12. Tumorzytogenetische Arbeitstagung

Abstractband

27.-29. Mai 1999
Berlin-Scjmöckwitz

Tagungspräsident:
Prof. Dr. G. Thiel, Berlin

Reproduzierbarkeit und Detektionsgrenzen von CGH-Studien

Verdorfer Irmgard, Saul W., Brecevic L., Trautmann U. und Gebhart E.

Institut für Humangenetik, Schwabachanlage 10, D-91054 Erlangen

Der Zugriff auf eine große Anzahl zytogenetisch charakterisierter Leukämien aus der laufenden Diagnostik, ermöglicht uns eine gezielte Bearbeitung spezieller Fragestellungen der comparativen genomischen Hybridisierung (CGH). An gesamtgenomischer DNA dieser Leukämiefälle wird eine CGH durchgeführt, mit dem Ziel, die Methode auf ihre Reproduzierbarkeit zu prüfen und ihre Detektionsgrenzen zu bestimmen. Um die Reproduzierbarkeit der CGH-Methode zu prüfen, wird eine zweite, sog. „reverse" Hybridisierung durchgeführt. Dabei wird die Tumor-DNA mit Digoxigenin-11-UTP und die Referenz-DNA mit Biotin-16-UTP markiert. Dadurch wird die Sicherheit der Methode erhöht, denn jede entdeckte Veränderung muß durch diese zweite, reverse Hybridisierung bestätigt werden. Die Detektionsgrenze der CGH-Methode wird an Hand von unterschiedlich großen aberranten Zellpopulationen im Knochenmark von Leukämien geprüft. Es soll geklärt werden, wie groß eine chromosomal aberrante Zellpopulation sein muß, damit sie mit Hilfe der CGH noch erfaßt werden kann. Bisher liegen uns CGH-Daten von 13 Leukämie-Patienten vor, die in der GTG-Bänderungen oder in der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) unterschiedlich große aberrante Zellpupulationen zeigten. Die Größe der aberranten Zellpopulationen reichte dabei von 4% bis 96%. Die in der Bänderungsanalyse und CGH am häufigsten beobachteten Aberrationen betrafen die Chromosomen 5 (5q-) und 8 (Trisomie). In allen Mosaik-Fällen mit einer aberranten Zellpopulation von mindestens 20% oder mehr konnten die Imbalancen auch durch die CGH bestätigt werden. Die bisherigen Ergebnisse unsere Studie zeigen, daß zum einen die detektierten Aberrationen gut reproduzierbar sind und zum anderen, daß auch kleinere aberrante Zellpopulationen (20%) durch die CGH noch erfaßt werden können. Die CGH stellt also eine zusätzliche, gut einsetzbare Methode in der Leukämiediagnostik dar.

Schlüsselwörter:

Comparative genomische Hybridisierung (CGH) bei Leukämien; Detektionsgrenzen der CGH, Erfassung aberranter Subpopulationen

Telomeres and Telomerase – Cause or Consequence of chromosomal aberrations

Vetter Michael, Appligene Oncor, Illkirch, France

Telomeres are specific structures stabilizing Chromosome ends. The repetitive DNA, which makes up the Telomer, cannot provide a template for the lagging strand in replication and therefore telomeric sequences will shorten by 30-150 bp per cell division. Cells of the germline and unicellular organisms solve this problem by means of the enzyme telomerase, which can perfectly restore the gap in the lagging strand. In other cells telomerase is inactivated during development and a „mitotic clock" signals the cell to arrest in G1 when the telomere reaches a critical length.

One mechanism proposed for this observation is that the shortened telomeric DNA is no longer able to bind its associated proteins and, as a result, the free ends of the DNA are recognized as a double strand break by genes responsible for signaling a G1 arrest in such situations. It is known that the activity of p53 as a transcription factor increases following DNA double strand breaks and in senescent human fibroblasts and that in one of its targets, the cyclin-Cdk inhibitor CDKN7p21 also increases. This affects other proteins involved in the cell cycle and prevents cells to enter the S-phase.

If the function of p53 and pRb is eliminated extended cell proliferation can be observed. The Telomeres continue to shorten, to the point where the telomeres are too short to prevent chromosome fusion. Frequently dicentric chromosomes then form, there is considerable loss of genetic material, and the cells enter crisis where cell production is counterbalanced by cell death. This has been described as the first mortality stage (M1). If those senescent cells continue to divide telomeres become even shorter, division ceases and programmed cell death is induced, M2.

These defense mechansims have to be circumvented for tumors to progress from a benign state of limited growth to a malignant state of potentially unlimited growth. To evade the physiological impasse of telomeric attrition a cell must activate telomerase which prevents and can revers telomere shortening.

The activation of telomerase has been shown in most tumors and it is also known that most tumors show cytogenetic aberrations. The questions arises at what point the chromosomal changes occur in the immortalisation process. As Telomerase is a target for anti cancer strategies an answer to this questions could be quite important.

Telomere; Telomerase, Chromosomal aberrations

Comparative genomic hybridization and the interpretation of ratio profiles: Deterministic thresholds versus confidence interval based approach

Barth, Thomas F. E.[1]; Benner, A[2]; Döhner, H[3]; Bentz, M[3]; Möller, P[1]; Lichter, P[4]

[1]Pathologisches Institut der Universität Ulm; [2]Abteilung "Biostatistik", Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, [3]Medizinische Klinik und Poliklinik V, Universität Heidelberg; and [4]Abteilung "Organisation komplexer Genome," Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Germany

Comparative genomic hybridization (CGH) is a widely used screening method for genomic imbalances. The various approaches for interpretation of the ratio profiles for gains and losses of chromosomal material by defined thresholds are a matter of ongoing discussion.

36 lymphomas with a total of 257 regions were screened by fluorescence in situ hybridization (FISH) with 10 specific probes mapping to various regions of the genome. The FISH was regarded as gold standard and FISH results were compared with CGH ratio profiles of the corresponding regions. Of 218 regions with two signals detected by FISH, in 42 instances false positive results were obtained applying a confidence-interval based approach for the evaluation of CGH ratio profiles. False positive results were limited to 8 instances using the classical deterministic thresholds with cut-off values of 1.25-0.8. Of 39 regions with chromosomal aberrations detected by FISH, in 30 instances the aberration was detected with the confidence-interval based approach while in 19 instants the aberration was also detected by the 1.25-0.8 thresholds. Subsequent statistical analysis revealed a higher positive predictive value and positive likelihood ratios for the cut-off values of 1.25-0.8 than the confidence-interval based approach. Taken together, our results indicate that the use of thresholds with cut-off values of 1.25-0.8 provides a higher reliability of positive test results, however, some of the aberrations in the test group are not detected. In contrast, the confidence-interval based approach offers an advantage regarding a lower number of false negative results, but one has to take into account a much higher number of false positive results. We conclude, that the quality of a positive CGH result and the frequency of gains and losses detected by CGH strongly depend on the approach used for interpretation of ratio profiles.

CGH; interpretation of ratio-profiles; thresholds

Die Nutzung von formalin-fixiertem, in Paraffin eingebetteten Gewebe für CGH und Interphase-Cytogenetik

Ullmann Reinhard, Petzmann S., Popper H.

Die Fixierung von Gewebe mittels Formalin und anschließender Einbettung in Paraffin bringt viele Vorteile für den pathologischen Routinebetrieb, verursacht aber sehr häufig massive Schädigungen der DNA. Um bei unseren Untersuchungen nicht auf Gefriermaterial beschränkt zu sein, beschäftigten wir uns mit der Nutzbarmachung von formalin-fixiertem Gewebe für CGH und Interphasecytogenetik. Im Bereich der CGH mußte vor allem bei der Markierungsreaktion der Degradierung der DNA Rechnung getragen werden. Besonders massiv wirkte sich die Qualität der DNA aus, wenn diese mittels DOP-PCR gleichförmig amplifiziert werden mußte. Für die Nutzung von Paraffinmaterial für die Interphasecytogenetik isolierten wir Zellkerne von 40-50µm dicken Schnitten. Auf diese Kerne wurden selbst hergestellte chromosomenspezifische Centromersonden hybridisiert. Diese Centromersonden ermöglichen als Ergänzung zur CGH einerseits die Ploidiebestimmung, andererseits können numerische Aberrationen des Y-Chromosoms festgestellt werden. Nicht zu unterschätzen ist allerdings die diesen Methoden innewohnende Artefaktgefahr. So passierte es zum Beispiel, daß aufgrund autoflouresziernder Granulae in einigen Fällen die Verwendung bestimmter Fluorochrome unmöglich wurde. Im Rahmen der CGH erwies sich besonders die DOP-PCR artefakt-gefährdet, weswegen zusätzlich zu den bei PCR üblichen Leerwertkontrollen weitere Kontrollen unabdingbar sind.

Stichworte: Formalin-Fixierung, CGH, DOP-PCR, Mikrodissektion, Interphasecytogenetik

Untersuchungen der kindlichen T-ALL im Rezidiv mittels CGH

Becker, Markus 1,Wernicke, C 1; Beyermann, B 2; Thiel, G 1

1Institut für Medizinische Genetik der Medizinischen Fakultät (Campus Charité Mitte) und 2Klinik für Kinderheilkunde Campus Virchow-Klinikum der Humboldt-Universität zu Berlin

Die zytogenetische Untersuchung der kindlichen T-ALL ist eine etablierte diagnostische Methode. Das schlechte in vitro Wachstum der Leukämiezellen, die häufig unzureichende Quantität und Qualität der Mitosen, sowie der hohe Anteil normaler Metaphasen schränken die Aussagekraft der zytogenetischen Befunde ein. Die CGH, die eine Kultivierung des Ausgangsmaterials nicht erfordert, unterliegt diesen Einschränkungen nicht. Bis zu 50 % der Fälle einer ALL mit klonalen Veränderungen weisen numerische Aberrationen auf, und das gehäufte Auftreten struktureller Aberrationen läßt auf eine hohe Nachweisrate von chromosomalen Veränderungen mittels der CGH schließen. Hierfür untersuchten wir das Knochenmark von 31 Kindern (3-11 Jahre alt) mit dem Rezidiv einer T-ALL. In 10 von 31 Fällen konnte mit der CGH keine Veränderung nachgewiesen werden. 2 dieser 10 Fälle stellten sich im nachhinein als extramedulläre Rezidive heraus, so daß sich der Anteil unauffälliger Karyotypen auf 8 von 29 reduzierte (27,5 %). 15 der 21 Fälle mit chromosomalen Veränderungen zeigten komplexe Aberrationen mit mehr als einem von Veränderungen betroffenem Chromosom. Die Anzahl der Veränderungen lag zwischen 1 und 9 pro Fall. Es wurden insgesamt 46 strukturelle Aberrationen nachgewiesen und 15 numerische. Es handelte sich dabei um 46 Verluste gegenüber 20 Zugewinnen chromosomalen Materials. Die mittels der CGH am häufigsten gefundenen Veränderungen waren Deletionen im Bereich der Chromosomen 9p (6 Fälle; 20,7 %) und 12p (7 Fälle; 24,1 %). Weitere häufig nachgewiesene Veränderungen waren partielle Deletionen von 5q (5 Fälle; 17,2 %) und Verluste des Chromosom 19 (5 Fälle; 17,2 %). Weitere Verluste genetischen Materials konnten für die Chromosomen 2q (1×), 4(1×), 6q(3×), 7p(3×), 7q(3×), 8p(1×), 8q(1×), 11p(1×), 15(1×), 17p(4×), 18(1×), 22(1×) und Y(1×) nachgewiesen werden, Gewinne für die Chromosomen 1q(2×), 4p(2×), 4q(1×), 6q(1×), 7q(1×), 8q(1×), 9p(1×), 10(1×), 12(1×), 13q(1×), 15(1×), 17q(1×) und 19(3×). Zusammenfassend halten wir die CGH als Ergänzung zur Zytogenetik bei der kindlichen T-ALL für sehr sinnvoll.

