B. nach vorhergehender MGUS, zu unterscheiden (Avet-Loiseau et al., 2002).

Das MM zeichnet ein genetisch sehr heterogenes Bild, das sich jedoch zunehmend auch durch den Einsatz zytogenetischer und molekularzytogenetischer Methoden verstehen lässt. Die Identifizierung und Charakterisierung von weiteren spezifischen zytogenetischen Veränderungen wie bei den akuten Leukämien ist ebenfalls beim MM sinnvoll und könnte bezüglich der Onkogenese, der Therapie und der Verbesserung der Prognose dieser Patienten wertvolle Erkenntnisse liefern.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Das multiple Myelom (MM) stellt eine Neoplasie der terminal differenzierten B-Zellen (= Plasmazellen) dar und ist durch eine starke Vermehrung von identischen Immunglobulinen gekennzeichnet. Wie die meisten hämatologischen Systemerkrankungen treten beim MM Chromosomenaberrationen auf, die bei letzterem meist komplex sind. Die Charakterisierung des genetisch sehr heterogenen Bildes des MM und dessen Einteilung in Subgruppen könnte zum Verständnis der Onkogenese und Verbesserung der Therapiestrategien beitragen. Dies ist zunehmend auch durch den Einsatz zytogenetischer und molekularzytogenetischer Methoden möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Knochenmark von 126 Patienten mit einer Plasmazellerkrankung mit der konventionellen zytogenetischen Analyse (CC), 57 Patienten mit der comparativen genomischen Hybridisierung (CGH) und 114 bzw. 116 Patienten mit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) in der Chromosomenregion 13q14.3 bzw. 14q32.3, untersucht. Bei 28 % der Fälle zeigten sich in der CC meist komplexe Chromosomenaberrationen, wobei die Chromosomen 1, 13 und 14 besonders häufig betroffen waren. Mit der CGH wurden bei 46 % der Fälle Zugewinne und/oder Verluste von genetischem Material festgestellt, wobei ein Großteil der Patienten (48/57) in der CC einen normalen Karyotyp aufwies. Zugewinne ganzer Chromosomen bzw. chromosomaler Teilregionen zeigten sich besonders häufig für die Chromosomen 9/9p, 11 und 21q sowie 3, 5, 7, 8 und 15. Verluste, die deutlich seltener detektiert wurden, betrafen insbesondere die Chromosomen/-region 22/22q und weniger häufig die Region 13q. Die FISH-Untersuchung in der Chromosomenregion 13q14.3 zeigte bei 29 % der Patienten eine Deletion in dieser Region. Die FISH-Analyse im Immunglobulin-Schwerkettenlocus (*IgH*) ergab bei 29 % der untersuchten Patienten Veränderungen mit Beteiligung der Chromosomenregion 14q32.3. Basierend auf den Daten der CGH-Analyse wurden Kandidatengene, die für die Tumorphagenese relevant sein könnten, herausgearbeitet. Diskutiert wurde die Bedeutung von *H-RAS*, *BCL1*, *JAK2*, *NFIB*, *PAX5*, *p16/p15*, *AML1*, *ERG*, *RBI*, *DBM* sowie *DLEU1* und 2 für die Entwicklung maligner Plasmazellen bzw. hämatologischer Neoplasien. Die in dieser Arbeit besonders häufig amplifizierte Bereiche 9p sowie 21q wurden nach unseren Kenntnissen in den bisher publizierten CGH-Studien beim MM nicht beschrieben. Zugewinne von 9p wurden dagegen in einer anderen Lymphomentität, dem primär mediastinalen B-Zell-Lymphom (MBL), als charakteristisch eingestuft. Bei der Deletion 13q14, die einen unabhängigen ungünstigen prognostischen Faktor beim MM darstellt, ist eine weitere Eingrenzung des kleinsten deletierten Bereiches sinnvoll, da dies die Identifizierung von eventuell relevanten Tumorsuppressorgenen erleichtert. *IgH*-Translokationen stellen mit großer Wahrscheinlichkeit ein entscheidendes, frühes Ereignis in der Pathogenese des MM dar.

## 6. LITERATUR

**Aalto Y., Nordling S., Kivioja A.H., Karaharju E., Elomaa I., Knuutila S.** (1999) Among numerous DNA copy number changes, losses of chromosome 13 are highly recurrent in plasmacytoma. *Genes Chrom Cancer* **25**: 104-107

**Abeliovich D., Yehuda O., Ben-Neriah S., Or R.** (1994) Loss of Y chromosome: an age related event of cytogenetic marker of a malignant clone ? *Cancer Genet Cytogenet* **76**: 70-71

**Arnold J.** (1879) Beobachtungen über Kernteilungen in Zellen der Geschwülste. *Virchows Arch Pathol Anat* **78**: 279-301

**Aubele M., Mattis A., Zitzelsberger H., Walch A., Kremer M., Welzl G., Hofler H., Werner M.** (2000) Extensive ductal carcinoma in situ with small foci of invasive ductal carcinoma: evidence of genetic resemblance by CGH. *Int J Cancer* **85**: 82-86

**Avet-Loiseau H., Andree-Ashley L.E., Moore D., Mellerin M.P., Feusner J., Bataille R. and Pallavicini M.G.** (1997a) Molecular cytogenetic abnormalities in multiple myeloma and plasma cell leukemia measured using comparative genomic hybridization. *Genes Chrom Cancer* **19**: 124-133

**Avet-Loiseau H., Vigier M., Moreau A., Mellerin M.P., Gaillard F., Harousseau J.L., Bataille R., Milpied N.** (1997b) Comparative genomic hybridization detects genomic abnormalities in 80 % of follicular lymphomas. *Br J Haematol* **97**: 119-122

**Avet-Loiseau H., Li J.Y., Facon T., Brinaudeau C., Morineau N., Maloisel F., Rapp M.J., Talmant P., Trimoreau F., Jaccard A., Harousseau J.L., Bataille R.** (1998) High incidence of translocations t(11;14)(q12;q32) and t(4;14)(p16;q32) in patients with plasma cell malignancies. *Cancer Res* **58**: 5640-5645

**Avet-Loiseau H., Li J.Y., Morineau N., Morineau N., Facon T., Brigaudeau C., Harousseau J.L., Grosbois B., Bataille R.** (1999b) Monosomy 13 is associated with chromosome 13 abnormalities in both multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* **94**: 2583-2589

**Avet-Loiseau H., Facon T., Daviet A., Godon C., Rapp M.J., Harousseau J.L., Grosbois B., Bataille R.** (1999a) 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. *Cancer Res* **59**: 4546-4550

**Avet-Loiseau H., Daviet A., Brigaudeau C., Callet-Bauchu E., Terré C., Lafage-Pochitaloff M., Désangles F., Ramond S., Talmant P. And Bataille R.** (2001) Cytogenetic, interphase, and multicolor fluorescence in situ hybridization analyses in primary plasma cell leukemia: a study of 40 patients at diagnosis, on behalf of the Intergroupe Francophone du Myélom and the Group Français de Cytogénétique Hématologique. *Blood* **97**: 822-825

**Avet-Loiseau H., Facon T., Grosbois B., Magrangeas F., Rapp M.J., Harousseau J.L., Minvielle S., Bataille R.** (2002) Oncogenesis of multiple myeloma : 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood* **99**: 2185-2191

**Axelsson R., Bachmann R., Hällen J.** (1966) Frequency of pathological proteins (M-components) in 6695 sera from an adult population. *Acta Med Scand* **178**: 801-808

**Baccon L.P., Leroux D., Dascalescu C., Duley S., Marais D., Esmenjaud E., Sotto J.J. and Callanan M.** (2001) Novel evidence of a role for chromosome 1 pericentric heterochromatin in the pathogenesis of B-cell lymphoma and multiple myeloma. *Genes Chromosomes Cancer* **32**: 250-264

**Barth T.F., Dohner H., Werner C.H., Stilgenbauer S., Schlotter M., Pawlita M., Lichter P., Moller P., Bentz M.** (1998) Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in primary large B-cell lymphomas of the gastrointestinal tract. *Blood* **91**: 4321-4330

**Bartl R., Frisch B., Fateh-Moghadam A., Kettner G., Jaeger K., Sommerfeld W.** (1987) Histologic classification and staging of multiple myeloma. *Am J Clin Pathol* **87**: 342-355

**Bartl R., Frisch B., Wilmanns W.** (1995) Morphology of multiple myeloma. Aus: Malpas J.S., Bergsagel D.E., Kyle R.A. *Myeloma, Biology and Management*. Oxford University Press, Oxford New York Tokyo, pp 82-123

**Bartl R., Wilmanns W.** (2000) Multiples Myelom und andere monoklonale Gammopathien. Aus: *Internistische Onkologie*, Thieme-Verlag, 2. Auflage: 431-450

**Bakkus M.H., Heirman C., Van Riet I., Van Camp B., Thielemans K.** (1992) Evidence that multiple myeloma Ig heavy chain VDJ genes contain somatic mutations but show no intracloal variation. *Blood* **80**: 2326-2335

**Baumann J.G.J., Wiegant J., Borst P., Van Duijn P.** (1980) A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochrome-labeled RNA. *Exp Cell Res* **138**: 485-490

