

Diplomarbeit

**Klinische Relevanz von Interphase FISH  
Untersuchungen bei hämatologischen  
Erkrankungen**

eingereicht von

**Maria Hude**

Matr. Nr.: 0211741

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde  
(Dr<sup>in</sup>. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Institut für Humangenetik**

unter der Anleitung von

**Univ.- Prof. Dr. med. univ. Michael Speicher**

**Dr. med. univ. Werner Emberger**

Graz, Juni 2011

## *Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, Juni 2011*

## **Vorwort**

In der folgenden Arbeit wurde als Geschlecht die maskuline Form gewählt. Dies soll nicht als Herabwürdigung des weiblichen Geschlechts verstanden werden, sondern dient ausschließlich der flüssigeren Lesbarkeit der Arbeit.

## **Danksagung**

Bedanken möchte ich mich bei all jenen Menschen, die mich während meines Studiums unterstützt und mir beim Verfassen dieser Arbeit zur Seite gestanden sind. Ganz herzlich danken möchte ich meinem Betreuer Dr. med. univ. Werner Emberger für die vielen Reviews und anregenden Gespräche und Herrn Professor Dr. med. univ. Michael Speicher für die Möglichkeit am Institut für Humangenetik wissenschaftlich tätig zu sein. Spezieller Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie für ihre Geduld und Unterstützung in all den Jahren meines Studiums.

# Zusammenfassung

## Allgemeines:

Entsprechend internationalen diagnostischen Empfehlungen in der Hämatologie werden bei Verdacht auf eine hämatologische Systemerkrankung, neben anderen diagnostischen Untersuchungen, molekular-zytogenetische und zytogenetische Analysen durchgeführt. Die molekular-zytogenetischen Untersuchungen haben dabei den Zweck, die bei verschiedenen Erkrankungen häufigen und prognostisch relevanten Aberrationen, unabhängig von der Notwendigkeit einer Zellkultivierung, zu erfassen. Anhand der Analyse von Falldaten der letzten Jahre soll aufgezeigt werden, ob diese Zielsetzung im klinischen Alltag erreicht wird.

## Methoden:

Zu Beginn der Arbeit wurde der Zeitraum von 1. Januar 2004 bis 1. April 2009 für die Durchführung der Datenanalyse gewählt. Innerhalb dieses Zeitraums wurden die Daten abhängig von der durch die Klinik festgelegten Zuweisungsdiagnosen eingeteilt, und mittels Microsoft™ Access analysiert. Anschließend wurden die gewonnenen Ergebnisse in Microsoft™ Excel übertragen und in Form einer Tabelle dargestellt.

## Ergebnisse:

Insgesamt wurden, unterteilt in neun, den jeweiligen hämatologischen Krankheiten entsprechenden Untergruppen, 4038 Fälle ermittelt. Unter diesen Fällen befanden sich 516, bei denen keine FISH Untersuchung durchgeführt wurde. Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf die Anzahl der Fälle, die Art der durchgeführten FISH Probe, das Ergebnis und die sich aus den positiven Fällen ergebende Prozentzahl.

## Schlussfolgerung:

Der Einsatz der FISH bei der Diagnostik von hämatologischen Erkrankungen zur Auffindung spezifischer genetischer Aberrationen hat sich in der klinischen Diagnostik als effektive Methode bewiesen. Die Zielsetzung einer raschen und spezifischen Diagnostik wird erreicht.

Das Ergebnis der zytogenetischen Untersuchung war umso genauer, je sicherer die Zuweisungsdiagnose feststand. Bei den Fällen mit einer laut Zuweisung sicheren klinischen Diagnose konnten höhere positive Prozentzahlen ermittelt werden als in den Fällen mit unsicherer Diagnose.

## **Abstract**

### General:

When there is any indication for a hematological systemic disorder, molecularcytogenetic and cytogenetic analysis are performed in addition to other diagnostic procedures, as dictated by international diagnostic recommendations in hematology. The molecularcytogenetic examinations serve the purpose to detect prognostically relevant aberrations often associated with these illnesses, without the need for cell cultures. By analysing data collected over the last years the aim was to find out whether this goal is reached in clinical routine.

### Methods:

January 1<sup>st</sup> 2004 to April 1<sup>st</sup> 2009 was the time frame chosen for data analysis. This data was divided into groups, using the referring diagnosis made by the clinic, and analysed using Microsoft™ Access. The results were processed in Microsoft™ Excel and displayed in tables.

### Results:

Ultimately, 4038 cases, divided into nine subgroups, were investigated. Among these cases were 516 where no FISH examination had been performed. The number of cases, the manner of FISH examination applied and whether they were positive were part of this analysis.

### Conclusion:

The usage of FISH in the diagnosis of haematological diseases to detect specific genetic aberrations has proofed to be of great value in the clinical diagnostics. The purpose to get an accurate and specific diagnosis was accomplished.

The accuracy of the outcome of the cytogenetic examination was directly related to the accuracy of the correctness of the referring diagnosis. Cases that had a confirmed clinical diagnosis, according to the referral, had higher positive percentages than cases with an unsure diagnosis.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Vorwort</b>	<b>III</b>
<b>Danksagung</b>	<b>IV</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>V</b>
<b>Abstract</b>	<b>VI</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>Glossar und Abkürzungen</b>	<b>IX</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>XI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>XII</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Das menschliche Genom	1
1.1.1 Einteilung der Chromosomen	1
1.1.2 Mutationen	3
1.2 Fluoreszenz In Situ Hybridisierung	12
1.2.1 Grundlagen	12
1.2.2 FISH Sonden	13
1.3 Hämatologische Erkrankungen	15
1.3.1 Grundlagen	15
1.3.2 Einteilung und Beschreibung der Erkrankungen	16
1.3.3 Chronisch myeloproliferative Erkrankungen	16
1.3.4 Myeloproliferatives/Myelodysplastisches Syndrom	20
1.3.5 Myelodysplastisches Syndrom	21
1.3.6 Akute myeloische Leukämie	22
1.3.7 Akute lymphatische Leukämie	24
1.3.8 Non Hodgkin Lymphome	25
1.3.9 Plasmazell Neoplasien	29
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>31</b>

2.1	Verwendete FISH- Proben	31
2.2	Beschreibung der FISH- Sonden und deren Lokalisation im Genom	31
2.2.1	Deletions- Proben	31
2.2.2	Breakapart- Proben	33
2.2.3	Translokations Proben	36
2.2.4	Kommerziell erwerbzbare Probenkombinationen	39
2.2.5	Vervielfältigungs Proben	40
2.3	Ablauf der klinischen Diagnostik am Beispiel der ALL	40
2.4	Datenbearbeitung	42
2.5	Zuordnung der FISH Untersuchungen	46
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>50</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>54</b>
<b>5</b>	<b>PROBLEMATIK IN DER DURCHFÜHRUNG DER DATENANALYSE</b>	<b>61</b>
5.1	Allgemeines	61
5.2	Vorhandener Datensatz	62
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG A</b>	<b>69</b>

## Glossar und Abkürzungen

ABR	<i>Alterned Breakpoint Region</i>
ALL	<i>akute lymphatische Leukämie</i>
AML	<i>akute myeloische Leukämie</i>
cen	<i>Zentromer</i>
CLL	<i>chronisch lymphatische Leukämie</i>
CML	<i>chronisch myeloische Leukämie</i>
CMML	<i>chronische myelomonozytäre Leukämie</i>
CMPE	<i>Chronische Myeloproliferative Erkrankungen</i>
del	<i>Deletion</i>
der	<i>Derivatives Chromosom</i>
DNS	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
dup	<i>Duplikation</i>
ET	<i>essentielle Thrombozythämie</i>
EVI	<i>Ecotropic Virus Integration</i>
FAB	<i>French- American- British Classification System</i>
FISH	<i>Fluoreszez in situ Hybridisierung</i>
fra	<i>Fragile Stelle</i>
i	<i>Isochromosom</i>
IGH	<i>Immunglobulin Heavy Chain</i>
ins	<i>Insertion</i>
inv	<i>Inversion</i>
ISCN	<i>International System for Human Cytogenetic Nomenclature</i>
Mb	<i>Megabase</i>
MDS	<i>Myelodysplastisches Syndrom</i>
MM	<i>multiples Myelom</i>
NF	<i>Nekrosefaktor</i>
NHL	<i>Non-Hodgkin Lymphom</i>
NK	<i>natürliche Killerzellen</i>
OMF	<i>Osteomyelofibrose</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PV	<i>Polyzythämia Vera</i>
r	<i>Ringchromosom</i>

RAR $\alpha$	<i>Retinoic Acid Receptor Alpha</i>
RNS	<i>Ribonukleinsäure</i>
t	<i>Translokation balanciert</i>
TCRA	<i>T- Cell Receptor Alpha</i>
TCRD	<i>T- Cell Receptor Delta</i>
ter	<i>Terminales Ende</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
WBC	<i>White Blood Count</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 <i>Schematische Darstellung eines Karyotyps mit Darstellung der jeweiligen Bänderungsmuster.</i>	2
Abbildung 2 <i>Ablauf der FISH.</i>	13
Abbildung 3 <i>Zellen der Hämatopoese.</i>	15
Abbildung 4 <i>Fallverteilung nach den jeweiligen Erkrankungen.</i>	43
Abbildung 5 <i>Krankheitsverteilung der Erstvorstellungen.</i>	44
Abbildung 6 <i>Aufschlüsselung der Daten der Krankheitsverläufe.</i>	45
Abbildung 7 <i>Ermittelte Daten zur AML.</i>	51
Abbildung 8 <i>Ermittelte Daten zur ALL.</i>	51
Abbildung 9 <i>Ermittelte Daten zur CML.</i>	51
Abbildung 10 <i>Ermittelte Daten zur CLL.</i>	51
Abbildung 11 <i>Ermittelte Daten zum NHL.</i>	52
Abbildung 12 <i>Ermittelte Daten zum MM.</i>	52
Abbildung 13 <i>Ermittelte Daten zum MDS.</i>	52
Abbildung 14 <i>Ermittelte Daten zur CMPE.</i>	52
Abbildung 15 <i>Ermittelte Daten zur CMML.</i>	53
Abbildung 16 <i>AML Sichere versus Verdachtsdiagnosen.</i>	57
Abbildung 17 <i>Prozentzahlen sichere versus unsichere Diagnosen der AML.</i>	58

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 <i>ISCN Nomenklatur bei Chromosomenaberrationen.</i>	10
Tabelle 2 <i>Allgemeine Leukämiezeichen.</i>	40
Tabelle 3 <i>Gesamtfalldaten- Übersicht.</i>	43
Tabelle 4 <i>Falldaten der Erstdiagnosen am Institut für Humangenetik.</i>	44
Tabelle 5 <i>Falldaten der Verlaufsdiagnosen.</i>	45
Tabelle 6 <i>Zuordnung der genetischen Aberrationen zu den spezifischen Erkrankungen.</i>	47
Tabelle 7 <i>Referenzzeiträume.</i>	49
Tabelle 8 <i>Übersicht über die am Institut für Humangenetik zur Verwendung kommenden FISH Proben.</i>	70

# 1 EINLEITUNG

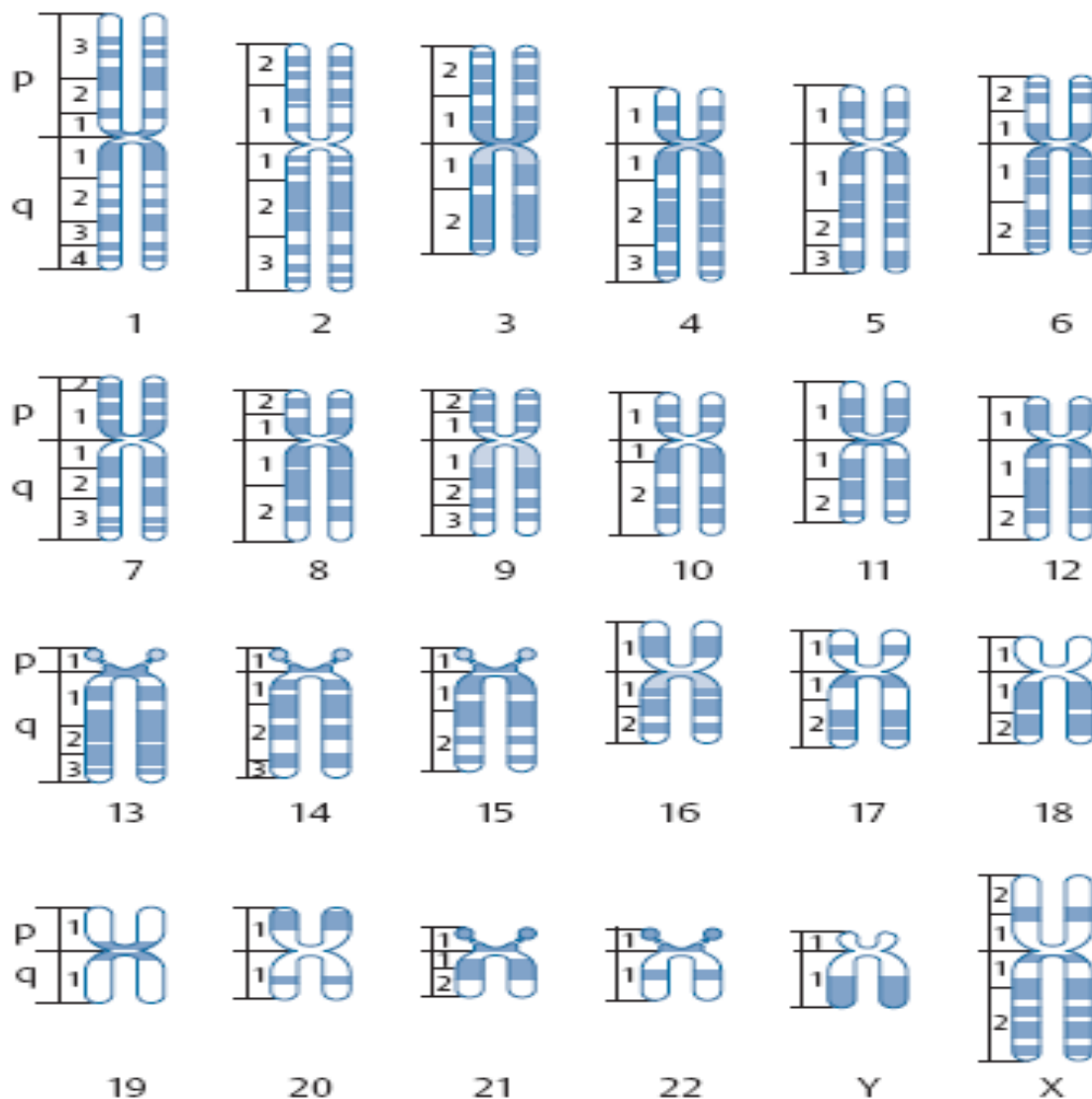
## 1.1 *Das menschliche Genom*

Die Erbinformation ist in Form der Chromosomen im Zellkern jeder einzelnen kernhaltigen Körperzelle gespeichert. Die Chromosomen bestehen aus Desoxyribonukleinsäure (DNS), Histonen (basische Proteine) und nicht basischen Proteinen. Jede menschliche Zelle enthält 46 Chromosomen, bestehend aus 44 Autosomen und 2 Gonosomen (*Dietel et al., 2005, pp384-385*).

### 1.1.1 **Einteilung der Chromosomen**

Die geordnete Darstellung der Chromosomen in einer Metaphase wird als Karyogramm bezeichnet. Die Chromosomen werden dabei nach bestimmten, genau festgelegten Kriterien geordnet. Diese beinhalten: Form, Größe, Länge, Lage des Zentromers und das Bandenmuster der jeweiligen Chromosomen (siehe hierfür Abbildung 1) (*Buselmaier, 2003, pp204- 206*).

## Menschlicher Karyotyp



**Abbildung 1** Schematische Darstellung eines Karyotyps mit Darstellung der jeweiligen Bänderungsmuster (THIEMEs INNERE MEDIZIN, 1999, pp823).

Jede menschliche kernhaltige Zelle enthält einen diploiden Chromosomensatz ( $2n=46$ ). Bei Frauen lassen sich die Chromosomen zu 23 Paaren anordnen, wohingegen der männliche Chromosomensatz sich in 22 Paare und zwei unpaare Chromosomen (X- und Y- Chromosom) gliedert. Die Geschlechtschromosomen werden als Gonosomen bezeichnet, wohingegen alle anderen die Bezeichnung Autosomen tragen (Dietel et al., 2005, pp384-385).

Nach der Lage des Zentromers am Chromosom spricht man von metazentrischen (zum Beispiel Chromosom 1), submetazentrischen (zum Beispiel Chromosom 4) und akrozentrischen (zum Beispiel Chromosom 21) Chromosomen. Der kurze Arm

am Chromosom wird als p- Arm, der lange als q- Arm, bezeichnet (*Dietel et al., 2005, pp403*).

Die Chromosomen können nach den oben angeführten Kriterien in sieben Gruppen eingeteilt werden:

- Gruppe A: 3 Chromosomenpaare (1, 2, 3)
- Gruppe B: 2 Chromosomenpaare (4, 5)
- Gruppe C: 7 Chromosomenpaare (6- 12)
- Gruppe D: 3 Chromosomenpaare (13- 15)
- Gruppe E: 3 Chromosomenpaare (16- 18)
- Gruppe F: 2 Chromosomenpaare (19, 20)
- Gruppe G: 2 Chromosomenpaare (21, 22)

Die auf den Chromosomen lichtmikroskopisch erkennbare Bänderung ermöglicht eine Feineinteilung. Die p- und q- Arme können abhängig von ihrer Bänderung in Regionen unterteilt werden. Eine grobe Zuteilung kann durch die am Chromosom erkennbaren R- und G- Banden getroffen werden.

Das Charakteristikum der R- Banden besteht in der während der Replikation frühen Verdoppelung und der hohen Gendichte dieser Regionen.

Im Gegensatz dazu sind die G- Banden gen ärmer und werden während der Replikation erst spät verdoppelt (*Buselmaier, 2003, pp207- 208*).

Abhängig vom Kondensationsgrad der Chromosomen ist die Bänderung besser oder schlechter zu bewerten. Die beste Beurteilung der einzelnen Banden ist in der Metaphase der Mitose möglich (*Murken et al., 2006, pp142- 144*).

### **1.1.2 Mutationen**

Nach *Buselmaier, 2003, pp262*, lassen sich Mutationen in Abhängigkeit ihrer zugrundeliegenden Veränderungen unterteilen:

- Genmutationen
- Chromosomenaberrationen

- Genommutationen

### **1.1.2.1 Genmutationen**

Hierbei handelt es sich um submikroskopisch kleine Mutationen auf molekularer Ebene, wobei nur eines aber auch mehrere benachbarte Nukleotide betroffen sein können. Zu den Genmutationen werden Punktmutationen, Deletionen und Insertionen im Kilo- und Megabasenbereich, sowie Inversionen und dynamische Mutationen gezählt (*Buselmaier, 2003, pp263- 270*).

### **1.1.2.2 Chromosomenaberrationen**

Bei Chromosomenaberrationen handelt es sich um Veränderungen, welche die molekulare Struktur des betroffenen Chromosoms beeinflussen können (*Murken et al., 2006, pp175- 176*).

