AML1-AMPLIFIKATION BEI KINDERN MIT AKUTER LYMPHOBLASTISCHER LEUKÄMIE

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Carsten Michael Reichelt

aus Königstein im Taunus

Gießen 2006

Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin,

Onkogenetisches Labor

Leiter:

Prof. Dr. J. Harbott

des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH,

Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. J. Harbott

Gutachter: Prof. Dr. R. Friedrich

Tag der Disputation: 27.03.2007

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	**Einleitung**	**1**
1.1	Definition der Leukämie	1
1.1.1	Krankheitssymptome und Verlauf	1
1.1.2	Pathogenese	2
1.2	Leukämien im Kindesalter	3
1.2.1	Einteilung der Leukämien	3
1.2.2	Inzidenz	5
1.2.3	Therapie	7
1.3	Chromosomale Aberrationen im Kindesalter	8
1.4	Nachweis chromosomaler Aberrationen	9
1.4.1	Klassische Zytogenetik	9
1.4.2	Molekulare Zytogenetik	10
1.4.3	Molekulargenetik	12
1.5	Das *AML1*-Gen	12
1.6	Zielsetzung	13
2	**Patienten und Methoden**	**15**
2.1	Patientenkollektiv	15
2.2	Methoden	15
2.2.1	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	15
2.2.1.1	FISH-Protokoll	15
2.2.1.1.1	Behandlung von Ausstrichpräparaten (Patient 15)	17
2.2.1.2	Sonde	18
2.2.1.3	Mikroskopische Auswertung	21
2.3	Cut off-Punkt	21
2.4	Zytogenetische Auswertung	24
2.5	Dokumentation der Ergebnisse	24
2.6	Patientenbezogene Daten	24
2.7	Chemikalien/ Materialien	25
2.8	Lösungen	25

3	**Ergebnisse**	**27**
3.1	Patientenliste	27
3.2	Einteilung	27
3.2.1	Gruppe 1	28
3.2.2	Gruppe 2	39
3.2.3	Gruppe 3	31
3.2.4	Gruppe 4	34
3.2.5	Gruppe 5	36
3.2.6	Gruppe 6	38
3.2.7	*AML1*-Amplifikation	39
3.2.7.1	Gruppe 7	39
3.2.7.2	Patienten mit Karyotyp –21, +mar	42
3.3	Überblick über Gewinne und Verluste von *TEL* und *AML1*	46
3.4	Klinische Parameter	47
3.5	Zytogenetische Befunde	50
4	**Diskussion**	**55**
4.1	Probleme der Technik und Interpretation	57
4.2	Interpretation der FISH-Ergebnisse	58
4.3	Interpretation der zytogenetischen Befunde	60
4.4	Klinische Parameter	63
4.5	Zusammenfassung	68
4.6	Summary	69
5	**Anhang**	**70**
5.1	Abkürzungen und Definitionen	70
5.2	Patienten	74
5.3	Berechnungen	77
5.4	Literaturliste	80
5.5	Erklärung	91
5.6	Danksagung	92
5.7	Lebenslauf	93

1 Einleitung

1.1 Definition der Leukämie

Bereits im 19. Jahrhundert wurde der Name Leukämie, der weißes Blut bedeutet, von Rudolph Virchow zur Beschreibung dieser Erkrankung der Hämatopoese eingeführt (Henze et al., 2001). Diesem Kreis von Erkrankungen liegt eine klonale Proliferation eines abnormen Zellklons zugrunde, der zu einer Verdrängung der normalen hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark und zu einer sekundären Infiltration von extralymphatischen Organen führt (Hoffbrand et al., 2002a).

1.1.1 Krankheitssymptome und Verlauf

Die Krankheit äußert sich im Anfangsstadium häufig beginnend mit uncharakteristischen Symptomen wie Fieber, Nachtschweiß, Knochenschmerzen und eingeschränkter Belastbarkeit. Bei Kindern fallen insbesondere Interesselosigkeit und Spielunlust auf. Daneben treten im weiteren Krankheitsverlauf Symptome auf, die eine zunehmende Insuffizienz des Knochenmarks widerspiegeln. Dazu zählen allgemeine Anämiesymptome wie Blässe, Belastungsdyspnoe, Palpitationen, Angina pectoris und Zeichen einer Granulozytopenie, die sich in einer erhöhten Infektanfälligkeit insbesondere im Bereich von Haut und Lunge äußern und oft durch untypische Erreger wie Pilze der Spezies Candida verursacht werden. Weiterhin treten typische Zeichen einer Thrombozytopenie auf, die sich durch eine erhöhte Blutungsneigung mit Hämatomen, petechialen Einblutungen der Haut und häufigem Nasen- und Zahnfleischbluten manifestieren. Dazu kommen noch extramedulläre Manifestationen wie Hepatosplenomegalie und Lymphknotenvergrößerungen, Infiltration von Zahnfleisch, Haut, Hoden, sekretorischen Drüsen vor allem im Kopf- und Halsbereich und als Meningeosis leucaemica ein Befall im Bereich der Hirnhäute durch Infiltration mit malignen Zellen. Dies kann wiederum zu sekundären Symptomen wie Pruritus, ausgedehnten Ekzemen, Hirnnervenausfällen und einem Rückgang der Speichel- und Tränensekretion führen.
Der Verlauf der Krankheit kann entweder akut sein, was eine schnelle Progredienz der Symptome bedeutet oder sich eher schleichend als sogenannter chronischer Verlauf über einen Zeitraum von mehreren Jahren erstrecken. Die häufigsten Todesursachen

im Rahmen dieser Erkrankung sind schwere Infektionen, zerebrale Blutungen und das akute Nierenversagen (Henze et al., 2001; Schrappe et al., 2005).

1.1.2 Pathogenese

Es wird angenommen, dass sich Leukämien aufgrund eines gestörten Gleichgewichts von in der Zelle wirksamen Onkogenen und Tumor-Supressorgenen entwickeln. Einem solchen Ungleichgewicht liegt entweder eine spontane somatische Mutation oder eine Keimbahnmutation zugrunde. Auf chromosomaler Ebene wurden in den letzten Jahren verschiedene Mechanismen der zur malignen Entartung führenden Mutationen beschrieben. Dazu zählen Zugewinne und Verluste von Chromosomen (zum Beispiel Hyperdiploidie, Hypodiploidie), Genamplifikationen, Genverluste, Überexpression von Genen, chromosomale Rearrangements und Genaktivierung/- deaktivierung durch Punktmutationen (Sallan et al., 1997; Hoffbrand et al., 2002b; Barber et al., 2004). Dafür, dass diese Veränderungen bereits in utero zu einem frühen Zeitpunkt auftreten können, sprechen Untersuchungen an konkordanten Zwillingen, die gleiche DNA-Sequenzen für Fusionsgene zeigten, obwohl der Krankheitsausbruch erst zu einem späteren und unterschiedlichen Zeitpunkt stattfand (Ford et al., 1998). Auch scheinen noch weitere Faktoren nötig zu sein, um bei einer prädisponierenden genetischen Ausgangslage zu einer Manifestation der Erkrankung zu führen, was aus Untersuchungen von Blutproben Neugeborener zu folgern ist, in denen ca. 100mal häufiger Fusionsgene nachzuweisen sind, als aufgrund der tatsächlichen Erkrankungszahl zu vermuten wäre (Mori et al., 2002). Solche Faktoren können zum einen als exogene Ereignisse postnatal oder intrauterin auf das Kind einwirken, zum anderen entweder direkt oder indirekt über Einwirkung auf die Eltern zu einer Schädigung des Kindes führen. Zu diesen schädigenden Faktoren, die im einzelnen noch nicht identifiziert wurden, müssen Chemikalien wie Benzol, Medikamente wie Chlorambucil, Mustin und andere Chemotherapeutika, sowie Strahlung, virale Infektionen, Nikotinabusus und Ernährungsgewohnheiten gerechnet werden (Hoffbrand et al., 2002b). Weitere genetisch bedingte prädisponierende Risikofaktoren sind erworbene oder angeborene Erkrankungen des Immunsystems wie Ataxia teleangiectatica, Agammaglobulinämie und schwere Immundefekte, sowie chromosomale Störungen

wie das häufige Down-Syndrom (1:600) (Henze et al., 2001) und eine familiäre Belastung (Perrillat et al., 2001).
Letztendlich entwickelt sich im Verlauf ein maligner Zellklon, der sich durch ein beschleunigtes Zellwachstum, zunehmend mangelnde Differenzierung mit Funktionsverlust und verändertem Apoptoseverhalten charakterisieren lässt (Sallan et al., 1997).

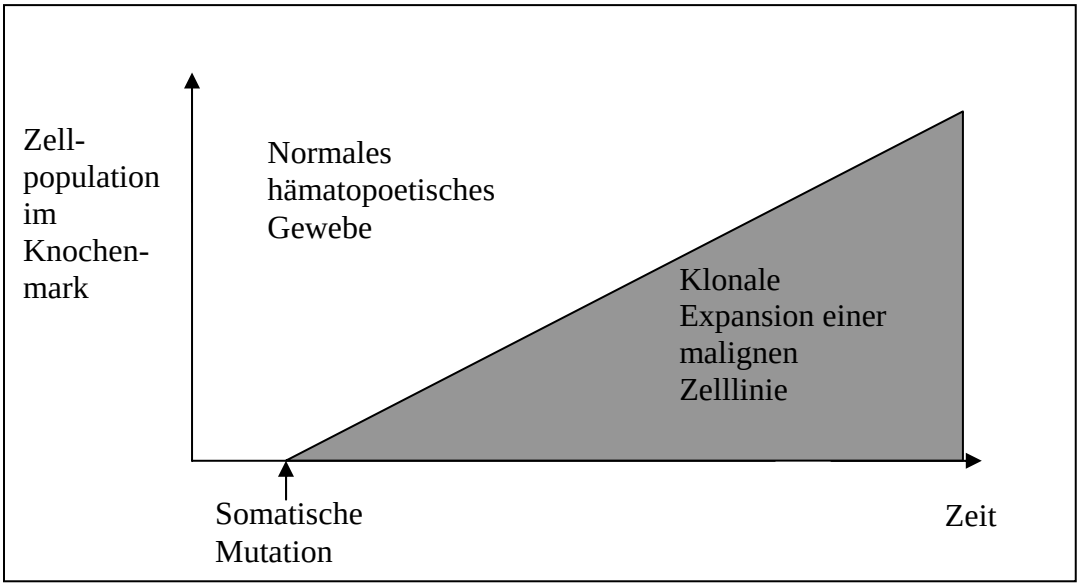


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Expansion eines malignen Klons nach einer somatischen Mutation (Hoffbrand et al., 2002b).

1.2 Leukämien im Kindesalter

Da sich die Leukämien bei Kindern hinsichtlich mehrerer Parameter deutlich von denen der Erwachsenen unterscheiden, findet eine Trennung dieser beiden Gruppen statt. Dies spiegelt sich unter anderem in der unterschiedlichen Prognose, anderen Häufigkeiten sowie unterschiedlichen Behandlungsstrategien wider.

1.2.1 Einteilung der Leukämien

Aufgrund des Verlaufs werden akute und chronische Formen unterschieden. Erstere zeigen einen raschen Krankheitsverlauf, der ohne Behandlung innerhalb von Monaten letal endet, durch eine Therapie jedoch potentiell heilbar ist. Chronische Erkrankungen dagegen verlaufen auch ohne Therapie über Jahre, kommen jedoch seltener zu einer definitiven Heilung (Henze et al., 2001).

Weiterhin kann man aufgrund der Zytomorphologie die Herkunft der malignen Zellen aus Vorläuferzellen der lymphatischen oder der myeloischen Reihe erkennen und so eine Unterscheidung in lymphoblastische und myeloische Leukämien vornehmen.

Bei der FAB-Klassifikation (French-American-British) wird lichtmikroskopisch die Morphologie und das zytochemische Verhalten auf PAS, saure Phosphatase und bei der Esterase Peroxidase Reaktion beurteilt. Bei der ALL wird eine Einteilung in drei Subklassen L1-L3 vorgenommen (Hoffbrand et al., 2002a).

L1 gleichförmige, kleine Blasten mit schmalem Plasmasaum

L2 größere Blasten mit auffälligeren Nukleoli und größerem Plasmasaum

L3 große Blasten, auffällige Nukleoli, stark basophiles Plasma und zytoplasmatische Vakuolen

Bei der AML dagegen unterscheidet man die Gruppen M0 bis M7 (Henze et al., 2001).

FAB-M0 akute Myeloblastenleukämie völlig unreif (AMbl)

FAB-M1 akute Myeloblastenleukämie (Ambl)

FAB-M2 akute Myeloblastenleukämie mit Ausreifung

FAB-M3 akute Promyelozytenleukämie mit starker Granulation (APL)

FAB-M4 akute myelomonozytäre Leukämie (AMML)

FAB-M5a akute Monoblastenleukämie (AMoL)

FAB-M5b akute Monoblastenleukämie mit Differenzierung

FAB-M6 Erythroleukämie (EL)

FAB-M7 Megakaryozytenleukämie

Ein weiteres Kriterium zur Einteilung der akuten Leukämien ist die Immunphänotypisierung. Hierbei werden die von der Zelle exprimierten Zytoplasma- und Oberflächenantigene mit Hilfe monoklonaler Antikörper sichtbar gemacht. Da Lymphoblasten je nach Entwicklungsstadium unterschiedliche Antigenmuster zeigen, lässt sich anhand der Art der nachgewiesenen Antigene und deren Kombination die Subklassifizierung vornehmen (Henze et al., 2001). Die folgende Abbildung 2 zeigt Beispiele für die immunologische Einteilung der Leukämien.

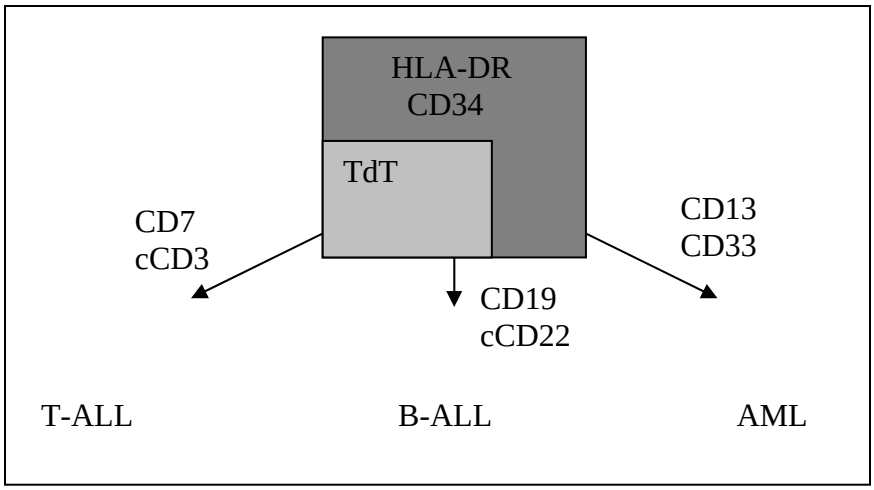


Abbildung 2: Beispiele der Einteilung in T-ALL, B-ALL und AML aufgrund immunologischer Marker (Hoffbrand et al., 2002a).

1.2.2 Inzidenz

Die Daten des 1980 eingerichteten zentralen Kinderkrebsregisters in Mainz geben einen detaillierten Überblick über die Inzidenz maligner Erkrankungen bei unter 15-jährigen (IMSD, 2005). So bilden die Leukämien bei malignen Erkrankungen in dieser Altersklasse die größte Gruppe. Von den jährlich erfassten Neuerkrankungen von ca. 1800 Fällen entfallen ca. 33 % auf die Leukämien, was einer Neuerkrankungszahl von ca. 600 Kindern pro Jahr entspricht. Davon sind ca. 83 % ALL-, ca.15 % AML- und 2 % CML-Patienten, wohingegen die CLL bei Kindern nicht vorkommt. Das Geschlechterverhältnis von Jungen zu Mädchen ist 1,2:1. Der Median des Erkrankungsbeginns ist der 61. Monat .
Die folgenden beiden Abbildungen geben eine Übersicht.

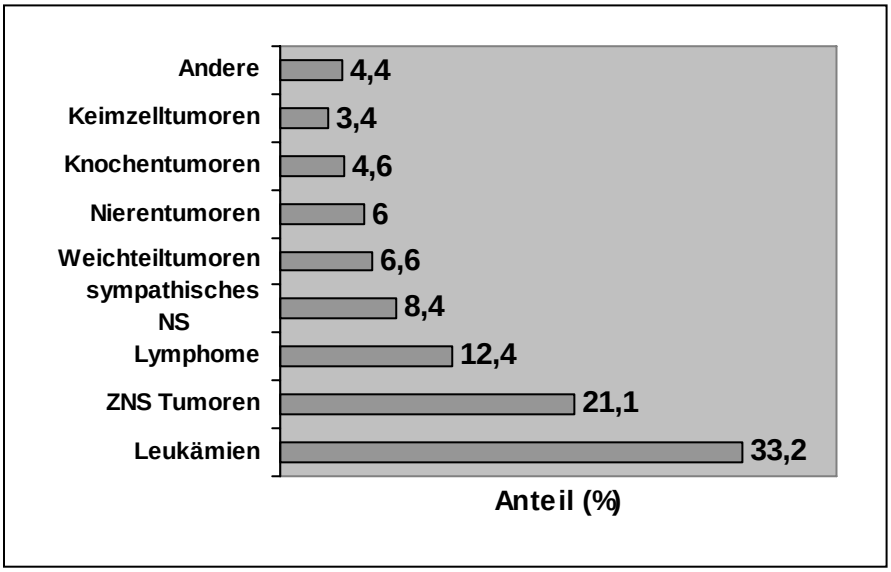


Abbildung 3: Prozentuale Verteilung maligner Erkrankungen bei Kindern. Leukämien bilden die größte Gruppe (IMSD, 2005).

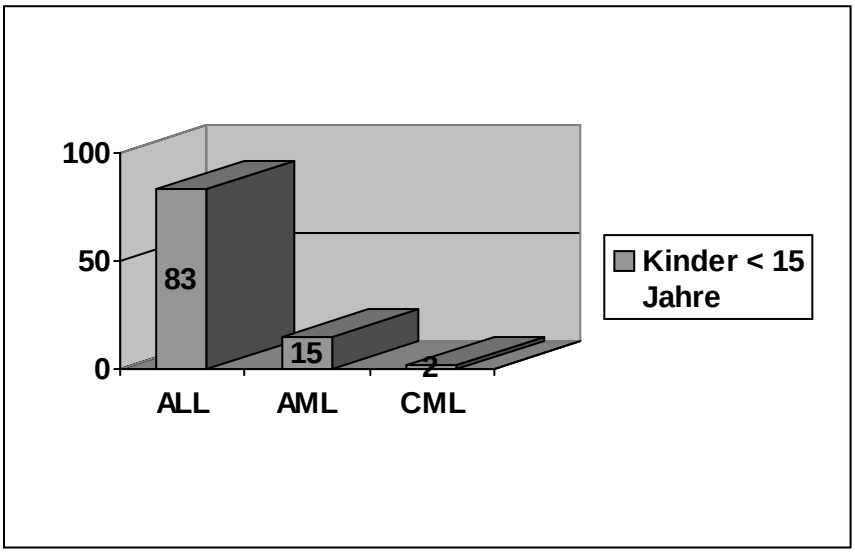


Abbildung 4: Anteil der einzelnen Leukämiearten an den Leukämien. Die ALL ist mit 83 % die weitaus häufigste (IMSD, 2005).

Da die Fragestellung dieser Arbeit auf die ALL begrenzt ist, beziehen sich die im Folgenden gemachten Ausführungen nur noch auf die Veränderungen innerhalb dieser mit 83 % häufigsten Leukämieform im Kindesalter. Die immunologischen Subgruppen sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

Linie		**Klinische Bezeichnung**	**Immunologische Marker**
B-Linie			CD19+, CD79+, CD22+ (mindestens zwei Merkmale), TdT+
	B1	pro-B-ALL (auch frühe prä-B-ALL oder prä-prä-ALL)	CD19+, CD79+, CD22+ (mindestens zwei Merkmale), TdT+
	B2	common ALL (c-ALL)	CD10+
	B3	prä-B-ALL	zytoplasmatisches IgM+
	B4	reife B-ALL	zytoplasmatisch oder an der Oberfläche kappa oder lambda+
T-Linie			CD 3+, meist TdT+, CD34-
	T1	pro-T-ALL	CD7+
	T2	prä-T-ALL	CD2+ und/oder CD5+ und /oder CD8+
	T3	corticale T	CD1a+

	T4	reife T-ALL	Membran CD3+, CD1a-
		T-alpha/beta	anti TCR alpha/ beta+
		T-gamma/delta	anti TCR gamma/ delta+

Tabelle 1: Immunologische Subklassifizierung der Lymphoblastischen Leukämien der B- und T- Zellreihe aufgrund des immunologischen Musters (Bene et al., 1995; Löffler et al., 1999).

1.2.3 Therapie

Kinder mit Leukämien werden in Deutschland zu über 99 % in sogenannten multizentrischen Therapiestudien behandelt (IMSD, 2005). Dies gewährleistet eine einheitliche Therapie basierend auf epidemiologisch gesicherten und kontrollierten Daten. Für die Therapie der ALL bei Kindern in Deutschland gibt es zwei Studien: ALL-BFM und Co-ALL.

Die Therapieschemata variieren je nach Studie, sind aber in ihren Grundzügen gleich. Es werden risikoadaptierte Protokolle eingesetzt, die sich in Induktions-, Konsolidierungs- und Erhaltungsphase gliedern (Henze et al., 2001). Eine Auswahl relevanter Prognoseparameter gibt Tabelle 2 wider.

Faktoren	**Prognose gut**	**Prognose schlecht**
Leukozyten*	Niedrig/ Normal (< $50x10^9$/l)	Hoch (> $50x10^9$/l)
Geschlecht*	Weiblich	Männlich
Zeit bis zur Clearance im Blut****	<1 Woche	>1 Woche
Zeit bis zur Remission*	<4 Wochen	>4 Wochen
ZNS-Befall bei Diagnose*	Keiner	Vorhanden
MRD*	nach 1-3 Monaten negativ	nach 3-6 Monaten noch positiv
Zytogenetik**	> 50 Chromosomen t(12;21)(p13;q22) Hyperdiploidie	t(4;11)(q21;q23) t(9;22)(q34;q11)***

Tabelle 2: Zusammenstellung positiver und negativer prognostischer Faktoren *(Schrappe et al., 2005), **(Harbott, 2001),***(Arico et al., 2000), ****(Gajjar et al., 1995).

Durch die Entwicklung solcher Studienprotokolle ist es im Laufe der Zeit gelungen, die Prognose der an ALL erkrankten Kinder auf > 75 % ereignisfreies Überleben (EFS) zu verbessern (Henze et al., 2001).

1.3 Chromosomale Aberrationen im Kindesalter

Seitdem systematische Untersuchungen zur Subklassifizierung bei Patienten mit ALL durchgeführt werden, wurde deutlich, dass erhebliche Unterschiede bei den ihnen zugrundeliegenden Aberrationen vorliegen (Hoffbrand et al., 2002a). In den letzten Jahren wurden immer mehr spezifische Veränderungen nachgewiesen, die zu klinisch und prognostisch klar voneinander abgrenzbaren Subklassen innerhalb der akuten lymphoblastischen Leukämien führen. So sind meist balancierte Chromosomenveränderungen im Sinne von Translokationen als die ursächlichen Störungen auf chromosomaler Ebene identifiziert worden. Die häufigsten Vertreter dieser Gruppe sind die Translokationen t(1;19), t(4;11), t(8;14), t(9;22), t(11;19) und t(12;21), welche mit ca. 22 % die häufigste Translokation bei Kindern unter 15 Jahren (ohne Säuglinge) ist (Romana et al., 1995; Schrappe et al., 2005). Eine andere oft anzutreffende Form der Veränderung sind numerische Aberrationen des Chromosomensatzes in Form einer Hyperdiploidie mit mehr als 50 Chromosomen. Insgesamt liegt die Häufigkeit dieser Veränderung bei 25 %. Die dabei am häufigsten vorliegenden zusätzlichen Chromosomen sind X, 4, 6, 10, 14, 17 und 18 als Trisomie, sowie 21 als Tri- oder Tetrasomie (Schrappe et al., 2005). Seltener ist dagegen die Hypodiploidie mit Chromosomenzahlen von weniger als 45. Eine Übersicht gibt Abbildung 5.

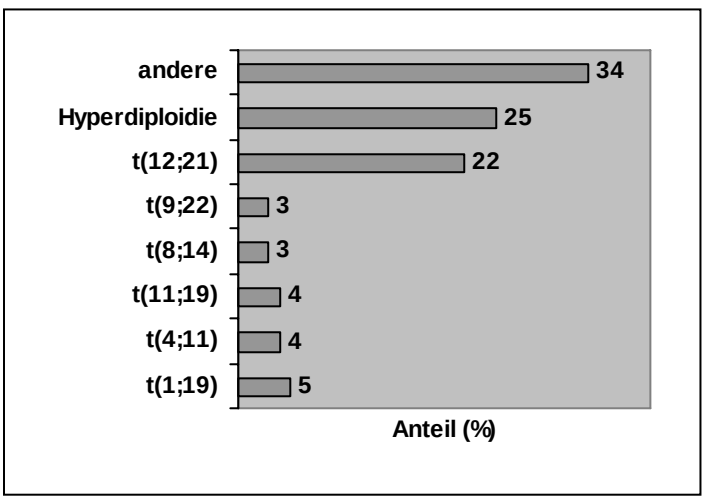


Abbildung 5: Die häufigsten Aberrationen bei Kindern unter 15 Jahren (ohne Säuglinge). Die führende spezifische Entität ist die t(12;21) mit 22 % (Schrappe et al., 2005).

In neuerer Zeit wurde eine zusätzliche Form der Veränderung beschrieben, bei der eine Amplifikation eines einzelnen Gens (*AML1*) vorliegt und die Gegenstand dieser Arbeit ist. Definitionsgemäß handelt es sich bei einer Amplifikation um die Produktion zusätzlicher Kopien von chromosomaler DNA in Form von intrachromosomaler oder extrachromosomaler DNA (Rieger et al., 1991). Als Folge der Amplifikation kann es zu einer vermehrten Genexpression kommen, die je nach betroffenem Gen zu einer Störung der Zellfunktion bis hin zu einer malignen Transformation führen kann. Zytogenetische Äquivalente dieser Genamplifikation können Double Minutes (DM) und Homogeneously Staining Regions (HSR) sein (Gebhart, 1989).

Die Identifizierung dieser spezifischen chromosomalen Aberrationen spielt für die Therapieauswahl eine große Rolle, da die einzelnen Veränderungen mit gänzlich unterschiedlicher Prognose korreliert sind. In Kombination mit den klassischen Prognosefaktoren wie Leukozytenzahl, Zeit bis zum Erreichen der ersten Remission und Dauer bis zur Elimination maligner Zellen unter die Nachweisgrenze gewinnt die Genetik im Rahmen von Therapiestudien zunehmend an Bedeutung für die Risikostratifizierung.