**Bayani J., Zielenska M., Marrano P., Kwan Ng Y., Taylor M.D., Jay V., Rutka J.T., Squire J.A.** (2000) Molecular cytogenetic analysis of medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumors by using conventional banding, comparative genomic hybridization, and spectral karyotyping. *J Neurosurg* **93**: 437-448

**Bentz M., Huck K., du Manoir S., Joos S., Werner C.A., Fischer K., Dohner H., Lichter P.** (1995) Comparative genomic hybridization in chronic B-cell leukemias reveals a high incidence of chromosomal gains and losses. *Blood* **85**: 3610-3618

**Bentz M., Werner C.A., Dohner H., Joos S., Barth T.F.E., Siebert R., Schroder M., Stilgenbauer S., Fischer K., Moller P., Lichter P.** (1996) High incidence of chromosomal imbalances and gene amplifications in the classical follicular variant of follicle center lymphoma. *Blood* **88**: 1437-1444

**Bentz M., Barth T.F.E., Brüderlein S., Bock D., Schwerer M.J., Baudis M., Joos S., Viardot A., Feller A.C., Müller-Hermelink H.K., Lichter P., Döhner H., Möller P.** (2001) Gain of chromosome arm 9p is characteristic of primary mediastinal B-cell lymphoma (MBL): Comprehensive molecular cytogenetic analysis and presentation of a novel MBL cell line. *Genes Chromo Cancer* **30**: 393-401

- Bergsagel P.L., Chesi M., Nardini E., Brents L.A., Kirby S.L., Kuehl W.M.** (1996) Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 13931-13936
- Bergsagel P.L., Kuehl W.M.** (2001) Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene* **20**: 5611-5622
- Blade J., Lopez-Guillermo A., Rozman C., Cervantes F., Salgado C., Aguilar J.L., Vives-Corrons J.L., Montserrat E.** (1992) Malignant transformation and life expectancy in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol* **81**: 391-394
- Blade J., Kyle R.A.** (1999) Nonsecretory myeloma, immunoglobulin D myeloma, and plasma cell leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* **13**: 1259-1279
- Boccardo M., Pileri A.** (1995) Prognostic factors in multiple myeloma. In: Malpas J.S., Bergsagel D.E., Kyle R.A. (eds) Myeloma, biology and management. Oxford University Press, pp 250-270
- Boccardo M., Pileri A.** (1997) Diagnosis, prognosis and treatment of multiple myeloma. Aus: Barlogie, B. Multiple Myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* **1**: 111-131
- Bockmühl U.** (1998) Bedeutung der Analyse genetischer Alterationen bei Kopf-Hals-Karzinomen. *HNO* **46**: 74-83
- Bolek T.W., Marcus R.B., Mendenhall N.P.** (1996) Solitary plasmacytoma of bone and soft tissue. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **36**: 329-333
- Bosch F., Jares P., Campo E., Lopez-Guillermo A., Piris M.A., Villamor N., Tassies D., Jaffe E.S., Montserrat E., Rozman C.** (1994) PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood* **84**: 2726-2732
- Boveri T.** (1914) Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Gustav Fischer, Jena
- Brigaudeau C., Trimoreau F., Gachard N., Rouzier E., Jaccard A., Bordessoule D., Praloran V.** (1997) Cytogenetic study of 30 patients with multiple myeloma: comparison of 3 and 6 day bone marrow cultures stimulated or not with cytokines by using a miniaturized karyotypic method. *Br J Haematol* **96**: 594-600
- Brown A.G., Ross F.M., Dunne E.M., Steel C.M., Weir-Thompson E.M.** (1993) Evidence for a new tumour suppressor locus (DBM) in human B-cell neoplasia telomeric to the retinoblastoma gene. *Nat Genet* **3**(1): 67-21
- Bryndorf T., Kirchhoff M., Rose H., Maahr J., Gerdes T., Karhu R., Kallioniemi A., Christensen B., Lundsteen C., Philip J.** (1995) Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *Am J Hum Genet* **57**: 1211-1220
- Busslinger M., Klis N., Pfeffer P., Graninger P.G., Kozmik Z.** (1996) Deregulation of PAX-5 by translocation of the E-mu enhancer of the IgH locus adjacent to two alternative PAX-5 promoters in a diffuse large-cell lymphoma. *Proc Nat Acad Sci* **93**: 6129-6134

**Busson-Le Coniat M., Salomon-Nguyen F., Dastugue N., Maarek O., Lafage-Pochitaloff M., Mozziconacci M.J., Baranger L., Brizard F., Radford I., Jeanpierre M., Bernard O.A., Berger R.** (1999) Fluorescence in situ hybridization of chromosome 1 abnormalities in hematopoietic disorders: rearrangements of DNA satellite II and new recurrent translocations. *Leukemia* **13**: 1975-1981

**Busson-Le Coniat M., Nguyen Khac F., Daniel MT, Bernard OA, Berger R.** (2001) Chromosome 21 abnormalities with AML1 amplification in acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* **32**: 244-249

**Calame K.L.** (2001) Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. *Nature Immunol* **2**:1103-1108

**Calasanz M.J., Cigudosa J.C., Odero M.D., Ferreira C., Ardanaz M.T., Fraile A., Carrasco J.L., Sole F., Cuesta B. and Gullon A.** (1997) Cytogenetic analysis of 280 patients with multiple myeloma and related disorders: primary breakpoints and clinical correlations. *Genes Chromosomes Cancer* **18**: 84-93

**Caligaris-Cappio F., Bergui L., Tesio L., Pizzolo G., Malavasi F., Chilosi M., Campana D., VanCamp B., Janossy G.** (1985) Identification of malignant plasma cell precursors in the bone marrow of multiple myeloma. *J Clin Invest* **76**: 1243-1251

**Carrere S., Verger A., Flourens A., Stehelin D., Duterque-Coquillaud M.** (1998) Erg proteins, transcription factors of the Ets family, form homo, heterodimers and ternary complexes via two distinct domains. *Oncogene* **16**: 3261-3268

**Caspersson T., Gahrton G., Lindsten J., Zech L.** (1970) Identification of the Philadelphia chromosome as no. 22 by quinacrine mustard fluorescence analysis. *Exp Cell Res* **63**: 238-240

**Castuma M.V., Rao P.H., Acevedo S.H., Larripa I.B.** (2000) Comparative genomic hybridization study of de novo myeloid neoplasia. *Acta Haematol* **104**: 25-30

**Chang H., Bouman D., Boerkoel C.F., Stewart A.K., Squire J.A.** (1999) Frequent monoallelic loss of D13S319 in multiple myeloma patients shown by interphase fluorescence in situ hybridization. *Leukemia* **13**: 105-109

**Cigudosa J.C., Rao P.H., Calasanz M.J., Odero M.D., Michaeli J., Jhanwar S.C. and Chaganti R.S.K.** (1998) Characterization of nonrandom chromosomal gains and losses in multiple myeloma by comparative genomic hybridization. *Blood* **91**: 3007-3010

**Clark R.E., Geddes A.D., Whittaker J.A., Jacobs A.** (1998) Differences in bone marrow cytogenetic characteristics between treated and untreated myeloma. *Eur J Cancer Clin Oncol* **25**:1789-1793

**Corradini P., Ladetto M., Voena C., Palumbo A., Inghirami G., Knowles D.M., Boccadoro M., Pileri A.** (1993) Mutational activation of N- and K-ras oncogenes in plasma cell dyscrasias. *Blood* **81**: 2708-2713

**Dal Cin P, Atkins L, Ford C, Ariyanayagam S, Armstrong SA, George R, Cleary A, Morton CC** (2001) Amplification of AML1 in childhood acute lymphoblastic leukemias. *Genes Chromosomes Cancer* **30**: 407-409

- Dalla-Favera R., Bregni M., Erikson J., Patterson D., Gallo R.C., Croce C.M.** (1982) Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 7824-7828
- Daniely M., Aviram A., Adams E.F., Buchfelder M., Barkai G., Fahlbusch R., Goldman B., Friedman E.** (1998) Comparative genomic hybridization analysis of nonfunctioning pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **83**: 1766-1770
- Dao D.D., Sawyer J.R., Epstein J., Hoover R.G., Barlogie B., Tricot G.** (1994) Deletion of the retinoblastoma gene in multiple myeloma. *Leukemia* **8**: 1280-1284
- Delattre O., Zucman J., plougastel B., Desmaze C., Melot T., Peter M., Kovar H., Joubert I., de Jong P., Rouleau G., Alain A. & Gilles T.** (1992) Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* **359**: 162-165
- Desikan R., Barlogie B., Sawyer J., Ayers D., Tricot G., Badros A., Zangari M., Munshi N.C., Anaissie E., Spoon D., Siegel D., Jagannath S., Vesole D., Epstein J., Shaughnessy J., Fassas A., Lim S., Roberson P., Crowley J.** (2000) Results of high dose therapy for 1000 patients with multiple myeloma: durable complete remissions and superior survival in the absence of chromosome 13 abnormalities. *Blood* **96**: 4008-4010
- Dewald G.W., Kyle R.A., Hicks G.A., Greipp P.R.** (1985) The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis. *Blood* **66**: 380-390
- Diebold J.** (2002) Formenkreis der Plasmazellneoplasien - Eine Übersicht. aus: Bartl R., Dietzfelbinger H. *Multiplres Myelom, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. Zuckschwerdt Verlag, München Wien New York, pp 5-9
- Dietzfelbinger H., Wick M., Bartl R., Lamerz R.** (2002) Prognostische Faktoren - aus: Bartl R., Dietzfelbinger H. *Multiplres Myelom, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. Zuckschwerdt Verlag, München Wien New York, pp 79-86
- Dimopoulos M.A., Palumbo A., Delasalle K.B. and Alexanian R.** (1994) Primary plasma cell leukaemia. *Br J Haematol* **88**: 754-759
- Döhner H., Stigenbauer S., Döhner K., Bentz M., Lichter P.** (1999) Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J Mol Med* **77**: 266-281
- Döhner K., Stilgenbauer S., Fröhling S., Bentz M., Döhner H.** (2001) Klassische und molekulare Zytogenetik in der Hämatologie und Onkologie. *Onkologe* **7**:1028-1038
- Douglass E.C., Magrath I.T., Lee E.C., Whang-Peng J.** (1980) Cytogenetic studies in non-African Burkitt-Lymphoma. *Blood* **55**: 148-155
- Drach J., Gatringer C., Huber H.** (1991) Expression of the neural cell adhesion molecule (CD56) by human myeloma cells. *Clin Exp Immunol* **83**: 418-422