#### Ursachen für Chromosomenaberrationen:

Bei den möglichen Ursachen für Chromosomenaberrationen wird zwischen der Einwirkung exogener Noxen und der von chemischen oder biologischen Substanzen, oder beiden gemeinsam, auf die genetische Struktur unterschieden (*Murken et al., 2006, pp175- 176*).

Bei den exogenen Noxen handelt es sich um ionisierende Strahlung, verschiedene chemische Substanzen und Viren (*Murken et al., 2006, pp175- 176*).

Zu den chemischen Noxen, auch Klastogene genannt, zählen industrielle Chemikalien, bestimmte Medikamente (zum Beispiel Chemotherapeutika), Naturstoffe (zum Beispiel Aflatoxine), sowie verschiedene Antibiotika, und auch Zigarettenrauch. Für diese Substanzen konnte nachgewiesen werden, dass sie der Auslöser für strukturelle Chromosomenaberrationen sein können, beziehungsweise als so genannte Spindelgifte, die genetische Struktur beeinflussen können (*Murken et al., 2006, pp175- 176*).

Die biologischen Noxen umfassen vor allem verschiedene Viren, Schimmelpilze und Mykoplasmen. Als typische Veränderung bei dieser Art der Noxeneinwirkung kommen vor allem Einzelbruchaberrationen im Chromatinbereich vor (*Murken et al., 2006, pp175- 176*).

### Strukturelle Chromosomen- Aberrationen:

Einer strukturellen Aberration liegt ein Umbau und somit auch die Veränderung eines oder mehrerer Chromosomen, zugrunde. Anders als bei den numerischen Aberrationen handelt es sich hier weder um eine Vermehrung, noch um eine Verminderung von genetischem Material, sondern um eine durch Umbau entstandene Fehlverteilung. Findet die Veränderung innerhalb des gleichen Chromosoms statt, spricht man von einer intrachromosomalen Veränderung. Betrifft die Veränderung zwei verschiedene Chromosomen wird dies als interchromosomale Aberration bezeichnet (*Murken et al., 2006, pp177- 180*).

Bei den konstitutionellen Chromosomenmutationen handelt es sich um Veränderungen, die bereits in den Keimzellen der sich entwickelnden Zygote in Erscheinung treten. Konstitutionelle Aberrationen betreffen also alle Körperzellen des sich entwickelnden Individuums (*Murken et al., 2006, pp177- 180*).

Im Gegensatz zu den konstitutionellen Chromosomenmutationen treten somatische Aberrationen in einzelnen beschränkten Geweben auf. Die Veränderung findet erst nach dem Zygotenstadium statt. Typische Beispiele für diese Art der chromosomalen Veränderungen sind verschiedene Tumorerkrankungen oder auch die klonalen Veränderungen bei Leukämien (*Murken et al., 2006, pp177- 180*).

### Balancierte Veränderungen:

Das genetische Material ist hierbei innerhalb der Zelle vollständig erhalten geblieben. Es ist lediglich zu einem Umbauvorgang zwischen einzelnen Chromosomen gekommen. Zu phänotypischen Veränderungen kommt es nur dann, wenn die entstandenen Bruchpunkte so liegen, dass die Funktion eines oder mehrerer Gene betroffen ist (*Murken et al., 2006, pp187- 191*).

*Als Beispiel einer balancierten Veränderung wird von Murken et al, 2006, pp187- 191 eine Chromosomenaberration in Tumorgewebe angeführt:*

Positionsänderungen in Form einer Translokation sind häufige Vorgänge innerhalb von Tumorgewebe. In Folge der geänderten genetischen Abfolge kann es zu einer

Zellaktivierung auf Grund von veränderten Eigenschaften der entstandenen Proteine kommen was, dann eine erhöhte Teilung der veränderten Zelle zur Folge haben kann.

#### Unbalancierte Veränderungen:

Hierbei führt vor allem ein nicht gegenseitiger Verlust (Deletion) sowie die Duplikation von genetischem Material zu phänotypischen Veränderungen (*Murken et al., 2006, pp184*).

#### Translokationen:

##### *Reziproke Translokation:*

Es handelt sich um den Austausch von genetischem Material zwischen verschiedenen Chromosomen. Jedes betroffene Chromosom weist dabei nur eine Bruchstelle auf. Es kommt zu einem wechselseitigen (reziproken) Austausch von genetischem Material (*Murken et al., 2006, pp186- 188*).

##### *Reziproke Translokation am Beispiel des Philadelphia- Chromosoms:*

Das Philadelphia Chromosom (Ph) ist das Resultat einer reziproken Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22. Das BCR Gen auf Chromosom 22 geht dabei eine Bindung mit dem ABL Gen auf Chromosom 9 ein. Das durch die Mutation veränderte Chromosom 22 wird als Philadelphia Chromosom bezeichnet. Das Fusionsprodukt BCR/ABL kommt auf Chromosom 22 im Zuge der Aberration zustande. Auf Chromosom 9 entsteht das ABL/BCR Fusionsgen.

In Studien, die mit Hilfe von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie durchgeführt wurden, konnte festgestellt werden, dass bei circa 95% der untersuchten Fälle das Vorhandensein des Philadelphia- Chromosoms nachweisbar war. Demnach gilt das Vorliegen von Ph positiven Zellen als beweisender Faktor für das Vorliegen einer CML. Zusätzlich zu der CML konnte auch in circa 20% der Fälle mit akuter lymphatischer Leukämie bei Erwachsenen und bei 2-5 % der Fälle von ALL bei Kindern, das Vorliegen einer Translokation der Chromosomen 22 und 9 erhoben werden (*Melo, 1996*).

Als Folge der Fusion kommt es im Zuge der Zellreplikation zur Entstehung einer fehlerhaften Tyrosinkinase. Die Tyrosinkinase zeigt eine erhöhte Aktivität, was in

weiterer Folge zu einem Zellwachstum und einer unkontrollierten Teilung der betroffenen Zelle führt (Melo, 1996).

*Robertson- Translokation (Synonym: zentrische Fusion):*

Die Robertson Translokation ist dadurch gekennzeichnet, dass sich zwei der akrozentrischen Chromosomen (Gruppe D und E) verbinden. Die beteiligten Chromosomen weisen dabei die Bruchpunkte immer entweder direkt am Zentromer oder in seiner unmittelbaren Umgebung auf.

Bei dieser Art der Translokation gehen die p- Arme der akrozentrischen Chromosomen in der Mehrheit der Fälle verloren. Die genetische Information, die diese Abschnitte enthält, entspricht jener der ribosomalen RNS. Da diese Informationen im Genom in mehrfacher Ausführung vorhanden sind, ist der Träger einer Robertson- Translokation zumeist phänotypisch unauffällig (Murken et al., 2006, pp186- 190).

Inversionen:

Diese Aberration ist gekennzeichnet durch zwei Brüche mit anschließender Drehung des entstandenen Segments innerhalb des betroffenen Chromosoms. Das Segment wird im Anschluss an eine 180° Drehung wieder in das Chromosom integriert. In den meisten Fällen bleibt es hierbei ohne phänotypische Auswirkungen für das Individuum, da es bei der einfachen Inversion in der Mitose weder zu einem Verlust, noch zu einem Zugewinn von genetischem Material kommt. Die Ausnahme bildet der Fall, wenn ein oder beide Bruchstücke innerhalb eines genetisch aktiven Loci am Chromosom liegen (Murken et al., 2006, pp191- 192).

Es wird zwischen perizentrischen (das Zentromer einschließende) und parazentrischen (außerhalb des Zentromers) Inversionen unterschieden (Murken et al., 2006, pp191- 192).

Als Beispiel für vonstatten gegangene Inversionen bei hämatologischen Erkrankungen ist zum einen die Inversion 16 (beteiligtes Gen: CBF $\beta$ ), sowie zum Anderen die Inversion 3 (beteiligtes Gen: EVI1), zu erwähnen.

### Insertionen:

Unter einer Insertion versteht man die Integration eines Chromosomenfragments an anderer Stelle innerhalb des Genoms. Diese Aberration entsteht unter anderem im Zuge von reziproken Translokationen, wenn das Genom irgendeiner Art von Umbau unterworfen ist (*Murken et al., 2006, pp192*).

### Duplikationen:

Bei dieser Aberration kommt es zu einer Verdoppelung von genetischem Material, wodurch das Entstehen von partiellen Trisomien begünstigt wird (*Murken et al., 2006, pp193*).

### Deletionen:

Unter Deletion versteht man einen Verlust von genetischem Material. Die Veränderung kann sowohl terminale, als auch interstitielle Abschnitte der Chromosomen betreffen (*Murken et al., 2006, pp193*).

Zu den klinisch relevanten Deletionen bei hämatologischen Erkrankungen zählen die Deletionen 6q, 7q (beteiligte Genabschnitte: D7S685 und D7S514), sowie 13q14, wo das RB1 Gen liegt.

### Mikrodeletionen:

Hierbei liegt der Verlust im submikroskopischen Bereich. Es kommt zur Deletion von lediglich einem oder mehreren Genen (circa 2- 3 Mb) (*Murken et al., 2006, pp193- 194*).

### Ringchromosomen:

Ein Ringchromosom kann sich nach vorhergehenden Brüchen an den terminalen Enden des gleichen Chromosoms mit anschließendem Ringschluss ausbilden. Die Enden gehen dabei in der Regel verloren. Das entstandene Chromosom kann in der Mitose bedingt stabil an die Tochterzellen weitergegeben werden. Dies führt nicht nur zu einem Verlust der terminalen Enden sondern auch zu einer nach mehrfacher Teilung des Zellkerns entstehenden Monosomie des betroffenen Chromosoms (*Murken et al., 2006, pp194*).

### Isochromosomen:

Kommt es während der Zellteilung zu einer transversalen (statt horizontalen) Teilung der Chromosomen, können daraus Isochromosomen resultieren (*Murken et al., 2006, pp195*).

Als Beispiel für das Vorkommen dieser Veränderung kann das Isochromosom 17q genannt werden.

### Markerchromosomen:

Es handelt sich hierbei um überzählige Chromosomen innerhalb des vorhandenen Chromosomensatzes. Auf Grund der geringen Größe des vorliegenden genetischen Materials ist eine genaue Zuordnung nur mithilfe der FISH Technik möglich.

Auf Grund des Vorhandenseins eines Zentromers können Markerchromosomen während der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben werden (*Murken et al., 2006, pp197*).

### Double Minutes und Homogeneously Stained Regions:

Bei Double Minutes handelt es sich um Chromatinstrukturen (das bedeutet es ist nicht möglich ein Zentromer innerhalb der Struktur nachzuweisen), die üblicherweise paarweise zusätzlich zu den Chromosomen im Zellkern auftreten. Es konnte ein erhöhtes Vorkommen dieser azentrischen Fragmente bei Tumoren im fortgeschrittenen Stadium festgestellt werden. Die Verteilung auf die Tochterzellen geschieht dabei zufällig.

Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den Homogeneously Stained Regions um Amplifikationen bestimmter DNS- Sequenzen. Sie können sowohl interstitiell aber auch terminal auftreten und imponieren als Armverlängerungen (*Murken et al., 2006, pp195*).

### Fragile Stellen:

Eine fragile Stelle bezeichnet eine Stelle am Metaphase Chromosom, die in der Regel auf Grund einer erhöhten Dichte von repetitiven DNS- Sequenzen eine vermehrte Vulnerabilität aufweist (*Murken et al., 2006, pp196*).

### Nomenklatur struktureller Chromosomenaberrationen:

Die allgemein gültige Bezeichnung einer Chromosomenaberration wird nach den Richtlinien der International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) 2009 durchgeführt (Murken et al., 2006, pp186- 187).

Nach Angabe der Chromosomenzahl werden die Geschlechtschromosomen und die vorliegende Mutation beschrieben (siehe Tabelle 1) (Murken et al., 2006, pp186- 187).

Abkürzung	Aberration	Beispiel
<b>p</b>	Kurzer Arm	
<b>q</b>	Langer Arm	
<b>cen</b>	Zentromer	
<b>ter</b>	Am Ende von p od. q	
<b>t</b>	Translokation balanciert	46,XX,t(11;22)(q23;q11.2)
<b>der</b>	Derivatives Chromosom	46,XX,der(11)t(11;22)(q23;q11.2)
<b>inv</b>	Inversion	46,XX,inv(2)(p14p21)
<b>del</b>	Deletion	46,XY,del(5)(p13)
<b>dup</b>	Duplikation	46,XX,dup(1)(q22q25)
<b>r</b>	Ringchromosom	46,XX,i(13)
<b>i</b>	Isochromosom	46,XX,i(13)
<b>ins</b>	Insertion	46,XX,ins(5;2)(p14;q22q32)
<b>fra</b>	Fragile Stelle	46,XX,fra(X)(q27.3)
<b>+/ -</b>	Zusätzliches/fehlendes Chromosom	47,XX,+21
<b>/</b>	Mosaikkonstellation	47,XX,+21[40]/46,XX[10]

**Tabelle 1** ISCN Nomenklatur bei Chromosomenaberrationen (Murken et al., 2006, pp186).

### **1.1.2.3 Genommutation**

Unter Genommutation, die auch als numerische Chromosomenaberration bezeichnet wird, versteht man eine Vervielfältigung aller oder einzelner Chromosomen auf Grund einer chromosomalen Fehlverteilung. Dies zieht eine Veränderung der Gesamtzahl der Chromosomen nach sich. Betrifft die Veränderung alle Chromosomen, bezeichnet man dies als eine Polyploidie, sind

nur einzelne Chromosomen betroffen, spricht man von einer Aneuploidie (zum Beispiel: Trisomie 8, Monosomie 7) (*Buselmaier, 2003, pp284*).

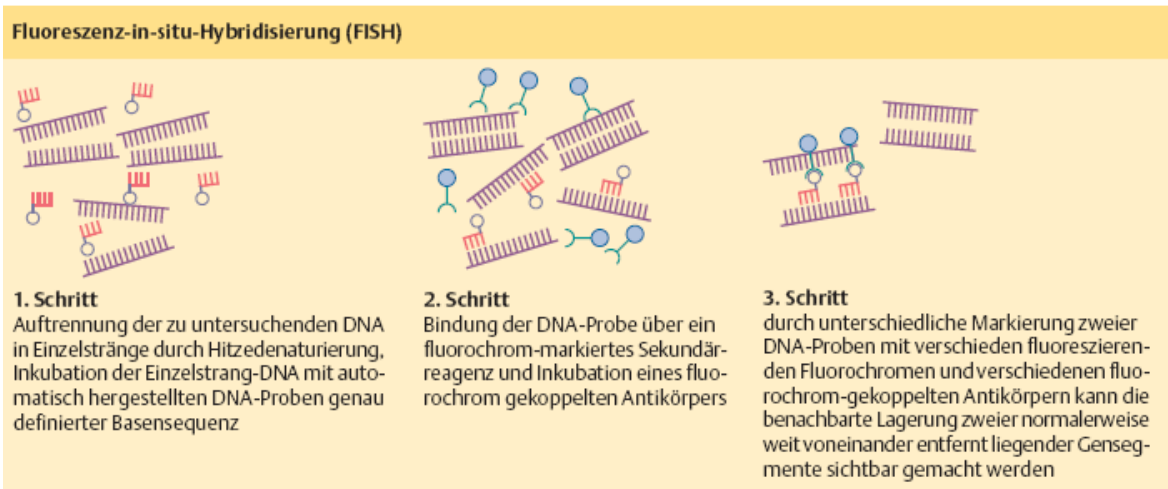
## 1.2 Fluoreszenz In Situ Hybridisierung

### 1.2.1 Grundlagen

Um klassische Methoden der Zytogenetik mit molekularbiologischer Technik zu verbinden sowie eine höhere diagnostische Genauigkeit zu erzielen, hat man die Methode der Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH) in die Gendiagnostik eingeführt. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Analyse der Chromosomen nicht wie vor der Einführung auf die Metaphase der Zellteilung beschränkt ist. Mit der FISH ist es möglich eine spezifische Chromosomenanalyse einzelner Regionen und Genabschnitte in jeder Zellzyklusphase durchzuführen. Dies schließt die Diagnostik nichtteilbarer Zellen mit ein. Außerdem bietet die FISH gegenüber der konventionellen Karyotypisierung den Vorteil einer wesentlich besseren Auflösung. War es bis zur Einführung der FISH möglich genetische Veränderungen in der Größenordnung von bis zu 5 Megabasen (Mb) sichtbar zu machen, können mit der neuen Methode genetische Verluste mit einer Größe von bis zu 0,1 Mb detektiert werden (*Murken et al., 2006, pp149- 152*).

Das erste Mal wurde eine Fluoreszenz in situ Hybridisierung erfolgreich 1980 durchgeführt. Es war erstmals möglich mit Fluorophor markierte RNA mit DNA zu hybridisieren (*Levsky and Singer; 2003*).

Das zugrunde liegende Prinzip der FISH hat sich seither nicht verändert. Die DNS wird denaturiert und dann mit speziellen im Vorfeld markierten einzelsträngigen Sonden wieder zur Hybridisierung gebracht. In Abbildung 2 sind die dafür notwendigen Schritte schematisch dargestellt. Durch die Einwirkung von Hitze wird die DNS in ihre Einzelstränge geteilt (Schritt eins). In Schritt zwei werden die im Vorfeld markierten Sonden mit der zu untersuchenden DNS zur Hybridisierung gebracht. Im Anschluss an die Hybridisierung (Schritt drei) kann die gewonnene Probe mikroskopisch analysiert werden (*THIEMEs INNERE MEDIZIN; 1999, pp 821*).



**Abbildung 2** Ablauf der FISH (THIEMEs INNERE MEDIZIN; 1999, pp821).

Heute ist es zusätzlich möglich die zum Einsatz kommenden Sonden direkt mit einem Fluorchrom zu markieren und dann nach der Hybridisierung und Gegenfärbung mittels eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar zu machen (Dietel et al., 2005, pp403).

### 1.2.2 FISH Sonden

Die meisten für die FISH zur Verfügung stehenden Sonden können mittels PCR schnell und kostengünstig hergestellt werden. Aus diesem Grund ist es inzwischen möglich viele verschiedenen DNS Sonden herzustellen. Die Sonden können dabei das gesamte Gen oder nur einzelne Genabschnitte am Chromosom abdecken (Murken et al., 2006, pp151).