1.4 Nachweis chromosomaler Aberrationen

Mit den in der letzten Zeit verbesserten Nachweismethoden ist es gelungen, die prognostisch relevanten Rearrangements zu detektieren und die Patienten in Risikogruppen zusammenzufassen (Carroll et al., 2003; Harrison et al., 2005). Die dabei eingesetzten Untersuchungen sind z.B. klassische Zytogenetik, FISH und PCR, wobei diese Methoden kombiniert eingesetzt werden, da ein einzelnes Verfahren alleine keine umfassende Diagnostik gewährleistet (Woo et al., 2005).

1.4.1 Klassische Zytogenetik

Die klassische Zytogenetik ist in der Lage, durch Chromosomenanalyse lichtmikroskopisch erkennbare Aberrationen aufzudecken. Dazu werden Bänderungstechniken eingesetzt, die Veränderungen wie Inversionen, Deletionen und Translokationen aufgrund eines veränderten Bandenmusters darstellen können.

Ebenso lassen sich Zugewinne und Verluste von einzelnen oder mehreren kompletten Chromosomen detektieren (Gibbons et al., 1992).
Einen Überblick über die häufigsten Befunde bei ALL gibt die folgende Abbildung.

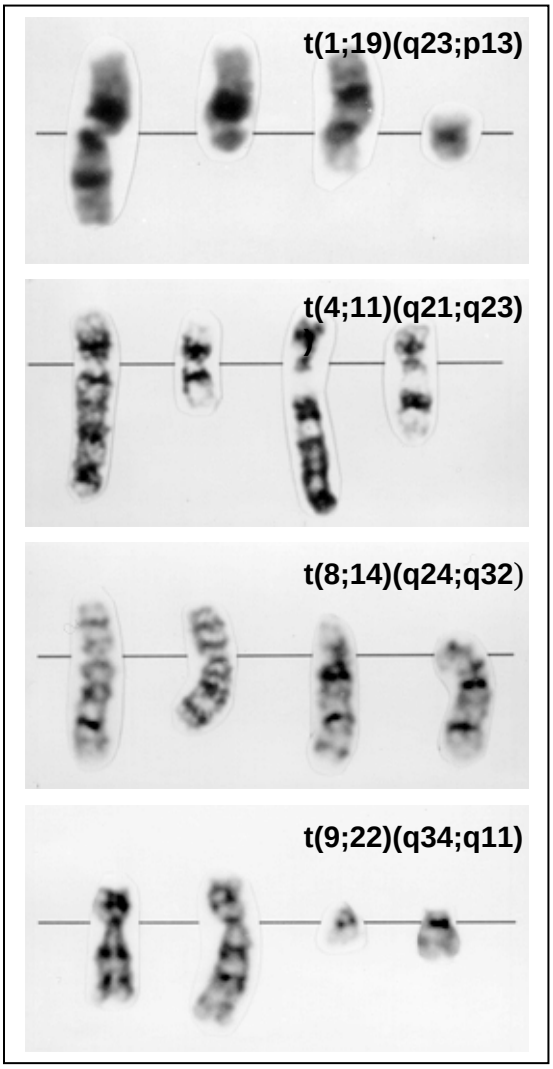


Abbildung 6: Befunde der klassischen Zytogenetik zum Nachweis spezifischer Aberrationen bei ALL.

1.4.2 Molekulare Zytogenetik

Eine Ergänzung zur klassischen Zytogenetik bietet die sogenannte FISH Technik.
Diese Methode beruht auf der Möglichkeit, die menschliche DNA durch Erhitzen oder chemische Behandlung in eine einzelsträngige Form zu überführen und während des Abkühlens mit einer zugesetzten Sonde zu hybridisieren (Gall and Pardue, 1969). Diese Sonde besteht aus komplementärer DNA (oder RNA) und lagert sich an die spezifische Gensequenz des Stranges an. Die Untersuchung ist sowohl in der Meta-, als auch in der Interphase möglich (Cremer et al., 1995). Das ursprüngliche

Verfahren radioaktiv markierte Sonden über eine Gammakamera sichtbar zu machen wurde zunehmend durch die Hybridisierung mit fluoreszierenden Sonden ersetzt (Lichter et al., 1992).



Abbildung 7: Schematische Darstellung der Anlagerung einer FISH-Sonde an den komplementären Abschnitt der Ziel-DNA (Vysis DGIU, 2006).

Je nach Art der Sonde ist sie entweder direkt markiert, das heißt sie ist mit fluoreszierenden Zytochromen gekoppelt, oder sie muss in einem weiteren Arbeitsschritt durch Anlagerung eines fluoreszierenden Markers, mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion, sichtbar gemacht werden (Köhler, 1996a; Köhler, 1996b).

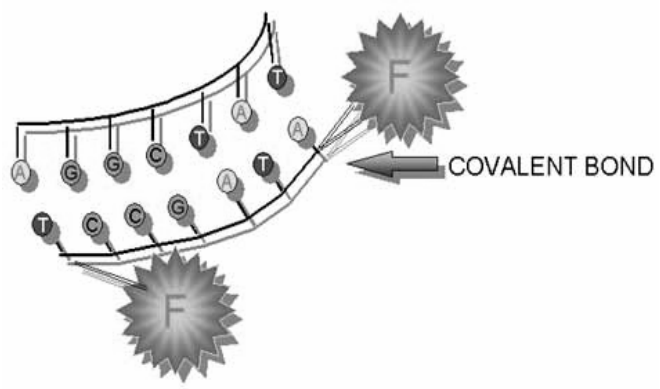


Abbildung 8: Zeigt den vergrößerten Ausschnitt einer einzelsträngigen DNA, an die sich eine direkt markierte Sonde anlagert (F) (Vysis DGIU, 2006).

Danach kann die untersuchte Zellprobe unter einem Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden. Dabei wird das Fluorochrom mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und strahlt seinerseits Licht einer bestimmten Wellenlänge ab, welche für den Farbstoff spezifisch ist.

Diese Methode ist im Laufe der Zeit zu einem wichtigen Verfahren der molekularzytogenetischen Diagnostik geworden (Cremer et al., 1995; Swiger and Tucker, 1996). Mit ihrer Hilfe können Aberrationen, die der klassischen Zytogenetik aufgrund zu geringer Größe oder zu großer Ähnlichkeit der ausgetauschten Sequenzen entgehen würden, detektiert werden. So zum Beispiel die häufige Translokation t(12;21) (*TEL/AML1*) bei ALL (Romana et al., 1994). Ein weiterer Vorteil ist die Tatsache nicht von ausreichender Anzahl und Qualität der Metaphasen abhängig zu sein, da die FISH auch an Interphasekernen anwendbar ist. Sie ist allerdings beschränkt auf bereits bekannte Aberrationen für deren Nachweis jeweils spezifische Sonden vorhanden sein müssen.

1.4.3 Molekulargenetik

Das derzeit standardmäßig angewandte Verfahren molekulargenetischer Diagnostik ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Mit Hilfe dieser Methode können Veränderungen auf molekularer Ebene ab einer Häufigkeit von $1:10^5$ Zellen nachgewiesen werden. Durch den Einsatz von geeigneten Primern und wiederholten Amplifizierungsschritten gelingt es, gesuchte DNA-Sequenzen nach ca. 25 Zyklen auf eine Menge von 10^6 Kopien zu vervielfachen (Löffler, 1998b). Der Nachweis erfolgt auf einem Agarosegel (Löffler, 1998a).
Eine Sonderform dieses Verfahrens ist die sogenannte RT-PCR, bei der als Ausgangsmaterial RNA dient. Diese wird mit Hilfe von Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die Amplifizierungsschritte laufen analog denen der herkömmlichen PCR ab (Löffler, 1998b).

1.5 Das *AML1*-Gen

Das *AML1*-Gen, auch als *CBFA2*, *PEBPaB* oder *RUNX1* bekannt, ist in der Bande 21q22 lokalisiert. Es umfasst ca. 120 kb und das daraus translatierte Protein besteht aus ca. 250 Aminosäuren. Es bildet die Alpha-Untereinheit eines heterodimeren core binding factors und wird in vielen verschiedenen Zellen und Differenzierungsstadien der Hämatopoese exprimiert. Seine Funktion ist die eines Transkriptions-Aktivator-Faktors für spezifische hämatopoetische Gene. Dazu zählen GM-CSF, CSF1R, TCRb und Myeloperoxidase (Huret JL, Senon S, 2003).

In den letzten Jahren sind immer mehr Rearrangements bei malignen hämatologischen Erkrankungen identifiziert worden, in die *AML1* involviert ist. Dazu zählen Rearrangements bei ALL, AML, Myelodysplastischem Syndrom und familiären Thrombozytenveränderungen. Einen Überblick gibt Tabelle 3.

Entität	Zytogenetik	Fusionspartner
ALL	**t(12;21)(p13;q22)**	***TEL***
T-ALL	**t(4;21)(q31;q22)**	**?**
AML	**t(1;21)(p36;q22)**	**?**
	t(2;21)(p11;q22)	**?**
	t(8;21)(q22;q22)	***ETO***
	t(12;21)(q24;q22)	**?**
	t(16;21)(q24;q22)	***MTG16***
	t(17;21)(q11;q22)	**?**
	t(19;21)(q13;q22)	***AMP19***
	t(20;21)(q13;q22)	**?**
MDS	**t(3;21)(q26;q22)**	***EVI1***
	t(5;21)(q13;q22)	**?**
	t(8;21)(q23;q22)	***FOG2***
	t(21;21)(q11;q22)	***UPS25***

Tabelle 3: *AML1* und seine Beteiligung bei malignen hämatologischen Erkrankungen mit dem jeweiligen zytogenetischen Befund (Huret JL, 2000; Huret JL, Senon S, 2003).

1.6 Zielsetzung

Bereits 1981 hat Janet Rowley über die Bedeutung einer fehlerhaften Regulation von Genen auf dem langen Arm von Chromosom 21 hingewiesen. In diesem Zusammenhang ist die häufige Trisomie 21, eine der häufigsten Aberrationen bei Kindern mit ALL zu sehen, die hier entweder allein oder zusammen mit anderen Aberrationen auftritt (Rowley, 1981).

In den letzten Jahren sind einige Berichte erschienen, die eine Amplifikation des *AML1*-Signals im Rahmen eines FISH-Screenings zum Nachweis von *TEL/AML1*-Genfusion beschrieben. Die Ursache für zusätzliche *AML1*-Signale waren entweder ein bis mehrere Chromosomen 21 oder eine Vervielfältigung des Signals auf einem

Chromosom 21. Dabei konnte in einigen Fällen ein verändertes Chromosom 21 nachgewiesen werden, wohingegen in anderen keine aberranten Chromosomen 21 gefunden wurden (Dal Cin et al., 2001; Martinez-Ramirez et al., 2001; Busson-Le Coniat et al., 2001; Mikhail et al., 2002).
Welche klinische Bedeutung diese Veränderung hat, ist noch unklar.
Daher wurde beschlossen, eine retrospektive FISH-Analyse mit asservierten Patientenproben durchzuführen.
Die geplanten Untersuchungen hatten folgende Ziele

- Untersuchung des Amplifikationsmechanismus, Bestimmung der Häufigkeit zusätzlicher Chromosomen 21, Bestimmung der Häufigkeit von Gen-Amplifikation auf einem Chromosom 21, Häufigkeit extrachromosomaler Amplifikation (z.B. Double minutes)

- Charakterisierung von Markerchromosomen

- Vergleich der Ergebnisse mit den klinischen Daten der Patienten zur Untersuchung der klinischen Bedeutung dieser Veränderung

Methoden

- FISH-Screening mit der für das *TEL/AML1*-Rearrangement gebräuchlichen LSI *TEL*/*AML1* ES Dual Color Translocation Probe (Abbott, Wiesbaden) und bei auffälligen Ergebnissen eine zytogenetische Untersuchung.

2 Patienten und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv gliedert sich in zwei Gruppen. Zum einen wurden 201 Patienten aus dem Jahre 2000 retrospektiv untersucht. Einschlusskriterien waren ein Diagnosedatum im Jahr 2000 und ein negatives Ergebnis für die Rearrangements *TEL*/*AML1*, *BCR/ABL* und *MLL/AF4*. Zum anderen fünf Patienten, die aufgrund eines verdächtigen Karyotyps (-21, +marker) aus der Datenbank des Onkogenetischen Labors Gießen herausgesucht wurden (Tabellen 29 und 30 im Anhang). Als Untersuchungsmaterial dienten fixierte Zellen aus den für die zytogenetische Untersuchung routinemäßig angelegten Zellkulturen aus Knochenmarkpunktaten dieser Patienten. Vorrangig wurden 24h-Kulturen bearbeitet, da dies die optimale Kulturzeit zur Beurteilung von Metaphasen bei ALL ist. War kein solches Material mehr vorhanden, wurde entweder auf KM48h oder pB24h zurückgegriffen.
In Ergänzung zu diesen Untersuchungen wurde von Patient 15 aus Gruppe 11 zusätzlich ein Blutausstrich aus der Rezidiveinsendung als Untersuchungsmaterial genutzt. Um ein besseres Ergebnis zu erzielen, wurde dieses Material vorher einem Pepsinverdau unterzogen, um Hintergrundsignale wegen Erythrozytenresten zu minimieren und die Durchlässigkeit für die Sonde zu erhöhen (Abbildung 20c).

2.2 Methoden

2.2.1 Fuoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die in dieser Arbeit angewandte Methode war die auf die grundlegenden Arbeiten von Gall und Pardue zurückgehende Technik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. (siehe auch Kapitel 1)

2.2.1.1 FISH – Protokoll

Das in der vorliegenden Arbeit angewendete Protokoll war das in der Arbeitsgruppe von H. Rieder (Marburg, Institut für Humangenetik) entwickelte Hybridisierungsprotokoll für Vysis Sonden. Es teilt sich in drei Arbeitsschritte.

Schritt 1: Herstellung der Präparate

Material:

Fixierte Zellsuspension (KM24h, KM48h, pB24h)

Fixativ (Methanol : Eisessig 3:1)

Objektträger (fettfrei, gekühlt)

Die bei –20°C in Fixativ aufbewahrten Zellsedimente (Pellets) wurden resuspendiert und fünf Minuten mit 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Danach wurde der klare Überstand mit der Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt. Das Pellet wurde mit frischem, kaltem Fixat resuspendiert und noch einmal zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgenommen und das Pellet mit soviel Fixat resuspendiert, dass eine leicht trübe Lösung entstand. 30-40 µl dieser Lösung wurden aus einer Höhe von 40 cm auf einen kalten und feuchten Objektträger aufgetropft, so dass eine gleichmäßige Verteilung der Zellkerne erreicht werden konnte. Die Beurteilung der Zelldichte und vorhandener Metaphasen fand unter einem Phasenkontrastmikroskop statt. Danach wurden die Präparate mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet, um ein möglichst optimales Anhaften der Kerne bzw. Chromosomen am Objektträger zu gewährleisten.

Schritt 2: Hybridisierung

Material:

600 ml 0,1xSSC

400 ml 2xSSC

100 ml 0,07 M NaOH

Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 100%) jeweils 100 ml

1x feuchte Kammer, Brutschrank, 37°C

Die vorbereiteten Objektträger wurden in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 70%, 50%, 30%) bei Raumtemperatur (RT) rehydriert. Dazu wurden sie jeweils eine Minute in einer Küvette mit dem Ethanol entsprechender Konzentration auf dem Schüttler belassen. Danach wurden sie bei RT für eine Minute in 0,1xSSC gegeben und anschließend für eine halbe Stunde in 2xSSC bei 70°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf ca. 37°C wurden sie für eine Minute in 0,1xSSC bei RT gestellt und dann eine Minute lang in 0,07M NaOH denaturiert. Es folgten zwei einminütige Waschungen

in eiskaltem 0,1xSSC bzw. 2xSSC. Danach erfolgte die Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 100%) für jeweils eine Minute bei RT.

Parallel zu diesen Arbeitsschritten wurde die verwendete Sonde vorbereitet, die zuvor wie unter Punkt 2.2.1.2 beschrieben portioniert worden war. Dazu wurde sie von -20°C auf 76°C in einem Wasserbad erhitzt und durch die Wärmewirkung denaturiert. Dies geschah lichtgeschützt in einer mit Alufolie verpackten Küvette, damit die direkt markierte Sonde nicht verblasste. Dann wurde sie kurz gemischt und zentrifugiert.

Von der so vorbereiteten Sonde wurden pro Objektträger 6 µl aufgetragen, mit einem Deckglas abgedeckt und mit Fixogum luftdicht verschlossen. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer (ca. 37°C).

Schritt 3: Posthybridisierungswaschungen

Material:

200 ml 2xSSC

200 ml 1xSSC

200 ml 2xSSC + Tween/ 0,1 %

200 ml 10x PBS

Vectashield+DAPI, lichtgeschützt/ gekühlt verwahrt

Die Deckgläser wurden entfernt und die hybridisierte Proben auf den Objektträgern lichtgeschützt zehn Minuten in 2xSSC RT, fünf Minuten in 1xSSC 72°C, fünf Minuten in 2xSSC/0,1% Tween RT und zwei Minuten in 1xPBS gewaschen. Diese Waschungen dienten dazu, überschüssige und unspezifisch gebundene Sondenreste zu entfernen, um die Hintergrundsignale zu reduzieren. Es folgte eine Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 100%) für jeweils eine Minute. Danach trockneten die Objektträger mindestens zehn Minuten bei RT und wurden mit Vectashield+DAPI gegengefärbt, eingedeckelt, mit Fixogum verschlossen und bei 4°C lichtgeschützt bis zur Auswertung aufbewahrt.

2.2.1.1.1 Behandlung von Ausstrichpräparaten (Patient 15)

Die methodischen Prinzipien bei der Behandlung von Ausstrichpräparaten entsprechen denen der Knochenmarkkulturen, allerdings ist eine Vorbehandlung mit

Pepsin zur Reduktion von störenden Hintergrundsignalen aufgrund von Zell und Erythrozythenresten nötig.

Schritt 1: Hybridisierung

Material:

Ausstrichpräparat

100 ml Pepsin/HCL- Gemisch (50 µg Pepsin/ ml 0,01M HCL, pH 2,3)

200 ml 1xPBS

100 ml 4 % Formaldehyd

Alkoholreihe (70%, 90%, 100% Ethanol)

Sonde (4 µl pro Ausstrich)

Der Ausstrich wird in einem Pepsin/ HCL-Gemisch (50 µg Pepsin/ ml 0,01M HCL, pH 2,3) 1,5 - 3,5 Minuten inkubiert. Danach folgt eine Waschung in 1xPBS für 3 Minuten bei RT. Daraufhin wird der Ausstrich für 10 Minuten bei 4°C in Formaldehyd inkubiert und im Folgenden erneut mit 1xPBS 2x3 Minuten gewaschen.

Jetzt erfolgt eine Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe (je 2 min. 70%, 90%, 100% Ethanol) und Lufttrocknung für mindestens 10 Minuten. Der so vorbereitete Ausstrich wird bei 78°C für 8 Minuten mit 4 µl Sonde unter einem mit Fixogum versiegelten Deckglas denaturiert und dann über Nacht in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Das weitere Vorgehen entspricht dem unter Schritt 3 (Punkt 2.2.1.1) beschriebenen.

2.2.1.2 Sonde

Es wurde die LSI *TEL*/*AML1* ES Dual Color Translocation Probe (Abbott, Wiesbaden) verwendet. Es handelt sich um eine direkt markierte DNA-Sonde, die routinemäßig zum Nachweis eines *TEL*/*AML1*-Rearrangements benutzt wird. Der Hybridisierungsmix wird nach den Vorgaben des Herstellers hergestellt:

20 µl Sonde
40 µl dest. H_2O
140 µl Hybridisierungspuffer

Dabei ist darauf zu achten, dass es während der einzelnen Arbeitsschritte zu keiner Lichtexposition der direkt markierten Sonde kommt. Zu diesem Zweck werden die Eppendorff Reaktionsgefäße mit Alufolie lichtundurchlässig verpackt. Die 200 µl Sondenmix werden dann in Aliquots à 12 µl abgefüllt und lichtgeschützt bei –20°C aufbewahrt. Einen schematischen Überblick über die Hybridisierungsregionen geben die Abbildungen 9a-c, einen Eindruck des tatsächlichen Bildes unter dem Fluoreszenzmikroskop die Abbildungen 10a und b.

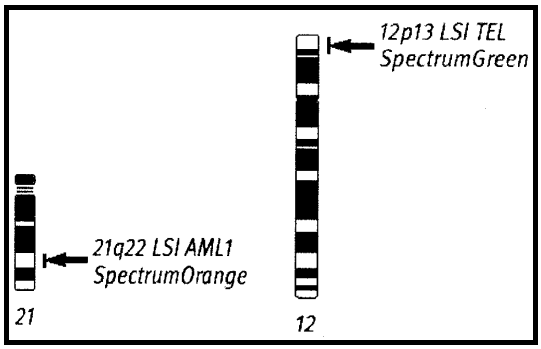


Abbildung 9a: LSI *TEL/AML1* ES Dual Color Translocation Probe, schematische Darstellung der Hybridisierungsregion (Vysis DGIU, 2006)

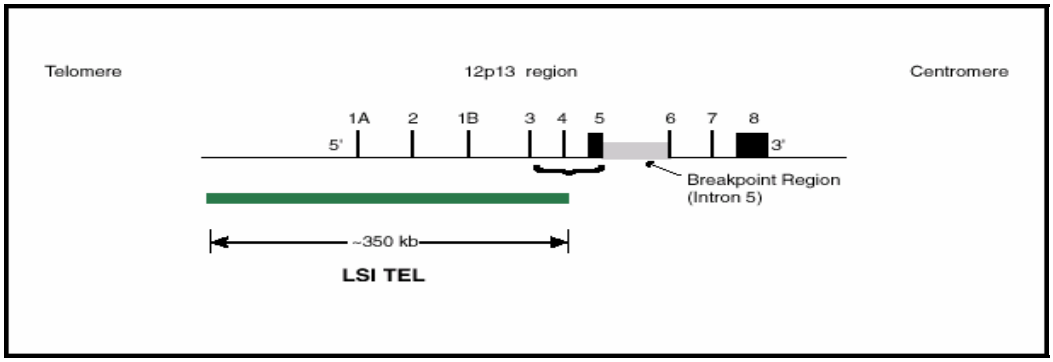


Abbildung 9b: Hybridisierungsregion 12p13 (Vysis DGIU, 2006)

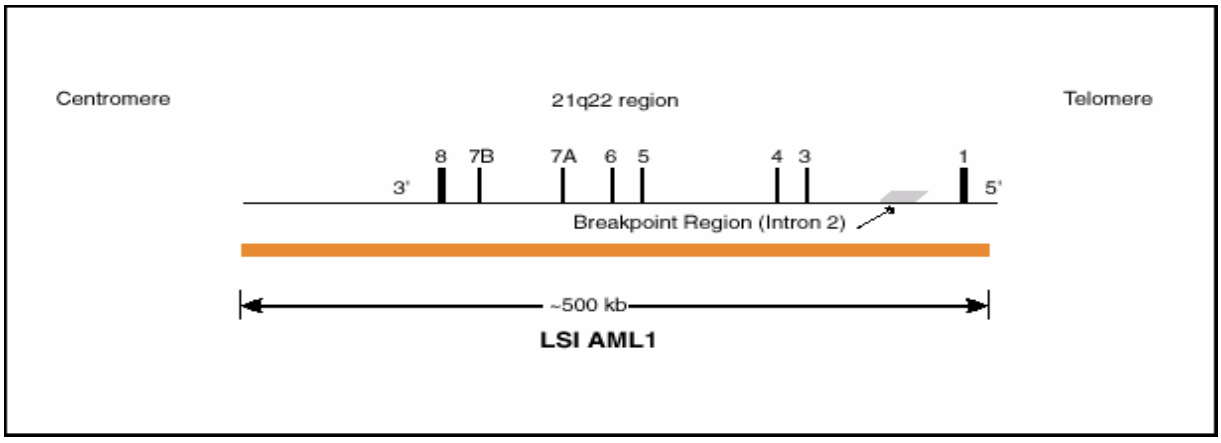
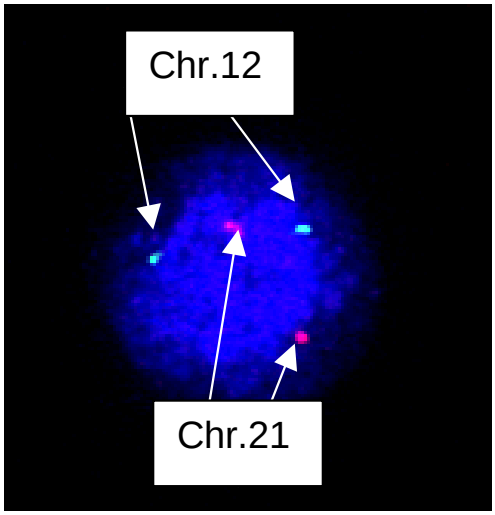
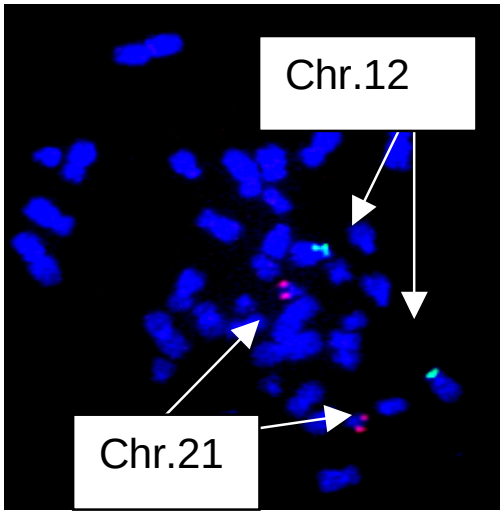


Abbildung 9c: Hybridisierungsregion 21q22 (Vysis DGIU, 2006)





Abbildungen 10a und 10b: Fluoreszenzmikroskopische Bilder der Hybridisierung einer Inter- und einer Metaphase (10a,10b) aus einem Knochenmarkpunktat mit LSI *TEL/AML1* ES Dual Color Translocation Probe. Der Kern und die einzelnen Chrmosomen sind durch DAPI Gegenfärbung blau eingefärbt, die hybridisierten Regionen der Chromosomen 12 und 21 stellen sich entsprechend der Eigenschaften der Sonde grün bzw. rot dar (Pfeile). Es liegt kein Rearrangement vor.

Für die Abbildungen 10a und 10b wurde Material von Patienten benutzt, die in der Untersuchung mittels PCR kein *TEL/AML1*-Rearrangement aufwiesen. Die Kerne und einzelnen Chromosomen stellen sich blau angefärbt dar. Die mit Pfeilen markierten Punkte zeigen die an die entsprechende Bindungsstelle hybridisierten Sonden. Für einen normalen Karyotyp ergeben sich jeweils zwei rote (*AML1*) und zwei grüne Signale (*TEL*). In der Metaphase sieht man, dass die Sonde an beiden homologen Chromosomen bindet.

