

Aus dem Medizinischem Zentrum für Humangenetik
Geschäftsf. Direktor Prof. Dr. Karl-Heinz Grzeschik

des

Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität
Marburg

In Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum
Gießen und Marburg GmbH
Standort Marburg



Zytogenetische Veränderungen bei undifferenzierter akuter myeloischer Leukämie

In a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Nadja Yvonne Schweitzer-Schmitt, geb. Schweitzer
aus Weilburg,
Marburg 2009

**Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am: 27.05.2010.
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund
Referent: Prof. Dr. Harald Rieder
Korreferent: Prof. Dr. Dr. Andreas Lübbe**

1 Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | <u>INHALTSVERZEICHNIS</u> | 1 |
| 2 | <u>EINLEITUNG</u> | 4 |
| 2.1 | DIE ANFÄNGE DER TUMORZYZOGENETIK | 4 |
| 2.2 | KREBSFÖRDERNDE GENE | 4 |
| 2.2.1 | Onkogene | 5 |
| 2.2.2 | Tumorsuppressorgene | 6 |
| 2.2.3 | Mutatorgene | 7 |
| 2.3 | LEUKÄMIEN | 7 |
| 2.3.1 | Allgemeines | 7 |
| 2.3.2 | Einteilung der Leukämien | 8 |
| 2.3.3 | Chronisch myeloproliferative Erkrankungen | 8 |
| 2.3.3.1 | Chronisch myeloische Leukämie (CML) | 9 |
| 2.3.4 | Akute Leukämien | 10 |
| 2.3.4.1 | Akute lymphatische Leukämie (ALL) | 10 |
| 2.3.4.2 | Akute myeloische Leukämie (AML) | 11 |
| 2.4 | ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT | 19 |
| 3 | <u>MATERIAL UND METHODEN</u> | 20 |
| 3.1 | METHODEN ZUM NACHWEIS HÄMATOLOGISCHER ERKRANKUNGEN | 20 |
| 3.1.1 | Knochenmarkuntersuchung | 20 |
| 3.1.1.1 | Zytologische Diagnostik | 20 |
| 3.1.1.2 | Zytochemische Diagnostik | 20 |
| 3.1.2 | Immunphänotypisierung (Oberflächenmarkeranalyse) | 21 |
| 3.2 | METHODEN ZUM NACHWEIS VON CHROMOSOMENVERÄNDERUNGEN | 24 |
| 3.2.1 | Konventionelle Chromosomenbandenanalyse | 24 |
| 3.2.1.1 | Molekularzytogenetische Untersuchungsmethoden - Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) | 25 |
| 3.2.1.2 | Chromosome Painting | 26 |
| 3.2.1.3 | Diagnostische Einsatzmöglichkeiten von FISH-Sonden | 27 |
| 3.2.2 | Molekularzytogenetische Untersuchungsmethoden: Die vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) | 28 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.3 | CHROMOSOMENBANDENANALYSE | 30 |
| 3.3.1 | Probenentnahme und Transport | 30 |
| 3.3.2 | Zellkulturen | 30 |
| 3.3.3 | Chromosomenpräparation | 31 |
| 3.3.4 | Chromosomenbandenfärbung mit Giemsa | 33 |
| 3.3.5 | Zytogenetische Befundung | 33 |
| 3.4 | NOMENKLATUR DER ZYTOGENETISCHEN DIAGNOSTIK | 34 |
| 3.4.1 | Beschreibung des Karyotyps | 34 |
| 3.4.2 | Numerische Anomalien | 35 |
| 3.4.3 | Strukturelle Anomalien | 36 |
| 4 | <u>ERGEBNISSE</u> | 39 |
| 4.1 | PATIENTEN | 39 |
| 4.1.1 | Fallzahlen und Patientenübersicht | 39 |
| 4.2 | UNTERSUCHUNG DER EINZELNEN PATIENTEN | 42 |
| 4.2.1 | Fall Nr. 1: AML M0, weiblich, 63 Jahre | 42 |
| 4.2.2 | Fall Nr. 2, AML M0, männlich, 19 Jahre | 44 |
| 4.2.3 | Fall Nr. 3, AML M0, weiblich, 37 Jahre | 46 |
| 4.2.4 | Fall Nr. 4, AML M0, weiblich, 48 Jahre | 48 |
| 4.2.5 | Fall Nr. 5, AML M0, männlich, 27 Jahre | 50 |
| 4.2.6 | Fall Nr. 6, AML M0, männlich, 34 Jahre | 52 |
| 4.2.7 | Fall Nr. 7, AML M0, weiblich, 76 Jahre | 55 |
| 4.2.8 | Fall Nr. 8, AML M0, männlich, 44 Jahre | 57 |
| 4.2.9 | Fall Nr. 9, AML M0, männlich, 26 Jahre | 59 |
| 4.2.10 | Fall Nr. 10, AML M0, weiblich, 72 Jahre | 61 |
| 4.2.11 | Fall Nr. 11, AML M0, männlich, 41 Jahre | 63 |
| 4.2.12 | Fall Nr. 12, AML M0, weiblich, 75 Jahre | 65 |
| 4.2.13 | Fall Nr. 13, AML M0, männlich, 34 Jahre | 67 |
| 4.2.14 | Fall Nr 14, AML M0, weiblich, 54 Jahre | 69 |
| 4.2.15 | Fall Nr. 15, AML M0, weiblich, 46 Jahre | 71 |
| 4.2.16 | Fall Nr. 16, AML M0, weiblich, 30 Jahre | 73 |
| 4.2.17 | Fall Nr. 17, AML M0, männlich, 28 Jahre | 75 |
| 5 | <u>AUSWERTUNG</u> | 77 |
| 5.1 | AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE | 77 |
| 5.1.1 | Klinische und hämatologische Merkmale | 77 |
| 5.1.2 | Immunologische Merkmale der AML M0 | 78 |

| | |
|--|------------|
| | 3 |
| 5.1.3 Zytochemische Auswertung | 79 |
| 5.1.4 Zytogenetische Auswertung | 80 |
| 5.1.4.1 Häufig betroffene Chromsomen | 81 |
| 6 DISKUSSION | 84 |
| 6.1 ZYTOGENETISCHE VERÄNDERUNGEN SIND BEI VIELEN PATIENTEN MIT EINER AML M0 ZU FINDEN | 84 |
| 6.1.1 Charakteristische chromosomale Veränderungen – Karyotypen mit ungünstiger Prognose | 85 |
| 6.1.1.1 Zytogenetische Veränderungen mit intermediärem Risikoprofil | 89 |
| 6.1.2 Patienten ohne chromosomale Veränderungen | 92 |
| 6.2 ZUKÜNFTIGE THERAPIEOPTIONEN | 94 |
| 7 ZUSAMMENFASSUNG | 96 |
| 8 LITERATURVERZEICHNIS | 98 |
| 9 ANHANG | 110 |
| 9.1 LEBENSLAUF (ENTFERNT) | 110 |
| 9.2 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER | 111 |
| 9.2 DANKSAGUNG | 112 |
| 9.3 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG (ENTFERNT) | 113 |

2 Einleitung

2.1 Die Anfänge der Tumorzytogenetik

Die Anfänge der Tumorzytogenetik reichen bis in das 19. Jahrhundert zurück. Der deutsche Pathologe David von Hansemann berichtete schon 1890 von auffälligen Kernveränderungen und gestörten Teilungsfiguren in Schnittpräparaten von Karzinomen (von Hansemann 1890). Er vermutete bereits damals, daß zwischen diesen Veränderungen und der Entstehung von malignen Tumoren ein Zusammenhang bestehen könnte. Etwa 25 Jahre später griff der deutsche Zoologe Theodor Boveri diese Vorstellungen auf und formulierte unter Hinzunahme eigener Beobachtungen die sogenannte „Chromosomenhypothese“ der Tumorentstehung. Danach werden Veränderungen im Chromosomensatz einer Zelle als Voraussetzung für den Übergang von normalem Wachstum zu maligner Proliferation angesehen (Boveri et al. 1914).

Es dauerte aber noch lange bis die technischen Voraussetzungen geschaffen waren, um diese Hypothese an menschlichen Tumoren zu überprüfen. Erst 1960 wurde mit dem sogenannten „Philadelphia-Chromosom“ die erste Chromosomenanomalie gefunden, die für eine menschliche Leukämie als charakteristisch gelten konnte (Nowell et al. 1960). Sie entdeckten, daß in Knochenmarkszellen von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie sehr häufig ein kleines Chromosom auftrat, das normalerweise im menschlichen Chromosomensatz nicht zu finden war. Das Philadelphia-Chromosom blieb allerdings recht lange das einzige Beispiel für eine charakteristische Chromosomenanomalie, die bei einer menschlichen Tumorerkrankung so regelmäßig auftrat, daß man sie mit der Entstehung der Erkrankung in Verbindung bringen konnte. 1967 wurde durch Singer und Zang bei einem weiteren humanen Tumor eine typische Chromosomenanomalie entdeckt: sie konnten zeigen, daß beim Meningeom sehr oft ein kleines akrozentrisches Chromosom fehlte (Zang et al. 1967).

2.2 Krebsfördernde Gene

In jedem Organismus sind zahlreiche Gene vorhanden, die das Zellwachstum steuern. Viele davon sind während der Embryogenese aktiv. Sie sorgen z.B. dafür, daß während der Entwicklung jeweils zum richtigen Zeitpunkt bestimmte Zelltypen sich stark vermehren und ein Organ bilden.

Danach müssen diese Gene mehr oder weniger vollständig inaktiviert werden, damit ein geordnetes Wachstum des Organismus möglich ist. Dafür sind Gene notwendig, die das Zellwachstum hemmen und zum Teil auch den streng kontrollierten Zelltod (Apoptose) auslösen. Viele Gene, die an der Steuerung der Zellproliferation beteiligt sind, können im mutierten Zustand zur Krebsentstehung beitragen. Man unterscheidet heute drei Gruppen von Tumorgenen: Onkogene, Tumorsuppressorgene und Mutatorgene.

2.2.1 Onkogene

Als Onkogene bezeichnet man Gene, die auf die Zellvermehrung so stark aktivierend einwirken, daß ein Tumor entstehen kann. Solange diese Gene nicht mutiert sind, sondern ihre richtige Funktion zur richtigen Zeit ausüben, nennt man sie Protoonkogene.

Man kennt inzwischen weit über 50 verschiedene Protoonkogene, die durch Mutationen zu Onkogenen werden können. Diese Mutationen entstehen auf sehr verschiedene Weise: durch ionisierende Strahlen oder chemische Mutagenen können Punktmutationen auftreten, die eine Veränderung der Basensequenz der DNA hervorrufen. Auch die Integration von Virus-DNA kann Protoonkogene aktivieren. Die Protoonkogene können sich aber auch vervielfachen und zu sogenannten Genamplifikationen führen. Dabei kann das Protoonkogen mehr als tausendfach auftreten. Diese Amplifikationen sind oft im Chromosomensatz als „Homogeneously Staining Regions“ (HSR) zu erkennen. Die HSR-Regionen sind als große, homogen angefarbte Zusatzregionen in einzelnen Chromosomen nachweisbar. Durch die enorme Vermehrung der Genkopienzahl kann das zugehörige Protein in sehr viel größeren Mengen produziert werden. Das ermöglicht auch ohne Veränderung des Einzelgens eine verstärkte Aktivierung der Zellproliferation. Vor allem das MYC-Protoonkogen scheint besonders oft von Amplifikationen betroffen zu sein. Insbesondere bei Neuroblastomen, Leukämien und Lungenkarzinomen werden Amplifikationen beobachtet (Varmus et al. 1994, Thompson et al. 1993).

Die Umwandlung von Protoonkogenen in Onkogene erfolgt vielfach auch durch chromosomale Umbauten, wie z.B. Translokationen. Ein typisches Beispiel dafür ist eine Translokation, die bei der chronisch myeloischen Leukämie zur Entstehung des Philadelphia-Chromosoms führt. Bei dieser Translokation wird ein relativ großes Stück des Chromosoms 22 auf das Chromosom 9 übertragen. Im Austausch gelangt eine recht kleine Region des Chromosoms 9 in das Chromosom 22.

In dieser Region ist das ABL1- Protoonkogen lokalisiert, das durch die Translokation in Chromosom 22 integriert wird. Dort verbindet sich das ABL-Protoonkogen mit dem BCR-Gen („breakpoint cluster region“, eine bevorzugte Bruchstelle), wodurch ein Hybridgen entsteht. Dadurch wird ein Hybridprotein (Tyrosinkinase) gebildet, das die Proliferation eines bestimmten Zelltyps im Knochenmark verstärkt, so daß sich ein leukämischer Zellklon entwickelt.

2.2.2 Tumorsuppressorgene

Absolut notwendig für eine geordnete Zellvermehrung sind Gene, die dafür sorgen, daß das Wachstum zur richtigen Zeit auch wieder beendet wird. Diese werden als Tumorsuppressorgene bezeichnet. Auch hiervon sind im menschlichem Genom zahlreiche Vertreter bekannt. Werden sie durch Mutationen z.B. inaktiviert, erlangen manche Zelltypen eine dauerhafte Teilungsfähigkeit und der Tumorentstehung steht nichts mehr im Wege.

Die ersten Tumorsuppressorgene wurden Anfang der 70er Jahre entdeckt.

Wichtige Tumorsuppressorgene sind z.B. das WT-1 Gen auf Chromosom 11 lokalisiert, das eine entscheidende Bedeutung bei der Entstehung des Wilms Tumors (bösartiger Nierentumor) bei Kindern hat. Auch beim Retinoblastom, ein bösartiger Tumor der Netzhaut bei Kindern, führt der biallelische Verlust des Retinoblastom-Gens in der Region 13q14 auf Chromosom 13 zur Inaktivierung des Tumorsuppressorgens RB1.

Während die meisten Tumorsuppressorgene nur dann zur Tumorentstehung führen, wenn beide Kopien mutiert sind, bildet das TP53-Gen eine Ausnahme. Dieses Gen liegt auf Chromosom 17 in der Region p12-13. Es ist ein wichtiges Wachstumsregulatorgen für viele verschiedene Zelltypen. Das entsprechende p53-Protein regt als Transkriptionsfaktor die RNA-Polymerase an und steuert damit die Genexpression. Außerdem ist es für die Auslösung der Apoptose wichtig. Das p53-Protein ist sehr komplex aufgebaut. Deshalb führen schon einfache Punktmutationen dazu, daß das Protein seine Aufgaben nicht mehr vollständig erfüllen kann. Bis heute sind über 100 verschiedene Mutationen des p53-Gens bekannt und alle führen mehr oder weniger zur Tumorentstehung in verschiedensten Geweben, wie Knochenmark, Dickdarm und Leber (Varmus et al. 1994, Strachan et al. 1996).

2.2.3 Mutatorgene

Als Mutatorgene bezeichnet man Gene, die in die Replikation und/oder Reparatur der DNA eingreifen und damit für die Stabilität des Genoms wichtig sind.

Bei der erblichen Form des Kolonkarzinoms (HNPCC = hereditäres nicht polypöses Colon Carcinom oder Lynch-Syndrom) sind bisher sechs verschiedene Gene entdeckt worden, die durch Mutationen zu einer 100-1000 fachen Steigerung der Gesamtmutationsrate im Genom führen, weil die DNA-Reparatursysteme defekt sind (Fishel et al. 1993, Holinski-Feder et al. 1998).

| Erkrankung | Art der Entstehung | Chromosomen Aberration | Involvierte Gene |
|------------------|--------------------|------------------------|------------------|
| CML | Gendefekt | t(9;22)(q34;q11) | BCR, ABL |
| AML Typ M1 u. M2 | Gendefekt | t(15;17)(q22;q11-21) | PML, RARA |
| ALL Typ L1 | Gendefekt | t(1;19)(q21;q23) | PBX1, E2A |
| Wilms-Tumor | Vererbbar | 11p13 | WT-1 |
| Retinoblastom | Vererbbar | 13q14 | RB1 |
| HNPCC | Vererbbar | 2p16 | MSH2 |

Tabelle 2-1: Beispiele von Tumorerkrankungen mit typischen Chromosomenanomalien bzw. Gendefekten.

2.3 Leukämien

2.3.1 Allgemeines

Das Wort Leukämie stammt aus dem Griechischen (leukos = weiß, aema = Blut) und bedeutet „weißes Blut“. Es bezieht sich auf die verbreiterte Leukozytenmanschette (buffy coat) auf der Erythrozytensäule nach Zentrifugieren des Blutes bei Leukämiepatienten mit sehr hohen Leukozytenwerten. Die Leukämie ist eine bösartige Erkrankung der weißen Blutkörperchen, die durch eine diffuse autonome Proliferation einer Leukozytenfraktion definiert ist. Das menschliche Blut besteht zu ca. 45% aus Blutkörperchen und zu 55% aus Blutplasma. Bei den Blutkörperchen unterscheidet man Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten.

Der größte Teil der Leukozyten befindet sich im extravasalen interstitiellen Raum, über 30% der Leukozyten findet man im Knochenmark. Alle Leukozyten stammen wie Erythrozyten und Thrombozyten, von den omnipotenten Stammzellen im Knochenmark ab. Diese omnipotenten Stammzellen sind in der Lage, sich durch Teilung selbst zu reduplizieren. Dies geschieht aber nur maximal 50 mal, danach verlieren die Zellen ihre Fähigkeit zur Reduplikation, wahrscheinlich durch den Verlust von Telomersequenzen bei jeder Zellteilung. Maligne, entartete Zellen überwinden diese Barriere durch die Neusynthese von Telomersequenzen durch Telomerase. Die Differenzierung der einzelnen Stammzellen findet durch zufällige, asymmetrische Teilungen auf der Stammzellebene statt. Dabei werden für die verschiedenen Linien Zellen im Überschuß produziert. Ohne Kontakt mit Zytokinen fallen diese Zellen dem programmierten Zelltod anheim (Apoptose). Die Präsenz von linienspezifischen Zytokinen sorgt auf diese Weise für die Ausreifung von mehr oder weniger Zellen der entsprechenden Linien. Die Zytokine werden von einer Vielzahl von Zellen gebildet und sezerniert und dienen als interzelluläre Mediatoren zur Aktivierung von Zellen.

2.3.2 Einteilung der Leukämien

Die Leukämien werden typischerweise entsprechend den Zellen ihrer Abstammung in myeloisch oder lymphatisch und entsprechend der Geschwindigkeit des klinischen Verlaufs in akut und chronisch unterteilt. Sind beide Zellreihen betroffen, spricht man von einer biphänotypischen Leukämie. Die Klassifizierung einer Leukämie spielt eine entscheidende Rolle, weil sie Informationen über den Charakter der Erkrankung, das Patientenmanagement, die Therapie und vor allen Dingen die Prognose enthält. Nur eine korrekte Klassifikation einer Leukämie ermöglicht eine optimale Behandlung.

2.3.3 Chronisch myeloproliferative Erkrankungen

Hierbei handelt es sich um monoklonale Erkrankungen der myeloischen Stammzellen mit autonomer Proliferation einer oder mehrerer hämatopoetischer Zellreihen (Leuko-, Erythro-, Thrombozytose). Die große Gruppe der chronischen myeloproliferativen Erkrankungen umfaßt vier Typen:

| Erkrankung | Vorwiegend Vermehrung von |
|----------------------------------|--|
| 1. Chronisch myeloische Leukämie | Granulozyten |
| 2. Polycythaemia vera | Erythrozyten |
| 3. Essentielle Thrombozythämie | Thrombozyten |
| 4. Osteomyelofibrose (OMF) | Fibrozyten im Knochenmark → extramedulläre Blutbildung |

Tabelle 2-2: Gruppe der chronisch myeloproliferativen Erkrankungen.

2.3.3.1 Chronisch myeloische Leukämie (CML)

Die chronisch myeloische Leukämie (CML) macht etwa 20% aller Leukämien aus und ist mit einer jährlichen Neuerkrankungsrate von ca. 2 pro 100.000 Einwohner die häufigste Erkrankung in der Gruppe der myeloproliferativen Erkrankungen. Sie tritt mit 3:2 etwas häufiger bei Männern als bei Frauen auf. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei ca. 50 Jahren.

Hierbei handelt es sich um eine Erkrankung einer pluripotenten Stammzelle, die sich zwar weiter bis zum Granulozyten differenzieren kann, sich aber der normalen Wachstumskontrolle entzogen hat, und sich unkontrolliert vermehrt.

Die CML ist eine der bestuntersuchteten Krebsarten und wurde bereits 1845 von Virchow erstmals beschrieben. Eine für diese Erkrankung charakteristische Veränderung ist das Philadelphia-Chromosom, das 1960 erstmals beschrieben wurde (s.Kap. 1.1). Es entsteht durch eine Translokation zwischen Chromosom 9 und 22. Dadurch wird die Proliferation eines bestimmten Zelltyps verstärkt und es kommt zu einer unkontrollierten Vermehrung dieser Zellart.

Die Erkrankung verläuft in drei Stadien (Chronische Phase, Übergangs- oder Akzelerationsphase und Blastenkrise). Die einzige Heilungsmöglichkeit besteht in einer Knochenmarkstransplantation. Medikamente, wie z.B. Chemotherapeutika, können zur Zeit nur den Krankheitsverlauf verlängern. Neuerdings gibt es Tyrosinkinase-Inhibitoren, die gezielt auf die BCR/ABL1-Tyrosinkinase wirken und damit die Vermehrung der Zellen hemmen. Die mittlere Überlebensdauer liegt bei ca. 5-6 Jahren.

2.3.4 Akute Leukämien

Die akuten Leukämien sind maligne klonale Neoplasien der hämatopoetischen Zellen mit diffuser autonomer Proliferation einer Leukozytenfraktion und Ausschwemmung unreifzelliger Blasten ins periphere Blut. Dabei bezieht sich „akut“ auf den klinischen Verlauf, der ohne Therapie innerhalb weniger Monate zum Tode führt.

2.3.4.1 Akute lymphatische Leukämie (ALL)

Die akute lymphatische Leukämie entsteht durch die maligne Entartung unreifer Vorstufen von lymphatischen Zellen, sogenannten Blasten. Die meisten ALL Erkrankungen werden bei Kindern diagnostiziert. Bei ihnen stellt die ALL mit 25% der Krebserkrankungen den häufigsten malignen Tumor dar. Der Altersgipfel liegt zwischen dem 3. und 5. Lebensjahr (Inzidenz 5,3/100.000). Bei älteren Kindern und Jugendlichen ist die Erkrankung seltener. In der Altersgruppe 35-40 Jahre ist die Rate jährlicher Neuerkrankungen mit 0,5/100.000 Menschen am seltensten. Danach steigt sie erneut langsam an und erreicht ein zweites Maximum im Alter über 80 Jahre (Inzidenz 2,3/100.000 Menschen).

Durch moderne Behandlungskonzepte können heute ca. 80% der Kinder geheilt werden (Creutzig et al. 1996). Problematischer ist die Therapie der Erwachsenen. Zu Beginn sprechen die meisten Patienten gut auf die Chemotherapie an, endgültig geheilt werden können aber nur 20-40%. Ein frühes Rezidiv ist prognostisch ungünstig. Die Prognose der Erkrankung ist abhängig vom Alter der Patienten, dem Typ der akuten Leukämie und von der Zytogenetik. Die meisten Patienten sterben durch erworbene Infektionen aufgrund ihrer inkompetenten Immunabwehr.

2.3.4.2 Akute myeloische Leukämie (AML)

Klassifikation

Die akute myeloische Leukämie ist eine maligne Expansion und Reifungsblockierung hämatopoetischer Zellen des Knochenmarks mit variabler Beteiligung der Zellreihen.

Häufig betroffen sind die granulozytäre und / oder die monozytäre Zellreihe, seltener die erythrozytäre und megakaryozytäre.

Die AML werden nach der FAB (French-American-British Arbeitsgruppe) von 1976 in acht Subtypen M0-M7 unterteilt. Im Laufe der Jahre wurde diese Gruppe erweitert, so daß die AML in 11 verschiedene Subgruppen unterteilt werden kann. Ausschlaggebend sind dabei Kriterien wie der Zelltyp (undifferenziert-differenziert), die Zytochemie, die Immunphänotypisierung und die Chromosomenanalyse. Seit der Erstellung der FAB-Klassifikation 1976 wurden viele Fortschritte in der Leukämiediagnostik erzielt. Hierzu trug besonders die Entwicklung zytogenetischer und molekularer Methoden bei. Viele Studien konnten die Relevanz und Vorteile dieser Untersuchungen verdeutlichen, da häufig ein direkter Zusammenhang zwischen der zytogenetischen Analyse, der AML-Subgruppe und der Prognose beobachtet wurde. Diese Daten führten 1999 zu einer neuen Klassifikation, wobei sowohl zytomorphologische, als auch zytogenetische, immunphänotypische und ätiologische Aspekte aufgenommen wurden (Harris et al. 1999, World Health Organization 2001; Haferlach et al. 2002b). In dem Klassifikationsvorschlag der World Health Organization (WHO) zur AML werden in einem ersten Schritt spezifische chromosomale Translokationen als Klassifikationsmerkmal verwendet. Weiterhin geht die Anamnese ein, so daß nun zwischen AML nach MDS und therapie-assoziiertes AML unterschieden wird. Eine weitere Subgruppe stellt die AML mit multilinearer Dysplasie dar, wobei dysplastische Veränderungen in mehreren Zelllinien nachzuweisen sind. Eine akute Leukämie besteht nach dieser Klassifikation schon bei einem Blastenanteil von $\geq 20\%$.

Während einige AML-Subtypen bereits morphologisch gut definiert sind (s. Tabelle 2-3), können andere nur durch weitere immunologische und chromosomale Untersuchungen klassifiziert werden. Entscheidende Rolle spielt hierbei die Zytogenetik. Sie konnte durch den Nachweis nicht zufälliger Chromosomenaberrationen, wie z.B. Translokationen, den Zusammenhang zwischen AML-Subtyp und charakteristischer Chromosomenveränderung herstellen.

| Typ | % von AML | Kennzeichen |
|------|-----------|--|
| M0 | selten | <ul style="list-style-type: none"> • myeloblastär undifferenzierte Blasten • Peroxydase negativ • myel. Immunmarker positiv (CD 13,33,65) |
| M1 | 20 | <ul style="list-style-type: none"> • myeloblastär undifferenzierte Blasten • Peroxydase positiv |
| M2 | 30 | <ul style="list-style-type: none"> • myeloblastär differenziert • mit Auerstäbchen • t(8;21) |
| M3 | 5 | <ul style="list-style-type: none"> • promyeloblastär • mit Haufen und Bündeln von Auerstäbchen • hypergranulär • t(15;17) |
| M3 v | selten | <ul style="list-style-type: none"> • promyelozytär • mikrogranulär |
| M4 | 30 | <ul style="list-style-type: none"> • kombiniert • myeloblastär und monozytär |
| M4Eo | selten | <ul style="list-style-type: none"> • kombiniert • myeloblastär und monozytär mit abnormen Eosinophilen • inv(16) |
| M5a | 10 | <ul style="list-style-type: none"> • monoblastär |
| M5b | selten | <ul style="list-style-type: none"> • promonozytär • monozytär |
| M6 | selten | <ul style="list-style-type: none"> • kombiniert • myeloblastär und erythroblastär |
| M7 | selten | <ul style="list-style-type: none"> • megakaryoblastär |

Tabelle 2-3: Akute myeloische Leukämie – Subtypisierung.