ALL, CGH, strukturelle Aberrationen, Deletionen.

Akute lymphatische Leukämie (ALL) der Erwachsenen: Verbesserung der zytogenetischen Diagnostik bei Chromosomensätzen >50 durch CGH und FISH

Rieder, Harald[1], Teichgräber, A.[1], Frerick, M.[1], Poensgen, B.[1], Schwartz, S.[2], Gassmann, W.[3], Thiel, E.[2], Hoelzer, D.[4,5], Rehder, H[1].

[1]Abt. Klinische Genetik, Universitätsklinikum, Marburg, [2] Abt. Hämatologie/Onkologie, Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Berlin, [3] Marienhospital, Siegen, [4] Abt. Hämatologie/Onkologie, Universitätsklinikum Frankfurt, Germany; [5] for the GMALL Study Group

Im Gegensatz zu Kindern mit ALL ist bei Erwachsenen eine Chromosomenzahl in den Blasten, die 50 Elemente übersteigt ($ALL^{>50}$), nicht mit einer überaus günstigen Prognose verbunden. Die kombinierte CGH- und Chromosomenbandenanalyse konnte zeigen, daß im Bereich des für die kindliche $ALL^{>50}$ typischen hoch-hyperdiploiden Karyotyps mit 51-57 Elementen (HH^{51-57}) die chromosomalen Zugewinne bei Erwachsenen etwa den Befunden bei der kindlichen ALL entsprachen, zugleich jedoch dreimal mehr strukturelle Chromosomenaberrationen vorlagen. Die in der CGH-Analyse durch partielle chromosomale Imbalanzen aufgedeckten strukturellen Chromosomenveränderungen erbrachten dabei u.a. Hinweise auf eine Vermehrung von Material des langen Armes von Chromosom 13 als eine neue wiederkehrende Chromosomenveränderung bei ALL, die am ehesten die Region 13q21q31 umfaßte.
Ein nahezu triploider (NTr-) Karyotyp der ALL ist bei Erwachsenen etwa zehnmal häufiger als bei Kindern und scheint mit einer ungünstigen Prognose assoziiert zu sein. Mit einem eigens für die Identifizierung eines NTr-Karyotyps bei ALL zusammengestellten Set von Chromosomen-spezifischen Zentromer-Sonden gelang es, den Zugewinn von Chromosom 1 als wesentliches Kriterium für die Unterscheidung von einem HH^{51-57}-Karyotyp zu isolieren und eine neue Strategie für die FISH-Diagnostik an Zellkernen bei der $ALL^{>50}$ der Erwachsenen zu entwickeln. Damit wurden die Grundlagen für eine prospektive Prüfung der FISH-Diagnostik sowie der prognostischen Bedeutung eines NTr-Karyotyps gelegt.
Sowohl CGH- als auch FISH-Analysen verfehlten zum Teil in der Chromosomenbandenanalyse aufgedeckte Chromosomenaberrationen. Dabei bestätigte sich die Limitierung der Aussagekraft der CGH bei geringen Leukämieanteilen in der Probe und ganzzahligen Vermehrungen des Chromosomensatzes. Die fehlende Nachweisbarkeit von numerischen Veränderungen in der FISH-Analyse ließ einen interindividuell unterschiedlichen Gehalt an zentromernaher Satelliten-DNA vermuten, der bei Chromosom 18 besonders ausgeprägt schien. Die Prüfung der Signalstärke an Metaphasechromosomen der jeweils zu untersuchenden Patienten sollte daher bei weiteren FISH-Analysen mit alpha-Satelliten-DNA-Sonden dem Einsatz an Leukämiezellen vorausgehen.

akute lymphatische Leukämie; CGH; Hyperdiploidie;

FISH analysis revaels Aplasie high incidence of secondary changes of chromosomes 12 and 21 in childhood acute lymphoblastic leucemia (ALL) with t(12;21)(p13;q22)

Margit König

12. Tumorzytogenetische Arbeitstagung Berlin

FISH analysis of childhood acute lyphoblastic leukemia (ALL) with a t(12;21)(p13;q22)

Margit König, Georg Mann, Ulrike Pötschger, Helmut Gadner, Oskar A. Haas

Children's Cancer Research Institute (CCRI) and Ludwig Boltzmann-Institute for Cytogenetic Diagnosis (LBICD), St. Anna Children's Hospital, Vienna, Austria (E-mail: o.a.haas@magnet.at)

With an incidence of approximately 25%, the translo-cation t(12;21) is the most common recurrent rear-rangement of childhood B-cell precursor ALL. Owing to its particular structure, it is virtually undetectable with conventional cytogenetic means. Thus, the most widely applied screening method relies on the detec-tion of the uderlying TEL/AML1 gene fusion with re-verse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). This technique, however, has the disadvantage that it only reveals the respective fusion product, but not any other associated clonal abnormalities that might be of potential biological and/or prognostic significance. We have therefore applied fluorescence in situ hybridisation (FISH) and probes specific for the TEL and AML1 genes to determine the type and incidence of secondary abnormalities associated with the t(12;21). Out of the 100 cases screened by interphase FISH, we found 27 with a t(12;21), 22 (81%) of which revealed additional abnormalities of the respective gene regions. 13 patients (48%) had one secondary change, five patients (19%) two and four patients three (11%). In 13 patients (48%) either one (10 cases; 37%) or two (3 cases; 11%) additional copies of chromosome 21 were present. The second TEL allele was deleted in 12 cases (44%), whereas five (18%) had a third copy. A se-cond fusion signal which indicated the presence of a duplicated der(21)t(12;21) was observed in five (18%) cases. However, also in t(12;21) negative patients we detected with this approach 22 cases with one or two additional copies of chromosomes 21 that were usually associated with hyperdiploidy, but also 6 cases with a deletion of the TEL gene. Of further potential interest are the occurrences of a t(12;21) in a patient with a con-stitutional trisomy 21 and in association with one pseudotriploid and one hyperdiploid, but atypical ka-ryotype, as well as an amplification of the AML1 gene in a t(12;21)-negative case.

Philadelphia-negative akute myeloische Leukämie (AML) nach Philadelphia-positiver akuter lymphatischer Leukämie (ALL)

Frey, M.[1], Ittel, T.H.[2], Rehder, H.[1], Rieder, H.[1]
[1]Abteilung für klinische Genetik, MZ für Humangenetik, Philipps-Universität Marburg
[2]Abteilung für Hämatologie / Onkologie, Klinikum Stralsund

Bei einer 53-jährigen Patientin wurde Ende Mai 1994 erstmalig eine akute lymphatische Leukämie (ALL) diagnostiziert. Laborchemisch lag eine LDH– Erhöhung vor, im Blutbild zeigte sich eine Thrombozytopenie. Immunologisch wurde die Diagnose einer common-ALL vom prä-B-Subtyp gestellt. Zytogenetisch fand sich eine Translokation t (9;22)(q32;q11) mit Stückverlust des kurzen Armes des aus der Philadelphia-Translokation derivierten 9q+-Chromosoms, der(9)t(9;22)(q34;q11)del(9)(p13), in einem hyperdiploiden Karyotyp mit 58-60 Chromosomen. Die anschließend eingeleitete Chemotherapie nach ALL-Protokoll (Niedrig-Risiko-Therapie) führte zu einer Vollremission. Unter konventioneller Erhaltungstherapie bestand über 3 Jahre eine kontinuierliche komplette Remission. Dabei zeigten sich zunehmend dysplastische Veränderungen des Knochenmarkes. Anfang 1997 trat eine erneute Leukämie auf. Das Blutbild zeigte eine Leukozytose (42500 µl) mit einem Blastenanteil von 44%. Morphologisch handelte es sich am ehesten um eine AML. Die Chromosomenanalyse zeigte einen komplex aberranten Karyotyp. Es fanden sich ein Verlust eines Chromosoms 5, ein überzähliges Chromosom 8, eine Translokation t(2;8), eine Translokation t(6;6), eine Anlagerung von Fremdmaterial am langen Arm des Chromosoms 22 und ein isodizentrisches Chromosom 16, idic(16)(q22). Die molekularzytogenetische Untersuchung mit DNA-Sonden für die Gene BCR und ABL erbrachte keinen Hinweis auf eine Philadelphia-Translokation. Somit lag im Vergleich zur Erstdiagnose aus zytogenetischer Sicht eine neue Leukämie vor. Dabei dürfte neben den komplexen Karyotypveränderungen am ehesten der Verlust von Chromosom 5 als zytogenetischer Hinweis auf eine therapie-induzierte Leukämie zu sehen sein. Nach unserer Kenntnis handelt es sich hier um den ersten Fall mit therapie-induzierter AML nach Philadelphia-positiver ALL.

Philadelphia-positiv; Akute lymphatische Leukämie, Therapie-induzierte Leukämie; Akute myeloische Leukämie.

Charakteristische genomische Veränderungen beim Lymphozyten-prädominanten Subtyp des Morbus Hodgkin

Franke, Sabine[1] ; Wlodarska, I[1] ; Delabie, J[2] ; De Wolf-Peeters, C[3] ; Hagemeijer, A[1]

[1]Center for Human Genetics and Flanders Interuniversity Institute of Biotechnology, University of Leuven, Belgium. [2]The Norwegian Institute for Cancer Research and the Norwegian Radium Hospital, University of Oslo, Norway. [3]Department of Pathology, University of Leuven, Belgium.

Der Lymphozyten-prädominante Typ (LP-HD) des Morbus Hodgkin stellt einen eindeutigen Subtyp in der REAL Klassifikation dar. Etwa fünf Prozent aller Hodgkin Erkrankungen sind vom LP-HD Typ. Ähnlich wie andere Typen des Morbus Hodgkin ist der LP-HD Typ charakterisiert durch eine geringe Zahl neoplastischer Zellen, neben einer riesigen Anzahl benigner B-Zellen. Diese Besonderheit begrenzt Karyotypisierungsstudien und Einblicke in die zytogenetischen Kennzeichen dieser Erkrankung. Um dieses Hindernis zu überwinden und genomische Abweichungen in Reed-Sternberg Zellen vom LP-HD Typ zu finden, haben wir die comparative genomische Hybridisierung (CGH) an 10 Lymphknoten, die als LP-HD diagnostiziert worden waren, durchgeführt und setzten DNA Material von malignen mikrodissektierten Einzelzellen ein. Fünf CD20+ Reed-Sternberg Zellen wurden pro Fall von immungefärbten gefrorenen Gewebeschnitten mikrodissektiert. DOP-PCR amplifizierte Tumor DNA wurde in der CGH eingesetzt. Alle zehn analysierten Fälle zeigten Zunahmen (insgesamt 47) oder Verluste (insgesamt 26) von genetischem Material, unter Einbezug fast aller Chromosomen (außer #14, 15 und 21). Die Zahl genomischer Veränderungen pro Fall variierte von 2 bis 13. Die häufigsten Veränderungen (in jeweils sechs Fällen), die in dieser LP-HD Gruppe gefunden wurden, umfaßten den Verlust von 1p und die Zunahme von Chromosom X. Andere Veränderungen (jeweils in vier Fällen) umfaßten Bereiche auf 3p, 6p, 6q, 9p und 13q. Amplifikationen von genetischem Material wurden nicht gefunden. Die Ergebnisse zeigen, daß der LP-HD Typ durch genomische Veränderungen, die spezifische chromosomale Regionen betreffen, charakterisiert wird.