2.2.1.3 Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop des Typs Axiophot mit Plan-Neofluor-Objektiven und einer 100 Watt Quecksilber-Kurzbogenlampe der Firma Zeiss (Göttingen). Für die Fotodokumentation stand eine High Performance CCD Camera von COHU (San Diego, USA) zur Verfügung.

Die Auswertung der Interphasenkerne erfolgte, indem mäanderförmig 200 Kerne pro Präparat beurteilt wurden. Dazu wurden die Fluoreszenzsignale jedes Kerns ausgezählt und in eine Tabelle eingetragen. Die Signale waren der Sonde entsprechend rot für das *AML1*-Signal auf Chromosom 21 beziehungsweise grün für das *TEL*-Signal auf Chromosom 12. Die benutzte Vergrößerung für die optische Auswertung war 400fach. Zur Fotodokumentation wurde die Vergrößerung auf 1000fach umgestellt. Eine Auswertung von Metaphasen wurde nur bei den Präparaten durchgeführt, bei denen in den Interphasekernen Auffälligkeiten zu sehen waren. Auch hier wurde mit der 400fachen Vergrößerung gearbeitet und zur Fotodokumentation auf 1000fach umgeschaltet.

2.3 Cut Off-Punkt

Der Cut Off-Punkt (COF) bezeichnet die Grenze zwischen zufälligem Auftreten und tatsächlichem Vorhandensein einer Aberration. In dieser Untersuchung wurde der Cut Off-Punkt für Zugewinne und Verluste, wie bei diesen Sonden üblich, aus dem arithmetischen Mittelwert zuzüglich der dreifachen Standardabweichung bestimmt. Die dieser Berechnung zugrunde liegenden Daten wurden aus Auswertungen von Knochenmarkpunktaten von 11 Patienten ohne chromosomale Aberrationen (sog. Kontrollen) gewonnen. Dazu wurden Zugewinne und Verluste der einzelnen Signale ermittelt, indem 200 Kerne pro Kontrolle beurteilt wurden. In der Berechnung wurden die Gewinne und Verluste nicht für eine bestimmte Anzahl (z.B. +1, +2,...), sondern nur für den Zugewinn bzw. Verlust an sich berechnet. Daraus ergibt sich für den Zugewinn eines Signals derselbe Cut Off-Punkt, wie für den Zugewinn mehrerer Signale. Dieses Vorgehen wurde gewählt, um mit hinreichender Sicherheit auch Zugewinne im Bereich von mehr als drei Signalen, die bei den Kontrollen eher selten

zu beobachten waren, und trotzdem als zufällige Ereignisse aus z.B. Hybridisierungsartefakten und Hintergrundsignalen aufgrund der Materialqualität resultieren können, aus der Bewertung herauszufiltern. Ergebnisse, bei denen der COF nur von einem der beiden (*AML1* oder *TEL*) überschritten wurde, sind im Ergebnisteil durch Sternchen gekennzeichnet (*).
Die Resultate sind in Tabelle 4 zu sehen.

	AML1-Signal (rot)		keine *AML1*-Veränderung (%)	
Kontrollennummer	Verlust (%)	Zugewinn (%)		Summe (%)
1	5	0	95	100
2	2	0,5	97,5	100
3	2,5	0	97,5	100
4	1,5	1	97,5	100
5	2	3	95	100
6	3,5	3	93,5	100
7	2	0	98	100
8	2,5	0,5	97	100
9	4,5	1	94,5	100
10	1	0,5	98,5	100
11	2	0,5	97,5	100
	TEL-Signal (grün)		keine *TEL*-Veränderung (%)	
Kontrollennummer	Verlust (%)	Zugewinn (%)		Summe (%)
1	3,5	3	93,5	100
2	0,5	3,5	96	100
3	1	2	97	100
4	1	2,5	96,5	100
5	1,5	0	98,5	100
6	0,5	4,5	95	100
7	0	2	98	100
8	0	6	94	100
9	1,5	2	96,5	100
10	1,5	0	98,5	100
11	1	2	97	100

Tabelle 4: Die Ergebnisse der FISH-Untersuchung bei Patienten, die als sogenannte Kontrollen zur Bestimmung des Cut-Off-Punktes benutzt wurden.

Als Beispiel für die Berechnung des Cut Off-Punktes ist im Folgenden die Berechnung für den Zugewinn von *AML1*-Signalen exemplarisch dargestellt. Die Berechnungen der anderen Cut Off-Punkte finden sich im Anhang (Berechnungen).

Berechnung: Zugewinne *AML1*

	n1	n2	n3	n4	n5	n6	n7	n8	n9	n10	n11
Zugewinne (%)	0	0,5	0	1	3	3	0	0,5	1	0,5	0,5

Arithmetisches Mittel: $\bar{x}$ = n1+n2+...+n11 / 11

= 0 + 0,5 + 0 + ...+ 0,5 / 11

= 10 / 11

= 0,91

Standardabweichung: $s = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}(xi-\bar{x})^2}$

s = 1,09

Cut Off-Punkt (COF): $COF = \bar{x} + 3s$

COF = 0,91 + 3 x 1,09

COF = 4,2

Die Cut Off-Punkte:

	TEL (grünes Signal)		*AML1* (rotes Signal)	
	Verlust	Zugewinn	Verlust	Zugewinn
$\bar{x}$	1,09	2,5	2,59	0,91
s	0,97	1,76	1,24	1,09
COF (%)	**4,0**	**7,8**	**6,3**	**4,2**

Aus der Definition des Cut Off-Punktes ergibt sich, dass nur diejenigen Werte als positiv anzusehen sind, die über dem errechneten Wert liegen.

2.4 Zytogenetische Auswertung

Eine klassische Zytogenetik mit Erstellung eines Karyogramms wurde nur bei Vorliegen von auffälligen FISH-Befunden an dem entsprechenden Material durchgeführt. Es wurden dafür dieselbe Zellsuspension (KM24/48, pB24) benutzt, die auch schon zur Befunderhebung bei der FISH-Untersuchung Anwendung gefunden hatte. Die Aufarbeitung erfolgte im Rahmen der Routineuntersuchungen des onkogenetischen Labors und wurde mit den Ergebnissen der FISH-Analysen verglichen. Die Chromosomenaberrationen wurden entsprechend der internationalen Nomenklatur beschrieben (ISCN, 2005).

2.5 Dokumentation der Ergebnisse

Die Archivierung der Fotodokumentation der auffälligen Präparate erfolgte elektronisch am PC und auf optical disc.

2.6 Patientenbezogene Daten

Alle patientenbezogenen Daten wie Alter, Geschlecht, Diagnosezeitpunkt und klinisches Bild wurden aus den Unterlagen der Therapiestudie ALL-BFM in Kiel bezogen.

2.7 Chemikalien/ Materialien

- Ethanol — Riedel de Haen, Sigma - Aldrich , Seelze
- Methanol — JT Baxter, Unterschleißheim
- Deckgläser 24x24mm — Menzel - Gläser, Braunschweig
- Essigsäure — JT Baxter, Unterschleißheim
- Fixogum — Marabuwerke-Gmbh, Tamm
- HCl — Merck, Darmstadt
- KCl — Merck, Darmstadt
- KH_2PO_4 — Merck, Darmstadt
- NaCl — Carl Roth Gmbh+Co, Karlsruhe
- NaOH — Carl Roth Gmbh+Co, Karlsruhe
- Na_2HPO_4 — Merck, Darmstadt
- Objektträger 26x76mm — Menzel - Gläser, Braunschweig
- Tri-NaCitrat-dihydrat — Carl Roth Gmbh+Co, Karlsruhe
- Tween — Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
- 4'6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI) — Sigma, Dreisenhofen

2.8 Lösungen

20xSSC

- 175,3 g NaCl
- 88,2 g Tri-NaCitrat-dihydrat
- 1000 ml dest. H_2O

Diese Lösung wurde mit HCL und NaOH auf pH 7,0 eingestellt und anschließend autoklaviert. Sie bildete die Stammlösung, aus welcher die Verdünnungsstufen 0,1xSSC, 1xSSC und 2xSSC durch Auffüllen mit der entsprechenden Menge dest. H_2O und erneutem Einstellen des pH-Wertes auf pH 7,0 hergestellt wurden. Hiernach erfolgte keine erneute Autoklavierung. Die Aufbewahrung erfolgte bei Raumtemperatur.

0,07 N NaOH

- 14 ml NaOH mol/l
- 186 ml dest. H_2O

Die Aufbewahrung erfolgte bei Raumtemperatur.

1xPBS

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,44 g Na_2HPO_4
- 0,24 g KH_2PO_4

Diese Chemikalien wurden in 800 ml dest. H_2O gelöst und auf pH 7,0 eingestellt. Dann wurde mit dest. H_2O auf 1000 ml aufgefüllt. Der Ansatz wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Alkoholreihe

- Ethanol 30 %, 50 %, 70 %, 100 %

Diese Alkoholreihe wurde aus der Ausgangskonzentration von 100 % durch Verdünnen mit der entsprechenden Menge dest. H_2O hergestellt. Die Aufbewahrung erfolgte bei Raumtemperatur.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenliste

Es wurden Knochenmark- bzw. Blutproben von 201 Patienten, die den unter 2.1 angegebenen Einschlusskriterien entsprachen, ausgewählt und dem beschriebenen FISH-Screening unterzogen (Tabelle 18 im Anhang). Zusätzlich wurden noch fünf weitere Patienten untersucht, deren Karyotyp aufgrund der zytogenetischen Befunde (-21, +mar) als verdächtig für das Vorliegen einer *AML1*-Amplifikation eingeschätzt wurde (Tabelle 19). Diese fünf zusätzlichen Patienten werden, da sie nicht aus dem Jahr 2000 stammen, nicht bei der Berechnung von Inzidenzen und Prozentangaben berücksichtigt. Aufgrund der verschiedenen Anzahl von *AML1*-Signalen konnte eine Einteilung in sieben unterschiedliche Gruppen vorgenommen werden (siehe Tabelle 5).

Gruppe	Signalverteilung	Anzahl der Patienten	Prozentsatz (%)
1	1 *AML1*	5	2,5
2	3 *AML1*	13	6,5
3	4 *AML1*	21	10,5
4	5 *AML1*	1	0,5
5	Mehrere Klone	22	11,0
6*	2 *AML1*	136	67,5
7	*AML1* Amplifikation	3 (+5)	1,5

Tabelle 5: Aufgrund der FISH-Ergebnisse zusammengefasste Gruppen. Die Gruppengröße variiert zwischen 0,5 % und 67,5 %. Fasst man die aberranten Gruppen zusammen, ergibt sich, dass 32,5 % aller Patienten numerische Veränderungen des *AML1*-Gens aufwiesen.

*enthält 5 Patienten mit *TEL*-Verlust bei normaler *AML1*-Signalverteilung.

3.2 Einteilung

Im folgenden werden die durch die FISH gefundenen einzelnen Untergruppen von Patienten vorgestellt, indem exemplarisch jeweils entsprechende Ergebnisse eines Patienten gezeigt werden. In den Tabellen werden nur die Werte angegeben, die Aberrationen oberhalb des Cut Off-Wertes entsprechen. Abweichende

Signalkonstellationen unterhalb des Cut Off-Wertes und die normalen Signale werden nicht extra aufgeführt.

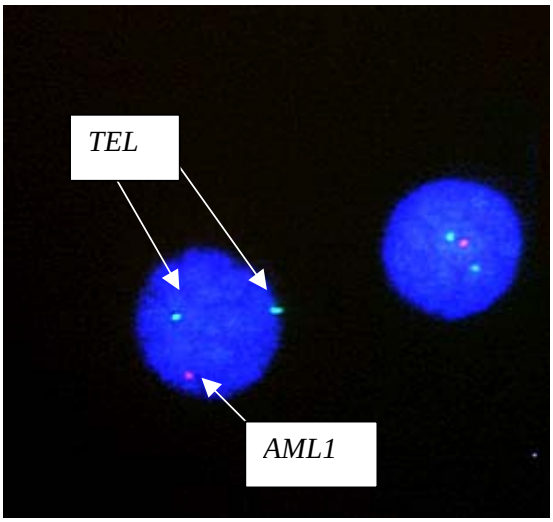
3.2.1 Gruppe 1

Gruppe 1 besteht aus fünf Patienten, die einen Verlust eines *AML1*-Signals und eine regelgerechte Anzahl von Signalen für *TEL* aufweisen. Diese Signalverteilung ist bei 2,5 % der untersuchten Patienten zu finden. Die Klongröße liegt zwischen minimal 7,5 % und maximal 92,0 %, wobei der Median bei 91,5 % liegt und bei 4 von 5 Patienten die Aberration mehr als ¾ der ausgezählten Kerne ausmacht. Die Patienten dieser Gruppe sind in der Tabelle 6 zusammengefasst.

Fallnummer	Material	Signalverteilung	aberrante Kerne (%)
34	KM24	1 *AML1*; 2 *TEL*	91,5
46	KM24	1 *AML1*; 2 *TEL*	7,5
91	KM48	1 *AML1*; 2 *TEL*	92,0
156	KM24	1 *AML1*; 2 *TEL*	76,0
161	KM24	1 *AML1*; 2 *TEL*	91,5

Tabelle 6: Patienten mit nur einem *AML1*-Signal. Die letzte Spalte gibt die Größe des aberranten Klons an.

Die folgenden Abbildungen 11a und 11b zeigen für diese Gruppe exemplarisch die in der FISH-Untersuchung gesehenen Veränderungen in der Inter- und in der Metaphase von Patient 34. Man erkennt die mit den Sonden markierten Gene *TEL* und *AML1* auf den entsprechenden Chromosomen 12 beziehungsweise 21. Es liegt ein Verlust eines *AML1*-Signals vor. In der Metaphase desselben Patienten sieht man ebenfalls den Verlust eines *AML1*-Signals. Die *TEL*-Signale sind regelgerecht.



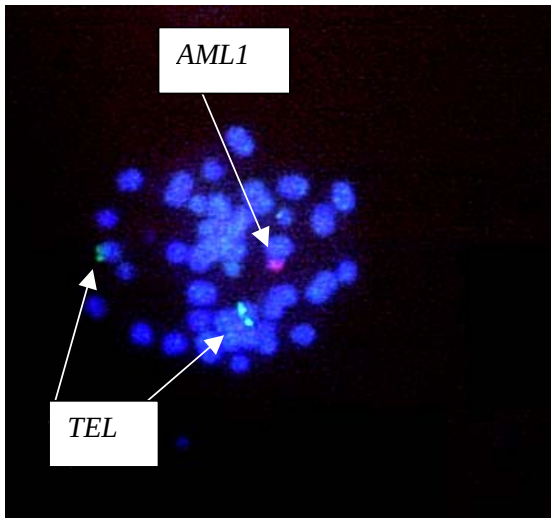


Abbildung 11a und 11b: Inter- und eine Metaphase von Patient 34. Es handelt sich um hybridisiertes Knochenmarkpunktat. Die Pfeile markieren die *TEL*- beziehungsweise *AML1*-Signale. Es liegt ein Verlust eines *AML1*-Signals bei regelgerechten *TEL*-Signalen vor.

3.2.2 Gruppe 2

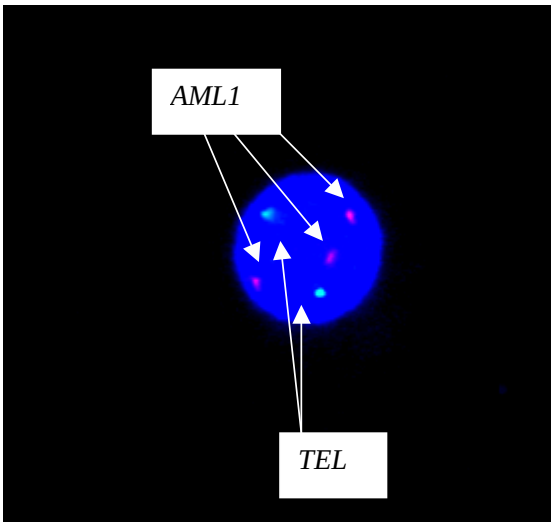
Bei dieser Gruppe von 13 Patienten weisen alle Patienten einen Zugewinn eines *AML1*-Signals auf. Diese Veränderung macht damit einen Anteil von 6,5 % aller Patienten aus. Die Signalveränderung ist in 65,5 % bis 91,5 % der untersuchten Kerne nachweisbar. Der Median liegt bei 75,5 %. Bezüglich der Anzahl der *TEL*-Signale zeigt lediglich Patient 137 eine zusätzliche Veränderung in Form eines Signalverlustes, während die restlichen Patienten dieser Gruppe eine normale Anzahl von *TEL*-Signalen aufweisen. Einen Überblick gibt Tabelle 7.

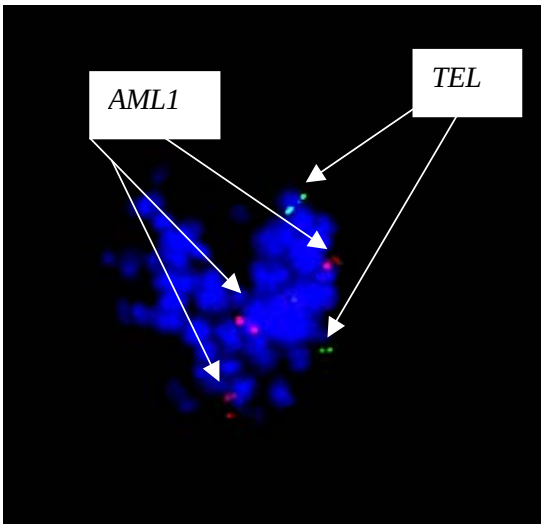
Fallnummer	Material	Signalverteilung	aberrante Kerne (%)
23	KM24	3 *AML1*; 2 *TEL*	71,5
37	KM24	3 *AML1*; 2 *TEL*	65,5
61	KM24	3 *AML1*; 2 *TEL*	68,0
69	KM24	3 *AML1*; 2 *TEL*	91,5
75	KM24	3 *AML1*; 2 *TEL*	72,0
93	KM24	3 *AML1*; 2 *TEL*	86,5
101	KM24	3 *AML1*; 2 *TEL*	80,5
113	KM24	3 *AML1*; 2 *TEL*	66,5
153	KM24	3 *AML1*; 2 *TEL*	83,5
166	KM24	3 *AML1*; 2 *TEL*	75,5
172	KM48	3 *AML1*; 2 *TEL*	72,0

182	KM24	3 *AML1*; 2 *TEL*	90,5
137	KM24	3 *AML1*; 1 *TEL*	82,5

Tabelle 7: Patienten mit einem Zugewinn von einem *AML1*-Signal. Im Knochenmark von Patient 137 konnte zusätzlich ein Verlust eines *TEL*-Signal nachgewiesen werden.

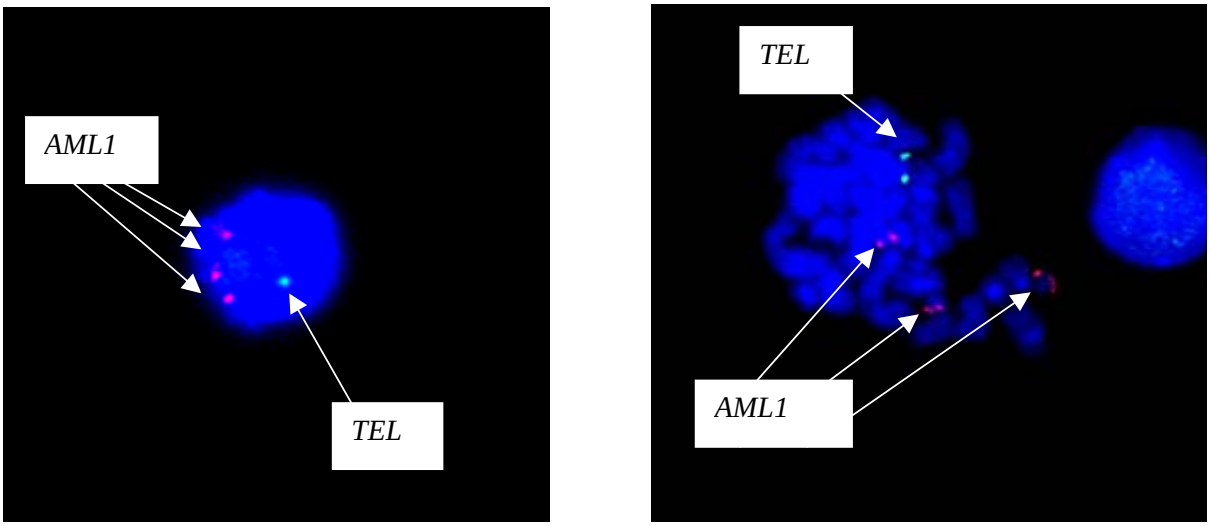
Exemplarisch zeigen die Abbildungen 12a und 12b eine Inter- und eine Metaphase mit den für diese Gruppe typischen Signalveränderungen von Patient 23.
Man erkennt die drei *AML1*-Signale und die zwei *TEL*-Signale. Es liegt hier ein *AML1*-Zugewinn bei normaler *TEL*-Konfiguration vor. Besonders gut kommt in der Metaphase zur Darstellung, dass die Signale nicht nur auf getrennten Chromosomen liegen, sondern auch die Allele auf den beiden Chromatiden getrennt voneinander markiert wurden.





Abbildungen 12a und 12b: Inter- und Metaphase von Patient 23. Die Pfeile markieren drei *AML1*-Signale und zwei *TEL*-Signale. Es liegt also ein Zugewinn von einem *AML1*-Signal vor. Die *TEL*-Signale sind regelgerecht.

Zusätzlich zeigt die Abbildung 13a eine Interphase des Patienten 137. Hier erkennt man die mit den Pfeilen gekennzeichneten drei *AML1*-Signale aber nur ein *TEL*-Signal. In der Metaphase (Abbildung 13b) kann man sehen, dass die verschiedenen Signale jeweils auf getrennten Chromosomen lokalisiert sind. Es handelt sich um einen Zugewinn eines *AML1*-Signals und den Verlust eines *TEL*-Signals.



Abbildungen 13a und 13b: Inter- und Metaphase von Patient 137. Die Pfeile markieren die *AML1*- und *TEL*-Signale. Es sind sowohl in der Inter-, als auch in der Metaphase ein Zugewinn eines *AML1*-Signals und ein Verlust eines *TEL*-Signals nachweisbar.

3.2.3 Gruppe 3

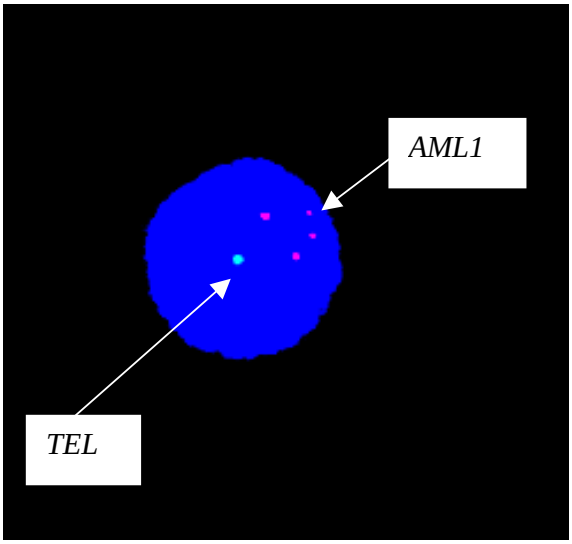
In der Gruppe 3 sind 21 Patienten mit zwei zusätzlichen *AML1*-Signalen zusammengefasst, sie enthält somit 10,5 % der untersuchten Patienten. Die Veränderung ist in 17,5 % bis 91,5 % der untersuchten Kerne nachweisbar, wobei der Median 72 % beträgt. Es scheint also eine hohe Variabilität bezüglich der Klongröße bei den einzelnen Patienten vorzuliegen. Weiterhin kann man innerhalb dieser Gruppe aufgrund der *TEL*-Signale noch einmal zwischen 4 Untergruppen unterscheiden. Es gibt Patienten mit normaler Anzahl, mit einem Verlust, mit einem einfachen und einem zweifachen Zugewinn von *TEL*-Signalen.

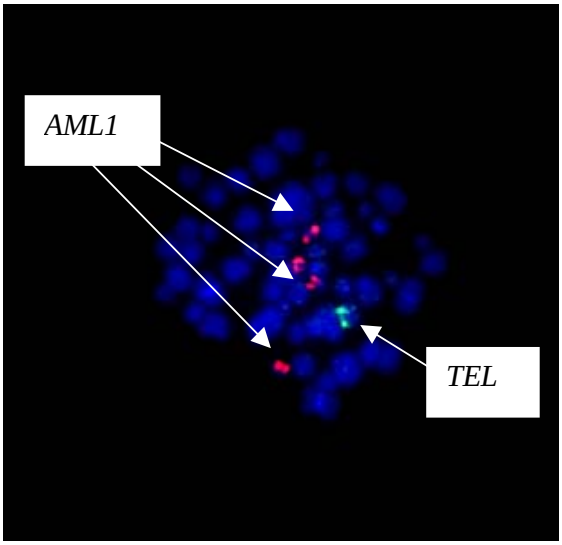
Fallnummer	Material	Signalverteilung	auffällige Kerne in %
132	KM48	4 *AML1*; 1 *TEL*	25,5
173	KM24	4 *AML1*; 1 *TEL*	86,5
3	KM24	4 *AML1*; 2 *TEL*	88,0
89	KM24	4 *AML1*; 2 *TEL*	89,5
117	KM24	4 *AML1*; 2 *TEL*	83,5
139	KM24	4 *AML1*; 2 *TEL*	89,5
126	pB24	4 *AML1*; 2 *TEL*	39,0
151	KM24	4 *AML1*; 2 *TEL*	84,5
154	KM24	4 *AML1*; 2 *TEL*	91,5
82	KM24	4 *AML1*; 2 *TEL*	36,0
183	KM24	4 *AML1*; 2 *TEL*	49,0

170	KM24	4 *AML1*; 2 *TEL*	17,5
163	KM24	4 *AML1*; 2 *TEL*	91,5
169	KM24	4 *AML1*; 2 *TEL*	19,5
177	KM24	4 *AML1*; 2 *TEL*	72,0
193	KM24	4 *AML1*; 2 *TEL*	87,0
198	KM24	4 *AML1*; 2 *TEL*	53,5
63	KM24	4 *AML1*; 3 *TEL*	28,5
92	KM24	4 *AML1*; 3 *TEL*	86,5
119	pB48	4 *AML1*; 3 *TEL*	20,0
11	pB24	4 *AML1*; 4 *TEL*	22,0

Tabelle 8: Patienten mit einem zweifachen Zugewinn von *AML1*-Signalen. Zusätzlich liegen bei einigen ein- oder zweifache Zugewinne oder Verluste von *TEL*-Signalen vor.

