

**Entwicklung einer computerlesbaren  
zytogenetischen Notation zur Detektion  
minimal rekurrenter Aberrationen bei Patienten  
mit hämatologischen Neoplasien**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Jutta Bradtke  
aus Kirchhain/Hessen

Marburg/Lahn 2008

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation  
am 25.03.2003 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker, Philipps-Universität Marburg

Zweitgutachter: Prof. Dr. Harald Rieder, Universität Düsseldorf

Tag der mündlichen Prüfung am: 21.01.2009

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von April 2001 bis Dezember 2004 in der Arbeitsgruppe Tumorgenetik am Institut für Klinische Genetik/ Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg (Leitung Frau Prof. Rehder) unter der Betreuung von Prof. Dr. Harald Rieder durchgeführt.

## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel: „Entwicklung einer computerlesbaren zytogenetischen Notation zur Detektion minimal rekurrenter Aberrationen bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien“ selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe

---

(Ort/Datum)

---

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)

Die Dissertation wurde in seiner jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient. Teile dieser Dissertation wurden im Jahr 2003 in der Zeitschrift BMC Bioinformatics veröffentlicht.

## Zusammenfassung

Zur Beschreibung menschlicher Karyotypen wird allgemein die ISCN (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature) in seiner jeweils aktuell gültigen Fassung verwendet. Mit Hilfe der ISCN können nicht nur konstitutionelle Karyotypen, sondern auch die bei vielen Krebserkrankungen vorkommenden aberranten Karyotypen beschrieben werden. Die Karyotypen von Krebspatienten sind häufig umfangreich und nur mit Hilfe einer genauen Kenntnis der ISCN-Regeln zu interpretieren. Im Rahmen der Erforschung von Mechanismen der Krankheitsentstehung und -progression bei Neoplasien werden die Chromosomenbefunde von erkrankten Patienten in elektronischen Datenbanken gesammelt. Durch die Auswertung der Chromosomenbefunde vieler Patienten können chromosomale Veränderungen entdeckt werden, die für bestimmte Patientengruppen rekurrent sind und somit nicht zufällig auftreten. Viele der auf diese Weise aufgedeckten rekurrenten Veränderungen haben eine prognostische Bedeutung für den Patienten und die An- oder Abwesenheit einer spezifischen chromosomalen Veränderung kann zur Einordnung eines Patienten in ein bestimmtes Therapieschema führen. Karyotypen, die mit der ISCN beschrieben werden, sind aufgrund der Komplexität der ISCN-Regeln nur sehr eingeschränkt computerlesbar. Insbesondere die vollständige Erfassung aller chromosomalen Imbalancen infolge von unbalancierten chromosomalen Rearrangements sowie von sämtlichen betroffenen chromosomalen Bruchpunkten ist nicht möglich. Programme, mit deren Hilfe eine Interpretation von Karyotypen erfolgen könnte, standen zum Beginn dieser Arbeit nicht zur Verfügung. Aus diesem Grund musste eine umfassende Analyse großer zytogenetischer Datensammlungen manuell erfolgen und war dadurch ein sehr zeitaufwändiges und fehleranfälliges Unterfangen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine vollständig automatisierte Analyse einer Sammlung nach ISCN 1995 dokumentierter tumorzytogenetischer Chromosomenbefunde unter Verwendung einer neu entwickelten zytogenetischen Notation (SCCN) möglich ist. Bei der vollständig automatisierten Analyse einer Beispielsammlung tumorzytogenetischer Daten wurde das gesamte Spektrum an Rearrangements, Bruchpunkten und chromosomalen Imbalancen innerhalb einer selektierten Patientengruppe abgebildet. Anhand einer Datenbank mit den Chromosomenbefunden von 94 Patienten mit einer Philadelphia-positiven akuten lymphatischen Leukämie sowie zusätzlichen Sekundäraberrationen konnte die Effektivität und Effizienz der SCCN nachgewiesen werden. Mittels zweier Software-Tools zur quantitativen (chromosomale Imbalancen) und qualitativen Analyse (Bruchpunktanalyse)

erfolgte eine Präsentation der Analyseergebnisse in tabellarischer und grafischer Form. Fehlerhafte oder unplausible Datensätze wurden während des Analyseprozesses herausgefiltert und in separaten Tabellen dokumentiert. Die bei der Analyse gefundenen Sekundäraberrationen zur Philadelphia-Translokation und ihre Häufigkeiten entsprachen weitgehend den bekannten Literaturwerten. Bisher unbekannte, minimal rekurrente Veränderungen wurden nicht nachgewiesen.

## Abkürzungen und Fachbegriffe

<i>abl</i>	Abelson-Maus Leukämie Virus Homolog 1	GMALL	German Multicenter ALL Studie
ALL	Akute Lymphatische Leukämie	HLA-DR	Human Leukocyte Antigen
AML	Akute Myeloische Leukämie	ISCN	International System of Cytogenetic Nomenclature
ASG- Bandenfärbung	Acetic Saline and Giemsa	Kb	Kilobase(n)
c-ALL	common-ALL	LCD	Leukemia Cytogenetic Database
<i>bcr</i>	Breakpoint Cluster Region	Mbp	Mega Basenpaar(e)
BFM-Studie	Berlin-Frankfurt- Münster Studie	M-FISH	Multicolor-FISH
bphs	bands per haploid set	NOR	Nukleus Organisierende Region
CGH	Vergleichende Genomische Hybridisierung	OT	Objektträger
CD	Cluster of Differentiation	Ph-Translokation	Philadelphia-Translokation
CML	Chronische Lymphatische Leukämie	POM	Polyoxymethylen
CQS	Cytoband Query System	PS	Polystyrol
CyDAS	Cytogenetic Data Analysis System	revFISH	Reverse-FISH
cyIg	Zytoplasmatisches Immunglobulin	SCCN	Simplified Computerreadable Cytogenetic Notation
cyMPO	Zytoplasmatische Myeloperoxidase	SKY	Spectral Karyotyping
DNA	Desoxy- Ribonucleinsäure	TdT	Terminale- Desoxynucleotidyltransferase
EW	Einwohner	UV	ultraviolett
FISH	Fluoreszenz-in-situ- Hybridisierung	WHO	World Health Organisation