Morbus Hodgkin, Lymphozyten-prädominanter Typ, CGH, charakteristische Veränderungen

Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) zum Nachweis der Translokation t(2;5)(p23; q35) und anderer ALK-Veränderungen bei Ki-1 Lymphomen

Gesk, Stefan (1); Siebert, R.(1); Harder, S(1).; Tiemann, M.(2); Kreipe, H.(3); Reiter, A.(4); Eckelt, A.(5); Grote, W.(1); Schlegelberger, B.(1);
(1) Institut für Humangenetik, Schwanenweg 24, 24105 Kiel, (2) Insitut für Hämatopathologie, Kiel, (3) Institut für Pathologie und (4) Kinderklinik der MH Hannover, (5) Vysis GmbH, Stuttgart

CD30/Ki1-positive großzellig-anaplastische Lymphome (ALCL) machen ungefähr 25% aller Non-Hodgkin Lymphome bei Kindern und jungen Erwachsenen aus. Die typische chromosomale Veränderung der ALCL ist die Translokation t(2;5)(p23q35), die zytogenetisch in 30-50% und molekulargenetisch in 12-80% aller ALCL nachweisbar ist. Bei der t(2;5), die mit einer vergleichsweise guten Prognose assoziiert ist, kommt es zur Fusion des ALK (anaplastische-Lymphom-Kinase) Gens in 2p23 mit dem NPM (nukleäres Phosphoprotein Nucleophosmin) Gen in 5q35. Das NPM/ALK Hybridprotein besitzt Tyrosinkinaseaktivität und wird im Kern und im Zytoplasma exprimiert. In ca. 15% der ALCL ist die Expression des ALK-Proteins jedoch auf das Zytoplasma beschränkt. Diesen Lymphomen liegt pathogenetisch möglicherweise ein Rearrangement des ALK-Gens ohne Beteiligung des NPM-Gens zugrunde.
In einer molekularzytogenetischen Studie untersuchten wir insgesamt 10 ALCL, bei welchen zytogenetisch keine t(2;5) nachweisbar war (keine Metaphasen: n=4; aberranter Klon ohne t(2;5): n=6). Es kamen folgende FISH-Assays zum Einsatz: a) NPM-Assay, bestehend aus zwei YAC-Sonden (CEPH 756A7, 939F4), welche den Bruchpunkt in 5q35 flankieren; b) ALK-Assay (LSI-ALK, Vysis) bestehend aus zwei Sonden, die den Bruchpunkt in 2p23 flankieren; c) inv(2)-Assay, bestehend aus einer den Bruchpunkt der kryptischen Inversion inv(2)(p23q35) in 2q35 überspannenden YAC-Sonde (CEPH 914E7, Wlodarska et al., Blood, Vol.12, 1998).
Zunächst wurden alle ALCL mit dem NPM-Assay untersucht. Dabei fand sich in einem Fall, bei dem keine zytogenetische Analyse möglich war, ein Bruchpunkt in 5q35. Die NPM-negativen Fälle wurden weiterhin mit dem ALK-Assay untersucht. Dabei fand sich in drei Fällen ein Bruchpunkt in 2p23. Während zwei dieser Fälle keine Metaphasen enthielten, konnte bei dem dritten Fall durch kombinierte FISH- und R-Bandendarstellung nachgewiesen werden, daß sowohl die 3-' als auch die 5-' Sonde für das ALK-Gen auf einem komplex rearrangierten derivativem Chromosom 2 lokalisiert sind. Dieses Markerchromosom liegt in zwei Kopien vor. Immunhistochemische Untersuchungen wurden bisher bei zwei dieser ALK-rearrangierten Fälle durchgeführt. Bei beiden zeigte sich eine ausschließlich zytoplasmatische ALK-Expression.
Um das eventuelle Vorliegen einer Inversion inv(2)(p23q35) bei den ALK-rearrangierten NPM-negativen ALCL auszuschließen, wurde das YAC 914E7, welches den Bruchpunkt in 2q35 überspannt, mit einer centromerspezifischen Sonde für das Chromosom 2 als interne Kontrolle kombiniert. Im Falle eines Bruchereignisses in 2q35 sollte ein überzähliges Signal für die 2q35-Sonde vorliegen. Ein solches überzähliges Signal ließ sich in keinem der drei Fälle nachweisen. FISH stellt die geeignete Methode dar, um in ALCL atypische ALK-Rearrangements ohne Beteiligung des NPM-Gens nachzuweisen. Diese Untersuchungen sind Ausgangspunkt für die Klonierung bislang unbekannter Partnergene von ALK, die zur Pathogenese der ALCL beitragen dürften.

Korrelation zwischen zytogenetischen Befunden und klinischem Verlauf bei hochmalignen B-Zell-Lymphomen

Lana Harder (1), Hadi Nowotny (2), Reiner Siebert (1), Ruth Sonnen (3), Heinrich Bartels (4), Georg Hopfinger (2), Konrad Müller-Hermelink (5), Alfred Feller (6), Michael Vesely (7), Renate Heinz (2), Thomas Zwingers (8), Brigitte Schlegelberger (1)

(1) Institut für Humangenetik, Universität Kiel (2) Ludwig-Boltzmann Institut für Leukemieforschung, Wien (3) Allgem. Krankenhaus St. Georg, Hamburg (4) Städt. Krankenhaus Lübeck (5) Institut für Pathologie, Universität Würzburg (6) Institut für Pathologie, Universität Lübeck, (7) Jakob Erdheim Institut für Pathologie and Klinische Bacteriologie, Wien Lainz (8)Estimate GmbH, Augsburg

Nach Einführung der REAL-Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome wurde eine Diskussion darüber ausgelöst, ob - wie in diesem Klassifikationsschema vorgeschlagen - hochmaligne B-Zell-Lymphome zu definierten klinisch-pathologischen Subtypen zusammengefaßt werden sollen. Dies trifft insbesondere für die "diffuse large cell lymphomas" zu, die in der Kiel-Klassifikation in die centroblastischen, immunoblastischen und großzellig-anaplastischen Lymphome vom B-Typ unterteilt werden. Um die Frage zu klären, ob diese Subtypen der hochmalignen B-Zell-Lymphome biologische Entitäten darstellen, wurde die Häufigkeit und prognostische Bedeutung der zytogenetischen Befunde in verschiedenen Subtypen hochmaligner B-Zell-Lymphome untersucht.

Die zytogenetischen Befunde von 126 Patienten mit hochmalignen B-Zell-Lymphomen wurden mit den histopathologischen Diagnosen nach der Kiel-Klassifikation verglichen. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in der Häufigkeit typischer Chromosomenaberrationen: Die Burkitt-Translokation kam gehäuft bei Burkitt-Lymphomen, die Translokation t(14;18) bei centroblastischen Lymphomen, Deletionen in 8q und 14q, Veränderungen in 4q und Verluste des Chromosoms 10 bei immunoblastischen Lymphomen vor. Die Translokation t(11;14) war beschränkt auf die blastische Variante des Mantelzell-Lymphoms. Patienten mit dieser Chromosomenaberration hatten eine signifikant schlechtere Prognose als die übrigen Patienten mit hochmalignen B-Zell-Lymphomen und auch als Patienten mit morphologisch ähnlichen centroblastischen Lymphomen ohne t(11;14).

Die multivariate Analyse zeigte, daß Deletionen in 1q, die vor allem den terminalen Bereich 1q42-qter betreffen, Duplikationen in 1q, die vor allem die Region 1q23-32 betreffen, Trisomien 5 und Veränderungen in 15q unabhängige prognostische Faktoren darstellen. Bei den immunoblastischen Lymphomen hatten Veränderungen in 7q und 8q einen größeren Einfluß auf das Überleben als der internationale prognostische Index.

Diese zytogenetischen Befunde unterstreichen, daß morphologisch definierte Subtypen der hochmalignen B-Zell-Lymphome, vor allem die Burkitt-Lymphome, die centroblastischen und die immunoblastischen Lymphome und die blastische Variante des Mantelzell-Lymphoms als klinisch-pathologische Entitäten innerhalb der hochmalignen B-Zell-Lymphome unterschieden werden müssen.

Sind die Mantelzell-Lymphome eine homogene Entität?

Krömer, Elisabeth[1]; Hopfinger, G.[2]; Grüner, H.[1]; Nowotny, H.[1]; Nader, A.[3]; Pittermann, E.[2]; Heinz, R.[1]

[1]Ludwig Boltzmann Institut für Leukämieforschung und Hämatologie,
[2]3.Medizinische Abteilung, Hanuschkrankenhaus und
[3]Pathologisches Institut, Hanuschkrankenhaus, Wien, Österreich

Nachdem bereits vor mehr als 20 Jahren die Kiel-Klassifikation das Non-Hodgkin-Lymphom vom centrocytischen Subtyp (CC) aufgrund morphologischer Kriterien von anderen NHL unterschieden hat und die hohe Spezifität der 1991 identifizierten Translokation (11;14) (q13;q32) diesen Ansatz bestätigte, wurde dieser Subtyp in der 1995 eingeführten REAL-Klassifikation nunmehr als distinkte Entität - das Mantelzell-Lymphom (MCL) - etabliert. Da die Definition der MCL sowohl die niedrig maligne als auch die blastische Variante des CC umfaßt und in manchen Fällen auch den früheren centroblastisch/centrocytoiden Subtyp einschließt, sollte anhand klinischer und zytogenetischer Daten die Homogenität dieser Entität am Beispiel der Patienten unserer Abteilung überprüft werden.
Von den 30 reevaluierten Patienten hatten acht (m/w=5/3) die blastische Variante des MCL (MCL/bl), die Gruppe der verbleibenden 22 MCL (m/w=16/6) schließt zwei Patienten mit CB/CCoid, die nach REAL als MCL reklassifiziert wurden, ein. Das mediane Alter der beiden Gruppen war mit 67 (MCL) bzw. 63 Jahren (MCL/bl) nicht unterschiedlich, die deutlichste Differenz ergab sich beim Knochenmarkbefall mit 20/22 MCL/bl gegenüber 5/8 MCL.
Bei allen 30 Patienten wurde eine zytogenetische Analyse (aus Knochenmark oder Lymphknotengewebe) durchgeführt, der maligne Klon konnte bei 18 MCL (82%) sowie 8 MCL/bl (89%) erfaßt und beschrieben werden. Die spezifische Translokation (11;14) war bei 15 der 18 MCL-Patienten (83,3%) und fünf der acht MCL/bl (62,5%) nachweisbar. Bei einem weiteren MCL und zwei MCL/bl lag lediglich die charakteristische Deletion am 11q vor. Bei den sekundären Aberrationen zeigten sich z.T. deutliche Unterschiede zwischen niedrig malignem MCL und der blastischen Variante: Die lymphomtypische Deletion am 6q trat bei 39% der MCL, jedoch nur bei 12,5% der MCL/bl auf, was eine Korrelation mit der etwas günstigeren Prognose vermuten läßt. Der Verlust eine X-Chromosoms war ausschließlich bei den MCL zu beobachten (4 Fälle, 3w, 1m). Bei der blastischen Variante traten zum einen einige der sekundären Veränderungen wesentlich häufiger auf, z.B. +3, +7, -10 sowie Veränderungen an 2p und 17p, andererseits lagen meist zahlreiche sekundäre Aberrationen in einem Klon vor.
Die zytogenetischen Befunde bestätigen sowohl die Etablierung der Mantelzell-Lymphome als eigene Entität, als auch den Einschluß der blastischen Variante durch die REAL-Klassifikation, nicht zuletzt aufgrund des konsistenten Vorliegens der t(11;14) in über 85% der Fälle. Die klinischen Daten, vor allem die nicht signifikant unterschiedlichen relativ kurzen Überlebenszeiten (26 bzw. 20 Monate für MCL bzw. MCL/bl) liefern jedoch neuerlich Argumente gegen die strittige Einordnung der MCL in die Gruppe der niedrig malignen NHL.