**Drach J., Schuster J., Nowotny H., Angerler J., Rosenthal F., Fiegl M., Rothermundt C., Gsur A., Jäger U., Heinz R., Lechner K., Ludwig H., Huber H.** (1995) Multiple myeloma: High incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* **55**: 3854-3859

**Drach J., Ackermann J., Fritz E., Krömer E., Schuster R., Gisslinger H., DeSantis M., Zojer N., Fiegl M., Roka S., Schuster J., Heinz R., Ludwig H. and Huber H.** (1998) Presence of p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood* **92**: 802-809

**Drach J.** (1999) Biologie des Multiplen Myeloms. *Onkologie* **5**: 286-289

**Draube A., Tesch H., Frickhofen N.** (1999) Formvarianten monoklonaler Gammopathien. *Onkologie* **4**: 290-296

**Du Manoir S., Speicher M.R., Joos S., Schröck E., Popp S., Döhner H., Kovacs G., Robert-Nicoud M., Lichter P., Cremer T.** (1993) Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* **90**: 590-610

**Du Manoir S., Schröck E., Bentz M., Speicher M.R., Joos S., Ried T., Lichter P., Cremer T.** (1995) Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* **19**: 27-41

**Durie G.M., Salmon S.E.** (1975) A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* **36**: 842-854

**Durie G.M.** (1986) Staging and kinetics of Multiple Myeloma. *Sem Oncol* **13**: 300-309

**Ehrlich A., Küppers R.** (1995) Analysis of immunoglobulin gene rearrangements in single B cells. *Curr Opin Immunol* **7**: 281-284

**Epstein J., Xiao H.Q., He X.Y.** (1990) Markers of multiple hematopoietic-cell lineages in multiple myeloma. *N Engl J Med* **322**: 664-668

**Facon T., Lai J.L., Preudhomme C., Zandecki M., Hammad M., Wattel E., Jouet J.P., Bauters F.** (1993) Improved cytogenetic analysis of bone marrow plasma cells after cytokine stimulation in multiple myeloma: a report of 46 patients. *Br J Haematol* **84**: 743-745

**Facon T., Avet-Loiseau H., Guillermin G., Moreau P., Genevieve F., Zandecki M., Lai J.L., Leleu X., Jouet J.P., Bauters F., Harousseau J.L., Bataille R., Mary J.Y., Intergroupe Francophone du Myelome** (2001) Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum  $\beta_2$ -microglobulin produce a very powerful myeloma staging system for patients receiving high dose therapy. *Blood* **97**: 1566-1571

**Falk R.H., Comenzo R.C., Skinner M.** (1997) The systemic Amyloidosis. *N Engl J Med* **337**: 898-909

**Flactif M., Zandecki M., Lai J.L., Bernardi F., Obein V., Bauters F., Facon T.** (1995) Interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) as a powerful tool for the detection of aneuploidy in multiple myeloma. *Leukemia* **9**: 2109-2114

**Fonseca R., Witzig T.E., Gertz M.A., Kyle R.A., Hoyer J.D., Jalal S.M., Greipp P.R.** (1998) Multiple myeloma and the translocation t(11;14)(q13;q32)- a report on 13 cases. *Br J Haematol* **101**: 296-301

**Fonseca R., Hoyer J.D., Aguayo P., Jalal S.M., Ahmann G.J., Rajkumar S.V., Witzig T.E., Lacy M.Q., Dispenzieri A., gertz M.A., Kyle R.A., Greipp P.R.** (1999) Clinical significance of the translocation (11;14)(q13,q32) in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* **35**: 599-605

**Fonseca R., Oken M.M., Greipp P.R.** (2001) t(4;14)(p16.3;q32) is strongly associated with chromosome 13 abnormalities in both multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* **98**: 1271-1272

**Fonseca R., Blood E.A., Oken M.M., Kyle R.A., Dewald G.W., Bailey R.J., Van Wier S.A., Henderson K.J., Hoyer J.D., Harrington D., Kay N.E., Van Ness B., Greipp P.R.** (2002) Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients. *Blood* **99**: 3735-3741

**Fonseca R., Harrington D., Oken M.M., Dewald G.W., Bailey R.J., Van Wier S.A., Henderson K.J., Blood E.A., Rajkumar S.V., Kay N.E., Van Ness B., Greipp P.R.** (2002a) Biological and prognostic significance of interphase fluorescence in situ hybridization detection of chromosome 13 abnormalities ( $\Delta 13$ ) in multiple myeloma: an eastern cooperative oncology group study. *Cancer Res* **62**: 715-720

**Gabrea A., Bergsagel P.L., Chesi M. Shou Y., Kuehl W.M.** (1999) Insertion of excised IgH switch sequences causes overexpression of cyclin D1 in a myeloma tumour cell. *Molecular Cell* **3**: 119-123

**Gall J.G., Pardue M.L.** (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **63**: 378-383

**Garcia-Marco J.A., Price C.M., Catovsky D.** (1997) Interphase cytogenetics in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* **94**: 52-58

**García-Sanz R., Orfão A., González M., Moro M.J., Hernandez J.M., Ortega F., Borrego D., Carnero M., Casanova F., Jimenez R., Portero J.A., San Miguel J.F.** (1995) Prognostic implications of DNA aneuploidy in a series of 156 untreated MM patients. *Br J Haematol* **90**: 106-112

**García-Sanz R., Orfão A., González M., Bladé J., Moro M.J., Fernández-Calvo J., Sanz M.A., Pérez-Simón J.A., Rasillo A. and San Miguel J.F.** (1999) Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood* **93**: 1032-1037

**Geurts J.M.W., Schoenmakers E.F.P.M., Roijer E., Astrom A.K., Stenman G., ven de Ven W.J.M.** (1998) Identification of NFIB as recurrent translocation partner gene of HMGIC in pleomorphic adenomas. *Oncogene* **16**: 865-872

**Golub T.R., Barker G.F., Bohlander S.K., Hiebert S.W., Ward D.C., Bray-Ward P., Morgan E., Raimondi S.C., Rowley J.D., Gilliland D.G.** (1995) Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4917-4921

- Gould J., Alexanian R., Goodacre A., Pathak S., Hecht B., Barlogie B.** (1988) Plasma cell karyotype in multiple myeloma. *Blood* **7**: 453-456
- Greipp P.R., Witzig T.E., Gonchoroff N.J.** (1985) Immunofluorescent plasma cell labeling indices (IL) using a monoclonal antibody (BU-1). *Am J Hematol* **20**: 289-292
- Greipp P.R., Lust J.A., O'Fallon W.M., Katzmann J.A., Witzig T.E., Kyle R.A.** (1993) Plasma cell labeling and beta 2-microglobulin predict survival independent of thymidine kinase and C-reactive protein in multiple myeloma. *Blood* **15**: 3382-3387
- Groffen J, Stephenson J.R., Heisterkamp N., de Klein A., Bartram C.R., Grosveld G.** (1984) Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* **36**: 93-99
- Gutierrez N.C., Hernandez J.M., Garcia J.L., Canizo M.C., Gonzalez M., Hernandez J., Gonzalez M.B., Garcia-Marcos M.A. and San Miguel J.F.** (2001) Differences in genetic changes between multiple myeloma and plasma cell leukemia demonstrated by comparative genomic hybridization. *Leukemia* **15**: 840-845
- Hallek M., Bergsagel P.L., Anderson, K.C.** (1998) Multiple Myeloma: Increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* **91**: 3-21
- Hansemann von D.** (1890) Über asymmetrische Zellteilungen in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung. *Arch Pathol Anat Physiol* **119**: 299-326
- Harper M.E., Ullrich A., Saunders G.F.** (1981) Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11. *Chromosoma* **83**: 431-439
- Harper M.E., Marselle L.M., Gallo R.C., Wong-Stahl F.** (1986) Detection of lymphocytes expressing human T-lymphotropic virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci* **83**: 772-776
- Harris N.L., Jaffe E.S., Stein H., Banks P.M., Chan J.K.C., Cleary M.L., Delsol G., De Wolf-Peters C., Falini B., Gatter K.C., Grogan T.M., Isaacson P.G., Knowles D.M., Mason D.Y., Müller-Hermelink H.K., Pileri S.A., Piris M.A., Ralkiaer E., Warnke R.A.** (1994) A revised european-american classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the international lymphoma study group. *Blood* **84**: 1361-1392
- Harris N.L., Jaffe E.S., Diebold J., Flandrin G., Müller-Hermelink H.K., Vardiman J., Lister T.A., Bloomfield C.D.** (1999) World Health Organisation Classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the clinical advisory committee meeting – Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* **17**: 3835-3849
- Hawthorn L, Roberts T, Verlind E, Kooy RF, Cowell JK.** (1995) A yeast artificial chromosome contig that spans the RB1-D13S31 interval on human chromosome 13 and encompasses the frequently deleted region in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genomics* **30**: 425-430.
- Heim S. & Mitelmann F.** (1986) Secondary chromosome aberrations in the acute leukemias. *Cancer Genet Cytogenet* **22**: 331-338