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungen und Fachbegriffe</b> .....	<b>III</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>3</b>
1.1 Die ISCN-Nomenklatur .....	3
1.1.1 Von der Denver-Konferenz zur ISCN 2005 .....	3
1.1.2 Beschreibung der ISCN-Nomenklatur .....	5
1.2 Analyse tumorzytogenetischer Daten zur Entdeckung rekurrenter Aberrationen .....	8
1.3 Computergestützte Auswertung von zytogenetischen Datensammlungen .....	10
1.4 Die Akute Lymphatische Leukämie .....	12
1.4.1 Die Philadelphia-Translokation als spezifische Aberration der ALL .....	15
1.4.2 Zusätzliche chromosomale Aberrationen bei Philadelphia-positiven ALL-Patienten .....	17
1.5 Zielsetzung der Arbeit .....	19
<b>2. Ergebnisse</b> .....	<b>20</b>
2.1 Entwicklung einer vereinfachten computerlesbaren zytogenetischen Notation .....	20
2.1.1 Erstellung des Beispieldatensatzes .....	20
2.1.2 Vorüberlegungen zur Entwicklung einer SCCN .....	22
2.1.3 Beschreibung der im SCCN-String verwendeten Zeichen und Kürzel .....	23
2.1.4 Aufbau des SCCN-String .....	24
2.1.5 Beschreibung des quantitativen SCCN-Strings .....	27
2.1.6 Beschreibung des qualitativen SCCN-Strings .....	27
2.1.7 Regeln für die Translation von ISCN zu SCCN .....	28
2.1.8 Übersetzung der ISCN-Karyotypen des Beispieldatensatzes in den SCCN-String .....	30
2.1.9 Analyse-Software .....	30
2.2 Das Patientenkollektiv des Beispieldatensatzes .....	32
2.2.1 Zytogenetische Charakteristika der Patienten .....	32
2.3 Ergebnisse der Metaanalyse von 94 Karyotypen mittels SCCN-Analysesoftware .....	37
2.3.1 Ergebnisse der quantitativen Analysen .....	37
2.3.2 Ergebnisse der qualitativen Analysen .....	42
<b>3. Diskussion</b> .....	<b>47</b>
3.1 Die computergestützte Analyse großer tumorzytogenetischer Datensammlungen .....	47
3.2 SCCN: ein geeignetes Werkzeug für eine vollständig automatisierte Analyse von zytogenetischen Daten .....	57
3.3 Analyse der Zusatzaberrationen von t(9;22)(q34;q11) .....	65
3.4 Ausblick .....	68

<b>4. Patienten und Material</b> .....	<b>70</b>
4.1 Patientenkollektiv und Probenmaterial .....	70
4.2 Material .....	72
4.2.1 Medien, Lösungen, Enzyme und Kits .....	72
<b>5. Methoden</b> .....	<b>76</b>
5.1 Chromosomenbandenanalysen .....	76
5.1.1 Grundlagen der Chromosomenpräparation .....	76
5.1.2 Herstellung von Chromosomenpräparaten .....	76
5.1.3 Chromosomenfärbung .....	79
5.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung .....	80
5.2.1 Grundlagen der Technik .....	80
5.3 Molekularzytogenetische Untersuchung der t(9;22)(q34;q11) und ihrer Sekundäraberrationen .....	84
5.3.1 Beschreibung der lokus-spezifischen Translokations-Sonden .....	84
5.3.2 Beschreibung der Multicolor-FISH-Sonden .....	86
5.3.3 FISH-Analysen .....	87
5.4 Auswertungen .....	93
5.4.1 Chromosomenbandenanalysen .....	93
5.4.2 Fluoreszenz-mikroskopische Auswertung .....	94
5.5 Verwaltung von Patientendaten und zytogenetischen Befunden .....	98
5.5.1 Verwendete Hard- und Software .....	98
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>99</b>
<b>7. Anhang</b> .....	<b>104</b>
7.1 Verzeichnis der Abkürzungen und Zeichen der ISCN 1995/2005 (Auszug) .....	104
7.2 Ideogramme der 24 Chromosomen des Menschen .....	106
7.3 Ergebnisse der quantitativen Analyse am Beispiel von Chromosom 9 .....	107
7.4 Ergebnisse der qualitativen Analyse am Beispiel von Chromosom 6 .....	108
7.5 ISCN-Karyotypen und SCCN-Strings der 94 ALL-Patienten .....	109
<b>Danksagung</b> .....	<b>113</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>114</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Die ISCN-Nomenklatur

### 1.1.1 Von der Denver-Konferenz zur ISCN 2005

Nachdem im Jahre 1956 Tijo und Levan die genaue Anzahl menschlicher Chromosomen von 48 auf 46 festgelegt hatten, setzte in den Folgejahren ein verstärktes Interesse an der Humangenetik ein. Im Zuge dessen wurden viele Klassifikations- und Nomenklatorsysteme zur Beschreibung des menschlichen Karyotyps und seiner Variabilität sowie von chromosomalen Aberrationen vorgeschlagen. Zu diesem Zeitpunkt war nur die Beschreibung von numerischen und grobstrukturellen Veränderungen der Chromosomen möglich. Im Jahr 1959 entdeckte Lejeune die Trisomie 21 bei Patienten mit dem Down-Syndrom (Lejeune *et al.* 1959). Im gleichen Jahr erfolgte die Erstbeschreibung der gonosomalen Aberrationen beim Ullrich-Turner-Syndrom (Monosomie X) (FORD *et al.* 1959) und beim Klinefelter-Syndrom (zusätzliches X-Chromosom beim männlichen Geschlecht) (JACOBS & STRONG 1959). Im Jahr 1960 wurden die beiden konstitutionellen autosomalen Trisomien 13 (PATAU *et al.* 1960) und 18 (Edwards *et al.* 1960) und die erste klinisch bedeutsame, nicht konstitutionelle strukturelle Veränderung, das Philadelphia-Chromosom (benannt nach ihrem Entdeckungsort) bei der chronischen myeloischen Leukämie (Nowell & Hungerford 1960), entdeckt. Durch diese Entwicklungsschritte wurde eine Vereinheitlichung der bisher gebräuchlichen Klassifikations- und Nomenklatorsysteme notwendig. Noch im gleichen Jahr einigte man sich daher auf „A Proposed Standard System of Nomenclature of Human Mitotic Chromosomes“ (Denver Conference 1960) – diese bildete die Basis für alle zukünftigen Nomenklaturen.

Im Jahre 1963 erhielt diese Nomenklatur offiziellen Charakter (London Conference 1963); nach Patau (PATAU 1960) wurden sieben verschiedene Chromosomengruppen (A – G) eingeführt. Auf der 1966 nachfolgenden „Chicago Conference“ wurde ein „Standard System of Nomenclature“ für eine Kurzschrift-Beschreibung der Chromosomenanzahl und seiner Abnormalitäten (im ungebänderten Zustand) vorgeschlagen.

Kurz darauf, im Jahre 1970, konnte erstmals die Bänderung menschlicher Chromosomen mit Hilfe des Fluoreszenz-Farbstoffs Quinacrin dargestellt werden