Zytogenetik, Mantelzell-Lymphom, t(11;14)

Molekular- zytogenetische Analyse hochmaligner Lymphome mittels Vergleichender Genomischer Hybridisierung

Katrin Walenta[1], H. Döhner[1], M. Baudis[1], L. Trümper[2], A.C. Feller[3], H. Merz[3], H. K.Müller-Hermelink[4], G. Ott[4], M. Klöss[5], M. Löffler[5], C. Schulze[1], P. Lichter[6] und M. Bentz[1]

[1]Medizinische Klinik und Poliklinik V, Universität Heidelberg; [2]Med. Klinik, Universität des Saarlandes, Homburg; [3]Patholog. Institut, Med. Universität zu Lübeck; [4]Patholog. Institut der Universität Würzburg; [5]Inst. f. med. Informatik, Statistik und Epidemiologie, Universität Leipzig; [6]Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg.

Nach wie vor gibt es nur wenige Daten zur prognostischen Relevanz chromosomaler Aberrationen bei Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL). Um die prognostische Bedeutung von Chromosomenveränderungen möglichst genau abschätzen zu können, ist es wichtig, eine große Patientenzahl zu analysieren, die idealerweise alle die gleichen prätherapeutischen Charakteristika aufweisen und darüberhinaus eine einheitliche Therapie erhalten. Diese Voraussetzungen sind im Rahmen einer multizentrischen Therapiestudie gegeben. Allerdings steht dabei in der Regel nur formalinfixiertes, Paraffin-eingebettetes Tumorgewebe zur Verfügung. Mit Hilfe der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH= Comparatative Genomic Hybridization) ist es möglich, auch an solchem Material einen umfassenden Überblick über chromosomale Aberrationen zu erhalten. Hier wurde Tumormaterial von 151 Patienten analysiert, die alle im Rahmen der NHL-B Studie der Deutschen Studiengruppe Hochmaligne Non-Hodgkin Lymphome behandelt wurden. Hierbei zeigten sich folgende Ergebnisse: in 95 von diesen 151 Patienten (63%) konnten erfolgreich CGH-Analysen durchgeführt werden. Die übrigen 56 Fälle ergaben trotz wiederholter Hybridisierungsversuche keine auswertbaren CGH- Ergebnisse. Dies ist auf die unzureichende Qualität der DNA zurückzuführen, welche sich durch längere Formlain-Fixierungszeiten (>24-48 Stunden) ergibt. Die häufigsten Veränderungen betrafen Zugewinne chromosomalen Materials auf 12q (18,1%), 7q und 18q (je 17%), 7p (16%), 1q und 11q (je 14,9%), und ein Verlust auf 13q (17%) und 6q (16%). Für einige dieser Veränderungen konnten Konsensusregionen identifiziert werden. In 15 Fällen war es möglich, insgesamt 23 DNA-Amplifikationen innerhalb des Genoms zu kartieren. Zum jetzigen Zeitpunkt sind für 62 der 95 Patienten klinische Daten verfügbar. Dabei besitzen Patienten mit komplexen chromosomalen Veränderungen (≥ 3 Aberrationen) eine verminderte Überlebenswahrscheinlichkeit (p= 0.058). Diese Daten zeigen, daß molekularzytogenetische Analysen im Rahmen multizentrischer Therapiestudien durchführbar sind. Mit steigender Patientenzahl können so möglicherweise prognostisch relevante spezifische Aberrationen bei aggressiven Lymphomen identifiziert werden.

Stichwörter: CGH, Non- Hodgkin- Lymphome, multizentrische Therapiestudie

Eine neue Dreifarb-FISH-Methode zur Verlaufskontrolle Ph-positiver CML-Fälle nach gegengeschlechtlicher KMT

Starke Heike; Heller A, Ziegler M, Loncarvic I F, Claussen U, Gebhart E*, Liehr T
Institut für Humangenetik und Anthropologie, Jena, Deutschland
*Institut für Humangenetik, Erlangen, Deutschland

Bei der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) ist der Nachweis eines BCR-ABL Rearrangements, welches auf eine minimale Resterkrankung (MRD) oder ein Rezidiv bei Verlaufskontrollen nach Knochenmarks Transplantation (KMT) von großer Bedeutung. In der molekularen Zytogenetik ist es seit einigen Jahren üblich bei Philadelphia Chromosom positiven (Ph+) Leukämien nach KMT den Krankheitsverlauf durch Einsatz von BCR-ABL Gen-spezifischen Sonden zu verfolgen. Bei gegengeschlechtlicher KMT werden statt dessen meist die X und Y Chromosom-spezifischen Zentromer Sonden zu diesem Zweck eingesetzt. Nach erfolgter KMT sind jedoch häufig noch Empfängerzellen in variierenden prozentualen Anteilen im Knochenmark vorhanden. Durch alleinigen Einsatz der X und Y Chromosom-spezifischen Sonden ist keinerlei Aussage über den Malignitätsgrad der nachgewiesenen Empfängerzellen möglich, was aber oft sowohl prognose- als auch therapierelevant ist. Daher schien es sinnvoll, in solchen Fällen nach gegengeschlechtlicher KMT die BCR-ABL Sonden mit der Y Chromosom spezifischen Sonde zu kombinieren. Hierzu verwendeten wir die BCR-ABL ES Sonde (SpectrumGreen und SpectrumOrange) sowie die Y-spezifische SatIII Sonde (SpectrumAqua) von Vysis. In 6 bislang mit dieser Proben-Kombination untersuchten Fällen (jeweils vor und nach KMT) konnte gezeigt werden, daß neben Empfänger-zellen mit Ph-Chromosom auch solche nachweisbar sein können, die keine Ph-Translokation aufweisen. Folglich ist mit dieser neuen Dreifarb-FISH-Methode eine bessere Charakterisierung der verbliebenen Empfängerzellen möglich. Ein erhöhter Anteil an Ph-negativen Empfängerzellen kann hierbei einen Hinweis auf ein sekundäres Malignom sein. Bei Verschlechterung des klinischen Bildes nach KMT sollte es mit dieser Methode möglich sein, zwischen einem Rezidiv, einem sekundären Malignom oder der Vermehrung von unauffälligen Empfängerzellen zu unterscheiden.

Danksagung: HS und AH sind Stipendiaten der Herbert Quandt Stiftung der Varta AG.

Stichwörter: CML, Philadelphia Chromosoms, BCR-ABL, KMT

Hypermetaphase- und Interphase FISH zur Beurteilung des zytogenetischen Ansprechens bei der Philadelphia-Chromosom positiven CML - Erste Erfahrungen mit der Anwendung in der Routinediagnostik.

Duba Hans-Christoph*, Hilbe W.+, Mehringer A.*, Erdel M.*, Thaler J.* und Utermann G.*
* Institut für Medizinische Biologie und Humangenetik der Universität, Schöpfstraße 41, A-6020 Innsbruck
+ Universitätsklinik für Innere Medizin, Anichstraße 35, A-6020 Innsbruck

In den letzten Jahren hat das "Monitoring" von CML Patienten an Bedeutung gewonnen, da vor allem durch den Einsatz von Interferon komplette und partielle zytogenetische Remissionen (<35% Philadelphia Chromosom positive Zellen) erreicht werden können. Neue molekularzytogenetische Methoden wie die Hypermetaphase (HMF) und die Interphase (IPF) FISH mit BCR/ABL spezifischen Proben wurden erst kürzlich entwickelt. Diese Methoden haben sich als wertvolle Ergänzung zur konventionellen Zytogenetik erwiesen, die nachwievor als der "Goldstandard" zur Remissionsbeurteilung angesehen wird.

Diese beiden Methoden wurden von unserer Arbeitsgruppe in den vergangenen zwei Jahren (1997-1998) an insgesamt 135 Proben von Ph-positiven CML Patienten unter Therapie oder nach Knochenmarkstransplantation angewandt. Bei 85 Patienten wurde die HMF Methode, bei den restlichen 50 Patienten, bei denen mittels HMF keine auswertbaren Metaphasen erhalten werden konnten, die IPF Methode angewandt. Als Vergleichsgruppe wurden die konventionell zytogenetischen Daten von Patienten mit gleichen Charakteristika aus den Jahren 1994 - 1995 (n=134) ausgewertet.

Während mittels HMF ein Mittel von 48,2 Metaphasen (Bandbreite 1 - 201) ausgewertet werden konnte, betrug dieses Mittel bei der konventionellen Zytogenetik nur 18,8 (Bandbreite 3 - 68). Bei beiden Methoden konnten in 37% (n=50) der Proben keine Metaphasen erhalten werden. In den Jahren 1997 - 1998 wurde hier zusätzlich die IPF angewandt. Mittels IPF konnte bei diesen Patienten ein Mittel von 201 Interphasen auf das Vorliegen des BCR/ABL Rearrangements analysiert werden, und somit ein Befund erhoben werden, was im Vergleichszeitraum 1994 - 1995 ohne FISH nicht möglich war.

Unsere Untersuchungen brachten folgende Ergebnisse: a) mittels HMF kann eine größere Metaphasenausbeute und damit eine größere Sensitivität erzielt werden. b) mittels IPF kann auch in Fällen wo durch den antiproliferativen Effekt von Interferon keine Metaphasen erhalten werden können eine Aussage über den Remissionsstatus des Patienten gegeben werden. Zusammen mit anderen kürzlich erschienenen Arbeiten illustrieren unsere Ergebnisse, daß diese neuen Methoden (HMF, IPF) sehr gut geeignet sind, den Remissionsstatus bei der CML zu bestimmen und in neue Therapieschemata miteinbezogen werden sollten.

Stichwörter: CML/Interphasefish/Hypermetaphasefish

Einsatz der p53 FISH-Sonde zur Prognosedifferenzierung bei Leukämien

Liehr, Thomas; Starke H, Loncarvic I, Heller A, Ziegler M, Claussen U
Institut für Humangenetik, Jena, Deutschland

Bei der Chronisch Lymphatischen Leukämie (CLL) und beim Multiplen Myelom (MM) wurde kürzlich gefunden, daß p53 Deletion vorkommen können, die mittels FISH Technik einfach nachweisbar sind. Für die CLL konnten Döhner et al. (1997, Leukemia Suppl 2,19-21) zeigen, daß Patienten ohne p53 Deletion einerseits eine bessere Prognose und andererseits unter Therapie mit Nukleosid Analoga eine sehr gute Chance auf Langzeitremission haben. Für das MM konnte mittels einer FISH-Studie (Drach et al., 1998, Blood, 92, 802-809) nachgewiesen werden, daß in 32-54% der MM Fälle p53 Deletion vorkommen; diese war meist mit Stage III assoziiert. Patienten mit p53 Deletion hatten deutlich kürzeres Überleben als solche ohne p53 Deletion. Aufgrund dieser Erkenntnisse wird in der Tumorzytogenetik seit kurzem in unserem Labor bei MM und CLL Fällen die p53 Sonde (Vysis) zusammen mit der Zentromer Sonde für das Chromosom 17 routinemäßig in einen 2-Farb-FISH Ansatz eingesetzt. Bislang wurden 6 Fälle mit CLL und 1 Fall mit MM untersucht. In einem CLL Fall konnte eine p53 Deletion nachgewiesen werden. Darüber hinaus war die p53 Sonde bei einem CML Fall von Bedeutung, in dem neben einem Ph-Chromosom ein Translokations-Chromosom (17p11.1;Yq11.1) auftrat - verbunden mit dem Verlust des p53-Gens innerhalb dieser Zellen. Diese Veränderung konnte mittels eines Dreifarb-FISH Ansatzes sowohl in Metaphase als auch in Interphase Zellen nachgewiesen werden. Somit verspricht die p53 Sonde nach entsprechender statistischer Evaluierung eine gute und wichtige Ergänzung zu den anderen in der molekularen Tumorzytogenetik inzwischen routinemäßig eingesetzten Sonden, wie z.B. der bcr/abl oder Zentromer Sonden zu werden, die zum Nachweis von zytogenetischen Markern verwendet werden, welche auf eine minimale Resterkrankung (MRD) hinweisen.