Sie können dabei in folgende Gruppen unterteilt werden:

- Sonden, die das gesamte Chromosom abdecken
- Sonden für einzelne Chromosomenarme (p- oder q- Arm spezifisch)
- Sonden zur Analyse der Zentromerregion (aller Chromosomen oder einzelner speziell zu analysierender)
- Telomer- oder Subtelomerregionssonden
- Sonden für die genauere Analyse von einzelnen Chromosombanden oder Regionen (angewandt bei Mikrodeletionssyndromen...)
- Bruchpunktspezifische Sonden zum Nachweis struktureller Chromosomenaberrationen

Durch die Fülle der bereits zur Verfügung stehenden DNS Sonden ist es einfacher geworden Chromosomenaberrationen eindeutig zu diagnostizieren (*Murken et al., 2006, pp151*)

## 1.3 Hämatologische Erkrankungen

### 1.3.1 Grundlagen

Bei den Knochenmarkszellen, die bei der Hämatopoese eine Rolle spielen, wird zwischen Stammzellen, Progenitoren und reifen Zellen unterschieden. (Siehe Abbildung 3)

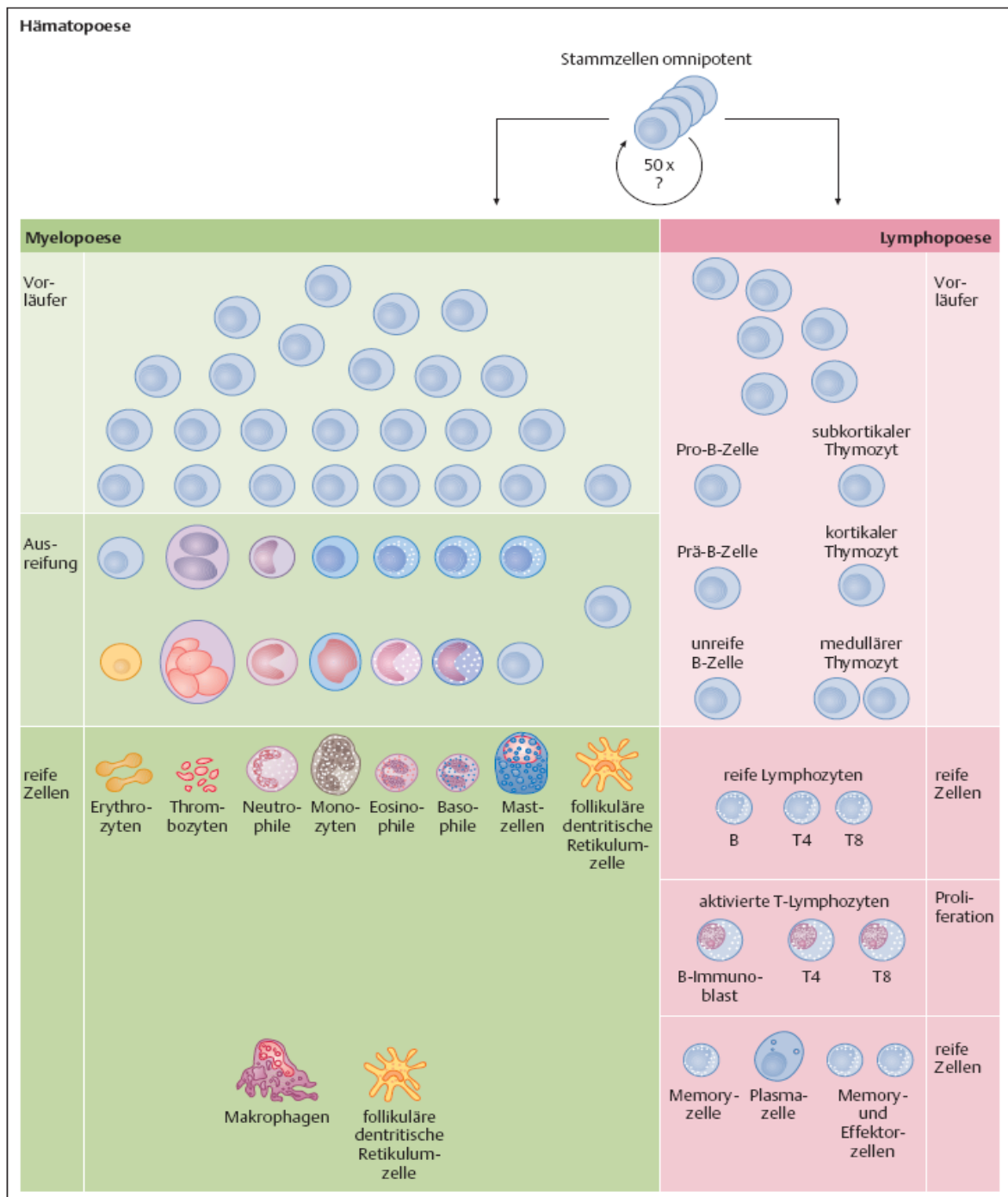


Abbildung 3 Zellen der Hämatopoese (THIEME'S INNERE MEDIZIN; 1999, pp 814).

### **1.3.2 Einteilung und Beschreibung der Erkrankungen**

Die nachfolgende Einteilung der hämatologischen Erkrankungen wurde anhand der bestehenden World Health Organisation (WHO) Klassifikation getroffen. Die Einteilung wurde basierend auf den histopathologischen und genetischen Merkmalen der Neoplasien durchgeführt und dient einer weltweiten Vereinheitlichung der Nomenklatur der Erkrankungen.

### **1.3.3 Chronische myeloproliferative Erkrankungen**

Bei den chronisch myeloproliferativen Erkrankungen (CMPE) handelt es sich um eine Gruppe von Erkrankungen, denen eine klonale neoplastische Veränderung der hämatopoetischen Stammzelle vorausgeht. Sie ist gekennzeichnet durch die Vermehrung einer oder mehrerer myeloischen Zelllinien (*Jaffe et al., 2001, pp17*).

Grundsätzlich haben alle CMPE's das Potential eine klonale Entwicklung zu vollziehen, was dann in weiterer Folge zu einer Panzytopenie aufgrund einer fortschreitenden Fibrose des Knochenmarks, einer unzureichenden Hämatopoese oder einer Blastenkrise führen kann. Die oft sehr ähnlichen klinischen Parameter (Leukozytose, Thrombozytose, Megakaryozytose, Myelofibrose und Organomegalie) gestalten die Diagnostik und suffiziente Trennung der einzelnen Erkrankungen dieser Gruppe untereinander oft schwierig (*Jaffe et al., 2001, pp17*).

Neben vielen anderen tumorspezifischen Veränderungen ist es im Fall der chronisch myeloischen Leukämie möglich, durch molekulargenetische- und molekularzytogenetische Untersuchungen mit hoher Wahrscheinlichkeit festzustellen, dass es sich auf Grund der vorliegenden genetischen Veränderungen um eine chronisch myeloische Leukämie handelt (*Jaffe et al., 2001, pp17*).

Bei den übrigen Erkrankungen des Formenkreises der CMPE's wird zwar von verschiedenen genetischen Veränderungen berichtet, es kann jedoch keine sichere Zuordnung zu einer spezifischen Erkrankung auf Grund der molekulargenetischen Untersuchungen getroffen werden (*Jaffe et al., 2001, pp17*).

Zu der Gruppe der chronisch myeloproliferativen Erkrankungen werden gezählt:

- Osteomyelofibrose
- Essenzielle Thrombozythämie
- Polyzythämia Vera
- Chronisch myeloische Leukämie (*Jaffe et al., 2001, pp16*).

### **1.3.3.1 Osteomyelofibrose**

Bei der Osteomyelofibrose (OMF) handelt es sich um eine neoplastische Veränderung der Stammzelle mit anschließender Fibrosierung und Sklerosierung des Knochenmarks. Es kann in weiterer Folge zu einem extramedullären Wachstum und einer Reifung des neoplastischen Stammzellklons kommen (*Jaffe et al., 2001, pp35*).

Initial zeigt sich die Erkrankung durch eine atypische Hyperplasie der Megakaryozyten (Megakaryozytose) und einem Anstieg der Leukozyten (Leukozytose) im Blut. Die Megakaryozyten produzieren Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF- $\beta$ ), welche die Proliferation der Fibrozyten im Knochenmark anregen. Dies führt dann zu einer Fibrosierung und späteren Sklerosierung des Knochenmarks. Es kommt zu einer extramedullären Blutbildung in Milz und Leber mit einer entsprechenden Organvergrößerung (*Jaffe et al., 2001, pp35*).

#### **1.3.3.1.1 Genetik der Osteomyelofibrose**

Bei 60% der molekularzytogenetisch untersuchten Patienten mit OMF konnte eine genetische Auffälligkeit gefunden werden. Dabei am häufigsten vertreten waren die Deletion 13, Deletion 20 und eine partielle Trisomie 1. Auch die Trisomien 8 und 9 waren entweder einzeln oder gemeinsam in den Untersuchungsergebnissen vertreten. Zwar sind diese Auffälligkeiten bei 60% der Patienten nachgewiesen worden, was aber nicht bedeutet, dass ein sicherer Zusammenhang zwischen den genetischen Aberrationen und dem Auftreten der OMF bewiesen werden konnte (*Jaffe et al., 2001, pp38*).

Zusätzlich zu den oben genannten Mutationen konnten noch in einigen Fällen Deletionen an den Chromosomen 7 und 5 gefunden werden. In diesen Fällen ist jedoch bei einem hohen Prozentsatz der Fälle eine initiale zytotoxische Therapie durchgeführt worden, was zu einer Selektion der vorhandenen veränderten

Subzelllinien geführt haben kann, die das Auftreten der Erkrankung begünstigt (*Jaffe et al., 2001, pp38*).

### **1.3.3.2 Essentielle Thrombozythämie**

Bei der essentiellen Thrombozythämie (ET) handelt es sich um eine Proliferation der Thrombozyten, was eine essentielle Thrombozythämie im Blut zur Folge hat. Parallel dazu können leichte Elevationen der Leukozytenzahl auftreten. Im Knochenmark bietet sich ein Bild von sehr zahlreichen großen Megakaryozyten. Klinisch wird die Erkrankung vor allem durch Thrombosen oder Blutungen auffällig (*Jaffe et al., 2001, pp39- 40*).

Auf Grund dessen, dass für die essentielle Thrombozythämie bisher weder molekulargenetische noch biologische Marker bekannt sind, handelt es sich derzeit noch um eine reine klinische Ausschlussdiagnose (*Jaffe et al., 2001, pp39- 40*).

#### **1.3.3.2.1 Genetik der essentiellen Thrombozythämie**

Es ist momentan noch nicht möglich eine spezifische zytogenetische oder molekulargenetische Veränderung zuzuordnen. Nur bei ca. 5- 10% der Patienten konnten genetische Auffälligkeiten nachgewiesen werden. Zu diesen Auffälligkeiten zählen eine Deletion am Chromosom 13 sowie eine Trisomie der Chromosomen 8 und 9 (*Jaffe et al., 2001, pp41*).

Zusätzlich konnten noch andere Chromosomenaberrationen [del(5q) (EGR1), t(3;3)(q21;q26) (EVI1, RPN1); inv(3)(q21;q26) (EVI1, RPN1)] bei Patienten mit ET beobachtet werden. Allerdings handelt es sich dabei eher um Veränderungen, die dem myelodysplastischen Syndrom (MDS) und der akuten myeloischen Leukämie (AML) zugeordnet werden können (*Jaffe et al., 2001, pp41*).

#### **1.3.3.3 Polyzythämia Vera**

Die Polyzythämia Vera (PV) entsteht durch eine Mutation in der hämatopoetischen Stammzelle und ist gekennzeichnet durch eine massive Erhöhung der Erythrozytenzahl. Der Anstieg der Erythrozytopoese geschieht unabhängig von einem regulierenden System. Zusätzlich zu der Erythrozytose führt die Erkrankung

zu einer Vermehrung aller Zellen der myeloischen Reihe (*Jaffe et al., 2001, pp32-34*).

Die Erkrankung läuft in zwei Phasen ab. In der ersten Phase kommt es mutationsbedingt zu einer Erythrozytose (eventuell mit Beteiligung der anderen myeloischen Zelllinien). Davon gefolgt fällt in der zweiten Phase (post-polyzythämischen Phase) die Zellproliferation stark ab, was zu einer allgemeinen Zytopenie mit Anämie, Fibrose des Knochenmarks und einer extramedullären Blutbildung führt (*Jaffe et al., 2001, pp32-34*).

#### **1.3.3.3.1 Genetik der Polyzythämia Vera**

Bei der PV ist bisher kein die Erkrankung beweisender genetischer Defekt nachgewiesen. Nur bei ca. 10- 20% der betroffenen Patienten konnte eine zytogenetische Veränderung nachgewiesen werden. Die am häufigsten auftretenden Aberrationen sind die Trisomien 8 und 9, sowie Deletionen an den Chromosomen 20, 13 und 1. Diese Mutationen werden zu 80- 90% bei den Patienten gefunden, bei denen die Erkrankung im Fortschreiten begriffen ist, aber auch bei 100% der Patienten, die ein reaktives myelodysplastisches Syndrom oder eine sekundäre akute myeloische Leukämie entwickeln. Dementsprechend ist das Auftreten der oben beschriebenen Veränderungen als prognostisch relevanter Faktor mit einem klinisch schlechten Outcome in Verbindung zu bringen (*Jaffe et al., 2001, pp34*).

#### **1.3.3.4 Chronisch myeloische Leukämie**

Der Ursprung der chronisch myeloischen Leukämie (CML) liegt in der Veränderung einer pluripotenten Stammzelle innerhalb des Knochenmarks. Die Krankheit ist weithin vergesellschaftet mit dem Philadelphia Chromosom und dem BCR/ABL Fusionsgen. Obwohl die Zelllinie der neutrophilen Granulozyten am stärksten betroffen ist, wird eine Vermehrung aller Zellen der myeloischen und auch der lymphatischen Reihen beobachtet. Die CML kann weitgehend in drei Phasen eingeteilt werden:

- Initiale chronische Phase
- Akzelerations Phase
- Blastenschub

Die CML ist die häufigste Form der chronisch myeloproliferativen Erkrankungen. Sie betrifft 15- 20% aller Leukämiefälle (*Jaffe et al., 2001, pp20- 23*).

#### **1.3.3.4.1 Genetik der chronisch myeloischen Leukämie**

Bei Diagnosestellung ist es möglich bei 90- 95% der CML Patienten das Philadelphia Chromosom molekular- zytogenetisch nachzuweisen. Die beschriebene Translokation fusioniert Teile des BCR Gens am Chromosom 22 mit Abschnitten des ABL Gens am Chromosom 9 (*Jaffe et al., 2001, pp23*).

Zusätzlich zum Philadelphia Chromosom konnten noch andere spezifische Mutationen bei CML Patienten festgestellt werden. Zu den Mutationen zählen: ein zusätzliches Ph, Trisomie 8 oder ein Isochromosom 17. Die Bezeichnung der betroffenen Genen ist dabei wie folgt: TP53, RB1, MYC, P16ink4a, RAS, AML1 und EVI1 (*Jaffe et al., 2001, pp23*).

#### **1.3.4 Myeloproliferatives/Myelodysplastisches Syndrom**

Die chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML) gehört zu der Gruppe der myelodysplastischen/myeloproliferativen Erkrankungen. Bei der Diagnose der Erkrankung kann sowohl eine myelodysplastische Komponente als auch eine Zellproliferation beobachtet werden.

Ein charakteristisches Merkmal ist eine Hyperzellularität des Knochenmarks, aufgrund einer abnormen Proliferation einer oder mehrerer Zelllinien der myeloischen Zellreihe. Die Besonderheiten dieser Erkrankung sind die oft stark dysplastischen und nicht mehr funktionstüchtigen Zellen, die in der Zytologie festgestellt werden können (*Jaffe et al., 2001, pp47- 48*).

##### **1.3.4.1 Chronische myelomonozytäre Leukämie**

Bei dieser Erkrankung ist das Auftreten von einer Monozytose der bestimmende Faktor. Sie wird durch folgende Punkte charakterisiert:

- Persistierende Monozytose  $< 1 \times 10^9/L$  im peripheren Blut
- Abwesenheit eines Ph- Chromosoms oder eines BCR/ABL Fusionsgen
- Weniger als 20% Blastenanteil im Blut oder Knochenmark
- Die Dysplasie muss mindestens eine myeloische Zelllinie betreffen

Die klinische Symptomatik erstreckt sich von Müdigkeit über Blutungen bis hin zu klassischen klinischen Leukämiesymptomen wie Gewichtsverlust und Nachtschweiß (*Jaffe et al., 2001, pp49- 51*).

#### **1.3.4.1.1 Genetik der chronischen myelomonozytären Leukämie**

Bei ca. 20- 40% der Patienten mit CMML konnten genetische Auffälligkeiten festgestellt werden. Diese genetischen Veränderungen können allerdings nicht spezifisch der CMML zugeordnet werden.

Die am häufigsten gefundenen Aberrationen sind eine Trisomie 8, eine Deletion am Chromosom 7 und strukturelle Auffälligkeiten am p- Arm des Chromosoms 12 (*Jaffe et al., 2001, pp51- 52*).

Zusätzlich zu den oben genannten, konnten noch andere chromosomale Veränderungen der CMML zugeteilt werden. Dazu gehören das Isochromosom 17 und eine Translokation der Chromosomen 5 und 12 (*Jaffe et al., 2001, pp51- 52*).

#### **1.3.5 Myelodysplastisches Syndrom**

Das myelodysplastische Syndrom ist die Folge einer klonalen Stammzellveränderung in der myeloischen Zellreihe. Es kann eine oder mehrere Zelllinien betreffen. Es manifestiert sich in einer Zelldysplasie und ineffektiven Hämatopoese. Die Erkrankung kann vom Auftreten erhöhter Zahlen an Blasten gekennzeichnet sein, allerdings darf die Blastenzahl die 20% Marke nicht überschreiten. In diesem Fall handelt es sich per Definition bereits um eine akute myeloische Leukämie. Obwohl die Anzahl der Blasten im Blut und Knochenmark einen Hinweis darauf geben kann, welche Erkrankung vorliegt, spielen noch immer allgemeine Faktoren wie das Erkrankungsalter des Patienten sowie der weitere klinische Verlauf eine entscheidende Rolle (*Jaffe et al., 2001, pp63- 66*).

Ob das MDS eine Transformation zu einer AML vollzieht, hängt von dem vorliegenden Subtyp ab (*Jaffe et al., 2001, pp63- 66*).

Das Auftreten der MDS zeigt einen starken Zusammenhang zu vorhergehender Chemo- und/oder Radiotherapie (*Jaffe et al., 2001, pp63- 66*).

Die laborchemischen Veränderungen bei dem MDS umfassen eine allgemeine Zytopenie, sehr häufig eine Anämie, eher selten eine Neutropenie oder eine Thrombozytopenie (*Jaffe et al., 2001, pp63- 66*).

Innerhalb der Gruppe des myelodysplastischen Syndroms können verschiedene Krankheitsentitäten voneinander unterschieden werden. Die Einteilung wird nach der Art der auftretenden Zellen in Blut und Knochenmark, einer möglichen vorhergehenden Behandlung und dem Vorkommen verschiedener genetischen Aberrationen getroffen. Die beeinflussenden Faktoren sind dabei wie folgt:

- Refraktäre Anämie
- Refraktäre Anämie mit Auftreten von Sideroblasten
- Refraktäre Zytopenie mit Auftreten von Zelldysplasie in mehreren Zelllinien
- Refraktäre Anämie mit Blastenexzess
- Unklassifizierbares MDS
- MDS in Verbindung mit einer isolierten Deletion am Chromosom 5 (*Jaffe et al., 2001, pp63- 66*).

#### **1.3.5.1 Genetik des MDS**

Ein besonderer Stellenwert kommt hier der isolierten Deletion am Chromosom 5 zu. Diese Form der MDS imponiert laborchemisch durch hypolobäre Megakaryozyten, einer refraktären makrozytären Anämie und einer möglichen Thrombozytopenie.

Das Auftreten einer Deletion am Chromosom 17 ist klinisch vergesellschaftet mit dem Auftreten von kleinen, vakuolisierten Neutrophilen, einer TP53 Mutation und einem schweren klinischen Verlauf mit dementsprechend schlechter Prognose. Eine Deletion am Chromosom 17 tritt bevorzugt in therapieassoziierten MDS Fällen auf.