(Caspersson *et al.* 1970). Diese revolutionäre Entdeckung ermöglichte erstmals eine genaue Unterscheidung und Kategorisierung der spezifischen Merkmale der einzelnen Chromosomen innerhalb der sieben Chromosomen-Gruppen. Der hierdurch stattfindende enorme Erkenntniszuwachs hatte zur Folge, dass die Nomenklatur erneut angepasst werden musste. Im Jahre 1971 fand die nächste Konferenz in Paris statt, hier wurde eine Regel zur Beschreibung von Chromosomenregionen und -banden sowie struktureller Rearrangements durch die Angabe der Bruchpunkte eingeführt und in den Folgejahren noch einmal angepasst (N.N. 1972). J.D. Rowley konnte 1973 mittels Quinacrin-Bänderung nachweisen, dass es sich bei der Philadelphia-Translokation um eine Translokation zwischen den langen Armen je eines Chromosom 9 und 22 handelt (Rowley 1973). Im Jahr 1978 wurden dann alle vorherigen Versionen der Nomenklatur unter der ISCN 1978 (Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature 1978) zusammengefasst. Doch die technische Entwicklung ging weiter; die Autoren Francke und Oliver entwickelten ein hochauflösendes Bänderungsverfahren an Trypsin-Giemsa gebänderten Prometaphase-Chromosomen (high resolution banding) (Francke & Oliver 1978), so dass schon 1980 eine Erweiterung der ISCN um neue (Sub-) Banden aus Prophase- und Prometaphasechromosomen stattfinden musste (ISCN 1981) (Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature 1981). In der Folgezeit (1984) erfolgte eine weitere Überarbeitung und Fehlerkorrektur der ISCN, eine Terminologie zur Beschreibung erworbener Aberrationen (z.B. aus Neoplasien) wurde eingeführt. Hieraus resultierte anschließend die ISCN 1985 (Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature 1985). Im Jahr 1991 wurde zusätzlich eine Nomenklatur für die Zytogenetik bei Krebserkrankungen eingeführt (ISCN 1992). Ein weiterer Meilenstein in der Erforschung chromosomaler Anomalien war bereits 1988 die Entwicklung der Chromosomen-in-situ-Suppressions-Hybridisierung bzw. der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) (Warford 1988). Die Identifizierung von Veränderungen erstmals auch im Interphasekern und von submikroskopischen Deletionen, so genannter Mikrodeletionen wurde hierdurch möglich. Demzufolge war es notwendig auch hierfür eine entsprechende Nomenklatur zu entwickeln. So wurde 1995 erneut beraten und als Ergebnis die ISCN 1995 veröffentlicht (ISCN 1995 1995). Eine Terminologie zur Beschreibung zytogenetischer Ergebnisse aus FISH und revFISH wurde entwickelt. Der intensive Gebrauch der ISCN 1995 und die weitere Entwicklung neuer, feinerer molekularzytogenetischer Methoden und deren Implementierung in die

Routinediagnostik zeigte auf, dass weiterhin einige Defizite und Unklarheiten innerhalb der ISCN bestanden. Bei diesen Methoden handelte es sich beispielsweise um die Vergleichende Genomische Hybridisierung (CGH), 24-Farben FISH (Multicolor-FISH) und SKY (Spectral Karyotyping), Vielfarben-Bänderung (Multicolor-Banding) und nicht zuletzt die an Mikrochips durchgeführte Array-CGH. Eine Überarbeitung und Erweiterung des Standardwerkes ISCN 1995 wurde diskutiert und im Dezember 2004 in Vancouver erarbeitet. Seit Oktober 2005 ist nun die ISCN 2005 (Shaffer & Tommerup 2006) zur Beschreibung zytogenetischer Veränderungen verbindlich. Neben der Einführung eines 300 bphs und 700 bphs Karyogrammes, wurde die vorher häufig mißverständliche Nomenklatur für die in-situ-Hybridisierung modernisiert, vereinfacht und erweitert. Außerdem wurde eine Basis-Nomenklatur für die Array-CGH eingeführt, welche möglicherweise bei einer zukünftigen routinemäßigen Anwendung dieser Methode erweitert werden muss. Für den Bereich der Chromosomenbandenanalyse wurde zusätzlich die Abkürzung „rob“ für die Robertson'schen Translokationen eingeführt.

### **1.1.2 Beschreibung der ISCN-Nomenklatur**

Ein Karyotyp nach ISCN 1995 bzw. der inzwischen aktuellen ISCN 2005 besteht aus mehreren Elementen, die nach einem fest definierten Muster sortiert sind. Strukturelle Aberrationen innerhalb eines Karyotyps können in ISCN-Kurzschrift oder der detaillierteren ISCN-Langschrift beschrieben werden. Bei Verwendung der Langschrift werden im Gegensatz zur Kurzform die Bruchpunkte und die Herkunft und Orientierung des chromosomalen Materials im derivativen Chromosom genau angegeben. Im praktischen Gebrauch wird jedoch in der Regel die Kurzschrift verwendet, welche zur Beschreibung der meisten Rearrangements vollkommen ausreicht.

Grundsätzlich beginnt ein Karyotyp mit der Angabe der Chromosomenanzahl, danach folgt nach einem trennenden Komma die vorliegende Gonosomenkonstellation. Ein normal männlicher oder weiblicher Chromosomensatz wird mit 46,XY bzw. 46,XX beschrieben. Falls ein aberranter Karyotyp vorliegt, folgen nach einem weiteren Komma im Anschluss an die Gonosomen die Beschreibungen der Aberrationen. Hierbei muss die Reihenfolge beginnend vom Chromosom 1 bis Chromosom 22 eingehalten werden. Falls jedoch ein Gonosom in eine Aberration involviert ist, wird dieses vor den

Autosomen beschrieben und dafür bei der Gonosomenkonstellation weggelassen. Einzelne Aberrationen werden durch ein Komma und ohne trennendes Leerzeichen nacheinander aufgelistet. Bei numerischen Aberrationen wird dem entsprechenden Chromosom ein Plus- (Zugewinn) oder Minuszeichen (Verlust) vorangestellt (z.B. 45,XY,-7 oder 47,XX,+8 bzw. 46,X,-X,+8). Bei strukturellen Aberrationen folgt auf die der Aberration entsprechenden ISCN-Abkürzung das betroffene Chromosom, welches von Klammern eingefasst wird. Im Anschluss daran werden die betroffenen Bruchpunkte in Klammern aufgeführt [z.B. 45,XY,-7,del(9)(p21)]. Ein feststehendes Prinzip bei Gebrauch der Kurzschrift ist:

Bei (reziproken) Rearrangements mit mindestens zwei Bruchpunkten werden (nach Angabe des Aberrationskürzels), jeweils durch ein Semikolon getrennt, die betroffenen Chromosomen innerhalb eines ersten Klammernpaares und die Bruchpunkte innerhalb eines zweiten Klammernpaares beschrieben [z.B.47,XY,+8,t(9;22)(q34;q11)]. Analog dazu erfolgt die Beschreibung von Drei- und Vierbruchpunkt-Rearrangements. Die Reihenfolge der Bruchpunkte im zweiten Klammernpaar entspricht der Reihenfolge der involvierten Chromosomen im ersten Klammernpaar.

Die ISCN-Langschrift wird hauptsächlich dann gebraucht, wenn sehr komplexe Bruchereignisse innerhalb eines Chromosoms stattfanden bzw. dabei Material mehrerer verschiedener Chromosomen auf ein Chromosom transloziert wurde. Hierbei wird die Orientierung des Materials innerhalb eines Chromosoms durch Pfeile und ein Bruchereignis durch ein Paar Doppelpunkte dargestellt. Die Herkunft des chromosomalen Materials wird durch Angabe des Herkunftschromosoms und der involvierten Banden definiert.

In kurzer Schreibweise wird ein Isochromosom eines derivativen Chromosom 22 nach vorangegangener Philadelphia-Translokation dementsprechend durch den Ausdruck  $ider(22)(q10)t(9;22)(q34;q11)$  beschrieben. In ISCN-Langschrift stellt sich diese Aberration deutlich komplexer dar. Der entsprechende Ausdruck lautet dann  $ider(22)(9qter->9q34::22q11->22q10::22q10->22q11::9q34->9qter)$ .

Liegt eine Aberration konstitutionell d.h. im angeborenen Chromosomensatz vor, wird die entsprechende Aberration mit einem „c“ versehen.