Abbildungen 14a und 14b zeigen stellvertretend für die Gruppe der Patienten mit einem Zugewinn von zwei *AML1*-Signalen und einem Verlust eines *TEL*-Signals eine Interphase und eine Metaphase des Patienten 173. Die Pfeile deuten auf vier *AML1*-Signale und ein *TEL*-Signal. In der Metaphase ist die Hybridisierung beider Allele der Chromatiden, sowie die Lage auf verschiedenen voneinander getrennt liegenden Chromosomen gut zu erkennen.





Abbildungen 14a und 14b: Inter- und Metaphase von Patient 173. Die Pfeile zeigen die jeweiligen Gene. Es sind jeweils vier *AML1*-Signale und ein *TEL*-Signal zu erkennen. Alle Signale liegen auf getrennten Chromosomen und die Hybridisierung beider Allele ist erkennbar.

Für die Gruppe von Patienten mit einem zweifachen Zugewinn von *AML1*-Signalen bei normaler *TEL*-Signalverteilung wurden stellvertretend die Interphase und die Metaphase des Patienten 3 ausgewählt. Sie sind in den folgenden Abbildungen 15a und 15b zu sehen. Die Pfeile zeigen auf vier *AML1*-Signale und zwei *TEL*-Signale.

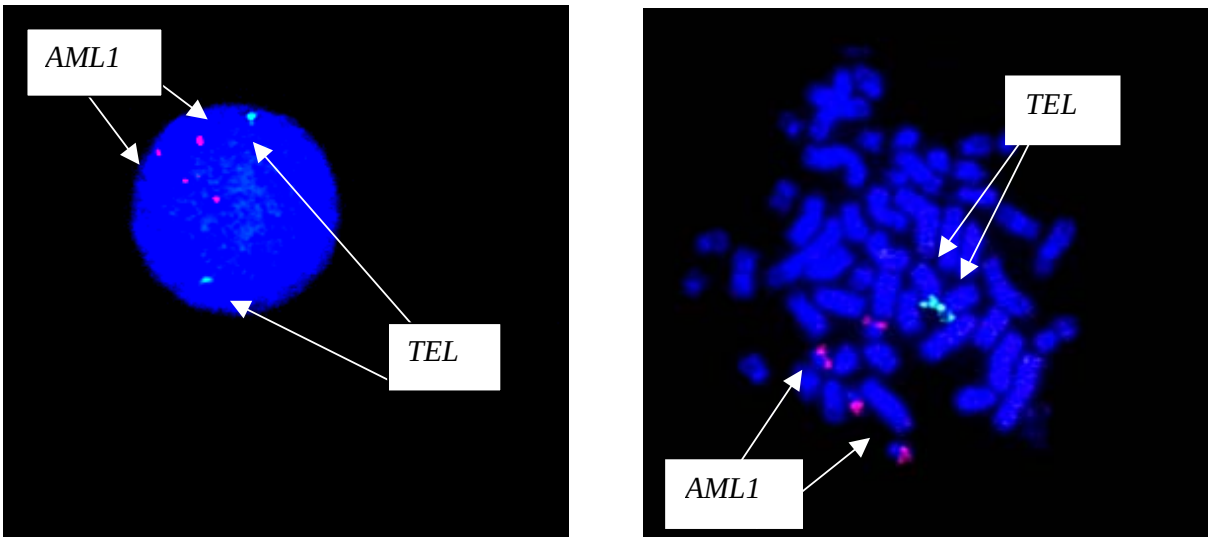


Abbildung 15a und 15b: Inter- und Metaphase von Patient 3. Die Pfeile markieren die *AML1*- bzw. *TEL*-Signale. Es sind vier *AML1*-Signale und zwei *TEL*-Signale zu erkennen. Es handelt sich also um einen zweifachen *AML1*-Zugewinn und eine regelgerechte *TEL*-Verteilung.

Die Abbildung 16 stammt von Patient 119 und zeigt exemplarisch eine Interphase aus der Gruppe der Patienten mit einem zweifachen Zugewinn von *AML1*-Signalen und einem einfachen Zugewinn von einem *TEL*-Signal. Da im untersuchten Material keine Metaphase zu finden war, muss in der Darstellung leider darauf verzichtet werden.

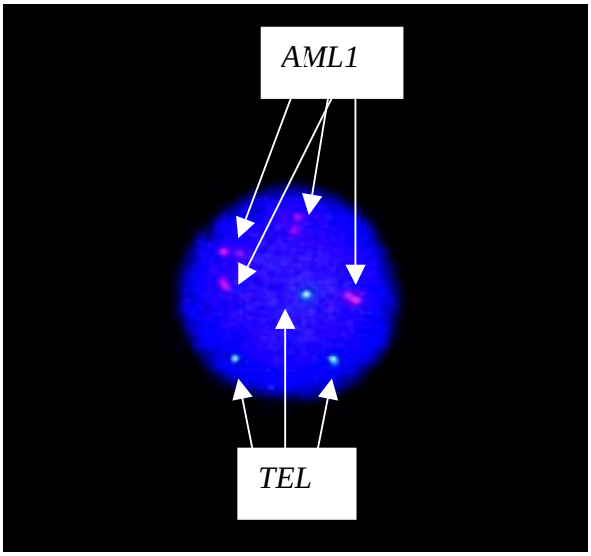


Abbildung 16: Interphase von Patient 119. Man erkennt vier *AML1*-Signale und drei *TEL*-Signale. Das entspricht einem zweifachen *AML1*- und einem einfachen *TEL*-Zugewinn. Eine Metaphase war im Untersuchungsmaterial nicht zu finden.

Die Abbildung 17 zeigt den zweifachen Zugewinn beider Signale in einem Interphasekern von Patient 11. Man kann vier *AML1*-Signale und vier *TEL*-Signale erkennen. Auch hier war keine Metaphase zu finden.

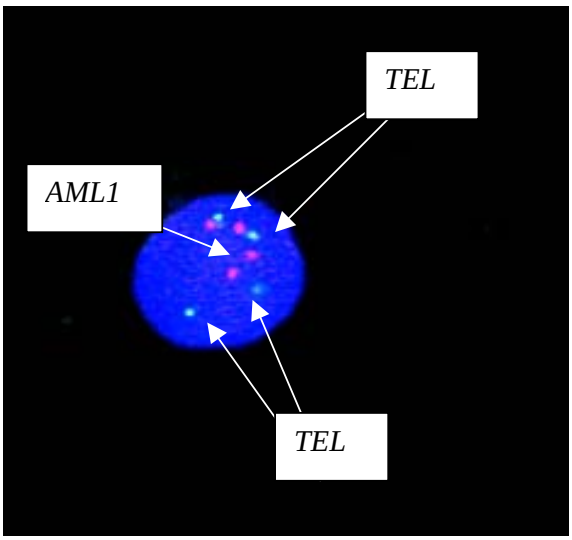


Abbildung 17: Interphase von Patient 11. Man erkennt die mit den Pfeilen markierten Signale. Es sind vier *AML1*-Signale und vier *TEL*-Signale nachzuweisen. Das entspricht einem Zugewinn von zwei *AML1*- und zwei *TEL*-Signalen.

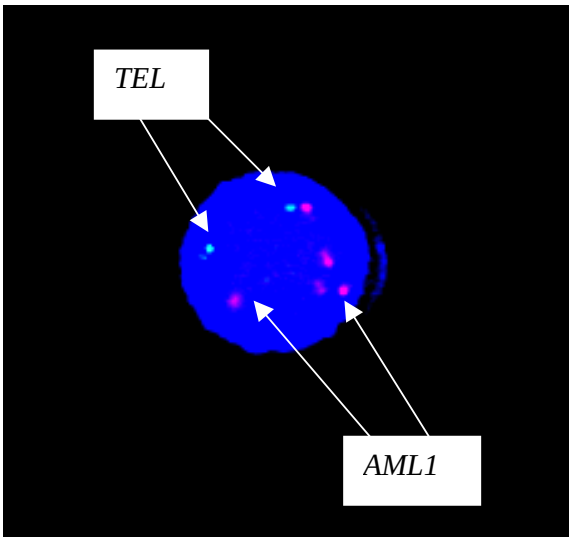
3.2.4 Gruppe 4

Der Zugewinn von mehr als zwei *AML1*-Signalen auf separaten Chromosomen konnte lediglich bei einem der Patienten nachgewiesen werden, was einer Häufigkeit von 0,5 % entspricht. Hier traten in 77 % der ausgewerteten Kerne 5 *AML1*-Signale nebeneinander auf. Die Übersicht enthält Tabelle 9.

Fallnummer	Material	Signalverteilung	aberrante Kerne in %
84	pB24	5 *AML1*; 2 *TEL*	77,0

Tabelle 9: Seltene Veränderung mit 5 einzelnen *AML1*-Signalen bei einem Patienten.

Die folgenden Abbildungen 18a-c stammen alle von Patient 84 und zeigen sowohl einen Interphasekern als auch Metaphase. Man erkennt die zwei *TEL*- und die fünf *AML1*- Signale. Es liegt also ein Zugewinn von drei *AML1*-Signalen bei regelgerechten *TEL*- Signalen vor. Abbildung 18c zeigt die Metaphase aus Bild 18b in bearbeiteter (invertierter) Darstellung, so dass man deutlicher erkennen kann, dass alle Signale auf verschiedenen Chromsomen lokalisiert sind.



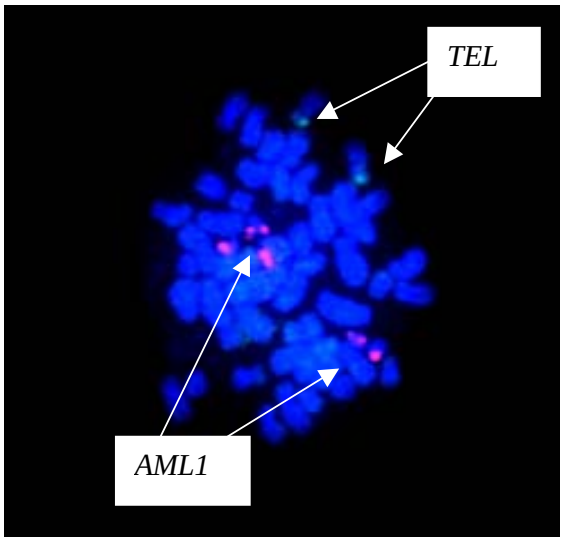


Abbildung 18a und 18b: Fünf *AML1*-Signale und zwei *TEL*-Signale in einer Inter-/ Metaphase von Patient 84. Es liegt ein Zugewinn von drei *AML1*-Signalen vor. Die *TEL*-Signalverteilung ist normal.

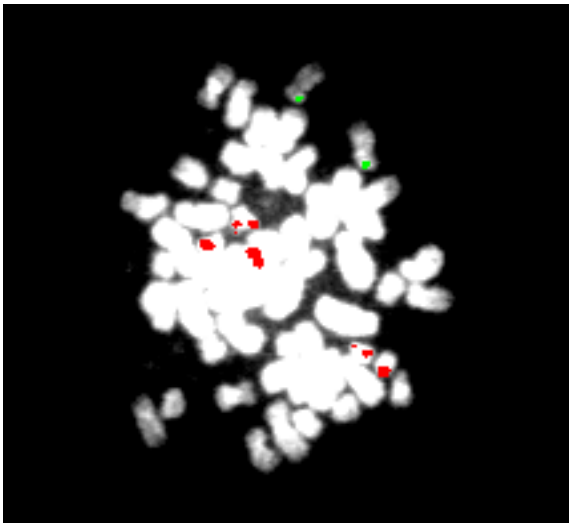


Abbildung 18c: Metaphase wie in Abbildung 18b, allerdings in einer Computerbearbeitung (invertiert), die deutlich zeigt, dass alle *AML1*-Signale auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. Auch die *TEL*-Signale liegen auf separaten Chromosomen.

3.2.5 Gruppe 5

Während in den vorangegangenen Gruppen jeweils nur ein aberranter Klon gefunden wurde, sind in dieser Gruppe bei allen Patienten zwei bis drei unterschiedlich veränderte Klone nebeneinander aufgetreten. Mit 22 Patienten ist dies die größte Gruppe mit Aberrationen und sie macht 11 % aller untersuchten Kinder aus. Innerhalb dieser Gruppe lässt sich weiterhin eine Einteilung dahingehend treffen, ob neben normalen Signalen nur *AML1*, *TEL* oder die Signale beider Gene verändert sind:

1. Gruppe 5a: *AML1*-Zugewinn, *TEL*-Zugewinn
2. Gruppe 5b: *AML1*-Zugewinn, *TEL*-Verlust
3. Gruppe 5c: *AML1*-Zugewinn; sowohl *TEL*-Verlust, als auch Zugewinn
4. Gruppe 5d: *AML1*-Zugewinn, *TEL* unverändert

Einen Überblick gibt Tabelle 10.

Fallnummer	Material	Klon1	Klon 2	Klon 3
Gruppe 5a *AML1*-Zugewinn, *TEL*-Zugewinn				
77	KM24	4 *AML1*; 3 *TEL* 64 %	3 *AML1*; 3 *TEL* 17 %	4 *AML1*; 4 *TEL* 9 %
85	KM24	3 *AML1*; 2 *TEL* 77,5 %	3 *AML1*; 3 *TEL* 13 %	
Gruppe 5b *AML1* Zugewinn, *TEL* Verlust				
48	KM24	4 *AML1*; 2 *TEL* 15 %	2 *AML1*; 1 *TEL* 11,5 %	
99	KM24	2 *AML1*; 1 *TEL* 52,5 %	3 *AML1*; 2 *TEL* 11,5 %	
141	KM24	4 *AML1*; 2 *TEL* 39,5 %	2 *AML1*; 1 *TEL* 11,5 %	
Gruppe 5c *AML1* Zugewinn; *TEL* sowohl Verlust, als auch Zugewinn				
5	KM24	4 *AML1*; 4 *TEL* 58,5 %	3 *AML1*; 1 *TEL* 32 %	

Gruppe 5d *AML1* Zugewinn, *TEL* unverändert				
18	KM24	4 *AML1*; 2 *TEL* 24 %	3 *AML1*; 2 *TEL* 18 %	
19	KM24	4 *AML1*; 2 *TEL* 25 %	3 *AML1*; 2 *TEL* 12,5 %	
27	KM24	4 *AML*1; 2 *TEL* 72 %	3 *AML1*; 2 *TEL* 16 %	
32	KM24	3 *AML1*; 2 *TEL* 63,5 %	4 *AML1*; 2 *TEL* 20,5 %	
44	KM24	4 *AML1*; 2 *TEL* 65 %	3 *AML1*/; 2 *TEL* 17 %	
55	KM24	4 *AML1*/; 2 *TEL* 86,5 %	3 *AML1*; 2 *TEL* 5,5 %	
59	KM24	3 *AML1*; 2 *TEL* 37,5 %	4 *AML1*; 2 *TEL* 23 %	
65	KM24	3 *AML1*/; 2 *TEL* 50 %	4 *AML1*; 2 *TEL* 5,5 %	
71	KM24	4 *AML1*; 2 *TEL* 78 %	3 *AML1*; 2 *TEL* 7 %	
83	KM24	3 *AML1*; 2 *TEL* 8 %	4 *AML1*; 2 *TEL* 80,5 %	
90	KM24	4 *AML1*; 2 *TEL* 66,5 %	3 *AML1*; 2 *TEL* 26,5 %	
127	KM24	3 *AML1*; 2 *TEL* 39 %	4 *AML1*; 2 *TEL* 38,5 %	
128	KM24	3 *AML1*; 2 *TEL* 80 %	4 *AML1*; 2 *TEL* 6,5 %	
131	KM24	4 *AML1*; 2 *TEL* 80 %	3 *AML1*; 2 *TEL* 11,5 %	
201	KM24	4 *AML1*; 2 *TEL* 9 %	3 *AML1*; 2 *TEL* 6 %	4 *AML1*; 4 *TEL* 4,5 %*
50	KM24	4 *AML1*; 2 *TEL* 76,5 %	4 *AML1*; 3 *TEL* 4,5 %*	3 *AML1*; 2 *TEL* 7,5 %

Tabelle 10: Patienten mit mehreren parallel aufgetretenen Klonen. Insgesamt 11 % der untersuchten Patienten wiesen diese Art der Veränderung auf. Die Prozentangaben stellen jeweils den Anteil dieser Aberration an allen ausgewerteten Kernen dar.

* nur *AML1* liegt über dem COF

Bilder der verschiedenen Klone werden hier nicht im Einzelnen gezeigt, da die Veränderungen denen der Gruppen 1-4 entsprechen, jedoch in dieser Gruppe bei den einzelnen Patienten parallel nebeneinander auftreten.

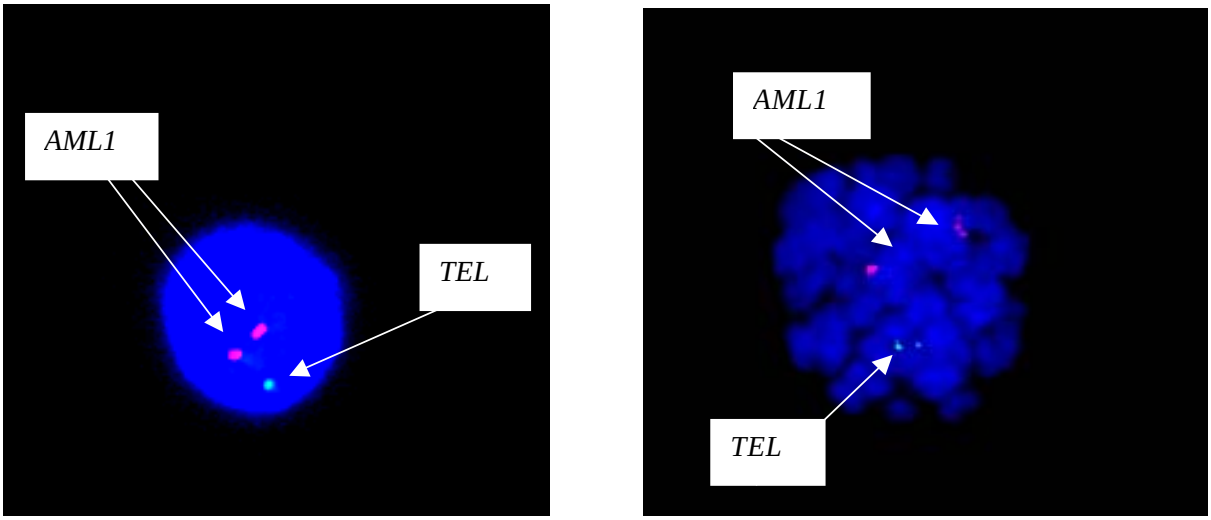
3.2.6 Gruppe 6

Gruppe 6 umfasst die Patienten, die eine normale Anzahl an *AML1*-Signalen aufweisen. Es handelt sich mit 136 Patienten (67,5 %) um die größte Gruppe. Innerhalb dieser gibt es jedoch 5 Patienten, die bei einer regelgerechten *AML1*-Verteilung einen Verlust eines *TEL*-Signals zeigen und daher im Folgenden näher dargestellt werden. Es handelt sich um 3,7 % der Patienten innerhalb dieser Gruppe und bezogen auf alle untersuchten Patienten um 2,5 %. Der Maximalwert der aberranten Kerne lag bei 83,5 %, das Minimum bei 54 % und der Median bei 77,5 %. Einen Überblick über die Patienten dieser Gruppe gibt Tabelle 11.

Fallnummer	Material	Signalverteilung	aberrante Kerne in %
16	KM24	2 *AML1*; 1 *TEL*	80,0
29	KM24	2 *AML1*; 1 *TEL*	83,5
53	KM24	2 *AML1*; 1 *TEL*	58,0
111	KM24	2 *AML1*; 1 *TEL*	54,0
129	KM24	2 *AML1*; 1 *TEL*	77,5

Tabelle 11: 5 Patienten mit einer normalen *AML1*-Konfiguration und einem Verlust eines *TEL*-Signals.

Die Abbildungen 19a und 19b zeigen exemplarisch eine Interphase und eine Metaphase des Patienten 16. Man erkennt die zwei *AML1*-Signale und ein einzelnes *TEL*-Signal. Es liegt also ein Verlust eines *TEL*-Signals vor.



Abbildungen 19a und 19b: Inter- und Metaphase von Patient 16. Die Pfeile markieren die entsprechenden Signale. Es handelt sich um einen Verlust eines *TEL*-Signals, der sowohl in der Inter-, als auch in der Metaphase zu erkennen ist. Die *AML1*- Signale sind normal verteilt.

3.2.7 *AML1*-Amplifikation

3.2.7.1 Gruppe 7

Diese Gruppe umfasst drei Patienten und zeichnet sich durch eine Amplifikation der *AML1*-Signale bei regelrechter *TEL*-Signalverteilung aus. Prozentual kam diese Aberration bei 1,5 % der untersuchten Patienten des Jahres 2000 vor. Maximal wiesen 97,5 % und minimal 91,5 % der untersuchten Kerne eines Patienten diese Aberration auf. Im Vergleich zu den anderen Gruppen liegt die Klongröße im Durchschnitt deutlich über der der anderen Gruppen. Einen Überblick gibt Tabelle 12.

Fallnummer	Material	Signalverteilung	aberrante Kerne in %
15	KM24	Ampl. *AML1*	91,5
103	KM24	Ampl. *AML1*	97,5
200	KM48	Ampl. *AML1*	96,5

Tabelle 12: Patienten mit einer *AML1*-Amplifikation. Die Klongröße liegt bei allen über 90 %.

Im Folgenden werden die FISH-Ergebnisse aller Patienten dieser Gruppe dargestellt.

Patient 15

Die Abbildung 20a zeigt eine Interphase von Patient 15. Man erkennt zwei regelgerechte grüne *TEL*-Signale und multiple rote clusterartig verteilte *AML1*-Signale, was auf die hohe Amplifikationsrate des markierten Bereichs hindeutet. Abbildung 20b zeigt eine Metaphase desselben Patienten. Die Pfeile zeigen neben den regelrechten *TEL*-Signalen, das normale *AML1*-Signal und ein deutlich verstärktes *AML1*-Signal. Hier wird deutlich, dass die Amplifikation nur auf einem Chromosom liegt.

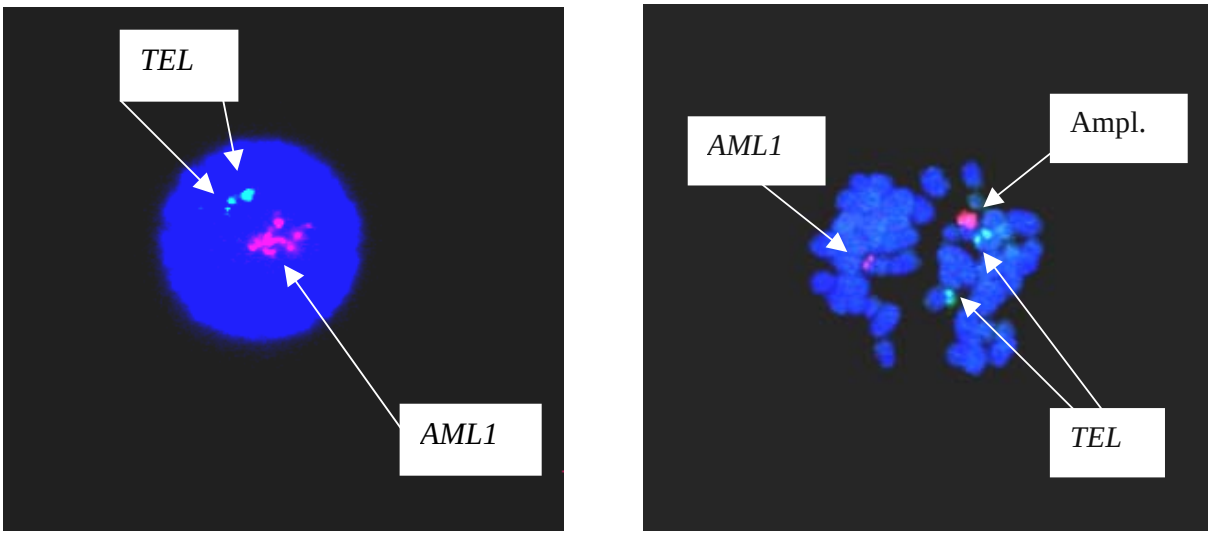


Abbildung 20a und 20b: Inter- und Metaphase von Patient 15. Die Pfeile bezeichnen die beiden Signale. Man sieht regelgerechte *TEL*-Signale und multiple *AML1*-Signale. Die Metaphase zeigt ein verstärktes *AML1*-Signal, welches auf einem einzelnen Chromosom lokalisiert ist und ein weiteres regelgerechtes *AML1*-Signal, sowie zwei *TEL*-Signale.

Die Abbildung 20c zeigt mehrere Interphasekerne von Patient 15 in einem Blutausstrich zum Zeitpunkt des Rezidivs. Auch hier erkennt man die Amplifikation der *AML1-Signal*e (Pfeil 1) und regelgerechte *TEL*- Signale (Pfeil 2). Bei den rötlich gefärbten Strukturen (Pfeil 3) handelt es sich um Reste von Erythrozyten, die nach dem Pepsinverdau übriggeblieben sind.

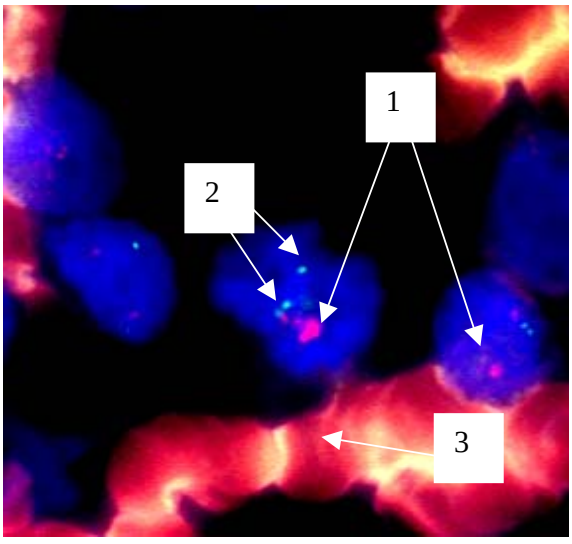
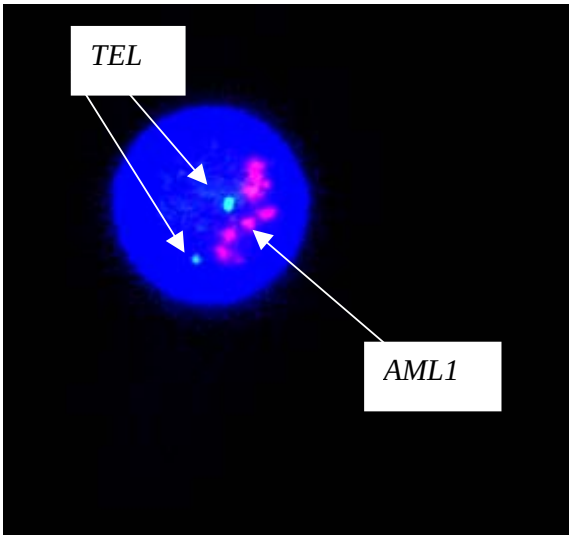


Abbildung 20c: Rezidiveinsendung von Patient 15. Es handelt sich um einen Blutausstrich, mit mehreren Interphasen. Pfeil 1 markiert amplifizierte *AML1*-Signale, Pfeil 2 *TEL*-Signale und Pfeil 3 Erythrozyten.