- Heim S. & Mitelmann F.** (1989) Primary chromosome abnormalities in human neoplasia. *Adv Cancer Res* **52**: 1-43
- Heim S. & Mitelmann F.** (1995) *Cancer Cytogenetics. Chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells.* 2. Auflage, Wiley-Liss, New York
- Heller A., Chudoba I., Bleck C., Senger G., Claussen U., Lier T.** (2000) Microdissection based comparative genomic hybridization analysis (micro-CGH) of secondary acute myelogenous leukemias. *Int J Oncol* **16**: 461-468
- Helling R.B., Goodman H.M., Boyer H.W.** (1974) Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol.* **14**:1235-1244.
- Herrinton L.J., Weiss N.S., Olshan A.F.** (1995) The epidemiologie of myeloma. aus: Malpas J.S., Bergsagel D.E., Kyle R.A. *Myeloma Biology and Mangement.* Oxford Unifersity Press, Oxford, pp 127-168
- Ho F., Lortan J., Khan M., MacLennan I.C.M** (1986) Distinct short-lived and long lived antibody producing cell populations. *Eur J Immunol* **16**: 1297-1301
- Ho P.J., Campbell L.J., Gibson J., Brown R., Joshua D.** (2002) The biology and cytogenetics of multiple myeloma. *Rev Clin Exp Hematol* **6**: 276-300
- Hui A.B., Pang J.C., Ko C.W., Ng H.K.** (1999) Detection of chromosomal imbalances in growth hormone-secreting pituitary tumors by comparative genomic hybridization. *Hum Pathol* **30**: 1019-1023
- Hunter T., Pines J.** (1994) Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* **79**: 573-582
- Ichikawa H., Shimizu K., Hayashi Y., Ohki M.** (1994) An RNA-binding protein gene, *TLS/FUS* is fused to *ERG* in human myeloid leukemia with t(16;21) chromosomal translocation. *Cancer Res* **54**: 2865-2868
- Iida S., Rao P.H., Nallasivam P., Hibshoosh H., Butler M., Louie D.C., Dyomin V., Ohno H., Chaganti R.S., Dalla-Favera R.** (1996) The t(9;14)(p13;q32) chromosomal translocation associated with lymphoplasmacytoid lymphoma involves the PAX-5 gene. *Blood* **88**: 4110-4117
- ISCN** (1995) An international system for human cytogenetic nomenclature. Editor: **Mitelman F., S. Karger**, Medical and Scientific Publishers, Basel
- Isola J., DeVries S., Chu L., Ghazvini S., Waldman F.** (1994) Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumour samples. *Am J Pathol* **145**: 1301-1308
- Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H., Vardiman J.W.** (2001) *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Heamatopoietic and Lymphoid Tissues.* IARC Press, Lyon

- James L., Varley J.** (1996) Preparation, labelling and detection of DNA from archival tissue sections suitable for comparative genomic hybridization. *Chromosome Res* **4**: 163-164
- Jarosova M., Holzerova M., Jedlickova K., Mihal V., Zuna J., Stary J., Pospisilova D., Zemanova Z., Trka J., Blazek J., Pikalova Z., Indrak K.** (2000) Importance of using comparative genomic hybridization to improve detection of chromosomal changes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenetic* **123**: 114-122
- Jehn U.** (2002) Plasmazell-Leukämie. aus: Bartl R., Dietzfelbinger H. (2002) Multiples Myelom, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Zuckschwerdt Verlag, München Wien New York, pp 97-98
- Jeuken J.W., Sprenger S.H., Boerman R.H., von Deimling A., Teepe H.L., van Overbeeke J.J., Wesseling P.** (2001) Subtyping of oligo-astrocytic tumours by comparative genomic hybridization. *J Pathol* **194**: 81-87
- Jhanwag S.C., Neel B.G., Hayward W.S., Chaganti R.S.K.** (1984) Localization of the cellular oncogenes ABL, SIS and FES on human germ-line chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* **38**: 73-75
- John H., Birnstiel M., Jones K.** (1969) RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* **223**: 582-587
- Johansson B., Brøndum-Nielsen K., Billström R., Schiødt I., Mitelman F.** (1997) Translocations between the long arms of chromosomes 1 and 5 in hematologic malignancies are strongly associated with neoplasms of the myeloid lineages. *Cancer Genet Cytogenet* **99**: 97-101
- Jonveaux P., Berger R.** (1992) Chromosome studies in plasma cell leukemia and multiple myeloma in transformation. *Genes Chrom Cancer* **4**: 321-325
- Joos S., Otano-Joos M.I., Bruderlein S., du Manoir S., Bentz M., Moller P., Lichter P.** (1996) Primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma is characterized by gains of chromosomal material including 9p and the REL gene. *Blood* **87**: 1571-1578
- Joos S., Küpper M., Ohl S., von Bonin F., Mechttersheimer G., Bentz M., Marynen P., Möller P., Pfreundschuh M., Trümper L., Lichter P.** (2000) genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase JAL2 in CD30+ Hodgkin cells. *Cancer Res* **60**: 549-552
- Juge-Morineau N., Harousseau J.L., Amiot M., Bataille R.** (1997) The retinoblastoma susceptibility gene RB-1 in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* **24**: 229-237
- Juneau A.L., Kaehler M., Christensen E.R., C.R., Zinsmeister A.R., Lust J., Hanson C., Dewald G.W.** (1998) Detection of RB1 deletions by fluorescence in situ hybridization in malignant hematologic disorders. *Cancer Genet Cytogenet* **103**: 117-123
- Kallioniemi A., Kallioniemi O.P., Sudar D., Rutovitz D., Gray J.W., Waldman F., Pinkel D.** (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* **258**: 818-821

- Kallioniemi O.P., Kallioniemi A., Piper J., Isola J., Waldmann F.M., Gray J.W., Pinkel D.** (1994) Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chrom Cancer* **10**: 231-243
- Karhu R., Siitonen S., Tanner M., Keinanen M., Makiperna A., Lehtinen M., Vilpo J.A., Isola J.** (1997) Genetic aberrations in pediatric acute lymphoblastic leukemia by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenetic* **95**: 123-129
- Kelly J.J., Kyle J.M., Miles J.M.** (1983) Osteosclerotic myeloma and peripheral neuropathy. *Neurology* **33**: 202-210
- Kibbelaar R.E., Mulder J.W.R., Dreef E.J., van Kamp H., Fibbe W.E., Wessels J.W., Beverstock G.C., Haak H.L., Kluin P.M.** (1993) Detection of monosomy 7 and trisomie 8 in myeloid neoplasia: A comparison of banding and fluorescence in situ hybridization. *Blood* **82**: 904-913
- Kipps T.J.** (2000) Genetics of chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol Cell Ther* **42**: 5-14
- Klein G.** (1989) Multiple phenotypic consequences of the Ig/Myc translocation in B-cell-derived tumors. *Genes Chrom Cancer* **1**: 3-8
- Knudson A.G.Jr.** (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**: 820-823
- Knudson A.G.Jr.** (1993) Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 10914-10921.
- Königsberg R., Zojer N., Ackermann J., Krömer E., Kittler H., Fritz E., Kaufmann H., Nössling T., Riedl L., Gisslinger H., Jäger U., Simonitsch I., Heinz R., Ludwig H., Huber H. & Drach J.** (2000) Predictive role of interphase cytogenetics for survival of patients with multiple myeloma. *J Clin Oncol* **18**: 804-812
- Komiyama T., Matsumura K., Tsuchida N.** (1997) Comparison of DNA copy numbers in original oral squamous cell carcinomas and corresponding cell lines by comparative genomic hybridization. *Jpn J Cancer Res* **88**: 476-483
- Korsmeyer S.J.** (1992) Chromosomal translocations in lymphoid malignancies reveal novel protooncogenes. *Annu Rev Immunol* **10**: 785-807
- Kowalczyk J.R., Dmoszynska A., Chobotow M., Sokoloeska B.** (1991) Cytogenetic studies in patients with multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* **55**: 173-179.
- Kros J.M., van Run P.R., Alers J.C., Beverloo H.B., van den Bent M.J., Avezaat C.J., van Dekken H.** (1999) Genetic aberrations in oligodendroglial tumours: an analysis using comparative genomic hybridization. *J Pathol* **188**: 282-288
- Kubagawa H.L.B., Vogler L.B., Capra J.D., Conrad M.E., Lawton A.R., Cooper M.D.** (1979) Stidies on the clonal origin of multiple myeloma: use of individually specific (idiotype) antibodies to trace the oncogenic event to ist earliest point of expression in B-cell differentiation. *J Exp Med* **150**: 792-807