Epidemiologie

Die AML macht etwa 80% aller akuten Leukämien aus, davon sind weniger als 5% dem M0 Subtyp zuzuordnen. Sie trägt zur gesamten Krebssterblichkeit ca. 1-2% bei.

Die Inzidenz der AML nimmt mit dem Alter zu. So steigt die Inzidenz von < 1 bei unter 30jährigen bis auf über 10:100 000/Jahr bei 80jährigen. Die Zahl der durch AML bedingten Todesfälle ist seit 1950 von ca. 1,5 auf 2,5:100.000/Jahr deutlich angestiegen. Diese Beobachtung lässt sich nicht allein mit der verbesserten Diagnostik erklären, sondern lässt auf den zunehmenden Einfluß bestimmter Umweltfaktoren schließen.

Zu den gesicherten auslösenden Faktoren einer AML zählen ionisierende Strahlen, Benzol und antineoplastische Substanzen, wie Alkylantien, Anthrazykline und Podophyllotoxine, die zur Chemotherapie maligner Erkrankungen eingesetzt werden. Auch Rauchen scheint ein leukämogener Faktor zu sein. Eine familiäre Häufigkeit von Leukämien ist bekannt, dies lässt auf eine genetische Disposition schließen. Ebenfalls prädisponierend sind das Down-Syndrom und bestimmte genetische Anomalien.

Symptomatik

Das klinische Bild der initialen Beschwerden und Untersuchungsbefunde ist Ausdruck in erster Linie der hämatopoetischen Insuffizienz und in zweiter Linie der Zellinfiltration von Organen. Die auftretenden Komplikationen, wie Anämie, Thrombopenie und Granulozytopenie sind Folgen der Schädigung der normalen Blutbildung.

Blässe und Müdigkeit sind die häufigsten Symptome der Anämie und treten bei der Mehrheit der Erwachsenen auf. 80% der Patienten haben initial ein Hämoglobin unter 11g/dl. Die mediane Hämoglobin Konzentration beträgt 9g/dl. Schreitet die Krankheit fort, kann dies zu kardiorespiratorischen Symptomen wie Dyspnoe, Tachykardie, Synkope und Angina pectoris, seltener zu Lungenödem und zum Herzversagen führen. Die ineffektive Erythropoese basiert auf einer Reduktion der Stammzellen im Knochenmark. Reife und funktionsfähige Erythrozyten können nicht genügend produziert werden. Im peripheren Blut findet man reichlich Retikulozyten, als Zeichen einer gesteigerten Erythropoese.

Häufig klagen die Patienten zu Beginn der Erkrankung über Fieber und Infekte. Die niedrigen Granulozytenwerte führen zu einer Septikämie. Klinische Zeichen dafür sind z.B. Mundsoor, Gingivahypertrophie oder Infektionen der oberen Luftwege.

60% der Patienten haben Blutungen, die auf eine schwere Thrombozytopenie hinweisen. Das höchste Blutungsrisiko haben Patienten mit einem Thrombozytenwert $< 20.000/\mu\text{l}$. An der Haut zeigen sich kleine petechiale Einblutungen, besonders der abhängigen Körperpartien. Auch Nasenbluten, Zahnfleischbluten und Blutungen im Pharynxbereich sind Ausdruck eines niedrigen Thrombozytenwertes. Auch Einblutungen in die Retina oder in den Glaskörper als seltene Komplikationen sind beobachtet worden. Die gefährlichste Komplikation ist die intrakranielle Blutung, die innerhalb weniger Stunden letal verlaufen kann.

An charakteristischen klinischen Befunden bei der körperlichen Untersuchung zeigen sich:

- Lymphknotenschwellungen
- Hepato-Splenomegalie
- Gingiva-Hypertrophie
- Mundulzera
- Hämorrhagien und
- Hautulzera.

Die Nieren, Lunge, Pleura, das Herz und das Perikard sowie der Gastrointestinaltrakt können mit Lymphomen infiltriert sein, was zu Blutungen in diesen Organen führen kann

Eine ZNS Beteiligung ist selten. In 5-7% der Fälle finden sich leukämische Blasten im Liquor cerebrospinalis ohne klinische Symptomatik. Bei hohen Leukozytenzahlen kommt es gelegentlich zu Verschlüssen kleiner Gehirngefäße durch Blasten mit Nekrosen, Blutungen und schlechter Prognose. Dieses Leukostasesyndrom tritt bevorzugt bei Kindern mit Monoblastenleukämie (M 5) auf.

Diagnostik

Ausschlaggebend für die Diagnostik einer AML ist der Blut - und Knochenmarkbefund im Zusammenhang mit der Anamnese und der körperlichen Untersuchung. Die Diagnosekriterien einer AML wurden von der FAB-Gruppe definiert und sind allgemein akzeptiert (Bennett et al. 1985). Das Blutbild gibt zunächst Auskunft über die Erythrozyten-, Thrombozyten- und Leukozytenzahlen. Dabei kann die Zahl der Leukozyten normal, erhöht oder erniedrigt sein (40% aller Fälle verlaufen subleukämisch). Allein die unreifzelligen Elemente im Blut und Knochenmark sichern die Diagnose. Maßgebend für die Diagnose einer AML ist ein normo-, meist hyperzelluläres Knochenmark. Die Diagnose ist gesichert, wenn die Erythropoese $< 50\%$ und der Blastenanteil $> 30\%$ aller kernhaltigen Zellen im Knochenmark beträgt. Weiterhin findet sich oft parallel dazu eine Anämie und Granulozytopenie. Die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit ist erhöht, eine Erhöhung der Harnsäure und der Lactatdehydrogenase (LDH) weisen auf einen vermehrten Zellumsatz hin.

Therapie

Grundsätzlich besteht die Behandlung der AML in einer supportiven und einer antileukämischen Therapie. Während die Supportivtherapie die Aufgabe hat, die Komplikationen der Leukämie und der antileukämischen Therapie zu beherrschen, muß durch antileukämische Chemotherapie versucht werden eine Vollremission einzuleiten (Remissionsinduktion). Zur Vermeidung von Rezidiven schließt sich daran die Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie an.

Die Supportivbehandlung erst schafft die notwendigen Voraussetzungen für eine erfolgreiche antileukämische Therapie. In erster Linie sind es opportunistische Infektionen durch Bakterien, Pilze und Viren, die mit antimikrobiellen Substanzen prophylaktisch oder empirisch behandelt werden. Die Therapie von Blutungskomplikationen besteht in der Substitution von Blutzellen, Erythrozyten und Thrombozyten sowie in der Verabreichung von Gerinnungsfaktoren. Der Einsatz hämatopoetischer Wachstumsfaktoren ist eine spezielle Form der Supportivtherapie. Am gebräuchlichsten sind G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) und GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor). Diese Zytokine werden im Anschluss an die Chemotherapiezyklen eingesetzt um die Regeneration der Granulozyten aus der Aplasie zu beschleunigen.

Ziel der antileukämischen Therapie ist zunächst die Herbeiführung der Remission und im Anschluß daran eine möglichst lange oder endgültige

Erhaltung dieses Zustandes. Kennzeichen der Remission sind: Beseitigung der Leukämiezellen und volle Regeneration der normalen Blutzellen.

In der ersten Phase der Induktions-Chemotherapie wird mit ein bis zwei Therapiezyklen eine Knochenmarkaplasie herbeigeführt. Dabei kommt es zu einer gleichzeitigen Beseitigung der leukämischen Blasten und der restlichen normalen Markzellen und zur Rekonstitution einer normalen Hämatopoese, aus der sich die Remission entwickelt.

Die Postremissionstherapie besteht aus wiederholten Chemotherapie-zyklen, zunächst als Konsolidierungstherapie, später als Erhaltungs-therapie mit Zyklen geringerer Intensität.

Für die Knochenmarktransplantation in Remission werden außerdem myeloablative Therapieformen, entweder als hochintensive Chemotherapie oder als Ganzkörperbestrahlung, eingesetzt. Bei der allogenen Knochenmarktransplantation kommt zudem der antileukämische Effekt des transplantierten Spenderimmunsystems zum Tragen.

Möglich sind die allogene Transplantation von einem HLA-identischen Geschwister und die autologe Transplantation, entweder als Knochenmarktransplantation oder auch als Blut-Stammzelltransplantation. Die allogene Transplantation hat heute erste Priorität bei Patienten unter 55 Jahren und vorhandenen Geschwisterspendern. In erster Remission angewendet zeigt sich die Knochenmarktransplantation einer alleinigen Chemotherapie in den Langzeiteffekten überlegen, da neben der myeloablativen Vorbehandlung auch der Graft-versus-leukemia-Effekt zum Tragen kommt.

Die Chemotherapie der AML hat sich in den letzten 20 Jahren stark weiterentwickelt. Die alleinige Gabe einer Substanz ist heute obsolet. Vielmehr finden sich Kombinationen von verschiedenen Chemotherapeutika, um eine schnellere komplette Remission zu erreichen. Die beiden wichtigsten antileukämischen Substanzgruppen, die zur Behandlung der AML eingesetzt werden sind die Cytosin-Arabinoside (ARA-C) und die Anthrazykline/Anthrachinone Daunorubicin, Doxorubicin, Idarubicin, Mitoxantron. Zusätzlich wird mit Etoposid, 6-Thioguanin, Cyclophosphamid und Busulfan die Therapie komplettiert. Bezüglich der Intensität lassen sich drei Stufen unterscheiden:

1. Chemotherapie in Standarddosierung, z.B. TAD (TAD: 6-Thioguanin, ARA-C und Daunorubicin)
2. Chemotherapie mit Hochdosis ARA-C, z.B. HAM (HAM: ARA-C und Mitoxantron) und
3. myeloablative Therapie, z. B. Hochdosis Busulfan-Cyclophosphamid, allerdings nur in Verbindung mit einer Knochenmaktransplantation.

So haben möglichst zwei Induktionszyklen, Hochdosis ARA-C in der Induktionssphase und Hochdosis ARA-C in der Konsolidierung, sowie eine ausreichend intensive und mehrjährige Erhaltungstherapie einen günstigen Einfluss auf die Langzeitergebnisse (Remissionsdauer, Heilungsrate).

Die Gruppe der AML setzt sich, wie bereits oben erwähnt, aus elf Subtypen mit jeweils eigener Biologie und Ätiologie zusammen. Diese Unterschiede wirken sich auf die Langzeitergebnisse der Chemotherapie und damit auch auf die Prognose aus. Die Prognose der AML ist abhängig vom Alter des Patienten, der Dynamik der Leukämie (Leukozytenzahl, Höhe der Laktatdehydrogenase im Serum) und der genetischen Disposition (Down-Syndrom, Li-Fraumeni-Syndrom, Neurofibromatose Typ 1).

Prognose

Man unterscheidet eine de-novo AML von einer sekundären AML. Beide Formen unterscheiden sich hinsichtlich der Biologie der Erkrankung und dem therapeutischen Ansprechen. Die sekundäre AML, die z. B. aus einem myelodysplastischen Syndrom hervorgegangen ist, weist ein therapeutisch schlechteres Ansprechen auf eine Chemotherapie auf.

Anhand einer Reihe prognostischer Faktoren lässt sich das Ansprechen auf eine Therapie abschätzen. Als prognostisch ungünstige Faktoren gelten:

- hohes Alter (> 60 Jahre)
- schlechter Allgemeinzustand bei Diagnosestellung
- hohe Leukozytenzahl
- vorangegangene hämatologische Erkrankung (z. B. MDS)
- FAB M0, M6 und M7
- ungünstige Zytogenetik (Trisomie 8, Aberrationen von Chromosom 5 oder 7, t(6;9), t(9;22), 11q23 Aberrationen und komplex aberrante Karyotypen)
- sekundäre Leukämien.

Dagegen sind prognostisch günstige Faktoren:

- Promyelozyten Leukämie (FAB M3)
- günstige Zytogenetik (t(15;17), inv (16), t(8;21)).

Die Gruppe mit der besten Prognose zeigt eine Translokation t(8;21) (FAB M2) oder eine Inversion von Chromosom 16 inv(16) (FAB M4 E₀). Die t(8;21) und die inv(16) sind zwei der am häufigsten wiederkehrenden zytogenetischen Anomalien der de novo AML bei Patienten jünger < 45 Jahre.

Sie machen 15-20% aller Anomalien in dieser Altersgruppe aus (Nucifora et al. 1995). Die Komplettremissionsrate liegt bei über 80%, die Anzahl der Patienten mit anhaltender Remission nach 5 Jahren bei etwa 70%.

Die Gruppe mit der schlechtesten Prognose zeigt zytogenetische Anomalien an den Chromosomen 3q, 5, t(6;9), 7, 11q23 und komplexe Aberrationen. Die Remissionsrate beträgt 50%, eine anhaltende Remission nach 5 Jahren wird nur bei 10% der Patienten gesehen.

Andere chromosomale Anomalien sind einer Intermediärgruppe zuzuordnen. Hier liegt die Komplettremissionsrate bei etwa 70%, die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei ca. 30%.

Der Grund für die schlechte Prognose der AML M0 ist zur Zeit noch unklar, aber mehrere Faktoren scheinen dabei eine Rolle zu spielen. Diese minimal differenzierte Leukämie zeigt viele Merkmale von Stammzellen und solche Leukämieformen sind relativ resistent gegenüber Chemotherapeutika. Außerdem findet sich bei der AML M0 das p-170 Protein, das normalerweise von Stammzellen exprimiert wird und eine multidrug Resistenz vermittelt (Campos et al. 1992). Weiterhin beobachtet man bei der AML M0 häufig eine hohe Inzidenz von ungünstigen Chromosomenaberrationen, die auch zur schlechten Prognose beitragen.

2.4 Zielsetzung dieser Arbeit

1. Welche typischen Chromosomenveränderungen gibt es bei der AML M0?
2. Lassen sich Tendenzen zu bestimmten chromosomalen Regionen feststellen?
3. Sind die Chromosomenveränderungen mit denen in der Literatur vergleichbar?
4. Sind diese genetischen Veränderungen mit einem aggressiverem Verlauf der Erkrankung erklärbar?
5. Welche Therapieoptionen gibt es für die Zukunft?

3 Material und Methoden

3.1 Methoden zum Nachweis hämatologischer Erkrankungen

3.1.1 Knochenmarkuntersuchung

3.1.1.1 Zytologische Diagnostik

Die Knochenmarkaspiration sollte an unbestrahlten Knochen durchgeführt werden, nach einer Chemotherapie sollte man bis zur vollständigen Regeneration der Blutwerte warten. Typischerweise wird eine Beckenkammpunktion nach vorheriger Lokalanästhesie durchgeführt (Spina iliaca posterior superior), die Sternumpunktion ist nur noch in Ausnahmefällen indiziert, wenn das Becken vorher bestrahlt wurde. Das gewonnene Material, ca. 3 ml Knochenmark wird sofort nach Aspiration auf einen Objektträger aufgestrichen und ins Labor gebracht. Diese Untersuchung des Knochenmarks ist die wichtigste hämatologische Untersuchung und die Basis jeder weiterführenden hämatologischen Diagnostik. Da die Methode eine sehr gute Beurteilung der Einzelzelle zuläßt, ist sie das diagnostische Standardverfahren für alle Störungen der Hämatopoese sowie für alle lymphatischen Erkrankungen mit der Tendenz zur leukämischen Aussaat. Bei der Auswertung der Befunde geht es primär darum, hämatologische Systemerkrankungen nachzuweisen oder auszuschließen. Ein unauffälliges Punktionsergebnis schließt eine Erkrankung mit herdförmigen Infiltraten keinesfalls aus (z.B. beim Plasmozytom). Ein weiterer Nachteil ist, daß diese Untersuchungsmethode sehr stark von der Erfahrung des Untersuchers abhängig ist.

3.1.1.2 Zytochemische Diagnostik

Zytochemische Methoden werden zur Diagnostik und Klassifikation von Leukämien herangezogen. Die Zellen der AML M0 zeigen zytologisch und zytochemisch keine granulozytäre Reifung.

Die Period-Acid-Schiff-Reaktion (PAS) weist zytoplasmatisches Glykogen nach, das sich vor allem in Zellen der lymphozytären Reihe findet. Ist die PAS-Reaktion positiv, stammen die Zellen von der lymphozytären Reihe ab, ist sie negativ geht man von einer myeloischen Natur der Zellen aus.

Bei der Esterase-Reaktion (EST) kommt es nicht auf Positivität oder Negativität an, sondern auf das Reaktionsmuster.

Esterasen finden sich in allen Blutzellen in unterschiedlicher Aktivität. Die Monozyten zeigen dabei die höchsten, das gesamte Zytoplasma überziehenden Reaktionen, im Gegensatz zu unreifen Zellen der Granulopoese, mit einer eher fleckförmigen Verteilung des Enzyms. Die Esterase-Reaktion eignet sich zum Nachweis der Zugehörigkeit unreifer Zellpopulationen zur monozytären Reihe. Die Peroxidase (POX) ist ein zytoplasmatisches Enzym. Der Peroxidase-Nachweis wird insbesondere zur Abgrenzung morphologisch undifferenzierter akuter myeloischer und akuter lymphatischer Leukämien verwendet. Dabei ist der positive Nachweis in den Blasten nicht so entscheidend. Die Blasten unterscheiden sich, was Zytoplasmaweite, Kernlokalisierung, Chromatinstruktur und Aussehen der Nukleolen betrifft. Nach Definition sind weniger als 3% der Blasten bei der AML M0 in der Peroxidase positiv. Denn Peroxidase positive Zellen, die diesen Kriterien nicht entsprechen, können auch frühe Promyelozyten oder Blasten der residualen normalen Hämatopoese sein. Besonders wichtig bei dieser Technik ist die gute Beurteilbarkeit der Kernstruktur, sonst ist eine Auswertung nur sehr schlecht möglich.

3.1.2 Immunphänotypisierung (Oberflächenmarkeranalyse)

Die Immunphänotypisierung ist eine Methode zur Analyse der Expression verschiedener Antigene auf der Oberfläche von Zellen. Aus dem Expressionsmuster lassen sich Rückschlüsse auf Zugehörigkeit zu einer bestimmten Zellreihe und dem Differenzierungsgrad der Zellen ziehen. Besondere Bedeutung hat die Immunphänotypisierung bei der Klassifikation von akuten und chronischen Leukämien, sowie bei Non-Hodgkin-Lymphomen. Mit der Entwicklung monoklonaler Antikörper war es möglich Zellen anhand ihrer Oberflächenantigene zu erkennen und zu typisieren. Für die Benennung der Antigene wird die sogenannte CD-Nomenklatur (Cluster of differentiation) verwendet. Die akute myeloische Leukämie wird auf dem Boden von Zytomorphologie und Zytochemie diagnostiziert. Die einzigen Ausnahmen sind die AML M0 und AML M7. Darüberhinaus liegen für einige bei der AML auftretende Aberrationen typische Immunphänotypen vor, wobei diese Korrelationen jedoch nicht vollständig sind und daher nur einen wegweisenden Stellenwert haben. Die AML M0 ist sehr undifferenziert, sodaß die Diagnose nicht allein morphologisch gestellt werden kann. Die Immunphänotypisierung nimmt die Abgrenzung gegenüber der ALL vor und weist die Expression von CD 13, CD 33 und CD 117 nach sowie andere myeloische Marker bei

gleichzeitiger Negativität für lymphatische Antigene bzw. nicht ausreichendem Score für die Diagnose einer biphenotypischen Leukämie. In etwa der Hälfte der Fälle kann trotz der zytochemischen Negativität für POX durchflußzytometrisch eine Expression von MPO nachgewiesen werden.

Tabelle 3-1 zeigt eine Auswahl von monoklonalen Antikörpern, die zur Zelltypisierung, vor allem bei der AML M0 eingesetzt werden. Hierbei zeigt sich typischerweise eine Positivität für myeloische Antigene (CD 11, CD 13, CD 14, CD 15, CD 33, CD 34) bei gleichzeitiger Negativität für lymphatische Antigene (Bennett et al. 1991).

| Cluster of differentiation (CD) | Zelltyp | Antigen |
|---------------------------------|--|---|
| CD 34 | myeloische und lymphoide Vorläuferzellen | 105-120kDa Glykoprotein |
| TdT | nukleäre Expression in lymphat. Vorläuferzellen | terminale Desoxynucleotid- Transferase |
| HLA-DR | B-Lymphozyten, aktivierte T-Lymphozyten, Monozyten, Vorläuferzellen | |
| CD 7 | T-Zellen, NK-Zellen, unreife myeloische Zellen | 40kDa Protein, gp 40 |
| CD 117 | myeloische Vorläuferzellen | C-kit, Stem-cell-factor-Rezeptor |
| MPO | unreife myeloische Zellen, Neutrophile und Monozyten | Myeloperoxidase |
| CD 13 | myeloische Zellen | Aminopeptidase N |
| CD 33 | Monozyten, myeloische Vorläuferzellen | 67kDa Glykoprotein |
| CD 65 | Neutrophile | Ceramide- Dodecasaccharide 40 |
| CD 14 | Monozyten | LPS-Rezeptor |
| CD 19 | Vorläufer B-Zellen, B-Zellen | |
| CD 2 | T-Zellen, die meisten NK-Zellen | Ligand d. Leukozytenfunk- tionsantigens 3, gp 50 |
| CD 4 | Helper/ Inducer-T-Lymphozyten, Monozyten, unreife myeloische Zellen | Rezeptor für MHC-Klasse-II-Moleküle und HIV, gp 59 |

Tabelle 3-1: Auswahl von monoklonalen Antikörpern bei AML M0.

Gekoppelt an fluoreszierende Farbstoffe oder Enzyme kann die Antikörperreaktion sichtbar gemacht werden. Zur Phänotypisierung benutzt man

- die Immunzytochemie,
- die mikroskopische Fluoreszenz-Immunzytologie und
- die Durchflußzytometrie.

Das Standardverfahren ist derzeit die Durchflußzytometrie. Sie erlaubt zwar keine unmittelbare morphologische Klassifizierung der Zellen, dafür aber eine objektive Messung. Damit ist auch für einen Untersucher ohne diagnostische morphologische Erfahrung eine Auswertung möglich. Allerdings muß das Ergebnis mit dem zytochemischen Befund abgeglichen werden, da kein Antigen eine 100%ige Spezifität besitzt.

Eine immunologische Typisierung neoplastischer Zellen ist immer dann notwendig, wenn eine eindeutige Charakterisierung morphologisch nicht möglich ist. Damit ist die Immunphänotypisierung ein wichtiges Verfahren bei allen akuten lymphatischen Leukämien und leukämischen lymphoproliferativen Erkrankungen, bei denen morphologisch Zweifel an einer eindeutigen Zuordnung besteht.

3.2 Methoden zum Nachweis von Chromosomenveränderungen

3.2.1 Konventionelle Chromosomenbandenanalyse

Die konventionelle oder klassische Chromosomenanalyse ist nach wie vor die zentrale Methode der Tumorzytogenetik. Dabei werden die Träger der Erbinformationen, die Chromosomen, im Stadium der Metaphase mithilfe unterschiedlicher Methoden der Chromosomenbandenfärbung lichtmikroskopisch sichtbar gemacht. Sie erlaubt die Identifizierung von numerischen und strukturellen Chromosomenveränderungen und verschafft einen Überblick über das Genom in einzelnen, sich teilenden Zellen. Dadurch können genetische Veränderungen in unterschiedlichen Zellpopulationen nebeneinander untersucht und z.B. Anhaltspunkte für eine klonale Evolution der Leukämie gewonnen werden. Die Chromosomenbänderung erlaubt die Identifizierung einzelner Chromosomen.

Veränderungen in dem für ein bestimmtes Chromosom typischen Bänderungsmuster deuten auf strukturelle Aberrationen wie Translokationen, Deletionen oder Inversionen hin (Mitelman et al. 2001). Da es bei Leukämien verhältnismäßig einfach ist, Probenmaterial zu gewinnen, Tumorzellen anzuzüchten und Metaphasen zu erhalten, sind die Leukämien von allen malignen Tumoren die am besten untersuchten (Raimondi 1993; Mitelman et al. 1998).

Die klassische Zytogenetik ist aber auch mit Nachteilen behaftet (Le Beau 1993): zur Präparation von Metaphasezellen sind frische, teilungsfähige Zellen erforderlich. Auch wenn teilungsfähige Zellen kultiviert worden sind, ist oft aufgrund schlechter Chromosomenmorphologie oder unzureichender Metaphasenspreitung eine Identifizierung der Chromosomen und das Erkennen struktureller Veränderungen nicht möglich. So ist bei 5-10% der Patienten mit akuter myeloischer Leukämie aufgrund unzureichender Metaphasenqualität mit der konventionellen Zytogenetik der Karyotyp nicht eindeutig zu bestimmen (Bloomfield et al. 1987) und chromosomale Veränderungen können so dem Nachweis entgehen.

3.2.1.1 Molekularzytogenetische Untersuchungsmethoden - Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Lokalisierung von bestimmten DNA-Sequenzen im menschlichen Chromosomensatz kann dadurch erfolgen, daß man sie markiert und auf intakte Metaphase-Chromosomen hybridisiert. Die markierte DNA-Sequenz wird auch DNA-Sonde genannt, weil man mit ihrer Hilfe bestimmte Chromosomensequenzen aufspüren kann (Strachan et al. 1996).

Früher erfolgte die Markierung der DNA-Sonde meist durch radioaktive Isotope, inzwischen wurden aber für diesen Zweck modifizierte Nukleotide eingeführt, die ein kovalent gebundenes Reportermolekül enthalten (z.B. Biotin oder Digoxigenin). Diese Reportermoleküle können durch Anlagerung eines fluoreszenzmarkierten Affinitätsmoleküls sichtbar gemacht werden (Scherthan et al. 1989). Die Fluoreszenzmarkierung kann entweder direkt oder indirekt erfolgen.