Patient 103

Die Abbildung 21a zeigt eine Interphase von Patient 103. Man erkennt die Amplifikation des *AML1*-Signals, das in durchschnittlich 9-10 Kopien vorliegt. Die *TEL*-Signale sind regelgerecht.
In der Metaphase (Abb. 21b) erkennt man ein vergrößertes und ein normales *AML1*-Signal (Pfeile). Die *TEL*-Signale sind regelgerecht. Alle Signale liegen auf verschiedenen Chromosomen. Ebenfalls ist die getrennte Hybridisierung der beiden Allele auf den Schwesterchromatiden am oberen Rand der Metaphase zu erkennen.



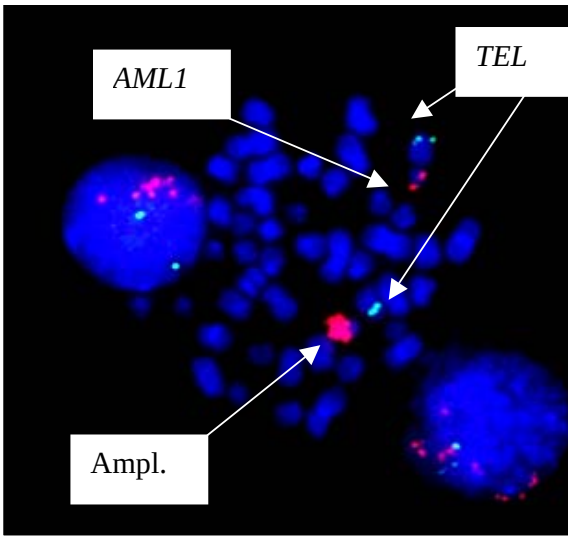
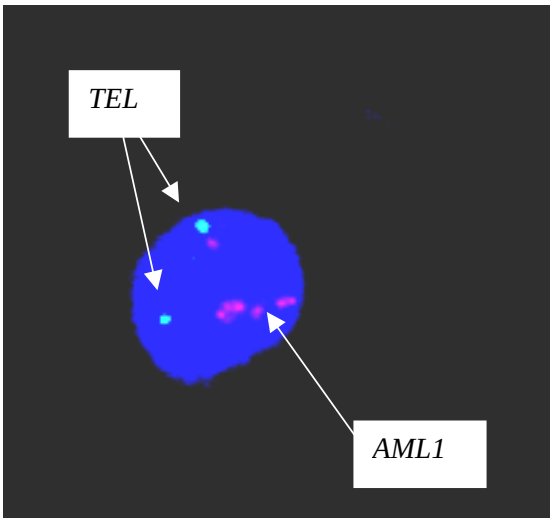


Abbildung 21a: Interphase von Patient 103. Es sind zwei *TEL*-Signale und ca. 9 *AML1*-Signale zu sehen.
Abbildung 21b: Metaphase zwischen zwei Interphasen ebenfalls von Patient 103. Es fallen zwei *TEL*-Signale, ein normales *AML1*-Signal und eine Amplifikation des *AML1*-Signals auf einem Chromosom auf.

Patient 200

Auch bei Patient 200 liegt die Amplifikation mit ca. 7 Kopien in der Größenordnung wie bei den anderen Kindern (Abb. 22a) und man sieht keine Veränderung bezüglich der *TEL*-Signale. In der Metaphase (Abb. 22b) ist die Amplifikation wieder klar auf ein Chromosom beschränkt und im Vergleich mit dem normalen Signal wird ihre Größe deutlich. Auch hier liegen bezüglich *TEL* keine Veränderungen vor.



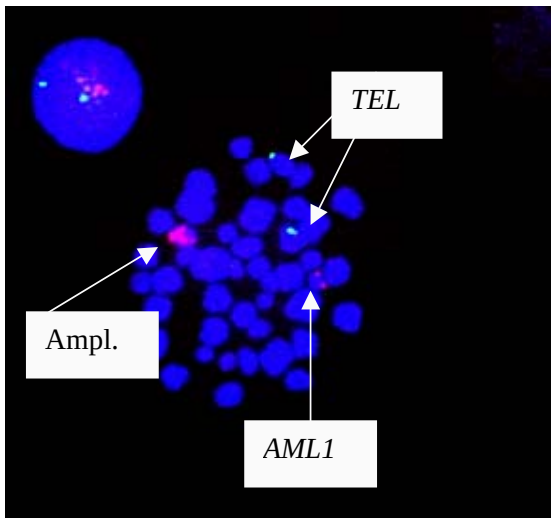


Abbildung 22a: Interphase von Patient 200. Es ist die Amplifikation von *AML1*-Signalen zu erkennen. Die zwei *TEL*-Signale stellen sich regelgerecht dar.

Abbildung 22b: Interphase und eine Metaphase von Patient 200. Es sind zwei regelgerechte *TEL*-Signale und ein regelgerechtes *AML1*-Signal, sowie eine *AML1*-Amplifikation zu sehen.

3.2.7.2 Patienten mit Karyotyp -21, + mar

Ebenfalls in die Gruppe der Patienten mit *AML1*-Amplifikation fallen fünf weitere Patienten, deren Karyotyp aufgrund der zytogenetischen Befunde (-21, +mar) als verdächtig für das Vorliegen einer *AML1*-Amplifikation eingeschätzt wurde und die daher einer FISH-Analyse unterzogen wurden (Tabelle 30). Alle zeigen eine hochgradige Amplifikation des *AML1*-Signals. Der Median der Aberration der untersuchten Kerne liegt bei 94,5 % mit einem Maximum von 95,5 % und einem Minimum von 91,5 %. Auch bei diesen Patienten liegt die Häufigkeit der veränderten Kerne bei konstant über 90 %.

Es werden, wenn möglich, jeweils Inter- und Metaphase der Patienten gezeigt. Einen Überblick gibt Tabelle 13.

Fallnummer	Material	Signalverteilung	Eingangsdatum
202	KM24	amplifiziert 94,5 %	10.06.87
203	KM24	amplifiziert 95,5 %	30.07.93
204	KM24	amplifiziert 91,5 %	21.09.98
205	KM24	amplifiziert 93,5 %	05.01.01
206	KM24	amplifiziert 95,5 %	23.03.01

Tabelle 13: 5 Patienten mit dem Karyotyp –21, + mar, auch bei ihnen liegt die Klongröße bei über 90 %.

Patient 202

Die Abbildungen 23 zeigt eine Interphase von Patient 202.
Man erkennt eine Akkumulation von *AML1*-Signalen und zwei regelgerechte *TEL*-Signale.

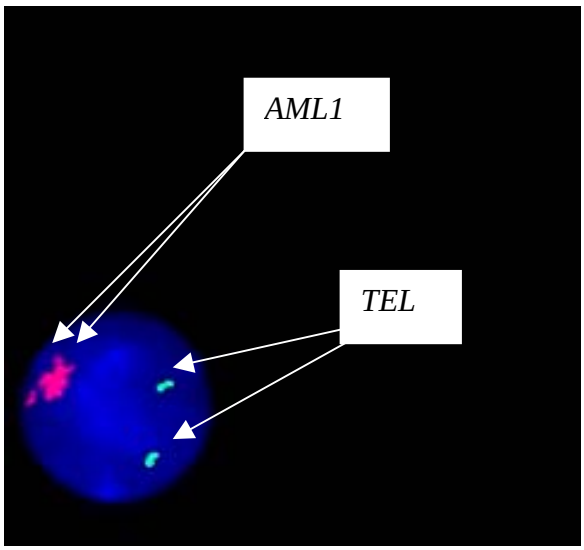


Abbildung 23: Interphasekern von Patient 202. Es sind zwei *TEL*-Signale pro Kern und eine Amplifikation der *AML1*-Signale nachweisbar.

Patient 203

In der Abbildung 24a sind zwei Interphasen von Patient 203 dargestellt. Man erkennt acht *AML1*-Signale. Die *TEL*-Signale sind regelgerecht.
Abbildung 24b zeigt eine Metaphase von Patient 203. Zu sehen ist neben einem normalen *AML1*-Signal eine Akkumulation von *AML1*-Signalen auf einem deutlich vergrößerten Chromosom.

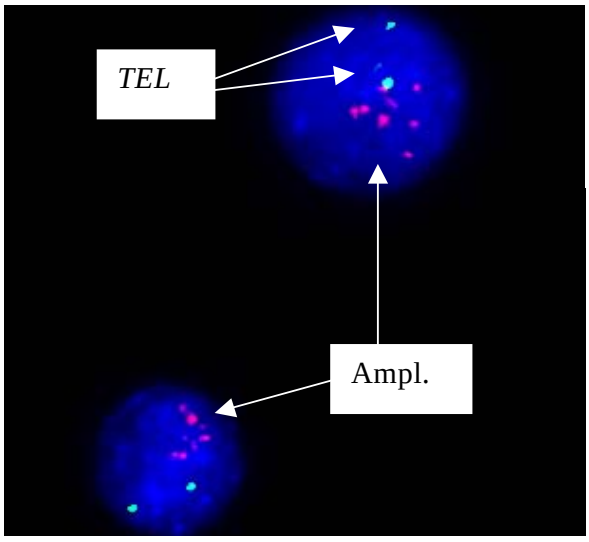


Abbildung 24a: Zwei Interphasen von Patient 203 mit jeweils zwei *TEL*-Signalen und einer Amplifikation der *AML1*-Signale.

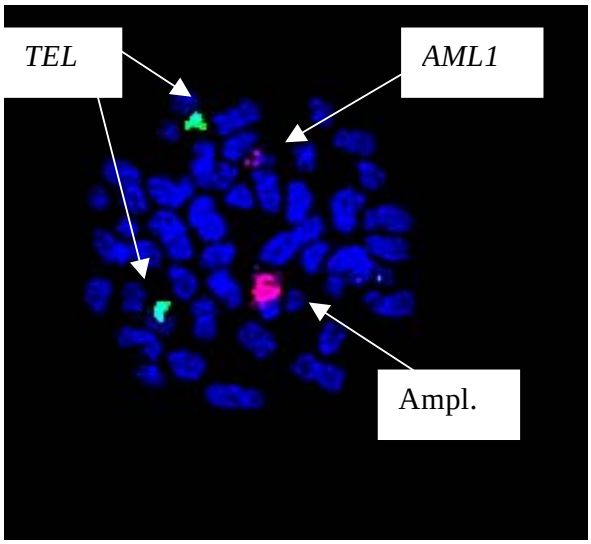


Abbildung 24b: Eine Metaphase ebenfalls von Patient 203. Die Pfeile kennzeichnen die beiden *TEL*-Signale, ein normales *AML1*-Signal und eine auf einem Chromosom liegende Signalverstärkung des *AML1*-Gens, welche der Amplifikation entspricht.

Patient 204

Die Abbildung 25 gibt eine Interphase von Patient 204 wieder. Man erkennt 7-10 *AML1*- und zwei regelgerechte *TEL*-Signale. Eine Metaphase war auf dem Präparat nicht zu finden.

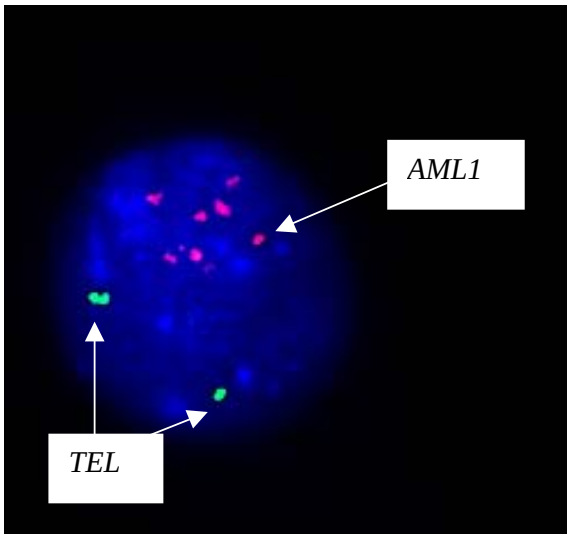


Abbildung 25: Interphase von Patient 204. Neben zwei regelgerechten *TEL*-Signalen tritt eine Amplifikation der *AML1*-Signale auf.

Patient 205

Die Abbildung 26a zeigt vier Interphasen von Patient 205. Man erkennt acht bis zehn eher disseminiert über den Kern verteilte *AML1*-Signale und zwei regelgerechte *TEL*-Signale. Der mit Pfeil N markierte Kern zeigt ein normales Verteilungsmuster.

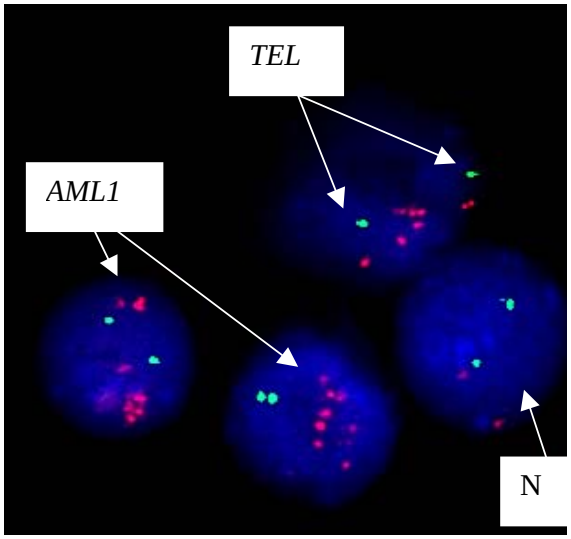


Abbildung 26a: Vier Interphasen von Patient 205. Davon zeigen drei Kerne eine *AML1*-Amplifikation. Die Pfeile markieren die *TEL*- sowie die *AML1*-Signale in den aberranten Zellkernen, bzw. einen Kern mit normaler Signalkonstellation (N).

Abbildung 26b zeigt eine Inter- und eine Metaphase von Patient 205. In der Metaphase erscheint eines der *AML1*-Signale leicht vergrößert gegenüber dem Regelgerechten. Die *TEL*-Signale sind regelgerecht.

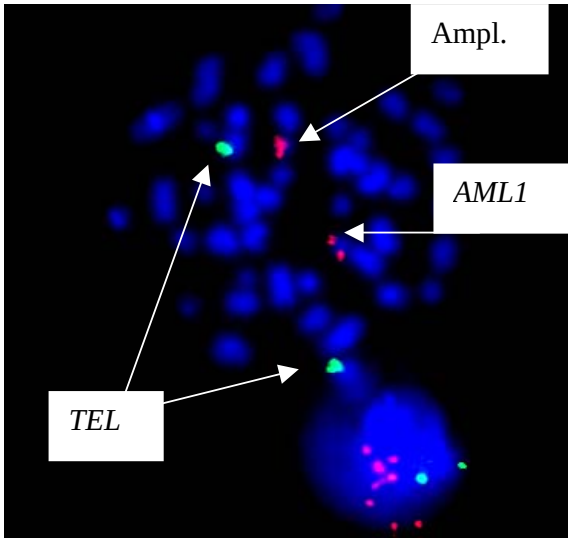


Abbildung 26b: Eine Metaphase und eine Interphase von Patient 205. Es sind zwei *TEL*-Signale, ein normales *AML1*-Signal und eine Amplifikation des *AML1*-Signals zu sehen.

Patient 206

Die Abbildung 27a zeigt eine Metaphase von Patient 206. Man sieht die *AML1*-Amplifikation, das regelrechte *AML1*-Signal und die *TEL*-Signale. Die Signalverteilung der Interphasen ist aufgrund der in dieser Darstellung gewählten Bearbeitung nicht gut zu erkennen. Die Interphase des selben Patienten aus Abbildung 27b zeigt normale *TEL*- und amplifizierte *AML1*-Signale.

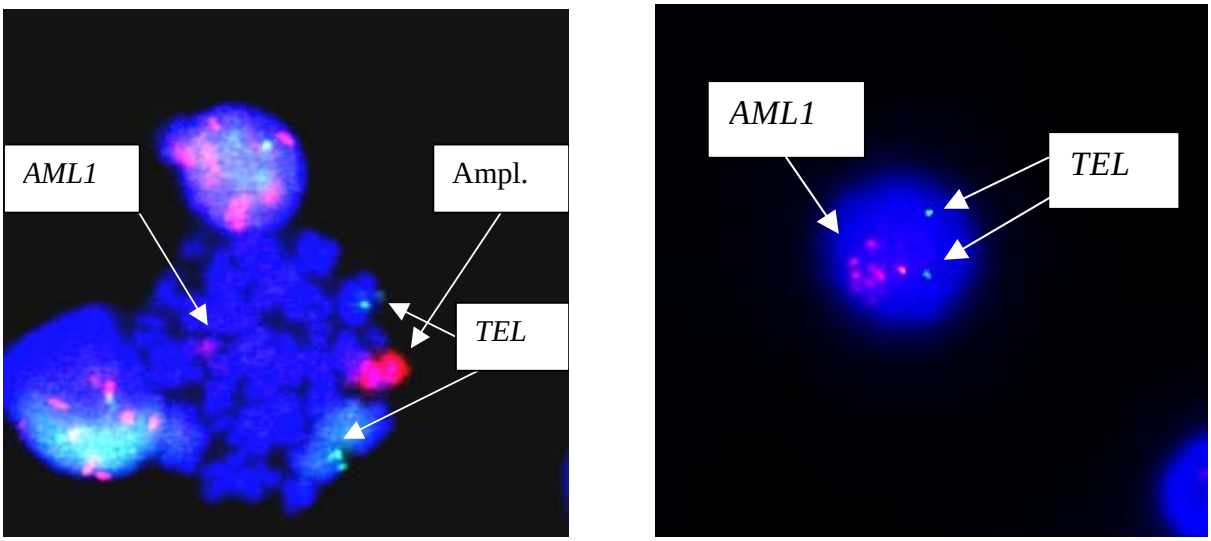


Abbildung 27a und 27b: Metaphase und Interphasen von Patient 206. Die Beschriftung der Metaphase zeigt die *TEL*-Signale, ein regelgerechtes *AML1*-Signal sowie eine *AML1*-Amplifikation mit einer Signalvermehrung auf nur einem Chromosom. In der Interphase erkennt man regelgerechte *TEL*- und amplifizierte *AML1*-Signale.

Vergleicht man die Interphasekerne der einzelnen Patienten mit Amplifikation, so fällt auf, dass die Anzahl der *AML1*-Signale in etwa gleich ist und bei >7-10 liegt. In den meisten Fällen bilden die Signale mehr oder weniger klar umgrenzte Regionen (Abb.20-23). Im Gegensatz dazu sind sie jedoch bei den Patienten 205 und 206 über den Kern verteilt (Abb.24-27). Der Vergleich der Metaphasen macht deutlich, dass in allen Fällen das Signal der Amplifikation auf ein Chromosom beschränkt ist. Allerdings variiert die Größe des Signals von Patient zu Patient beträchtlich. In allen Fällen sind die normalen *TEL*-und *AML1*-Signale klar zu erkennen.

3.3 Überblick über Gewinne und Verluste von *TEL* und *AML1*

Insgesamt konnten bei 70 (35%) Patienten durch dieses Screening numerische Signalveränderungen von *AML1* und/oder *TEL* detektiert werden. Von diesen 70

Patienten hatten 53 (26,5%) ausschließlich *AML1*-Veränderungen, wobei 48 (24%) Patienten Zugewinne und 5 (2,5%) Patienten Verluste aufwiesen. 5 (2,5%) Patienten hatten lediglich *TEL*-Veränderungen, die ausschließlich aus Verlusten bestanden. 12 (6%) Patienten zeigten sowohl *TEL*-, als auch *AML1*-Veränderungen, wobei 6 (3%) Patienten einen *AML1*-Zugewinn bei gleichzeitigem *TEL*-Zugewinn und 6 (3%) Patienten einen *AML1*-Zugewinn bei gleichzeitigem *TEL*-Verlust aufwiesen. *AML1* war also bei 65 (32,5%) und *TEL* bei 17 (8,5%) Patienten verändert.

	+ *TEL*	- *TEL*	*TEL* unverändert
+ *AML1*	4 (Gruppe 3) 2 (Gruppe 5a)	1 (Gruppe 2) 2 (Gruppe 3) 3 (Gruppe 5b)	12 (Gruppe 2) 15 (Gruppe 3) 1 (Gruppe 4) 16 (Gruppe 5d) 3 (Gruppe 7) 1 (Gruppe 5c)*
- *AML1*	-		5 (Gruppe 1)
AML1 unverändert		5 (Gruppe 6)	-

Tabelle 14: Aberrationen der in den Gruppen aufgeführten Patienten aufgeschlüsselt nach *TEL*-, *AML1*- und gemischten Veränderungen.

* der Patient aus Gruppe 5c war nur hinsichtlich der *AML1*-Veränderung klar zuzuordnen, im Bezug auf die *TEL*-Veränderung war bei einem Nebeneinander von *TEL*-Verlust und Zugewinn keine eindeutige Zuordnung vorzunehmen, so dass er nur bei den *AML1*-Veränderungen aufgeführt wird.

3.4 Klinische Parameter

Die Tabelle 15 gibt einen Überblick über die klinischen Parameter der Patienten mit einem amplifizierten *AML1*-Gen. Die untersuchten Parameter sind in der ersten Spalte aufgeführt und für jeden dieser Patienten angegeben.

Die Leukozytenzahl bei Diagnose liegt zwischen 700 und 35600 pro µl. Der Median beträgt 9575. Der Anteil der Blasten liegt zwischen 3 und 83 % mit einem Median von 47 %.

Bezüglich der Immunhistochemie kommen nur c-ALL und prä-B-ALL in einem Verhältnis von 1,7:1 vor.

Es sind beide Geschlechter in einem Verhältnis Jungen zu Mädchen von 1,7:1 betroffen. Das Alter bei Diagnose reicht von 5,6 Jahren bis 10,8 Jahren. Der Altersmedian liegt bei 7,9 Jahren.

Nach der Einteilung in Risikogruppen wurden 3 Patienten in die Standardrisikogruppe und 5 Patienten in die Gruppe mit mittlerem Risiko eingeordnet (1: 1,7).

Alle Patienten, bei denen Daten vorliegen, sprachen auf die initiale Gabe von Prednison gut an. Eine erste Vollremission wurde von allen Patienten erreicht.

Von den 8 Patienten wurden im Verlauf der Therapie 5 Patienten stammzelltransplantiert.

Fünf Patienten haben ein Rezidiv erlitten, wobei das Alter bei Rezidiveintritt zwischen 7,9 und 11,8 mit einem Median von 10,1 Jahren liegt. Die Zeitspanne zwischen Erstdiagnose und Auftreten des Rezidivs reicht von 1,0 bis zu 2,6 Jahren. Der Median beträgt 2,3 Jahre.

Von den 8 Patienten sind bis zum jetzigen Zeitpunkt 4 Patienten verstorben. Ihr Alter liegt zwischen 11,2 und 13,7 Jahren, die Zeitspanne zwischen Diagnose und Tod zwischen 2,7 und 4,6 Jahren.

Patient	15	103	200	202	203	204	205	206	Median
BFM-Studie	BFM-95	BFM-2000	BFM-2000	BFM-86	BFM-90	BFM-95	BFM-2000	BFM-2000	
Leukozytenzahl	25700	25800	4200	1700	35600	700	7400	11750	**9575**
periphere Blasten (%)	58	76	5	33	83	3	68	36	**47**
Immunphänotyp	c-ALL	c-ALL	prä-B-ALL	c-ALL	c-ALL	prä-B-ALL	prä-B-ALL	c-ALL	
Risikogruppe	MR	SR	MR	SR	MR	SR	MR	MR	
Prednisonresponse	Gut	Gut	Gut	Gut	Keine Angabe	Gut	Keine Angabe	Gut	
Vollremission erreicht	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	
Geschlecht	M	M	W	M	W	W	M	M	
Alter bei Diagnose	7,2	6,3	7,1	10,8	10,4	5,6	9,0	8,5	**7,9**
Alter bei 1.Rezidiv	9,8			11,8		7,9	11,3	10,1	**10,1**
Intervall Diag.-Rez.	2,6			1,0		2,3	2,3	1,6	**2,3**
Todesalter	11,2			13,7			13,6	11,2	**12,4**
Intervall Diag.-Tod	4,0			2,9			4,6	2,7	**3,5**
Stammzelltransplant.	Ja	Nein	Nein	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	

Tabelle 15: Überblick über die klinischen Parameter der Patienten mit einem amplifizierten *AML1*-Gen.

3.5 Zytogenetische Befunde

Im Folgenden wird allen in der FISH gefundenen Gruppen, falls vorhanden, exemplarisch der Karyotyp eines Patienten den FISH-Befunden tabellarisch gegenübergestellt. Bei der Gruppe der Kinder mit einer *AML1*-Amplifikation wird zusätzlich für jeden Patienten, soweit vorhanden, ein Karyogramm gezeigt. Die Karyotypen wurden im Rahmen der Routinediagnostik im Onkogenetischen Labor erstellt.

	Nr.	Karyotyp
Gruppe 1 1 *AML1*; 2 *TEL*	161	46,XX,add(1)(p?36),del(6)(q?23),del(7)(q22),-9,?add(9)(q), -13,del(21)(q22),+mar1~2,inc
Gruppe 2 3 *AML1*; 1*TEL*	137	50,XX,-5,+6,+9,+10,der(12)t(12;?13)(p12;q12),-13,+21,+mar, inc[6]/46,XX[2]
Gruppe 2 3 *AML1*; 2 *TEL*	166	52~54,XX,+?X,+4,+6,+10,+13,+17,+?18,+21[cp8]
Gruppe 3 4 *AML1*; 2 *TEL*	154	55-58,XY,+X,dup(1)(q25;q42),+4,+6,+7,+?10,+?12,+13,+?14, +15,+17,+18,+21,+21c,+mar
Gruppe 4 5 *AML1*; 2 *TEL*	84	50~54,XX,+?X,+6,?-8,+?10,+14,+?der(16),+17,+18,+21,+21, ?der(22),+mar[cp8]
Gruppe 6 2 *AML1*; 1*TEL*	16	46,XX,del(12)(p13),inc
Amplifikation (Gruppe 7 und Patienten 202-206)	103	47,XY,+X,del(20)(q11),-21,+mar
	202	49,XY,+X,dup(1)(q23q32),+i(7p?),der(11p),- 21,+2mar
	203	46,XX,del(7)(q?22),del(9)(q22),del(12)(p12),-21,+mar
	204	47,XX,+X,?der(3),t(7;15)(p15;q13),del(9)(p?22), add(10)(q?26),-21,+mar[cp5]/ 46,XX[2]
	205	45~46,XY,-6,-7,-9,16qh+,-18,-21,+mar1~4,inc[cp3]/46,XY, 16qh+[10]

Tabelle 16: Gegenüberstellung von FISH-Ergebnissen und zytogenetischen Befunden von jeweils einem Vertreter der Gruppen 1-6, sowie allen Patienten mit *AML1*-Amplifikation, bei denen ein Karyotyp ermittelt werden konnte. Es liegt eine weitgehende Übereinstimmung der Befunde vor.