- Kuehl W.M. and Bergsagel P.L.** (2002) Multiple Myeloma: involving genetic events and host interactions. *Nature Reviews Cancer* **2**: 175-187
- Küppers R., Klein U., Hansmann M.L., Rajewsky K.** (1999) Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* **341**: 1520-1529
- Küppers R., Dalla-Favera R.** (2001) Mechanisms of chromosomal translocation in B cell lymphomas. *Oncogene* **20**: 5580-5594
- Kyle R.A., Maldonado J.E. & Bayrd E.D.** (1974) Plasma cell leukaemia: report on 17 patients. *Archives of Internal Medicine* **133**: 813-818
- Kyle R.A., Greipp P.R.** (1980) Smouldering multiple myeloma. *New Engl J Med* **302**: 1347-1349
- Kyle R.A.** (1997) Monoclonal gammopathy of undetermined significance and solitary plasmocytoma. *Hematol Oncol Clin North Am* **11**: 71-87
- Lacronique V., Boureux A., Valle V.D., Poirel H., Quang C.T., Mauchauffe M., Berthou C., Lessard M., Berger R., Ghysdael J., Bernard O.A.** (1997) A TEL-JAK2 fusion protein constitutive kinase activity in human leukemia. *Science* **278**: 1309-1312
- Lai J.L., Zandecki M., Mary J.Y., Bernardi F., Izydorczyk V., Flactif M., Morel P., Jouet J.P., Bauters F., Facon T.** (1995) Improved cytogenetics in multiple myeloma: A study of 151 patients including 117 patients at diagnosis. *Blood* **85**: 2490-2497
- Lai J.L., Michaux L., Dastugue N., et al.** (1998) Cytogenetics in multiple myeloma: a multicenter study of 24 patients with t(11;14)(q13;q32) or its variants. *Cancer Genet Cytogenet* **104**: 133-138
- Langer P.R., Waldrop A.A., Ward D.A.** (1981) Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci* **78**: 6633-6637
- Larramendy ML, El-Rifai W, Knuutila S.** (1998) Comparison of fluorescein isothiocyanate- and Texas red-conjugated nucleotides for direct labeling in comparative genomic hybridization. *Cytometry*. **31**: 174-179
- Levan A.** (1966) Non-random representation of chromosome type in human tumor stemlines. *Hereditas* **55**: 28-38
- Lisse I.M., Drivsholm A., Christoffersen P.** (1988) Occurrence and type of chromosomal abnormalities in consecutive malignant monoclonal gammopathies: Correlation with survival. *Cancer Genet Cytogenet* **35**: 27-36
- Liu Y, Szekely L, Granden D., Söderhäll S., Juliusson G., Gahrton G., Linder S., Einhorn S.** (1993) Chronic lymphocytic leukemia cells with allelic deletions at 13q14 commonly have one intact RB1 gene: evidence for a role of an adjacent locus. *Proc Natl Acad Sci* **90**: 8697-8701
- Liu Y, Hermanson M, Granden D, Merup M, Wu X, Heyman M, Rasool O, Juliusson G, Gahrton G, Detlofsson R.** (1995) 13q deletions in lymphoid malignancies. *Blood* **86**: 1911-1915

**Liu Y, Corcoran M, Rasool O, Ivanova G, Ibbotson R, Grander D, Iyengar A, Baranova A, Kashuba V, Merup M, Wu X, Gardiner A, Mullenbach R, Poltaraus A, Hultstrom AL, Juliusson G, Chapman R, Tiller M, Cotter F, Gahrton G, Yankovsky N, Zabarovsky E, Einhorn S, Oscier D.** (1997) Cloning of two candidate tumor suppressor genes within a 10 kb region on chromosome 13q14, frequently deleted in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene* **15**: 2463-2473.

**Lloveras E., Sole F., Florensa L., Besses C., Espinet B., Gil M., Perez-Vila M.E., Pedro C., Abella E., Sans-Sabrafen J., Woessner S.** (2002) Contribution of cytogenetics and in situ hybridization to the study of monoklonal gammopathies of undetermined significance. *Cancer Genet Cytogenetic* **132**: 25-29

**Ludwig H., Meran J. & Zojer N.** (1999) Multiple Myeloma: An update on biology and treatment. *Ann Oncol* **10**: 31-43

**Lundsteen C., Maahr J., Christensen B., Bryndorf T., Bentz M., Lichter P., Gerdes T.** (1995) Image analysis in comparative genomic hybridization. *Cytometry* **19**: 42-50

**Mastero R., Piccinin S., Doglioni C., Gasparotto D., Vukosavljevic T., Sulfaro S., Barzan L., Biocchi M.** (1996) *Cancer Res.* **56**: 1146-1150

**Malpas J.S.** (1995) Clinical presentation and diagnosis. aus: **Malpas J.S., Bergsagel D.E., Kyle R.** Myeloma, Biology and Management. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, pp 169-190

**Malpas J.S., Bergsagel D.E., Kyle R. & Anderson K.** (1998) Multiple Myeloma: Biology and Management. Oxford University Press, Oxford

**Max E.E.** (1999) Fundamental Immunology. Paul W.E. Lippincott-Raven: Philadelphia, pp 113-184

**Melamed J., Einhorn J.M., Ittmann M.M.** (1997) Allelic loss on chromosome 13q in human prostate carcinoma. *Clin Cancer Res* **3**: 1867-1872

**Meran J.G., Zojer N., Ludwig H.** (1999) Klinik, Diagnose und Prognose des Multiplen Myeloms. *Onkologe* **4**: 297-305

**Mertens F., Johansson B., Hoglund M., Mitelman F.** (1997) Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res* **57**: 2765-2780

**Metzger A.K., Mohapatra G., Minn Y.A., Bollen A.W., Lamborn K., Waldman F.M., Wilson C.B., Feuerstein B.G.** (1999) Multiple genetic aberrations including evidence of chromosome 11q13 rearrangement detected in pituitary adenomas by comparative genomic hybridization. *J Neurosurg* **90**: 306-314

**Mitelman F., Mertens F. & Johansson B.** (1997) A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet* **15**: 417-474

**Miyoshi H., Shimizu K., Kozu T., Maseki N., Kanekoy Y., Ohki M.** (1991) t(8;21) break-points on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci* **88**: 10431-10434



- Monni O., Joensuu H., Franssila K., Knuutila S.** (1996) DNA copy number changes in diffuse large B-cell lymphoma-comparative genomic hybridization study. *Blood* **87**: 5269-5278
- Moreau P., Facon T., Leleu N., Morineau N., Huyghe P., Harousseau J.L., Bataille R., Avet-Loiseau** (2002) Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood* **100**: 1579-1583
- Morel F., Herry A., Le Bris M.J., Douet-Guilbert N., Le Calvez G., Marion V., Berthou C., De Braekeeler M.** (2002) AML1 amplification in a case of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* **137**: 142-145
- Morgan R.J., Gonchoroff N.J., Katzmann J.A., Witzig T.E., Kyle R.A., Greipp P.R.** (1989) Detection of hypodiploidy using multi-parameter flow cytometric analysis: A prognostic indicator in multiple myeloma. *Am J Hematol* **30**: 195-200
- Morris C.M., Cochrane J.M., Benjes S.M., Crossen P.E., Fitzgerald P.H.** (1991) Molecular definition of interstitial deletions of chromosome 13 in leukemic cells. *Genes Chrom Cancer* **3**: 455-460
- Motokura T., Bloom T., Kim H.G., Juppner H., Ruderman J.V., Kronenberg H.M, Arnold A.** (1991) A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* **350**: 512-515
- Nederlof P.M., Van der Flier S., Wiegant J.** (1990) Multiple fluorescence in situ hybridization. *Cytometry* **11**: 126-131
- Newcomb E.W., Rao L.S., Giknavorian S.S., Lee S.Y.** (1995) Alternative of multiple tumor suppressor gene (p53(17p13), p16INK4(9p21), and DBM(13q14)) in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Mol Carcinog* **14**: 141-146
- Ng M.H.L., Chung Y.F., Lo K.W., Wickham N.W., Lee J.C., Huang D.P.** (1997) Frequent hypermethylation of p16 and p15 genes in multiple myeloma. *Blood* **87**: 2500-2506
- Nishida K, Tamura A, Nakazawa N, Ueda Y, Abe T, Matsuda F, Kashima K, Taniwaki M.** (1997) The Ig heavy chain gene is frequently involved in chromosomal translocations in multiple myeloma and plasma cell leukemia as detected by in situ hybridization. *Blood* **90**: 526-534.
- Noel P., Kyle R.A.** (1987) Plasma cell leukemia: an evaluation and response to therapy. *Am J Med* **83**: 1062-1068
- Nowell P.C. & Hungerford D.A.** (1960) A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science* **132**: 1497
- Nutt S.L., Heavey B., Rolink A.G., Busslinger M.** (1999) Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* **401**: 556-562
- O'Connor D.P., Kay E.W., Leader M., Murphy G.M., Atkins G.J., Mabruk M.J.** (2001) A high degree of chromosomal instability at 13q14 in cutaneous squamous cell carcinomas: indication for a role of a tumour suppressor gene. *Mol Pathol* **54**: 165-169