Um eine gute Fluoreszenzintensität zu erhalten werden meist große DNA-Moleküle als Sonden verwendet (ca. 40 kb). Solche großen DNA-Stücke enthalten aber sehr häufig auch repetitive Sequenzen, die an vielen Stellen im Chromosomensatz unspezifisch hybridisieren können. Deshalb wird in solchen Fällen eine chromosomale in situ Suppressions-Hybridisierung vorgeschaltet.

Darunter versteht man, daß vor der eigentlichen Hybridisierung die DNA-Sonde mit einem Überschuß an unmarkierter chromosomaler Gesamt-DNA versetzt und anschließend denaturiert wird. Damit werden die repetitiven Sequenzen abgesättigt und die unspezifischen Signale unterdrückt (Lichter et al. 1992). Eine schematische Übersicht zur FISH-Diagnostik zeigt Abbildung 3-1.

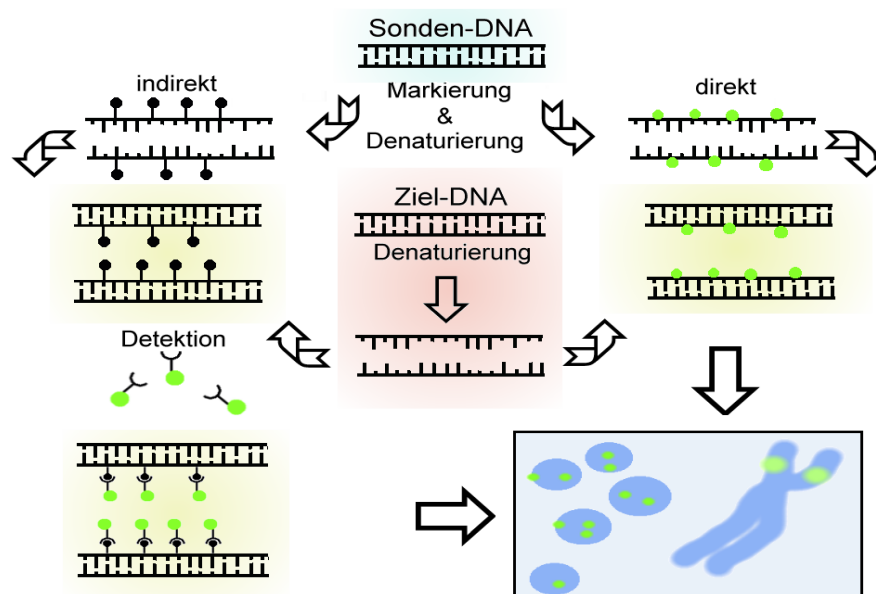


Abbildung 3-1: FISH-Schema.

3.2.1.2 Chromosome Painting

Als „chromosome painting“ wird eine besondere Form der FISH-Anwendung benannt mit der man einzelne Chromosomen oder auch Chromosomenregionen spezifisch anfärben kann. Die entsprechenden Sonden werden mit Hilfe chromosomenspezifischer DNA-Banken aus vielen DNA-Fragmenten hergestellt. Das Hybridisierungssignal setzt sich dementsprechend aus vielen Einzelsignalen zusammen, die über das ganze Chromosom verteilt sind und es durchgehend anfärben (painting). Man kann auch verschiedenfarbige Fluoreszenzmarkierungen in unterschiedlichen Konzentrationen einsetzen und erhält dann zahlreiche Farbabstufungen, die eine gleichzeitige Unterscheidung aller Chromosomen erlauben. Dieses Verfahren wird als Multicolor-FISH bezeichnet (Ried et al. 1998).

Für die Markierung chromosomaler Regionen wird zunächst durch Mikrodissektion die DNA aus dem entsprechenden Chromosomenbereich gewonnen. Aus den daraus angelegten DNA-Banken können dann spezifische DNA-Sonden hergestellt werden. Durch die Kombination mehrerer solcher Sonden läßt sich auf den Chromosomen ein charakteristisches Bandenmuster erzeugen (Chudoba et al. 1999).

3.2.1.3 Diagnostische Einsatzmöglichkeiten von FISH-Sonden

Die FISH-Technik und ihre Sonderformen haben insbesondere den großen Vorteil, daß man mit ihnen chromosomale Umbauten erkennen kann, die mit den klassischen Bänderungstechniken oft nicht nachweisbar sind (Adinolfi et al. 1994; Ruppertsberger et al. 1991). Die Anwendung der normalen Bänderungsanalyse ist in der Tumozytogenetik vor allem dadurch stark eingeschränkt, daß die präparierten Metaphasen oft eng zusammenliegende und stark kontrahierte Chromosomen enthalten. In solchen Fällen kann mit den FISH-Techniken durchaus noch festgestellt werden, ob z.B. bestimmte Abschnitte eines Chromosoms fehlen oder verlagert wurden. Auch die Zusammensetzung sogenannter Markerchromosomen kann aufgeklärt werden. Soweit die entsprechenden Sonden zur Verfügung stehen ist es möglich die Amplifikation von Onkogenen bzw. den Verlust von Tumorsuppressorgenen oder Mutatorgenen nachzuweisen (Cremer et al. 1988; Bruckert et al. 2000). Der Nachteil der FISH-Technik besteht darin, daß vor dem Experiment die Wahl einer geeigneten Sonde getroffen werden muß. Somit muß man sich auf einen kleinen Ausschnitt eines Genoms beschränken. Es ist bisher nicht möglich, das gesamte Genom nach möglichen Veränderungen abzusuchen und neue, bisher unbekannte Veränderungen zu erkennen, da man für unbekannte Zielsequenzen keine geeignete Sonden herstellen kann. Man muß also vorher wissen, nach was man sucht.

3.2.2 Molekularzytogenetische Untersuchungsmethoden:

Die vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)

Möchte man in einem Chromosomensatz ein nicht genau zu identifizierendes, verändertes Chromosom genauer charakterisieren, so kann man das entsprechende Genom mittels Durchflußzytometrie oder Mikrodissektion genauer isolieren und die DNA des Chromosoms als Sonde einsetzen. Das bedeutet, daß die zu untersuchende DNA als Sonde eingesetzt wird. Diese Sonde läßt man auf normale Metaphasechromosomen hybridisieren. Die DNA des unbekanntes Chromosoms wird die entsprechenden Chromosomen der Metaphase anfärben. Die Chromosomen des gesunden Satzes sind leicht zu identifizieren und verraten die Herkunft der DNA und damit die Zusammensetzung des veränderten Chromosoms. Die comparative genomische Hybridisierung ist eine Weiterentwicklung des „reverse chromosome painting“ (Carter et al. 1992; Joos et al. 1993; Carter 1994). Sie ermöglicht in einem einzigen Hybridisierungsexperiment überblicksartig die Bestimmung der Chromosomen und Chromosomenregionen, die in einem Test-Genom über- oder unterrepräsentiert sind. Bei dieser Methode wird die gesamte genomische DNA einer zu untersuchenden Zellpopulation zusammen mit einer Referenz-DNA auf normale Metaphasechromosomen hybridisiert. Die Referenz-DNA stammt von einem gesunden Spender und enthält demnach außer eventuell vorhandenen genetischen Polymorphismen kein über- oder unterrepräsentiertes genetisches Material. Test- und Referenz-DNA sind unterschiedlich markiert und können mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen dargestellt werden (z.B. Grün für Test-DNA, Rot für Referenz-DNA). Test- und Referenz-DNA werden zu gleichen Teilen gemischt. Die unterschiedliche Anfärbung läßt sich meist schon mit bloßem Auge erkennen, für eine zuverlässige Auswertung ist eine digitale Bildauswertung mit computerunterstützter Berechnung der Färbeverhältnisse notwendig (s. Abbildung 3-2).

Die CGH-Technik hat den großen Vorteil, daß man mit ihr Tumoren auf das Vorliegen von Chromosomenveränderungen untersuchen kann ohne dabei Metaphasen aus dem Tumorgewebe gewinnen zu müssen. Damit werden auch die vielen Tumoren einer Chromosomenanalyse zugänglich, bei denen keine Spontanmitosen auftreten und die auch in der Zellkultur keine Proliferation zeigen. Außerdem besteht nicht die Gefahr, daß bei der zytogenetischen Untersuchung nur Metaphasen von Zellklonen erfaßt werden, die sich in der Zellkultur besonders schnell vermehren. Bisher ist das Auflösungsvermögen der CGH noch begrenzt, weshalb nur das Fehlen bzw. der Zugewinn relativ großer

Chromosomenstücke mit Hilfe des Fluoreszenzprofils sicher nachgewiesen werden können. Auch Veränderungen im Zentromerbereich der Chromosomen lassen sich nicht erkennen, weil dort viele repetitive Sequenzen, deren Fluoreszenz bei der CGH mit unmarkierter DNA unterdrückt wird (Kallioniemi et al. 1994). Mit Hilfe der CGH wurden schon zahlreiche Ergebnisse z.B. bei Tumoren erzielt. So wurde z.B. beim Mammakarzinom festgestellt, daß der Zugewinn chromosomaler DNA im Bereich 8q eine schlechte Prognose zeigt (Isola et al. 1995). Auch bei vielen anderen Tumoren fanden sich im fortgeschrittenen Stadien DNA-Vermehrungen im Bereich 8q(11). Da dort das MYC-Onkogen lokalisiert ist, liegt die Vermutung nahe, daß eine Überrepräsentation dieses Gens mit der Tumorprogression in Zusammenhang steht (Bernardino et al. 1998).

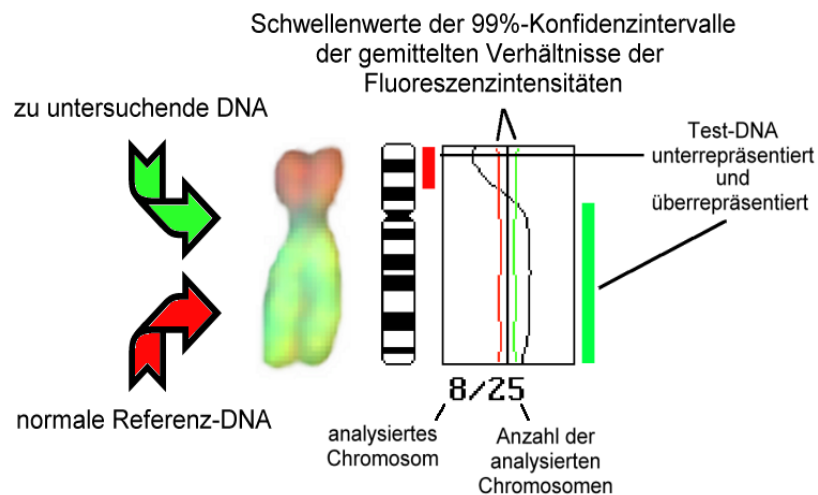


Abbildung 3-2: *Schema der CGH-Analyse.*

3.3 Chromosomenbandenanalyse

3.3.1 Probenentnahme und Transport

Die Chromosomenanalysen erfolgten an Knochenmarkzellen aus Sternal- und Beckenkammpunktionen und/oder aus Zellen des peripheren Blutes. Von den Einsendern wurde beachtet, daß eine Materialentnahme immer vor Einleitung einer zytoreduktiven Therapie erfolgen mußte, da nach Therapiebeginn das Ergebnis verfälscht werden würde.

Die Proben sollten innerhalb eines Tages im Labor eintreffen, da sich nach der Entnahme das Milieu, in dem sich die Zellen befinden, verändert: Nährstoffangebot, Abtransport von Stoffwechselprodukten, Regulation des Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushaltes sind nicht mehr gewährleistet. Dies beeinträchtigt insgesamt die Zellausbeute, verändert aber nicht die Zusammensetzung der einzelnen Zellpopulationen. Man kann immer davon ausgehen, daß sich der Anteil maligner Zellen verringert, da sie einerseits der spontanen Apoptose anheim fallen und andererseits von fremden Zellen überwuchert werden können (Williams et al. 1984). Mindestens 2-3 ml Knochenmarkaspirat und 5-10 ml Blut, mit Li-Heparin versetzt, wurden unmittelbar nach Entnahme per Expresspost an das Tumorzytogenetik Labor versandt und dort umgehend untersucht.

3.3.2 Zellkulturen

Für die Zellkulturen werden kommerziell erhältliche Nährstofflösungen verwendet, um den Leukämiezellen möglichst optimale Wachstumsbedingungen in vitro anzubieten. Um das natürliche Zusammenspiel zwischen Blut- und Stromazellen nicht zu zerstören, wird das Probenmaterial ohne größere Manipulation oder Auftrennung der zellulären Bestandteile direkt in die Kulturen eingesetzt (McGinnes et al. 1991; Manabe et al. 1992; Eder et al. 1992). Es gibt Hinweise darauf, daß Leukämiezellen verstärkt auf einen Nebenstoffwechselweg zurückgreifen, bei dem der DNA Baustein Thymidintriphosphat direkt aus Thymidin gewonnen wird (Wilmanns 1967; Hallek et al. 1992). Um einen vermehrten Bedarf der leukämischen Zellen zu decken, werden auch die Kulturen mit Thymidin versetzt. Außerdem fügt man den Kulturen Antibiotika hinzu, um eine Überwucherung durch Pilze oder Bakterien zu verhindern. Die Dauer der Zellkultivierung kann sich unterschiedlich auf das Wachstum verschiedener Zellarten auswirken, weshalb für jede Probe verschiedene Kulturen mit unterschiedlichen Kulturzeiten

angesetzt werden (Knuutila et al. 1981; Stewart und Secker-Walter 1986; Li et al. 1991).

Lösungen:

| | |
|--------------------------|---------------------------------|
| McCoy`s Nährmedium | Fa. GIBCO BRL/Life Technologies |
| RPMI 1640 Nährmedium | Fa. PAN Biotech (GIBCO BRL) |
| Antibiotikalösung | GIBCO BRL/Life Technologies |
| | 10000 IE Penicillin G/ml |
| | 10000 µg/ml Streptomycin |
| | 25 µg/ml Amphotericin B |
| Fötale Kälberserum (FKS) | Fa. Life Technologies |
| Thymidin | Fa. Life Technologies |

Ansetzen der Nährlösung:

Als Kulturmedium diente 1 ml FKS, gemischt mit 4 ml der Nährmedien RPMI 1640 oder McCoy`s 5a. Die Nährmedien wurden vorher mit der Antibiotikalösung versetzt (1 ml Antibiotikalösung auf 100 ml Nährlösung). Ein Teil der Kulturen wurde mit Thymidin (4ng/ml) angesetzt. Pro Ansatz wurden nicht mehr als 0,5 ml KM-Aspirat oder peripheres Blut verwendet. Die Kulturen wurden in Zentrifugenröhrchen (Fa. Harre) bei 37°C für 24h, 48h, und 72h im Wärmeschrank, Kurzzeitkulturen für 4h im 37°C warmen Wasser, inkubiert.

3.3.3 Chromosomenpräparation

Während der Metaphase der Zellteilung sind die Chromosomen maximal kondensiert und somit optimal darstellbar. Fügt man den Zellkulturen in dieser Phase Colcemid®, eine chemisch modifizierte Form des Colchizins, zu, kommt es zur Hemmung der Ausbildung des Spindelapparates, wodurch sich teilende Zellen in der Metaphase arretiert werden. Durch gleichzeitige Gabe von DNase kann überschüssige, freie DNA verdaut und die Chromosomenqualität

verbessert werden. Danach lässt man die Zellen in hypotoner Kaliumchloridlösung quellen. Die Zellen dehnen sich dadurch aus und dies führt zu einer besseren Verteilung der Metaphasechromosomen. Damit die Struktur der Metaphasechromosomen dauerhaft erhalten bleibt, werden sie in mehreren Waschgängen mit Carnoy's Fixativ, einem Essigsäure-Methanol-Gemisch, behandelt. Dabei kommt es zur Auflösung der Zellmembran. Die fixierten Zellen werden auf Objektträger aufgetropft und die Chromosomen können durch das Lichtmikroskop auf numerische oder strukturelle Veränderungen untersucht werden.

Für die zytogenetische Befundung ist eine übersichtliche Metaphasenspreitung von großer Bedeutung. Die einzelnen Chromosomen sollten in voller Ausdehnung sichtbar sein, nicht übereinander liegen, aber auch nicht völlig versprengt sein. Verschieden Faktoren spielen dabei eine Rolle: die Objektträger müssen sauber und fettfrei sein, am besten leicht mit Wasser benetzt sein. Temperatur und vor allem die Auftropfhöhe sind wichtige Einflußgrößen und können ggf. variiert werden (Weiss et al. 1999).

Lösungen

| | |
|------------------------------|--|
| Hypotone Kaliumchloridlösung | 0,075 M KCL-Lösung |
| Colcemid® | 10µg/ml, Fa. Life Technologies |
| DNase | 100µg/µl in 50% Glycerin, Fa. Boehringer |
| Carnoy's Fixativ | Methanol:Eisessig = 3:1, -20°C kalt Methanol, Eisessig, Fa. Merck |

Vorgehen

Zwei Stunden vor Ende der Inkubationszeit wird den Kulturen 0,1 ml Colcemid® und 50µl der DNase Lösung zugegeben. Danach zentrifugiert man die Zellen bei 1000 U/min für 7 Minuten, nimmt den Überstand mit der Pipette ab und schüttelt das Sediment vorsichtig wieder auf. Unter ständigem, langsamen Schütteln (Vortex, Stufe 1) tropft man ca. 9 ml hypotone Kaliumchloridlösung hinein und läßt diese für 15 Minuten einwirken. Nach erneuter Zentrifugation bei 700 U/min, Abnahme des Überstandes und Aufschütteln der Zellen, fixiert man sie, indem man langsam unter ständigem Schütteln (Vortex, Stufe 1) 5-7 ml Carnoy's Fixativ hinzu gibt. Besonders wichtig für die Chromosomenqualität ist, daß dieser Schritt besonders vorsichtig und langsam passiert. Anschließend erfolgt erneut eine Zentrifugation bei 900 U/min für 7 Minuten, Abnahme des Überstandes, Resuspension und Zugabe von Fixativ. Man wiederholt die letzten Schritte zur Waschung der fixierten Zellsuspension.

Zum Schluß stellt man sich eine Auftropflösung mit einer geeigneten Konzentration an Zellkernen her, indem man nach der letzten Abzentrifugation mehr oder weniger Fixativ abnimmt und das Sediment zu einer homogenen Suspension aufmischt.

Die Objektträger werden für zwei Stunden in 100% vergällten Alkohol eingelegt, danach mehrmals mit destilliertem Wasser abgespült um sie dann mit Eiswürfeln und Aqua bidestilata (eisgekühlt) zu benutzen. Man tropft dann die Suspension aus verschiedenen Höhen auf den mit Wasser benetzten Objektträger, kippt den Überschuß seitlich weg, um die Präparate dann luftzutrocknen.

3.3.4 Chromosomenbandenfärbung mit Giemsa

Lösungen

| | |
|---------------------|--|
| Giemsalösung | Azur-Eosin-Methylenblau, Fa. Merck |
| Phosphatpuffer | 3,6 mM KH_2PO_4 , 2,75 mM Na_2HPO_4 , pH 7,2 |
| Modifiziertes 2xSSC | 0,03 M tri-Natriumcitrat 0,095 M NaCl |

Vorgehen

Für die Giemsa-Bandenfärbung wurden die bis zu drei Tage alten Chromosomen über Nacht in einer modifizierten 2xSSC Lösung inkubiert. Die anschließende Färbung erfolgte in einer 5%igen Giemsa-Lösung in Phosphatpuffer für 2,5 Minuten. Nach Luftrocknung wurden die Präparate mit Corbit Balsam eingedeckt (Fonatsch et al. 1980).

3.3.5 Zytogenetische Befundung

Zur Karyotypisierung der Metaphasen wurde die Software „Ikaros“ der Firma MetaSystems verwendet. Die Klassifikation von Chromosomenveränderungen erfolgte entsprechend dem internationalen System für humane zytogenetische Nomenklatur (International System for Human Cytogenetic Nomenclature) (ISCN 1995). Damit Veränderungen des Karyotyps als charakteristisch für die malignen Blasten betrachtet werden können, mussten folgende Kriterien erfüllt sein: es darf sich nicht um eine konstitutionelle, d.h. angeborene Veränderung handeln und die Veränderung muß klonal sein, d.h. sie sollte in mehreren Zellen vorkommen: die gleichen strukturellen Veränderungen und Hinzugewinne von Chromosomen sollten mindestens in zwei Zellen, Verluste in mindestens drei Zellen zu sehen sein (ISCN 1995; Secker-Walker et al. 1997).

Zunächst wird die modale Chromosomenzahl angegeben - das ist die Anzahl von Chromosomen pro Zelle, danach folgt die Nennung der Geschlechtschromosomen, dann numerische sowie strukturelle Veränderungen.

3.4 Nomenklatur der zytogenetischen Diagnostik

Der menschliche Chromosomensatz, der Karyotyp, besteht aus 2x22 Autosomen und zwei Geschlechtschromosomen (Gonosomen). Die Benennung (Numerierung folgt ihrer Größe, wobei Chromosom 1 das größte und Chromosom 22 das kleinste Autosom ist). Sie werden außerdem in sieben Gruppen (A-G) zusammengefaßt. Der männliche Chromosomensatz wird als 46, XY, der weibliche als 46, XX bezeichnet. Der kurze Arm eines jeden Chromosoms wird „p“ (für „petit“), der lange „q“ genannt. Die Enden des Chromosoms heißen jeweils Telomer, der Grenzpunkt zwischen kurzem und langem Arm Zentromer. Entsprechend dem Bänderungsmuster sind auf den Armen unterschiedliche Regionen und Banden zu erkennen, die, vom Zentromer ausgehend mit arabischen Ziffern numeriert werden.

3.4.1 Beschreibung des Karyotyps

Nach dem ISCN-Code werden

- Chromosomenzahl,
- Geschlechtschromosomen XX oder XY und
- Anomalien

beschrieben.

Numerische Anomalien werden mit „+“ vor dem zusätzlichen Chromosom bezeichnet (Trisomie) oder mit „-“ vor dem fehlenden Chromosom (Monosomie). +8 bedeutet ein zusätzliches Chromosom 8. -7 den Verlust des Chromosoms 7.

- „NN“ normaler Karyotyp
- „AA“ Karyotyp mit pathologischen Mitosen
- „AN“ Karyotyp mit pathologischen und normalen Mitosen

3.4.2 Numerische Anomalien

Bei Neoplasien kann es zu einem Zugewinn oder zu einem Verlust einzelner ganzer Chromosomen kommen. Man spricht dann von Trisomie (z.B. Trisomie 8) bzw. Monosomie (z.B. Monosomie 7). Der einfache Chromosomensatz mit 23 Elementen wird als haploid bezeichnet. Der normale menschliche Chromosomensatz, bei dem jedes Autosom doppelt vorliegt, ist diploid mit 46 Elementen. Ist die Zahl der Chromosomen größer als 46, spricht man von einem hyperdiploiden, bei weniger als 46 von einem hypodiploiden Chromosomensatz. Entsprechend werden Sätze mit 69 Chromosomen als triploid, mit 92 als tetraploid (Ploidiegrad) usw. bezeichnet. Bewegt sich die Chromosomenzahl mit ± 11 um ein ganzzahliges Vielfaches des haploiden Satzes, wird dies mit „nahezu diploid“ bezeichnet. Liegen bei einem normalen Chromosomensatz strukturelle oder numerisch kompensierte Anomalien vor, wird der Chromosomensatz als „pseudodiploid“ bezeichnet.

| Ploidiegrad | modale Chromosomenzahl |
|-------------------|------------------------|
| nahezu haploid | ≤ 34 |
| hypohaploid | < 23 |
| hyperhaploid | 24-34 |
| nahezu diploid | 35-57 |
| hypodiploid | 35-45 |
| hyperdiploid | 47-57 |
| nahezu triploid | 58-80 |
| hypotriploid | 58-68 |
| hypertriploid | 70-80 |
| nahezu tetraploid | 81-103 |
| hypotetraploid | 81-91 |
| hypertetraploid | 93-103 |

Tabelle 3-2: Ploidiegrade numerischer Aberrationen.

| Beispiele | Erklärung |
|----------------------------|---|
| 1. 26,X,+4,+6,+21 | Ein hyperhaploider Karyotyp mit zwei Kopien von Chromosom 4,6 und 21 und einer Kopie aller anderen Chromosomen. |
| 2. 71,XXX,+8,+10 | Ein hypertriploider Karyotyp mit vier Kopien der Chromosomen 8 und 10 und drei Kopien aller anderen Chromosomen. |
| 3. 89,XXYY,-1,-3,-5,+8,-21 | Ein hypotetraploider Karyotyp mit drei Kopien der Chromosomen 1,3,5,21 sowie fünf Kopien von Chromosom 8 und vier Kopien aller anderen Chromosomen. |

Tabelle 3-3: *Beispiele.*

3.4.3 Strukturelle Anomalien

Durch Strukturaberrationen wird die Morphologie der Chromosomen verändert. Für ihre exakte Beschreibung ist eine eindeutige Benennung der Chromosomenabschnitte nötig.