Abbildung 28 zeigt das Karyogramm von Patient 103. Der Karyotyp ist 47,XY,+X,del(20)(q11),-21,+mar. Der Pfeil markiert ein Markerchromosom, das von seiner Größe dem derivaten Chromosom 21 entsprechen könnte (vergl. Abb.21b) und damit Sitz der *AML1*-Amplifikation wäre.

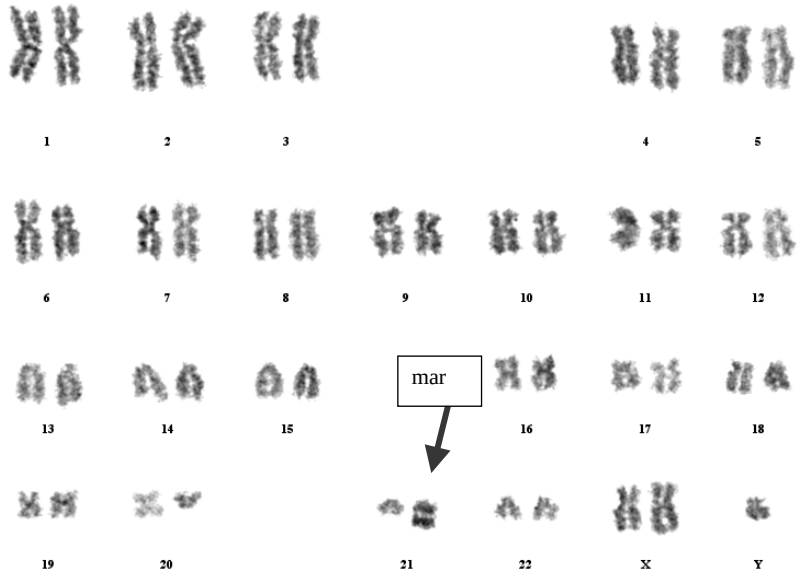


Abbildung 28:
Karyogramm von Patient 103 mit dem Karyotyp 47,XY,+X,del(20)(q11), -21,+mar. Der Pfeil markiert das Markerchromosom

In der Abbildung 29 sieht man das Karyogramm von Patient 202. Der Karyotyp lautet 49,XY,+X,dup(1)(q23q32),+i(7p?),der(11p),-21,+2mar. Man erkennt zwei metazentrische Markerchromosomen (Pfeil), von denen eines ein deutlich vergrößertes Chromosom 21 mit einer Amplifikation von *AML1* sein könnte.

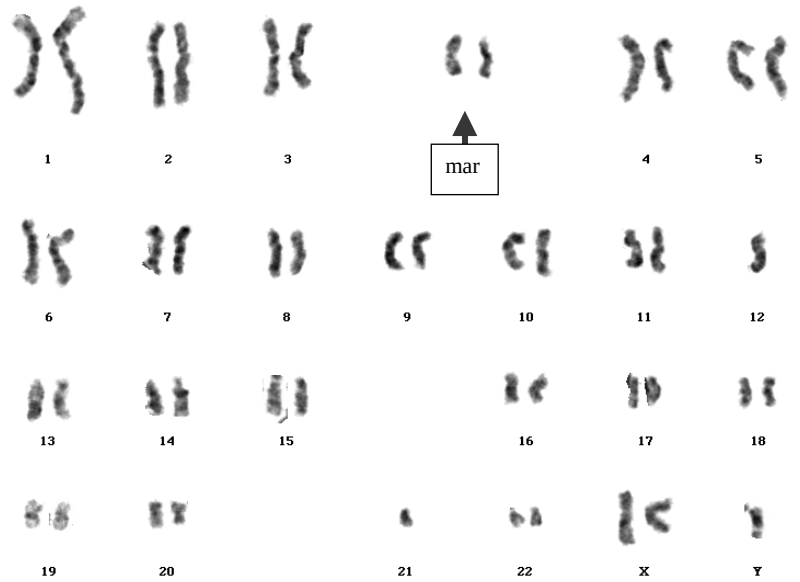


Abbildung 29:
Karyogramm von Patient 202. Der Karyotyp ist 49,XY,+X,dup(1)(q23q32), +i(7p?),der(11p), - 21,+2mar. Der Pfeil zeigt die beiden Markerchromosomen.

Die Abbildung 30 zeigt das Karyogramm von Patient 203. Der Karyotyp ist als 46,XX,del(7)(q?22),del(9)(q22),del(12)(p12),-21,+mar beschrieben. Neben den anderen im Karyotyp beschriebenen Aberrationen ist ein Markerchromosomen (Pfeil) vorhanden.

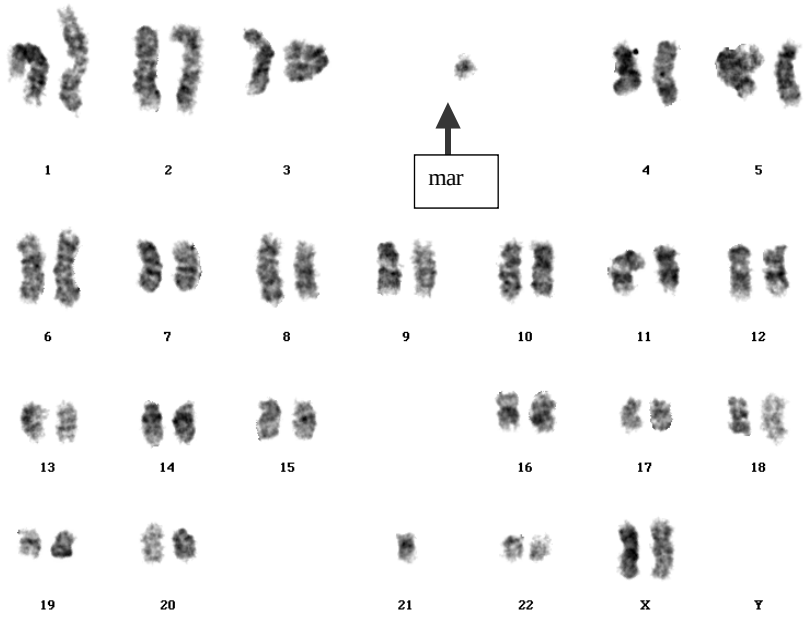


Abbildung 30:
Karyogramm von Patient 203. Der Karyotyp ist 46,XX,del(7)(q?22), del(9)(q22),del(12)(p12), -21,+mar.
Der Pfeil bezeichnet das Markerchromosom.

In Abbildung 31 sieht man das Karyogramm von Patient 204. Der Karyotyp ist 47,XX,+X,?der(3),t(7;15)(p15;q13),del(9)(p?22),add(10)(q?26),-21,+mar[cp5]/ 46,XX. Neben den anderen im Karyotyp beschriebenen Aberrationen sieht man ein Markerchromosom (Pfeil).

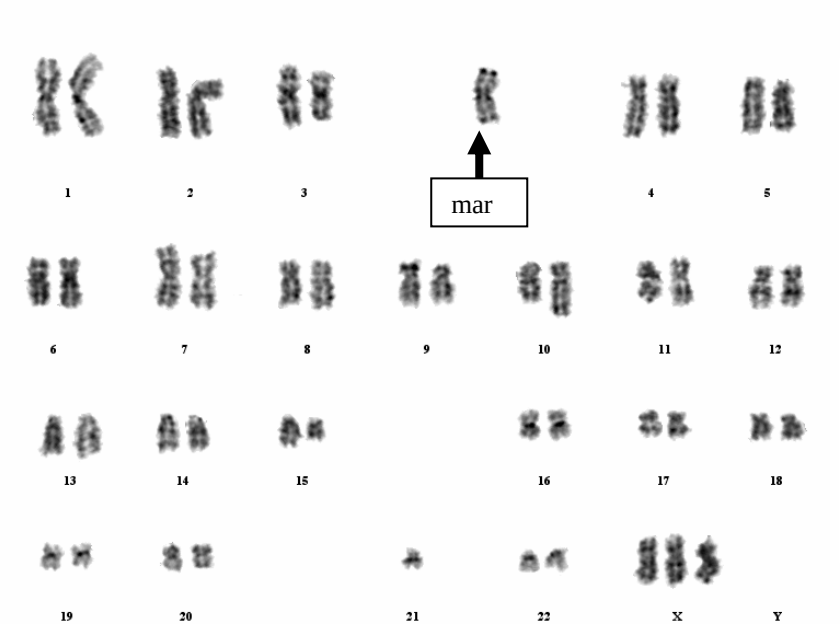


Abbildung 31:
Karyogramm von Patient 204. Der Karyotyp ist 47,XX,+X,?der(3),t(7;15) (p15;q13),del(9)(p?22), add(10)(q?26), -21,+mar[cp5]/ 46,XX[2].
Der Pfeil markiert das Markerchromosom.

Die Abbildung 32 zeigt das Karyogramm von Patient 205. Der Karyotyp wird als 45~46,XY,-6,-7,-9,16qh+,-18,-21,+mar1~4,inc[cp3]/46,XY,16qh+[10] beschrieben. Man erkennt neben anderen den im Karyotyp beschriebenen Aberrationen vier Markerchromosomen (Pfeil).

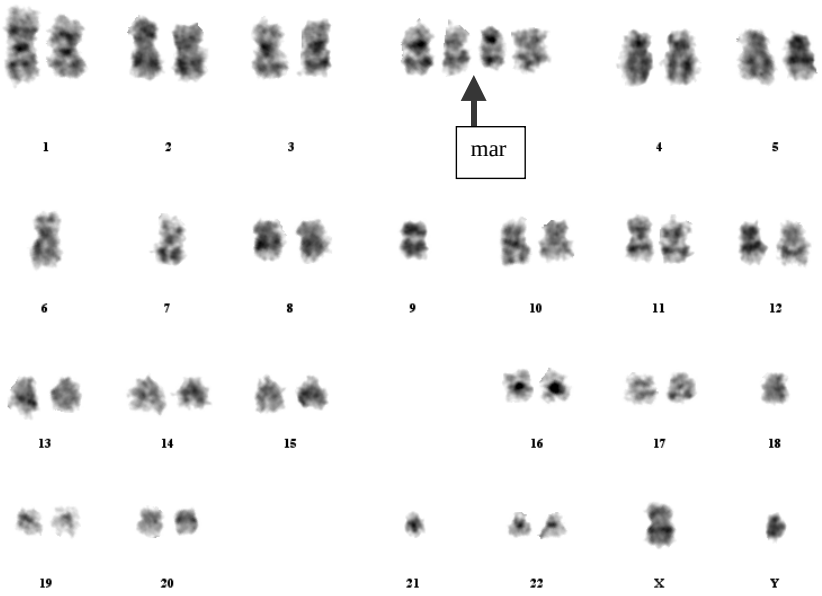


Abbildung 32:
Karyogramm von Patient 205. Der Karyotyp ist 45~46,XY,-6,-7,-9,16qh+, -18,-21,+mar1~4, inc[cp3]/46,XY,16qh+[10]. Der Pfeil markiert die Markerchromosomen.

Der Vergleich der FISH-Analyse mit der klassischen Zytogenetik zeigt eine weitgehende Übereinstimmung. So wird deutlich, dass der Verlust des *AML1*-Signals bei Patient 161 (Gruppe 1) durch eine Deletion im langen Arm von Chromosom 21 [del(21)(q22)] verursacht wird.

Die zusätzlichen Signale bei den Patienten der Gruppen 2-5 kommen durch hyperdiploide Karyotypen mit einer entsprechenden Anzahl zusätzlicher Chromosomen 21 zustande. Dies ist eine Bestätigung für die FISH-Analysen an den Metaphasechromosomen. Allerdings werden bei Patient 84 (Gruppe 4) nur zwei zusätzliche Chromosomen 21 detektiert. Möglicherweise handelt es sich bei dem fraglich veränderten Chromosom 22 [?der(22)] oder dem Markerchromosom um das gesamte oder Teile des dritten Chromosom 21.

Auch die Verluste des *TEL*-Signals sind durch eine unbalancierte Translokation t(12;?13) (Patient 137) bzw. eine Deletion des kurzen Arms von Chromosom 12 [del(12)(p13)] (Patient 16) zu erklären. Allerdings ist auch für den Patienten 203 eine del(12)(12) beschrieben, jedoch traten hier zwei *TEL*-Signale auf.

Die Karyogramme der Patienten 103 und 202-204 (Abb. 28-32) machen deutlich, dass sowohl die Form als auch die Größe der Markerchromosomen, die die Amplifikation tragen, unterschiedlich sein kann. Sie sind nicht einheitlich konfiguriert und kommen als metazentrische, akrozentrische und submetazentrische Chromosomen vor.

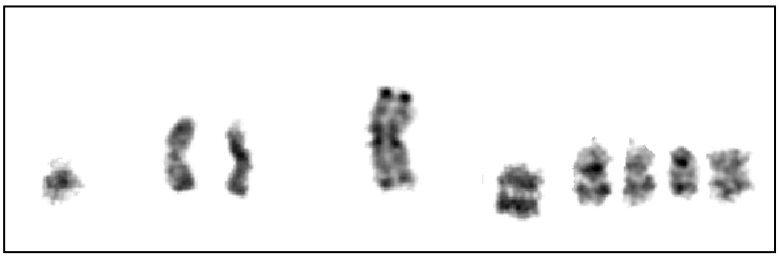


Abbildung 33: Markerchromosomen der Karyogramme von Patienten mit *AML1*-Amplifikation. Es kommen Metazentrische, Akrozentrische und Submetazentrische vor.

4 Diskussion

Nachdem 1956 die tatsächliche Chromosomenzahl des menschlichen Genoms ermittelt worden war (Tjio and Levan, 1956), wurde im Rahmen der darauf aufbauenden Zytogenetik mit der systematischen Untersuchung neoplastischer Zellen begonnen. Als im weiteren verschiedene Bänderungstechniken eingeführt wurden, konnten im zunehmenden Maße neben numerischen auch strukturelle Chromosomenveränderungen nachgewiesen werden (Caspersson et al., 1970). So wurde unter anderem für das von Nowell und Hungerford im Rahmen der CML beschriebene sogenannte Philadelphiachromosom (Nowell and Hungerford, 1960) von Janet Rowley das entsprechende zytogenetische Korrelat, die Translokation t(9;22)(q34;q11), entdeckt (Rowley, 1973). Mit der Weiterentwicklung von molekulargenetischen Techniken konnten Veränderungen auf immer kleinerer Ebene und letztlich in den Genen selbst nachgewiesen werden. Zu diesen Techniken zählt unter anderem die auf den Arbeiten von Gall und Pardue zurückgehende FISH Technik (Gall and Pardue, 1969).

Mittlerweile ist es möglich in 70-80 % der Fälle der akuten lymphoblastischen Leukämien bei Kindern mit Hilfe der zur Verfügung stehenden Untersuchungsmethoden eine genetische Veränderung nachzuweisen. Möglicherweise liegen auch in allen Leukämiezellen solche Veränderungen vor, die aber mit den heutigen Methoden noch nicht erkennbar sind (Schrappe et al., 2005). So ist die häufigste Veränderung bei Leukämien im Kindesalter, die Translokation t(12;21)(p13;q22), erst 1994 beschrieben worden (Romana et al., 1994). Bei den meisten heute nachweisbaren Aberrationen handelt es sich um balancierte Veränderungen, was bedeutet, dass hierbei weder genetisches Material hinzugewonnen noch verloren wird (Passarge, 1994). Dabei spielen Translokationen die größte Rolle (siehe auch Abbildung 5 in der Einleitung).

Darüber hinaus ist eine weitere wichtige große Gruppe die der numerischen Anomalien mit hoch hyperdiploiden Chromosomensätzen mit mehr als 50 Chromosomen. Dabei sind häufig Trisomien einzelner Chromosomen sowie Tetrasomien des Chromosom 21 die zugrundeliegende Ursache (Ritterbach et al., 1998). Bei der genaueren Analyse der involvierten Chromosomen zeigte sich, dass insbesondere die Chromosomen 4, 6, 10, 14, 17, 18, 21 und X bevorzugt betroffen zu sein scheinen (Harbott, 1993; Schrappe et al., 2005), (Ritterbach et al., 1998). Dass

Zugewinne von Chromosomen mit einem gesteigerten Leukämierisiko einhergehen können, war schon durch klinische Beobachtungen von Patienten mit Trisomie 21 beschrieben worden. Daher lag die Vermutung nahe, dass insbesondere diesem Chromosom und den darauf liegenden Genen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Leukämien zuzuschreiben sei (Rowley, 1981).

Ein wichtiger Schritt zum Verständnis der Veränderungen bei Leukämien auf genetischer Ebene und insbesondere der Rolle von Genen auf Chromosom 21 war die Entdeckung des *AML1*-Gens in der Bande 21q22, welches 1991 beschrieben wurde (Miyoshi et al., 1991). Es wird von vielen hämatopoetischen Zellreihen exprimiert, ist in die Differenzierung und Ausreifung der Zelllinien involviert und scheint dadurch als Onkogen eine wichtige Rolle im Entstehungsprozess von Leukämien zu spielen (Lo Coco et al., 1997). Es ist unter anderem bei der bei Kindern häufigen Translokation t(12;21)(p13;q22) einer der Fusionspartner (Romana et al., 1995), daneben konnten inzwischen weitere 32 Fusionspartner für dieses Gen identifiziert werden (Huret JL, Senon S, 2003).

Neben diesen Translokationen, und somit balancierten Veränderungen, wurde im Jahr 2000 erstmals eine Amplifikation des *AML1*-Gens bei einem Kind mit der Diagnose einer ALL beschrieben (Niini et al., 2000). Im Weiteren wurden auch Amplifikationen dieses Gens im Zusammenhang mit AML (Streubel et al., 2001), MDS (Kakazu et al., 1999; Roumier et al., 2003) und ALL bei Erwachsenen (Jabber Al-Obaidi et al., 2002) gefunden.

Amplifikationen verschiedener Gene waren bis dahin vor allem bei soliden Tumoren beschrieben und dort als eine häufige Veränderung bei Tumorzellen identifiziert worden. Dabei zeigte es sich, dass vor allem Gene, die als sogenannte Onkogene in der Zellproliferation und Replikation eine Rolle spielen, betroffen waren. So ist beispielsweise bei Neuroblastomen, kleinzelligem Lungenkrebs, Gliomen und anderen neuroektodermalen Tumoren häufig eine Amplifikation von *MYCN* anzutreffen (Schwab, 1999), bei Prostatakarzinom häufig von *C-MYC* (Miyoshi et al., 2000) und bei Leber und Uteruskarzinomen von *C-ERB2* (Ohta et al., 2001; Santin et al., 2005).

4.1 Probleme der Technik und Interpretation

Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Technik der Fluoreszenz in situ Hybridisierung beruht auf den grundlegenden Arbeiten von Gall und Pardue (Gall and Pardue, 1969) und gehört in ihren Weiterentwicklungen (Manning et al., 1975) zu den etablierten Verfahren der molekularzytogenetischen Diagnostik. Zu den wichtigsten Entwicklungen zählt dabei der Ersatz der ursprünglich angewandten radioaktiven Markierung durch fluoreszierende Nachweismethoden, sowie das zunehmende Angebot von direkt markierten Sonden. Dadurch wurde eine deutlich einfachere Handhabung der Untersuchung und eine kürzere Bearbeitungszeit erreicht. Die eingesetzte LSI *TEL*/*AML1* ES Dual Color Translocation Probe (Abbott, Wiesbaden) gehört zu den routinemäßig verwendeten Hybridisierungssonden und wurde zur Detektion der Translokation t(12;21)(p13;q22) entwickelt. Da diese Sonde seit vielen Jahren routinemäßig in der Diagnostik bei Untersuchungen zu *TEL/AML1*-Rearrangements im Rahmen der BFM-Studie eingesetzt wird und auch bereits erfolgreich bei anderen Arbeiten zum Nachweis von *AML1*-Amplifikationen zum Einsatz kam (Dal Cin et al., 2001; Harewood et al., 2003; Soulier et al., 2003; Andersen et al., 2005), lag es nahe, sie auch für die Fragestellung dieser Arbeit zu nutzen.

Die im Rahmen der zytogenetischen Diagnostik ermittelten Karyogramme entsprechen der internationalen Nomenklatur (ISCN, 2005) und wurden von Mitarbeitern des Onkogenetischen Labors der Kinderklinik der Justus Liebig Universität Gießen erstellt.

Probleme, die bei diesen Untersuchungen auftraten, waren die schlechte Ausbeute an qualitativ ausreichenden Metaphasen. So konnte nicht für alle Patienten ein Karyotyp erstellt werden. Diese Tatsache ist bei der zytogenetischen Bearbeitung von Blut und Knochenmark ein bekanntes Problem in der Diagnostik der ALL (Gibbons et al., 1992).

Was die Auswahl der Patienten, bei denen eine Karyotypbestimmung durchgeführt wurde, angeht, wurde aus den Gruppen 1-6 immer nur ein Patient ausgewählt. Sicherlich ist es möglich, dass hierbei innerhalb der Gruppen bestehende Variationen in der Charakteristik der beobachteten Veränderungen unentdeckt bleiben können, allerdings war es nicht das Ziel dieser Arbeit, eine detaillierte zytogenetische Untersuchung aller Patienten durchzuführen. Das Hauptinteresse lag auf den

Charakteristika der Patienten mit *AML1*-Amplifikation. Aus diesem Grunde wurde in der Gruppe 7 (Amplifikation) im Gegensatz zu den anderen Gruppen versucht, möglichst die Karyotypen aller Patienten zu erstellen und die entsprechenden Karyogramme zu zeigen, um sie in die Untersuchung aufzunehmen.

Da aufgrund der kleinen Patientenzahl statistisch eindeutige Aussagen nicht möglich sind, habe ich insbesondere bei der Interpretation klinischer Ergebnisse versucht, mich auf meiner Meinung nach eindeutige Tendenzen zu beschränken und wenn möglich auch Ergebnisse anderer Forschungsgruppen darzustellen. Dies gilt vor allem auch, weil Patienten 15, 202, 203 und 204 aufgrund des Datums ihres Erkrankungsbeginns nicht nach Therapieschema ALL-BFM 2000 behandelt wurden und daher auch behandlungsbedingte Unterschiede nicht auszuschließen sind.

4.2 Interpretation der FISH-Ergebnisse

Von den 201 Patienten des Jahres 2000, die den Einschlusskriterien unter Punkt 2.1 entsprachen, wiesen 70 Patienten (35 %) Veränderungen der Chromosomen 12 und bzw. oder 21 auf, die zu einer anomalen Signalkonstellation führten.
Davon ist *AML1* mit 32,5 % der Fälle fast viermal so häufig von Veränderungen betroffen wie *TEL* mit 8,5 %, wobei 30 % aus einem *AML1*-Zugewinn und 2,5 % aus einem *AML1*-Verlust herrühren. Dieses Ergebnis kann als Bestätigung der bereits bekannten Tatsache, dass numerische und strukturelle Aberrationen von Chromosom 21 häufig anzutreffende Veränderungen bei Kindern mit ALL sind, angesehen werden (Berger R., 1997).
Im Gegensatz dazu ist *TEL* nur in 8,5 % der Fälle von einer Veränderung betroffen und davon sind 3 % *TEL*-Zugewinne und 5,5 % *TEL*-Verluste. Verglichen mit den Angaben zu *TEL*-Deletionen bei ALL im Bezug auf die t(12;21) unterscheidet sich die Häufigkeit der *TEL*-Verluste deutlich von dieser Gruppe, bei der in mehr als 50 % der Fälle begleitend eine Deletion eines *TEL*-Signals auftritt (Golub et al., 1996; Attarbaschi et al., 2004). Dies kann als Bestätigung dafür angesehen werden, dass *TEL*-Verluste eine spezifische Veränderung bei t(12;21) sind.
Die im Rahmen dieser Arbeit gesuchte Veränderung einer *AML1*-Amplifikation (Gruppe 7) kam in 1,5 % der Fälle vor. Sie ist damit eine eher selten anzutreffende Anomalie und liegt in der Größenordnung von Aberrationen wie Hypodiploidie und

MYC-Rearrangements (Sallan et al., 1997; Pui and Evans, 1998). Ein Prozentsatz in dieser Größenordnung wurde auch von kürzlich publizierten Ergebnissen einer englischen Arbeitsgruppe bestätigt, die bei einer größeren Patientengruppe von 1,5 % Inzidenz spricht (Harewood et al., 2003).
Von einer spanischen Arbeitsgruppe angegebene höhere Prozentzahlen um 9,5 % Inzidenz lassen sich mit diesen Ergebnissen nicht belegen (Martinez-Ramirez et al., 2001). Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied ist eine andere Verteilung aufgrund einer anderen ethnischen Zusammensetzung. Solche ethnischen Einflüsse wurden schon für verschiedene Rearrangements und auch das generelle Risiko einer Erkrankung an ALL in unterschiedlichen Populationen gezeigt (Schrappe et al., 2005). In amerikanischen Untersuchungen in Florida zum Auftreten von ALL und ethnischer Abstammung konnte ein deutlich geringeres Risiko für Kinder von farbigen Eltern nachgewiesen werden (Wilkinson et al., 2001). Auch Untersuchungen aus Südafrika zeigen dieses Ergebnis, wobei berücksichtigt werden muss, dass dort aufgrund schlechterer medizinischer Versorgung der farbigen Bevölkerung die Diagnoserate bei farbigen Kindern zusätzlich erniedrigt wird (Hesseling et al., 2004). Betrachtet man die spezifischen Rearrangements in ethnische Gruppen, so scheint in Skandinavien die Hyperdiploidie mit ca. 63 % (davon 46% hoch hyperdiploid) eine größere Rolle als zum Beispiel im deutschsprachigen Raum zu spielen. Dafür treten spezifische Veränderungen, wie die t(4:11) mit ca. 2 %, t(11;19) mit ca. 1,4 % und t(1;19) mit ca.1,3 %, dort etwas mehr in den Hintergrund (Forestier et al., 2000). Weiterhin konnte für japanische Kinder ein niedrigeres Auftreten einer t(12;21) nachgewiesen werden, wobei die Häufigkeit um 10 % liegt (Eguchi-Ishimae et al., 1998), was als eine weitere Bestätigung von ethnischen Einflüssen gewertet werden kann.
Eine andere Erklärung ist, dass es sich aufgrund der kleinen Stichprobe von 42 untersuchten Patienten um eine statistische Verzerrung handelt. Außerdem ist nicht ersichtlich, ob bei der Auswahl der Patienten eine Selektion durchgeführt wurde, die zu einem erhöhten Nachweis dieser Veränderung geführt haben könnte.