Komplexe zytogenetische Veränderungen werden oft auf den Chromosomen 5 und 7 festgestellt und stehen ebenfalls in Verbindung mit einem schweren klinischen Verlauf und schlechten Prognose (*Jaffe et al., 2001, pp66- 67*).

#### **1.3.6 Akute myeloische Leukämie**

Die akute myeloische Leukämie ist definiert durch eine klonale Vermehrung von myeloiden Blasten im Blut, Knochenmark oder anderen Geweben. Grundsätzlich

kann man die AML, je nach Genetik und Morphologie, in verschiedene Gruppen unterteilen:

- AML mit rekurrierenden, genetischen Auffälligkeiten
- AML mit Dysplasie mehrerer Zelllinien
- Therapieassoziierte AML
- Unklassifizierbare AML

Auch die Schwere des Krankheitsverlaufs, das Therapieansprechen und das Erkrankungsalter hat einen Einfluss auf die Gruppenzugehörigkeit (*Jaffe et al., 2001, pp77- 80*).

Die Ätiologie der AML umfasst ionisierende Strahlung, vorausgehende zytotoxische Chemotherapie, Benzene und Virusinfektionen. Auch Rauchen hat einen Einfluss auf die Entstehung der AML. Trotz des Zusammenhangs dieser Risikofaktoren mit dem Auftreten der AML konnte nur in 1-2% der betroffenen Patienten ein direkter Zusammenhang zwischen Exposition mit einem Gefahrenstoff und dem Auftreten der Erkrankung hergestellt werden (*Jaffe et al., 2001, pp77- 80*).

### **1.3.6.1 AML mit rekurrierenden genetischen Veränderungen**

Diese Gruppe ist durch spezifische genetische Aberrationen (meistens balancierte Translokationen) und einer hohen Rate an kompletten Remissionen definiert. Am häufigsten sind die reziproken Translokationen t(8;21) (AML1; ETO), inv(16) (CBF $\beta$ ), t(16;16) (CBF $\beta$ ), t(15;17) (PML; RAR $\alpha$ ) und mehrerer Mutationen, die den Breakpoint 11q23 des MLL Gens betreffen. Alle diese Auffälligkeiten spiegeln sich in der Morphologie der Erkrankung wieder (*Jaffe et al., 2001, pp81*).

#### **1.3.6.1.1 AML mit Translokation der Chromosomen 8 und 21 (AML1-Gen und ETO- Gen)**

Es werden hier vor allem Veränderungen in der Zelllinien der neutrophilen Granulozyten beschrieben. Die Translokation zählt zu den häufigsten Aberrationen bei der AML und wird in ca. 5- 12% der Fälle diagnostiziert (*Jaffe et al., 2001, pp81-82*).

#### **1.3.6.1.2 AML mit einer Inversion des Chromosoms 16 oder einer Translokation des Chromosoms 16 (CBF $\beta$ - Gen)**

Dieses Erscheinungsbild zeigt vor allem Alterationen in der Monozyten und Granulozyten Zelllinie und eine veränderte eosinophile Komponente (>5% der Zellen präsentieren sich mit vergrößerten Granula im Zellkern) im Knochenmark. Laut FAB- Klassifikation handelt es sich hierbei um das Vorliegen eines M4Eo- Subtyps. Einer Inversion des Chromosoms 16 wird bei ca. 10- 12% aller Fälle mit AML gefunden (*Jaffe et al., 2001, pp82-84*).

#### **1.3.6.1.3 AML mit Translokation an den Chromosomen 15 und 17 (RAR $\alpha$ - Gen und PML- Gen)**

Bei dieser Form dominieren die Promyelozyten (auch akute Promyelozyten Leukämie genannt) im Knochenmark. Sie kann bei 5- 8% der Patienten nachgewiesen werden.

Hier können noch zusätzlich alternative Mutationen, bei denen das RAR $\alpha$ - Gen am Chromosom 17 variabel eine Fusion mit anderen Breakpoints eingehen kann gefunden werden (*Jaffe et al., 2001, pp84- 85*).

#### **1.3.6.1.4 AML mit Veränderungen des MLL Gens am Chromosom 11**

Diese Untergruppe ist mit Auffälligkeiten der Monozyten vergesellschaftet. Sie werden in 5- 6% der Fälle angefounden. Das MLL Gen auf 11q23 ist involviert in eine Reihe von Translokationen mit anderen Chromosomen. Die am Häufigsten vorkommenden Bindungspartner sind dabei die Chromosomen 9 und 19. Allerdings wird davon ausgegangen, dass das MLL Gen in einer wesentlich höheren Anzahl von Mutationen eine wesentliche Rolle spielt (*Jaffe et al., 2001, pp86- 87*).

### **1.3.7 Akute lymphatische Leukämie**

Es handelt sich bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) um eine autonome Proliferation eines Leukozytenstamms, die systematisiert und autonom abläuft. Es kommt zu einem Ausstoß von unreifen Blasten in das periphere Blut. Die ALL ist eine Erkrankung, die überwiegend (zu 80%) im Kindesalter auftritt. Es werden drei Subtypen unterschieden:

- Kindlicher Typ (geprägt von überwiegend kleinen Blasten)

- Erwachsenen Typ (heterogene Zellpopulation)
- Burkitt Typ (vorwiegend Blasten im Blut nachweisbar) (*Herold et al., 2008, pp82- 83*).

### 1.3.7.1 Genetik der ALL

Auch bei der Genetik der ALL kann zwischen den verschiedenen Erkrankungssubtypen unterschieden werden. Beim kindlichen Typ der ALL kommt am häufigsten (bei 30% der Fälle) eine zytogenetische Veränderung in Form einer Translokation der Chromosomen 12 und 21 vor. Hierbei kommt es zu einer Fusion des TEL- und AML1- Gens.

Bei 30% der betroffenen Kindern kann eine Translokation t(1;19) (PBX1, E2A) festgestellt werden. Diese Veränderung lässt in vielen Fällen auf ein schlechtes Therapieansprechen schließen.

Ebenfalls typisch für die kindliche Form der ALL ist das Fusionsgen MLL-AF4, dem die Translokation t(4;11)(q21;q23) zugrunde liegt (*Herold et al., 2008, pp83*).

Bei der ALL vom erwachsenen Typ sind vor allem die Translokationen t(8;14), t(2;8) und t(8;22) mit den entsprechenden Genen C-MYC, IGH und IGL hervorzuheben, da sie ebenfalls mit einer schlechteren Prognose in Zusammenhang zu bringen sind.

Auch die Translokation t(9;22)(q34;q11), die das Fusionsgen BCR/ABL zur Folge hat, kann beobachtet werden (*Herold et al., 2008, pp83*).

### 1.3.8 Non Hodgkin Lymphome

Die Non- Hodgkin Lymphome nehmen ihren Ausgang von B- oder T- Lymphozyten. Eine Ausnahme bildet hierbei das Plasmozytom welches seinen Ausgang vom Knochenmark nimmt sowie die CLL, die einem leukämischen B- Zell Lymphom entspricht. Bei den NHL findet die Einteilung nach Maglinitätsgrad und der Art der Ausgangszellen (B- oder T- Zellreihe) statt und wird nach *Herold et al., 2008, pp65* nachfolgend angeführt:

#### B- Zellreihe:

- Vorläuferzell- Lymphome
- B- CLL
- Mantelzell- Lymphom

- Follikuläres Lymphom
- Marginalzonen- B- Zell- Lymphom vom MALT Typ
- Plasmazellmyelom/Plasmozytom
- Diffuses großzelliges B- Zell- Lymphom
- Mediastinales großzelliges B- Zell- Lymphom
- Burkitt- Lymphom

### **T- Zellreihe:**

- Vorläuferzell- Lymphome
- Mycosis fungoides
- Nicht spezifiziertes, peripheres T- Zell- Lymphom
- Angioimmunoplastisches T- Zell- Lymphom
- Extranodales NK/T- Zell- Lymphom
- Anaplastisches großzelliges Lymphom, primär systemisch

### **1.3.8.1 Chronisch lymphatische Leukämie**

Unter einer chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) versteht man das Auftreten kleiner, monomorpher, runder B- Lymphozyten im peripheren Blut, Knochenmark und Lymphknoten. Die B- Lymphozyten sind oft durchmischt mit Prolymphozyten und Paraimmunoblasten, die CD5 und CD23 exprimieren (*Jaffe et al., 2001, pp127- 128*).

Die Krankheit ist definiert durch eine Beteiligung von peripheren Blut und Knochenmark bei einer Lymphozytenzahl  $>10 \times 10^9/L$ . Typischerweise sind Lymphknoten, Leber und Milz mit betroffen (*Jaffe et al., 2001, pp127- 128*).

#### **1.3.8.1.1 Genetik der CLL**

Bei der CLL kann man ein Rearrangement von leichten und schweren Immunglobulinketten feststellen. Ca. 50% aller untersuchten Patienten zeigen Umbauvorgänge in diesen Genregionen (*Jaffe et al., 2001, pp129*).

Aber auch andere Mutationen sind bei der CLL zu finden. Bei ca. 20% der Patienten kann eine Trisomie 12 festgestellt werden, wobei bei dieser Mutation eher selten zusätzlich ein Rearrangement der oben genannten Ig- Ketten

beobachtet werden kann. Deletionen im Bereich von 13q14 (RB1- Gen) können bei ca. 50% der Patienten gefunden werden (zusätzlich zu den Ig- Ketten Veränderungen).

Bei weiteren 20% konnte eine Deletion 11q22-23 (ATM- Gen) gefunden werden, bei 5% Deletionen in der Region 6q21 und bei 10% Deletionen in der Region 17p13 (das entspricht dem Genort p53) (*Jaffe et al., 2001, pp129*).

Zusätzlich wurde in einigen Fällen auch noch eine Translokation t(11;14) sowie ein BCL1 Gen Rearrangement festgestellt. Allerdings sind diese Veränderungen nicht krankheitsspezifisch und wahrscheinlich auf das Vorhandensein eines Mantelzell Lymphoms bei diesen Patienten zurückzuführen (*Jaffe et al., 2001, pp129*).

### **1.3.8.2 Mantelzell- Lymphom**

Hierbei handelt es sich um eine B- Zell Neoplasie bestehend aus kleinen bis mittelgroßen monomorphen Lymphoidzellen mit unregelmäßigen Zellkernen. Sie umfassen circa 2- 10% der NHL's (*Jaffe et al., 2001, pp168- 171*).

#### **1.3.8.2.1 Genetik des Mantelzell- Lymphoms**

In 70- 75% der Fälle zeigt sich eine Translokation an den Chromosomen 11 und 14, was dem Genort einer Ig Schwerkette und dem CYCLIN D1 Genen entspricht. Untersuchungen zeigten zusätzlich eine Punktmutation im ATM Gen.

In wenigen aggressiven Krankheitsfällen konnten zusätzliche Mutationen in den Regionen TP53, p16 und p18 festgestellt werden (*Jaffe et al., 2001, pp168- 171*).

Andere, öfter auftretende Aberrationen umfassten 13q14 (RB1- Gen) Deletionen, eine partielle oder totale Trisomie 12 und Deletionen am Chromosom 17 (*Jaffe et al., 2001, pp168- 171*).

### **1.3.8.3 Follikuläres Lymphom**

Das follikuläre Lymphom ist eine Neoplasie der follikulären B- Lymphozyten. Diese Art der Lymphome machen weltweit gesehen 22% der NHL's aus. Das Lymphom infiltriert hauptsächlich die Lymphknoten, kann aber ebenso in Knochenmark, Milz, peripheren Blut und im Waldeyer Rachenring gefunden werden (*Jaffe et al., 2001, pp162- 168*).

#### **1.3.8.3.1 Genetik des folliculären Lymphoms**

Immunglobulin leicht und schwer Ketten zeigen typischerweise bei dieser Erkrankung ein Rearrangement.

Zusätzlich können bei der Mehrzahl der Patienten zytogenetische Auffälligkeiten gefunden werden. Die am häufigsten vorkommende ist  $t(14;18)(q32;q21)$ , die einen Umbauvorgang im BCL2 sowie den IGH- Gen beinhaltet. Sie kann in 70-95% der untersuchten Fälle festgestellt werden.

In seltenen Fällen zeigt sich eine  $t(2;18)(p12;q21)$ , die das BCL2 Gen mit einer Leichtkette am Chromosom 2 verbindet. Diese Veränderung scheint schon sehr früh während der Erkrankung aufzutreten und fällt zeitlich wahrscheinlich mit dem Immunglobulin- Ketten Rearrangement zusammen. (Anmerkung: Eine Überexpression des BCL2 Gens bewirkt in vitro einen Überlebensvorteil für die B-Zellen durch Umgehung der Apoptose.)

Bei Patienten mit einer Translokation der Chromosomen 14 und 18 kann nur in 10% keine andere genetische Aberration festgestellt werden. Alle übrigen Patienten zeigen weitere Veränderungen. Die am häufigsten gefundenen Aberrationen beinhalten die Chromosomen 1, 2, 4, 5, 13 und 17 sowie Zusätze an den Chromosomen X, 7, 12 oder 18.

Einer mit einer Transformation des Lymphoms einhergehende Veränderung betrifft die Region um 17p13 (TP53 Gen).

In 10- 40% wurden Veränderungen in der Region 6q23-36 beschrieben. Sie sind damit die am zweithäufigsten vorkommenden Mutationen dieses Lymphoms.

Zusätzlich wurden in 15% der folliculären Lymphome Veränderungen von 3q27 aber auch BCL6 Rearrangements festgestellt. Während 5' Mutationen des BCL6 Gens in 40% gefunden wurden (*Jaffe et al., 2001, pp162- 168*).

#### **1.3.8.4 Diffuses großzelliges B- Zell Lymphom**

Hierbei handelt es sich um eine Proliferation von großen neoplastischen B-lymphoiden Zellen. Die Größe des Zellkerns übertrifft hierbei die von normalen Makrophagen, das heißt er umfasst circa die doppelte Größe des Zellkerns von normalen Lymphozyten. 30-40% der NHL's setzen sich aus diffusen großzelligem B- Zell Lymphomen zusammen (*Jaffe et al., 2001, pp171- 175*).

#### **1.3.8.4.1 Genetik des diffusen großzelligen B- Zell Lymphoms**

Immerhin 20- 30% der Fälle zeigen eine Translokation t(14;18) des BCL2 Gens, die normalerweise auf ein folliculäres Lymphom hinweisen würde. Weitere 30% zeigen Auffälligkeiten im Bereich von 3q27, der das BCL6 Gen beinhaltet (*Jaffe et al., 2001, pp171- 175*).

#### **1.3.9 Plasmazell Neoplasien**

Diese Erkrankung nimmt ihren Ursprung aus der Veränderung eines fertig ausdifferenzierten, Immunglobulin produzierenden B- Lymphozyten. Das charakteristische Zeichen für diese Erkrankung liegt in der Produktion eines homogenen Immunglobulin- Produktes mit der Bezeichnung M- Komponente (*Jaffe et al., 2001, pp142*).

Die Gruppe der Plasmazell Neoplasien kann man unterteilen in Entitäten, die hauptsächlich Plasmazellen enthalten (Plasmozytom und multiples Myelom) und welche, die zusätzlich Lymphozyten beinhalten (Schwerketten Erkrankungen und Waldenström Makroglobulinämie) (*Jaffe et al., 2001, pp142*).

##### **1.3.9.1 Multiples Myelom**

Das multiple Myelom (MM) ist eine vom Knochenmark ausgehende Erkrankung, die multifokal in Erscheinung tritt. Sie manifestiert sich durch eine Protein- und Skelettdestruktion mit Osteolysen, pathologischen Frakturen, Knochenschmerzen, Hyperkalzämie und Anämie. Der Verlauf erstreckt sich von leichten Formen mit besserem klinischem Verlauf, bis hin zu schweren Formen mit Plasmazellinfiltrationen in verschiedenen Organen und Ablagerungen von Immunglobulinketten im Gewebe (*Jaffe et al., 2001, pp142- 144*).

##### **1.3.9.1.1 Genetik des MM**

Molekular- genetische Studien berichten über ein Rearrangement von Immunglobulinketten- Genen. Normalerweise betrifft das Rearrangement nur eine Bande. Allerdings wird berichtet, dass in 5% der Fälle von einer multiplen Umlagerung (mehrere Banden übergreifenden) der Fall ist. In einigen Fällen wird eine Deletion des Ig- Gens gefunden (*Jaffe et al., 2001, pp147- 148*).

Strukturelle und numerische Chromosomenveränderungen wurden in 20- 60% der Fälle eines multiplen Myeloms beschrieben. Diese Zahl resultiert daraus, dass bei Patienten im Initialstadium der Erkrankung die Veränderung zu circa 30- 40% auftritt. Bei Patienten, die sich schon in einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium befinden, kann eine genetische Veränderung in 60- 70% der Fälle nachgewiesen werden. Dieser Umstand weist auf eine Progression der genetischen Aberrationen innerhalb des Krankheitsverlaufes hin (*Jaffe et al., 2001, pp147- 148*).

Beim MM kann eine Vielzahl von genetischen Auffälligkeiten festgestellt werden, die sich über das gesamte Spektrum möglicher Aberrationen erstrecken (Deletionen, Translokationen, Verluste beziehungsweise Gewinne von Genmaterial an einzelnen Chromosomen).

Zugewinne der Chromosomen 3, 5, 7, 8, 11, 15 und 19 sowie Verluste an den Chromosomen 8, 13, 14 und X sind berichtet worden.

Unter den Verlusten ist die partielle Monosomie oder Deletion 13(13q14) (RB1) die am Häufigsten vorkommende. Sie wird in 15- 40% der Fälle diagnostiziert.

Die am häufigsten vorkommende strukturelle Veränderung kann mit 15% am Chromosom 1 festgestellt werden. Gefolgt von Chromosom 14 mit 10% der Fälle.

Die häufigste Translokation betrifft die t(11;14)(q13;q32), die ein Rearrangement des BCL1 und IGH Genorts aufweist.

Eine Deletion von 17p13 in Verbindung mit einem p53 Allel Verlust wurde in 25% der untersuchten Fällen berichtet und weist auf eine schlechte Prognose hin.

Ebenfalls zu einer schlechten Prognose führt der Verlust des q- Arms auf Chromosom 7 auf Grund der zu Grunde liegenden Veränderung im Bereich des „Multidrug resistance genes“ (*Jaffe et al., 2001, pp147- 148*).

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### ***2.1 Verwendete FISH- Proben***

Die genetische Beratungsstelle des Instituts für Humangenetik der medizinischen Universität Graz bezieht zur Untersuchung der verschiedenen genetischen Veränderungen, der in dieser Arbeit beschriebenen hämatologischen Erkrankungen, kommerziell erwerbbar FISH Sonden. Bei den FISH Sonden handelt es sich um Produkte der Firmen Abbot Molecular™ sowie Kreatech Diagnostics™.

Eine tabellarische Auflistung aller verwendeter Sonden, deren Lokalisation im Genom und die Bezeichnung der entsprechenden Gene ist im Anhang A zusammengestellt.

### ***2.2 Beschreibung der FISH- Sonden und deren Lokalisation im Genom***

#### **2.2.1 Deletions- Proben**

##### **Vysis D7S522/CEP 7 FISH Probe Kit**

Die Sonde kommt bei der Untersuchung mehrerer hämatologischer Erkrankungen zum Einsatz. Zu den Erkrankungen zählen AML, ALL, MDS, CMML, CMPE, Anämie und Leukozytose (*Jenkins et al., 1998; Collard et al., 1987*).