Das Zentromer unterteilt das Chromosom in einen kurzen und einen langen Arm (p=kurzer Arm, q=langer Arm). Innerhalb der Arme werden anhand der Bandenfärbung einzelne Regionen, Bande und Subbande unterschieden. 2q37.1 bedeutet z.B. das die Veränderung auf dem langen Arm von Chromosom 2, in der Region 3 in Bande 7 und Subbande 1 lokalisiert ist. Da diese Schreibweise zu aufwendig ist benutzt man im Alltag untenstehende Abkürzungen. Danach werden in Klammern die beteiligten Chromosomen genannt, in einer zweiten Klammer die beteiligten Chromosomenregionen, jeweils durch ein Semikolon getrennt.

| Nomenklatur und Beispiele | Beschreibung |
|------------------------------|--|
| <i>Translokation (t)</i> | Austausch zwischen zwei Chromosomen 1. Klammer: die Chromosomen, die an der Translokation beteiligt sind. 2. Klammer: die Bruchpunkte auf dem betreffenden Chromosom |
| Beispiel t(8;21)(q22;q22) | Translokation der Chromosomen 8 und 21, wobei die Bruchpunkte auf beiden Chromosomen auf dem langem Arm in den Banden 22 liegen. |
| <i>Dizentrisch (dic)</i> | Als dizentrisch wird ein Chromosom bezeichnet, das nach einer Translokation zwei Zentromere aufweist. |
| <i>Deletion (del)</i> | Verlust eines Chromosomenanteils, und zwar endständig oder interstitiell innerhalb eines Chromosomenarms, wobei sich die verbliebenen Bruchstücke wieder aneinanderlegen. 1. Klammer: betreffendes Chromosom 2. Klammer: Bruchpunkte auf dem Chromosom |
| Beispiel del(5)(q13q33) | Interstitieller Verlust im Bereich des langen Arms von Chromosom 5 zwischen den Banden 13-33. |
| <i>Inversion (inv)</i> | Drehung eines Chromosomenteilstücks um 180°, perizentrisch, das Zentromer einbeziehend oder parazentrisch. 1. Klammer: betreffendes Chromosom 2. Klammer: Bruchpunkte auf dem Chromosom |
| Beispiel inv(16)(p13q22) | Perizentrische Inversion des Chromosoms 16 mit den Bruchpunkten 13 auf dem kurzen und 22 auf dem langen Arm. |
| <i>Duplikation (dup)</i> | Verdoppelung eines Chromosomensegments. |
| <i>Ringchromosom (r)</i> | Am kurzem und am langem Arm eines Chromosoms treten Brüche auf, wobei die Bruchstellen miteinander verschmelzen und die jeweils distalen Chromosomenteile verloren gehen. |

| | |
|---|--|
| <i>Isochromosom (i)</i> | Entsteht bei der Fehlteilung des Zentromers, wobei die Trennung der Chromatiden während der Zellteilung nicht in Längsrichtung, sondern quer, in der Regel durch das Zentromer, erfolgt. |
| Beispiel i(17)(pp)(17)(qq) | Die eine Tochterzelle enthält zwei Chromatiden des kurzen, die andere Tochterzelle zwei Chromatiden des langen Arms; die eine Zelle erhält dann ein Chromosom 17 mit zwei kurzen, die andere Zelle ein Chromosom 17 mit zwei langen Armen. |
| <i>Markerchromosom (mar)</i> | Herkunft und Zusammensetzung eines Chromosoms sind nicht zu identifizieren. |
| <i>Inkomplett (inc)</i> | Am Ende einer zytogenetischen Formel bedeutet, daß nicht alle Chromosomen befundet wurden, d.h. eine genaue Aussage über die Zusammensetzung des Karyotyps konnte nicht getroffen werden. |
| <i>Additional (add)</i> | Angelagertes chromosomales Material unbekannter Herkunft. |
| <i>Derivatvchromosom (der)</i> | Aus Anteilen von zwei oder mehr Chromosomen zusammengesetztes oder in sich zwei- oder mehrfach verändertes Chromosom. Das Chromosom mit intaktem Zentromer wird als Derivatvchromosom bezeichnet. |
| Beispiel 46,XX,der(1)t(1;3) (p22;q13) | Das Derivatvchromosom 1 resultiert aus einer Translokation des distal von Segment 3q13 liegenden Teiles des Chromsoms 3 an den kurzen Arm von Chromosom 1 an die Bande 1p22. Dabei ersetzt das (der)1 ein normales Chromosom 1. Das fehlende normale Chromosom 1 muß nicht extra benannt werden. Zusätzlich bestehen bei dieser Beschreibung zwei normale Chromosomen 3. Der Karyotyp ist unbalanziert mit Verlust von Segment 1p22-pter und Zugewinn von 3q13-qter. |

Tabelle 3-4: Überblick über die Nomenklatur struktureller Chromosomenaberrationen mit Beispielen.

4 Ergebnisse

4.1 Patienten

4.1.1 Fallzahlen und Patientenübersicht

Im Rahmen der Deutschen multizentrischen Therapiestudie der ALL der Erwachsenen (Leiter Prof. Dr. D. Hoelzer, Frankfurt) wurden Knochenmark- und Blutproben an die AG Tumorgenetik am Institut für Klinische Genetik der Philipps-Universität in Marburg zur zytogenetischen Untersuchung eingesandt. In den Jahren von 1995 bis 2000 gingen ca. 150 Proben mit einer diagnostizierten AML (ohne weitere Klassifikation) ein. Diese Proben wurden von mir zytogenetisch untersucht, die Befundung wurde im Rahmen der Routinediagnostik durchgeführt. Um nun genauere Angaben über die Patienten und den AML Subtyp zu bekommen, wurden die Kliniken, die die Proben eingesandt hatten, angeschrieben. In den Briefen baten wir um den kompletten Arztbrief, der v.a. Dingen die Laborbefunde, den morphologischen und zytochemischen Befund, sowie den Immunphänotypisierungsbefund, vor eingeleiteter Chemotherapie, enthält.

Nach der Auswertung der eingehenden Patientenakten konnte ich 17 Patienten dem AML M0 Subtyp zuordnen. Die Patienten waren im Alter zwischen 19 und 76 Jahren, darunter befanden sich neun weibliche und acht männliche. Kinder wurden nicht untersucht. Die Patienten zeigten Veränderungen an einem oder zwei Chromosomen oder zum Teil komplexe Chromosomenaberrationen bis hin zu Veränderungen des gesamten Chromosomensatzes. Bei drei Patienten fand sich ein normaler weiblicher oder männlicher Karyotyp. Ausgangsmaterial bei der DNA Gewinnung zur zytogenetischen Untersuchung war in neun Fällen Knochenmarkaspirat und peripheres Blut und in acht Fällen nur Knochenmark sowie in einem Fall nur peripheres Blut.

Um die Daten auswertbar zu machen, konzentrierte ich mich auf die initialen Hb- Werte, die Thrombo- und Leukozytenwerte, sowie die Anzahl der Blasten im peripheren Blut. Parameter, die bei jedem Patienten routinemäßig bei der Aufnahme abgenommen wurden. Die Einheit hinter jedem Blutwert ist bei jedem Patienten gleich, alle Einheiten wurden umgerechnet, um sie vergleichbar zu machen. Bei der körperlichen Aufnahmeuntersuchung beschränkte ich mich auf Lymphknotenschwellungen, Leber- und/oder Milzvergrößerungen, da diese Befunde Aufschluß über ein fortgeschrittenes Stadium der Erkrankung geben könnten oder auch zur Diagnose geführt haben könnten.

Bei der Auswertung der Knochenmarkbefunde waren vor allen Dingen die Blastenzahl in % im Knochenmark, ob eine normale Hämatopoese noch stattfindet oder nicht, sowie die zytochemische Reaktion der Blasten wichtig. Ohne diese morphologische und zytochemische Untersuchung ist eine AML M0 Diagnosestellung nicht möglich. Ebenfalls trägt zur Diagnostik der Immunphänotypisierungsbefund bei, der in den meisten Fällen aus Knochenmarkaspirat gewonnen wird. Dabei konzentrierte ich mich bei der Auswertung vor allem auf die frühen myeloischen Antigene CD 33, 13, 14 und 15, die Progenitorantigene CD 34 und HLA-DR sowie den Stammzellfaktorrezeptor CD 117 (c-kit), da diese Oberflächenantigene besonders wichtig für die Zuordnung der Blasten bei AML M0 sind. Da oftmals eine Koexpression lymphatischer Marker vorlag, wählte ich noch einige typische T/B-lymphatische (z.B. CD 7 als T-lymphatischer Marker) Marker aus. Alle Werte wurden in % - Zahlen ausgedrückt. Da die verschiedenen Kliniken oftmals unterschiedliche Standards bei ihren immunologischen Laboranforderungen hatten und nicht bei jedem Patienten alle immunologischen Marker bestimmt wurden, sind diese Werte mit n.u. (nicht untersucht) gekennzeichnet.

Im Fall Nr. 4, 8 und 13 liegen keine genauen Prozentangaben sondern nur beschreibende Angaben des Immunphänotypisierungsbefundes vor.

Eine Übersicht aller untersuchten Patienten gibt

Tabelle 4-1.

| Fall Nr. | Alter | Ge- schlecht | Unters.- Material | Karyotyp |
|----------|-------|-----------------|----------------------|--|
| 1 | 63 | w | KM | 46, XX, del (7)(q22) |
| 2 | 19 | m | KM | 46, XY, del (9)(p13) |
| 3 | 37 | w | KM | 45, XX, t(3;6)(q21;q25-27), -7 |
| 4 | 48 | w | KM | 47, XX, +8 |
| 5 | 27 | m | KM+pB | 45, XY, der(14;14)(q10;q10). ish der(14;14)(wcp14+;wcp14+) |
| 6 | 34 | m | KM | 48, Y, t(X;10)(p11;p11), +3, der(3)inv(3)(q21q26)del(3)(p?21p23), +21. ish t(X;10) (wcpX+, wcp10+;wcp10+,wcpX+), der(3) (wcp3+), +21(wcp21+) (komplex hyperdiploid) |
| 7 | 76 | w | KM+pB | 97-100, XXXX (tetraploid) |
| 8 | 44 | m | KM+pB | 69-87. rev ish enh(6q21q27,8q13q24), dim(5q21q35,8p11p23,11?,15q24q26) |
| 9 | 26 | m | KM+pB | 45 XY, -5, add(7)(q2?2),del(7)(q1?2), -?18, +mar |
| 10 | 72 | w | pB | 46, XX, inv(3)(q21q26), del(7)(p11) |
| 11 | 41 | m | KM+pB | 46, XY, ?i(7)(q10), add(18)(p?) 47, XY, ?i(7)(q10), add(18)(p?), +?21 |
| 12 | 75 | w | KM+pB | 46, X, der(X)add(X)(p?23)add(X)(q2?6) or ider(X)add(X)(q2?6) |
| 13 | 34 | m | KM+pB | 46, XY, der(11)(t(1;11)(q11;q13) |
| 14 | 54 | w | KM | 46, XX, del(2)(p2?), add(9)(q?), del(11)(q?13), add(12)(q?), -17, +mar |
| 15 | 46 | w | KM+pB | 46, XX |
| 16 | 30 | w | KM | 46, XX |
| 17 | 28 | m | KM | 46, XY |

Tabelle 4-1: Übersicht über die 17 untersuchten Patienten.

4.2 Untersuchung der einzelnen Patienten

4.2.1 Fall Nr. 1: AML M0, weiblich, 63 Jahre

| Diagnostik | Untersuchte Parameter | Werte |
|-------------------------------|-----------------------|--------------|
| Klin. Untersuchung | LK-Schwellung | - |
| | Hepatomegalie | - |
| | Splenomegalie | - |
| Blutwerte | Hb | 7,1 g/dl |
| | Thrombozyten | 112/ μ l |
| | Leukozyten | 2,9/ μ l |
| | Blasten | 0% |
| Knochenmark | Blasten | 80% |
| Immunphänotypisierung (KM) | CD 34 | 87% |
| | TdT | 54% |
| | HLA-DR | 90% |
| | CD 7 | 7% |
| | CD 117 | 50% |
| | MPO | 1% |
| | CD 13 | 26% |
| | CD 33 | 41% |
| | CD 65 | 35% |
| | CD 15 | 52% |
| | CD 14 | 41% |
| | CD 19 | 1% |
| | CD 2 | 12% |
| Zytochemie | PAS | -/+ |
| | EST | - |
| | POX | - |
| | | |

| |
|---------------------------------|
| Zytogenetischer Befund |
| Nomal: 46, XX [17] |
| Klon 1: 46, XX, del(7)(q22) [5] |

Tabelle 4-2: Befunde von Fall Nr. 1

Interpretation:

Die Patientin zeigte bei der körperlichen Untersuchung einen deutlich reduzierten Allgemeinzustand mit Müdigkeit, Schwäche und Belastungsdyspnoe sowie eine Gewichtsabnahme von 5 Kg innerhalb von 14 Tagen. Die initialen Blutwerte zeigten eine deutliche Anämie, Thrombo- und Leukozytopenie. Das Knochenmark war infiltriert mit mehr als 80% Blasten, die die normale Hämatopoese verdrängt haben. Bei der zytochemischen Reaktion zeigten die Blasten eine negative Reaktion für POX und EST, die PAS-Reaktion war zum Teil leicht positiv. Im Immunphänotypisierungsbefund aus Knochenmark fanden sich überwiegend myeloische Zellen mit deutlich gesteigerter Expression der Progenitorantigene CD 34 und TdT bei erhaltener Ausreifungstendenz. Ferner wurde der Zytokinrezeptor CD 117 stark exprimiert. Bei der zytogenetischen Untersuchung aus den Knochenmarkkulturen wurden insgesamt 22 Metaphasen analysiert. Davon zeigten 17 einen normalen weiblichen Karyotyp. In 5 Metaphasen lag ein Stückverlust des langen Armes eines Chromosoms 7 vor.

4.2.2 Fall Nr. 2, AML M0, männlich, 19 Jahre

| Diagnostik | Untersuchte Parameter | Werte |
|---------------------------------|------------------------|---------------|
| Klin. Untersuchung | LK-Schwellung | + |
| | Hepatomegalie | - |
| | Splenomegalie | - |
| Blutwerte | Hb | 12,0 g/dl |
| | Thrombozyten | 58/ μ l |
| | Leukozyten | 28,2/ μ l |
| | Blasten | 95% |
| Knochenmark | Blasten | 70% |
| Immunphänotypisierung (KM) | CD 34 | 81% |
| | TdT | 15% |
| | HLA-DR | 84% |
| | CD 7 | 80% |
| | CD 117 | 71% |
| | MPO | n.u. |
| | CD 13 | 63% |
| | CD 33 | 19% |
| | CD 65 | 14% |
| | CD 15 | 24% |
| | CD 14 | 4% |
| Zytochemie | PAS | - |
| | EST | - |
| | POX | - |
| | Zytogenetischer Befund | |
| Normal: 46, XY [17] | | |
| Klon 1: 46, XY, del(9)(p13) [3] | | |

Tabelle 4-3: Befunde von Fall Nr. 2

Interpretation:

Das Blutbild des Patienten zeigte bei Aufnahme eine Leukozytose sowie eine Thrombozytopenie. Im Knochenmark fanden sich mehr als 95% unreife Blasten, die auch im peripheren Blut mit 70% dominierten. Der Patient fühlte sich abgeschlagen und zeigte Lymphknotenschwellungen am Hals (nuchal und zervikal) und axillär. Der Immunphänotypisierungsbefund beschreibt eine sehr unreife Zellpopulation mit deutlich gesteigerter Expression eines frühen myeloischen Differenzierungantigens (CD 13). Zusätzlich zeigte sich eine Positivität für zwei T-lymphatische Merkmale (CD 2, CD 7). Alle anderen T-lymphatischen Marker waren negativ. Stark positiv war ebenfalls die Expression hämatopoetischer Vorläuferzellantigene, wie CD 34 (81%) und HLA-DR (84%). Die zytochemischen Reaktionen fielen alle negativ aus.

Bei der zytogenetischen Untersuchung wurden aus Knochenmark 20 Metaphasen analysiert. Davon zeigten drei Metaphasen einen Stückverlust des kurzen Armes eines Chromosoms 9. Die gleiche Veränderung fand sich in einer der fünf Metaphasen aus den zusätzlich untersuchten Blutkulturen.

4.2.3 Fall Nr. 3, AML M0, weiblich, 37 Jahre

| Diagnostik | Untersuchte Parameter | Werte |
|--|------------------------|---------------|
| Klin. Untersuchung | LK-Schwellung | - |
| | Hepatomegalie | - |
| | Splenomegalie | - |
| Blutwerte | Hb | 12 g/dl |
| | Thrombozyten | 90,3/ μ l |
| | Leukozyten | 9,4/ μ l |
| | Blasten | 70% |
| Knochenmark | Blasten | 50% |
| Immunphänotypisierung (pB) | CD 34 | 57% |
| | TdT | 2% |
| | HLA-DR | 42% |
| | CD 7 | 6% |
| | CD 117 | 24% |
| | MPO | 11% |
| | CD 13 | 80% |
| | CD 33 | 55% |
| | CD 65 | 12% |
| | CD 15 | 28% |
| | CD 14 | 16% |
| Zytochemie | PAS | - |
| | EST | - |
| | POX | - |
| | Zytogenetischer Befund | |
| Normal: 46, XX [0] | | |
| Klon 1: 45, XX, t(3;6)(q21;q25-27),-7 [30] | | |

Tabelle 4-4: Befunde von Fall Nr. 3

Interpretation:

Bei der Aufnahmeuntersuchung wurde bei der Patientin eine allgemeine Schwäche, ein Mundsoor, Zahnfleischbluten sowie eine vermehrte Hämatomneigung festgestellt.

Die Blutwerte zeigten eine massive Thrombozytopenie, was die Blutungsneigung erklärt sowie eine leichte Anämie. Die Leukozyten lagen im Normbereich. Im peripheren Blut fand man mehr als 70% undifferenzierte Blasten. Fast identisch stellt sich der Knochenmarkbefund mit ca. 50% undifferenzierten Blasten und einer deutlich gesteigerten jungen Megakaryopoese (Linksverschiebung) dar. Die Granulopoese zeigte ebenfalls Dysplasiezeichen. In der zytochemischen Reaktion reagierten die Blasten aus dem Knochenmark negativ mit PAS, POX und EST. Der Immunphänotyp zeigt ein frühes myeloisches Bild mit Expression der Vorläuferantigene CD 34 und CD 117 und außerdem die myeloischen Differenzierungszeichen CD 13 und CD 33. Die Blastenpopulation ist negativ für lymphatische Marker und zytoplasmatische Myeloperoxidase.

Aus den Knochenmarkkulturen, die zur zytogenetischen Untersuchung eingesandt wurden, konnten ca. 30 Metaphasen analysiert werden. Diese zeigten alle eine Translokation zwischen dem langen Arm eines Chromosoms 3 und dem langen Arm eines Chromosoms 6. Außerdem fehlte immer ein Chromosom 7. Das Rearrangement involviert die Chromosomenbande 3q21, die auch bei der Inversion $inv(3)(q21q26)$ und der Translokation $t(3;3)(q21;q26)$ beteiligt ist.

4.2.4 Fall Nr. 4, AML M0, weiblich, 48 Jahre

| Diagnostik | Untersuchte Parameter | Werte |
|-------------------------------|-----------------------|---------------|
| Klin. Untersuchung | LK-Schwellung | - |
| | Hepatomegalie | - |
| | Splenomegalie | - |
| Blutwerte | Hb | 8,9 g/dl |
| | Thrombozyten | 147/ μ l |
| | Leukozyten | 14,4/ μ l |
| | Blasten | 90% |
| Knochenmark | Blasten | 70% |
| Immunphänotypisierung (KM) | CD 34 | ++ |
| | TdT | + |
| | HLA-DR | + |
| | CD 7 | ++ |
| | CD 117 | ++ |
| | MPO | + |
| | CD 13 | ++ |
| | CD 33 | ++ |
| | CD 65 | + |
| | CD 15 | + |
| | CD 14 | + |
| | CD 19 | - |
| | CD 2 | - |
| CD 4 | - | |
| Zytochemie | PAS | - |
| | EST | - |
| | POX | - |
| Zytogenetischer Befund | | |
| Normal: 46, XX [0] | | |
| Klon 1: 47, XX, +8 [25] | | |

Tabelle 4-5: Befunde von Fall Nr. 4

Interpretation:

Festgestellt wurde bei der Patientin eine generelle Immuninkompetenz, die bereits zu einer nekrotisierenden Entzündung im Bereich des Oberkiefers (hervorgerufen durch einen polyresistenten *Pseudomonas aeruginosa* Stamm) geführt hatte. Im peripheren Blutbild dominierten undifferenzierte Blasten, die myeloischer Natur sind. Die Leukozyten waren erhöht, der Hämoglobinwert war erniedrigt, eine normale Hämatopoese fand nicht mehr statt. Undifferenzierte Blasten bestimmen auch das Bild bei der Knochenmarkuntersuchung. Die zytochemischen Nachweise blieben alle negativ, sodaß die Blasten wahrscheinlich myeloischer Natur sind. Der Immunphänotyp zeigte eine unreife myeloische Zellpopulation mit verstärkter Expression der Progenitorzellmerkmale CD 34 und CD 117, sowie eine Koexpression von CD 7 und partiell von CD 4 und TdT.

Bei der zytogenetischen Untersuchung konnten aus Knochenmark 25 Metaphasen analysiert werden. Alle zeigten ein überzähliges Chromosom 8.

4.2.5 Fall Nr. 5, AML M0, männlich, 27 Jahre

| Diagnostik | Untersuchte Parameter | Werte |
|-------------------------------|---|---------------|
| Klin. Untersuchung | LK-Schwellung | - |
| | Hepatomegalie | - |
| | Splenomegalie | - |
| Blutwerte | Hb | 8,3 g/dl |
| | Thrombozyten | 100/ μ l |
| | Leukozyten | 16,6/ μ l |
| | Blasten | 8% |
| Knochenmark | Blasten | 90% |
| Immunphänotypisierung (KM) | CD 34 | 51% |
| | TdT | 0 |
| | HLA-DR | 82% |
| | CD 7 | 61% |
| | CD 117 | 9% |
| | MPO | n.u. |
| | CD 13 | 13% |
| | CD 33 | 87% |
| | CD 65 | 0 |
| | CD 15 | 7% |
| Zytochemie | PAS | - |
| | EST | - |
| | POX | - |
| | Zytogenetischer Befund | |
| | Normal: 46, XY [9] | |
| | Klon 1: 45, XY, der(14;14)(q10;q10). ish der (14;14)(wcp14+;wcp14+) [5] | |

Tabelle 4-6: Befunde von Fall Nr. 5

Interpretation:

Der Patient zeigte eine Reduzierung des Allgemeinzustandes mit in Form von rezidivierenden Bronchitiden und Belastungsdyspnoe. Im durchgeführten Blutbild sah man eine Leukozytose, die Thrombozyten und das Hämoglobin waren erniedrigt. In den peripheren Blutaussstrichen fanden sich fast ausschließlich kleine bis mittelgroße undifferenzierte Blasten, die ebenfalls in den Knochenmarkausstrichen zu sehen sind. Die normale Hämatopoese wurde im Knochenmark fast vollständig durch blastäre Populationen verdrängt. Die Zytochemie zeigt negative Reaktionen für PAS, POX und EST. Der Immunphänotyp, der aus Knochenmark gewonnen wurde, zeigt eine Zellpopulation mit deutlich gesteigerter Expression eines frühen myeloischen Differenzierungsantigens (CD 33) bei fehlender Ausreifungstendenz. Zusätzlich findet man eine Koexpression eines B-lymphatischen (CD 19) und eines T-lymphatischen (CD 7) Markers. Die Merkmale hämatopoetischer Vorläuferzellantigene sind deutlich positiv (HLA-DR, CD 34). Ebenfalls aus Knochenmark wurde der zytogenetische Befund analysiert. Von den 13 untersuchten Metaphasen wiesen 9 einen normalen männlichen Chromosomensatz auf, in 4 Metaphasen fand sich ein metazentrisches Derivatvchromosom, daß sich aus den langen Armen beider Chromosomen 14 oder aus den langen Armen eines Chromosoms 14 und eines Chromosoms 15 zusammensetzt. Bei der hier durchgeführten FISH-Untersuchung aus Knochenmarkkulturen wurden 9 Metaphasen mit Sonden für das gesamte Chromosom 14 und 15 analysiert. Davon zeigten 8 ein normales Hybridisierungsmuster. In einer Metaphase lag ein metazentrisches Derivatvchromosom vor, das aus Anteilen von Chromosom 14 bestand. Beide Chromosomen 15 zeigten ein normales Hybridisierungsmuster.

4.2.6 Fall Nr. 6, AML M0, männlich, 34 Jahre

| Diagnostik | Untersuchte Parameter | Werte |
|----------------------------|-----------------------|---------------|
| Klin. Untersuchung | LK-Schwellung | - |
| | Hepatomegalie | + |
| | Splenomegalie | + |
| Blutwerte | Hb | 10,3 g/dl |
| | Thrombozyten | 300/ μ l |
| | Leukozyten | 23,7/ μ l |
| | Blasten | 80% |
| Knochenmark | Blasten | 80% |
| Immunphänotypisierung (KM) | CD 34 | 72% |
| | TdT | 3% |
| | HLA-DR | 93% |
| | CD 7 | 56% |
| | CD 117 | 34% |
| | MPO | 3% |
| | CD 13 | 57% |
| | CD 33 | 81% |
| | CD 65 | 0 |
| | CD 15 | 0 |
| | CD 14 | 0 |
| Zytochemie | CD 19 | 90% |
| | CD 2 | 4% |
| | CD 4 | 2% |
| | PAS | - |
| | EST | - |
| | POX | - |

Zytogenetischer Befund

Normal: 46, XY [6]

Klon 1:

48,Y,t(X;10)(p11;p11), +3, der(3)inv(3)(q21q26)del(3)(p?21p23),+21.
ish t(X;10)(wcpX+,wcp10+;wcp10+,wcpX+),der(3) (wcp3+),
+21(wcp21+) [44]

Klon 2:

49,Y,t(X;10)(p11;p11),+1,+3,der(3)inv(3)(q21q26)del(3)(p?21p23),+21
ish +1(wcp1+),t(X;10)(wcpX+,wcp10+;wcp10+,wcpX+),
der(3) (wcp3+),+21(wcp21+) [3]

Tabelle 4-7: Befunde von Fall Nr. 6Interpretation:

Der Patient beklagte sich bei der Aufnahme über eine seit vier Wochen bestehende Leistungsminderung und Belastungsdyspnoe. Bei der körperlichen Untersuchung fanden sich Petechien an beiden Unterschenkeln und am Stamm. Die Abdomen-Sonographie zeigte das Bild einer Hepato- und Splenomegalie. Im initial durchgeführten Blutbild sah man eine deutliche Erhöhung der Leukozyten mit 23,7/μl. Der Hämoglobinwert war erniedrigt, die Thrombozyten lagen im Normbereich. Im Ausstrich des peripheren Blutes fand man überwiegend mittelgroße Blasten mit schmalen Zytoplasmasaum ohne erkennbare Reifungszeichen. Auch in der Knochenmarkuntersuchung zeigte sich ein dichtes Blasteninfiltrat (über 80% der kernhaltigen Zellen). Die zytochemischen Reaktionen für PAS, EST und POX waren negativ. Bei der Immunphänotypisierung wurden ausschließlich myeloische Zellen mit verstärkter Expression früher myeloischer Differenzierungsantigene und ohne erkennbare Reifungstendenz nachgewiesen. Die Progenitorantigene CD 34 und HLA-DR, sowie der Stammzellrezeptor CD 117 sind deutlich positiv. Weiterhin werden zwei B-lymphatische Marker, CD 19 und CD 7, koexprimiert.