Danksagung: HS und AH sind Stipendiaten der Herbert Quandt Stiftung der Varta AG.

Stichwörter: p53, CLL, Multiples Myelom, CML

Ist der Ausschluß eines Sub-Klones mit numerischen Veränderungen der Chromosomen 7 und/oder 8 mittels FISH bei der ALL von Relevanz?

Heller Anita; Starke H, Ziegler M, Loncarevic I F, Claussen U, Liehr T
Institut für Humangenetik und Anthropologie, Jena, Deutschland

Anlaß für unsere Studie war die Publikation von Lempert et al. (1998) in Cytogenet. Cell Genet. 105:193-197, in der durch Interphase-FISH Analysen bei 21 Patienten mit Akuter Lymphatischer Leukämie (ALL) in 5 Fällen Aneuploidien der Chromosomen 7 und 8 festgestellt wurden, die nach konventionell zytogenetischer Untersuchung unauffällig schienen. Aufgrund dieser Daten empfehlen die Autoren, grundsätzlich Interphase-FISH Analysen bei ALL-Fällen durchzuführen, um mögliche Sub-Klone mit Monosomie bzw. Trisomie der Chromosomen 7 und/oder 8 zu erfassen. In der hier vorgestellten eigenen Studie wurden bislang 18 ALL-Fälle mittels Zweifarb-FISH unter Verwendung der Zentromer-Sonden cep7 (biotinyliert) und cep8 (digoxigeniert) [Oncor] untersucht. Pro Fall erfolgte eine Auswertung von 200 Interphasekernen. Von diesen 18 Fällen zeigten nach der GTG-Bänderung 11 Patienten einen unauffälligen Karyotyp, bei 4 Fällen konnte, aufgrund zu geringen Zellwachstums, kein zytogenetischer Befund erhoben werden, und in 3 Fällen lagen komplex aberrante Karyotypen ohne Beteiligung der Chromosomen 7 oder 8 vor. In nur einem der 18 untersuchten ALL-Fälle wurde ein numerisch aberranter Subklon mit einer Monosomie 7 gefunden. Diese Aberration lag dabei in 14% der untersuchten Zellen vor. Bisher können wir die Ergebnisse von Lempert et al. in der von uns untersuchten Patientengruppe nicht in vollem Umfang bestätigen. Nach Klärung der prognostischen Relevanz der Monosomie bzw. Trisomie 7 und oder 8 sollte der zusätzliche Aufwand, der sich durch die routinemäßig durchgeführte Zweifarb FISH Analyse ergibt, bewertet werden.

Danksagung: AH und HS sind Stipendiaten der Herbert Quandt Stiftung der Varta AG.

Stichwörter: ALL, Aneuploidien der Chromosomen 7/8, Interphase-FISH

FAST-FISH zur Detektion numerischer Chromosomenaberrationen bei Kindern mit Myelodysplastischem Syndrom (MDS) oder aplastischer Anämie (AA)

Pils, Sabine[1]; Roitzheim, B.[2]; Niemeyer, C.[3]; Harbott, J.[1]

[1]Onkogenetisches Labor, Universitäts-Kinderklinik Gießen, Deutschland;[2]Universitäts-Kinderklinik Köln, Deutschland; [3]Universitäts-Kinderklinik Freiburg, Deutschland

Der Einsatz der FISH-Technik in der onkologischen Diagnostik erlaubt die einfache und zuverlässige Detektion numerischer Chromosomenaberrationen. Der Nachweis dieser Veränderungen, insbesonderre der Monosomie 7 und der Trisomie 8 hat bei MDS und aplastischer Anämie klinische Bedeutung. Das Auftreten der Monosomie 7 bei Diagnosestellung und auch während des Verlaufes ist bei Kindern mit AML oder MDS mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Auch für die Behandlung der Anämien hat das Vorkommen einer Monosomie 7 therapeutische Konsequenzen. Aufgrund des Einsatzes hochrepetitiver Sonden in einem FAST-FISH Protokoll kann eine Vereinfachung der Methodik bei gleichzeitiger Beschleunigung der Befunderhebung erzielt werden. Zur Detektion numerischer Aberrationen werden Sonden verwendet, die spezifisch mit der alphoiden Satelliten-DNS in der Zentromerregion eines oder mehrerer zu untersuchender Chromosomen hybridisieren. Im Gegensatz zur herkömmlichen Hybridisierung über Nacht, wird im FAST-FISH Protokoll aufgrund der raschen Hybridisierungskinetik die Dauer auf 2 h reduziert, was eine Reduktion der unspezifischen Hintergrundsignale zur Folge hat. Eine vergleichende Analyse beider Protokolle innerhalb eines Kollektivs von MDS- und Anämie-Patienten zeigt, dass mit FAST-FISH in wesentlich kürzerer Zeit mindestens vergleichbar gute Hybridisierungsergebnisse erreicht werden können.

Gefördert durch die Deutsche Krebshilfe, Bonn und die Kind-Phillip Stiftung, Essen

MDS, Monosomie 7, FAST-FISH, Satelliten-DNS

Monosomie 7 in der Interphase-Zytogenetik und klinischer Verlauf bei der schweren aplastischen Anämie (SAA) im Kindesalter

Walther Joachim-Ulrich (1), Chaudhuri Y P(1), Harbott J(2), Führer M(1)
Kinderklinik und Kinderpoliklinik der Universität München (1)
Kinderklinik und Kinderpoliklinik der Universität Gießen (2)

Die hämatologische Zytogenetik wird in der Klinik meist zum Nachweis somatischer klonaler Aberrationen eingesetzt; das trifft auch für die Diagnostik bei der schweren aplastischen Anämie (SAA) zu. Hier trägt sie auf diese Weise zur initialen Differentialdiagnostik (Leukämie, MDS) bei und dient im Verlauf dem Ausschluß bzw.der Früherkennung von "sekundär" auftretenden klonalen Komplikationen, erkennbar an Aberrationen wie insbesondere der Monosomie 7, die teils primär, teils sekundär ("iatrogen"?) beobachtet wird. Im Patientenkollektiv der SAA 94 Studie der GPOH fanden sich bisher unter 139 Kindern sechs mit klonaler Monosomie 7, alle erstmals nach Beginn der immunsuppressiven Therapie (mit zusätzlichem GCSF) und bei vier von sechs mittels FISH nachgewiesen. Drei von diesen sechs blieben Non-Responder, ein Kind sprach rasch, aber nur teilweise an, ein weiteres spät (18 Monate) und partiell. Diese beiden Patienten wurden im Verlauf diagnostisch als MDS (RAEB / RAEB-t) umklassifiziert. Der sechste Patient hatte bereits am Tag 112 eine AML entwickelt. Hinsichtlich des Erkrankungsalters entsprachen alle sechs dem Gesamtkollektiv (Median: 9 Jahre). Außerhalb des Behandlungsprotokolls verfolgen wir drei weitere Patienten mit SAA und Monosomie 7 nach Immunsuppression und GCSF-Gabe.
Für diese Patienten muß nach der gegenwärtigen Einschätzung eine Fremdspender-Transplantation erwogen werden. Offene Fragen betreffen den Zeitpunkt und den Mechanismus des klonalen Verlusts von Chromosom 7 (vgl.andere Zytopenie-Syndrome) sowie die Gewährleistung, aber auch die klinische Relevanz seines frühestmöglichen Nachweises.
Stichworte: aplastische Anämie, Monosomie 7, FISH, Immunsuppression, GCSF

Ph-negative chronische myeloische Leukämien mit BCR-ABL Genfusion auf Chromosom 22 oder Chromosom 9

Loncarevic Ivan F., Starke H., Bleck C., Ziegler M., Clement J.H., Liehr T., Claussen U.,
Institut für Humangenetik und Anthropologie, Jena, Deutschland

Bei etwa 5% bis 10% der Patienten mit einer chronisch myeloischen Leukämie (CML) finden sich Varianten der CML-typischen Translokation t(9;22)(q34;q11). Neben Modifikationen dieser Translokation ist in wenigen Fällen, auch ein unauffälliger Karyotyp nach G-Banden-Zytogenetik zu konstatieren. Die molekulare Analyse der Bruchpunktregion läßt in einigen dieser Fälle (5-10%) eine Rekombination der Gene BCR und ABL erkennen. Eine kryptische Genfusion kann in einem Schritt oder ausgehend von einer typischen t(9;22) im Vorgang der Klon-Evolution entstehen. Es ist denkbar, daß mit der Entstehung eines neuen Zellklons auch eine veränderte Klinik einhergeht.

Wir beschreiben zwei Patienten mit einer CML, die mittels G-Banden-Zytogenetik einen unauffälligen Karyotyp aufwiesen. In beiden Fällen wurde durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH, ES-FISH, Vysis) eine Kolokalisation der Gene BCR und ABL und mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) eine BCR/ABL-Genfusion nachgewiesen. Die Kolokalisation beider Gene war entweder auf dem Chromosom 22 (Fall 1) oder auf dem Chromosom 9 (Fall 2). Mit anderen genspezifischen Sonden sowie den Painting-Sonden für die Chromosom 9q und 22 war kein reziproker Stückaustausch zwischen den Chromosomen erkennbar. In Fall 2 wiesen 35% der Zellen in Interphase mit der ES-FISH-Sonde die t(9;22) typische Signalkonstellation auf. Daher wurde hier vermutet, daß dem atypischen Zellklon ein Zellklon mit einer typischen t(9;22)(q34;q11) zugrunde liegt. Eine Unterscheidung zwischen Insertion und sekundäre Translokation als Entstehungsmechanismus der vorliegenden Genfusion ist mittels FISH jedoch nicht möglich, da in beiden Fällen das gleiche Produkt entstehen kann.