**Offit K., Jhanwar S.C., Ladanyi M., Filippa D.A., Chaganti R.S.** (1991) Cytogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of non-Hodgkin's lymphoma: correlations between recurrent aberrations, histology, and exposure to cytotoxic treatment. *Genes Chrom Cancer* **3**: 189-201

**Offit K., Parsa N.Z., Filippa D., Jhanwar S.C., Chaganti R.S.** (1992) t(9;14)(p13;q32) denotes a subset of low-grade non-Hodgkin's lymphoma with plasmacytoid differentiation. *Blood* **80**: 2594-2599

**Ohno H., Furukawa T., Fukuhara S., Zong S.Q., Kamesaki H., Shows T.B., LeBeau M.M., McKeithan T.W., Kawakami T., Honjo T.** (1990) Molecular analysis of a chromosomal translocation, t(9;14)(p13;q32), in a diffuse large-cell lymphoma cell line expressing the Ki-1 antigen. *Proc Nat Acad Sci* **87**: 628-632

**Ottesen A.M., Kirchoff M., De-Meyts E.R., Maahr J., Gerdes T., Rose H., Lundsteen C., Petersen P.M., Philip J., Skakkebaek N.E.** (1997) Detection of chromosomal aberrations in seminomatous germ cell tumours using comparative genomic hybridization. *Genes Chrom Cancer* **20**: 412-418

**Padilla-Nash H.M., Nash W.G., Padilla G.M., Robertson K., Robertson C.N., Macville M., Schröck E., Ried T.** (1999) Molecular cytogenetic analysis of the bladder carcinoma cell line BK-10 by spectral karyotyping. *Genes Chrom Cancer* **25**: 53-59

**Pardue M.L. & Gall J.G.** (1969) Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci* **64**: 600-604

**Paszek-Vigier M., Talmant P., Mechinaud F., Garand R., Harousseau J.L., Bataille R., Avet-Loiseau H.** (1997) Comparative genomic hybridization is a powerful tool, complementary to cytogenetics, to identify chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* **99**: 589-596

**Peest D., Coldewey R., Deicher H., Sailer M., Vykoupil C., Leo R.** (1993) Prognostic value of clinical, laboratory, and histological characteristics in multiple myeloma: improved definition of risk groups. *Eur J Cancer* **29A**: 978-983

**Peeters P., Raynaud S.D., Cools J., Wlodarska I., Grosgeorge J., Philip P., Monpoux F., van Rompaey L., Baens M., van den Berghe H., Marynen P.** (1997) Fusion of *TEL*, the *ETS*-variant gene 6 (*ETV6*), to the receptor-associated kinase *JAK2* as a result of the t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia. *Blood* **90**: 2535-2540

**Pellat-Deceunynck C., Barille S., Jego G., Puthier D., Robillard N., Pineau D., Rapp M.J., Harousseau J.L., Amiot M., Bataille R.** (1998) The absence of CD56 on malignant plasma cells in a hallmark of plasma cell leukemia and of a special subset of multiple myeloma. *Leukemia* **12**: 1977-1982

**Pérez-Simón J.A., García-Sanz M.D., Tabernero M.D., Almeida J., González M., Fernández-Calvo J., Moro M.J., Hernández J.M., San Miguel J.F. & Orfão A.** (1998) Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: a FISH analysis of different chromosomes. *Blood* **91**: 3366-3371

- Piper J., Rutovitz D., Sudar D., Kallioniemi A., Kallioniemi O.P., Waldman F.M., Gray J.W., Pinkel D.** (1995) Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* **19**: 10-26
- Portier M., Moles J.P., Mazars G.R., Jeanteur P., Bataille R., Klein B., Theillet C.** (1992) *P53* and *RAS* gene mutations in multiple myeloma. *Oncogene* **7**: 2539-2543
- Pratt G.** (2002) Molecular aspects of multiple myeloma. *J Clin Pathol* **55**: 273-283
- Pritchard M.A., Baker E., Callen D.F., Sutherland G.R., Wilks A.F.** (1992) Two members of the JAK family of protein tyrosine kinases map to chromosomes 1p31.3 and 9p24. *Mammalian Genome* **3**: 36-38
- Qian F., Kruse U., Lichter P., Sippel A.E.** (1995) Chromosomal localization of the four genes (NFIA, B, C, and X) for the human transcription factor nuclear factor I by FISH. *Genomics* **28**: 66-73
- Rabin M., Watson M., Barker P.E., Ryan J., Breg W.R., Ruddle F.H.** (1984) N-ras transactivating gene maps to region p11-p13 on chromosome 1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* **38**: 70-72
- Radaszkiewicz T. und Vesely M.** (1997). Blut, Knochenmark und lymphatisches System. Blut und Knochenmark. aus: Böcker W., Denk H., Heitz Ph.U. *Pathologie*. Urban & Schwazenberg, München, Wien, Baltimore pp 453-488
- Rajkumar S.V., Fonseca R., Dewald G.W. et al.** (1999) Cytogenetic abnormalities correlate with the plasma cell labeling index and extent of bone marrow involvement in myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* **113**: 73-77
- Ranni N.S., Slavutsky I., Wechsler A., Brioux de Salum S.** (1987) Chromosome findings in multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* **25**: 309-316
- Rao P.H., Cigudosa J.C., Ning Y., Calasanz M.J., Iida S., Tagawa S., Michaeli J., Klein B., Dalla-Favera R., Jhanwar S.C., Ried T., Chaganti R.S.** (1998) Multicolor spectral karyotyping identifies new recurring breakpoints and translocations in multiple myeloma. *Blood* **92**: 1743-1748
- Renz M., Kurz C.** (1984) A colorimetric method for DNA hybridization. *Nucleic Acids Res* **12**: 3435-3444.
- Rickert C.H., Dockhorn-Dworniczak B., Simon R., Paulus W.** (1999) Chromosomal imbalances in primary lymphomas of the nervous system. *Am J Pathol* **155**: 1445-1451
- Ried T., Petersen I., Holtgreve-Grez H., Speicher M.R., Schröck E., du Manoir S., Cremer T.** (1994) Mapping of multiple DNA gains and losses in primary small cell lung carcinomas by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* **54**: 1801-1806
- Ried T., Liyanage M., Du Manoir S., Heselmeyer K., Auer G., Macville M., Schröck E.** (1997) Tumor cytogenetics revisited: comparative genomic hybridization and spectral karyotyping. *J Mol Med* **75**: 801-814

- Rimokh R., Berger F., Delsol G., Charrin C., Bertheas MF., French M., Garoscio M., Felman P., Coiffier B. and Bryon P.A.** (1993) Rearrangement and overexpression of the BCL-1/PRAD-1 gene in intermediate lymphocytic lymphomas and in t(11q13)-bearing leukemias. *Blood* **81**: 3063-3067
- Romana S.P., Poirel H., Le Coniat M., Flexor M.A., Mauchauffe M., Jonveaux P., Macintyre E.A., Berger R., Bernard O.A.** (1995) High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **86**: 4263-4269
- Rondeau G., Moreau I., Bezieau S., Cadoret E., Moisan JP, Devilder MC.** (1999) Exclusion of Leu1 and Leu2 genes as tumor suppressor genes in 13q14.3-deleted B-CLL. *Leukemia* **13**: 1630-1632.
- Rosenberg C.L., Wond E., Petty E.M., Bale A.E., Tsujimoto Y., Harris N.L., Arnold A.** (1991) PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: Mapping and expression in centrocytic lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 9638-9642
- Rosenberg C., Schut T.B., Mostert M., Tanke H., Raap A., Oosterhuis J.W., Looijenga L.** (1999) Chromosomal gains and losses in testicular germ cell tumors of adolescents and adults investigated by a modified comparative genomic hybridization approach. *Lab Invest* **79**: 1447-1451
- Rowley J.** (1973) A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**: 290-293
- Rowley J.** (1990) The Philadelphia chromosome translocation. A paradigm for understanding leukemia. *Cancer* **65**: 2178-2184
- Rowley J.** (1998) The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Ann Rev Genet* **32**: 495-519
- Rowley J.** (2000) Cytogenetic Analysis in leukemia and lymphoma: An introduction. *Semin Hematol* **37**: 315-319
- Sahota S.S., Leo R., Hamblin T.J., Stevenson F.K.** (1996) Ig VH gene mutational patterns indicate different tumor cell status in human myeloma and monoklonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* **87**: 746-755
- Saltzman A., Stone M., Franks C., Searfoss G., Munro R., Jaye M., Ivashchenko Y.** (1998) Cloning and characterization of human Jak-2 kinase: high mRNA expression in immune cells and muscle tissue. *Biochem Biophys Res Commun* **246**: 627-633
- San Miguel J.F., Almeida J., Ocqueteau M., Orfao A.** (1996) Detection of two subpopulations of plasma cells in MGUS patients: Utility in the differential diagnosis with MM. *Blood* **88**: 640a
- Sawyer J.R., Lukacs J.L., Munshi N, Desikan K.R., Singhal S., Mehta J., Siegel D., Shaughnessy J., Barlogie B.** (1998a) Identification of new nonrandom translocations in multiple myeloma with multicolor spectral karyotyping. *Blood* **92**: 4269-4278