Ein aberranter Karyotyp kann im Falle einer Neoplasie aus einem oder mehreren Klonen bestehen. Diese können durch eine klonale Evolution aus einer Zelllinie

entstanden sein und somit identische Aberrationen (Primäraberration) gemeinsam haben (in diesem Fall spricht man von Subklonen) oder sie sind aus verschiedenen Stammzellen entstanden und daher unabhängig voneinander und haben keine Aberration gemeinsam.

Unter dem Begriff Modalzahl versteht man die Anzahl der Chromosomen im aberranten Klon, die bei der Chromosomenbandenanalyse am häufigsten gefunden wurde. Beim Vorliegen mehrerer aberranter Klone mit unterschiedlicher Chromosomenzahl entspricht die Modalzahl dem Klon mit den meisten ausgewerteten Mitosen.

An der Modalzahl eines aberranten Karyotyps orientiert sich auch die Einteilung in verschiedene Ploidiegruppen (s. Tabelle 1).

**Tabelle 1: Ploidiegruppen nach ISCN**

<b>Ploidiegruppe</b>	<b>Modalzahl</b>
nahezu haploid +/- 23	<= 34
hypohaploid	<23
hyperhaploid	24-34
nahezu diploid +/- 46	35-57
hypodiploid	35-45
hyperdiploid	47-57
nahezu triploid +/- 69	58-80
hypotriploid	58-68
ypertriploid	70-80
nahezu tetraploid +/- 92	81-103
hypotetraploid	81-91
hypertetraploid	93-103

Die Ploidiegruppen werden durch die Zahl 23 (Anzahl der Chromosomen im haploiden Satz) und ihre Vielfachen festgelegt. Ob es sich bei einer numerischen Aberration um einen Zugewinn oder Verlust handelt, hängt davon ab, zu welcher Ploidiegruppe ein aberranter Klon gezählt wird. Wenn beispielsweise die Modalzahl 57 beträgt, fällt der Klon in die nahezu diploide Gruppe (hyperdiploid) und Trisomien von Chromosomen werden als Zugewinne gezählt. Wenn dagegen modal 58 Chromosomen vorliegen, fällt der Klon in die nahezu triploide Gruppe (= hypotriploid) und Trisomien werden nicht

im Karyotyp aufgeführt, wohingegen bei allen Chromosomen, die nur disom vorliegen, davon ausgegangen wird, dass ein Verlust vorliegt, welcher dann auch im ISCN-Karyotyp aufgeführt wird. Zwei Beispiele zur Verdeutlichung:

hyperdiploid:57,XX,+X,+4,+6,+8,+10,+11,+14,+17,+18,+21,+21

hypotriploid:58,XXX,-1,-2,-3,-5,-7,-9,-13,-15,-16,-19,-20,+21,-22

Die Beispiele zeigen wie unterschiedlich zwei Karyotypen aussehen können, wenn sie in der Anzahl der einzelnen Chromosomen zwar sehr ähnlich sind, jedoch unterschiedlichen Ploidiegruppen zugeordnet werden (Unterschied: im hypotriploiden Klon liegt auch das Chromosom 12 in dreifacher Kopie vor).

Eine auszugsweise Auflistung der in der ISCN 1995/2005 verwendeten Zeichen und Abkürzungen ist im Anhang aufgeführt.

## ***1.2 Analyse tumorzytogenetischer Daten zur Entdeckung rekurrenter Aberrationen***

Bei verschiedenen Leukämieentitäten wurden durch die Analyse der zytogenetischen Daten verschiedener Patientengruppen inzwischen viele spezifische, rekurrente Aberrationen definiert. Die prognostische Bedeutung dieser spezifischen Aberrationen ist bekannt und neu erkrankte oder rezidierte Patienten werden entsprechend dieser Aberrationen (und unter Berücksichtigung weiterer klinischer Befunde) im Rahmen einer Therapie in verschiedene Risikogruppen eingeteilt. Bei den meisten dieser spezifischen Aberrationen sind die beteiligten Gene und deren Funktion im Zellzyklus und bei der Krankheitsprogression bekannt. Auf dieser Grundlage wurden in den letzten Jahren sogar einige Medikamente entwickelt, die beim Vorliegen einer spezifischen Aberration der Krankheitsprogression auf molekularer Ebene entgegenwirken (z.B. Imatinib bei CML und ALL). Darüber hinaus können im Rahmen einer klonalen Evolution im Krankheitsverlauf und unter Therapie unterschiedlichste Zusatzaberrationen zu den spezifischen Veränderungen gefunden werden. Einige dieser Zusatzaberrationen sind rekurrent und mit bestimmten spezifischen Aberrationen assoziiert. Daneben findet man jedoch häufig nicht-rekurrente Zusatzaberrationen. Bei vielen Leukämie-Patienten mit aberrantem Karyotyp, die aber keine spezifischen

Aberrationen aufweisen, werden unspezifische Aberrationen gefunden, deren pathogene Wirkung unklar ist, die aber eine Rolle bei der Krankheitsprogression spielen könnten. Wenn im Falle einer Neoplasie eine zytogenetische Diagnostik durchgeführt wird, dient diese in der Regel dazu den betroffenen Patienten, je nach Aberrationsstatus und entsprechender Risikostratifizierung, nach der für ihn bestmöglichen Therapie zu behandeln. Tumorzytogenetische Ergebnisse werden (vorausgesetzt eine Einverständniserklärung des Patienten oder seines gesetzlichen Vertreters liegt vor) darüber hinaus im Rahmen von Therapiestudien gesammelt. In Deutschland aktive Studien sind z.B. die verschiedenen GMALL-Studien (Deutsche Multizentrische ALL-Studie: [www.kompetenznetz-leukaemie.de](http://www.kompetenznetz-leukaemie.de)) für erwachsene Patienten mit ALL oder die ALL-BFM-Studien ([www.uni-kiel.de/all-studie/All\\_intro.htm](http://www.uni-kiel.de/all-studie/All_intro.htm)) für pädiatrische ALL-Patienten. Durch die Speicherung der tumorzytogenetischen Daten in Datenbanken können diese einer möglichen wissenschaftlichen Analyse zugänglich gemacht werden. Hierfür werden die Daten i.d.R. mehrerer Referenzlabore an die jeweiligen Studienzentralen weitergeleitet. Schon im einzelnen Referenzlabor werden dabei tumorzytogenetische Daten von Patienten aus größeren Zeiträumen archiviert. Hierbei entstehen unter Umständen Datenbanken mit den Datensätzen mehrerer tausend Patienten.