Bei der zytogenetischen Untersuchung aus eingesandtem Knochenmark wurden 34 Metaphasen analysiert. Davon wiesen 6 einen normalen männlichen Karyotyp auf. In 28 Metaphasen lag mit 48 Elementen ein hyperdiploider Karyotyp vor. Zwei Markerchromosomen waren hinzugewonnen. Insgesamt 19 Metaphasen wurden nach vielfarbiger Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (M-FISH) analysiert. In allen Metaphasen war je ein Chromosom 3 und 21 überzählig. Ferner zeigte sich eine Translokation zwischen den kurzen Armen je eines Chromosoms X und 10. In 3 Metaphasen lag zusätzlich eine Trisomie von Chromosom 1 vor.

In Zusammenschau der Chromosomenbanden- und M-FISH-Analyse lagen Trisomien der Chromosomen 3 und 21 sowie eine Translokation $t(X;10)(p11;p11)$ vor. Ein Chromosom 3 wies eine Veränderung des langen Armes auf. Zusätzlich war der kurze Arm dieses Chromosoms 3 verkürzt.

4.2.7 Fall Nr. 7, AML M0, weiblich, 76 Jahre

| Diagnostik | Untersuchte Parameter | Werte |
|---|-----------------------|---------------|
| Klin. Untersuchung | LK-Schwellung | - |
| | Hepatomegalie | + |
| | Splenomegalie | + |
| Blutwerte | Hb | 11,2 g/dl |
| | Thrombozyten | 180/ μ l |
| | Leukozyten | 15,1/ μ l |
| | Blasten | 65% |
| Knochenmark | Blasten | 80% |
| Immunphänotypisierung (KM) | CD 34 | 96% |
| | TdT | 76% |
| | HLA-DR | 89% |
| | CD 7 | 11% |
| | CD 117 | 38% |
| | MPO | 0 |
| | CD 13 | 17% |
| | CD 33 | 3% |
| | CD 65 | 7% |
| | CD 15 | 2% |
| | CD 14 | 2% |
| | CD 19 | 15% |
| CD 2 | 12% | |
| CD 4 | 70% | |
| Zytochemie | PAS | leicht + |
| | EST | - |
| | POX | - |
| Zytogenetischer Befund | | |
| Normal: 46, XX [1] | | |
| Klon 1: 97-100, XXXX, Strukturaberrationen [12] | | |

Tabelle 4-8: Befunde von Fall Nr. 7

Interpretation:

Bei der klinischen Untersuchung beklagte sich die Patientin über eine seit Monaten bestehende Schwäche und Blässe, sowie eine Belastungsdyspnoe. Im Bereich beider Unterschenkel sah man die Zeichen einer hämorrhagischen Diathese mit vielen kleinen subkutanen Petechien. Das periphere Blutbild zeigte eine deutlich erhöhte Leukozytenzahl. Gleichzeitig waren der Hämoglobin-Wert und die Thrombozytenzahl vermindert. Die Blastenzahl peripher betrug 65%. Das Knochenmark stellte sich als ausgeprägt hyperzellulär dar, die normale Granulo- und Erythropoese war kaum noch nachweisbar. Es fand sich eine deutliche Infiltration durch kleine bis mittelgroße Blasten. Die Zytochemie zeigte eine 30% positive PAS-Reaktion und eine negative Reaktion für EST und POX. In der Immunphänotypisierung dominierte eine blastäre Zellpopulation mit Expression der Progenitorantigene CD 34, HLA-DR und TdT. Weiterhin wurden der Stammzellfaktorrezeptor CD 117 und CD 4, ein T-lymphatischer Marker, exprimiert. Bei der zytogenetischen Untersuchung wies nur 1 der 13 Metaphasen aus Knochenmarkkulturen einen normalen weiblichen Karyotyp auf. Die übrigen 12 Metaphasen zeigten mit 97-100 Elementen einen nahezu tetraploiden Karyotyp. Die chromosomale Zusammensetzung war nicht mit Sicherheit auszumachen, da die Chromosomenqualität nicht ausreichte, doch schienen neben den numerischen auch strukturelle Chromosomenveränderungen vorzuliegen.

4.2.8 Fall Nr. 8, AML M0, männlich, 44 Jahre

| Diagnostik | Untersuchte Parameter | Werte |
|-------------------------------|-----------------------|---------------|
| Klin. Untersuchung | LK-Schwellung | - |
| | Hepatomegalie | - |
| | Splenomegalie | - |
| Blutwerte | Hb | 8,1 g/dl |
| | Thrombozyten | 102/ μ l |
| | Leukozyten | 18,9/ μ l |
| | Blasten | 37% |
| Knochenmark | Blasten | 80% |
| Immunphänotypisierung (KM) | CD 34 | ++ |
| | TdT | ++ |
| | HLA-DR | - |
| | CD 7 | ++ |
| | CD 117 | + |
| | MPO | + |
| | CD 13 | ++ |
| | CD 33 | ++ |
| | CD 65 | + |
| | CD 15 | + |
| | CD 14 | + |
| | CD 19 | + |
| | CD 2 | + |
| CD 4 | + | |
| Zytochemie | PAS | - |
| | EST | - |
| | POX | - |

Zytogenetischer Befund

Normal: 46, XY [9]

Klon 1:

69-87. rev ish enh(6q21q27,8q13q24),

dim(5q21q35,8p11p23,11?,15q24q26) [17]

Tabelle 4-9: Befunde von Fall Nr. 8Interpretation:

Anamnestisch berichtete der Patient bei der Aufnahme über eine seit fünf Wochen bestehende Schwäche und einen Leistungsknick. Bei der Blutuntersuchung stellte man eine Leukozytose und einen Blastenanteil von 37% fest. Der Hämoglobin-Wert und die Thrombozyten lagen unter dem Normbereich. In den Knochenmarkausstrichen wird das Bild von einer monomorphen Blastenpopulation beherrscht, die die normale Hämatopoese nahezu völlig verdrängt haben. Die Zellen sind sehr undifferenziert und reagieren in der zytochemischen Untersuchung negativ mit PAS, EST und POX. Der immunologische Befund, der hier nur beschreibend vorliegt und keine absoluten Prozentzahlen enthält, zeigte eine unreife, stammzellnahe AML (Expression der Progenitormerkmale CD 34 und TdT) mit Koexpression von CD 7. HLA-DR wird jedoch nicht exprimiert. Bei der zytogenetischen Untersuchung aus Knochenmarkkulturen wurden 26 Metaphasen analysiert. 9 Metaphasen wiesen einen normalen männlichen Chromosomensatz auf. Die übrigen 17 Metaphasen zeigten 69-87 Chromosomen, zumeist waren 79 Elemente vorhanden. Dies entspricht einem nahezu triploiden Chromosomensatz. Die chromosomale Zusammensetzung war nicht genau zu eruieren. Insbesondere waren Strukturveränderungen der Chromosomen nicht auszuschließen. Mit Hilfe der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) wurde die DNA auf ein Ungleichgewicht in der chromosomalen Zusammensetzung untersucht. Dabei zeigte sich für die getestete DNA eine Vermehrung von Material eines Teils der langen Arme der Chromosomen 6 und 8. Es bestanden Verluste von chromosomalen Material im Bereich der langen Arme von Chromosom 5 und 15 sowie des kurzen Armes von Chromosom 8. Darüber hinaus waren Anteile von Chromosom 11 unterrepräsentiert.

4.2.9 Fall Nr. 9, AML M0, männlich, 26 Jahre

| Diagnostik | Untersuchte Parameter | Werte |
|--|------------------------|----------|
| Klin. Untersuchung | LK-Schwellung | - |
| | Hepatomegalie | - |
| | Splenomegalie | - |
| Blutwerte | Hb | 7,1 g/dl |
| | Thrombozyten | 80/μl |
| | Leukozyten | 6,7/μl |
| | Blasten | 75% |
| Knochenmark | Blasten | 90% |
| Immunphänotypisierung (pB) | CD 34 | 0 |
| | TdT | 0 |
| | HLA-DR | 82% |
| | CD 7 | 91% |
| | CD 117 | 54% |
| | MPO | 4% |
| | CD 13 | 86% |
| | CD 33 | 63% |
| | CD 65 | 54% |
| | CD 15 | 47% |
| | CD 14 | 0 |
| Zytochemie | PAS | - |
| | EST | - |
| | POX | - |
| | Zytogenetischer Befund | |
| Normal: 46, XY [0] | | |
| Klon 1: 45, XY,-5,add(7)(q2?2),del(7)(q1?2),-?18,+mar [24] | | |

Tabelle 4-10: Befunde von Fall Nr. 9

Interpretation:

Der Patient war bei der Aufnahmeuntersuchung in einem deutlich reduzierten Allgemeinzustand. Weiterhin bestand eine Schwellung im Bereich der linken Kieferhöhle. Der Hämoglobin-Wert und die Thrombozytenzahl waren zugunsten einem peripheren Blastenanteil von >75% vermindert. Die Knochenmarkausstriche zeigten eine Blasteninfiltration von mehr als 90%. Eine normale Hämatopoese war dabei nicht mehr nachweisbar. Die zytochemischen Reaktionen für PAS, POX und EST waren negativ. Die Immunphänotypisierung wurde aus peripherem Blut gewonnen. Dabei wurden überwiegend myeloische Zellen mit deutlich gesteigerter Expression früher myeloischer Antigene und partiell erhaltener Ausreifungstendenz nachgewiesen. Es bestand eine Negativität der Progenitorantigene CD 34 und TdT. Dagegen fand sich eine deutlich gesteigerte Expression des Zytokinrezeptors CD 117. Die myeloischen Zellen exprimierten außerdem sehr stark HLA-DR und koexprimierten CD 7. Die Metaphasen für die zytogenetische Untersuchung wurden aus peripherem Blut und aus Knochenmark gewonnen. Dabei wiesen alle 20 Metaphasen aus Blut und alle 4 Metaphasen aus dem Knochenmark einen hypodiploiden Karyotyp mit 45 Elementen auf. Es fehlte immer ein normales Chromosom 5. Ein Chromosom 7 wies eine Verlängerung, sein Homologon eine Verkürzung des langen Armes auf. Ferner schien ein Chromosom 18 zu fehlen. Ein Markerchromosom war hinzugewonnen.

4.2.10 Fall Nr. 10, AML M0, weiblich, 72 Jahre

| Diagnostik | Untersuchte Parameter | Werte |
|-------------------------------|--|--------------|
| Klin. Untersuchung | LK-Schwellung | - |
| | Hepatomegalie | - |
| | Splenomegalie | - |
| Blutwerte | Hb | 7 g/dl |
| | Thrombozyten | 414/ μ l |
| | Leukozyten | 40/ μ l |
| | Blasten | 60% |
| Knochenmark | Blasten | 80% |
| Immunphänotypisierung (pB) | CD 34 | 79% |
| | TdT | 0 |
| | HLA-DR | 76% |
| | CD 7 | 2% |
| | CD 117 | 30% |
| | MPO | n.u. |
| | CD 13 | 0 |
| | CD 33 | 80% |
| | CD 65 | 6% |
| | CD 15 | 22% |
| | CD 14 | 18% |
| Zytochemie | PAS | - |
| | EST | - |
| | POX | - |
| | Zytogenetischer Befund normal: 46, XX [0] Klon 1: 46, XX, inv(3)(q21q26), del(7)(p11) [16] | |

Tabelle 4-11: Befunde von Fall Nr. 10

Interpretation:

Die Patientin litt seit sechs Jahren an einem myelodysplastischen Syndrom mit refraktärer Anämie. Bei der Aufnahme fiel eine massiv erhöhte Leukozytenzahl mit einem Blastenanteil von mehr als 60% und ein erniedrigter Hämoglobinwert auf. Die Patientin war blass und tachypnoeisch und zeigte urbiquitäre Wassereinlagerungen. Die Beurteilung der Blasten erfolgte aus peripherem Blut, da der Knochenmarkausstrich eine mindere Qualität aufwies. Die daraus gewonnenen Blasten dominierten das Bild. Es zeigte sich eine Linksverschiebung mit hämatopoetischen Vorstufen. Die PAS-, POX- und EST-Färbungen wiesen ein negatives Reaktionsmuster auf. Der Immunphänotypisierungsbefund, ebenfalls aus peripherem Blut, zeigte eine unreife Zellpopulation mit gesteigerter Expression eines frühen myeloischen Differenzierungsantigens bei fehlender Ausreifungstendenz. Zusätzlich fand sich eine Positivität für zwei T-lymphatische Marker (CD 2 und CD 4). V.a. die Progenitorantigene HLA-DR und CD 34 waren stark positiv, TdT war negativ. Der zytogenetische Befund wurde aus peripherem Blut gewonnen. Alle 16 Metaphasen zeigten eine paracentrische Inversion eines Chromosoms 3 sowie einen Stückverlust des kurzen Armes eines Chromosoms 7.

4.2.11 Fall Nr. 11, AML M0, männlich, 41 Jahre

| Diagnostik | Untersuchte Parameter | Werte |
|-------------------------------|-----------------------|----------|
| Klin. Untersuchung | LK-Schwellung | + |
| | Hepatomegalie | - |
| | Splenomegalie | - |
| Blutwerte | Hb | 11 g/dl |
| | Thrombozyten | 350/μl |
| | Leukozyten | 9,9/μl |
| | Blasten | 91% |
| Knochenmark | Blasten | 80% |
| Immunphänotypisierung (KM) | CD 34 | 39% |
| | TdT | 19% |
| | HLA-DR | 37% |
| | CD 7 | 89% |
| | CD 117 | 13% |
| | MPO | n.u. |
| | CD 13 | 10% |
| | CD 33 | 92% |
| | CD 65 | 0 |
| | CD 15 | 0 |
| | CD 14 | 1% |
| Zytochemie | PAS | leicht + |
| | EST | leicht + |
| | POX | - |
| | | |

Zytogenetischer Befund

Normal: 46, XY [0]

Klon 1: 46, XY, ?i(7)(q10), add(18)(p?) [5]

Klon 2: 47, XY, ?i(7)(q10), add(18)(p?), +?21 [16]

FISH-Befund:

nuc ish 9q24(ABLx2), 22q11(BCRx2)[192] / nuc ish 9q24(ABLx2),
22q11(BCRx2)

(ABL con BCRx1) [4]/[0]/[0]

Tabelle 4-12: Befunde von Fall Nr. 11Interpretation:

Bei der Aufnahme klagte der Patient über Halsschmerzen, die nuchalen Lymphknoten waren geschwollen. Die klinische Untersuchung zeigte eine eitrige Tonsillitis. Im durchgeführten Blutbild fand man eine Anämie und eine Leukozytose. Die Thrombozyten befanden sich im Normbereich. Die Knochenmarkzytologie beschreibt eine massive Infiltration des Knochenmarks durch Blasten von unterschiedlicher Größe. Die Granulopoese und die Erythropoese sind nahezu völlig verdrängt, nur die Megakaryopoese ist noch regelrecht. Die PAS- und EST-Reaktionen waren leicht positiv, die POX-Reaktion war negativ. Der immunologische Befund aus Knochenmarkspirat wies eine Zellpopulation mit starker Expression eines T-lymphatischen Antigens, CD 7, sowie ein frühes myeloisches Differenzierungsantigen, CD 33, nach. Für die zytogenetische Untersuchung wurden Knochenmark und peripheres Blut verwendet. Aus den Knochenmarkkulturen wurden 6 Metaphasen gewonnen und analysiert. Sie wiesen alle eine Veränderung eines Chromosoms 7 auf, die am ehesten als Isochromosom des langen Armes von Chromosom 7 zu interpretieren war. Darüber hinaus bestand eine Anlagerung chromosomalen Materials am kurzen Arm eines Chromosoms 18. In einer dieser Metaphasen lag zudem ein Chromosom der G-Gruppe, am ehesten ein Chromosom 21, überzählig vor. Alle 5 Metaphasen aus unstimulierten Blutkulturen zeigten den gleichen Karyotyp. Die Kerne mononukleärer Zellen aus den Knochenmarkkulturen wurden nach Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit DNA-Sonden für die Gene BCR und ABL auf die Verteilung der Signale untersucht. Von insgesamt 196 Kernen mit jeweils 2 Signalen für ABL bzw. BCR wiesen 4 eine Zusammensetzung je eines BCR und ABL Signals auf.

4.2.12 Fall Nr. 12, AML M0, weiblich, 75 Jahre

| Diagnostik | Untersuchte Parameter | Werte |
|-------------------------------|-----------------------|--------------|
| Klin. Untersuchung | LK-Schwellung | - |
| | Hepatomegalie | - |
| | Splenomegalie | - |
| Blutwerte | Hb | 9,3 g/dl |
| | Thrombozyten | 161/ μ l |
| | Leukozyten | 2,5/ μ l |
| | Blasten | 15% |
| Knochenmark | Blasten | 80% |
| Immunphänotypisierung (KM) | CD 34 | 65% |
| | TdT | 67% |
| | HLA-DR | 78% |
| | CD 7 | 27% |
| | CD 117 | 62% |
| | MPO | n.u. |
| | CD 13 | 29% |
| | CD 33 | 11% |
| | CD 65 | 13% |
| | CD 15 | 7% |
| | CD 14 | n.u. |
| | CD 19 | 19% |
| Zytochemie | CD 2 | 28% |
| | CD 4 | 78% |
| | PAS | + |
| | EST | - |
| | POX | - |

| |
|---|
| Zytogenetischer Befund |
| Normal: 46, XX [15] |
| Klon 1: |
| 46, X, der(X)add(X)(p?23)add(X)(q2?6) or ider(X)add(X)(q2?6) [10] |

Tabelle 4-13: Befunde von Fall Nr. 12

Interpretation:

Die Patientin beschrieb bei Aufnahme einen seit längerem bestehenden Leistungsknick, Schwindel und eine Belastungsdyspnoe. Ferner klagte sie über Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust von 2 Kg in 14 Tagen. Bei der Blutuntersuchung fiel eine Anämie, Thrombozytopenie und Leukozytopenie auf. Außerdem wurden im Blutbild vereinzelt Blasten nachgewiesen. Diese Blasten infiltrierten auch massiv das Knochenmark und verdrängten die normale Hämatopoese. Die Blasten reagierten in der Peroxidase- und Esterasereaktion negativ. Die PAS-Reaktion war positiv. Der Immunphänotyp zeigte eine unreife Zellpopulation mit partieller Expression früher myeloischer Differenzierungsantigene und deutlicher Koexpression von CD 4. Der Stammzellfaktorrezeptor (CD 117) war deutlich positiv. Bei der zytogenetischen Untersuchung aus Knochenmark wurden 25 Metaphasen analysiert. Davon wiesen 15 einen normalen weiblichen Chromosomensatz auf. In den übrigen 10 Metaphasen fehlte immer ein normales X-Chromosom, ein Markerchromosom war hinzugewonnen. Zur genaueren Untersuchung wurde mit Proben für das gesamte Chromosom 4 bzw. X und mit Proben für das Zentromer von Chromosom 4 bzw. X hybridisiert. Dabei zeigte sich, daß das Markerchromosom aus einem komplex rearrangiertem X-Chromosom bestand, das sowohl am kurzen wie am langen Arm eine Anlagerung fremden chromosomalen Materials aufwies. Auch ein Isochromosom des langen Armes eines im langen Arm rearrangierten X-Chromosoms ist möglich. Die Metaphasen aus den Blutkulturen waren alle unauffällig.

4.2.13 Fall Nr. 13, AML M0, männlich, 34 Jahre

| Diagnostik | Untersuchte Parameter | Werte |
|--|-----------------------|--------------|
| Klin. Untersuchung | LK-Schwellung | - |
| | Hepatomegalie | - |
| | Splenomegalie | - |
| Blutwerte | Hb | 12,2 g/dl |
| | Thrombozyten | 200/ μ l |
| | Leukozyten | 7,4/ μ l |
| | Blasten | 52% |
| Knochenmark | Blasten | 75% |
| Immunphänotypisierung (pB) | CD 34 | n.u. |
| | TdT | n.u. |
| | HLA-DR | ++ |
| | CD 7 | ++ |
| | CD 117 | n.u. |
| | MPO | - |
| | CD 13 | ++ |
| | CD 33 | ++ |
| | CD 65 | n.u. |
| | CD 15 | n.u. |
| | CD 14 | n.u. |
| CD 19 | ++ | |
| CD 2 | n.u. | |
| CD 4 | n.u. | |
| Zytochemie | PAS | - |
| | EST | n.u. |
| | POX | - |
| Zytogenetischer Befund Normal: 46, XY [1] Klon 1: 46, XY, der(11)(t(1;11)(q11;q13) [7] | | |

Tabelle 4-14: Befunde von Fall Nr. 13

Interpretation:

Bei der Aufnahmeuntersuchung fanden sich am Körperstamm des Patienten mehrere Petechien. Bei der Inspektion der Mundhöhle fiel eine Soorstomatitis auf. Im durchgeführten Blutbild sah man eine Anämie und einen Anteil von 52% undifferenzierten Blasten. Die zytologische Untersuchung des Knochenmarks zeigte eine Infiltration durch Blasten. Die normale Granulopoese und Thrombopoese wurde verdrängt. Lediglich die Erythropoese war regelrecht erhalten. Die Peroxidase- und PAS-Reaktion fiel negativ aus. Die EST-Reaktion wurde nicht untersucht. Der immunologische Befund, der hier nur beschreibend vorliegt, zeigt eine unreife Zellpopulation mit deutlicher Expression myeloischer Antigene wie CD 13 und CD 63. Das Progenitorantigen HLA-DR ist deutlich positiv. Ebenfalls werden zwei B-Zellantigene, CD 19 und CD 22 (54%), exprimiert. Aus den eingesandten Knochenmarkkulturen wurden 8 Metaphasen analysiert. Davon wies eine einen normalen männlichen Chromosomensatz auf. In den anderen 7 Metaphasen lag eine Anlagerung von Material des langen Armes eines Chromosoms 1 an den langen Arm eines Chromosoms 11 vor.

4.2.14 Fall Nr 14, AML M0, weiblich, 54 Jahre

| Diagnostik | Untersuchte Parameter | Werte |
|-------------------------------|-----------------------|--------------|
| Klin. Untersuchung | LK-Schwellung | - |
| | Hepatomegalie | - |
| | Splenomegalie | - |
| Blutwerte | Hb | 6,3 g/dl |
| | Thrombozyten | 280/ μ l |
| | Leukozyten | 6,6/ μ l |
| | Blasten | 80% |
| Knochenmark | Blasten | 50% |
| Immunphänotypisierung (KM) | CD 34 | 40% |
| | TdT | n.u. |
| | HLA-DR | 40% |
| | CD 7 | 20% |
| | CD 117 | 20% |
| | MPO | 0 |
| | CD 13 | 60% |
| | CD 33 | 40% |
| | CD 65 | n.u. |
| | CD 15 | n.u. |
| | CD 14 | 0 |
| Zytochemie | PAS | - |
| | EST | + |
| | POX | - |
| | | |

| |
|--|
| Zytogenetischer Befund |
| Normal: 46, XX [0] |
| Klon 1: |
| 46, XX, del(2)(p2?), add(9)(q?), del(11)(q?13), add(12)(q?), -17, +mar [6] |

Tabelle 4-15: Befunde von Fall Nr. 14

Interpretation:

Die Patientin klagte bei der Aufnahmeuntersuchung über eine allgemeine Abgeschlagenheit und Belastungsdyspnoe. Bei der körperlichen Untersuchung fanden sich Hämatome sowie eine Pilzinfektion der Haut (beidseits axillär). Weiterhin bestand seit mehr als vier Wochen eine unklare Anämie. Das Blutbild zeigte einen Hämoglobin-Abfall auf 6,3 g/dl. Im peripheren Blut und im Knochenmark fanden sich reichlich Blasten, die die normale Hämatopoese fast vollständig verdrängt haben. Die zytochemischen Reaktionen zeigten eine Negativität für PAS und POX, die EST zeigte eine punktförmige Positivität. Bei der immunologischen Untersuchung fand sich eine Expression der myeloischen Marker CD 33 und CD 13, daneben die Expression von CD 34 (Progenitorantigen), CD 117 (Stammzellfaktorrezeptor) und CD 7 (T-Zell-Antigen) sowie HLA-DR. Der zytogenetische Befund aus Knochenmarkkulturen zeigte in allen 6 analysierten Metaphasen komplexe Strukturveränderungen der Chromosomen 2, 9, 11 und 12. Der kurze Arm eines Chromosoms 2 wies einen Stückverlust auf, weiterhin gab es einen Hinzugewinn an einem langen Arm eines Chromosoms 9. Es fand sich ein Stückverlust des kurzen Armes von Chromosom 11 sowie ein Hinzugewinn am langen Arm von Chromosom 12. Ferner fehlte immer ein Chromosom 17. Ein Markerchromosom war hinzugewonnen.

4.2.15 Fall Nr. 15, AML M0, weiblich, 46 Jahre

| Diagnostik | Untersuchte Parameter | Werte | |
|---|-----------------------|-------------|--|
| Klin. Untersuchung | LK-Schwellung | - | |
| | Hepatomegalie | - | |
| | Splenomegalie | - | |
| Blutwerte | Hb | 5,3 g/dl | |
| | Thrombozyten | 97/ μ l | |
| | Leukozyten | 23/ μ l | |
| | Blasten | 81% | |
| Knochenmark | Blasten | 80% | |
| Immunphänotypisierung (KM) | CD 34 | 82% | |
| | TdT | 68% | |
| | HLA-DR | 94% | |
| | CD 7 | 40% | |
| | CD 117 | 3% | |
| | MPO | n.u. | |
| | CD 13 | 49% | |
| | CD 33 | 33% | |
| | CD 65 | 1% | |
| | CD 15 | 1% | |
| | CD 14 | 0 | |
| Zytochemie | PAS | - | |
| | EST | + | |
| | POX | - | |
| | | | |
| | | | |
| Zytogenetischer Befund Normal: 46, XX [25] | | | |

Tabelle 4-16: Befunde von Fall Nr. 15

Interpretation:

Bei Aufnahme klagte die Patientin über eine Reduzierung des Allgemeinzustandes und wies eine ausgeprägte Blässe auf. Im durchgeführten Blutbild fand sich eine ausgeprägte Anämie, eine Thrombozytopenie und eine Leukozytose sowie ein Blastenanteil von 81%. Ebenfalls dominierten in den Knochenmarkausstrichen die unreifen, blastären Zellen, die die normale Hämatopoese verdrängt hatten. Die zytochemischen Reaktionen PAS und POX waren negativ, die EST war positiv. Im immunologischen Befund stellt sich eine unreife Zellpopulation durch Expression eines frühen myeloischen Antigens bei fehlender Ausreifungstendenz dar. Daneben zeigt sich eine Expression eines B-lymphatischen (CD 19) sowie eines T-lymphatischen Antigens (CD 7). Der zytogenetische Befund zeigt einen normalen weiblichen Karyotyp in allen aus Knochenmarkkulturen analysierten 25 Metaphasen.