- Sawyer J.R., Tricot G., Mattox S., Jagannath S. and Barlogie B.** (1998b) Jumping translocation of chromosome 1q in multiple myeloma: evidence for a mechanism involving decondensation of pericentromeric heterochromatin. *Blood* **91**: 1732-1741
- Sawyer J.R., Waldron J.A., Jagannath S. and Barlogie B.** (1995) Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* **82**: 41-49
- Scarpa A., Taruscio D., Scardoni M., Iosi F., Paradisi S., Ennas M.G., Rigaud G., Moore P.S., Menestrina F.** (1999) Nonrandom chromosomal imbalances in primary mediastinal B-cell lymphoma detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. *Genes Chrom Cancer* **26**: 203-209
- Schambeck C.M., Bartl R., Höchtlen-Vollmar W., Wick M., Lamerz R., Fateh-Moghadam A.** (1996) Characterization of myeloma cells by means of labelling index, bone marrow histology, and serum beta 2-microglobulin. *Am J Clin Pathol* **106**: 64-68
- Schmitt G., Döker R., Pape H.** (1999) Onkologie systematisch. Diagnostik und interdisziplinäre Therapie maligner Tumoren. Uni-Med Verlag, Bremen BRD, pp 85-94
- Schnedl W.** (1971) Analysis of the human karyotype using a reassociation technique. *Chromosoma* **34**: 448-454
- Schröck E., Thiel G., Lozanova T., du Manoir S., Meffert M.-C., Jauch A., Speicher M.R., Nürnberg P., Vogel S., Jänisch W., Donis-Keller H., Ried T., Witkowski R., Cremer T.** (1994) Comparative genomic hybridization of human malignant gliomas reveals multiple amplification sites and nonrandom chromosomal gains and losses. *Am J Pathol* **144**: 1203-1218
- Schröck E., du Manoir S., Veldman T., Schoell B., Wienberg J., Ferguson-Smith M.A., Ning Y., Ledbetter D., Bar-Am I., Soenksen D., Garini Y., Ried T.** (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* **273**: 494-497
- Schutz B.R., Scheurlen W., Krauss J., du Manoir S., Joos S., Bentz M., Lichter P.** (1996) Mapping of chromosomal gains and losses in primitive neuroectodermal tumors by comparative genomic hybridization. *Genes Chrom Cancer* **16**: 196-203
- Schwaller J., Parganas E., Wang D., Cain D., Aster J.C., Williams I.R., Lee C.K., Gerthner R., Kitamura T., Frantsve J., Anastasiadou E., Loh M.L., Levy D.E., Ihle J.N., Gilliland D.G.** (2000) Stat5 is essential for the myelo- and lymphoproliferative disease induced by TEL/JAK2. *Molec Cell* **6**: 693-704
- Seabright M.** (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* **2**: 971-972
- Seong C., Delasalle K., Hayes K., Weber D., Dimopoulos M., Swantkowski J., Huh Y., Glassman A., Champlin R. and Alexanian R.** (1998) Prognostic value of cytogenetics in multiple myeloma. *Br J Haematol* **101**: 189-194. *Leukemia* **12**: 960-969
- Shaughnessy J., Tian E., Sawyer J. Bumm K., Landes R., Badros A., Morris C., Tricot G., Epstein J., Barlogie B.** (2000) High incidence of chromosome 13 deletion in multiple myeloma detected by multiprobe interphase FISH. *Blood* **96**: 1505-1511

- Shurtleff S.A., Buijs A., Behm F.G., Rubnitz J.E., Raimondi S.C., Hancock M.L., Chan G.C.F., Pui C.H., Grosveld G., Downing J.R.** (1995) TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) in the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia* **9**: 1985-1989
- Smadja N.V., Krulik M., Louvet C., de Gramont A., Gonzalez-Canali G., Mougeot-Martin M.** Similar cytogenetic abnormalities in two cases of plasma cell leukemia (1991) *Cancer Genet Cytogenet* **52**:123-129
- Smadja N.V., Louvet C., Isnard F., Dutel J.L., Grange M.J., Varette C., Krulik M.** (1995) Cytogenetic study in multiple myeloma at diagnosis: comparison of two techniques. *Br J Haematol* **90**: 619-624
- Smadja N.V., Fruchart C., Isnard F., Louvet C., Dutel J.L., Cheron N., Grange M.J., Monconduit M., Bastard C.** (1998) Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases. *Leukemia* **12**: 960-969
- Smadja N.V., Bastard C., Brigaudeau C., Leroux D., Fruchart C.** (2001) Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* **98**: 2229-2238
- Smith L., Barlogie B., Alexanian R.** (1985) Biclonal and hypodiploid multiple myeloma. *Am J Med* **80**: 841
- Soulier J., Pierron G., Vecchione D., Garand R., Brizard F., Sigaux F., Aurias A.** (2001) A complex pattern of recurrent chromosomal losses and gains in T-c-prolymphocytic leukemia. *Genes Chromo Cancer* **31**: 248-254
- Speicher M.R., Schoell B., du Manoir S., Schröck E., Ried T., Cremer T., Störkel S., Kovacs A., Kovacs G.** (1994) Specific loss of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17 and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* **145**: 356-364
- Speicher M.R., Ballard S.G., Ward D.C.** (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genet* **12**: 368-375
- Stapleton P., Weith A., Urbanek P., Kozmik Z., Busslinger M., Hammarstrom L.** (1993) Chromosomal localization of seven PAX genes and cloning of a novel family member, PAX-9. *Nature Genetics* **3**: 292-298
- Steenis van H.** (1966) Chromosomes and Cancer. *Nature* **209**: 819-821
- Stein H., Hiddemann W.** (1999) Die neue WHO-Klassifikation der malignen Lymphome. *Deutsches Ärzteblatt* **96**, Heft 49: 30-37
- Struski S., Doco-Fenzy M., Cornillet-Lefebvre P.** (2002) Compilation of published comparative genomic hybridization studies. *Cancer Genet Cytogenetics* **135**: 63-90
- Taberero D., San Miguel J.F., Garcia-Sanz R., Najera L., Garcia-Isidoro M., Perez-Simon J.A., Gonzalez M., Wiegant J., Raap A.K., Orfao A.** (1996) Incidence of chromosome numerical change in multiple myeloma. Fluorescence in situ hybridization analysis using 15 chromosome-specific probes. *Am J Pathol* **149**: 153-161

- Tada K., Oka M., Hayashi H., Tangoku A., Oga A., Sasaki K.** (2000) Cytogenetic analysis of esophageal squamous cell carcinoma cell lines by comparative genomic hybridization: relationship of cytogenetic aberrations to in vitro cell growth. *Cancer Genet Cytogenetic* **117**: 108-112
- Taniwaki M., Nishida K., Ueda, Takashima T.** (1996) Non-random chromosomal rearrangements and their implications in clinical features and out-come in multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Leuk Lymphoma* **21**: 25-30
- Terpstra W.E., Lokhorst H.M., Blomjous F., Meuwissen O.J., Dekker A.W.** (1992) Comparison of plasma cell infiltration in bone marrow biopsies and aspirates in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* **82**: 46-49
- Terstappen L.W., Johnsen S., Segers-Nolten I.M., Loken M.R.** (1990) Identification and characterisation of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood* **76**: 1739-1747
- Tew J.G., DiLosa R.M., Burton G.F., Kosco M.H., Kupp L.I., Masuda A., Szakal A.K.** (1992) Germinal centers and antibody production in bone marrow. *Immunol Rev* **126**: 99-112
- Tiemann M., Trümper L.** (2001) Pathologie, Biologie und Klassifikation maligner Non-Hodgkin-Lymphome. *Onkologie* **9**: 940-959
- Tjio J.H., Levan A.** (1956) The chromosome number of man. *Hereditas* **42**: 1-6
- Tonegawa S.** (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**: 575-581
- Tricot G., Barlogie B., Jagannath S., Bracy D., Mattox S., Vesole D.H., Naucke S., Sawyer J.R.** (1995) Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of chromosome 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities. *Blood* **86**: 4250-4256
- Tricot G., Sawyer J.R., Jagannath S., Desikan R., Siegel D., Naucke S., Mattox S., Bracy D., Munshi N., Barlogie B.** (1997) Unique role of cytogenetics in the prognosis of patients with myeloma receiving high-dose therapy and autotransplants. *J Clin Oncol* **15**: 2659-2666
- Ueshima Y., Fukuhara S., Nagai K., Takatauki K., Uchino H.** (1983) Cytogenetic studies and clinical aspects of patients with plasma cell leukemia and leukemic macroglobulinemia. *Cancer Res* **43**: 905-912
- United Kingdom Cancer Cytogenetics Group (UKCCG)** (1992a) Loss of the Y chromosome from normal and neoplastic and bone marrows. *Genes Chrom Cancer* **5**: 83-88
- United Kingdom Cancer Cytogenetics Group (UKCCG)** (1992b) Primary, single, autosomal trisomies associated with haematological disorders. *Leuk Res* **16**: 841-851
- Urashima M., Ogata A., Chauhan D., Vidriales M.B., Teoh G., Hoshi Y., Schlossman R.L., DeCaprio J.A., Anderson K.C.** (1996) Interleukin-6 promotes multiple myeloma cell growth via phosphorylation of retinoblastoma protein. *Blood* **88**: 2219-2227