Um bei einer wissenschaftlichen Analyse zu statistisch abgesicherten Aussagen zu gelangen, müssen möglichst große Fallzahlen ausgewertet werden. Große Fallzahlen entstehen z.B. durch die Zusammenführung der Daten verschiedener Institute. Dieses wird auf der Ebene sowohl nationaler (Kompetenznetz Akute und chronische Leukämie) als auch internationaler Zusammenarbeit erreicht (European Leukemia Net). Wenn eine nicht-spezifische Aberration oder Zusatzaberration nur ein- oder zweimal innerhalb der begrenzten Patientensammlung eines tumorzytogenetischen Institutes vorkommt, fällt diese bei einer Analyse der zytogenetischen Daten nicht unbedingt auf, sie wird am ehesten als zufällig und nicht-rekurrent eingestuft. Durch die Erzeugung von Datenbanken mittels Zusammenführung der Patientendaten verschiedener tumorzytogenetischer Institute stehen jedoch größere Fallsammlungen zur Verfügung. Bei der Analyse dieser größeren Datenmenge ist es möglich, dass sich eine vormals als zufällig eingestufte Aberration nun als minimal rekurrent erweist, weil sie aufgrund der größeren Menge an untersuchten Patienten gehäuft innerhalb einer spezifischen Patientengruppe vorkommt. Mit Hilfe der Analyse solcher großen zytogenetischen

Datenbestände auf bestimmte Chromosomenaberrationen können neue, seltene primäre Chromosomenaberrationen aufgedeckt werden. So kann die wiederholte Involvierung einer bestimmten Chromosomenbande bei Translokationen mit unterschiedlichen Partnerchromosomen auf die tumorauslösende Umlagerung ein und desselben Gens hindeuten (Rowley 1999). Die Analyse großer tumorzytogenetischer Fallsammlungen ist zudem hilfreich, um minimale gemeinsam deletierte Chromosomensegmente zu identifizieren und damit wichtige Hinweise auf dort lokalisierte potentielle Tumorsuppressorgene zu erhalten (Johansson et al. 1993). Diese Strategie führte z.B. zur Entdeckung des Tumorsuppressorgens *CDKN2A* in der Chromosomenbande 9p21 (Chilcote et al. 1985; Middleton et al. 1991; Kamb et al. 1994). Über die Identifizierung minimaler gemeinsam hinzugewonnener Segmente können mittels Analyse tumorzytogenetischer Daten auch Regionen eingegrenzt werden, die eventuell für die Tumorgenese bedeutsame Onkogene beherbergen (Batanian et al. 2001). Die Aufschlüsselung der zeitlichen Abfolge des Auftretens und die Art der Kombination von zusätzlichen Chromosomenaberrationen im Rahmen einer klonalen Evolution können Hinweise auf genetische Mechanismen der Tumorprogression geben. Dabei können komplexe Karyotypveränderungen das Muster von genetischen Veränderungen verschleiern (Hoglund et al. 2001; Hoglund et al. 2002).

### ***1.3 Computergestützte Auswertung von zytogenetischen Datensammlungen***

Eine rein manuelle Analyse großer Mengen tumorzytogenetischer Daten ist sehr zeitaufwändig und häufig fehleranfällig. Eine computergestützte Auswertung großer Datenmengen wäre wünschenswert, da sie den erforderlichen Zeitaufwand minimiert und zu weniger fehlerbelasteten Ergebnissen führt. Aus diesem Grund wurde bei der Entwicklung der ISCN 1995 bereits berücksichtigt, dass eine Computerlesbarkeit der ISCN-Karyotypen möglich ist. So können in Datenbanken, in denen in ISCN-Kurzschrift beschriebene zytogenetische Daten gespeichert sind, numerische Veränderungen ganzer Chromosomen, eindeutige bekannte Chromosomenrearrangements sowie bereits bekannte rekurrente Bruchpunkte via Computer über eine einfache Volltextsuche leicht abgefragt werden (Mitelman et al. 1997; Mitelman et al. 2007). Dieses Verfahren ist jedoch, je nach Beschaffenheit der ISCN-Karyotypen, für eine umfassendere Analyse meistens nicht ausreichend.

Unbalancierte Chromosomenrearrangements führen zu partiellen Zugewinnen und Verlusten chromosomalen Materials. Der Zugewinn eines derivativen Chromosoms, welches das Resultat einer unbalancierten Translokation ist, führt ebenfalls zu partiellen Zugewinnen und Verlusten derselben Chromosomenabschnitte. Zum Beispiel führt in dem Karyotyp 47,XY,der(19)t(1;19)(q23;p13),+der(19)t(1;19) der Zugewinn des derivativen Chromosom 19 zu einem zweifachen Zugewinn der Banden 1q23 bis 1q44, zum Verlust eines Teils der Chromosomenbande 19p13 bis zum Telomer von Chromosom 19 und außerdem zum Zugewinn eines in Richtung Zentromer gelegenen Anteils von 19p13 (da der Bruchpunkt theoretisch in der Bandenmitte angesiedelt wird). Darüber hinaus können komplexe chromosomale Rearrangements zum Teil nur mittels der weiter oben beschriebenen detaillierten ISCN-Langschrift dargestellt werden, wodurch Netto-Zugewinne und -Verluste mitunter nur durch aufwändiges Vergleichen der einzelnen Aberrationen innerhalb des Gesamtkaryotyps entdeckt werden können. Auch die Beschreibung der Art des Rearrangements ist beim Gebrauch der ISCN-Langschrift für komplexe Karyotypen ohne die Information des Gesamtkaryotyps oftmals schwierig. Diese Beispiele zeigen, dass ein ISCN-Karyotyp mit strukturellen Aberrationen (ob in Kurz- oder Langschrift) so genannte „Metainformationen“ über die chromosomalen Zugewinne und Verluste enthalten kann, die ohne genaue Kenntnis der ISCN-Regeln nicht interpretiert werden können und somit einer automatisierten Abfrage unter Verwendung einer einfachen Volltextabfrage nicht zugänglich sind.

Eine vollständig computerisierte Metaanalyse zytogenetischer Daten via Volltext-Abfragen kann erfolgen, wenn neben dem ISCN-Karyotyp auch die darin enthaltene Metainformation in einer Datenbank dokumentiert wird. Dieses Verfahren wird in verschiedenen tumorzytogenetischen Instituten in unterschiedlicher Weise angewendet. Wenn die im ISCN-Karyotyp enthaltene Metainformation nicht zusätzlich dokumentiert wird oder tumorzytogenetische Daten analysiert werden müssen, bei denen nur der ISCN-Code als Informationsquelle vorliegt, kann eine vollständig computerisierte Analyse nur erfolgen, wenn ein Analyseprogramm vorliegt, welches einen ISCN-Karyotypen interpretieren kann. In der Vergangenheit gab es nur wenige, unvollständige Ansätze zur Entwicklung einer solchen Software (Kamada et al. 1983) (Hashimoto et al. 1989).

Zu Beginn dieser Arbeit stand kein System für eine automatisierte Analyse von ISCN-Karyotypen zur Verfügung. Es erschien zudem fraglich, ob die Entwicklung einer

Software möglich ist, die die im ISCN-Code enthaltenen Metainformationen erkennen kann und dann eine Analyse aller chromosomaler Zugewinne und Verluste bzw. Bruchpunkten liefert. Da es den meisten tumorzytogenetischen Instituten an den zeitlichen und finanziellen Mitteln mangelt, erschien die mögliche Entwicklung eines entsprechenden Programms zudem als unrealisierbar.