Der Aufbau der Sonde ist dahingehend designed, Deletionen der Region 7q31 zu erkennen und mittels FISH kenntlich zu machen. Auf Grund der Annahme, dass in der von der Sonde untersuchten Region am Chromosom 7 ein Tumorsupressor-Gen liegt, ist die Durchführung der Untersuchung von hoher Bedeutung bei der molekulargenetischen Diagnostik von Bluterkrankungen (*Jenkins et al., 1998; Collard et al., 1987*).

##### **Vysis LSI EGR1/D5S23, D5S721 Dual Color Probe**

Hierbei handelt es sich um die Kombination zweier Sonden zur Erzielung einer höheren Spezifität der Untersuchung. Die mit orange markierte EGR1 Probe arbeitet dahingehend, eine Deletion am Chromosom 5 in der Region 5q31 aufzuzeigen, während die FISH Sonde D5S23, D5S721 (mit Grün markiert) das

prinzipielle Vorhandensein der Deletion untersucht. Es gilt dabei festzustellen, ob es sich bei der vorliegenden molekulargenetischen Aberration um eine komplette Deletion der Region 5q31 handelt, oder ob es sich um einen Verlust des q- Arms handelt. Im Falle einer Deletion können zwei grüne, jedoch nur ein oranges Signal beobachtet werden.  
(<http://international.abbottmolecular.com/products/genetics.html>).

### **Vysis D20S108 FISH Probe Kit**

Die Sonde ist darauf spezialisiert, Deletionen am Chromosom 20 zu erkennen. Circa 4% der an myelodysplastischen Syndrom erkrankten Patienten und 1- 2% der Patienten mit akuter myeloischen Leukämie weisen bei molekulargenetischen FISH Untersuchungen eine Deletion am q- Arm des Chromosoms 20 auf. Bei Erkrankungen aus dem lymphatischen Formenkreis ist die Mutation selten nachzuweisen (*Bøezinová et al., 2005*).

Am kurzen Arm des Chromosoms 20 wird das Vorhandensein mehrerer Tumorsuppressorgene vermutet. Die möglichen Deletionen in dieser Region variieren sehr stark in Größe und Ausdehnung. Dieser Umstand macht eine spezifische Untersuchung dieser Region mittels einfacher Bänderungstechnik zu einer großen Herausforderung. Heutzutage wird aus diesem Grund vor allem auf die viel schnellere und diagnostisch aussagekräftigere FISH Untersuchung zurückgegriffen (*Bøezinová et al., 2005*).

Patienten, die in der FISH Untersuchung eine isolierte Deletion 20q aufweisen, haben dabei eine wesentlich bessere klinische Prognose als Patienten mit multiplen genetischen Aberrationen (*Bøezinová et al., 2005*).

### **Vysis LSI 13 (RB1) 13q14 SpectrumOrange Probe**

Die FISH Sonde wird eingesetzt um Deletionen im Bereich von 13q14.3 zu diagnostizieren, was einer Lokalisation proximal des RB1 Gens entspricht. Im Bereich 13q14.3 ist mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Tumorsuppressor- Gen angesiedelt, welches bei der oben genannten Deletion ebenfalls einer Veränderung unterworfen sein könnte.

Bei einem Großteil der untersuchten Patienten betrifft die Deletion ausschließlich den Genabschnitt 13q14, ohne das RB1 Gen in die Deletion mit einzuschließen (<http://international.abbottmolecular.com/products/genetics.html>).

### **Vysis LSI p53 (17p13.1) Spectrum Orange Probe**

Diese Untersuchung wird zur Diagnose einer Deletion am Chromosom 17 eingesetzt. Im Bereich 17p13.1, wo sich das p53 Gen befindet, kann es bei verschiedenen hämatologischen Erkrankungen (siehe Kapitel 1.3) zu einem Verlust von genetischem Material mit Auswirkungen auf die klinische Prognose und den weiteren Verlauf der Erkrankung kommen (<http://international.abbottmolecular.com/products/genetics.html>).

### **Vysis MYB Spectrum Aqua FISH Probe Kit**

Diese FISH Probe dient der Untersuchung einer Deletion in der Region 6q23. Diese Region entspricht dem gesamten MYB Gen am Chromosom 6. Eine durchgeführte Studie, die die Häufigkeit einer Deletion am MYB-Gen bei an CLL erkrankten Patienten als Forschungsgrundlage hatte, konnte bei 5% der untersuchten Fälle eine stattgefundenen Deletion aufdecken (<http://international.abbottmolecular.com/products/genetics.html>).

## **2.2.2 Breakapart- Proben**

### **Vysis LSI MLL Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe**

Das MLL Gen (auch bekannt als: ALL1, HRX oder Htrx1) ist am Chromosom 11 lokalisiert. Bei einer Reihe von hämatologischen Erkrankungen wurde von einer Veränderung in Form eines chromosomalen Breakaparts berichtet. Findet im Zuge einer genetischen Aberration ein Bruch am Chromosom 11 statt, ist meist die Region 11q23 (m-bcr) beteiligt. Auffallend bei dieser Mutation ist die Vielfalt der nach einem neuerlichen Zusammenschluss möglichen Bindungspartner (mehr als 30 mögliche Bindungspartner sind in der Literatur bereits beschrieben) (*Cimino et al., 1998*).

Das MLL Gen hat eine ungefähre Länge von 90 kb und besteht aus 36 Exons. Bei dem Gen handelt es sich sehr wahrscheinlich um einen Transkriptionsfaktor, der

die Entwicklung und Differenzierung der menschlichen Zellen steuert (*Cimino et al., 1998*).

#### **Vysis CBFB Break Apart FISH Probe Kit**

Die dieser Probe zu Grunde liegende Mutation ist eine Inversion am Chromosom 16. Die inv(16) zieht eine Verbindung des CBF $\beta$  Gens am Chromosom 16 in der Region 16q22 mit dem MYH11 Gen in der Region 16p13 nach sich (*Liu et al., 1998*).

Die Veränderung ist vor allem im Bereich der akuten myeloischen Leukämie stark vertreten und weist auf eine gute klinische Prognose für den Patienten hin (*Grimwade et al., 1998*).

#### **Vysis LSI IGH Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe**

Das IGH Gen liegt am Chromosom 14 in der Region 14q23. Die Sonde soll ein chromosomales Rearrangement, also die Folge eines stattgefundenen Bruches in dieser Region aufzeigen. Vor allem Brüche im J- Segment des IGH Gens können mit dieser Methode untersucht werden. Aber auch eventuell vorkommende Veränderungen in dem konstanten Gensegment im IGH Gen können ermittelt werden (*Bergsagel et al., 2005*).

Ein Bruch in den oben genannten Genabschnitten am Gen kann in weiterer Folge zu Translokationen führen, bei denen mehrere spezifische Bindungspartner in der Literatur beschrieben wurden (*Bergsagel et al., 2005*).

Zu den häufigen Bindungspartnern zählen 11q13 (CCN D1 Gen), 6p21 (CCN 3D Gen), 16q23 (MAF Gen), 20q12 (MAFB Gen), 4p16 (FGFR3 Gen) (*Bergsagel et al., 2005*).

#### **Vysis MYC Break Apart FISH Probe Kit**

Das C-MYC Gen ist lokalisiert auf Chromosom 8q24. Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass es in diesem Bereich bei verschiedenen neoplastischen Erkrankungen zu Brüchen in der Struktur des Chromosoms kommen kann. Ebenfalls wurden anschließend stattfindenden Translokationen beschrieben,

wobei mehrere verschiedene Bindungspartner ausgeforscht werden konnten. In der Mehrheit der Fälle kommt es zu den Mutationen t(8;22)(q23;q11) und t(2;8)(p11;q24), in denen sowohl das C-MYC Gen als auch die Immunglobulingene IGH, IGK und IGL beteiligt sind (Veronese et al., 1995).

Die zum Einsatz kommende LSI MYC Dual Color FISH Probe besteht aus jeweils einer Probe, die auf der dem Telomer zugewandten Seite des für seine Bruchpunkte bekannten Abschnitts auf Chromosom 8 ansetzt und einer Probe, die sich der dem Zentromer zugewandten Seite annimmt. Auf diese Weise kann mit der Probe die Mehrheit der in diesem Bereich stattfindenden Veränderungen diagnostiziert werden (<http://international.abbottmolecular.com/products/genetics.html>).

#### **Vysis LSI BCL6 (ABR) Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe**

Die FISH Sonde wird eingesetzt um eventuell stattgefundenen Brüche am Chromosom 3 diagnostizieren zu können.

Die Probe umfasst das gesamte BCL6 Gen. Es handelt sich dabei um zwei Sonden, wobei eine die 3' Region, die andere die 6' Region um den Abschnitt 3q27 analysiert (<http://international.abbottmolecular.com/products/genetics.html>).

#### **Vysis LSI TCR alpha/delta Dual Color Break apart Rearrangement Probe**

Die Sonde kommt zur Anwendung um mögliche Veränderungen im TCR $\alpha$  beziehungsweise TCR $\Delta$  festzustellen. Der Rezeptor befindet sich am Chromosom 14q11. Mit Hilfe der Untersuchung können Bruchstellen und genetische Rearrangements festgestellt werden (<http://international.abbottmolecular.com/products/genetics.html>).

#### **ON EVI t(3;3); inv(3) (3q26) Break**

Strukturelle Brüche am Chromosom 3 werden in Verbindung gebracht mit einer schlechten klinischen Prognose für den betroffenen Patienten. Zusätzlich zu dem schlechten klinischen Erscheinungsbild in Verbindung mit der Veränderung zeigen durchgeführte Chemotherapien nur mäßigen bis ausbleibenden Erfolg (Levi et al., 2003).

Bei dieser genetischen Veränderung wird vor allem von einer inv(3)(q21;q26) (EVI1 und RPN1), aber auch von innerhalb des Chromosoms 3 gelegenen Rearrangement t(3;3)(q21;q26) (EVI1 und RPN1) ausgegangen. In seltenen Fällen kann es zusätzlich zu einer Translokation von Teilen des Chromosoms 3 mit anderen Chromosomen kommen (*Levi et al., 2003*).

Bei allen berichteten Fällen war das EVI1 Gen auf Chromosom 3q26 an der stattgefundenen Veränderung beteiligt (*Levi et al., 2003*).

### **2.2.3 Translokations Proben**

#### **Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe**

Die FISH Probe wird überwiegend in der genetischen Diagnostik der chronisch myeloischen Leukämie eingesetzt. Zusätzlich kommt sie bei besonderen Fragestellungen oder unklarer klinischer Diagnose, bei akuter lymphatischer Leukämie, akuter myeloischen Leukämie, chronisch myelo- monozytären Leukämie und zur Diagnosesicherung bei Erkrankungen aus dem Bereich der chronisch myeloproliferativen Erkrankungen zum Einsatz (*Sinclair et al., 1997*).

Die Sonde erkennt spezifisch die Fusion des BCR Gens auf Chromosom 22 mit dem ABL Gen auf Chromosom 9. Das resultierende Genprodukt ist die Folge einer Translokation zwischen Chromosom 9 und 22 und wird als BCR- ABL beziehungsweise ABL- BCR Fusionsgen bezeichnet (*Sinclair et al., 1997*).

Bei der Mehrzahl der CML Fälle und circa einem Drittel der ALL Fälle findet der Bruch im BCR Gen in der sogenannten „Major Breakpoint Cluster Region“ (M- bcr) statt, die sich über die Exons 12 bis 16 im BCR Gen spannt (*Melo et al., 1996*).

#### **Vysis LSI AML1/ETO Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe**

Bei dieser genetischen Veränderung verbindet sich das AML1 Gen, mit der genauen Lokalisation 21q22, mit dem ETO Gen im Bereich 8q22. Das resultierende Genprodukt AML1/ETO wird dann am Chromosom 8 mittels der oben genannten FISH Probe sichtbar gemacht (*Nucifora and Rowley, 1995*).

Der genaue Ablauf der Translokation geht dabei wie folgt von statten: es handelt sich um einen „Drei- Wege“- Austausch, wobei der lange Arm des Chromosoms

21 eine Verbindung mit dem Chromosom 8 eingeht. Im gleichen Prozess spaltet sich genetisches Material vom Chromosom 8 ab und verbindet sich mit einem dritten Chromosom, wobei ein Teil von diesem wiederum eine Verbindung mit Chromosom 21 eingeht (*Nucifora and Rowley, 1995*).

Die AML1/ETO Translokation ist vergesellschaftet mit einer höheren kompletten Remissionsrate und einer besseren Prognose für die betroffenen Patienten (*Hagemeyer et al., 1998*).

### **Vysis PML/RAR $\alpha$ SF FISH Probe Kit**

Die Sonde wurde entwickelt um die balancierte reziproke Translokation t(15;17) (PML- Gen und RAR $\alpha$ - Gen) mittels FISH feststellen zu können. Sie wird vor allem zur Diagnosesicherung und zur Diagnostik der AML eingesetzt (*He et al., 1998*).

Bei der durch die genetische Aberration bedingten Translokation sind zwei Gene beteiligt. Einerseits das PML Gen, mit der genauen Lokalisation 15q22, und auf der anderen Seite das RAR $\alpha$ - Gen auf 17q12.1 (*He et al., 1998*).

Auf Grund der Translokation resultieren zwei Fusionsproteine: PML/RAR $\alpha$  und RAR $\alpha$ /PML. Die entstehende t- RNA ist wegen der entstandenen Bruchstellen innerhalb des PML Gens und der Möglichkeit des alternativen Spleißens sehr variabel. Es können mehrere onkogene Proteine aus dieser Translokation resultieren (*Pandolfi et al., 1992*).

### **Vysis LSI IGH/BCL2 Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe**

Bei der Translokation spielen zwei Gene eine entscheidende Rolle. Zum einen das IGH Gen auf Chromosom 14 in der Region 14q32 und zum anderen das BCL2 Gen mit der Lokalisation 18q21. Die Schreibweise der vorliegenden Aberration ist wie folgt: t(14;18)(q32;q21). Die Translokation führt zu einer Überexpression des Antiapoptosefaktors BCL2 auf Grund der Umlagerung eines IGH- Transkriptions-Enhancers (*Vaandrager et al., 2000*).

In einem hohen Prozentsatz der Fälle kann die Bruchstelle im IGH Gen im J-Segment auffindig gemacht werden (*Vaandrager et al., 2000*).

### **Vysis LSI IGH/MALT1 t(14;18) (q32;q21) Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe**

Bei der Sonde zur Untersuchung dieser Aberration handelt es sich um eine Translokation zwischen dem IGH Gen (14q32) und dem MALT1 Gen (18q21). Das MALT1 Gen liegt am Chromosom 18 in unmittelbarer Nähe des BCL2 Gens. Das BCL2 Gen liegt nur 5 Mb entfernt in Richtung des Zentromers (*Sanchez-Izquierdo et al., 2000*).

Der genaue Pathomechanismus der Veränderung ist nicht bekannt. Es wird davon ausgegangen, dass das alterierte MALT1 Gen durch eine Vernetzung mit anderen Faktoren in die natürliche Apoptose der Zellen eingreift (*Sanchez-Izquierdo et al., 2000*).

### **Vysis IGH/CCND1 DF FISH Probe Kit**

Es handelt sich um eine Translokation mit Beteiligung des IGH Gens (14q32) und des CCND1 Gens (11q13). Das Fusionsprodukt IGH/CCND1, das durch die Mutation entsteht, hat eine Dysregulation von Cyclin D1 zur Folge (*Chesi et al., 1996*).

### **Vysis IGH/FGFR3 DF FISH Probe Kit**

Bei der Translokation t(4;14) geht das IGH Gen auf Chromosom 14 eine Verbindung mit dem FGFR3 Gen auf Chromosom 4 ein. Patienten, bei denen eine solche Translokation mittels FISH diagnostiziert werden konnte, zeigen eine höhere Expression von FGFR3, was mit einer schlechteren Prognose oder einem schlechteren Ansprechen auf eine Chemotherapie in Verbindung gebracht werden konnte (*Keats et al., 2003*).

### **Vysis LSI API2/MALT1 t(11;18) (q21;q21) Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe**

Es handelt sich um eine Translokation zwischen dem MALT1 Gen mit der genauen Lokalisation 18q21 und dem API2 Gen auf der Region 11q21. Das Resultat ist eine Fusion der beiden Gene (MALT1/API2), das durch seine

Verbindung mit hoher Wahrscheinlichkeit den NF- $\kappa$ B Pathway direkt aktiviert (Sanchez-Izquierdo et al., 2000).

#### **2.2.4 Kommerziell erwerbbar Probenkombinationen**

##### **Vysis LSI p53 / LSI ATM and LSI D13S319 / LSI 13q34 / CEP 12 Multi-color Probe**

Bei dieser Probe handelt es sich um eine Kombination von mehreren Proben, die dann in ihrer Gesamtheit zur Diagnose der chronisch lymphatischen Leukämie eingesetzt werden. Vorhergehende Studien haben gezeigt, dass es sinnvoll ist die Proben bei der zytomolekularen Diagnostik der CLL als Kombination zu verwenden. Die von der Probe analysierten genetischen Aberrationen treten hierbei bevorzugt in Kombination auf (Döhner et al., 2000).

Bei der CLL spielt die vorliegende Kombination der genetischen Veränderungen eine entscheidende Rolle im Krankheitsverlauf. Auch bei der Prognose und der Therapie stellen die genetischen Daten oft eine Grundlage dar (Döhner et al., 2000).

Probensample 1:

Dieses Proben- Set setzt sich aus spezifischen Sonden zur Feststellung folgender Veränderungen zusammen: del(17p13.1) und del(11q22.3). Die Deletion am Chromosom 17 betrifft dabei das p53 Gen, die Deletion 11q das sogenannte ATM Gen (<http://international.abbottmolecular.com/products/genetics.html>).

Probensample 2:

Das zweite Set behandelt die Deletion 13q14 (RB1- Gen), eine Trisomie 12p und eine Deletion am Chromosom 13q34 (<http://international.abbottmolecular.com/products/genetics.html>).

##### **Vysis D5S23, D5S721/CEP 9/CEP 15 FISH Probe Kit**

Bei dieser Untersuchung handelt es sich um mehrere gleichzeitig stattfindende Tests, um verschiedene genetische Veränderungen in Form von einer Vermehrung genetischen Materials feststellen zu können (Hyperdiploidie= mehrfaches Vorhandensein eines oder mehrerer Chromosomen im ansonsten

diploiden Chromosomensatz). Genau genommen wird eine mögliche Vervielfältigung von 5p15.2, 9p11-q11 (CEP9) und 15p11.1-q11.1 (CEP15) untersucht. Bei einem isolierten Auftreten einer der genannten Vervielfältigungen, wird von einem prognostisch günstigen Marker gesprochen (<http://international.abbottmolecular.com/products/genetics.html>).

## 2.2.5 Vervielfältigungs Proben

### CEP 8 Spectrum Orange Direct Labeled Fluorescent DNA Probe Kit

Die Trisomie 8 gehört zu den häufigsten chromosomalen Veränderungen bei der AML. Die Veränderung kann dabei sowohl isoliert als auch in Verbindung mit anderen Aberrationen vorgefunden werden. Dabei wird die Prognose bei einem Auftreten von einer Trisomie 8 in Verbindung mit einem auch ansonsten komplexen vorliegenden Karyotyp wesentlich verschlechtert (*Schaich et al., 2007*).