**Van Camp B., Durie B.G., Spier C., De Waele M., Van Riet I., Vela E., Frutiger Y., Richter L., Grogan T.M.** (1990) Plasma cells in multiple myeloma express a natural killer cell-associated antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19) *Blood* **76**: 377-382

**Van Prooijen-Knegt A.C., Van Hoek J.F.M., Baumann J.G.J., Van Duijn P., Wool I.G., Van der Ploeg M.** (1982) In situ hybridization of DNA sequences in human metaphase chromosomes visualized by an indirect fluorescent immunocytochemical procedure. *Exp Cell Res* **141**: 397-407

**Veldmann T., Vignon C., Schröck E., Rowley J.D., Ried T.** (1997) Hidden Chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolour spectral karyotyping. *Nature Genet* **15**: 406-410

**Verhagen P.C., Zhu X.L., Rohr L.R., Cannon-Albright L.A., Tavtigian S.V., Skolnick M.H., Brothman A.R.** (2000) Microdissection, DOP-PCR, and comparative genomic hybridization of paraffin-embedded familial prostate cancers. *Cancer Genet Cytogenet* **122**: 43-48

**Vescio R.A., Cao J., Hong C.H., Lee J.C., Wu C.H., Der Danielian M., Wu V., Newman R., Lichtenstein A.K., Berenson J.R.** (1995) Myeloma Ig heavy chain V region sequences reveal prior antigenic selection and marked somatic mutation but no intraclonal diversity. *J Immunol* **155**: 2487-2497

**Walther C., Guenet J.L., Simon D., Deutsch U., Jostes B., Goulding M.D., Plachov D., Balling R. Gruss P.** (1991) Pax: a murine multigene family of paired box containing genes. *Genomics* **11**: 424-434

**Weber-Nordt R., Mertelsmann R., Finke J.** (1998) The JAK-STAT pathway: signal transduction involved in proliferation, differentiation and transformation. *Leuk Lymphoma* **28**: 459-467

**Weh H., Fiedler W., Hossfeld D.K.** (1990) Cytogenetics in multiple myeloma: are we studying the right cells? *Eur J Haematol* **45**: 236-237

**Weh H., Gutensohn K., Selbach J., Kruse R., Wacker-Backhaus G., Seeger D., Fiedler W., Fett W., Hossfeld D.K.** (1993) Karyotype in multiple myeloma and plasma cell leukaemia. *Eur J Cancer* **29A**: 1269-1273

**Weinberg R.A.** (1995) The retinoblastoma gene and cell cycle control. *Cell* **81**: 323-330

**Welkoborsky H.J., Bernauer H.S., Riazimand H.S., Jacob R., Mann W.J., Hinni M.L.** (2000) Patterns of chromosomal aberrations in metastasizing and nonmetastasizing squamous cell carcinomas of the oropharynx and hypopharynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **109**: 401-410

**Wijdenes J., Vooijs W.C., Clement C. et al.** (1996) A plasmacyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol* **94**: 318-323

**Wiktor A, Rybicki BA, Piao ZS, Shurafa M, Barthel B, Maeda K, Van Dyke DL.** (2000) Clinical significance of Y chromosome loss in hematologic disease. *Genes Chrom Cancer* **27**: 11-16.



- Wilkens L., Tchinda J., Burkhard D., Nolte M., Werner M., Georgii A.** (1998) Analysis of hematologic diseases using conventional karyotyping, fluorescence in situ hybridization (FISH), and comparative genomic hybridization (CGH). *Hum Pathol* **29**: 833-839
- Withers D.A., Harvey R.C., Faust J.B., Melnyk O., Carey K., Meeker T.C.** (1991) Characterization of a candidate bcl 1 gene. *Mol Cell Biol* **11**: 4846-4853
- Wolf S, Mertens D, Schaffner C, Korz C, Dohner H, Stilgenbauer S, Lichter P.** (2001) B-cell neoplasia associated gene with multiple splicing (BCMS): the candidate B-CLL gene on 13q14 comprises more than 560 kb covering all critical regions. *Hum Mol Genet* **10**: 1275-1285.
- Wutke K., Varbiro M., Rudiger K.D., Kelenyi G.** (1981) Cytological and histological classification of multiple myeloma. *Haematol* **14**: 315-329
- Yin Z., Spitz M.R., Babaian R.J., Strom S.S., Troncso P., Kagan J.** (1999) Limiting the location of the putative human prostate cancer suppressor gene at chromosome 13q14.3. *Oncogene* **18**: 7576-7583
- Yunis J.J.** (1976) High resolution of human chromosomes. *Science* **191**: 1268-1270
- Zandecki M., Obein V., Bernardi F., Soenen V., Flacif M., Luc Lai J.L., Francois M., Facon T.** (1995) Monoclonal gammopathy of undetermined significance: chromosome changes are a common findings within bone marrow plasma cells. *Br J Haematol* **90**: 693-696
- Zandecki M., Facon T., Preudhomme c., Vanrumbeke M., Vachee A., Quesnel B., Lai J.L., Cosson A., Fenaux P.** (1995a) The retinoblastoma gene (RB-1) status in multiple myeloma: a report on 35 cases. *Leuk Lymphoma* **18**: 497-503
- Zandecki M., Lai J.L., Facon T.** (1996) Multiple myeloma: almost all patients are cytogenetically abnormal. *Br J Haematol* **94**: 217-227
- Zandecki M, Lai JL, Genevieve F, Bernardi F, Volle-Remy H, Blanchet O, Francois M, Cosson A, Bauters F, Facon T.** (1997) Several cytogenetic subclones may be identified within plasma cells from patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, both at diagnosis and during the indolent course of this condition. *Blood* **90**: 3682-3690
- Zech L., Haglund U., Nilsson K., Klein G.** (1976) Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* **17**: 47-56
- Zitzelsberger H., Lehmann L., Werner M., Bauchinger M.** (1997) Comparative genomic hybridization for the analysis of chromosomal imbalances in solid tumours and haematological malignancies. *Histochem Cell Biol* **108**: 403-417
- Zojer N., Königsberg R., Ackermann J., Fritz E., Dallinger S., Kromer E., Kaufmann H., Riedl L., Gisslinger H., Schreiber S., Heinz R., Ludwig H., Huber H., Drach J.** (2000) Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization. *Blood* **95**: 1925-1930

**Zucman J., Melot T., Desmaze C., Ghysdael J., Plougastel B., Peter M., Zucker J.M., Triche T.J., Sheer D., Turc-Carel C., Ambros P., Combaret V., Lenoir G., Aurias A., Thomas G., Delattre O.** (1993) Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours. *EMBO J* **12**: 4481-4487

**Zulian G.B.** (1997) Multiple Myeloma: clinical evaluation of plasma cell proliferative disorders and initial management. *Semin Hematol* **34**: 29-39

## Lebenslauf

Sarah Volpert, geb. Stachowski

Geboren am 08.06.1972 in Lippstadt

Familienstand: verheiratet

Name des Vaters: Erich Stachowski

Name der Mutter: Brigitte Stachowski, geb.: Kuchenbecker

### Schulbildung:

Grundschule:	von 1978 bis 1983:	Katholische Grundschule in Kallenhardt
Hauptschule:	von 1983 bis 1985:	Maximilian-Kolbe-Hauptschule in Rüthen
Gymnasium:	von 1985 bis 1986: von 1986 bis 1993:	Aufbaugymnasium in Rüthen Gymnasium-Petrinum in Brilon
<b>Hochschulreife:</b>	am 16.06.1993	am Gymnasium Petrinum Brilon
<b>Studium:</b>	von 1993 bis 1999	Studiengang Biologie-Diplom Westfälische Wilhelms-Universität Münster
<b>Promotionsstudiengang:</b>	von 1999 bis 2003	Westfälische Wilhelms-Universität Münster
<b>Prüfungen:</b>	am 21.05.1999 Diplom im Fach Biologie	Westfälische Wilhelms-Universität Münster
<b>Tätigkeiten:</b>	10.1998 bis 05.1999	Studentische Hilfskraft im Institut für Humangenetik Universitätsklinikum Münster
	06.1999 bis 09.2000	Wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Humangenetik Universitätsklinikum Münster
	10.2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Humangenetik Universitätsklinikum Münster
<b>Beginn der Dissertation:</b>	01.11.1999	im Institut für Humangenetik, Betreuer: Univ.-Prof. Dr. J. Horst/ Univ.-Prof. Dr. M. Meinhardt