#### ***1.4 Die Akute Lymphatische Leukämie***

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist eine bei Erwachsenen eher seltene hämatologische Neoplasie. Sie macht weniger als 15% der Leukämien bei den Erwachsenen aus. In Deutschland hatte sie in den Jahren 1997-1998 bei den 15-64jährigen eine Inzidenz von 0,5 Neuerkrankungen auf 100000 EW pro Jahr (Dugas et al. 2003), dieses entspricht ca. 500 Neuerkrankungen pro Jahr. Männer erkranken etwas häufiger an der ALL als Frauen (ca. 1,4 zu 1). Bei den über 80jährigen liegt die Frequenz bei 1,5/100000 Neuerkrankungen jährlich. Das mittlere Erkrankungsalter liegt beim Erwachsenen zwischen 30 und 40 Jahren (Dugas et al. 2003). Bei Kindern ist eine ALL mit einem Anteil von ca. 80% die häufigste Leukämieform. Auch in dieser Patientengruppe erkranken pro Jahr in Deutschland ca. 500 Patienten neu. Die Symptome der ALL können über Wochen und Monate schleichend zunehmen, können jedoch auch sehr plötzlich auftreten. Sie werden durch Insuffizienz der Blutbildung bzw. Infiltration anderer Organe hervorgerufen. Ein Befall des Zentralnervensystems (ZNS) ist möglich. Prä-leukämische Erkrankungen sind bei der ALL sehr selten, wodurch eine Anamnese der Patienten nicht sehr ergiebig ist.

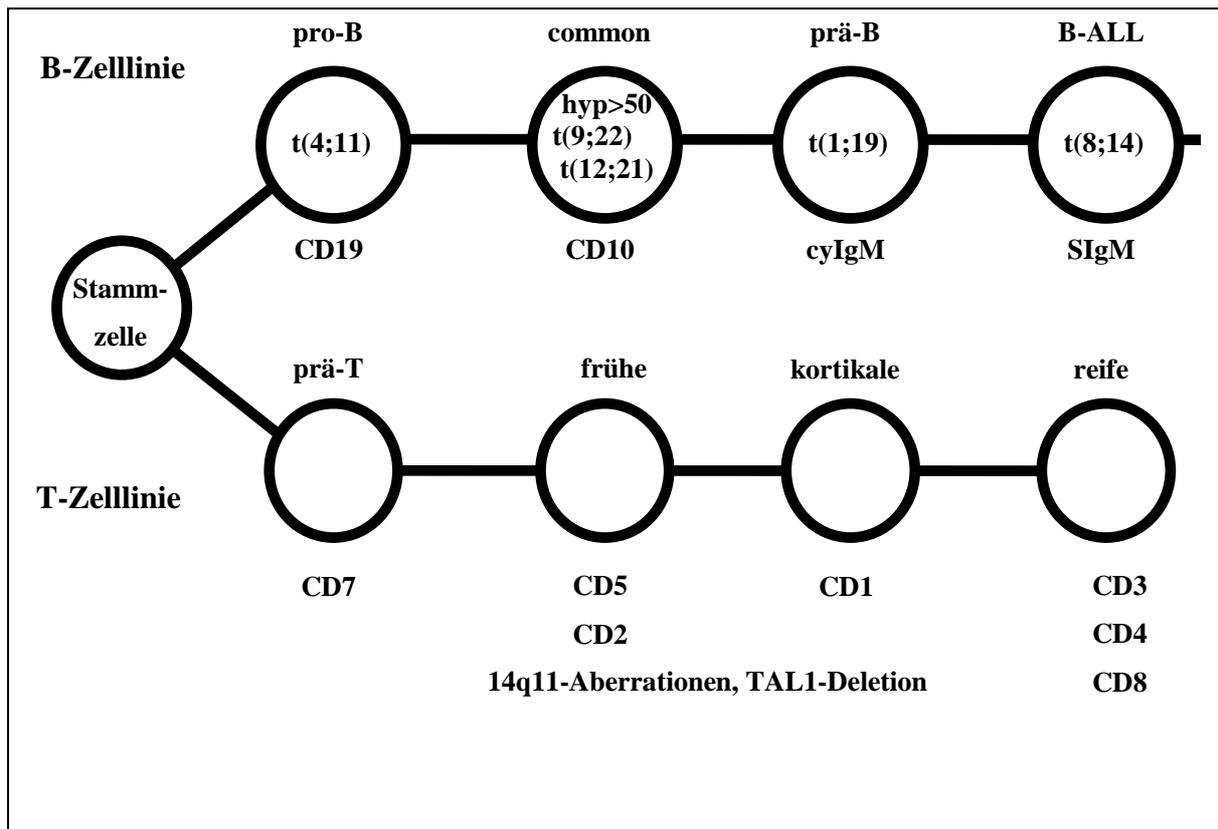
Eine ALL entsteht durch Entartung einer pluripotenten hämatologischen Stammzelle. Stammzellen des Knochenmarks werden allgemein als Zellen mit extensiver Selbsterneuerungskapazität und spezifischem Differenzierungspotential definiert.

Eine Störung in der Balance zwischen Proliferation und Differenzierung kann zu einer klonalen Selektion einer Stammzelle und so zu einer Progression und neoplastischen Entartung führen. Nach den Richtlinien der WHO müssen für die Diagnose einer ALL mindestens 20% Blasten vorliegen. Bei der ALL sind die verschiedenen Reifungsstadien der Blasten durch das Vorkommen spezifischer Oberflächenmarker definiert, deren Vorkommen einen Hinweis auf die verschiedenen ALL-Subtypen liefern können. Das Vorkommen dieser Oberflächenmarker wird mittels Immunphänotypisierung bestimmt (hier nicht dargestellt). Eine Einteilung der ALL in

ihre Subtypen geschieht neben immunologischen (Immunphänotypisierung) nach morphologischen (z.B. Zellgröße, Zytoplasma, Nucleoli) und zytochemischen Kriterien. Bei einer Einteilung nach den verschiedenen Reifestadien der Lymphozyten können mittels Immunphänotypisierung, je nach betroffener Zellreihe (B- oder T-Zellreihe), verschiedene Subtypen der ALL bestimmt werden. Die Zellen eines bestimmten Reifungsgrades können durch die Markierung mit spezifischen Antikörpern erkannt werden (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2: Zelltypen und Antikörper bei den verschiedenen Subtypen der ALL**

Subtypen bei ALL	Zelltyp	Antikörper
B-Reihe	B-I: Pro-B-ALL (pro-B-Zelle)	cyCD22, CD19, CD24, CD20, HLA-DR, TdT
	B-II: c-ALL (prä-prä-B-Zelle)	cyCD22, CD19, CD24, CD20, HLA-DR, TdT, CD10
	B-III: Prä-B-ALL (prä-B-Zelle)	cyCD22, CD19, CD24, CD20, HLA-DR, TdT, cyIg
	B-IV: reife B-ALL (Burkitt-Lymphom), frühe B-Zelle	cyCD22, CD19, CD24, CD20, HLA-DR, CD10, cyIg, sIg
T-Reihe	T-I: Pro-T-ALL	cyCD3, CD7, CD5, CD2, CD1a, CD8, CD52
	T-II: prä-T-ALL	cyCD3, CD7, CD5, CD2, CD1a, CD8, CD52
	T-III: cortikale T-ALL	cyCD3, CD7, CD5, CD2, CD1a, CD8, CD52
	T-IV: reife T-ALL	cyCD3, CD7, CD5, CD2, CD4, CD8, SCD3
My+-ALL	Biphänotypische ALL	Ggf. mit ein oder zwei myeloischen Markern (CD33, CD13, CD65s, CD117, cyMPO)



**Abbildung 1: Schema der Zelldifferenzierung der lymphatischen Zellreihe mit ALL-Subtypen, spezifischen Aberrationen und Oberflächenmarkern.**

Je nach ALL-Subtyp können spezifische chromosomale Aberrationen vorkommen, die mit einer unterschiedlichen prognostischen Relevanz assoziiert sind. Die Bedeutung prognostischer Faktoren kann jedoch nur in Zusammenhang mit der entsprechenden Therapie beurteilt werden. Wenn eine spezifische Aberration festgestellt wird, wird diese folglich zusammen mit weiteren Diagnoseparametern in dem patientenspezifischen Therapieschema (Hochrisiko, Standardrisiko, Niedrigrisiko) berücksichtigt.