Was den Anteil aberranter Kerne in den FISH-Analysen betrifft, zeigt sich, dass der aberrante Zellklon in einem sehr hohen Prozentsatz nachzuweisen war, was dafür spricht, dass die normale Zellpopulation fast vollständig aus dem Knochenmark verdrängt zu sein scheint. Die Klongröße macht zwischen 91,5 % und 97,5 % aller Zellen aus.

Dagegen ist eine exakte Aussage über die Kopienzahl der *AML1*-Signale in den einzelnen Kernen nur schwer zu treffen, da die Signale oft sehr eng beieinander liegen und daher nicht genau ausgezählt werden konnten. Sie lagen aber bei allen Patienten über 7 Kopien. Diese Größenordnung wurde auch schon von anderen Arbeitsgruppen angegeben (Nordgren et al., 2002). Allerdings liegt sie im Vergleich mit Amplifikationsraten von 5 - 700 Kopien bei einigen soliden Tumoren deutlich in einem unteren Bereich (Schwab and Amler, 1990; Nilsson et al., 2004).
Die Morphologie der Signale war entweder ein kompaktes Cluster oder eine disseminierte Ansammlung. Diese Anordnung scheint aber mehr an dem jeweiligen Kondensationsgrad der DNA im Kern zu liegen, als ein besonderes Merkmal eines Patienten zu sein, da beide Formen nebeneinander im gleichen Untersuchungsmaterial desselben Patienten vorkamen.
Weiterhin kann aufgrund dieser Arbeit eine Schlussfolgerung bezüglich dem gleichzeitigen Auftreten von Translokation t(12;21) und *AML1*-Amplifikation getroffen werden. Bei allen Kindern mit ALL wird im Onkogenetischen Labor routinemäßig ein PCR-Screening unter anderem auf ein *TEL/AML1*-Rearrangement t(12;21) hin durchgeführt. Alle positiven Ergebnisse werden in einem zweiten Schritt mittels FISH bestätigt. Dabei ist bisher in keinem Fall neben einer Translokation t(12;21) eine Amplifikation von *AML1* aufgefallen. Offensichtlich liegen beide Aberrationen nicht gleichzeitig vor.

4.3 Interpretation der zytogenetischen Befunde

Beim Vergleich mit der zytogenetischen Untersuchung wurde versucht, für die in der FISH-Diagnostik nachgewiesenen Veränderungen ein zytogenetisches Korrelat zu finden und weitere vorhandene Charakteristika der einzelnen Gruppen zu beschreiben. Allerdings wurde aufgrund der schon am Anfang beschriebenen Überlegungen und methodischen Probleme ein zytogenetischer Befund nicht für alle Patienten der einzelnen Gruppen erstellt. Bei den Ergebnissen der stellvertretend für die Gruppen 1-6 zytogenetisch untersuchten Patienten fallen jedoch folgende Punkte auf.
Die Gruppen 1 und 6, die in der FISH durch den Verlust eines Signals (Gruppe 1: -*AML1*; Gruppe 6: -*TEL*) aufgefallen waren, hatten einen pseudodiploiden Chromosomensatz mit 46 Chromosomen. Die Signalverluste lassen sich in beiden Fällen durch die vorliegenden strukturellen Veränderungen erklären, im ersten Fall

durch del(21)(q22) und im zweiten Fall durch del(12)(p13). Die zusätzlich gefundenen anderen strukturellen Chromosomenveränderungen waren mit der durchgeführten FISH-Untersuchung naturgemäß nicht nachweisbar, da sie nicht in dem mit der Sonde hybridisierten Chromosomenabschnitt lagen.

Die Gruppen 2, 3, und 4, die in der FISH durch Signalzugewinne von *AML1* aufgefallen waren, gehen zytogenetisch alle mit einem hyperdiploiden oder sogar hoch hyperdiploiden Karyotyp einher. Die Chromosomenzahl reicht von 50 bis 58 und die zusätzlich vorhandenen *AML1*- und *TEL*-Signale lassen sich in allen Fällen durch das Vorhandensein zusätzlicher Kopien von Chromosom 21 bzw. 12 oder Teilen dieser Chromosomen erklären. Eine Ausnahme stellt der Patient dar, der stellvertretend für die Gruppe 4 untersucht wurde. Bei ihm lassen sich nur zwei der drei *AML1*-Zugewinne durch zusätzliche Chromosomen 21 erklären. Es ist jedoch möglich, dass sich eines der drei zusätzlichen *AML1*-Signale auf einem Markerchromosomen befindet, welches bei diesem Patienten zu finden war.

Aus diesen Ergebnissen der Untersuchung kann gefolgert werden, dass Gendeletionen eher durch intrachromosomale Veränderungen verursacht sind und nicht auf numerischen Anomalien zu beruhen scheinen, während Signalzugewinne eher mit numerischen Veränderung einher zu gehen scheinen und nicht das Ergebnis einer strukturellen Veränderung sind.

Eine Besonderheit stellt der Patient 137 aus der Gruppe 2 dar, da bei ihm in der FISH-Untersuchung sowohl ein Zugewinn von *AML1* als auch ein Verlust von *TEL* nachzuweisen war. Er ist sozusagen ein Mischbild der zuvor beschriebenen Veränderungen, und es müssten daher bei ihm Charakeristika beider Gruppen anzutreffen sein. Tatsächlich lässt sich der *AML1*-Zugewinn durch ein zusätzliches Chromosom 21 und den hyperdiploiden Chromosomensatz erklären und der *TEL*-Verlust beruht auf der strukturellen Veränderung der(12)t(12;?13)(p12;q12). Dies entspricht den gefundenen Charakteristika der anderen Gruppen, in denen für Verluste strukturelle Veränderungen und für Zugewinne numerische Aberrationen verantwortlich gemacht werden konnten. Dass hier beide Charakteristika nebeneinander in einem Karyotyp vorliegen, kann als Bestätigung dieses Ergebnisses angesehen werden.

Im Gegensatz zu allen anderen Gruppen lässt sich allerdings Gruppe 7, also die Gruppe der *AML1*-Amplifikationen, nicht in dieses Schema einordnen. Sie zeigt mit

mehr als 7 *AML1*-Signalen pro Interphase die höchsten Werte an zusätzlichen Signalen. Allerdings lassen sich die *AML1*-Zugewinne zytogenetisch nicht durch zusätzliche Kopien von Chromosomen 21 erklären obwohl der Karyotyp hyperdiploid ist. Die Hyperdiploidie beruht hier jedoch auf zusätzlichen Kopien anderer Chromosomen. Weiterhin fallen in dieser Gruppe eine Vielzahl unterschiedlicher komplexer struktureller und numerischer Veränderungen sowie das regelmäßige Auftreten von Markerchromosomen und der Verlust eines normalen Chromosoms 21 auf. Da alle erfolgreich untersuchten Patienten solche Markerchromosomen aufweisen, lässt sich vermuten, dass sie der Sitz der Amplifikation sind. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um derivative Formen eines Chromosom 21. Diese Markerchromosomen sind nicht einheitlich konfiguriert und kommen als metazentrische, akrozentrische und submetazentrische vor.
Auch andere Arbeitsgruppen haben solche Markerchromosomen gefunden, die in den FISH-Metaphasen einer Amplifikation auf einem vergrößerten Chromosom 21 zu entsprechen scheinen und ebenfalls keine eindeutige morphologische Präferenz aufweisen (Busson-Le Coniat et al., 2001; Morel et al., 2002).
Allerdings gibt es eine englische Studiengruppe, die von einem der(21)dup(21)(q?) als spezifisches Markerchromosom bei dieser Veränderung ausgeht (Robinson et al., 2003). Dies lässt sich mit dieser Untersuchung hingegen nicht bestätigen.

Ein weiteres Ergebnis der zytogenetischen Untersuchung ist, dass sogenannte Double minutes (DMs) als Sitz einer Amplifikation nicht nachgewiesen werden konnten. Double minutes sind sphärische DNA-Körper, die neben Chromosomen in Kernen von Tumorzellen als Träger einer Amplifikation anzutreffen sind, wobei sie häufig bei soliden Tumoren vorkommen (Schwab, 1999). Auch homogeneously staining regions (HSRs), also ausgedehnte Regionen gleichfärbender DNA-Abschnitte als Ausdruck einer Genamplifikation, waren nicht anzutreffen. Dies spricht dafür, dass sich der Mechanismus der Amplifikation von dem bei soliden Tumorformen unterscheidet.

Vergleicht man Zytogenetik und FISH-Befunde miteinander, so sind die *AML1*-Signale nicht auf das Vorhandensein zusätzlicher Chromosomen 21 zurückzuführen, sondern auf eine Signalvermehrung auf veränderten Chromosomen 21, die als Markerchromosomen auffallen. Dafür spricht neben der Zytogenetik, dass sich bei allen untersuchten Patienten die amplifizierten Signale in der Metaphase als eine

Signalansammlung auf nur einem Chromosom darstellen. Diese Unterscheidung ist wichtig, da Zugewinne von Chromosomen 21 schon lange als häufiges Ereignis bekannt sind (Berger R., 1997), jedoch eher als Befund bei Hyperdiploidie und damit in einer Gruppe mit günstiger Prognose. Auch andere Arbeitsgruppen sehen diesen Unterschied als relevant an und trennen Patienten mit zusätzlichen kompletten Chromosomen 21 von solchen mit veränderten Chromosomen 21 und zählen nur die zweite Gruppe zu den Amplifikationen (Harrison et al., 2005).

4.4 Klinische Parameter

Die im Folgenden dargestellten klinischen Daten wurden von der Studienleitung in der ALL-BFM-Studie erhoben und geben ausgewählte Ergebnisse der im Rahmen der im Studienprotokoll festgelegten Untersuchungen der Patienten mit *AML1*-Amplifikation, also der Gruppe 7, wieder. Diese Befunde werden mit den Literaturdaten verglichen, um etwaige Unterschiede aufzudecken und die Charakteristika der Patienten mit dieser Veränderung hervorzuheben.

Die in dieser Gruppe aufgeführten acht Patienten scheinen bezogen auf das Diagnosealter zu einer späten Manifestation zu neigen. Der jüngste Patient war bei Diagnose 5,6 und der älteste 10,8 Jahre alt. Der Median lag bei 7,9 Jahren. Nach den Angaben des deutschen Kinderkrebsregisters liegt der Median der Manifestation einer ALL bei Kindern bei 4,8 Jahren (IMSD, 2005). Daten anderer Untersuchungsgruppen, die ebenfalls Patienten zwischen 6 und 15 Jahren gefunden haben, sprechen ebenfalls von einem späten Diagnosealter (Dal Cin et al., 2001; Busson-Le Coniat et al., 2001). Harewood gibt sogar einen Median von 9 Jahren an (Harewood et al., 2003).

Die weiteren Verlaufskontrollen der Patienten zeigen, dass 5 der 8 Patienten ein Ereignis in Form eines Rezidivs erlitten haben. Das entspricht einem ereignisfreien Überleben von 37,5 %. Es ist damit deutlich schlechter als die in der Literatur zu findende Angabe von 75-80 % für Kinder mit ALL (Pui and Evans, 1998; Schrappe et al., 2000; Schrappe, 2003).

Der Median des Rezidivalters liegt mit 10,1 Jahren erwartungsgemäß über dem durchschnittlichen Wert bei Rezidiven, da das Diagnosealter auch höher war. Das

Intervall zwischen Diagnose und Auftreten des Rezidivs zeigt einen Median von 2,3 Jahren, mit Minimal- bzw. Maximalwerten von 1,0 und 2,6 Jahren. Da Rezidive definitionsgemäß über den zeitlichen Abstand zwischen erfolgter Therapie (Therapiedauer 2 Jahre) und Auftreten des Rezidivs eingeteilt werden, handelt es sich hier um eine Tendenz zu frühen Rezidiven [sehr früh: innerhalb 18 Monaten nach Diagnosestellung; früh: innerhalb 6 Monaten nach Beendigung der Chemotherapie; spät: mehr als 6 Monate nach Beendigung der Chemotherapie (Stackelberg von et al., 2005)].
Im Verlauf verstarben 4 der 5 Patienten mit einem Rezidiv. Ihr Alter lag zwischen 11,2 und 13,7 Jahren. Bezogen auf alle Patienten dieser Gruppe, sind 4 von 8, also 50 % im Verlauf gestorben. Nach neueren Daten beträgt das Risiko an einer ALL zu versterben bei Kindern <20 % (Pui and Evans, 1998; Henze et al., 2001; Schrappe et al., 2005), so dass auch hier von einer deutlich schlechteren Prognose dieser Patientengruppe ausgegangen werden darf. Die Zeit zwischen Diagnose und Tod lag zwischen 2,7 und 4,6 Jahren.
Eine neuerlich veröffentlichte Studie aus England kam zu einem vergleichbaren Ergebnis. Hier erlitten 12 von 28 Patienten ein Rezidiv, von denen 9 verstarben (Robinson et al., 2003).

Zu der Interpretation des klinischen Verlaufs muss angemerkt werden, dass nicht alle Patienten nach dem selben Studienprotokoll therapiert wurden. So fielen lediglich die Patienten 103, 200, 205 und 206 einheitlich in das Therapieschema des Studienprokolls ALL-BFM-2000, während Patient 15 und 204 nach ALL-BFM-95, Patient 202 nach ALL-BFM-86 und Patient 203 nach ALL-BFM-90 therapiert wurden.
Fasst man nur die einheitlich nach ALL-BFM-2000 therapierten Patienten zusammen, so hat man eine Rezidivquote von 50 % (2 von 4). Von diesen Rezidivpatienten sind im Verlauf bisher alle verstorben.

Die Geschlechtsverteilung liegt mit 1,7:1 auf der Seite des männlichen Geschlechts. Die Größenordnung liegt im Bereich der für ALL typischen Geschlechtswendigkeit von 1,2:1 (IMSD, 2005). Auch Untersuchungen anderer Studiengruppen stützen dieses Ergebnis und sprechen von einem Verhältnis von 1,2:1 M/F (Harewood et al., 2003). Die *AML1*-Amplifikation scheint also kein an ein Geschlecht gebundenes Ereignis zu sein, sondern im Rahmen der schon bekannten Geschlechtsverteilung zu liegen. Ob

weibliche Patienten mit dieser Veränderung einen besseren Verlauf zeigen als männliche, kann aufgrund der Datenlage nur gemutmaßt werden, derzeit erlitt aber bisher nur eine der in dieser Studie untersuchten Patientinnen ein Rezidiv und ein Todesfall ist bisher bei den Mädchen nicht eingetreten.

Die *AML1*-Amplifikationen scheinen auf Stadien der B-Zell-Vorläufer Leukämien beschränkt zu sein, da nur c-ALL und prä-B-ALL im Verhältnis 1,7:1 vertreten waren. Dabei sind sowohl männliche als auch weibliche Patienten in diesen Gruppen zu finden, so dass nicht von einer Geschlechtsabhängigkeit auszugehen ist. Laut Angaben aus der Literatur würde die prä-B-ALL einer Gruppe mit günstiger Prognose entsprechen (Friedmann and Weinstein, 2000), ob sich das auf den weiteren Verlauf auch innerhalb dieser Gruppe positiv auswirkt, kann aufgrund der noch zu geringen Daten nicht gesagt werden, tatsächlich erlitten aber bereits zwei der Patienten mit diesem Immunphänotyp ein Rezidiv von denen einer im weiteren Verlauf verstarb.

Für die initialen Leukozyten- und Blastenzahlen im peripheren Blut lässt sich aus den Daten keine eindeutige Tendenz ersehen. Die Werte schwanken bei den Leukozyten zwischen minimal 700 und maximal 35600, bei den Blasten zwischen minimal 3 % und maximal 83 %. Aus diesen Ergebnissen lässt sich keine Einschätzung der Prognose treffen, insbesondere, da der Patient mit den niedrigsten Leukozyten- und Blasten-Werten einen schlechteren Verlauf zeigte als der Patient mit den Höchsten. Auch bezogen auf das Geschlecht der einzelnen Patienten spricht nichts für einen Zusammenhang mit dem Auftreten besonders hoher oder niedriger Werte.

Eine Einschätzung der Wertigkeit der durch das Studienprotokoll getroffenen Risikostratifizierung ist nicht eindeutig möglich, da 3 Patienten in die SR und 5 Patienten in die MR Gruppe eingeteilt wurden und somit keine Gruppe deutlich bevorzugt anzutreffen war. Allerdings ist auffällig, dass keiner der Patienten initial in die Hochrisikogruppe gefallen ist, was bei den beobachteten Verläufen so nicht zu erwarten gewesen wäre.

Allerdings muss auch hier noch mal daraufhingewiesen werden, dass nicht alle Patienten nach dem selben Therapieschema therapiert wurden, wodurch die Vergleichbarkeit eingeschränkt ist.

Das initiale Therapieansprechen auf Prednisongabe ist bei den Patienten dieser Gruppe, soweit Daten vorliegen, gut und auch erreichten alle Patienten eine erste Vollremission. Dies würde eigentlich für einen positiven Verlauf der Erkrankung sprechen, was aber durch den tatsächlichen Verlauf der Krankheit bei diesen Patienten nicht bestätigen lässt. Allerdings muss man sagen, dass bei ca. 98 % aller Patienten eine initiale Remission erreicht wird (Henze et al., 2001) unabhängig davon, ob ein mit einer positiven Prognose einhergehendes Rearrangement vorliegt oder nicht. Dadurch ist eigentlich nur das Ausbleiben der initialen Remission als ein eindeutiges schlechtes prognostisches Zeichen zu werten.

Zwar sind die bisher vorliegenden Patientenzahlen und Daten noch sehr klein, aber aufgrund der vorliegenden Ergebnisse scheint es sich bei dieser Gruppe möglicherweise um eine neue prognostisch ungünstige Subgruppe zu handeln. Sie scheint initial durch die standardmäßig erhobenen Parameter wie WBC, Prednison Response, usw. und der daraus resultierenden Risikostratifizierung nicht als aggressiver aufzufallen und damit einer frühzeitigen Diagnose zu entgehen. Leider zeigen die Patienten, mit der durchgeführten MR/SR Therapie, einen schlechten Verlauf.

Die bisher angewandten Therapieschemata scheinen bei dieser Gruppe nicht den gewünschten Erfolg zu haben. Auch die Umstellung auf ein aggressiveres therapeutisches Vorgehen mit dem Einsatz von Stammzelltransplantation zeigte nicht den gewünschten Erfolg, was die Daten zur SZT zeigen, die bei 5 Patienten durchgeführt wurde, bei denen trotz allem 4 Patienten verstarben.

Will man die Prognose dieser Patienten verbessern, scheint es nötig zu sein, früher aggressiv mit der Therapie zu beginnen, das bedeutet sie schon am Anfang in die Hochrisikogruppe aufzunehmen. Daraus ergibt sich allerdings das Problem diese Patienten innerhalb der anderen zu erkennen.

Eine Möglichkeit wäre die routinemäßige Untersuchung aller Kinder mit ALL mittels FISH. Ausgenommen könnten davon Patienten bleiben, die im PCR Screening eine Translokation t(12;21)(p13;q22) aufweisen, da eine *AML1*-Amplifikation offenbar nicht parallel zu dieser Veränderung vorliegt. Weiterhin könnten Patienten, die das Vorliegen eines anderen Rearrangements wie zum Beispiel t(9;22) oder t(4;11) zeigen, von diesem Screening ausgenommen werden, da sie bereits dadurch in die Hochrisikogruppe aufgenommen wurden.

Möglicherweise würde auch ein Screening der Patienten, die älter als 4 Jahre sind ausreichen, da dieses Rearrangement mit einem Auftreten bei älteren Patienten einherzugehen scheint.

Eine andere Möglichkeit zur Lösung dieses Problems könnte darin liegen Patienten, die ein Markerchromosomen im Karyogramm zeigen, gezielt einer FISH Diagnostik zuzuführen. Allerdings müsste hierzu bei allen Patienten zunächst eine Zytogenetik durchgeführt werden, jedoch bedeutet dies einen hohen personellen und zeitlichen Aufwand und zudem sind nicht bei allen Patienten erfolgreich zytogenetische Untersuchungen durchführbar (zum Beispiel aufgrund mangelnder Metaphasen), was dieses Vorgehen nicht praktikabel erscheinen lässt.

Außerdem wäre die Durchführung eines weiteren Screenings günstig, um die Patientenzahl zu erhöhen und zu überprüfen, ob sich die schlechte Prognose von Patienten mit *AML1*-Amplifikation bestätigen lässt.

4.5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden 206 Kinder mit ALL auf das Vorliegen einer *AML1*-Amplifikation hin untersucht. Die Untersuchungsmethode war ein FISH-Screening mit der LSI *TEL*/*AML1* ES Dual Color Translocation Probe (Abbott, Wiesbaden). Ergänzend erfolgte bei ausgewählten Patienten ein Vergleich mit der klassischen Zytogenetik. Insgesamt konnten acht Patienten mit dieser Aberration gefunden werden und bezogen auf die 201 im Jahre 2000 diagnostizierten Patienten, bei denen drei diese Veränderung zeigten, ergibt sich eine Inzidenz von 1,5 %.

Charakteristische FISH-Ergebnisse sind sieben oder mehr *AML1*-Signale pro Interphase. Es kommen sowohl clusterartige, als auch disseminierte Signalansammlungen vor. In der Metaphase verteilen sich die Signale auf ein normales Chromosom 21 und auf ein Chromosom mit aufgrund der Akkumulation verstärktem Signal.
Die häufige Translokation t(12;21)(p13;q22) und die *AML1*-Amplifikation, die beide mit der verwendeten Sonde nachweisbar sind, scheinen sich gegenseitig auszuschließen.

Zytogenetisch charakteristisch ist das Vorliegen eines Verlustes von einem normalen Chromosom 21 und das Auftreten von Markerchromosomen. Die erhobenen Befunde sprechen gegen eine bevorzugte Morphologie der Markerchromosomen. Die Chromosomenzahl liegt zwischen 45 und 49 und dabei kommen meist erhöhte Chromosomenzahlen vor.

Klinisch könnte es sich möglicherweise um einen prognostisch ungünstigen Subtyp handeln. Von den insgesamt älteren Patienten (Median 7,9 Jahre) hatten 62,5 % ein Rezidiv und die Hälfte verstarb. Die Rückfälle ereigneten sich jeweils innerhalb der ersten 32 Monate nach Diagnosestellung mit einer Tendenz zu frühen Rezidiven (Stand 2006).

Aufgrund dessen wäre möglicherweise ein gezieltes FISH-Screening und eine Aufnahme der Patienten in die Hochrisikogruppe sinnvoll, da sie durch die üblichen Diagnosemethoden nicht entdeckt werden können.

4.6 Summary

In this current study 206 children with ALL were screened for the existence of an amplification of the *AML1* gene. The research was carried out using FISH screening with the LSI *TEL*/*AML1* ES Dual Color Translocation Probe (Abbott, Wiesbaden). In addition, classical cytogenetics were performed on selected patients. In all, eight patients were discovered to have the aberration in question and among 201 patients diagnosed in the year 2000 three were found to carry the amplification, thus showing an incidence of 1.5 %.

Characteristic results of the FISH screening show seven or more *AML1* signals per interphase. The signals are to be seen as clusters or as disseminated signals. In the metaphases the signals are localized on the normal chromosome 21 and a chromosome with one accumulated strong signal. Furthermore, it seems likely that the current translocation t(12;21)(p13;q22) and the amplification which are both detectable with this probe are mutually exclusive.

A cytogenetic characteristic of this group is the loss of a normal chromosome 21 and the appearance of marker chromosomes. The above findings show no preferable morphology of the marker chromosomes which were found to occur in different shapes and sizes. The number of chromosomes ranges between 45 and 49 whereby the higher number appears more frequently.

According to the follow up data one can assume that *AML1* amplification seems to indicate a poor prognosis. Among those in general older positive children (median 7.9 years) 62,5 % relapsed and half of them died. In all cases relapses occured within 32 months after diagnosis (tendency for early relapses).

For this reason, FISH screening and a high risk treatment could possibly be adequate as these patients cannot be detected using the traditional diagnostic methods.