4.2.16 Fall Nr. 16, AML M0, weiblich, 30 Jahre

| Diagnostik | Untersuchte Parameter | Werte |
|-------------------------------|------------------------|---------------|
| Klin. Untersuchung | LK-Schwellung | - |
| | Hepatomegalie | - |
| | Splenomegalie | - |
| Blutwerte | Hb | 11,2 g/dl |
| | Thrombozyten | 183/ μ l |
| | Leukozyten | 13,2/ μ l |
| | Blasten | 80% |
| Knochenmark | Blasten | 86% |
| Immunphänotypisierung (KM) | CD 34 | 92% |
| | TdT | n.u. |
| | HLA-DR | 94% |
| | CD 7 | 97% |
| | CD 117 | 87% |
| | MPO | 2% |
| | CD 13 | 86% |
| | CD 33 | 97% |
| | CD 65 | n.u. |
| | CD 15 | 0 |
| | CD 14 | 0 |
| Zytochemie | PAS | - |
| | EST | - |
| | POX | - |
| | Zytogenetischer Befund | |
| | Normal: 46, XX [13] | |

Tabelle 4-17: Befunde von Fall Nr. 16

Interpretation:

Die Patientin beschrieb bei der Aufnahme einen Leistungsknick und eine Schwäche seit mehreren Wochen. Es bestand eine Anämie, eine leichte Thrombozytopenie sowie eine Leukozytose. Die periphere Blastenzahl betrug 80%. Das Knochenmark zeigte mit 86% unreifen Blasten kaum ausreifende Zellen, eine normale Erythropoese und Granulopoese fand nicht mehr statt, lediglich die Megakaryopoese schien nur leicht beeinträchtigt zu sein.

Zytochemisch reagierten die Blasten negativ für PAS, POX und EST. Der immunologische Befund war nur eingeschränkt beurteilbar, weil der Patientin bereits Vincristin verabreicht wurde. Trotzdem fanden sich genug unreife Blasten (90%), die deutlich die myeloischen Differenzierungsantigene CD 13 und CD 33 exprimierten. Ferner zeigte sich eine Koexpression eines T-lymphatischen Markers (CD 7).

Alle 13 Metaphasen aus den Knochenmarkkulturen wiesen einen normalen weiblichen Karyotyp auf. Hier konnte nur eine eingeschränkte Aussage getroffen werden, da die Patientin, wie bereits oben erwähnt, einmalig Vincristin erhalten hatte.

4.2.17 Fall Nr. 17, AML M0, männlich, 28 Jahre

| Diagnostik | Untersuchte Parameter | Werte |
|--|-----------------------|--------------|
| Klin. Untersuchung | LK-Schwellung | - |
| | Hepatomegalie | - |
| | Splenomegalie | - |
| Blutwerte | Hb | 6 g/dl |
| | Thrombozyten | 120/ μ l |
| | Leukozyten | 2,5/ μ l |
| | Blasten | 15% |
| Knochenmark | Blasten | 59% |
| Immunphänotypisierung (KM) | CD 34 | 81% |
| | TdT | n.u. |
| | HLA-DR | 16% |
| | CD 7 | 96% |
| | CD 117 | 1% |
| | MPO | 1% |
| | CD 13 | 2% |
| | CD 33 | 87% |
| | CD 65 | n.u. |
| | CD 15 | n.u. |
| CD 14 | 0 | |
| CD 19 | 3% | |
| CD 2 | 6% | |
| CD 4 | 3% | |
| Zytochemie | PAS | - |
| | EST | n.u. |
| | POX | - |
| Zytogenetischer Befund Normal : 46, XY [26] | | |

Tabelle 4-18: Befunde von Fall Nr. 17

Interpretation:

Der Patient bemerkte seit vier Wochen zunehmende Luftnot und eine Reduzierung des Allgemeinzustandes. Im peripheren Blutbild lag eine Panzytopenie vor mit einem Blastenanteil von 15%. Die Blasten fanden sich auch in großer Anzahl in den Knochenmarkausstrichen, wo sie die normale Hämatopoese verdrängt hatten. Die zytochemische Reaktion der undifferenzierten Blasten war in der POX- und PAS-Färbung negativ (EST wurde nicht untersucht). Die Blastenpopulation exprimiert bei der immunphänotypischen Untersuchung vornehmlich das myeloische Antigen CD 33 und das Progenitorantigen CD 34. CD 7, ein T-lymphatischer Marker, wird deutlich koexprimiert.

Der zytogenetische Befund aus den Knochenmarkkulturen wies in allen 26 Metaphasen einen normalen männlichen Karyotyp auf.

5 Auswertung

5.1 Auswertung der Ergebnisse

5.1.1 Klinische und hämatologische Merkmale

Die klinischen und hämatologischen Merkmale sind in der Tabelle 5-1 zusammengefaßt.

| Diagnostik | Durchschnitt | Normalwerte |
|--|--------------|-------------|
| Patientenanzahl (n) | 17 | |
| Alter (Jahre) | 44 | |
| Hämoglobin (g/dl) | 9,02 | 12-16 |
| Thrombozyten $\times 10^6/\mu\text{l}$ | 174,8 | 150-350 |
| Leukozyten/ μl | 14,2 | 4-10 |
| Blasten im Blut (%) | 58,5 | |
| Blasten im KM (%) | 75,3 | |
| LK-Schwellung (%) | 0,7 | |
| Hepatomegalie (%) | 0,7 | |
| Splenomegalie (%) | 0,7 | |

Tabelle 5-1: *Klinische und hämatologische Merkmale der 17 AML M0 Patienten*

Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung der Patienten lag bei 44 Jahren. Die Anzahl der erkrankten Frauen entsprach ungefähr der Anzahl der erkrankten Männer (Frauen: 9, Männer 8).

Die Hämoglobinkonzentrationen lagen bei allen Patienten deutlich unterhalb der Normgrenze mit einem Durchschnittswert von 9 g/dl. Die Thrombozytenwerte waren ebenfalls im unteren Normbereich. Anders verhalten sich die Leukozyten: hier beobachtete man konstant erhöhte Werte mit einem Durchschnittswert von 14,2/ μl , der deutlich oberhalb der Normgrenze lag. Blasten im peripheren Blut fand man bei fast 60% der Patienten, d.h. mehr als die Hälfte der Patienten zeigte bei Aufnahme eine Blastenpopulation. Parallel dazu verhalten sich die Blasten im Knochenmark, die in ca. 80% der Fälle nachweisbar waren.

Anamnestisch bestand bei fast allen Patienten eine Reduzierung des Allgemeinzustandes mit zum Teil schon vorhandenen schweren Begleitinfektionen, die mitunter zur Diagnosestellung geführt hatten.

Die klinischen Untersuchungsmerkmale, wie Lymphknotenschwellungen, Hepato- und Splenomegalie stellen sich dagegen allgemein als selten und unspezifisch dar.

5.1.2 Immunologische Merkmale der AML M0

Die Ergebnisse der Immunphänotypisierung wurden in der Abbildung 5-1 zusammengefaßt. Bei der graphischen Darstellung handelt es sich um durchschnittliche Prozentzahlen. Zu erwähnen ist, daß nicht bei allen Patienten jeder immunologische Marker bestimmt worden ist. Dies ist bei der Berechnung berücksichtigt worden. Bei drei Patienten lag lediglich eine Beschreibung der Werte ohne quantitative Prozentangaben vor.

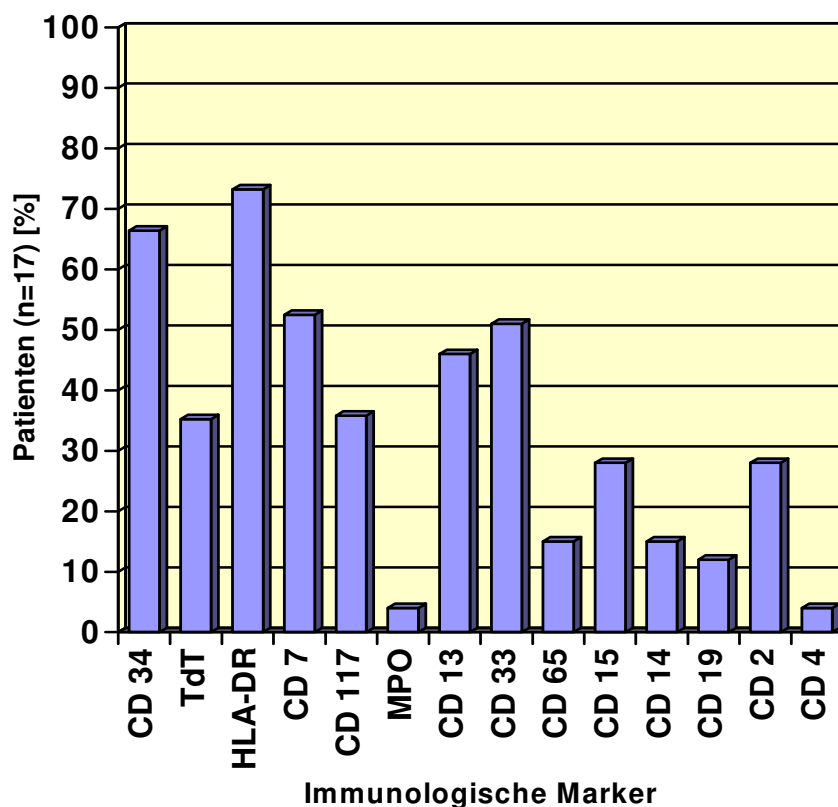


Abbildung 5-1: Immunologische Marker bei AML M0

Die Abbildung 5-1 beschreibt auf der x-Achse die wichtigsten immunologischen Marker, die bei den von mir untersuchten Patienten bestimmt worden sind. Auf der y-Achse sind die durchschnittlichen Prozentzahlen aufgetragen.

Bei der ersten Betrachtung fällt eine deutliche Positivität von über 70% für HLA-DR, einem Progenitor für unreife Vorläuferzellen auf. Gefolgt von CD 34 (63%) einem Marker für myeloische und lymphoide Vorläuferzellen. Ebenso deutlich positiv sind die myeloischen Marker CD 13 und CD 33. CD 117, der Stammzellrezeptorfaktor, findet sich bei 36% der untersuchten Patienten. Etwas weniger positiv ist bei 35% der Patienten eine Expression von TdT, einem Marker für lymphatische Vorläuferzellen, nachzuweisen.

Nur geringe Werte wurden für die Myeloperoxidase (MPO) gefunden. Bei etwa 4% der untersuchten Patienten war eine Positivität für MPO feststellbar.

Weiterhin kann man erkennen, daß bei einigen Patienten mit einer AML M0 eine schwache Positivität für die T- und B- lymphatischen Marker CD 19, CD 2 und CD 4 gefunden wurde. Der höchste Wert wurde mit 28% bei CD 2 gefunden. Die Marker sind nur bei wenigen Patienten nachzuweisen und dienen dann zur Abgrenzung gegenüber einer ALL.

Andere Marker waren so niedrig oder nicht exprimiert, sodaß sie hier nicht aufgelistet sind.

5.1.3 Zytochemische Auswertung

Die PAS Reaktion wurde bei allen 17 Patienten durchgeführt. Der überwiegende Anteil (13 Patienten) war negativ. In drei Fällen zeigte die PAS Färbung eine leichte Positivität, in einem Fall war sie positiv.

Die Esterase Reaktion wurde bei 15 Patienten untersucht und fiel bei 12 Patienten negativ, bei einem leicht positiv, bei zwei deutlich positiv aus. Bei zwei Patienten wurde keine Esterase Bestimmung durchgeführt.

Die POX Reaktion wurde bei allen Patienten durchgeführt und fiel immer negativ aus.

Eine Übersicht der zytochemischen Ergebnisse zeigt Tabelle 5-2.

| Zytochemische Reaktion | + | +/- | - | Patienten (n=17) |
|------------------------|---|-----|----|------------------|
| PAS | 1 | 3 | 13 | 17 |
| EST | 2 | 1 | 12 | 15 |
| POX | | | 17 | 17 |

Tabelle 5-2: Zytochemische Ergebnisse der 17 untersuchten Patienten

5.1.4 Zytogenetische Auswertung

Eine zytogenetische Untersuchung wurde bei allen 17 Patienten durchgeführt. Strukturelle Veränderungen in Form von Zugewinnen (add) oder Verlusten (del) waren bei nahezu allen untersuchten Patienten (14/17) zu beobachten. Numerische Veränderungen, im Sinne von Veränderungen des ganzen Chromosomensatzes oder Zugewinnen und Verlusten von ganzen Chromosomen, zeigten sich bei 14 Patienten. Drei Patienten wiesen einen normalen weiblichen oder männlichen Karyotyp auf.

| Zytogenetische Veränderung | Patienten (n=17) |
|----------------------------|------------------|
| Strukturelle Aberrationen | 14 |
| Numerische Aberrationen | 13 |
| Normaler Karyotyp | 3 |

Tabelle 5-3: Übersicht der zytogenetischen Veränderungen

Die zytogenetischen Veränderungen sind nicht isoliert nur bei einem Patienten zu finden, sondern sie sind oft mit anderen Aberrationen kombiniert, d.h., daß ein Patient mehrere zytogenetische Veränderungen haben kann.

Strukturelle chromosomale Veränderungen, in Form von Deletionen (5/17 untersuchten Fällen) und Additionen (4/17 untersuchten Fällen), stellen bei denen von mir untersuchten Patienten die häufigste zytogenetische Veränderung dar. Translokationen waren nur bei zwei Patienten (Fall Nr. 3 und 13) zu beobachten. Ein Derivatvchromosom kam bei drei Patienten (Fall Nr. 5, 12, 13), ein Markerchromosom bei zwei Patienten (Fall Nr. 9 und 14) vor. Eine Inversion wurde in einem Fall gefunden (Fall Nr. 10), sowie eine Isochromosombildung (Fall Nr. 11).

Bei den numerischen Aberrationen war zu beobachten, daß bei acht Patienten Zugewinne oder Verluste von ganzen Chromosomen bestanden. Hierbei waren Verluste von ganzen Chromosomen am häufigsten. Veränderungen des ganzen Chromosomensatzes fanden sich bei drei Patienten (Fall Nr. 6-8).

5.1.4.1 Häufig betroffene Chromosomen

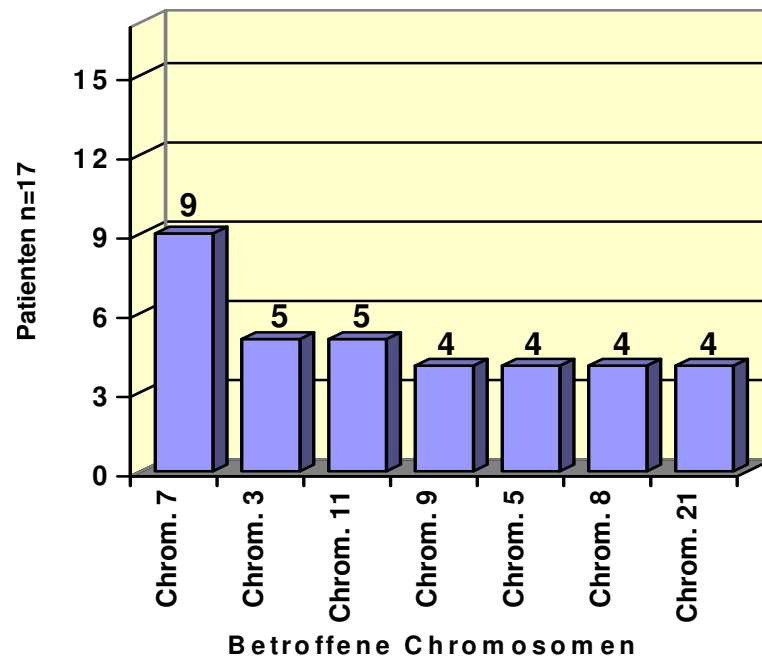


Abbildung 5-2: Häufig betroffene Chromosomen bei den 17 untersuchten Patienten.

Veränderungen an Chromosom 7

Am häufigsten betroffen war das Chromosom 7 (insgesamt bei 9/17 Patienten). Dabei wurden bei drei Patienten (Nr. 1, 9 und 10) Deletionen beobachtet; zweimal war hierbei der lange, einmal der kurze Arm des Chromosoms betroffen. Ein Zugewinn am langen Arm des Chromosoms 7 fand sich im Fall Nr. 9, eine Inversion des langen Armes ebenfalls in einem Fall (Nr.11). Es waren immer verschiedene chromosomale Regionen betroffen. Ein kompletter Verlust des Chromosoms 7 war nur im Fall Nr. 3 zu beobachten. Bei drei Patienten kam durch den veränderten Chromosomensatz ein oder mehrere Chromosomen 7 hinzu.

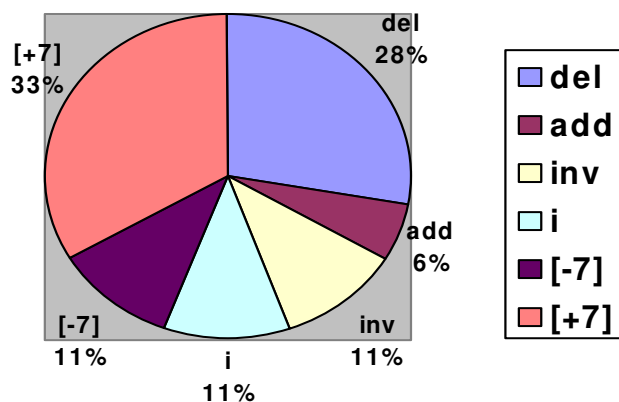


Abbildung 5-3: *Veränderungen an Chromosom 7*

Veränderungen an Chromosom 3

Veränderungen an Chromosom 3 wurden insgesamt bei fünf Patienten beobachtet, dabei sind im Fall Nr. 6 gleich mehrere komplexe Veränderungen des Chromosoms 3 beschrieben.

Die Beteiligung der Region q21-q27 des Chromosoms 3 kommt in Form von Translokationen, Inversionen und Entstehung von Derivatchromosomen dreimal vor (Fall Nr. 3, 6 und 10). Eine Deletion des kurzen Armes von Chromosom 3 wurde einmal beobachtet, ein kompletter Verlust des Chromosoms 3 fand sich in einem Fall. Zugewinne von einem ganzen Chromosom 3 fanden sich aufgrund der veränderten Chromosomensätze bei drei Patienten.

Veränderungen an Chromosom 11

Eine Beteiligung von Chromosom 11 beobachtete man in den Fällen Nr. 13 und 14. Im Fall Nr. 14 ging Material des langen Armes von Chromosom 11 verloren und in Fall Nr. 13 entstand ein Derivatchromosom aus Anteilen von Chromosom 11 und 1. Jeweils betroffen waren hier die Regionen auf den langen Armen der beiden Chromosomen.

Veränderungen an Chromosom 9

Strukturelle Veränderungen von Chromosom 9 fanden sich bei zwei der untersuchten Patienten. Im Fall Nr. 2 ging Material des kurzen Armes von Chromosom 9 verloren $\text{del}(9)(p13)$. Im Fall Nr. 14 gab es einen Zugewinn am langen Arm von Chromosom 9, die genaue Chromosomenbande konnte aber nicht identifiziert werden.

Veränderungen an Chromosom 5, 8 und 21

Seltener beobachtet wurden Veränderungen der Chromosomen 5, 8 und 21. Sie wurden als ganze Chromosomen entweder hinzugewonnen wie im Fall Nr. 4: +8 und im Fall Nr. 6: +21 oder verloren (Fall Nr. 9: -5). Eine strukturelle Veränderung von Chromosom 5 war nur einmal im Fall Nr. 8 nachweisbar. Hier handelte es sich um einen Stückverlust des langen Armes.

Chromosomensatzveränderungen

Veränderungen des Chromosomensatzes fanden sich bei drei Patienten (Fall Nr. 6-8) und waren meist mit anderen Chromosomenaberrationen kombiniert. Fall Nr. 6 wies einen komplex hyperdiploiden Chromosomensatz mit 48 Elementen und überzähligem komplex verändertem Chromosom 3 sowie eine Trisomie 21 auf. Zudem bestand eine $t(X;10)$. Bei Fall Nr. 7 handelte es sich um einen nahezu tetraploiden Chromosomensatz. Einen nahezu triploiden Chromosomensatz beobachtete man auch in Fall Nr. 8 mit einem relativem Verlust von Material eines Teils des langen Armes von Chromosom 5 sowie mit relativem Zugewinn des langen Armes von Chromosom 8.

Normaler Karyotyp

Drei Patienten wiesen einen normalen weiblichen oder männlichen Karyotyp auf (Fall Nr. 15-17).

6 Diskussion

6.1 Zytogenetische Veränderungen sind bei vielen Patienten mit einer AML M0 zu finden

Die AML M0 stellt auf klinischer, morphologischer und genetischer Ebene eine heterogene Erkrankung dar (Stasi et al. 1999). Bei der AML M0 treten chromosomale Veränderungen im Vergleich zu anderen FAB-Subtypen bei der Hälfte der Patienten auf (Klaus et al. 2004, Cohen et al. 1998), häufig als unbalancierte Chromosomenveränderungen (Cuneo et al. 1995). Während bei balancierten Aberrationen das Zusammenfügen von unterschiedlichem chromosomalen Material zur Entstehung abnormer Fusionsgene mit kanzerogenem Potential führt, kommt es bei unbalancierten Aberrationen durch den Verlust oder Zugewinn von chromosomalen Material zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder Aktivierung bestimmter Protoonkogene (Budillon et al. 1995). Die Folgen der veränderten Genexpression sind der Verlust der Wachstumskontrolle und die klonale Proliferation der veränderten Zellen (Appelbaum et al. 2001). Bei der AML M0 finden sich sowohl balancierte und unbalancierte Aberrationen, die gleichermaßen relevant sind. Am häufigsten finden sich Anomalien der Chromosomen 5, 7, 8 und 11 (Béné et al. 2001). Klaus et al. beschreibt, daß besonders die Trisomien 11, 13 und 14 mit einer AML M0 assoziiert sind (Klaus et al. 2004). Etwa ein Viertel (24%) der Erwachsenen mit einer AML M0 zeigt keine zytogenetischen Veränderungen (Béné et al. 2001).

Der Karyotyp der leukämischen Blasten stellt den wichtigsten unabhängigen prognostischen Parameter sowohl in bezug auf das Ansprechen der Therapie als auch auf das Überleben dar (Arthur et al. 1989, Mrózek et al. 1997, Grimwade et al. 2001, Schoch et al. 2005). Die prognostische Bedeutung der Chromosomenaberrationen ist jedoch immer im Zusammenhang mit der verabreichten Therapie zu sehen, da diese einen entscheidenden Einfluß auf die Prognose hat. Leider sind die Remissionsraten und die Remissionsdauer der AML nach den heutigen Therapieansätzen nicht zufriedenstellend (Büchner et al. 2001), sodaß die Leukämogenese der einzelnen Subgruppen immer wichtiger wird, um risikoadaptierte Therapien zu entwickeln. Deshalb werden heute alle Patienten hinsichtlich ihres zytogenetischen Risikoprofils in Gruppen mit niedrigem, intermediärem und hohem Risiko und dementsprechend schlechter Prognose eingeteilt (s. Tabelle 6-1).

| Prognose | Karyotyp |
|-------------|---|
| günstig | t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q12), inv(16(p13q22))/t(16;16)(p13;q22) |
| intermediär | normaler Karyotyp, andere Chromosomenaberrationen |
| ungünstig | -5/5q-, -7/7q-, 17p-, 11q23-Anomalien, komplex aberranter Karyotyp |

Tabelle 6-1: Einteilung des Risikoprofils der AML M0 anhand des Karyotyps

6.1.1 Charakteristische chromosomale Veränderungen – Karyotypen mit ungünstiger Prognose

Aufgrund der geringen Fallzahl ist eine statistische Auswertung nicht aussagefähig. Aus diesem Grund sollen die Ergebnisse mit der Literatur verglichen werden.

Häufig betroffen – Chromosom 7

Am häufigsten bei den von mir untersuchten Patienten betroffen war das Chromosom Nr. 7 in Form von Verlusten oder Zugewinnen von genetischem Material. Das Chromosom 7 besteht aus ca. 159 Mill. bp und repräsentiert ca. 5% der gesamten menschlichen DNA. Es codiert ca. 1000-1500 Gene. Auf Chromosom Nr. 7 sind vor allen Dingen Gene für Wachstum und Entwicklung der Knochen, sowie für die geistige Entwicklung gespeichert. Eine Deletion des langen Armes von Chromosom 7 bei Erwachsenen ist häufig mit einer sekundären Leukämie, z.B. nach einer Chemo- oder Strahlentherapie, vergesellschaftet. Bei einer de novo AML resultieren daraus myelodysplastische Syndrome oder akute myeloische Leukämien.

Die Monosomie 7 und die del 7q sind die häufigsten Veränderungen am Chromosom 7 bei der AML M0 (Lu et al. 2004) und gehen mit einer schlechten Prognose einher. Immer ist die del 7q eine interstitielle Deletion und betrifft meistens die Bruchpunkte q22 bis q36. Vermutlich führt der Verlust dieser Regionen zu einem Mechanismus, der bei der Entstehung maligner myeloischer Erkrankungen beteiligt ist. Im Fall Nr. 1 sieht man hier den typischen 7q22 Verlust. Die AML M0 könnte eine sekundäre AML sein, da die Patientin vor Jahren eine Strahlentherapie aufgrund eines Sigmacarcinoms hatte.

Der Verlust eines Chromosoms 7 ist eine häufig zu beobachtende numerische Aberration bei AML M0. Dabei tritt sie in 12% der Fälle gemeinsam mit anderen zytogenetischen Veränderungen, wie der Trisomie 13 auf (Cohen et al. 1998).

Typischerweise findet man sie bei chronisch myeloproliferativen Erkrankungen, myelodysplastischem Syndrom und als sekundäre Leukämie nach Exposition von genschädigenden Agenzien (Le Beau et al. 1986; Pedersen-Bjergaard et al. 1991).

Die Monosomie 7 ist mit typischen hämatologischen Veränderungen vergesellschaftet. So beobachtete Berger et al. (1981) in früheren Untersuchungen, daß bei Patienten mit Monosomie 7 gehäuft Micromegakaryozyten im Knochenmark gefunden wurden. Außerdem findet sich bei Patienten mit dieser Veränderung eine erhöhte Disposition gegenüber Infektionen mit Fieber und erhöhten Leukozyten bei Diagnosestellung. Bei der hier untersuchten Patientin in Fall Nr. 3 ist die Monosomie 7 mit einer Translokation t(3;6)(q21;q25-27) verbunden und wurde vorher noch nicht beschrieben. Die Patientin litt bei Aufnahme an einer seit sechs Monaten bestehenden essentiellen Thrombozythämie. Die Megakaryopoese war stark erhöht und die Patientin litt an einem Soor der Mundschleimhaut. Fieber wurde nicht festgestellt.