**Tabelle 3: Chromosomenaberrationen, Häufigkeiten und prognostische Bedeutung bei erwachsenen Patienten mit einer ALL**

Aberration	Häufigkeit (%)	Prognose
t(9;22)(q34;q11.2)	20-30	ungünstig, hochrisiko
t(4;11)(q21;q23)	3-7	ungünstig, hochrisiko
t(1;19)(q23;p13.3)	1-3	ungünstig?
t(10;14)(q24;q11)	1-3	ungünstig?
9p/6q/12p	5-15/3-6/2-5	unklar
hoch-hyperdiploid (51-65 Chr.)	2-9	günstig
Normalkaryotyp	15-33	intermediär

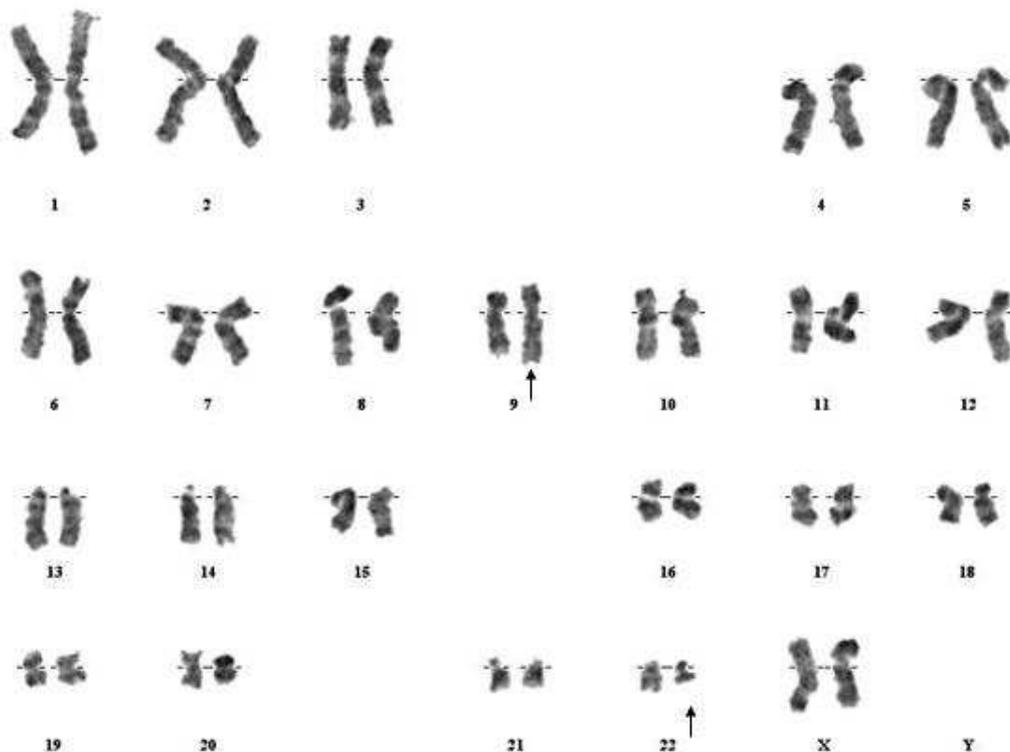
#### 1.4.1 Die Philadelphia-Translokation als spezifische Aberration der ALL

Eine spezifische Aberration bei der ALL ist die Philadelphia-Translokation. Sie kommt bei der ALL mit L1- oder L2-Morphologie, meistens zusammen mit dem B-Zell Phänotyp und in sehr seltenen Fällen mit dem T-Zell Phänotyp, vor. Bei erwachsenen ALL-Patienten hat sie eine Inzidenz von ca. 15-30% (Specchia et al. 2003). Sie wird bei Kindern deutlich seltener nachgewiesen (2-5%) (Forestier et al. 2000).

Das allgemein Philadelphia-Chromosom genannte derivative Chromosom 22 fällt bei der zytogenetischen Analyse leicht als Markerchromosom auf. Es ist durch eine Translokation zwischen den langen Armen je eines Chromosom 9 und 22 entstanden und wird nach ISCN-Kurzschrift durch den Ausdruck t(9;22)(q34;q11.2) dargestellt. Durch dieses Rearrangement werden zwei Gene, das aus 23 Exons bestehende *bcr*-Gen (lokalisiert auf Chromosom 22) und das aus 12 Exons bestehende *abl*-Gen (lokalisiert auf Chromosom 9) gesplittet, umgelagert und auf den Chromosomen 9 und 22 fusioniert. Die Genfusion (*bcr/abl*-Rearrangement/ 5'*bcr*//3'*abl* Hybridgen) auf Chromosom 22 ist das entscheidende pathogene Ereignis und führt zur Entstehung eines neuen hybriden Genes bzw. seines aberranten Proteins (Gotoh & Broxmeyer 1997). Der Bruchpunkt in *abl* ist im ersten Intron variabel über eine Region von 200 kb gestreut, dabei häufig zwischen den beiden alternativen Exons 1b und 1a, manchmal 5'-seitig von 1b oder 3'-seitig von 1a gelegen, aber immer 5'-seitig von Exon 2. Auf dem *bcr*-Gen sind nur zwei Bruchpunktvarianten bekannt: M-*bcr* (für major breakpoint cluster region) ist ein 5,8 kb großer Cluster zwischen den Exons 12 und 16 (oder auch b1 bis b5

von *M-bcr*). Die meisten Bruchpunkte liegen bei der Philadelphia-positiven ALL aber entweder zwischen b2 und b3 oder zwischen b3 und b4, in einer 35 kb großen Region zwischen den Exons 1 und 2 (im 3'-Bereich des ersten *bcr* Introns), *m-bcr* genannt (für minor breakpoint cluster region).

Das Ergebnis des *bcr/abl*-Rearrangements ist eine dauerhaft aktivierte und dysregulierte *abl*-Tyrosinkinase. Der pathogene Effekt der Proliferation dieses chimären Proteins liegt zum einen in einer Aktivierung von Genen, die die Zellproliferation stimulieren und zum anderen in einer Aktivierung von Genen, die die Apoptose inhibieren.