## 2.3 Ablauf der klinischen Diagnostik am Beispiel der ALL

Allgemeine klinische Symptomatik der ALL Patienten:

Symptom	Befund/Ursache
Müdigkeit, Herzklopfen	Normochrome Anämie
Petechien, kleine Suffusionen, Zahnfleischbluten	Thrombopenie
Knochenschmerzen	Infiltration, Peri-, Endostbefall
Kopfschmerzen	Meningealer Befall, Anämie
Leber-, Milzschmerzen	Kapselspannung
Lymphknotenschwellung	
Infektion, Aphten	Granulozytopenie
Mundsoor	T- Telledefekt

**Tabelle 2** Allgemeine Leukämiezeichen (Senn et al., 2001; pp 376).

Das weitere diagnostische Vorgehen ist wie folgt:

- Differenzialblutbild: Hierbei ist noch keine endgültige Diagnose der ALL möglich. Die Leukozyten im Blut können erhöht, erniedrigt oder auch normal ausfallen. Ein Hinweis auf das Vorliegen einer ALL kann das Vorhandensein von Lymphoblasten im peripheren Blut sein.

- Knochenmarksbiopsie: Die Diagnose ALL kann bei einem Anteil von mehr als 25% Lymphoblasten der hämatopoetischen Zellen im Knochenmark gestellt werden.
- Zytologie: Beurteilung der Zellen im Knochenmark
- Zytochemie: Peroxidase- negativ und Esterasereaktion fallen schwach aus.
- Zytogenetik: Immunphänotypbestimmung und eventuell FISH Untersuchungen sind bei der Diagnosefindung von Bedeutung.
- Serum: Die Harnsäure im Serum und die Laktatdehydrogenase können bei der ALL, auf Grund eines vermehrten Zellumsatzes, erhöht sein.
- Liquoruntersuchung: Ein initialer Befall der Meningen ist bei der ALL oft zu beobachten (*Senn et al., 2001; pp 380*).

## **2.4 Datenbearbeitung**

Die nötigen Informationen zur Durchführung des praktischen Teils dieser Arbeit wurden aus der Datenbank der genetischen Beratungsstelle des Instituts für Humangenetik der medizinischen Universität Graz entnommen. Die Datenbank wird als Microsoft™ Access Datei an der Abteilung für Humangenetik geführt und den durchgeführten Untersuchungen entsprechend aktualisiert. Zu Beginn der Datenbearbeitung wurde ein Zeitrahmen als erste grundlegende Begrenzung definiert. Diesem Zeitraum entsprechend wurden dann die weiteren Schritte unternommen. Der Zeitraum, in dem die Studie durchgeführt wurde erstreckt sich von 1.1.2004 bis 1.4.2009.

Anschließend wurden die Daten mit Hilfe von Microsoft™ Access abhängig von den vorliegenden hämatologischen Erkrankungen unterteilt und in verschiedenen Dateien aufgespalten.

Die Einteilung bezog sich dabei auf folgende Zuweisungsdiagnosen:

- Akute myeloische Leukämie
- Akute lymphatische Leukämie
- Chronisch myeloische Leukämie
- Chronisch lymphatische Leukämie
- Non Hodgkin Lymphom
- Myelodysplastisches Syndrom
- Multiples Myelom
- Chronische myeloproliferative Erkrankungen
- Chronische myelomonozytäre Leukämie

Die Klassifizierung der Erkrankungen ist dabei so gewählt, dass sowohl sichere als auch Verdachtsdiagnosen ohne weitere Unterteilung der jeweiligen Gruppe zugeordnet wurden. Als Grundlage für die Zuordnung wurden die einzelnen Fälle aus dem gesamten vorliegenden Datensatz entnommen. Das bedeutet, dass bei eingegangenen Mehrfachdiagnosen derselbe Fall mehrmals bezüglich seiner FISH Untersuchungen in die Auswertung einfluss.

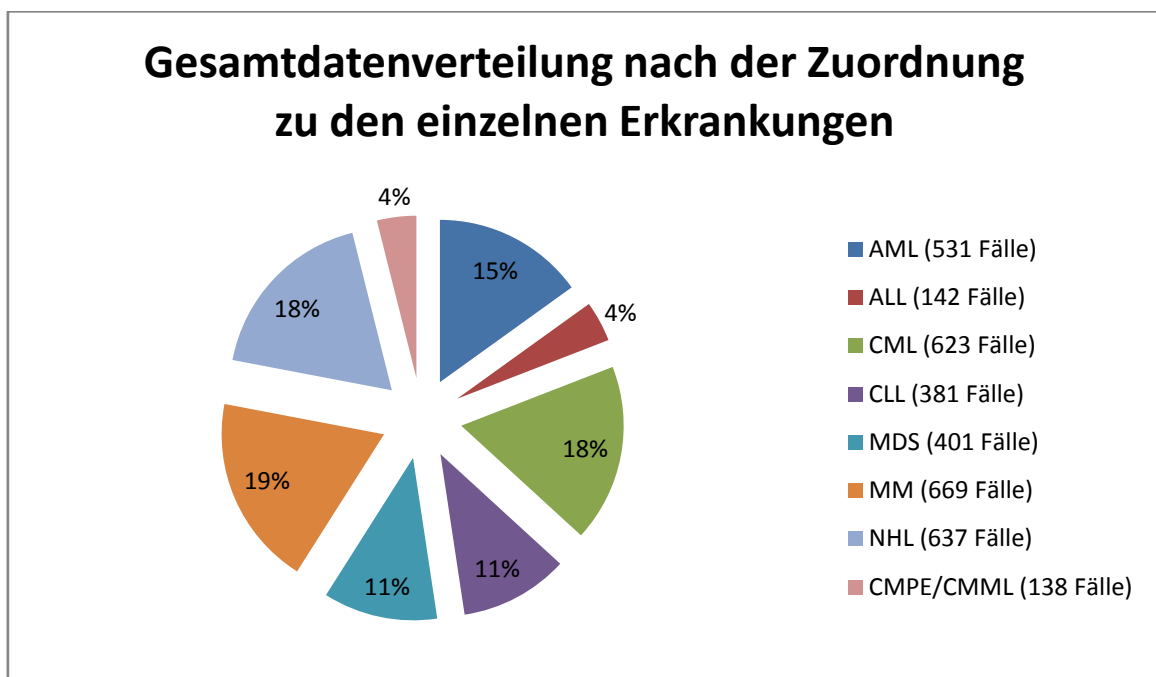
Nach der Durchführung der Zeitraumbeschränkung und der Zuordnung der Fälle zu den jeweiligen Erkrankungen konnten folgende Zahlen ermittelt werden:

Gesamtanzahl der ermittelten Fälle	4038 Fälle
Keine FISH Untersuchung vorhanden	516 Fälle
Gesamt	3522 Fälle

**Tabelle 3** Gesamtfalldaten- Übersicht.

Die Zuteilung zu den verschiedenen Erkrankungen wurde anhand der jeweiligen Zuweisungsdiagnosen getroffen.

Die ermittelte Einteilung zu den verschiedenen hämatologischen Krankheitsbildern setzte sich dabei wie folgt zusammen:



**Abbildung 4** Fallverteilung nach den jeweiligen Erkrankungen.

Im nächsten Schritt wurden die Daten nach ihrem Diagnosedatum in Erstdiagnosen beziehungsweise Erstvorstellungen an der MUG und Verlaufsdaten unterteilt. Bei den Fällen in der Gruppe der Erstdiagnosen handelt es sich nicht notwendigerweise um die tatsächliche Erstdiagnose sondern um die Erstvorstellung am Institut für Humangenetik der MUG.

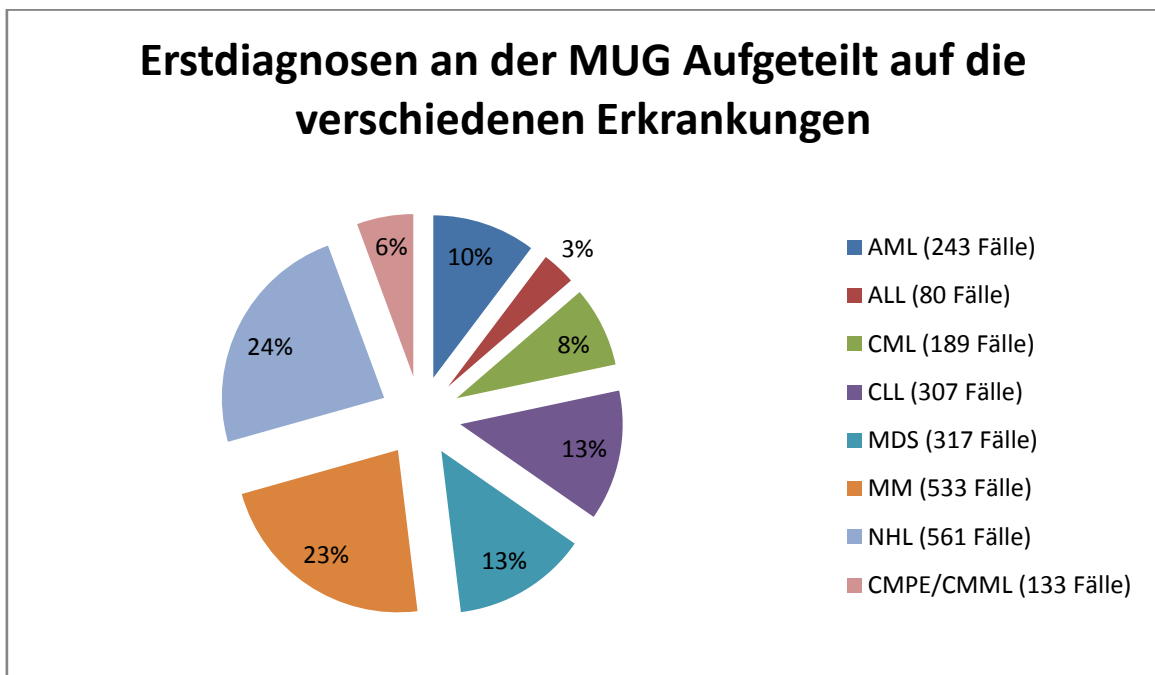
Aus den Daten kann nicht erhoben werden, ob der Patient schon zu einem früheren Zeitpunkt an einer anderen Klinik wegen einer genetischen Untersuchung mit der Fragestellung einer hämatologischen Erkrankung vorstellig wurde.

Die Fallzahlen zur genetischen Erstdiagnose an der MUG setzen sich wie folgt zusammen:

Gesamtanzahl der ermittelten Fälle	2570 Fälle
Keine FISH Untersuchung vorhanden	207 Fälle
Gesamt	2363 Fälle

**Tabelle 4** Falldaten der Erstdiagnosen am Institut für Humangenetik.

Die genaue Einteilung der Erkrankungen nach den definierten klinischen Verdachtsdiagnosen war dabei wie folgt:



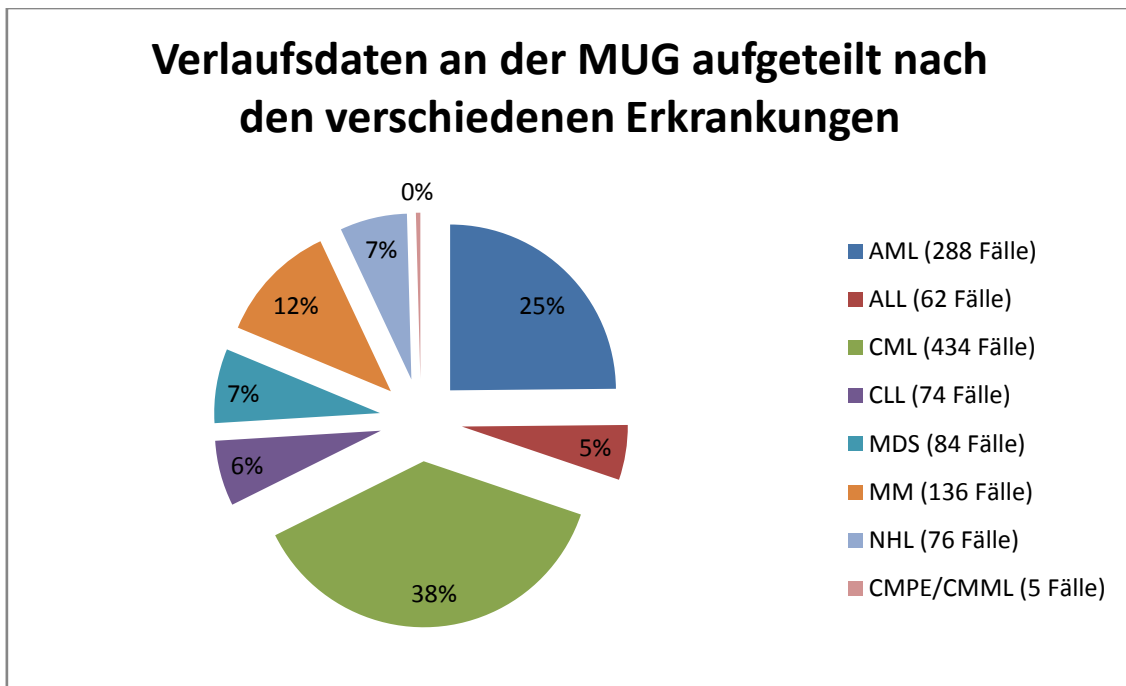
**Abbildung 5** Krankheitsverteilung der Erstvorstellungen.

Aus der ermittelten Gesamtdatenzahl abzüglich der Erstdiagnosen ergibt sich die Anzahl der am Institut für Humangenetik bearbeiteten Verlaufsdaten. Die Aufteilung der Verlaufsdaten gliedert sich wie folgt:

Gesamtanzahl der ermittelten Fälle	1468 Fälle
Keine FISH Untersuchung vorhanden	309 Fälle
Gesamt	1159 Fälle

**Tabelle 5** Falldaten der Verlaufsd Diagnosen.

Die Aufgliederung zu den hämatologischen Erkrankungen setzt sich wie folgt zusammen:



**Abbildung 6** Aufschlüsselung der Daten der Krankheitsverläufe.

## 2.5 Zuordnung der FISH Untersuchungen

Wie schon an früherer Stelle angedeutet, gibt es verschiedene genetische Aberrationen, die sich spezifisch den vorliegenden hämatologischen Erkrankungen zuordnen lassen.

Das prominenteste Beispiel hierfür ist das Philadelphia Chromosom bei der chronisch myeloischen Leukämie. Kann bei der CML ein BCR/ABL Fusionsgen mittels FISH Untersuchung festgestellt werden, kann die Diagnose als gesichert angesehen werden (*Melo et al., 1996*).

An der medizinischen Universität Graz werden die zytogenetischen Untersuchungen bei hämatologischen Erkrankungen einem festgelegten Schema entsprechend durchgeführt. Dabei werden die krankheitsspezifischen genetischen Veränderungen abhängig von der Zuweisungsdiagnose untersucht und dokumentiert.

Abhängig von der Zuweisungsdiagnose wird mittels FISH am Institut für Humangenetik der MUG nach folgenden genetischen Veränderungen gescreent:

AML	ALL	CML	CLL
t(3;3), inv(3)	t(9;22)	t(9;22)	del(17p13.1)
t(11q23)	t(11q23)		del(11q22.3)
-7/7q-	-7/7q-		del(13q14.3)
-5/5q-	-5/5q-		del(13q34)
20q-			+12
t(16;16), inv(16)			del(6q23)
t(15;17)			t(14q32)
t(8;21)			
t(9;22) <sup>1</sup>			

<sup>1</sup> Sporadische Durchführung bei den Fällen mit AML bei erhöhten White Blood Count (WBC) und Thrombozytose

MDS	MM	NHL	CMPE/CMML
-5/5q-	del(13q14)	18q21 BreakApart	t(9;22)
-7/7q-	del(17p13.1)	t(14q32)	-5/5q-
20q-	t(11;14)		-7/7q-
+8	t(4;14)		20q-
	+5p, +9, +15		t(11q23)

**Tabelle 6** Zuordnung der genetischen Aberrationen zu den spezifischen Erkrankungen.

Im nächsten Schritt wurden die Daten mittels Microsoft™ Access ausgewertet und die Ergebnisse in eine Microsoft™ Excel Tabelle übertragen. Ermittelt wurde die Anzahl der durchgeführten Untersuchungen und ob die Untersuchung mit positivem oder negativem Ergebnis abgeschlossen werden konnte. Im Anschluss daran wurde der Prozentsatz der positiven Untersuchungen ermittelt und in der Tabelle festgehalten.

Nicht jede Untersuchung wurde dabei während des gesamten Studien- Zeitraums durchgeführt. Die Erkenntnisse, welche Veränderungen von diagnostisch/prognostischem Wert sind, sind aufgrund der sich ständig entwickelnden und fortschreitenden medizinischen Forschung einem Wandel unterworfen und müssen daher immer wieder auf Richtigkeit überprüft und gegebenenfalls modifiziert werden.

Aus dem oben genannten Grund wurden innerhalb des definierten Zeitrahmens Referenzzeiträume, in denen die jeweiligen Untersuchungen standardisiert bei allen Patienten durchgeführt wurden, definiert und die Abfragen dann entsprechend durchgeführt:

Erkrankung	FISH- Untersuchung	Standardisiert durchgeführt ab:
<b>Akute myeloische Leukämie</b>	t(3;3), inv(3) (EVI)	März 2007
	t(11q23) (MLL)	Januar 2004
	-7/7q- (CEP7)	Oktober 2005
	-5/5q- (EGR1)	November 2005
	20q- (D20S108)	Februar 2006

	t(16;16), inv(16) (CBFB)	Februar 2006
	t(15;17) (PML/RARA)	Februar 2006
	t(8;21) (AML1/ETO)	April 2005
	t(9;22) (BCR/ABL)	Sporadische Durchführung
<b>Akute lymphatische Leukämie</b>	t(9;22) (BCR/ABL)	Juni 2007
	t(11q23) (MLL)	April 2004
	-7/7q- (CEP7)	Mär 2004
	-5/5q- (EGR1)	Januar 2007
<b>Chronisch myeloische Leukämie</b>	t(9;22) (BCR/ABL)	Januar 2004
<b>Chronisch lymphatische Leukämie</b>	del(17p13.1) (P53)	Januar 2004
	del(11q22.3) (ATM)	Januar 2004
	del(13q14.3)	Januar 2004
	del(13q34)	Januar 2004
	+12 (CEP12)	Januar 2004
	del(6q23) (MYB)	August 2007
	t(14q23) (IGHBrAp)	Sporadische Durchführung
<b>Myelodysplastisches Syndrom</b>	-5/5q- (EGR1)	Februar 2006
	-7/7q- (CEP7)	August 2006
	20q- (D20S108)	Januar 2007
	+8 (CEP8)	Januar 2008
<b>Multiples Myelom</b>	del(13q14)	Januar 2004
	del(17p13.1) (p53)	Januar 2004
	t(11;14) (CCND1)	Januar 2004
	del(13q14) (RB1)	Januar 2004- August 2005
	t(4;14) (FGFR)	Januar 2004
	+5p, +9, +15	Februar 2005
<b>Non Hodgkin Lymphom</b>	18q21 (BCL2/IGH)	März 2006
	t(14q23) (MALT1)	März 2007
<b>Chronische myeloproliferative Erkrankung</b>	t(9;22) (BCR/ABL)	März 2005
	-5/5q- (EGR1)	Januar 2008

	-7/7q- (CEP7)	Januar 2008
	-20q (D20S108)	Januar 2008
	t(11q23) (MLL)	Januar 2008
<b>Chronische myelomonozytäre Leukämie</b>	t(9;22) (BCR)	Keine Zeitraumbegrenzung auf Grund der geringen Fallzahlen möglich
	-5/5q- (EGR1)	
	-7/7q- (CEP7)	
	-20q (D20S108)	
	t(11q23) (MLL)	

**Tabelle 7** Referenzzeiträume.

### 3 ERGEBNISSE

Die gewonnenen Ergebnisse werden im Folgenden in Form von Tabellen dargestellt. Es handelt sich dabei um die Anzahl der jeweils durchgeführten Untersuchungen innerhalb des festgelegten Referenzzeitraumes (in Tabelle 7), die Anzahl der positiv verlaufenden Untersuchungen, sowie der aus den positiven Fällen resultierende Prozentsatz. Die Abfragen innerhalb der einzelnen Gruppen wurden jeweils für die gesamte Anzahl der ermittelten Fälle, zusätzlich bei den Erstdiagnosen an der MUG und schließlich bei den sich daraus ergebenden Verlaufsuntersuchungen, durchgeführt.