Isochromosom Xp und Isodicentrisches Chromosom idic(Xq13) in hämatologischen Erkrankungen: 4 neue Fälle

Dr. Hendrati Pirc-Danoewinata

12. Tumorzytogenetische Arbeitstagung Berlin

FISH analysis of i(X)(p10) and idic(X)(q13) in myeloid disorders

Hendrati Pirc-Daneowinata 1, Holger Auner 2, Ilse Chudoba 3, Otto Krieger 4, Peter Kier 5 , Oskar A. Haas 1,6

1 CCRI and 6 LBICD, St.Anna Chidren's Hospital, Vienna, Austria; 2 Dpt. Hematology & Oncology, University Hospital, Graz, Austria; 3 Metasystems, Altlussheim, Germany; 4 Elisabethinen Hospital, Linz, Austria, 5 Dpt. Hematology & Oncology, SMZO Hospital, Vienna, Austria (o.a.haas@magnet.at)

Isochromosomes of various chromosomes are commonly encountered in many types of hematologic neoplasms and usually part of complex karyotype changes. Isochromosomes of the short arm of the X chromosome are rare and typically associated with myeloid neoplasms. Depending on their structure and the breakpoints two distinct types can be distinguished cytogenetically. The breakpoints of the idic(X)(q13) are clearly located in the long arm, whereas those of the i(X)(p10) occur within the centromeric region. The former has been reported in 22 and the latter in only 8 patients so far, but in only three myelodysplastic syndromes (MDS) and in one acute myeloid leukemia (AML) as the sole karyotype abnormality. We present four new cases, two each with an idic(X)(q13) and i(X)(p10). In line with previous reports all patients were elderly females and suffered from myeloid malignancies. The i(X)(p10) chromosomes occurred as the sole abnormality in a 69-year old patient with pancytopenia and a 71-year-old patient with AML, whereas the idic(X)(q13) was duplicated in one 83-year-old patient with chronic myelomonocytic leukemia (CMML) and associated with a trisomy 8 in a 79-year old patient with AML. To verify and characterize these abnormalities in more detail, we performed FISH with an X chromosome-specific alpha satellite probe and chromosome-arm specific painting probes. In addition, we also used primed in situ labeling (PRINS) with a X centromere-specific oligonucleotide as target sequence and a probe for XIST ("X inactive specific trasncript"), the gene responsible for X-inactivation. Our analyses confirmed the dicentric nature of the X isochromosome in two patients and revealed that XIST was deleted on these chromosomes.

Die CGH- und SKY- Analysen von hämatopoetischen Tumoren und epithelialen Karzinomen lassen unterschiedliche Mechanismen bei der Tumorgenese vermuten

Schröck, Evelin[1,5], Ghadimi, B.M.[1], Hilgenfeld, E.[1,2], Padilla-Nash, H.[1], Heselmeyer, K.[1], Haas, O.[3], Auer, G.[4], Ried, T.[1]

[1]National Cancer Institute (NIH, Bethesda, MD),
[2]Medizinische Klinik (Münster)
[3]St. Anna-Kinderspital (Wien, Österreich)
[4]Department of Pathology, Karolinska-Hospital (Stockholm, Sweden)
[5]Institut für Molekulare Biotechnologie (Jena)

Wir sind daran interessiert, die Entstehungsmechanismen von tumorspezifischen chromosomalen Aberrationen zu analysieren. Mittels zytogenetischer und molekularbiologischer Methoden wurden bei Leukämien, Lymphomen und Sarkomen rekurrente Bruchpunkte chromosomaler Translokationen und die jeweils involvierten Gene identifiziert. Die pathogenetische Bedeutung dieser Fusionsgene oder aktivierten Protoonkogene für die Tumorentstehung ist nachgewiesen. Mit Hilfe von SKY fanden wir bei akuten komplexen Leukämien (n=30) eine grosse Zahl neuer, bisher nicht beschriebener Translokationen. Dies deutet darauf hin, dass noch eine Vielzahl weiterer Bruchpunkte zu klonieren sind. Ca. 50% dieser Translokationen sind balanciert, die anderen 50% sind unbalanciert. Zu untersuchen bleibt, in wieweit auch der Verlust von Tumorsuppressorgenen durch Deletion oder der Gewinn von Onkogenen durch Trisomie bei der Leukemogenese eine Rolle spielen. Im Gegensatz dazu ergaben die CGH- und SKY-Analysen von epithelialen Karzinomen, dass über 90% der Translokationen und Aberrationen unbalanciert sind. Spezifische Fusionsgene wurden bisher für Sarkome und andere Tumoren mesenchymaler Herkunft, jedoch nicht für epitheliale Karzinome beschrieben. Dafür gibt es zwei mögliche Interpretationen: (i) Aus methodischen Gründen und wegen der Vielzahl der auftretenden Aberrationen sind bisher keine rekurrenten Translokationsereignisse entdeckt worden, die zur Genlokalisation führen könnten. (ii) Der Entstehung epithelialer Karzinome liegen andere Prinzipien zugrunde als den Sarkomen und hämatopoetischen Tumoren: Durch den Gewinn und Verlust chromosomalen Materials (Aneuploidie) ändert sich die Kopienzahl von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, was Wachstumsvorteile und genomische Instabilität nach sich zieht. Mit Hilfe von geeigneten Modellsystemen wollen wir nun die zellulären Mechanismen untersuchen, die zu Aneuploidie und chromosomalen Translokationen führen.

SKY, CGH, komplexe Leukämien, epitheliale Karzinome, Mechanismen chromosomaler Aberrationen

Multiplex-FISH mit mikrodissektions generierten Painting Proben zur Analyse komplexer chromosomaler Rearrangements

Martin, Thomas; Ermis, E.; Reichardt, S.; Freiler, A.; Zang, K.D.

Institut für Humangenetik, Homburg, Deutschland

Multiplex-FISH ist eine der jüngsten Entwicklungen auf dem Feld der molekular-zytogenetischen Methoden. Alle 22 menschlichen Autosomen und die Geschlechtschromosomen X und Y werden in einer eigenen Farbe dargestellt. Die Identifikation der Chromosomen erfolgt über eine individuelle Fluorochromkombination, die über einen entsprechenden Fluoreszenzfiltersatz detektiert wird. Wir haben DNA-Bibliotheken aller menschlichen Chromosomen mittels Mikrodissektion generiert. Die das komplette Chromosom repräsentierende Probe kann mit DOP-PCR über mehrere Generationen amplifiziert werden. Auch die Markierung der Sonden erfolgt über DOP-PCR. Mit fünf verschiedenen Fluorochromen können die erforderlichen 24 Kombinationen erstellt werden. Durch den Einsatz von fünf unterschiedlich direkt markierten Nukleotiden konnte eine Verringerung der Hintergrundsignale bei gleichzeitig erheblicher Verkürzung der für die Posthybridisierungswaschung erforderlichen Zeit erreicht werden. Die Bildaufnahme und –bearbeitung erfolgt am neuen vollautomatischen Olympus AX70 Mikroskop mit 8-fach Filterrad mit einer gekühlten CCD-Kamera und der ISIS Software Version 3.0 der Firma Metasystems. Die Methode stellt eine Ergänzung der klassischen Zytogenetik dar, die ihre gezielte Anwendung gerade auch in der Tumorzytogenetik finden wird. In Tumorzellkulturen, wo geringer Mitoseindex und schlechte Mitosen- und Bänderungsqualität eine sichere Chromosomenzuordnung und Identifikation von Markern oft erheblich einschränken, kann eine Identifizierung über einen spezifischen Farbwert helfen, zumindest numerische und interchromosomale strukturelle Veränderungen sicher aufzuklären. Erste Ergebnisse unserer Untersuchungen werden präsentiert.

Multiplex-FISH, Mikrodissektion, Chromosomen Painting Probe, Chromosomenaberration

Aufklärung komplex aberranter Tumormetaphasen durch Multicolor-FISH, sowie Mikrodissektion von Fluoreszenz markierten derivativen Chromosomen

Weimer, Jörg; Kiechle, M.; Arnold N.

Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe -onkologisches Labor- Michaelisstr. 16, Kiel, Germany

Eine möglichst genaue Beschreibung chromosomaler Aberrationen ist Ziel der modernen Zytogenetik. Insbesondere in der Tumorzytogenetik ist die Identifizierung typischer, klinisch relevanter Chromosomenveränderung von Bedeutung. Diese zu definieren scheitert häufig an den sehr stark veränderten Tumormetaphasen deren Chromosomensatz nicht selten vielfach vorliegt, verschiedenste Verluste aufweist und derivative Chromosomen enthält. Klassische Bänderungstechniken erweisen sich bei der Erstellung eines komplexen Tumorkaryotyps oft als unzureichend. Multicolor-FISH erleichtert die Erfassung eines solchen Karyotyps, da diese unabhängig von dem Kondensationsgrad der Chromosomen ist. Bruchpunktbestimmungen von derivativen Chromosomen sind jedoch nur mit der Mikrodissektionstechnik und Rückhybridisierung möglich. Uns ist es gelungen, die Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit der Mikrodissectionstechnik zu verbinden. Wir konnten an einem Vaginaltumor mittels der M-FISH-Technik ein in allen Metaphasen präsentes Translokationsprodukt (8;12) nachweisen. Dieses derivative Chromosom wurde mit entsprechenden Fluoreszenzsonden hybridisiert, identifiziert und direkt mittels Mikrodissection isoliert. Durch Rückhybridisierung des derivativen Chromosoms auf normale Metaphasen konnte der Bruchpunkt und der translozierte chromosomale Abschnitt bestimmt werden.

Mikrodissektion, M-FISH, Tumorzytogenetik

Stellenwert von konventioneller Zytogenetik, Interphase-FISH, Hypermetaphasen-FISH und RT-PCR zum Nachweis von Restleukämie bei der chronischen myeloischen Leukämie

Claudia Schoch, S. Bursch, S. Schnittger, T. Haferlach und W. Hiddemann
Medizinische Klinik III, Klinikum Großhadern, LMU, München

85 Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie wurden parallel mit konventioneller Zytogenetik, Interphase-FISH (IP-FISH), Hypermetaphasen-FISH (HM-FISH) sowie RT-PCR untersucht. Davon sind 8 Patienten bei Erstdiagnose, 3 in Blastenkrise, 21 unter Interferontherapie, 6 unter Therapie mit Interferon + Hydroxyurea oder AraC, 9 unter Hydroxyurea-Therapie, 7 nach autologer und 31 nach allogener Knochenmarktransplantation analysiert worden. Im Median wurden 23 Metaphasen (4-44) mit Hilfe der G-Banden-Analyse ausgewertet. Es wurden im Median 200 Interphase-Kerne (100-400) und im Mittel 88 (5-509) Metaphasen mit BCR-ABL-FISH analysiert. Die RT-PCR wurde als sogenannte „nested RT-PCR" mit zweimal 35 Zyklen durchgeführt. Alle 50 Patienten die in der G-Banden-Analyse mindestens eine Ph-positive Metaphase aufwiesen, waren ebenfalls im IP-FISH, im HM-FISH und nach den ersten 35 Zyklen in der RT-PCR positiv. Bei 23 Patienten nach allogener KMT mit negativer nested RT-PCR waren die anderen Methoden ebenfalls negativ. Bei 8 Patienten war die RT-PCR erst nach den zweiten 35 Zyklen positiv, lediglich bei einem dieser Patienten zeigten 2 von 25 Metaphasen in der G-Banden-Analyse eine Philadelphia-Translokation, während lediglich 5 von 209 Interphase-Kernen und 0 von 102 Metaphasen eine Kolokalisation von BCR und ABL aufwiesen. Bei keinem Patienten ohne Nachweis von Ph-positiven Metaphasen in der konventionellen Zytogenetik wurden nur mit HM-FISH BCR-ABL-positve Metaphasen beobachtet. Diese Daten führen zu dem Schluß, daß die RT-PCR nach allogener Knochenmarktransplantation die Methode der Wahl zum Nachweis von minimaler Resterkrankung ist. Nur wenn die RT-PCR das Vorhandensein von Rest-CML anzeigt, ist der Einsatz von Hypermetaphasen-FISH sinnvoll. Diese Methode hat sich zum Nachweis von CML-Zellen als sensitiver erwiesen als die Interphase-FISH und ist bei einer großen Zahl von Metaphasen schneller durchzuführen als die konventionelle Zytogenetik. Aufgrund des relativ hohen Arbeitsaufwandes der Hypermetaphasen-FISH erscheint bei Patienten unter konventioneller Therapie zunächst eine Analyse mit Interphase-FISH sinnvoll, bei fehlendem Nachweis von BCR-ABL-positiven Zellen sollte dann eine Hypermetaphasen-FISH durchgeführt werden. Eine Korrelation mit klinischen Daten zum Krankheitsverlauf ist abzuwarten, bevor der Gold-Standard der Analyse von 25 Metaphase mit konventioneller G-Bandenanalyse aufgegeben werden kann.