Die inv(3)(q21q26)

Eine Inversion des langen Armes von Chromosom 3 findet man typischerweise bei myeloischen Leukämien, die geprägt sind durch eine gestörte Thrombopoese, Micromegakaryozyten und eine schlechte Prognose. Vorzugsweise sind sie mit strukturellen Aberrationen des Chromosoms 7 kombiniert (Jotterrand Bellomo et al. 1992) und gehen aus einem myelodysplastischem Syndrom hervor (Fonatsch et al. 1994). Häufig findet man die inv(3)(q21q26) bei den FAB-Subtypen M1, 2, 4, 6 und 7. Selten (1-2% der Fälle) wird sie bei einer AML M0 gefunden (Wieser et al. 2001).

Bei den zwei hier untersuchten Fällen hatte die Patientin im Fall Nr. 3 eine maskierte inv(3)(q21q26) sowie eine Monosomie 7 einhergehend mit einer Thrombozytose. Die vorangegangene Thrombozythämie war resistent gegenüber der Behandlung mit α -Interferon und Hydroxyurea. Auch die anschließend durchgeführte Chemotherapie und Knochenmarktransplantation konnten die Patientin nicht therapieren, sodaß sie innerhalb von sechs Monaten verstarb, was für den dynamischen Verlauf der Erkrankung spricht.

Im Fall Nr. 10 litt die Patientin seit sechs Jahren an einem myelodysplastischem Syndrom. Der Karyotyp wies eine inv(3)(q21q26) und zusätzlich eine del(7)(p11) auf. Die initialen Thrombozytenwerte waren hoch. Auch hier zeigte sich ein schlechtes Ansprechen auf die Chemotherapie und die Patientin verstarb innerhalb kurzer Zeit.

Die beiden Fälle zeigen einen ähnlich aggressiven Verlauf der Erkrankung und eine weitestgehende Resistenz gegenüber einer Chemotherapie.

Die *inv(3)(q21;q26)* involviert den Transkriptionsfaktor EVI1 (ecotropic viral integration 1 site) auf Chromosom 3q26. EVI1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese des 3q21q26 Syndroms. Normalerweise findet sich EVI1 nicht in normalen Blutzellen oder im Knochenmark. Eine Überexpression findet man bei myelodysplastischen Syndromen und myeloischen Leukämien (Martinelli et al. 2003). EVI1 ist ein komplexer Transkriptionsfaktor mit multiplen Funktionen, der z.B. den Wachstumsfaktor TGFbeta reguliert. TGFbeta ist ein wichtiger Regulator der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose (Fuchs 2006, Buonamici et al. 2003). Inwieweit EVI1 für die Leukämogenese verantwortlich ist, ist zur Zeit noch nicht bekannt.

Komplex aberrante Karyotypen

Bei insgesamt vier Patienten (Fall Nr. 9, 11, 12, 14) konnte ein komplex aberranter Karyotyp mit zum Teil unbalancierten Veränderungen nachgewiesen werden. Diese komplex veränderten Karyotypen findet man bei 10-15% bei de novo AML und bei 30-50% der Patienten mit sekundärer AML, für die AML M0 sind bisher keine Zahlen bekannt. Definitionsgemäß handelt es sich hierbei um Karyotypen, die mindestens drei bzw. fünf Aberrationen beeinhalteten (Dugas et al. 2001). Neueste Forschungsergebnisse zeigen, daß bei der AML mit komplex aberrantem Karyotyp, regelmäßig der Verlust des TP-53 (tumor protein 53) Gens nachzuweisen ist (Haferlach et al. 2008). Das TP-53 Gen, lokalisiert auf 17p31, agiert als Tumorsuppressor und reguliert die Ausdifferenzierung und Apoptose, ebenso kann es spezielle Gene zur Genomreparatur aktivieren. Diese Patientengruppe zeigt eine besonders schlechte Prognose aufgrund eines mangelnden therapeutischen Ansprechens der Chemotherapeutika. Diese AML Gruppe mit komplex aberrantem Karyotyp stellt eine eigene biologische Entität dar (Haferlach et al. 2004). Die genaue Leukämogenese bleibt noch zu erforschen, damit die Therapie effektiv und gezielt durchgeführt werden kann.

Veränderungen an Chromosom 5

Die Veränderungen an Chromosom 5 kamen bei den Patienten mit komplex veränderten Karyotyp vor (Fall Nr. 8 und 9). Im Fall Nr. 8 in Form eines Stückverlustes des langen Arms von Chromosom 5 und im Fall Nr. 9 handelte es sich um einen kompletten Verlust des Chromosoms 5.

Der Verlust des ganzen Chromosoms 5 oder der Verlust des langen Arms von Chromosom 5 sind häufig zu beobachtende Veränderungen bei AML und MDS (Joslin et al. 2007). Deletionen von Chromosom 5 und der Region 5q kommen in ca. 10% der Fälle der de novo AML vor (Herry et al. 2007). Sie traten beide in Kombination mit komplex veränderten Karyotypen auf, was auch mit der Literatur übereinstimmt (Lessard et al. 2007). Dies könnte bedeuten, daß der Verlust von 5/5q eine spezifische Aberration bei der AML M0 mit komplex aberranten Karyotyp darstellt. Bei den hier untersuchten Patienten wurde zur genaueren Untersuchung der chromosomalen Zusammensetzung eine vergleichende Genom-Hybridisierung durchgeführt (CGH) durchgeführt. Im Fall Nr. 8 bestanden Verluste im langen Arm von Chromosom 5. Es war die Region 5q21 bis 5q35 verloren gegangen. Nur wenige Gene auf 5q, die bei der Kanzerogenese eine Rolle spielen sind bekannt. Eine regulierende Funktion im Zellzyklus scheinen das EGR1-Gen (5q31) (early growth response gene 1), das CTNNA1-Gen (5q31) (human α -catenin gene) und das CSF1R-Gen (5q33-35) (macrophage colony-stimulating factor 1 receptor precursor), Kandidatengene, zu haben (Joslin et al. 2007, Liu et al. 2007). Typischerweise kann man bei einer FISH-Untersuchung regelmäßig ein Verlust dieses EGR1-Gens nachweisen. Interessanterweise ist dabei immer nur ein Allel von dem Verlust betroffen, daß andere war von der Mutation unbetroffen (Joslin et al. 2007, Herry et al. 2007). Das könnte bedeuten, daß der Verlust nur eines Allels, die sogenannte Haploinsuffizienz, für die Leukämieentstehung ausreicht und das klassische Modell der Tumorsuppressorgene, das besagt, daß beide Allele eines Gens inaktiviert sein müssen, hier nicht zutrifft (Marshall et al. 1991). Bei den hier untersuchten Fällen wurde leider keine FISH-Untersuchung durchgeführt. Weitere Tumorsuppressorgene werden in den Regionen 5q11 bis 5q13 vermutet (Fairman et al. 1996), die ebenfalls regelmäßig von Deletionen betroffen sind. Hier befindet sich das SKP2-Gen (S-phase kinase-associated protein 2), das für ein bestimmtes Protein kodiert, welches Einfluß auf den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus hat (Knuutila et al. 1999). Verluste des kurzen Arms von Chromosom 5 werden relativ selten beobachtet und sind nicht typisch für eine AML M0. Wahrscheinlich werden diese Gene für die maligne Transformation benötigt oder sie sind für das Überleben der leukämischen Zellen essentiell.

6.1.1.1 Zytogenetische Veränderungen mit intermediärem Risikoprofil

Veränderungen an Chromosom 9 sind sehr selten

Bei einem von 17 Patienten konnte der Verlust des kurzen Armes von Chromosom 9 nachgewiesen werden (Fall Nr. 2), im Fall Nr. 14 gab es einen fraglichen Zugewinn am langen Arm von Chromosom 9. Verluste im Bereich 9p können, wie hier, durch Deletionen aber auch durch Translokationen oder Isochromosombildung entstehen. 9p Deletionen werden typischerweise bei 7-13% der Fälle bei ALL gefunden und sind sehr selten bei einer AML M0. Patienten mit einer Veränderung an 9p zeigen eine schlechte Überlebensrate (Nahi et al. 2008). Kritisch ist der Verlust der 9p21 Region, weil dort mehrere Tumorsuppressorgene, wie CDKN2a und CDKN2b (cyclin dependent kinase 2a) liegen, die bei der Leukämieentstehung eine wichtige Rolle spielen (Kamath et al. 2008, Dreyling et al. 1995), indem sie den Zellzyklus regulieren. Diese Veränderungen auf molekularzytogenetischer Ebene lassen sich nur mit Hilfe spezieller Methoden (CGH und FISH) nachweisen, die hier nicht durchgeführt wurden.

Auffallend ist jedoch, daß bei dem Patienten mit Verlust der 9p13 Region hohe Werte für zwei T-lymphatische Antigene in der Immunphänotypisierung vorlagen (CD 2+7), sodaß man von einer AML mit aberranter Expression T-lymphatischer Marker sprechen kann. Veränderungen der 9p13 Region sind bisher bei keinem Patienten mit AML M0 in der Literatur beschrieben worden.

Verluste am langen Arm von Chromosom 11

Chromosom 11 ist ein durchschnittlich großes Chromosom mit einer der höchsten Gendichten im menschlichen Chromosomensatz. Verständlicherweise führen Veränderungen an diesem Chromosom zu vielfältigen Krankheitsbildern. Aberrationen von Chromosom 11 finden sich in 14% der Fälle bei der ALL und in 18% der Fälle bei der AML (Andreeva et al. 2007). Eine Zuordnung zum AML M0 Subtyp steht noch aus.

Bei den hier untersuchten Fällen (Nr. 13 und 14) handelt es sich jeweils um strukturelle Veränderungen, die den langen Arm von Chromosom 11 betreffen. Im Fall Nr. 13 handelt es sich um eine unbalancierte Translokation der(1)t(1;11) mit partieller Monosomie 11q und partieller Trisomie von 1q. Eine gleichartige Translokation ist bei der AML M0 bisher noch nicht beschrieben worden. Jedoch sind die partielle Monosomie des langen Armes von Chromosom 11

und eine partielle Trisomie des langen Armes von Chromosoms 1 beschrieben worden.

Im Fall Nr. 14 handelt es sich um eine Deletion des langen Armes von Chromosom 11, vermutlich liegt der Bruchpunkt bei der Region 11q13.

Ein wichtiges Gen bei der Entstehung von akuten Leukämien ist das MLL Gen (mixed lineage leukemia) in der Region 11q23, das hier betroffen sein könnte. Das MLL Gen kodiert für ein Protein das jeder Zelle eine spezifische Identität verleiht. Dazu bildet das MLL-Protein mit anderen Proteinen zusammen im Zellkern einen großen Proteinkomplex, der für die vielfältigen Aufgaben der Chromatin-Regulierung notwendig ist (Nilson et al. 1996). Nur aktives Euchromatin erlaubt das Ablesen der dort kodierten Gene. Alle bisher beobachteten Translokationen des MLL-Gens führen zur Ausprägung einer akuten Form der Leukämie (AML oder ALL), die aggressiv fortschreitet und nahezu therapieresistent ist (Cortes et al. 1994). Dies entspricht dem klinischem Verlauf der beiden untersuchten Patienten mit 11q Veränderungen. Beide wiesen einen aggressiven und chemotherapieresistenten Verlauf auf und die Patienten verstarben innerhalb weniger Monate.

Partielle Überrepräsentation von 1q

Ein Zugewinn des langen Armes von Chromosom 1 kann wie im vorliegenden Fall Ausdruck einer unbalancierten Translokation sein: der(11)t(1;11)(q11;q13). Häufiger kommt es zu einer Vermehrung von 1q durch eine Duplikation des langen Armes von Chromosom 1. Bei kindlicher ALL stellt solch eine Duplikation sogar die häufigste strukturelle Aberration überhaupt dar (Raimondi et al. 1996).

Außerdem entsteht ein Zugewinn 1q häufig durch eine unbalancierte Translokation t(1;11)(q11;q13). Bei etwa 75% der Fälle ist die Translokation unbalanciert, indem neben zwei normalen Chromosomen 1 ein Chromosom 11 vorliegt, das durch das translozierte Material von Chromosom 1 im langen Arm verlängert ist. Dadurch besteht eine partielle Trisomie 1q.

Eine Translokation t(1;11) ist bisher bei AML M0 nicht beschrieben worden. Jedoch sind Vermehrungen von 1q als sekundäre chromosomale Veränderungen bei hämatologischen Neoplasien bekannt (Raynaud et al. 1994, Johansson et al. 1994). Pedersen et al. (2000) beschreibt, daß Patienten mit einer myeloischen hämatologischen Erkrankung durchschnittlich jünger sind und das die Überlebensrate länger ist. Wahrscheinlich ist die partielle Trisomie 1q assoziiert mit der Überlebensdauer und dem Alter der Patienten.

Ebenfalls wird ein junges Durchschnittsalter der Patienten (36,5 Jahre) bei myelodysplastischen Veränderungen gefunden, nur hierbei wird die partielle Trisomie 1q als einzige Veränderung beschrieben (Fonatsch et al. 1991).

Veränderungen von Chromosom 8

Eine Trisomie 8 lag im Fall Nr. 4 als alleinige chromosomale Veränderung (47, XX, +8) vor. Diese Chromosomenaberration wird bei etwa 10% in Kombination mit anderen zytogenetischen Veränderungen bei Patienten mit einer AML gefunden. Als alleinige chromosomale Veränderung ist sie eine der häufigsten zu beobachtenden Aberrationen bei AML und MDS (Paulsson et al. 2006, Schoch et al. 2006). Eine Assoziation zu einem bestimmten FAB-Subtyp besteht nicht. Relativ wenig ist über die pathogenetischen Effekte einer Trisomie 8 bekannt. Sie ist häufig als sekundäre Veränderung zu beobachten (Paulsson et al. 2006). Die Prognose eines Patienten mit einer isolierten Trisomie 8 scheint besser, als die eines Patienten in Kombination mit komplexen Karyotypveränderungen zu sein (Schoch et al. 1997). Zugewinne von ganzen Chromosomen führen zu einer Überexpression der Gene auf dem entsprechenden Chromosom, während Verluste von chromosomalen Regionen zu einer Mindereexpression führen (Schoch et al. 2005). In Kombination mit komplexen Karyotypveränderungen könnten diese, dann primäre Veränderungen, auch zu einer Upregulation der überexprimierten Gene führen und somit, als sekundäres Ereignis, eine Tumorenstehung begünstigen (Schoch et al. 2006). Die AML M0 könnte so bei dem Patienten im Fall Nr. 8 entstanden sein.

Im Fall Nr. 8 findet sich ein nahezu triploider Chromosomensatz mit komplexen Karyotypveränderungen, der bei der AML M0 eher selten ist. Zur genaueren Identifikation der Veränderungen wurde eine CGH-Untersuchung durchgeführt. Dabei zeigte die getestete DNA eine Vermehrung von Material des langen Armes von Chromosom 8, sowie einen Verlust von Material am kurzen Arm von Chromosom 8. Auf dem kurzen Arm von Chromosom 8 (8q24) liegt das C-MYC-Onkogen (benannt nach dem MC 29 avian myelocytomatosis virus). C-MYC ist ein Transkriptionsfaktor, der normalerweise streng reguliert ist. In proliferierenden Zellen wird das C-MYC Gen nicht zellzyklusabhängig auf niedrigem Niveau, in ruhenden oder differenzierten Zellen gar nicht exprimiert (Hann et al. 1985). C-MYC kodiert für das AP-4 Gen (activating enhancer binding protein 4), worauf das AP-4 Protein gebildet wird. Dieses AP-4 Protein unterdrückt die Bildung eines zentralen hemmenden Regulators der Zellteilung,

indem es dessen regulatorische Region im Genom besetzt (Jung et al. 2008). Der Verlust dieser Region könnte und zu einer Tumoraktivierung geführt haben.

6.1.2 Patienten ohne chromosomale Veränderungen

Bei den von mir untersuchten Patienten konnte ich in drei Fällen (Nr. 15-17) einen normalen weiblichen oder männlichen Karyotyp nachweisen.

Etwa die Hälfte aller Patienten mit einer AML (ca. 40-50%) weist in der Literatur nach Durchführung der klassischen Zytogenetik keine chromosomalen Veränderungen auf (Gaidzik et al. 2008). Sie werden der intermediären Risikogruppe zugeordnet.

Zunehmend beschrieben werden in den letzten Jahren eine Reihe von kleinen Mutationen und Genarrangements, die nicht zytogenetisch sondern nur mit Hilfe einer PCR nachweisbar sind, sogenannte molekulare Mutationen. Sie sind wichtig für die Prognoseeinschätzung und Therapie. Hierzu gehören zum Beispiel die partiellen Tandemduplikationen im MLL-Gen (MLL-PTD = mixed lineage leukemia - partielle Tandem-Duplikation) und die Längenmutation im FLT-3 Gen (FMS-like tyrosine kinase 3). Durch die oben erwähnte Mutation wird die Struktur des FLT-3 Rezeptors so verändert, daß dieser dauerhaft aktiv ist und damit der Zelle signalisiert, sich ungehemmt zu teilen (Bacher et al. 2008). Ebenso häufig läßt sich eine Punktmutation in der Tyrosinkinasedomäne des FLT-3 Gens (TKD-Mutation) nachweisen. Diese Mutationen werden, wenn man sie spezifisch nachweist, bei 20-25% aller AML bei Erwachsenen mit einem normalen Karyotyp gefunden (Kinder 10-15%) und sind dann mit einer schlechten Prognose verbunden (Bacher et al. 2008, Mattison et al. 2007). Weitere molekulare Mutationen, die sich nur durch eine spezielle PCR nachweisen lassen sind Mutationen der Transkriptionsfaktoren CEBPA (CCAAT-enhancer binding protein alpha auf Chromosom 19q13.1) und AML1 (acute myeloid leukemia 1 auf Chromosome 21q22.3), die eine wichtige Rolle bei der Hämatopoese spielen, sowie NPM (nucleophosmin auf Chromosom 5q35) Mutationen. NPM Mutationen werden bei 50-60% aller AML Patienten gefunden, die einen normalen Karyotyp zeigen (Falini et al. 2008) und gelten als prognostisch günstig. Sind sie jedoch mit einer AML1 Mutation kombiniert, scheinen sie eine schlechtere Prognose zu haben (Gaidzik et al. 2008).

AML1 Mutationen finden sich häufig bei AML M0 und sind mit einer schlechten Prognose assoziiert.

Inwieweit die molekularen Mutationen routinemäßig bei Patienten mit einer AML M0 und normalen Karyotyp nachgewiesen werden können, bleibt weiteren Untersuchungsergebnissen überlassen.

| Mutation | Häufigste Subtypen | Prognose |
|----------|--|-----------|
| MLL-PTD | Normaler Karyotyp (11%) Trisomie 11 | ungünstig |
| FLT-3-LM | Normaler Karyotyp (40%) t(15;17) (35%) | ungünstig |
| AML1 | M0 (22%) Trisomie 21 (30%) | ungünstig |
| NPM | Normaler Karyotyp (55%) | günstig |

Tabelle 6-2: Molekulare Mutationen bei AML

6.2 Zukünftige Therapieoptionen

Da die Remissionsraten und die Remissionsdauer der AML mit den heutigen therapeutischen Ansätzen nicht zufriedenstellend sind (Büchner et al. 2001), ist die Leukämogenese der einzelnen Subgruppen von entscheidender Bedeutung. Nur somit sind gezielte Therapien der AML möglich.

Das Ergebnis der Chromosomenanalyse nimmt so zunehmend Einfluß auf die Therapieentscheidungen und bleibt nach wie vor der Goldstandard. Neben der klassischen Chromosomenanalyse hat die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Bedeutung gewonnen. Mit Hilfe dieser Technik ist es einerseits möglich, gezielt bereits bekannte genetische Veränderungen auch an Interphasekernen nachzuweisen, andererseits können komplexe Karyotypveränderungen genauer als mit der Chromosomenanalyse aufgeklärt werden. Die Bedeutung der FISH-Technik bei der AML ist bei Diagnosestellung vor allem als Ergänzung zur konventionellen Chromosomenanalyse zu sehen (Kim et al. 2001).

Eine weitere für die Zukunft zunehmend wichtige Untersuchungsmethode ist die RT-PCR (Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction), die heutzutage noch nicht standardmäßig durchgeführt wird und nur wenigen Laboren zur Verfügung steht. Hierbei werden im Rahmen der molekularen Diagnostik Fusionsgene nachgewiesen, die mit Hilfe der klassischen Zytogenetik nicht nachweisbar sind. Bei ca. 25% aller AML liegen reziproke Chromosomenrearrangements auf molekularer Ebene vor. Die Fusionsgene der meisten reziproken zytogenetisch nachweisbaren Rearrangements sind bekannt. Ziel für die Zukunft ist es, durch eine detaillierte Analyse genetischer und funktioneller Veränderungen der leukämischen Blasten spezifische Therapiemöglichkeiten für die verschiedenen AML-Subtypen zu entwickeln. Ein Therapieansatz wäre zum Beispiel die Entwicklung von Kinaseinhibitoren bei der FLT-3-Rezeptor-Mutation. Die neuen Medikamente könnten dann gezielt den FLT-3-Rezeptor blockieren und somit inaktivieren. Dadurch käme es zum Absterben der genetisch veränderten Leukämiezelle. Eine weitere Möglichkeit auf molekularer Ebene besteht in dem Monitoring einer Resterkrankung bzw. einem Relaps der Erkrankung. Mit Hilfe der neuen Untersuchungsmethoden (RT-PCR und Minimal-flow-cytometry) können bei mehr als der Hälfte der Patienten durch die Verlaufsbeobachtung von FLT-3 eine Resterkrankung bzw. ein Relaps frühzeitig diagnostiziert werden (Kern et al. 2008, 2005). Diese neuen Therapien wären insgesamt schonender und besser verträglich für den Patienten, da sie nicht zu einer Schädigung der gesunden Zellen führen würden (Wilhelm-Sander-Stiftung, 2007) bzw. den Verlauf der Erkrankung monitoren könnten und so eine risikoadaptierte Therapie in jedem Stadium der Erkrankung möglich wäre.

Die ersten klinischen Erprobungen für diese neuen Medikamente verlaufen zur Zeit recht vielversprechend. Ob alle Patienten davon profitieren könnten und ob sie einen dauerhaften Erfolg erzielen könnten bleibt noch zu erwarten.

7 Zusammenfassung

Die AML M0 ist eine seltene Erkrankung mit schlechter Prognose. Sie stellt auf klinischer und morphologischer Ebene eine heterogene Erkrankung dar. Die Diagnose kann nicht allein aufgrund morphologischer Kriterien gestellt werden, sondern bedarf zytochemischer und immunphänotypischer Zusatzuntersuchungen. Bei der Tumorentstehung spielen neben Genmutationen umschriebener Gene, z.B. durch Strukturaberrationen, auch komplexe Veränderungen des Genoms mit Zugewinnen und Verlusten von Chromosomen oder Chromosomenteilen eine wichtige Rolle. Der Nachweis einer Vielzahl von klonalen Veränderungen reflektiert die biologische Heterogenität dieser Krankheit und stellt einen weiteren Beweis dafür dar, dass hier nicht ein einheitlicher Subtyp vorliegt sondern ein ganzes Spektrum unterschiedlicher maligner Prozesse in dieser Gruppe zusammengefaßt wird.

Chromosomale Veränderungen finden sich bei etwa der Hälfte der diagnostizierten Patienten mit einer AML M0. Die konventionelle Chromosomenanalyse ist nach wie vor die zentrale Methode der Tumorzytogenetik, denn der Karyotyp stellt den wichtigsten prognostischen Parameter, sowohl in bezug auf das Ansprechen der Therapie, als auch auf das Überleben dar. Sie wird zunehmend durch moderne Methoden, wie die Fluoreszenz-in-situ-hybridisierung oder Comparative-genom-hybridisierung ergänzt. Ziel der Arbeit war herauszufinden, inwieweit die zytogenetischen Veränderungen bei den von mir untersuchten Patienten mit einer AML M0 mit denen in der Literatur übereinstimmen.

In den Jahren 1995-2000 wurden an die AG Tumorgenetik in Marburg 150 Proben aus ganz Deutschland mit einer bis dato nicht näher klassifizierten AML eingesandt. Nach der zytogenetischen Untersuchung wurden die betreffenden Kliniken um die Zusendung der kompletten Arztbriefe gebeten. Nach Auswertung des vollständigen Krankenblattes konnten 17 Patienten dem AML M0 Subtyp zugeordnet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Patienten anhand ihres zytogenetischen Risikoprofils (gut-intermediär-ungünstig) in drei Gruppen eingeteilt.

Am häufigsten betroffen bei den von mir untersuchten Patienten war das Chromosom 7. In der Literatur stellt die Monosomie 7 und die Deletion 7q die häufigste Veränderung bei der AML M0 dar und wird anhand des Karyotyps der Gruppe mit ungünstiger Prognose zugeordnet. Auch die Region q23-26 auf Chromosom 11 war bei meinen Patienten regelmäßig betroffen. In der Literatur sind diese Veränderungen oft mit Aberrationen von Chromosom 7 kombiniert, was auch in der vorliegenden Arbeit der Fall war.

Komplex aberrante Karyotypen mit schlechter Prognose und fehlendem Ansprechen auf die Chemotherapie zeigten sich bei vier Patienten. Eine genaue Zuordnung zu einem FAB-Subtyp konnte in der Literatur nicht gefunden werden. Bei den von mir untersuchten Patienten fand sich in drei Fällen ein normaler weiblicher oder männlicher Karyotyp, die der Gruppe mit intermediärem Risikoprofil zugeordnet wurden. Auch das ist bei einer AML M0 in 40-50% der Fälle zu finden. Neueste Forschungsergebnisse weisen aber auf molekulargenetischer Ebene zunehmend Veränderungen in Form von Fusionsgenen nach, die mit der klassischen Zytogenetik, selbst mittels CGH - und FISH Technik, nicht nachweisbar sind. Hier gibt es bereits erste Versuche auf molekulargenetischer Ebene in die Therapie einzugreifen. Es stellt sich abschließend heraus, daß auch bei dieser kleinen untersuchten Gruppe es typische Aberrationsmuster der einzelnen Chromosomen gibt und das bestimmte chromosomale Regionen regelmäßig betroffen wurden, was mit der Literatur übereinstimmt.