Die Einteilung der Tabellen wurde anhand der klinischen Zuweisungsdiagnose durchgeführt. Die Ergebnisse beziehen sich dabei auf alle Fälle, die eingegangenen Erstdiagnosen und die daraus resultierenden Verlaufsdaten.

Die Angabe der genetischen Veränderung ist laut ISCN Nomenklatur 2009 gewählt und bezieht sich auf den Ort am Chromosom, an dem die Aberration stattgefunden hat. Zusätzlich wird dabei auch die Art der jeweils vorliegenden Aberration angegeben.

Die Gesamtzahl der durchgeführten Untersuchungen wurde mittels Microsoft™ Access ermittelt und anschließend in eine Microsoft™ Excel Tabelle übertragen.

Es wurde dabei so vorgegangen, dass zuerst für jede Erkrankung Suchbegriffe definiert wurden. Dasselbe wurde analog dazu bei der Analyse der Durchführungshäufigkeit der einzelnen Untersuchungen und dem Ausgang der Untersuchungen angewandt.

Der angegebene Prozentsatz errechnet sich aus der Gesamtzahl der durchgeführten Untersuchungen und den daraus resultierenden positiven Fällen. Der Prozentsatz ist dabei immer vergleichend mit der Anzahl der durchgeführten Untersuchungen zu bewerten, da aus einer niedrigen Anzahl von Untersuchungen ein sehr hoher Prozentsatz resultieren kann, was aber nicht unbedingt direkt auf ein höheres Kollektiv umzulegen ist. Bei der Beurteilung der Daten sollte also dieser Umstand berücksichtigt werden.

## Akute myeloische Leukämie

	alle Fälle (n= 531)			Erstuntersuchungen (n= 243)			Verläufe (n= 288)		
	pos	Prozent	pos	Prozent	pos	Prozent	pos	Prozent	
MLL Amp.	308	13	4,2	191	9	4,7	117	4	3,4
MLL Rea.	308	11	3,6	191	4	2,1	117	7	6,0
EGR1	240	23	9,6	109	9	8,3	131	14	10,7
CEP7	262	43	16,4	112	21	18,8	150	22	14,7
AML1/ETO	163	5	3,1	116	3	2,6	47	2	4,3
PML/RARA	189	4	2,1	105	3	2,9	84	1	1,2
20q-	229	14	6,1	108	2	1,9	121	12	9,9
CBFB	169	11	6,5	104	5	4,8	65	6	9,2
EVI1	189	11	5,8	89	4	4,5	100	7	7,0
BCR/ABL	126	28	22,2	73	14	19,2	53	14	26,4

Abbildung 7 Ermittelte Daten zur AML.

## Akute lymphatische Leukämie

	alle Fälle (n= 142)			Erstuntersuchungen (n= 80)			Verläufe (n= 62)		
	pos	Prozent	pos	Prozent	pos	Prozent	pos	Prozent	
BCR/ABL	69	12	17,4	42	3	7,1	27	9	33,3
MLL Amp.	78	3	3,8	54	3	5,6	24	0	0,0
MLL Rea.	78	3	3,8	54	3	5,6	24	0	0,0
CEP7	54	6	11,1	36	3	8,3	18	3	16,7
EGR1	42	3	7,1	35	3	8,6	7	0	0,0

Abbildung 8 Ermittelte Daten zur ALL.

## Chronisch myeloische Leukämie

	alle Fälle (n= 623)			Erstuntersuchungen (n= 189)			Verläufe (n= 434)		
	pos	Prozent	pos	Prozent	pos	Prozent	pos	Prozent	
BCR/ABL	623	205	32,9	189	74	39,2	434	131	30,2

Abbildung 9 Ermittelte Daten zur CML.

## Chronisch lymphatische Leukämie

	alle Fälle (n= 381)			Erstuntersuchungen (n= 307)			Verläufe (n= 74)		
	pos	Prozent	pos	Prozent	pos	Prozent	pos	Prozent	
Set1 ges.									
P53	377	41	10,9	303	30	9,9	74	11	14,9
ATM	377	39	10,3	306	33	10,8	71	6	8,5
Set2 ges.									
D13S319	377	155	41,1	304	126	41,4	73	29	39,7
13q34	376	11	2,9	303	10	3,3	73	1	1,4
CEP12	377	41	10,9	304	36	11,8	73	5	6,8
MYB	123	6	4,9	91	3	3,3	32	3	9,4
IGH BrAp	52	1	1,9	40	1	2,5	12	0	0,0

Abbildung 10 Ermittelte Daten zur CLL.

## Non Hodgkin Lymphom

	alle Fälle pos (n= 637)			Prozent Erstuntersuchungen pos (n= 561)			Prozent Verläufe pos (n= 76)		
IGH	426	46	10,8	367	41	11,2	59	5	8,5
BCL2	555	11	2,0	464	9	1,9	91	2	2,2

Abbildung 11 Ermittelte Daten zum NHL.

## Multiples Myelom

	alle Fälle pos (n= 669)			Prozent Erstuntersuchungen pos (n= 533)			Prozent Verläufe pos (n= 136)		
D13S319	660	94	14,2	529	72	13,6	131	22	16,8
p53	661	29	4,4	530	22	4,2	131	7	5,3
CCND1	656	36	5,5	531	31	5,8	125	5	4,0
RB1	106	13	12,3	99	9	9,1	7	4	57,1
FGFR	654	26	4,0	529	21	4,0	125	5	4,0
D5S24/D5S721, CEP9, CEP15	547	123	22,5	428	99	23,1	119	24	20,2

Abbildung 12 Ermittelte Daten zum MM.

## Myelodysplastisches Syndrom

	alle Fälle pos (n= 401)			Prozent Erstuntersuchungen pos (n= 317)			Prozent Verläufe pos (n= 84)		
EGR1	367	31	8,4	291	21	7,2	76	10	13,2
CEP7	276	16	5,8	225	10	4,4	51	6	11,8
20q-	188	8	4,3	151	6	4,0	37	2	5,4
CEP8	38	3	7,9	34	2	5,9	4	1	25,0

Abbildung 13 Ermittelte Daten zum MDS.

## Chronische myeloproliferative Erkrankung

	alle Fälle pos (n= 117)			Prozent Erstuntersuchungen pos (n= 114)			Prozent Verläufe pos (n= 3)		
BCR/ABL	51	3	5,9	50	3	6,0	1	0	0,0
EGR1	48	1	2,1	47	1	2,1	1	0	0,0
CEP7	48	1	2,1	47	1	2,1	1	0	0,0
20q-	48	2	4,2	47	2	4,3	1	0	0,0
MLL Amp.	48	1	2,1	47	1	2,1	1	0	0,0
MLL Rea.	48	0	0,0	47	0	0,0	1	0	0,0

Abbildung 14 Ermittelte Daten zur CMPE.

## Chronische myelomonozytäre Leukämie

	alle Fälle (n= 21)			Erstuntersuchungen (n= 19)			Verläufe (n= 2)		
	pos	Prozent		pos	Prozent	pos	Prozent		
BCR/ABL	9	0	0,0	9	0	0,0	0	0	0
EGR1	13	0	0,0	13	0	0,0	0	0	0
CEP7	14	3	21,4	14	3	21,4	0	0	0
20q-	12	0	0,0	12	0	0,0	0	0	0
MLL Amp.	12	0	0,0	12	0	0,0	0	0	0
MLL Rea.	12	0	0,0	12	0	0,0	0	0	0

Abbildung 15 Ermittelte Daten zur CMML.

## 4 DISKUSSION

Ziel der Arbeit war es eine Übersicht über die Aufzeichnungen der Datenbank des Instituts für Humangenetik an der medizinischen Universität Graz zu erstellen. Die bearbeiteten Daten bezogen sich dabei auf die Anzahl der untersuchten Patienten, die klinischen Zuweisungsdiagnosen, die durchgeführten FISH Untersuchungen und deren Ergebnisse. Auf Grund dessen, dass nicht jede Untersuchung während des gesamten festgelegten Studienzeitraums durchgeführt wurde, ist in dieser Arbeit zusätzlich zum Studienzeitraum ein Zeitrahmen definiert, in dem die FISH-Diagnostik standardisiert an allen Patienten durchgeführt wurde. Dies ist in Tabelle 7 ersichtlich. Als Zeitspanne für die Datenanalyse wurde die Periode vom 1. Januar 2004 bis 1. April 2009 gewählt.

Zur Durchführung der Datenanalyse wurden sowohl für die verschiedenen FISH Untersuchungen als auch für den Ausgang derselben (positives oder negatives Ergebnis) Suchbegriffe definiert. Die mit dieser Methode ermittelten Daten werden in den folgenden Absätzen gezeigt und diskutiert.

Zur Fragestellung, wie viele Untersuchungen bei der klinischen Verdachtsdiagnose AML durchgeführt wurden, ergaben sich folgende Zahlen:

Im Studienzeitraum kamen am Institut für Humangenetik bei einer Gesamtfallzahl von 531 Fällen mit der klinischen Verdachtsdiagnose AML 1875 einzelne FISH Sonden zum Einsatz (welche FISH Sonden dabei zum Einsatz gekommen sind ist in Tabelle 6 dargestellt). Es konnte bei 163 Untersuchungen ein positives Ergebnis ermittelt werden. Dies entspricht einem prozentuellen Anteil von 8,7%.

Bei den 243 Erstvorstellungen an der MUG mit klinischer Verdachtsdiagnose AML wurden 1007 Untersuchungen mit einem positiven Ergebnis in 74 Fällen durchgeführt. Das entspricht einem prozentuellen Anteil von 7,3%.

Bei der Analyse der 142 Fälle mit Verdachtsdiagnose ALL konnten 321 durchgeführte Untersuchungen ermittelt werden. Bei 27, also 8,4%, konnte ein positives Ergebnisse festgestellt werden.

Unter den 80 Fällen, bei denen es zu einer Erstvorstellung am Institut für Humangenetik kam, wurden 221 Untersuchungen mittels FISH durchgeführt.

Dabei kam es zu 15 positiven Ergebnissen. Es konnte also in 6,8% der Fälle eine Aberration ermittelt werden.

Im Rahmen der Diplomarbeit wurde bei den eingegangenen klinischen Verdachtsdiagnosen der CML ausschließlich nach dem Fusionsprodukt BCR/ABL gesucht. Im gesamten Fallkollektiv mit der entsprechenden Zuweisung wurde, bei insgesamt 623 Fällen bezüglich des Philadelphia-Chromosoms FISH Untersuchungen durchgeführt, wobei diese in 205 Fällen (entspricht 32,9%) als positiv diagnostiziert werden konnten. Bei den Erstvorstellungen kamen auf 189 durchgeführte Untersuchungen 74 positive. Dies entspricht einem prozentuellen Anteil von 39,2%.

Bei den 381 Fällen mit der Verdachtsdiagnose CLL wurde primär mit zwei kommerziell erwerbbaaren Probensets (zur genaueren Erläuterung der Sets siehe Kapitel 2.2.4) gearbeitet. Das Probenset 1 kam dabei 377mal zum Einsatz, während das Probenset 2 377, beziehungsweise 376mal (siehe hierzu Kapitel 5), Anwendung fand. Innerhalb dieser Untersuchungen konnten beim Probenset 1 80 genetische Veränderungen, was 21,2% entspricht, festgestellt werden. Beim Probenset 2 konnten 207 Veränderungen diagnostiziert werden, was einen prozentuellen Anteil von 54,9% gleichkommt. Zusätzlich zu den kommerziell erwerbbaaren Sets wurden noch weitere genetische Untersuchungen (ebenfalls in Tabelle 6 ersichtlich) durchgeführt, bei denen bei 7 (4%) eine Aberration bestand. Im Rahmen des 307 Fälle umfassenden Fallkollektivs der Erstvorstellungen an der MUG mit Verdachtsdiagnose CLL kam das Probenset 1 303, beziehungsweise 306mal (weitere Details in Kapitel 5) zum Einsatz mit 63 (20,6%) stattgefundenen Aberrationen. Das Probenset 2 fand 303, beziehungsweise 304mal Anwendung mit 172 (56,6%) aufgefundenen genetischen Aberrationen. Die Anzahl der zusätzlichen Untersuchungen beträgt 131 mit 4 (3,1%) aufgefundenen genetischen Veränderungen.

Bei allen 637 ermittelten Fällen mit der Verdachtsdiagnose eines vorliegenden Lymphoms wurden zur molekularzytogenetischen Abklärung 981 Untersuchungen durchgeführt. In 57 Fällen, also bei 5,8%, konnte im Rahmen der FISH eine genetische Aberration festgestellt werden. Bei den 561 Erstvorstellungen konnten

50 genetische Veränderungen bei 831 eingesetzten FISH Proben gefunden werden. Dies entspricht einem positiven Anteil von 6%.

Zur Fragestellung einer genetischen Aberration bei der klinischen Verdachtsdiagnose eines multiplen Myeloms wurden am Institut für Humangenetik innerhalb der 669 Fälle mit entsprechender klinischer Zuweisungsdiagnose 3284 Untersuchungen durchgeführt. Bei 321 dieser Untersuchungen, was 9,8% entspricht, konnte das Vorliegen einer Veränderung festgestellt werden. Unter den 533 Erstvorstellungen an der MUG befanden sich 284 FISH- Untersuchungen, von insgesamt 2646, bei denen eine Veränderung festgestellt werden konnte. Die Prozentzahl der positiven Untersuchungen belief sich demnach auf 9,6%.

Unter den 401 am Institut für Humangenetik eingegangenen Fällen mit der klinischen Verdachtsdiagnose MDS konnte bei 58 von insgesamt 869 durchgeführten einzelnen FISH Untersuchungen eine genetische Aberration festgestellt werden. Demnach betrug der prozentuelle Anteil FISH Untersuchungen mit positivem Ergebnis 6,7%. Bei den 317 eingegangenen Erstvorstellungen konnte bei 39 (5,6%) von 701 Untersuchungen eine zytogenetische Veränderung festgestellt werden.

Unter den 243 durchgeführten genetischen Untersuchungen bei den 117 Fällen der chronischen myeloproliferativen Erkrankung konnte bei 8 Proben, also 3,3%, eine stattgefundene genetische Veränderung nachgewiesen werden. Unter den 114 Erstvorstellungen befanden sich 8 positive Fälle einer genetischen Aberration innerhalb der 238 durchgeführten FISH Untersuchungen. Dies entspricht 3,4%.

Bei der chronischen myelomonozytären Leukämie konnte auf Grund der geringen eingegangenen Fallzahlen (es konnten nur 21 Fälle ermittelt werden) mit entsprechender klinischer Verdachtsdiagnose bei den durchgeführten zytogenetischen Untersuchungen kein Referenzzeitraum definiert werden, während dem die Untersuchungen standardisiert und bei allen Fällen zum Einsatz kamen. Die Analyse der durchgeführten Untersuchungen bezieht sich daher auf alle eingegangenen Fälle ohne zeitliche Beschränkung der Selben.

Bei allen Fällen der CMML kamen 60 FISH Proben zum Einsatz und es konnten bei 3 davon, dies entspricht einen Anteil von 5%, eine Veränderung festgestellt

werden. Bei den ermittelten 19 Fällen innerhalb des Fallkollektivs der Erstvorstellungen entsprechen die Analysedaten denen der Gesamtfallzahldaten an der MUG.

Nach der Betrachtung der gewonnenen Ergebnisse kann zusammenfassend festgestellt werden, dass sich die verfolgte Strategie des FISH Einsatzes zum frühestmöglichen Zeitpunkt in der Diagnostik hämatologischer Erkrankungen eindeutig bewährt hat.

Bei der Betrachtung der gewonnenen Ergebnisse muss allerdings berücksichtigt werden, dass für die Einteilung nach den verschiedenen hämatologischen Erkrankungen als Grundlage die bei der Humangenetik eingegangenen klinischen Zuweisungsdiagnosen herangezogen wurden. Das heißt, es handelt sich bei den auf den Zuweisungen angegebenen und in die Datenbank übernommenen hämatologischen Erkrankungen nicht um sicher feststehende klinische Diagnosen, sondern um klinische Verdachtsdiagnosen.

Um die oben beschriebene Problematik in der Datenanalyse noch genauer zu veranschaulichen, wurde im Fall der akuten myeloischen Leukämie zusätzlich eine Analyse mit genauem Augenmerk auf die Sicherheit der Zuweisungsdiagnose durchgeführt. Die Aufteilung bezieht sich dabei auf Fälle mit laut Zuweisungsdiagnose sicherem Vorliegen einer AML ohne Angabe einer Differenzialdiagnose im Vergleich zu den Fällen wo der Diagnose „nur“ ein klinischer Verdacht zugrunde liegt.

	sicher (n= 96)	pos	Prozent	Verdacht (n= 147)	pos	Prozent
MLL Amp.	70	5	7,1	121	4	3,3
MLL Rea.	70	3	4,3	121	1	0,8
EGR1	54	8	14,8	55	1	1,8
CEP7	58	13	22,4	54	8	14,8
AML1/ETO	37	2	5,4	79	1	1,3
PML/RARA	38	2	5,3	67	1	1,5
20q-	46	1	2,2	62	1	1,6
CBFB	37	1	2,7	67	4	6,0
EVI1	36	2	5,6	53	2	3,8
BCR/ABL	17	2	11,8	56	12	21,4

**Abbildung 16** AML Sichere versus Verdachtsdiagnosen.

Aus Abbildung 16 und 17 geht hervor, dass der Untersuchungs- Outcome davon abhängig ist, wie sicher die Zuweisungsdiagnose feststeht. Bei den Patienten mit laut Zuweisung sicherer Diagnose einer AML ist bei allen durchgeführten FISH Untersuchungen eine höhere Trefferquote festzustellen.