CML, Hypermetaphasen-FISH, RT-PCR

Korrelation chromosomaler Aberrationen mit dem klinischen Verlauf bei Patientinnen mit Mammakarzinom nach adjuvanter Hochdosis-Chemotherapie

Alexander Seute[1], H.-P. Sinn[2], S. Hohaus[1], R. Emig[4], E.M. Grischke[3], G. Bastert[3], R. Schlenk[1], A.D. Ho[1], R. Haas[1], M. Bentz[1]

[1]Medizinische Klinik und Poliklinik V, [2]Pathologisches Institut und [3]Frauenklinik der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, [4]Frauenklinik und Poliklinik der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Nach wie vor gibt es nur wenige Untersuchungen zur klinischen Relevanz chromosomaler Aberrationen beim Mammakarzinom. Eine Hauptursache hierfür liegt in der methodischen Begrenzung der bislang angewandten Techniken. Durch die Einführung der sogenannten "comparativen genomischen Hybridisierung" (CGH) kann das gesamte genetische Material eines Tumors auf das Vorhandensein von chromosomalen Amplifikationen und Deletionen hin untersucht werden. Im Rahmen dieser Studie wurde ein homogenes Patientenkollektiv molekularzytogenetisch analysiert. Dabei handelte es sich um Patientinnen mit mehr als 10 metastatisch befallenen axillären Lymphknoten, die im Rahmen der Studie eine adjuvante Hochdosis-Chemotherapie erhielten. Solche Patientinnen haben mit konventionell dosierter adjuvanter Chemotherapie ein hohes Rezidivrisiko. Aberrationen konnten in 40 Fällen identifiziert werden, durchschnittlich zeigte jeder Tumor 6.4 Veränderungen. Eine Vielzahl chromosomaler Regionen war betroffen. Die häufigsten Veränderungen beinhalteten Zugewinne genetischen Materials auf den Chromosomen 17q (55%), 1q (50%), 8q (40%), 20q (32.5%), und 6p (22.5%), sowie Verluste auf den Chromosomen 13q (60%), 11q (45%), 5q (27.5%), 6q und 9p (je 25%) sowie 18q (22.5%). DNA Amplifikationen wurden in 17 Fällen (42.5%) gefunden, wobei einige Tumoren mehrere Amplifikationen aufwiesen. Diese kartierten am häufigsten in folgenden chromosomalen Regionen: 11q13 (6 Fälle), 17q23q25 (5 Fälle), 17q12q21 (3 Fälle), 20q13 (3 Fälle), 8q22q24 (3 Fälle). Für alle Patientinnen lagen klinische Daten vor. Dabei hatten Patientinnen mit einem Verlust von 16q oder des terminalen Endes des Chromosoms 11q ein geringeres Risiko für einen Rückfall nach Hochdosistherapie, wohingegen Patientinnen mit Zugewinn auf den Chromosomen 17q oder 20q, sowie Verlust von 9p ein erhöhtes Risiko für einen Rückfall aufwiesen. Diese Daten verdeutlichen, daß (i) chromosomale Veränderungen häufig in Tumoren von Hochrisikopatientinnen mit mehr als 10 axillären Lymphknotenmetastasen vorkommen, und daß (ii) chromosomale Aberrationen eine prognostische Bedeutung in diesem Kollektiv besitzen könnten.

Mammakarzinom, Hochdosis-Chemotherapie, comparative genomische Hybridisierung (CGH), klinische Korrelation

Korrelation von Grading, Histologie und Stadium mit mittels der CGH detektierten Veränderungen bei Ovarialkarzinomen

Arnold Norbert, Schwarz-Boeger U., Jacobsen A., Pfisterer J., Kiechle M.

Klinikum der CAU, Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe, Michaelisstr. 16, 24105 Kiel

In 81 von 84 untersuchten Ovarialkarzinomen wurden mittels der CGH chromosomale Veränderungen detektiert. Die am häufigsten vorkommenden Überrepräsentationen beinhalteten die Chromosomenarme 1q, 8q, 20q, 3q und 19p in einem Range von 69 bis 55% und Unterrepräsentationen der Chromosomenarme 13q, 4q und 18q in 54 bis 50% aller untersuchten Fälle. Der Vergleich dieser Veränderungen mit klinischen Parametern (Histologie, Grading und FIGO-Stadium) ergab statistisch signifikante Korrelationen. Im Vergleich zu Grad 3 Tumoren zeigten gut differenzierte Tumore signifikant weniger Veränderungen (p-Wert 0.007). Veränderungen an den Chromosomenarmen 11p-, 13q-, 4q-, 11q+, 8p-, 20q+ und 1q+ traten gehäufter in Grad 3 Tumoren auf. Eine starke Assoziation mit undifferenzierten histologischen Subtypen konnte mit Deletionen der Chromsomenarme 18q und 13q gefunden werden. Amplifikationen der Bereiche 8q, 11q, 13q, 14q, 20q und Deletionen der Bereiche 4q, 12p, 12q und 18q zeigten sich gehäuft in FIGO-Stadium IV Tumoren.
Diese, wie auch von uns und anderen Gruppen bereits publizierte Daten, zeigen, daß Ovarialkarzinome wiederkehrende spezifische Alterationen aufweisen, die als Startpunkte für genauere molekulargenetische Analysen dienen. Die Korrelation bestimmter Alterationen mit späten Stadien und undifferenzierten Karzinomen liefert erste Hinweise, daß sich in diesen Regionen Gene befinden können, deren Amplifikation und/oder Ausfall zu anaplastischen und aggressiveren Tumorphänotypen führen.

Ovarialkarzinome, CGH,

Verschiedene CGH-Befunde bei Glioblastomen

Lassmann, Jenny; Wernicke, C.; Krüger, M.; Thiel, G.

Institut für Medizinische Genetik der Charitè, Campus Mitte, Humboldt-Universität Berlin, Deutschland

Wir berichten über 26 Glioblastome von 25 Patienten, die mittels Comparativer Genomischer Hybridisierung (CGH) untersucht wurden. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation lag zwischen acht und 74 Jahren. In 15 Fällen handelt es sich um Rezidivtumoren, die sich aus niedergradigen Astrozytomen entwickelt haben, in elf Fällen um Primärtumoren. Ziel war es festzustellen, ob sich in Abhängigkeit vom Erkrankungsalter der Patienten verschiedene genetische Veränderungen nachweisen lassen. Zusätzlich lagen auf Grund früherer Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe von 23 Tumoren der untersuchten Serie zytogenetische Befunde vor, die mit den CGH-Ergebnissen verglichen wurden. An Hand der festgestellten genetischen Veränderungen ließen sich die Tumoren in Korrelation zum Alter der Patienten in zwei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe umfaßt 17 Tumoren von Patienten im Alter zwischen acht und 41 Jahren. Die zweite Gruppe besteht aus neun Tumoren von Patienten im Alter von 45 bis 74 Jahren. In der ersten Gruppe wurden bei 14 Tumoren, in der zweiten Gruppe bei acht Tumoren mittels CGH Veränderungen nachgewiesen. Zugewinne des langen Arms von Chromosom 8 wurden ausschließlich in der ersten Gruppe bei neun der 14 Tumoren beobachtet. Partielle oder komplette Zugewinne des Chromosoms 7 wurden bei sechs der acht Tumoren der zweiten Gruppe und nur einem Fall der ersten Gruppe festgestellt. Diese beiden Befunde traten in keinem Fall gemeinsam auf. Weitere Veränderungen, die ausschließlich in der jüngeren Patientengruppe auftraten, waren bei jeweils vier Tumoren Zugewinne am Chromosom 17 sowie Verluste am Chromosom 5. Andererseits wurden Zugewinne am Chromosom 19 bei fünf Tumoren der älteren Patientengruppe und nur einmal in der jüngeren Gruppe gefunden. Verluste des Chromosoms 10 gehören in beiden Gruppen zu den häufigsten Veränderungen. Dabei fällt auf, daß bei den Tumoren der älteren Patientengruppe jeweils das gesamte Chromosom verlorengegangen ist, während die Verluste bei der jüngeren Patientengruppe häufig auf den distalen Abschnitt des q-Arms beschränkt sind. Amplifikationen betrafen die Chromosomenbereiche bei 2p24, 3p12, 4q12-22, 7p12, 8q23-24 und 12q13-14. Die zytogenetischen Befunde der ersten Gruppe zeichnen sich durch strukturelle Instabilität im Sinne multipler nichtklonaler Veränderungen aus, während bei den Tumoren der zweiten Gruppe stabile klonale Aberrationen nachweisbar sind.

Glioblastome, CGH, Zytogenetik, Alter der Patienten, 7p12, 8q23-24

Zytogenetische Veränderungen in Aneurysmatischen Knochenzysten

Mathias Werner, J. Nebig, G. Delling
Abteilung für Osteopathologie, Institut für Pathologie der Universität Hamburg, BRD

Ziel: Aneurysmatische Knochenzysten (AKZ) sind Läsionen, die bevorzugt in den langen Röhrenknochen, aber auch in der Wirbelsäule und im Becken auftreten. Sie zeichnen sich durch einen lokal aggressiven Charakter mit rascher Destruktion der Spongiosa und der Kortikalis des betroffenen Knoches aus. Feingeweblich sind AKZ aus schmalen Gewebssepten aufgebaut, die unterschiedlich große blutgefüllte Hohlräume umschließen und aus spindeligen mononukleären Zellen sowie mehrkernigen Riesenzellen vom Osteoklastentyp bestehen. In einer besonderen Variante dieser Läsion treten die zystischen Veränderungen in den Hintergrund und es überwiegen solide Gewebsanteile (sogenannte solide bzw. teilsolide AKZ). Die besondere Problematik ergibt sich aus der differentialdiagnostischen Abgrenzung zu riesenzellhaltigen Knochentumoren, insbesondere zum teleangiekatischen Osteosarkom und zum Riesenzelltumor. Die Pathogenese der AKZ ist unklar, sie wird bisher als reaktive Veränderung aufgefaßt, die nach einer Gefäßdestruktion mit Blutaustritten in den Markraum entstehen kann. Durch tumorzytogenetische Untersuchungen von Biopsiematerial sollte überprüft werden, ob numerische oder strukturelle Anomalien als Hinweis auf einen klonalen Charakter bei dieser tumorähnlichen Läsion auftreten.

Methode: Es wurden Kurzzeit-Kulturen von 3 AKZ des klassisch zystischen Typs und 6 teilsoliden/soliden AKZ auf Coverslips angelegt. Die Karyotypisierung aus der P_0-Passage erfolgte nach Trypsinierung und Giemsabänderung. Außerdem wurden FISH-Präparate unter Verwendung von chromosomenspezifischen Paintingsonden angefertigt.