Für zukünftige Behandlungskonzepte der AML bleibt die Erforschung der Leukämogenese und die Entwicklung neuer Behandlungsoptionen anhand der Zytogenetik die wichtigste Aufgabe.

8 Literaturverzeichnis

1. Adinolfi M, Crolla J (1994) Nonisotopic in situ hybridization. *Advances in Human Genetics* 22: 187-235.
2. Andreeva SV, Drozdova VD, Emel'ianenko LA (2007) Chromosome 11 rearrangements in the different haematological neoplasias. *Tsitol Genet.* 41(2): 42-8.
3. Appelbaum FR, Rowe JM, Radich J, Dick JE (2001) Acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2001: 62-86.
4. Arthur DC, Berger R, Golomb HM, Swansbury GJ, Reeves BR, Alimena G, Van Den Berghe H, Bloomfield CD, de la Chapelle A, Dewald GW (1989) The clinical significance of karyotype in acute myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 40(2): 203-16.
5. Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S (2008) Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters - an analysis of 3082 patients. *Blood* 111(5): 2527-37.
6. Béné MC, Bernier M, Casasnovas RS, Castoldi G, Doekharan D, van der Holt B, Knapp W, Lemez P, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, Schoch C, Sperling C, van't Veer MB (2001) Acute myeloid leukemia M0: haematological, immunphenotypic and cytogenetic characteristics and their prognostic significance: an analysis in 241 patients. *Br J Haematol.* 113(3): 737-45.
7. Bennett JM, Catkovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C (1991) Proposal for the recognition of minimally differentiated leukemia (AML-M0). *Br J Haematol.* 78(3): 325-9.
8. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT (1985) Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Ann Intern Med.* 103: 626-9.
9. Berger R, Bernheim A, Daniel MT, Valensi F, Flandrin G (1981) Induced leukemias. Cytogenetical and cytological aspects. Comparison with primitive leukemias. *Nouv Rev Fr Hematol.* 23(5): 275-84.

10. Bernardino J, Apiou F, Gebault-Seureau M, Malfoy B, Dutrillaux B (1998) Characterization of recurrent homogeneously staining regions in 72 breast carcinomas. *Genes Chrom Cancer* 23: 100-8.
11. Bloomfield CD und de la Chapelle A (1987) Chromosome abnormalities in acute nonlymphocytic leukemia: clinical and biological significance. *Semin Oncol.* 14(4): 372-83.
12. Boveri T (1914) Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Jena: Gustav Fischer
13. Bruckert P, Kappler R, Scherthan H, Link H, Hagmann F-G, Zankl H (2000) Double minute chromosomes and c-myc amplification in acute myelogenous leukemia: Are they prognostic factors? *Cancer Genet Cytogenet.* 120: 73-9.
14. Büchner T, Hiddemann W (2001) Current status and perspectives of therapy for acute myeloid leukemia. *Semin Haematol.* 38 (3 Suppl 6): 3-9.
15. Budillon A (1995) Molecular genetics of cancer. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer* 76(10): 1869-73.
16. Buonamici S, Chakraborty S, Senyuk V, Nucifora E (2003) The role of EVI1 in normal and leukemic cells. *Blood Cells Mol Dis.* 31(2): 206-12.
17. Campos L, Guyotat D, Archimbaud E (1992) Clinical significance of multidrug resistance p-glycoprotein expression on acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis. *Blood* 79: 473-6.
18. Carter NP (1994) Cytogenetic analysis by chromosome painting. *Cytometry* 18(1): 2-10.
19. Carter NP, Ferguson-Smith MA, Perryman MT, Telenius H, Pelmeur AH, Leversha MA, Glancy MT, Wood SL, Cook K, Dyson HM (1992) Reverse chromosome painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes in clinical cytogenetics. *J Med Genet.* 29(5): 299-307.

20. Chudoba I, Plesch A, Lörch T, Lemke L, Claussen U, Senger G (1999) High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet.* 84: 156-60.
21. Cohen PL, Hoyer JD, Kurtin PJ, Dewald GW, Hanson CA (1998) Acute myeloid leukemia with minimal differentiation. A multiple parameter study. *Am J Clin Pathol.* 109(1): 32-8.
22. Cortes J, O'Brien S, Kantarjian H, Cork A, Stass S, Reireich EJ, Keating M, Pierce S, Estey E (1994) Abnormalities in the long arm of chromosome 11 (11q) in patients with de novo and secondary acute myelogenous leukemias and myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 8(12): 2174-8.
23. Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC, Manuelidis L (1988) Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. *Hum Genet.* 80: 235-46.
24. Creutzig U, Schrappe M (1996) Acute leukemia in childhood. Classification-diagnosis-therapy-prognosis. *Internist (Berl)* 37(10): 982-93.
25. Crossen PE, Morrison MJ, Rodley P, Cochrane J, Morris CM (1999) Identification of amplified genes in patients with acute myeloid leukemia and double minute chromosomes. *Cancer Genet Cytogenet.* 113(2): 126-33.
26. Cuneo A, Ferrant A, Micheaux JL (1995) Cytogenetic profile of minimally differentiated (FAB M0) acute myeloid leukemia: correlation with clinicobiologic findings. *Blood* 85: 3688-95.
27. Dreyling MH, Bohlander SK, Le Beau MM, Olopade OI (1995) Refined mapping of genomic rearrangements involving the short arm of chromosome 9 in acute lymphoblastic leukemias and other haematologic malignancies. *Blood* 86(5): 1931-38.

28. Dugas M, Schoch C, Schnittger S, Haferlach T, Danhauser-Riedl S, Hiddemann W, Messerer D, Uberla K (2001) A comprehensive leukemia database: integration of cytogenetics, molecular genetics and microarray data with clinical information, cytomorphology and immunphenotyping. *Leukemia* 15(12): 1805-10.
29. Eder M, Ottmann OG, Hansen-Hagge TE, Bartram CR, Falk S, Gillis S, Hoelzer D, Ganser A (1992) In vitro culture of common acute lymphoblastic leukemia blasts: Effects of interleukin-3, interleukin-7, and accessory cells. *Blood* 79: 3274-84.
30. Fairman J, Wang RY, Liang H, Zhao L, Saltman D, Liang JC, Nagarajan L (1996) Translocations and deletions of 5q13.1 in myelodysplasia and acute myelogenous leukemia: evidence for a novel critical locus. *Blood* 88(6): 2259-66.
31. Falini B, Martielli MP, Mecucci C, Liso A, Bolli N, Bigerna B, Pucciarini A, Pileri S, Meloni G, Martelli MF, Haferlach T, Schnittger S (2008) Cytoplasmic mutated nucleophosmin is stable in primary leukemia cells and in a xenotransplantant model of NPMc+ acute myeloid leukemia in scid mice. *Haematologica* 93(5): 775-9.
32. Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R (1993) The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75: 1027-38.
33. Fonatsch C, Gudat H, Lengfelder E, Wandt H, Silling-Engelhardt G, Ludwig WD, Thiel E, Freund M, Bodenstern H, Schwieder G (1994) Correlation of cytogenetic findings with clinical features in 18 patients with inv(3)(q21q26) or t(3;3)(q21;q26). *Leukemia* 8(8): 1318-26.
34. Fonatsch C, Haase D, Freund M, Bartels H, Tesch H (1991) Partial trisomy 1q. A nonrandom primary chromosomal abnormality in myelodysplastic syndromes? *Cancer Genet Cytogenet.* 56(2): 243-53.
35. Fonatsch C, Schaadt M, Kirchner HH, Diehl V (1980) A possible correlation between the degree of karyotype aberrations and the rate of sister chromatid exchanges in lymphoma lines. *Int J Cancer* 26: 749-56.

36. Fuchs O (2006) EVI1 and its role in myelodysplastic syndrome, myeloid leukemia and other malignant diseases. *Cas Lek Cesk.* 145(8): 619-24.
37. Gaidzik V, Döhner K (2008) Prognostic implications of gene mutations in acute myeloid leukemias with normal cytogenetics. *Semin Oncol.* 35(4): 346-55.
38. Grimwade D (2001) The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia. *Best Pract Clin Haematol.* 14(3) 497-529.
39. Haferlach C, Dicker F, Herrholz H, Schnittger S, Kern W, Haferlach T (2008) Mutations of the TP-53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 22(8): 1539-41.
40. Haferlach T, Kern W, Schoch C, Schnittger S, Sauerland MC, Heineke A, Büchner T, Hiddemann W, German AML Cooperative Group (2004) A new prognostic score for patients with acute myeloid leukemia based on cytogenetics and early blast clearance in trials of the German AML cooperative group. *Haematologica* 89(4): 408-18.
41. Haferlach T, Schoch C (2002) WHO classification of acute myeloid leukemia (AML) and the myelodysplastic syndrome (MDS). *Dtsch Med Wochenschr.* 2002b; 127: 447-50.
42. Hallek M, Wanders L, Strohmeyer S, Emmerich B (1992) Thymidine kinase: A tumor marker with prognostic value for non-Hodgkin's lymphoma and a broad range of potential clinical applications. *Ann Haematol.* 65(1): 1-5.
43. Hann SR, Thompson CB, Eisenmann RN (1985) C-MYC oncogene protein synthesis is independent of the cell in human and avian cells. *Nature* 314: 366-9.
44. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD (1999) World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting Airlie-House, Virginia. *J Clin Oncol.* 17: 3835-49.

45. Herry A, Douet-Gilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Morice P, Abgrall JF, Berthou C, De Braekeleer M (2007) Evaluation of chromosome 5 aberrations in complex karyotypes of patients with myeloid disorders reveals their contribution to dicentric and tricentric chromosomes, resulting in the loss of critical 5q regions. *Cancer Genet Cytogenet.* 175(2): 125-31.
46. Herry A, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, De Braekeleer M (2007) Redefining monosomy 5 by molecular cytogenetics in 23 patients with AML/MDS. *Eur J Haematol.* 78(6): 457-67.
47. Holinski-Feder E (1998) HNPPC-Syndrom. *Medgen.* 10: 271-3.
48. ISCN 1995. ISCN (1995): An international system for human cytogenetic nomenclature. Mitelman F (ed). Basel: S. Karger.
49. Isola JJ, Kallioniemi OP, Chu LW, Fuqua SAW, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Waldman FM (1995) Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in node-negative breast cancer. *Am J Hum Pathol.* 147: 905-11.
50. Johannsson B, Mertens F, Mitelman F (1994) Secondary chromosomal abnormalities in acute leukemia. *Leukemia* 8(6): 953-62.
51. Joos S, Scherthan H, Speicher MR, Schelgel J, Cremer T, Lichter P (1993) Detection of amplified DNA sequences by reversed chromosome painting using genomic tumor DNA as probe. *Hum Genet.* 90(6): 584-9.
52. Joslin JM, Fernald AA, Tennant TR, Davis EM, Kogan SC, Anastasi J, Crispino JD, Le Beau MM (2007) Haploinsufficiency of EGR1, a candidate gene in the del(5q), leads the development of myeloid disorders. *Blood* 110(2): 719-26.
53. Jotterand Bellomo M, Parleir V, Mühlematter D, Grob JP, Beris P (1992) Three new cases of chromosome 3 rearrangements in bands q21 and q26 with abnormal thrombopoiesis bring further evidence to the existence of a 3q21q26 syndrome. *Cancer Genet Cytogenet.* 59(2) 138-60.
54. Jung P, Menssen A, Mayr D, Hermeking H (2008) AP4 encodes a c-MYC-inducible repressor of p21. *Proc Natl Acad Sci. USA* 105(39): 15046-51.

55. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D (1994) Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chrom Cancer* 10: 231-43.
56. Kamath A, Tara H, Xiang B, Bajaj R, He W, Li P (2008) Double-minute MYC amplification and deletion of MTAP, CDKN2a, CDKN2b, and ELAVL2 in an acute myeloid leukemia characterized by oligonucleotide-array comparative genomic hybridization. (2008) *Cancer Genet Cytogenet.* 183(2): 117-20.
57. Kern W, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S (2008) Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Cancer* 112(1): 4-16.
58. Kern W, Schoch C, Haferlach T, Schnittger S (2005) Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol.* 56(2): 283-309.
59. Kim MH, Stewart J, Devlin C, Kim YT, Boyd E, Connor M (2001) The application of comparative genomic hybridization as an additional tool in the chromosome analysis of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Cancer Genet Cytogenet.* 126(1): 26-33.
60. Klaus M, Haferlach T, Schnittger S, Kern W, Hiddemann W, Schoch C (2004) Cytogenetic profile in de novo acute myeloid leukemia with FAB subtypes M0, M1, and M2: a study based on 652 cases analysed with morphology, cytogenetics, and fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 155(1): 47-56.
61. Knuutila S, Aalto Y, Autio K, Björkqvist AM, El-Rifai W, Hemmer S, Huhta T, Kettunen E, Kiuru-Kuhlefelt S, Larramendy ML, Lushnikova T, Monni O, Pere H, Tapper J, Tarkkanen M, Varis A, Wasenius VM, Wolf M, Zhu Y (1999) DNA copy number losses in human neoplasms. *Am J Pathol.* 155(3): 683-94.
62. Knuutila S, Vuopio P, Elonen E, Siimes M, Kovanen R, Borgstrom GH, de la Chapelle A (1981) Culture of bone marrow reveals more cells with chromosomal abnormalities than the direct method in patients with hematologic disorders. *Blood* 58: 369-75.

63. Le Beau MM (1993) Detecting genetic changes in human tumor cells: Have scientists "gone fishing"? *Blood* 81: 1970-83.
64. Le Beau MM, Albain KS, Larson RA, Vardiman JW, Davis EM, Blough RR, Golomb HM, Rowley JD (1986) Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes and acute nonlymphocytic leukemia further evidence for characterization abnormalities of chromosomes no. 5 and 7. *J Clin Oncol.* 4(3): 325-45.
65. Lessard M, Hélias C, Struski S, Perrusson N, Uetwiller F, Mozziconacci MJ Lafage-Pochitaloff M, Dastugue N, Terré C, Brizard F, Cornillet-Lefebvre F, Michaux L, Verellen-Dumoulin C, Perrot C, Van den Akker J, Lespinasse J, Eclache V, Berger R, Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique (2007) Fluorescence in situ hybridization analysis of 110 hematopoietic disorders with chromosome 5 abnormalities: do de novo and therapy-related myelodysplastic syndrome - acute myeloid leukemia actually differ? *Cancer Genet Cytogenet.* 176(1): 1-21.
66. Li YS, Le Beau MM, Mick R, Rowley LD (1991) The proportion of abnormal karyotypes in acute leukemia samples related to method of preparation. *Cancer Genet Cytogenet.* 52(1): 93-100.
67. Lichter P, Cremer T (1992) Chromosomal analysis by non-isotopic in situ hybridization in: Rooney, DE, Czepulkowski, Bitt, (cdy). *Human Cytogenetics Vol 1*, IRL Press Oxford.
68. Liu TX, Becker MW, Jelinek J, Wu WS, Deng M, Mikhalkevich N, Hsu K, Bloomfield CD, Stone RM, DeAngelo DJ, Galinsky IA, Issa JP, Clarke MF, Look AT (2007) Chromosome 5q deletion and epigenetic suppression of the gene encoding alpha-catenin (CTNNA1) in myeloid cell transformation. *Nat Med.* 13 (1): 78-83.
69. Lu Y, Jin J, Chen ZM, Lou JY, Xu WL (2004) Analysis of 32 cases of acute leukemia with abnormality of chromosome 7. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 21(6): 596-9.
70. Manabe A, Coustan-Smith E, Behm FG, Raimondi SC, Campana D (1992) Bone marrow derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 79: 2370-7.

71. Marshall CJ (1991) Tumor suppressor genes. *Cell*. 64(2): 313-26.
72. Martinelli G, Ottaviani E, Buonamici S, Isidori A, Borsaru G, Visani G, Piccaluga PP, Malagola M, Testoni N, Randomi M, Nucifora G, Tura S, Baccarani M (2003) Association of 3q21q26 syndrome with different RPN1/EVI1 fusion transcripts. *Haematologica* 88(11): 1221-8.
73. Mattison RJ, Ostler KR, Locke FL, Godley LA (2007) Implications of FLT3 mutations in the therapy of acute myeloid leukemia. *Rev Recent Clin Trials*. 2(2): 135-41.
74. McGinnes K, Quesniaux V, Hitzler J, Paige C (1991) Human B lymphopoiesis is supported by bone marrow derived stromal cells. *Exp. Haematol.* 19: 294-8.
75. Mitelman F, Johannson B, Mertens F (1998). Catalog of chromosome aberrations in cancer '98 CD-ROM. New York: Wiley-Liss.
76. Mitelman F, Johannson B, Mertens F (2001) Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer. <http://egap.nci.nih.gov/chromosomes/mitelman>.
77. Mrózek K, Heinonen K, de la Chapelle A, Bloomfield CD (1997) Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Semin Oncol.* 24(1): 17-31.
78. Nahi H, Lehmann S, Bengtzen S, Jansson M, Möllgard L, Paul C, Merup M (2008) Chromosomal aberrations in 17p predict in vitro drug resistance and short overall survival in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 49(3): 508-16.
79. Nilson I, Löchner K, Siegler G, Greil J, Beck JD, Fey GH, Marschalek R (1996) Exon/intron structure of the human ALL-1 (MLL) gene involved in translocations to chromosomal region 11q23 and acute leukemias. *Br J Haematol.* 93(4): 966-72.
80. Nowell PC, Hungerford DA (1960) A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132: 1497

81. Nucifora G, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ (1995) The molecular biology of myeloproliferative disorders as revealed by chromosomal abnormalities. *Semin Hematol.* 32(3): 201-19.
82. Paulsson K, Heidenblad M, Strömbeck B, Staaf J, Jönsson G, Borg A, Fioretos T, Johansson B (2006) High-resolution genome-wide array-based comparative genome hybridization reveals cryptic chromosome changes in AML and MDS cases with trisomy 8 as the sole cytogenetic aberration. *Leukemia* 20(5): 840-6.
83. Pedersen B, Norgaard JM, Pedersen BB, Clausen N, Rasmussen IH, Thorling K (2000) Many unbalanced translocations show duplication of a translocation participant. Clinical and cytogenetic implications in myeloid hematologic malignancies. *Am J Hematol.* 64(3): 161-9.
84. Pedersen-Bjergaard J, Philip P (1991) Two different classes of therapy-related and de novo acute myeloid leukemia? *Cancer Genet Cytogenet.* 55(1): 119-24.
85. Raimondi SC (1993) Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 81: 2237-51.
86. Raimondi SC, Pui C-H, Hancock ML, Behm FG, Filatov L, Rivera GK (1996) Heterogeneity of hyperdiploid (51-67) childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 10(2): 213-24.
87. Raynaud SD, Brunet B, Chischportisch M, Bayle J, Gratecos M, Pesce A, Dujardin P, Flandrin G, Ayraud N (1994) Recurrent cytogenetic abnormalities observed in complete remission of acute myeloid leukemia do not necessarily mark preleukemic cells. *Leukemia* 8(2): 245-9.
88. Ried T, Schröck E, Ning Y, Wienberg J (1998) Chromosome painting: a useful art. *Hum Mol Genet.* 7(10): 1619-26.
89. Ruppertsberger P, Arnold M, Zankl H, Scherthan H (1991) Characterization of marker chromosomes in normal cells by chromosomal in situ suppression (CISS) hybridization and R-banding. *Genes Chromosomes Cancer* 3(5): 394-9.

90. Scherthan H, Zankl H, Kioschis P (1989) Application of reflection contrast- and fluorescence microscopy to non-radioactive in-situ hybridization. *Scientific and Technical Information* 9: 171-4.
91. Schoch C, Haase D, Fonatsch C, Haferlach T, Löffler H, Schlegelberger B, Hossfeld DK, Becher R, Sauerland MC, Heinecke A, Wörmann B, Büchner T, Hiddemann W (1997) The significance of trisomy 8 in de novo acute myeloid leukemia: the accompanying chromosome aberrations determine the prognosis. German AML Cooperative Study Group. *Br J Haematol.* 99(3): 605-11.
92. Schoch C, Kohlmann A, Dugas M, Kern W, Hiddemann W, Schnittger S, Haferlach T (2005) Genomic gains and losses influence expression levels of genes located within the affected regions: a study on acute myeloid leukemias with trisomy 8, 11, or 13, monosomy 7, or deletion 5q. *Leukemia* 19(7): 1224-8.
93. Schoch C, Kohlmann A, Dugas M, Kern W, Schnittger S, Haferlach T (2006) Impact of trisomy 8 on expression of genes located on chromosome 8 in different AML subgroups. *Genes Chromosomes Cancer* 45(12): 1164-8.
94. Secker-Walker LM, Prentice HG, Durrant J, Richards S, Hall E, Harrison G (1997) Cytogenetics adds independent prognostic information in adults with acute lymphoblastic leukemia on MRC trial UKALL XA. *Br J Haematol.* 96(3): 601-10.
95. Stasi R, Venditti A, Del Poeta G, Buccisano F, Maurillo L, Del Principe M, Riccitelli A, Bruno A, Cox-Froncillo MC, Amadori S (1999) AML-M0: A review of laboratory features and proposal of new diagnostic criteria. *Blood Cells Mol Dis.* 25(2): 120-9.
96. Stewart EL, Secker-Walker LM (1986) Detection of the chromosomally abnormal clone in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 23: 25-35.
97. Strachan T, Read AP (1996) *Molekulare Humangenetik.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

98. Thompson PW, Whittaker JA, Brennan H (1993) Trisomy 4 with double minute chromosomes in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 69: 41-4.
99. Varmus H, Weinberg RA (1994) *Gene und Krebs.* Spektrum Verlag, Heidelberg.
100. Von Hanseemann D (1890): Über asymmetrische Zellteilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung. *Virchows Arch A Pathol. Anat.* 119: 299-326.
101. Weiss MM, Hermsen MA, Meijer GA, van Grieken MC, Baak JP, Kuipers EJ, van Diest PJ (1999) Comparative genomic hybridisation. *Mol Pathol.* 52(5): 243-51.
102. Wieser R, Schreiner U, Wollenberg B, Neubauer A, Fonatsch C, Rieder H (2001) Masked inv(3)(q21q26) in a patient with minimally differentiated acute leukemia. *Haematologica* 86(2): 214-5.
103. Wilhelm-Sander-Stiftung (2007) Krebsforscher sind neuer Leukämitherapie auf der Spur. idw-Pressemitteilung der Wilhelm-Sander-Stiftung vom 29.01.2007.
104. Williams DL, Harris A, Williams KJ, Brosius MJ, Lemonds W (1984) A direct bone marrow chromosome technique for acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 13: 239-57.
105. Wilmanns W (1967) Die Thymidinkinase in normalen und leukämischen myeloischen Zellen. *Klin Wschr.* 45(10): 505-11.
106. World Health Organization (2001) *Classification of tumors. Pathology & Genetics Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues.* IARC Press, Lyon 2001.
107. Zang KD, Singer H (1967) Chromosomal constitution of meningiomas. *Nature (Lond.)* 216: 84-5.

9 Anhang

9.1 Lebenslauf (Entfernt)

9.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren Frau/Herr

| | |
|-------------------------------|-----------------------|
| PD Dr. Alfke | Prof. Dr. Krieg |
| Prof. Dr. Arnold | Prof. Dr. Kretschmer |
| Prof. Dr. Aumüller | Prof. Dr. Kroll |
| Prof. Dr. Dr. Austermann | Prof. Dr. Kuhn |
| Prof. Dr. Barth | Prof. Dr. Lennartz |
| PD Dr. Bartsch | PD Dr. Lippert |
| Prof. Dr. Dr. Basler | Prof. Dr. Lorenz |
| PD. Dr. Bauhofer | Prof. Dr. Maisch |
| Prof. Dr. Baum | Prof. Dr. Moll |
| Prof. Dr. Behr | Prof. Dr. Moosdorf |
| Prof. Dr. Berger | Prof. Dr. Dr. Müller |
| Prof. Dr. Cetin | Prof. Dr. Neubauer |
| Prof. Dr. Christiansen | PD Dr. Nies |
| Prof. Dr. Czubayko | Prof. Dr. Niessing |
| Prof. Dr. Dr. Daut | Prof. Dr. Oertel |
| Prof. Dr. Doss | Prof. Dr. Remschmidt |
| Prof. Dr. Engenhardt-Cabillic | Prof. Dr. Rothmund |
| Prof. Dr. Geldner | Prof. Dr. Schäfer |
| PD Dr. Giese | Prof. Dr. Schüffel |
| PD Dr. Gotthardt | PD Dr. Schnabel |
| Prof. Dr. Gotzen | Prof. Dr. Schulz |
| Prof. Dr. Grimm | Prof. Dr. Schmidt |
| Prof. Dr. Griss | Prof. Dr. Seitz |
| Prof. Dr. Gudermann | Prof. Dr. Seyberth |
| Prof. Dr. Happle | Prof. Dr. Sitter |
| Prof. Dr. Hasilik | Prof. Dr. Steiniger |
| PD Dr. Hellinger | PD Dr. Stiletto |
| PD Dr. Herzum | Prof. Dr. Sundermeyer |
| PD Dr. Hesse | Prof. Dr. Vogelmeier |
| PD Dr. Höffken | Prof. Dr. Voigt |
| Prof. Dr. Hofmann | Prof. Dr. Wagner |
| PD Dr. Hoyer | PD Dr. Wagner |
| Prof. Dr. Joseph | Prof. Dr. Weihe |
| Prof. Dr. Kern | Prof. Dr. Werner |
| Prof. Dr. Klenk | Prof. Dr. Wulf |
| Prof. Dr. Klose | PD Dr. Zielke |

9.2 Danksagung

Mein uneingeschränkter Dank gilt allen, die mit ihrem Wissen, ihren Erfahrungen und persönlichen Hilfen zu dieser Arbeit beigetragen haben. Eine Doktorarbeit erfolgreich zu gestalten, erfordert trotz aller Begeisterung für die Experimente ein ausgeprägtes Durchhaltevermögen. Um so mehr war es wichtig, sich auf bestimmte Menschen immer voll verlassen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Harald Rieder für die Überlassung des Themas und für die hervorragende fachliche und menschliche Betreuung, allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im Institut für Klinische Genetik für die freundliche Aufnahme und die geduldige Einarbeitung in das Thema, sowie meinen Eltern, die mich auf meinen bisherigen Wegen immer unterstützt und begleitet haben. Herzlichen Dank auch an meinen lieben Ehemann, der durch seine unermüdliche Unterstützung, Motivation, Hilfs- und Diskussionsbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

9.3 Ehrenwörtliche Erklärung (Entfernt)