Zur besseren Veranschaulichung werden im Folgenden nur die Prozentzahlen der Untersuchungen gegenübergestellt, bei denen eine Aberration nachgewiesen werden konnte:

	Prozentzahl der sicheren Diagnosen	Prozentzahl der unsicheren Diagnosen
MLL Amp.	7,1	3,3
MLL Rea.	4,3	0,8
EGR1	14,8	1,8
CEP7	22,4	14,8
AML1/ETO	5,4	1,3
PML/RARA	5,3	1,5
20q-	2,2	1,6
CBFB	2,7	6,0
EVI1	5,6	3,8
BCR/ABL	11,8	21,4

**Abbildung 17** Prozentzahlen sichere versus unsichere Diagnosen der AML.

Diesem Umstand muss in der Zusammensetzung der standardisierten Probensets dadurch Rechnung getragen werden, dass relevante Differenzialdiagnosen ins analytische Spektrum integriert wurden. Die erhobenen Daten zeigen, dass sich diese Strategie klinische bewährt hat. Dies ist am Beispiel der Analyse der BCR/ABL Probe bei klinischer Verdachtsdiagnose AML mit erhöhten WBC und Thrombozytose zu veranschaulichen. Der Anteil der BCR/ABL positiven Fälle war im Fallkollektiv der klinisch sicheren Diagnosen wesentlich geringer als innerhalb des Fallkollektivs der AML Verdachtsdiagnosen (siehe Abbildung 17).

In weiterer Folge stellt sich die Frage, wann genau der ideale Zeitpunkt zur Durchführung einer zytogenetischen Untersuchung in der klinischen Diagnostik zu wählen ist. Aus den im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit gewonnenen Daten geht hervor, dass die Trefferquote zum Auffinden einer spezifischen genetischen Veränderung umso höher ist, je sicherer die Zuweisungsdiagnose zutrifft (siehe Abbildung 16 und 17). Bei sicherem Feststehen einer spezifischen,

hämatologischen Erkrankung kann sehr viel gezielter nach den für diese Erkrankung ausschlaggebenden Veränderungen gesucht werden, es müssen also weniger FISH Proben eingesetzt werden.

Der Ablauf der von der Klinik durchgeführten diagnostischen Schritte kann in mehrere Zeiträume unterteilt werden (siehe hierzu Kapitel 2.3):

- Zeitraum 1: Allgemeine klinische Symptomatik
- Zeitraum 2: Differenzialblutbild
- Zeitraum 3: Knochenmarkbiopsie, Zytochemie, Zytologie und Zytogenetik
- Zeitraum 4: Serum und Liquoruntersuchung

In der Regel stehen zum Zeitpunkt der Zusendung des Materials der Knochenmarkpunktion nur die Ergebnisse des Zeitraums 1 und 2 zur Verfügung. Zur spezifischen Analyse der genetischen Veränderungen durch zytogenetische und molekularzytogenetische Analytik ist es von Vorteil, die Zeitspanne, bis zur Durchführung entsprechender Untersuchungen so lang wie es für den Patienten therapeutisch vertretbar ist, hinauszuzögern.

Demnach wäre eine zytogenetische Untersuchung später in der klinischen Diagnostik von höherer Signifikanz, beziehungsweise die genetischen Veränderungen könnten mit einer höheren Trefferquote aufgefunden werden.

Der Nachteil eines „Abwartens“ zur Durchführung zytogenetischer Analysen ergibt sich für den Patienten im Zeitverlust. Des Weiteren sollten auch auf eine einfache Umschichtung der Kosten als auch des Arbeitsaufwands verzichtet werden. Es sollte darauf geachtet werden, dass aufgrund einer späteren Durchführung der FISH (und der damit einhergehenden Einsparung von Arbeitsaufwand und Kosten) der Patient keinen Nachteil erfährt.

Um einen effizienten Arbeitsablauf zu gewährleisten, der sowohl für den Patienten als auch für die Klinik keine Nachteile birgt, sollte auf eine möglichst gute Zusammenarbeit zwischen den verschiedenen, mit der Diagnose beauftragten Kliniken geachtet werden. Alle während der laufenden Diagnostik gewonnen Ergebnisse sollten sofort allen involvierten Ärzten zugänglich gemacht werden, um

das weitere diagnostische Vorgehen jederzeit modifizieren und dementsprechend optimieren zu können.

## **5 PROBLEMATIK IN DER DURCHFÜHRUNG DER DATENANALYSE**

### **5.1 Allgemeines**

Bei der im Rahmen der Diplomarbeit durchgeführten Datenanalyse wurde in mehreren Schritten vorgegangen, um dann schließlich zum gesuchten Ergebnis zu gelangen.

#### 1. Schritt:

Der Zeitrahmen der Datenanalyse wurde festgelegt und die Daten dann diesem Zeitraum entsprechend zur Analyse vorbereitet. Das Augenmerk fiel dabei auf die im Rahmen der Diplomarbeit relevanten Daten. Diese bezogen sich auf die Fallnummer, das Befunddatum, die klinische Zuweisungsdiagnose und die Interphase FISH Untersuchungen.

#### 2. Schritt:

Die vorliegenden hämatologischen Erkrankungen wurden gesichtet und entsprechend der angegebenen klinischen Verdachtsdiagnosen unterteilt und in verschiedenen Files gespeichert. Dabei wurde bei Mehrfachdiagnosen so verfahren, dass jeder Fall entsprechend der vorhandenen Diagnosen mehrfach in die Datenanalyse einfluss.

#### 3. Schritt:

Es wurden Suchbegriffe definiert, die es in Microsoft™ Access möglich machen sollten die verschiedenen Untersuchungen und das Ergebnis der Selben zu ermitteln. Die Suchbegriffe wurden so gewählt, dass sie möglichst alle Untersuchungen erfassen sollten. Die Analyse welche Erkrankung durchgeführt wurde und das Ergebnis wurde dabei unabhängig voneinander abgefragt.

#### 4. Schritt:

Die gewonnen Zahlen wurden in Microsoft™ Excel Files übertragen. Es wurde für jede Fragestellung eine eigene Datei angelegt. Die Daten wurden immer abhängig der anfangs durchgeführten Einteilung nach den Erkrankungen erfasst. Die

Fragestellungen bezogen sich auf die Anzahl der Fälle, die Anzahl der durchgeführten FISH Untersuchungen und deren Ergebnis, jeweils für alle Fälle, die Erstvorstellungen am Institut für Humangenetik und die daraus resultierenden Verlaufsdaten. Zusätzlich wurde im Fall der AML eine zusätzliche Abfrage mit genauem Augenmerk auf die Zuweisungsdiagnose durchgeführt, nämlich wie sicher diese laut Datenbank zum Zeitpunkt der zytogenetischen Untersuchung feststand.

## **5.2 Vorhandener Datensatz**

Die Daten zu den durchgeführten FISH Untersuchungen werden am Institut für Humangenetik in Form einer Microsoft™ Access Datenbank erfasst und gespeichert. Die Informationen welcher FISH durchgeführt wurde und dessen Ergebnis sind dabei in drei Spalten unterteilt (Interphase FISH, Bemerkung und Bemerkung 2). Die Spalten Bemerkung und Bemerkung 2 kommen dann zum Einsatz wenn der vorliegende Befund so umfassend ist, dass eine Spalte, auf Grund der in Microsoft™ Access festgelegten höchstens zulässigen Zeichenanzahl, zur vollständigen Erfassung nicht ausreichend ist.

Die einzelnen Untersuchungen sind innerhalb dieser Spalten durch ein Leerzeichen voneinander getrennt. Den Anfang einer neuen Untersuchung kennzeichnet die Zeichenfolge „nuc ish“.

Das Ergebnis und damit auch die Information welcher FISH durchgeführt wurde, wird in diesen Spalten vermerkt. Die Einträge können dabei eine Abweichung aufweisen. Diese Differenzen in den Einträgen umfassen unterschiedliche Groß/Kleinschreibung der Genorte, unterschiedliche Ergebnis Angaben für gleiche FISHe, uneinheitlicher Einsatz von Punkt, Beistrich und Strichpunkt und einfache Übertragungsfehler. Diese Inhomogenität in der Datenerfassung macht eine Analyse mittels Filtereingabe sehr schwierig und ungenau. Es ist hierbei zwar möglich allgemein gültige Suchbegriffe zu definieren, aber es kann nicht gewährleistet werden, dass auch wirklich alle vorhandenen Daten von einem gesetzten Filter erfasst werden.

Seit 2009 erfolgt die Erfassung der Untersuchungsdaten in ein eigens dafür designtes System. Durch die Einführung soll es nun problemlos möglich sein, benötigte Daten innerhalb eines kurzen Zeitraumes anzufordern und auszuwerten.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

Bergsagel L and Kuehl M, (2005) "Molecular Pathogenesis and a Consequent Classification of Multiple Myeloma" *Journal of Clinical Oncology* Vol 23 Nr26, pp 6333-6338

Brezinová J, Zemanová Z, Ransdorvá S, et al., (2005) "Prognostic significance of del(20q) in patients with hematological malignancies " *Cancer Genetics and Cytogenetics* 160, 188-192

Buselmaier W, (Hg), (2003) *Biologie für Mediziner*, 8. Auflage, Springer- Verlag Berlin Heidelberg New- York, pp204- 206; 207- 208; 262; 263- 270; 284

Chesi M, Bergsagel L, Brents L, et al., (1996) "Dysregulation of Cyclin D1 by Translocation Into an IgH Gamma Switch Region in Two Multiple Myeloma Cell Lines" *Blood* Vol 88 No2, pp 674- 681

Cimino G, Rapanotti C, Sprovieri T, et al., (1998) "ALL1 gene alterations in acute leukemia: biological and clinical aspects" *Haematologica* 83 : 350- 357

Collard J, Van de Poll M, Scheffer A, et al., (1987) "Location of Genes Involved in Invasion and Metastasis of Human Chromosome 7" *Cancer Research* 47, 6666-6670

Dietel M (Hg) (2005) *Harrisons Innere Medizin*, 16. Auflage, ABW Wissenschaftsverlag, Berlin, Deutschland, pp 384-385; 403;

Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al., (2000) "Genomic Aberrations And Survival In Chronic Lymphocytic Leukemia" *The New England Journal Of Medicine* December 28, pp 1910-1916

Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al., (1998) "The Importance of Diagnostic Cytogenetics on Outcome in AML: Analysis of 1,612 Patients Entered Into the MRC AML 10 Trial" *Blood* Vol 92, No 7, pp 2322-2333

Hagemeyer A, Klein A, Wijsman J, et al., (1998) "Development of an interphase fluorescent in situ hybridization (FISH) test to detect t(8;21) in AML patients" *Leukemia* Vol 12, pp 96-101

He L, Guidez F, Tribioli C, et al., (1998) "Distinct interactions of PML- RAR $\alpha$  and PLZF- RAR $\alpha$  with co- repressors determine differential responses to RA in APL" *Nature Genetics* Vol 18, pp 126-135

Herold G. (Hg) (2008) *Innere Medizin*, Gerd Herold, pp 65; 74- 77; 82- 83

Jaffe E (Hg) (2001) : World Health Organization Classification of Tumours : Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. Lyon: IARC Press, pp16; 17; 20- 23; 32- 34; 35; 38; 39- 40; 41; 47- 48; 49- 51; 51- 52; 63- 66; 66- 67; 77- 80; 81- 87; 127- 128; 129; 142- 144; 147- 148; 162- 175;

Jenkins R, Qian J, Lee H, et al., (1998) "A Molecular Cytogenetic Analysis of 7q31 in Prostate Cancer " *Cancer Research* 58, 759-766

Keats J, Reiman T, Maxwell C, et al., (2003) "In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression" *Blood* Vol 101 No4, pp 1520-1529

Levsky J and Singer R, (2003) "Fluorescence in situ hybridization: past, present and future" *Journal of Cell Science* 116, pp2833- 2838

Levy ER, Parganas E, Morishita K, et al., (2003) „DNA Rearrangements Proximal to the EVI1 Locus Associated With the 3q21q26 Syndrome“ *Blood* Vol 83 No5, pp 1348-1354

Liu P, Tarlé SA, Hajara A et al., (1993) "Fusion between transcription factor CBFbeta/PEBP2 beta and myosin heavy chain in acute myeloid leukemia" *Science* Aug 20, 261(5124):1041-4

Murken J (Hg) (2006) *Humangenetik*, 7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, pp141; 142- 144; 149- 152; 186- 187; 184- 196, 197

Melo, Junia V; (1996) "The Diversity of BCR-ABL Fusion Proteins and Their Relationship to Leukemia Phenotype" *Blood* Vol88 No5, pp 2375- 2384

Nucifora G and Rowley J, (1995) "AML1 and the 8;21 and 3;21 Translocations in Acute and Chronic Myeloid Leukemia" *Blood* Vol86 No1, pp 1- 14

Pandolfi P, Alcalay M, Fagioli M, et al., (1992) "Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RAR $\alpha$  transcripts that encode aberrant PML proteins and PML/RAR $\alpha$  isoforms in acute promyelocytic leukemia" *The EMBO Journal* Vol 11 No4, pp 1397- 1407

Sanchez- Izquierdo D, Buchonnet G, Siebert R, et al., (2000) "MALT1 is deregulated by both chromosomal translocation and amplification in B- cell non-Hodgkin Lymphoma" *Blood* Vol 101 No11, pp 4539-4546

Schaich M, Schlenk R, Haifa K, et al., (2007) "Prognosis of acute myeloid leukemia patients up to 60 years of age exhibiting trisomy 8 within a non- complex karyotype: individual patient data- based meta analysis of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup" *Haematologica/The hematology journal* 92(06) pp 763-770

Senn H.- J. et al. (2001) *Checkliste Onkologie*, 5. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, pp 376;380

Sinclair P, Green A, Grace C and Nacheva E, (1997) "Improved Sensitivity of BCR-ABL Detection: A Triple- Probe Three- Color Fluorescence In Situ Hybridization System" *Blood* Vol 90 No4, pp 1395-1402

THIEME'S INNERE MEDIZIN – TIM © Georg Thieme Verlag Stuttgart 1999, pp814; 821; 823

URL: <http://international.abbottmolecular.com/products/genetics.html>, letzter  
Besuch Februar 2011

Vaandrager JW, Schuurin E, Raap T, et al., (2000) "Interphase FISH Detection of BCL2 Rearrangement in Follicular Lymphoma Using Breakpoint- Flanking Probes" *Genes, Chromosomes & Cancer* 27: 85-94

Veronese M, Ohta M, Finan J, et al., (1995) "Detection of *myc* Translocations in Lymphoma Cells by Fluorescence In Situ Hybridization With Yeast Artificial Chromosomes" *Blood* Vol 85 No8, pp 2132-2138

## 7 LEBENS LAUF

### Angaben zur Person:

Name: Maria Hude  
Matr.- Nr.: 0211741  
Geburtsdatum: 8. Juni 1983  
Geburtsort: Klagenfurt  
Staatsbürgerschaft: AUT

### Schulbildung:

1989- 1993 Volksschule in Klagenfurt  
1993- 1999 Waldorfschule Klagenfurt  
1999- 2002 BRG Klagenfurt/ Viktring  
Juni 2002 Matura am BRG Viktring

### Hochschulbildung:

2002- 2004 Humanmedizinstudium an der medizinischen Fakultät der  
Karl- Franzens Universität Graz  
Seit 2004 Humanmedizinstudium an der Medizinischen Universität Graz  
Juni 2011 Voraussichtlicher Studienabschluss

### 6. Studienjahr:

28. Sep.- 20. Nov.2009 Service de Chirurgie digestive (240),  
Centre Hospitalier Saint- Philibert, Lille, Frankreich  
23. Nov.- 18. Dez.2009 Service de Pédiatrie (120h),  
Centre Hospitalier Saint- Vincent de Paul, Lille,  
Frankreich  
4. Jan.- 12. Feb.2010 Service de médecine interne (240h),  
Centre Hospitalier Saint- Philibert, Lille, Frankreich  
1. Mär.- 16.Apr.2010 Allgemeinmedizinische Famulatur (120h),  
Praxis Dr. Mosser, Klagenfurt

### SSM's:

Cased- based learning in Klinik und Praxis

Klinisch topographische Anatomie der Extremitäten

Modernste Methoden zur Messung der Body- Composition

Betriebswirtschaft im Gesundheitswesen

Gender Medicine

Klinische Humangenetik

### Famulaturen:

SS 2005 3 Wochen an der gynäkologischen Abteilung am LKH Klagenfurt

SS 2006 2 Wochen an der neurologischen Abteilung am LKH Klagenfurt

2 Wochen an der radiologischen Abteilung am LKH Klagenfurt

SS 2008 4 Wochen an der I. medizinischen Abteilung am LKH Klagenfurt

2 Wochen an der Abteilung für physikalische Medizin am LKH  
Klagenfurt

SS 2009 2 Wochen am UKH Klagenfurt

2 Wochen an der Abteilung für allg. Chirurgie am LKH Klagenfurt

## 8 ANHANG A

Kommerzielle FISH Proben Bezeichnung	Lokalisation im Genom	Betroffene Gene
Vysis D7S486/CEP 7 FISH Probe Kit	7q31 7p11.1-q11.1	D7S486 CEP 7
Vysis LSI EGR1/D5S23, D5S721 Dual Color Probe	5p15.2 5q31	D5S23, D5S721 EGR1
Vysis D20S108 FISH Probe Kit	20q12	D20S108
Vysis LSI 13 (RB1) 13q14 SpectrumOrange Probe	13q14	RB1
Vysis LSI TP53 (17p13.1) SpectrumOrange Probe	17p13.1	TP53
Vysis MYB SpectrumAqua FISH Probe Kit	6q23	MYB
Vysis LSI MLL Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe	11q23	MLL
Vysis CFBF Break Apart FISH Probe Kit	16q22	CBFB
Vysis LSI IGH Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe	14q32	IGH
Vysis MYC SpectrumOrange FISH Probe Kit	8q24.12 q24.13	C-MYC
Vysis LSI BCL6 (ABR) Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe	3q27	BCL6 (ABR)
Vysis LSI TCR alpha/delta Dual Color Break apart Rearrangement Probe	14q11	TCR alpha/delta
ON EVI t(3;3); inv(3) (3q26) Break	3q26	EVI
Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe	9q34 22q11.2	ABL BCR
Vysis LSI AML1/ETO Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe	21q22 8q22	AML1 ETO
Vysis PML/RARA SF FISH Probe Kit	17q21 15q22	RARA PML
Vysis LSI IGH/BCL2 Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe	14q32 18q21	IGH BCL2
Vysis LSI IGH/MALT1 t(14;18) (q32;q21) Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe	14q32 18q21	IGH MALT1
Vysis IGH/CCND1 DF FISH Probe Kit	11q13	CCND1

	14q32	IGH
Vysis IGH/FGFR3 DF FISH Probe Kit	14q32 4p16	IGH FGFR3
Vysis LSI API2/MALT1 t(11;18) (q21;q21) Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe	11q21 18q21	API2 MALT1
Vysis LSI p53 / LSI ATM and LSI D13S319 / LSI 13q34 / CEP 12 Multi-color Probe	17p13.1 11q22.3 13q14.3 13q34 12p11.1-q11	p53 ATM D13S319 13q34 CEP 12
Vysis D5S23, D5S721/CEP 9/CEP 15 FISH Probe Kit	5p15.2 9p11-q11 15p11.1-q11.1	D5S23/D5S721 CEP 9 CEP 15
CEP 8 SpectrumOrange Direct Labeled Fluorescent DNA Probe Kit	8p11.1-q11.1	CEP 8

**Tabelle 8** Übersicht über die am Institut für Humangenetik zur Verwendung kommenden FISH Proben.