Ergebnisse: In 3 Fällen konnten strukturelle chromosomale Aberrationen nachgewiesen werden. Bei einer AKZ (zystische Variante) in der proximalen Fibula fand sich in 50% der untersuchten Zellen eine balancierte Translokation zwischen den q-Armen der Chromosomen 1 und 17. Eine balancierte Translokation, jedoch zwischen den q-Armen der Chromosomen 3 und 10 wurde bei einer ebenfalls in der proximalen Fibula gelegenen soliden AKZ nachgewiesen. Bei einer weiteren teilsoliden AKZ in einem Mittelhandknochen fand sich eine Addition von chromosomalem Material, dessen Herkunft zunächst nicht geklärt werden konnte, am p-Arm des akrozentrischen Chromosoms 13 in der Hälfte der untersuchten Zellen. In diesen 3 Fällen mit strukturellen chromosomalen Aberrationen handelte es sich jeweils um die einzige klonale, zytogenetisch nachweisbare Veränderung. Numerische chromosomale Aberrationen wurden nicht gefunden. In 2 Fällen fanden sich hingegen Telomerassoziationen unter Beteiligung unterschiedlicher Chromosomen als nichtklonale Veränderungen.

Schlußfolgerung: Bei aneurysmatischen Knochenzysten treten strukturelle chromosomale Aberrationen auf. Die Veränderungen sind heterogen. Ihr Auftreten spricht gegen eine einfache reaktive Genese dieser lokal aggressiven tumorähnlichen Knochenläsion.

Stichworte: Knochentumoren, tumorähnliche Knochenläsionen, aneurysmatische Knochenzyste, chromosomale Aberrationen

Etablierung und Charakterisierung einer menschlichen Chordom- Zellinie U-CH1

Scheil, Stefanie; Brüderlein, S; Möller, P.

Institut für Pathologie der Universität Ulm, Albert-Einstein-Allee 11, 89081 *Ulm*, BRD

Chordome sind sehr seltene Tumoren, die aus Zellen der Chorda dorsalis entstehen. Die Patienten sind durchschnittlich 60 Jahre alt. Die Tumoren entstehen an beiden Enden der Wirbelsäule (intracraniell oder sacral), wachsen sehr langsam, rezidivieren häufig und metastasieren selten und spät. Die mittlere Überlebensrate 6,1 Jahre. Über den genetischen Hintergrund ist praktisch nichts bekannt.
Die Zellinie U-CH1 wurde aus einem Chordom-Rezidiv etabliert und histologisch, immunologisch, zytogenetisch und mit CGH untersucht: Die Zellinie besteht aus riesigen undifferenzierten Zellen, die entweder in Suspension oder auf Collagen-Beschichtung wachsen und intrazellulär in großen Mengen Collagen I akkumulieren. Immunologisch exprimieren die Tumorzellen: Vimentin, Zytokeratine 18 und 20, epitheliales Membran-Antigen (EMA), Collagen I, alpha-B-Crystallin, EGF-Rezeptor, RB1, bcl-1, CD95-Rezeptor, CD95-Ligand. Die Karyotypisierung ergab einen nahezu diploiden Karyotyp mit bis zu 6 relativ kleinen Markerchromosomen. Die CGH-Untersuchung sowohl der Linie als auch des Originaltumors zeigten übereinstimmende Muster von Gewinn und Verlust von genetischem Material: Verlust von 1p, 3 ,10, 11, 14 und 18, Gewinn von 7 und 17. Das Ergebnis wurde mit CGH-Daten aus anderen Chordomen verglichen: Die übereinstimmende Region aller bis jetzt analysierten Tumoren einschließlich der Linie war eine Überrepresentation von 7q.

Stichwörter: Chordome, U-CH1, Zytogenetik, CGH

CGH Studie chromosomaler Imbalanzen bei atypischen Carcinoiden der Lunge

Ullmann Reinhard, Petzmann S. und Popper H.

Inst. für Pathologie, Graz, Österreich

Carcinoide der Lunge können in eine typische und eine atypische Form unterteilt werden. Die genauen Grenzen sind derzeit Gegenstand kontroversieller Diskussionen. Einerseits gibt es Tendenzen, einen Teil der atypischen den typischen Carcinoiden zuzuordnen, andererseits gibt es Stimmen für eine Subgruppierung der atypischen Carcinoide. Bezugnehmend auf die derzeit mehrheitlich akzeptierte Nomenklatur beträgt die 10-Jahresüberlebensrate für typische Carcinoide 100%. Bei den atypischen Carcinoiden reduziert sie sich bei postoperativ unbehandelten Patienten auf 74%. Bis jetzt gibt es noch keine eindeutigen Parameter zur Erkennung jenes 26%igen Anteils an Patienten mit erhöhtem Risiko. Ziel dieser Arbeit ist die Klärung der Fragen, ob die Detektion spezifischer chromosomaler Aberrationen oder Aberrationsmuster einen Beitrag zur eindeutigen Klassifizierung dieser Tumoren leisten kann und ob im Rahmen einer solchen Untersuchung eine genauere Definition der Risikoparameter für atypische Carcinoide auf chromosomalem Niveau möglich ist. Methodisch basiert diese Studie auf der Comparativen Genomischen Hybridisierung. Zwecks Reduktion der Normalzellkontamination wurden die Tumorzellen mikrodissektiert. Bis jetzt wurden 16 atypische Carcinoide untersucht. Die häufigsten wiederkehrenden Aberrationen betrafen das Chromosom 11.

Stichworte: neuroendocrine Bronchuscarcinoide, CGH, Mikrodissektion

Comparative genomic hybridization analysis of sporadic neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system

Toennies Holger[1], Toliat M. [2], Ramel C. [1], Pape U.F.[3], Neitzel H. [1], Berger W. [2], Wiedenmann B. [3]

[1] Institut für Humangenetik, Charité, Campus Virchow-Klinikum, Berlin

[2] Max-Planck Institut für molekulare Genetik, Berlin

[3] Abteilung Hepatologie und Gastroenterologie, Charité, Campus Virchow-Klinikum, Berlin

Somatic genetic changes leading to the development of sporadic neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors are poorly characterized. We studied copy number changes in 25 sporadic neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system (11 foregut and 14 midgut tumors) and 6 adenocarcinomas by comparative genomic hybridization (CGH) allowing simultaneous evaluation of the entire tumor genome. Nearly all (97%) tumors investigated showed chromosomal imbalances, most of them gains of chromosomal material. Different specific chromosomal aneuploidies were detected in fore- and midgut tumors in comparison to adenocarcinomas. Consisting findings for foregut tumors were gains of chromosomes 20q (64%), 19 (55%) and 17p (45%) and losses of parts of chromosomes 1p (45%), 2q, and 6q in 27% of the cases investigated. In contrast midgut tumors showed a different chromosomal gain and loss pattern. Gains were detected for chromosome 17q and 19p (57%) followed by 19q and 4q (50%). Losses were most frequent from chromosome 18 (43%) and 9p (21%).

Our comparative genomic hybridization analyses on these differentiated sporadic neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors identified new possible candidate sites of chromosomal loss for both groups. These chromosomal regions detected as imbalances by comparative genomic hybridization may highlight locations of novel genes with an important role in the development and progression of fore- and midgut tumors of the gastroenteropancreatic system.

Sporadic neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors, comparative genomic hybridization, foregut tumors, midgut tumors, adenocarcinomas

Gundula Thiel

Von: Peter F. Ambros[SMTP:ambros@ccri.univie.ac.at]
Gesendet: Dienstag, 18. Mai 1999 13:53
An: gundula.thiel@charite.de
Betreff: 12. Arbeitstagung

SEQUENTIAL MONITORING OF TUMOR-SPECIFIC IMMUNOLOGICAL AND GENETIC MARKERS FOR DETECTING MINIMAL RESIDUAL DISEASE

P.F. Ambros, G. Mehes, C. Hattinger, T. Loerch*, A. Luegmayr, H. Gadner
CCRI, St. Anna Kinderspital, Kinderspitalg. 6, A-1090 Vienna, Austria. * MetaSystems, Altlussheim, FRG; e-mail: ambros@ccri.univie.ac.at

The MRD diagnosis in the bone marrow (BM), peripheral blood (PB) and apheresis products (AP) is becoming increasingly important. Limitations by the current technique are: lack of appropriate specificity and lack of accurate quantification. Immunocytochemical approaches are sensitive, positive cells are easy to detect, but false positive reactions are frequently unavoidable. Fluorescence based in situ hybridization (FISH) on the other hand, is highly effective in detecting alterations in the tumor cell genome, but rare tumor cells in the BM, PB or AP can be overlooked. To overcome these problems and to enable an exact quantification, we have fully automated the screening and relocation procedure and combined an immunological and genetic approach. The system detects and exactly relocates immunolabelled cells for sequential FISH analyses, identifying tumor specific genetic aberrations e.g. GD2/MYCN amplification or del1p in neuroblastomas, CD99/t(11;22) in Ewing tumors, CK/gain1q or 8q in breast carcinomas, and CD34 or CD10/numerical chromosome aberrations in ALL. In addition, a cell counter function allows an exact quantitative analysis of all cells contained in PB or BM samples (cytospins, BM smears). The technique was standardized by mixing a known number of tumor cells with normal PB. Virtually all cells intermixed into the PB samples were discovered, thus resulting in a detection limit which is only restricted by the number of cells available for analysis. Quantitative analysis of tumor cells was carried out in over 200 clinical samples. Automatic search, quantification and genetic analysis of low tumor cell infiltrates in routine bone marrow preparations can be carried out efficiently and reliably with this computer assisted microscopic system.

Discrepancies between cytogenetic and CGH-studies in renal cell carcinoma

Stumm Markus[1], Koch A[1], Weilepp G[1], Buhtz P[2], Phillip C[3], Steinbach F[3], Allhoff EP[3], and Wieacker PF[1]

Institut für Humangenetik[1], Institut für Pathologie[2] and Urologische Klinik[3], Universitätsklinikum, Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg

The cytogenetic features of renal cancers have been defined over the past 10 years Characteristic chromosomal aberrations have been identified in different histological types of renal cancer and some of these aberrations have now diagnostic and prognostic relevance. Nevertheless, most of these data were obtained through analysis of cultured tissues and only few data are available from uncultured tumour tissue. This is a critical point of view because carcinomas often harbour cytogenetically unrelated clones. Carcinoma cytogenetics is therefore extremely susceptible to selection differences, making the result strongly dependent on which sample is processed, how it is disaggregated, how and for how long the cells are cultured, on how the analysis is performed and the results presented. In contrast, comparative genomic hybridisation (CGH) offers the possibility to investigate the gain and loss of chromosomal material in native tumour tissue, without the risk for in vitro selection of several clones.

In our investigations we have already analysed 45 renal cell carcinomas, by conventional cytogenetic analysis of cultured renal tumour cells. 34 tumours (54%) showed aberrant karyotypes. The most specific chromosomal aberrations were loss of chromosome 3, loss of chromosome 6 and loss of chromosome 14 material in clear cell carcinoma and gain of chromosome 7, 16 and 17 in papillary carcinomas. At the moment we are performing CGH-analysis on these tumours and first results demonstrate that "the real karyotype" of renal cell carcinoma is more complex. Additionally to the chromosomal aberrations detected by classical cytogenetics, CGH identifies a broader spectrum of aberrant chromosomes in renal cell carcinoma, indicating a selection against specific clones in cell culture. The complete karyotype of renal cell carcinoma seems to be more complex than results from the analysis of a few cultured cells may show.

Key words: Renal cell carcinoma, cytogenetics, CGH