5 ANHANG

5.1 Abkürzungen und Definitionen

ABL	Protoonkogen auf Chromosom 9q34
AF4	Transcription activator auf Chromosom 4q21
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AML1	Gen auf Bande 21q22
Ampl	Amplifikation
ANLL	Akute nicht lymohoblastische Leukämie
BCR	Breakpoint cluster region, Bereich auf Chromosom 22, innerhalb dessen die Brüche bei der t(9;22) lokalisiert sind
BCR/ABL	Translokation t(9;22), Rearrangement des Prtotoonkogens *ABL* und dem *BCR*-Locus
BFM	Berlin-Frankfurt-München, Therapiestudie
Blasten am Tag 8	Die absolute Zahl der Blasten pro µl Blut des Patienten am 8. Tag nach einer Vorphase mit Prednison. Dient als Maß für Therapieansprechen in der BFM-Studie und gilt als prognostischer Faktor
CBF	core binding factor
CCD Camera	Charge-Coupled-Device Camera, Camerasystem, dass über Halbleiter an einen PC angeschlossen ist
CD	Custer of Differentiation
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CML	Chronisch myeloische Leukämie
co-ALL	Therapiestudie
COF	Cut-off-Punkt
DAPI	4’6-diaminidino-2-phenylindole
del	Deletion, Stückverlust an einem Chromosom

der	Derivativ: steht für die Veränderung an einem bestimmten Chromosom, wobei die Art der Aberration nicht klar ist.
diploid	Normaler Karyotyp, 46,XX oder 46,XY
DM	Double Minute, sphärisches Chromatinkörperchen, Äquivalent einer Genamplifikation
dup	Duplikation, Verdopplung eines Chromosomenstückes
E2A	Auch *TCF3*, transcription factor 3, Chromosom 19p13.3
EFS	Event free survival: bezeichnet den Zeitraum vom Beginn der Remission bis zu ihrem Ende durch Rezidiv oder Tod
ENL	Auch *LTG 19*, transcription activator, 19p13.3
ETO	Wahrscheinlich transcription activator, 8q22
FAB-Klassifikation	Französisch-Amerikanisch-Britische Arbeitsgruppe zur Festlegung morphologisch-zytochemischer Kriterien zur Unterteilung der akuten Leukämien
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
G-Banden	Banden, erzeugt durch Trypsinbehandlung und Giemsa Färbung
haploid	Einfacher Chromosomensatz, 23 Chromosomen
HLA	Histo-Kompatibilitäts-Faktor
HLF	Hepatic leukaemia factor, 17q22, Funktion unbekannt
HOX11	Auch *RNX*, 5q35.1
HSR	Homogeneously Staining Region, homogen färbende Chromosomenregion, Äquivalent einer Genamplifikation
hyperdiploid	47-57 Chromosomen, bei ALL auch Chromosomensätze > 60 Chromosomen
hypodiploid	35-45 Chromosomen
i	Isochromosom, Chromosom bestehend aus zwei identischen Armen, entstanden aus einer mitotischen Quer- statt Längsteilung
IGH	Immunglobulin heavy chain, 14q32.33

IL-3	Interleukin 3, Zytokin, Wachstumsfaktor haemotapoetischer Zellen
Immunphänotyp	Reifungsstufe der ALL, die sich durch eine spezifische Antigen-Antikörperreaktion nachweisen lässt
inv	Inversion, herausgebrochenes und in umgekehrter Leserichtung wieder eingefügtes Chromosomenstück
ISCN	International System for Cytogenetic Nomenclature
kb	Kilobasen
klonale Evulotion	Karyotypveränderung in einer Zellpopulation, die meist durch das Auftreten sekundärer Aberrationen gekennzeichnet ist
KM	Knochenmarkpunktat
mar	Markerchromosom, verändertes Chromosom, dass sich nicht in das Karyogramm einfügen lässt
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MIC-Klasifikation	Klassifikationsvorschlag, der Morphologie, Immunologie und Zytogenetik berücksichtigt
MLL	Auch *ALL1*, *HRX*, transcritional regulatory factor, 11q23
modale Chromosomenzahl	Die am häufigsten gefundene Chromosomenzahl in ausgezählten Metaphasen
Monosomie	Fehlen eines homologen Chromosoms
MR	Mittlere Risikogruppe
MRD	Minimal residual disease, minimale Resterkrankung
MYC	*C-myc*, transcription factor, 8q24
p-Arm	Kurzer Arm eines Chromosoms
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reaktion, Nachweis von Glycogen
pB	Peripheres Blut
PBS	Phosphate buffered saline
PBX	Transcription regulation, 1q23
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PHA	Phytohämaglutinin
POX	Myelo-Peroxidase-Reaktion
pseudodiploid	Chromosomenzahl 46, aber strukturelle Aberrationen an mindestens einem der Chromosomen
q-Arm	Langer Arm eines Chromosoms
RARa	Transcription factor, 17q22, Zelldifferenzierung
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase-PCR
S	Standartabweichung
SR	Standart Risikogruppe
SSC	Saline sodium citrate
TAL1	T-Cell acute leukaemia 1, transcription factor, 1p32
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEL	Translocation ets leukaemia, auch *ETV6*, transcription factor, 12p13.1
TTG2	T-Cell translocation gene 2, 11p13, auch *RHOM 2*

Tabelle 17: Abkürzungsverzeichnis

5.2 Patienten

Fallnummer	Eingangscode	Eingangsdatum	Fallnummer	Eingangscode	Eingangsdatum
1	00013	08.01.00	34	00183	21.03.00
2	00014	08.01.00	35	00185	23.03.00
3	00024	13.01.00	36	00187	23.03.00
4	00025	13.01.00	37	00191	24.03.00
5	00027	14.01.00	38	00193	24.03.00
6	00032	17.01.00	39	00202	28.03.00
7	00035	18.01.00	40	00207	29.03.00
8	00039	20.01.00	41	00209	30.03.00
9	00043	21.01.00	42	00221	01.04.00
10	00052	26.01.00	43	00226	01.04.00
11	00054	27.01.00	44	00227	04.04.00
12	00061	29.01.00	45	00234	06.04.00
13	00064	30.01.00	46	00235	06.04.00
14	00066	31.01.00	47	00246	08.04.00
15	00071	02.02.00	48	00248	11.04.00
16	00074	02.02.00	49	00252	13.04.00
17	00083	05.02.00	50	00254	13.04.00
18	00108	19.02.00	51	00267	18.04.00
19	00113	22.02.00	52	00268	18.04.00
20	00117	24.02.00	53	00273	19.04.00
21	00127	29.02.00	54	00278	20.04.00
22	00130	01.03.00	55	00288	21.04.00
23	00137	02.03.00	56	00290	22.04.00
24	00139	03.03.00	57	00303	27.04.00
25	00143	03.03.00	58	00308	28.04.00
26	00149	09.03.00	59	00317	29.04.00
27	00150	09.03.00	60	00319	03.05.00
28	00157	11.03.00	61	00321	04.05.00
29	00164	14.03.00	62	00324	05.05.00
30	00175	17.03.00	63	00327	06.05.00
31	00177	18.03.00	64	00330	06.05.00
32	00178	20.03.00	65	00334	08.05.00
33	00179	20.03.00	66	00339	10.05.00

67	00345	13.05.00	103	00541	12.07.00
68	00353	17.05.00	104	00557	17.07.00
69	00360	18.05.00	105	00559	18.07.00
70	00364	19.05.00	106	00561	18.07.00
71	00382	25.05.00	107	00574	21.07.00
72	00383	25.05.00	108	00578	25.07.00
73	00384	25.05.00	109	00583	26.07.00
74	00386	25.05.00	110	00584	26.07.00
75	00408	02.06.00	111	00589	27.07.00
76	00413	03.06.00	112	00606	01.08.00
77	00416	06.06.00	113	00609	01.08.00
78	00421	07.06.00	114	00611	02.08.00
79	00424	07.06.00	115	00615	03.08.00
80	00427	07.06.00	116	00624	04.08.00
81	00429	07.06.00	117	00630	08.08.00
82	00430	08.06.00	118	00651	17.08.00
83	00431	08.06.00	119	00659	19.08.00
84	00443	09.06.00	120	00660	19.08.00
85	00450	10.06.00	121	00680	26.08.00
86	00457	14.06.00	122	00685	30.08.00
87	00464	17.06.00	123	00686	30.08.00
88	00465	17.06.00	124	00696	01.09.00
89	00476	21.06.00	125	00702	02.09.00
90	00486	24.06.00	126	00708	04.09.00
91	00487	24.06.00	127	00712	05.09.00
92	00491	27.06.00	128	00740	09.09.00
93	00492	27.06.00	129	00748	13.09.00
94	00501	29.06.00	130	00753	14.09.00
95	00503	30.06.00	131	00756	14.09.00
96	00513	01.07.00	132	00765	16.09.00
97	00514	04.07.00	133	00766	16.09.00
98	00515	04.07.00	134	00772	19.09.00
99	00519	05.07.00	135	00773	19.09.00
100	00520	05.07.00	136	00774	20.09.00
101	00521	05.07.00	137	00777	20.09.00
102	00526	06.07.00	138	00779	20.09.00

139	00787	22.09.00	175	00970	24.11.00
140	00788	22.09.00	176	00978	25.11.00
141	00791	28.09.00	177	00979	25.11.00
142	00793	28.09.00	178	00980	25.11.00
143	00798	27.09.00	179	00986	28.11.00
144	00809	30.09.00	180	00987	28.11.00
145	00816	04.10.00	181	00989	29.11.00
146	00818	05.10.00	182	00992	29.11.00
147	00819	05.10.00	183	00664	30.11.00
148	00821	06.10.00	184	00995	01.12.00
149	00824	06.10.00	185	00996	01.12.00
150	00825	06.10.00	186	00998	01.12.00
151	00827	07.10.00	187	01006	05.12.00
152	00829	07.10.00	188	01013	06.12.00
153	00830	10.10.00	189	01022	11.12.00
154	00835	12.10.00	190	01035	14.12.00
155	00858	19.10.00	191	01043	15.12.00
156	00873	16.10.00	192	01052	20.12.00
157	00882	17.10.00	193	01059	21.12.00
158	00884	17.10.00	194	01065	23.12.00
159	00885	18.10.00	195	01067	23.12.00
160	00895	31.10.00	196	01070	28.12.00
161	00902	02.11.00	197	01071	28.12.00
162	00903	02.11.00	198	01076	29.12.00
163	00904	03.11.00	199	01079	29.12.00
164	00921	09.11.00	200	01082	30.12.00
165	00922	09.11.00	201	01083	30.12.00
166	00924	10.11.00			
167	00925B	18.11.00			
168	00929	11.11.00			
169	00937	15.11.00			
170	00938	15.11.00			
171	00948	17.11.00			
172	00952	18.11.00			
173	00953	20.11.00			
174	00957	21.11.00			

Tabelle 18: Untersuchte Patienten aus dem Jahre 2001

Fallnummer	Eingangscode	Eingangsdatum
202	87273	10.06.1987
203	93359	30.07.1993
204	98540	21.09.1998
205	010014	05.01.2001
206	010257	20.3.2001

Tabelle 19: Auffällige Patienten mit -21, +mar

5.3 Berechnungen

Berechnung: Zugewinne *TEL*

	n1	n2	n3	n4	n5	n6	n7	n8	n9	n10	n11
Zugewinne (%)	3	3,5	2	2,5	0	4,5	2	6	2	0	2

Arithmetisches Mittel: $\bar{x}$ = n1+n2+...+n11 / 11

= 3 + 3,5 + 2 + ...+ 2 / 11

= 27,5 / 11

= 2,5

Standartabweichung: $s = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}(xi-\bar{x})^2}$

s = 1,76

Cut Off-Punkt (COF): COF = $\bar{x}$ + 3s

COF = 2,5 + 3 x 1,76

COF = 7,8

Berechnung: Verluste *TEL*

	n1	n2	n3	n4	n5	n6	n7	n8	n9	n10	n11
Zugewinne (%)	3,5	0,5	1	1	1,5	0,5	0	0	1,5	1,5	1

Arithmetisches Mittel: $\bar{x}$ = n1+n2+...+n11 / 11

= 3,5 + 0,5 + 1 + ...+ 1 / 11

= 12 / 11

= 1,09

Standartabweichung: $s = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}(xi-\bar{x})^2}$

s = 0,97

Cut Off-Punkt (COF): COF = $\bar{x}$ + 3s

COF = 1,09 + 3 x 0,97

COF = 4,0

Berechnung: Verluste *AML1*

	n1	n2	n3	n4	n5	n6	n7	n8	n9	n10	n11
Zugewinne (%)	5	2	2,5	1,5	2	3,5	2	2,5	4,5	1	2

Arithmetisches Mittel: $\bar{x}$ = n1+n2+...+n11 / 11

= 5 + 2 + 2,5 + ...+ 2 / 11

= 28,5 / 11

= 2,59

Standartabweichung: $s = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}(xi-\bar{x})^2}$

s = 1,24

Cut Off-Punkt (COF): COF = $\bar{x}$ + 3s

COF = 2,59 + 3 x 1,24

COF = 6,3

5.4 Literaturliste

1. Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J, Christiansen DH. 2005. Amplification or duplication of chromosome band 21q22 with multiple copies of the AML1 gene and mutation of the TP 53 gene in therapy-related MDS and AML. Leukemia 19:197-200

2. Arico M, Valsecchi MG, Camitta B, Schrappe M, Chessells J, Baruchel A, Gaynon P, Silverman L, Janka-Schaub G, Kamps W, Pui CH, Masera G. 2000. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 342:998-1006

3. Attarbaschi A, Mann G, Konig M, Dworzak MN, Trebo MM, Muhlegger N, Gadner H, Haas OA. 2004. Incidence and relevance of secondary chromosome abnormalities in childhood TEL/AML1+ acute lymphoblastic leukemia: an interphase FISH analysis. Leukemia 18:1611-1616

4. Barber KE, Martineau M, Harewood L, Stewart M, Cameron E, Strefford JC, Rutherford S, Allen TD, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harris RL, Jalali GR, Moorman AV, Robinson HM, Harrison CJ. 2004. Amplification of the ABL gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 18:1153-1156

5. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. 1995. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Leukemia 9:1783-1786

6. Berger R. 1997. Acute lymphoblastic leukemia and chromosome 21. Cancer Genet Cytogenet 94:8-12

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

8. Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, Raetz E, Relling M, Davies S, Downing JR, Willman CL, Reed JC. 2003. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program) 102-131

9. Caspersson T, Zech L, Johansson C. 1970. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. Exp Cell Res 60:315-319

10. Cremer T, Jauch A, Ried T, Schröck E, Lengauer C, Cremer M, Speicher MR. 1995. Fluoreszenz in situ Hybridisierung. Deutsches Ärzteblatt 92:37-47

11. 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

12. Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Tanaka K, Hamamoto K, Ohki M, Ueda K, Kamada N. 1998. Fluorescence *in situ* hybridization analysis of 12;21 translocation in Japanese childhood acute lymphoblastic leukemia. Jpn J Cancer Res 89:783-788

13. Ford AM, Bennett CA, Price CM, Bruin MC, Van Wering ER, Greaves M. 1998. Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. Proc Natl Acad Sci USA 95:4584-4588

14. Forestier E, Johansson B, Borgstrom G, Kerndrup G, Johansson J, Heim S. 2000. Cytogenetic findings in a population-based series of 787 childhood acute lymphoblastic leukemias from the Nordic countries. The NOPHO Leukemia Cytogenetic Study Group. Eur J Haematol 64:194-200

15. Friedmann AM, Weinstein HJ. 2000. The Role of Prognostic Features in the Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. The Oncologist 5:321-328

16. Gajjar A, Ribeiro R, Hancock ML, Rivera GK, Mahmoud H, Sandlund JT, Crist WM, Pui CH. 1995. Persistence of circulating blasts after 1 week of multiagent chemotherapy confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 86:1292-1295

17. Gall JG, Pardue ML. 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proc Natl Acad Sci USA 63:378-383

18. Gebhart E. 1989. Tumorzytogenetik, Stuttgart; New York: Schattauer

19. Gibbons B, Czepulkowski BH. 1992. Cytogenetics in acute lymphoblastic leukemia, 67-95, Human Cytogenetics, A Practical Approach Volume 2. D.E.Rooney, B.H.Czepulkowski

20. Golub TR, McLean T, Stegmaier K, Carroll M, Tomasson M, Gilliland DG. 1996. The TEL gene and human leukemia. Biochim Biophys Acta 1288:M7-M10

21. Harbott J. 1993. Chromosomenaberrationen bei akuten Leukämien im Kindesalter, Stuttgart: Enke Verlag

22. Harbott J. 2001. Leukämien im Kindesalter-genetische Aspekte. Medizinische Genetik 183-187

23. Harewood L, Robinson H, Harris R, Al Obaidi MJ, Jalali GR, Martineau M, Moorman AV, Sumption N, Richards S, Mitchell C, Harrison CJ. 2003. Amplification of AML1 on a duplicated chromosome 21 in acute lymphoblastic leukemia: a study of 20 cases. Leukemia 17:547-553

24. Harrison CJ, Moorman AV, Barber KE, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harris RL, Jalali GR, Robinson HM, Strefford JC, Stewart A, Wright S, Griffiths M, Ross FM, Harewood L, Martineau M. 2005. Interphase molecular cytogenetic screening for chromosomal abnormalities of prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a UK Cancer Cytogenetics Group Study. Br J Haematol 129:520-530

25. Henze G, Klingebiel T, Schlegel PG 2001. Onkologie/ KMT, 710-717, Pädiatrie. Speer CP, Gahr M; Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag

26. Hesseling PB, Hartley P, Zietsman L, van Lill S, Preston-Martin S, Wessels G. 2004. Incidence of acute lymphoblastic leukaemia in white and coloured children in the Western Cape. S Afr Med J 94:533-536

27. Hoffbrand AV, Pettit.J.E., Moss PAH, Hoelzer D 2002a. Akute Leukämien, 161-177, Grundkurs Hämatologie. Berlin, Wien: Blackwell Verlag GmbH

28. Hoffbrand AV, Pettit.J.E., Moss PAH, Hoelzer D 2002b. Die Genetik maligner hämatologischer Erkrankungen, 147-160, Grundkurs Hämatologie. Berlin, Wien: Blackwell Verlag GmbH

29. Huret JL. 2000. Maligne Hämatologische Erkrankungen. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. http://AtlasGeneticsOncology.org/Educ/Hempat_de.html

30. Huret JL and Senon S. 2003. AML1 (acute myeloid leukemia 1). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.January 2003. www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/AML1.html

31. IMSD 2005. Jahresbericht 2005 des Deutschen Kinderkrebsregisters, Kaatsch P, Spix C; Mainz: Johannes Gutenberg-Universität

32. ISCN 2005. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Shaffer LG, Tommerup N; Basel: S.Karger

33. Jabber Al-Obaidi MS, Martineau M, Bennett CF, Franklin IM, Goldstone AH, Harewood L, Jalali GR, Prentice HG, Richards SM, Roberts K, Harrison CJ. 2002. ETV6/AML1 fusion by FISH in adult acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 16:669-674

34. Kakazu N, Taniwaki M, Horiike S, Nishida K, Tatekawa T, Nagai M, Takahashi T, Akaogi T, Inazawa J, Ohki M, Abe T. 1999. Combined spectral karyotyping and DAPI banding analysis of chromosome abnormalities in myelodysplastic syndrome. Genes Chromosomes Cancer 26:336-345

35. Köhler A. 1996a. Fluoreszenz in situ Hybridisierung (1). MTA Dialog 11:623-626

36. Köhler A. 1996b. Fluoreszenz in situ Hybridisierung (2). MTA Dialog 11:705-708

37. Lichter P, Cremer T. 1992. Chromosome analysis by non-isotopic in situ hybridization, 157-193, Human Cytogenetics , a practical Approach Volume 1. D.E.Rooney, B.H.Czepulkowski

38. Lo Coco F, Pisegna S, Diverio D. 1997. The AML1 gene: A Transcription factor involved in the Pathogenesis of Myeloid and Lymphoid Leukemias. Haematologica 82:364-370

39. Löffler G. 1998a. Bausteine und Strukturelemente der Zelle, 169-171, Biochemie und Pathobiochemie. Löffler, Petrides; Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag

40. Löffler G. 1998b. Stoffwechsel der Zelle: Weitergabe und Realisierung der Erbinformationen, 229-231, Biochemie und Pathobiochemie. Löffler, Petrides; Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag

41. Löffler H, Rastetter J. 1999. Blut und Knochenmark, 176-178, Atlas der klinischen Hämatologie, 5. Auflage. H.Löffler JR; Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

42. Manning JE, Hershey ND, Broker TR, Pellegrini M, Mitchell HK, Davidson N. 1975. A new method of in situ hybridization. Chromosoma 53:107-117

43. Martinez-Ramirez A, Urioste M, Contra T, Cantalejo A, Tavares A, Portero JA, Lopez-Ibor B, Bernacer M, Soto C, Cigudosa JC, Benitez J. 2001. Fluorescence in situ hybridization study of TEL/AML1 fusion and other abnormalities involving TEL and AML1 genes. Correlation with cytogenetic findings and prognostic value in children with acute lymphocytic leukemia. Haematologica 86:1245-1253

44. Mikhail FM, Serry KA, Hatem N, Mourad ZI, Farawela HM, El Kaffash DM, Coignet L, Nucifora G. 2002. AML1 gene over-expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 16:658-668

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

46. Miyoshi Y, Uemura H, Fujinami K, Mikata K, Harada M, Kitamura H, Koizumi Y, Kubota Y. 2000. Fluorescence in situ hybridization evaluation of c-myc and androgen receptor gene amplification and chromosomal anomalies in prostate cancer in Japanese patients. Prostate 43:225-232

47. Morel F, Herry A, Le Bris MJ, 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

48. Mori H, Colman SM, Xiao Z, Ford AM, Healy LE, Donaldson C, Hows JM, Navarrete C, Greaves M. 2002. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. Proc Natl Acad Sci USA 99:8242-8247

49. Niini T, Kanerva J, Vettenranta K, Saarinen-Pihkala UM, Knuutila S. 2000. AML1 gene amplification: a novel finding in childhood acute lymphoblastic leukemia. Haematologica 85:362-366

50. Nilsson M, Meza-Zepeda LA, Mertens F, Forus A, Myklebost O, Mandahl N. 2004. Amplification of chromosome 1 sequences in lipomatous tumors and other sarcomas. Int J Cancer 109:363-369

51. Nordgren A, Heyman M, Sahlen S, Schoumans J, Soderhall S, Nordenskjold M, Blennow E. 2002. Spectral karyotyping and interphase FISH reveal abnormalities not detected by conventional G-banding. Implications for treatment stratification of childhood acute lymphoblastic leukaemia: detailed analysis of 70 cases. Eur J Haematol 68:31-41

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

53. Ohta JI, Miyoshi Y, Uemura H, Fujinami K, Mikata K, Hosaka M, Tokita Y, Kubota Y. 2001. Fluorescence in situ hybridization evaluation of c-erbB-2 gene amplification and chromosomal anomalies in bladder cancer. Clin Cancer Res 7:2463-2467

54. Passarge E. 1994. Taschenatlas der Genetik, Stuttgart: Thieme

55. Perrillat F, Clavel J, Jaussent I, Baruchel A, Leverger G, Nelken B, Philippe N, Schaison G, Sommelet D, Vilmer E, Bonaiti-Pellie C, Hemon D. 2001. Family cancer history and risk of childhood acute leukemia (France). Cancer Causes Control 12:935-941

56. Pui CH, Evans WE. 1998. Acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 339:605-615

57. Rieger R, Michaelis A, Green MM 1991. Glossary of Genetics, classical and molecular, 27, 140 fifth edition ; Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

58. Ritterbach J, Hiddemann W, Beck JD, Schrappe M, Janka-Schaub G, Ludwig W-D, Lampert F, Harbott J. 1998. Detection of hyperdiploid karyotypes (>50 chromosomes) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) using fluorescence in situ hybridization (FISH). Leukemia 12:427-433

59. Robinson HM, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harewood L, Harris RL, Jalali GR, Martineau M, Moorman AV, Taylor KE, Richards S, Mitchell C, Harrison CJ. 2003. Amplification of AML1 in acute lymphoblastic leukemia is associated with a poor outcome. Leukemia 17:2249-2250

60. Romana SP, Le Coniat M, Berger R. 1994. t(12;21): a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. Genes Chromosomes Cancer 9:186-191

61. Romana SP, Poirel H, Leconiat M, Flexor MA, Mauchauffe M, Jonveaux P, Macintyre EA, Berger R, Bernard OA. 1995. High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. Blood 86:4263-4269

62. Roumier C, Fenaux P, Lafage M, Imbert M, Eclache V, Preudhomme C. 2003. New mechanisms of AML1 gene alteration in hematological malignancies. Leukemia 17:9-16

63. Rowley JD. 1973. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature 243:290-293

64. Rowley JD. 1981. Down Syndrome and acute leukaemia: increased risk may be due to trisomy 21. Lancet 2:1020-1022

65. Sallan SE, Golub TR, Pui CH, Campana.D., Evans WE, Behm FB, Billett A 1997. Acute lymphoblasic Leukemia, 103-119, Hematology. ASH;

66. Santin AD, Bellone S, Van Stedum S, Bushen W, Palmieri M, Siegel ER, Las Casas LE, Roman JJ, Burnett A, Pecorelli S. 2005. Amplification of c-erbB2 oncogene: a major prognostic indicator in uterine serous papillary carcinoma. Cancer 104:1391-1397

67. Schrappe M. 2003. Prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukemia. Indian J Pediatr 70:817-824

68. Schrappe M, Harbott J, Riehm H 2005. Akute lymphoblastische Leukämien, 656-679, Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J; Heidelberg: Springer Medizin Verlag

69. Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M, Harbott J, Ludwig WD, Henze G, Gadner H, Odenwald E, Riehm H. 2000. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Munster. Leukemia 14:2205-2222

70. Schwab M. 1999. Oncogene amplification in solid tumors. Semin Cancer Biol 9:319-325

71. Schwab M, Amler LC. 1990. Amplification of cellular oncogenes: a predictor of clinical outcome in human cancer. Genes Chromosomes Cancer 1:181-193

72. Soulier J, Trakhtenbrot L, Najfeld V, Lipton JM, Mathew S, Avet-Loiseau H, De Braekeleer M, Salem S, Baruchel A, Raimondi SC, Raynaud SD. 2003. Amplification of band q22 of chromosome 21, including AML1, in older children with acute lymphoblastic leukemia: an emerging molecular cytogenetic subgroup. Leukemia 17:1679-1682

73. Stackelberg von A, Henze G. 2005. Rezidive der akuten lymphoblastischen Leukämie, 680-690, Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J; Heidelberg: Springer Medizin Verlag

74. Streubel B, Valent P, Lechner K, Fonatsch C. 2001. Amplification of the AML1(CBFA2) gene on ring chromosomes in a patient with acute myeloid leukemia and a constitutional ring chromosome 21. Cancer Genet Cytogenet 124:42-46

75. Swiger RR, Tucker JD. 1996. Fluorescence in situ hybridization: a brief review. Environ Mol Mutagen 27:245-254

76. Tjio JH, Levan A. 1956. The chromosome number of men. Hereditas 42:1-6

77. Vysis DGIU. 2006. Fluorescence in situ Hybridization. www.Vysis.com

78. Wilkinson JD, Fleming LE, MacKinnon J, Voti L, Wohler-Torres B, Peace S, Trapido E. 2001. Lymphoma and lymphoid leukemia incidence in Florida children: ethnic and racial distribution. Cancer 91:1402-1408

79. Woo HY, Kim DW, Park H, Seong KW, Koo HH, Kim SH. 2005. Molecular cytogenetic analysis of gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia. J Korean Med Sci 20:36-41

5.5 Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

5.6 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. J. Harbott für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie die Unterstützung und Hilfestellung bei allen wichtigen Schritten und Fragen bis zur Vollendung dieser Arbeit.

Weiterhin Frau Dr. Silja Röttgers für die intensive Betreuung und Einarbeitung in dieses Thema sowie unermüdliche Hilfestellung bei allen auftauchenden Problemen.

Für die nette Unterstützung und Hilfe bei Klärung laborchemischer Fragen danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Onkogenetischen Labores insbesondere Thomas Jung.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Andrea Teigler-Schlegel und Dr. Jochen Bruch für die zytogenetische Bearbeitung des Materials.

Zuletzt danke ich meinen Eltern für alles was mir Studium und Promotion letztendlich möglich gemacht hat.

5.7 Lebenslauf

Name:		Carsten Michael Reichelt
geboren am:		28.06.1978
Geburtsort:		Königstein/ Taunus
Eltern:	Mutter:	Angela Anita Maria Reichelt, geb. Colloseus
	Vater:	Peter-Paul Michael Reichelt
Schulbildung:	1984-1988	Grundschule Heringen
	1988-1997	Werratalschule Heringen
Berufsausbildung:	1997-1998	Wehrdienst
	1998-2005	Studium der Humanmedizin, JLU Gießen
	2000	Ärztliche Vorprüfung
	2001	Erstes Staatsexamen
	2004	Zweites Staatsexamen
	2005	Drittes Staatsexamen/ Approbation
	2002-2006	Durchführung der Untersuchungen zum Dissertationsvorhaben im onkogenetischen Labor der Kinderklinik der JLU Gießen
	2005-2006	Assistenzarzt in der chirurgischen Abteilung Evangelisches und Johanniter Klinikum Niederrhein, Duisburg