**Abbildung 2: Karyogramm mit klassischer Philadelphia-Translokation. Der Karyotyp lautet 46,XX,t(9;22)(q34;q11). Es liegen keine zusätzlichen Aberrationen vor. Die Pfeile kennzeichnen die aberranten Chromosomen 9 und 22.**

Bei ca. 3% der Fälle mit einem *bcr/abl*-Rearrangement sind verschiedene Abwandlungen von der klassischen Translokationsform möglich (Huret et al. 1986), die

auf molekularer Ebene zum gleichen Ergebnis führen, sich zytogenetisch jedoch abweichend darstellen.

- die variante Philadelphia-Translokation  $t(V;22)$ , bei der andere Chromosomen (V) als das Chromosom 9 als Translokationspartner zum Chromosom 22 zytogenetisch nachweisbar sind.

- die komplexe Philadelphia-Translokation  $t(V;9;22)$  bezieht zusätzlich zu den Chromosomen 9 und 22 noch ein drittes oder mehrere andere Chromosomen mit ein. Als der zusätzliche Translokationspartner "V" können fast alle Chromosomen beteiligt sein, am häufigsten beschrieben werden die Chromosomen 1, 5, 6, 7, 17 und 21.

- Eine maskierte Philadelphia-Translokation liegt vor, wenn bei Philadelphia-negativer ALL das *bcr/abl*-Rearrangement nachzuweisen ist. Hierbei stellt sich das Chromosom 22 zytogenetisch nicht als Philadelphia-Chromosom dar. Vielmehr scheint es zytogenetisch normal zu sein oder ist durch eine komplexe Translokation "verschleiert".

Patienten mit einer akuten lymphatischen Leukämie und einer  $t(9;22)(q34;q11)$  erhalten in der Regel eine Hochrisiko-Therapie. Dennoch zeigen sie bis heute einen ungünstigen Krankheitsverlauf und haben sowohl ein deutlich geringeres ereignisfreies Überleben als auch ein viel niedrigeres Gesamtüberleben im Vergleich zu den anderen Prognosegruppen der ALL. Das Langzeit-Erkrankungsfreie Überleben (EFS) dieser Patientengruppe liegt bei Erwachsenen kleiner zehn Prozent (Jabbour et al. 2005).

#### **1.4.2 Zusätzliche chromosomale Aberrationen bei Philadelphia-positiven ALL-Patienten**

Bei ALL-Patienten mit einer Philadelphia-Translokation sind in 50-80% der Fälle verschiedene sekundäre Veränderungen möglich (Heerema et al. 2004a), welche die klonale Evolution der aberranten Zellen widerspiegeln. Diese Patienten haben durchschnittlich ein höheres Lebensalter (Faderl et al. 2000). Die häufigsten zusätzlichen Veränderungen sind bei Erwachsenen ein zusätzliches Philadelphia-Chromosom [ $+der(22)t(9;22)$ ], eine Monosomie 7 ( $-7$ ), eine Verkürzung des langen Armes eines Chromosom 7 [ $del(7)(q)$ ], eine Trisomie 8 ( $+8$ ) sowie Deletionen des p-

Armes von Chromosom 9 (Johansson et al. 1994). Außerdem wird häufig ein hyperdiploider Karyotyp mit >50 Chromosomen gefunden (Rieder et al. 1996). Daneben gibt es weitere rekurrente Zusatzaberrationen, welche weniger häufig gefunden werden.

Darüber hinaus werden immer wieder zusätzliche Aberrationen nachgewiesen, die nicht rekurrent erscheinen und nicht in das übliche Schema passen. Sie können alleine oder zusätzlich zu bekannten Sekundäraberrationen der Philadelphia-Translokation vorkommen. Die prognostische Relevanz dieser Aberrationen ist in der Regel unklar. Es hat sich grundsätzlich gezeigt, dass eine Abhängigkeit zwischen der Anzahl der Zusatzaberrationen und der Krankheitsprogression besteht. So wurde inzwischen die Gruppe der Patienten mit komplexen Chromosomenaberrationen ( $\geq 3$  Veränderungen, mindestens eine davon strukturell) als prognostisch sehr ungünstige Subgruppe bei der ALL identifiziert, wohingegen Patienten mit hoch-hyperdiploiden bis nahezu tetraploiden Chromosomensätzen ohne strukturelle Aberrationen meistens eine günstigere Prognose haben (Secker-Walker et al. 1997; Ramos et al. 2000).

### ***1.5 Zielsetzung der Arbeit***

Die weiter oben beschriebenen Probleme und Überlegungen haben zu folgender Aufgabenstellung der vorliegenden Dissertation geführt:

Zur Gewinnung eines Patientenkollektivs sollten Zellen aus Knochenmark und peripherem Blut von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie zytogenetisch und molekularzytogenetisch untersucht werden. Nur Patienten mit einer Philadelphia-Translokation und mindestens einer Sekundäraberration sollten in das Kollektiv aufgenommen werden. Die zytogenetischen Befunde sollten innerhalb einer bereits bestehenden relationalen Datenbank gespeichert und das Kollektiv durch bereits existierende Befunde erweitert werden.

Um die in den ISCN-Karyotypen enthaltenen Metainformationen einer automatisierten Analyse zugänglich zu machen, sollte eine computerlesbare zytogenetische Notation auf Basis der ISCN 1995 entwickelt werden. Diese zytogenetische Notation sollte als Grundlage für eine vollständig automatisierte Analyse großer tumorzytogenetischer Datenbestände dienen. Damit eine qualitative und quantitative Analyse von ISCN-Karyotypen, die in die computerlesbare Notation umgewandelt wurden, ermöglicht wird, sollte an der Entwicklung einer entsprechenden Analyse-Software mitgewirkt werden.

Die computerlesbare zytogenetische Notation und die Analyse-Software sollte anhand eines ausreichend großen Beispieldatensatzes mit einem definierten Patientenkollektiv (ALL-Patienten mit einer Philadelphia-Translokation und mindestens einer Zusatzaberration) überprüft werden.

Darüber hinaus sollte eine qualitative und quantitative Analyse des Beispieldatensatzes im Hinblick auf die Detektion bisher unbekannter minimal rekurrenter Aberrationen und chromosomaler „hot spots“ von Rearrangements bei ALL-Patienten mit einer Philadelphia-Translokation und Zusatzaberration(en) erfolgen.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 *Entwicklung einer vereinfachten computerlesbaren zytogenetischen Notation*

#### 2.1.1 **Erstellung des Beispieldatensatzes**

Die persönlichen, klinischen und diagnostischen Daten aller im tumorgenetischen Labor Marburg zytogenetisch und molekularzytogenetisch untersuchten Patienten wurden in einer relationalen Datenbank, der so genannten Leukemia Cytogenetic Database (LCD), gespeichert. Auch die Befunde der von mir untersuchten Patienten wurden in die LCD übertragen. Als Grundlage für die LCD diente eine ACCESS-Datenbank (ACCESS 2000 Professional, Microsoft Corporation). Bei einer ACCESS-Datenbank handelt es sich um eine relationale Datenbank, in der die Verknüpfung von Tabellen und somit eine gemeinsame Nutzung von Datensätzen möglich ist. Die LCD bestand aus einer Haupttabelle, welche die Stammdaten der Patienten sowie zusätzliche klinische Daten enthielt, sowie aus zusätzlichen Hilfstabellen, in denen z.B. die Ergebnisse der molekularzytogenetischen Analysen gespeichert wurden. Die Haupttabelle und Hilfstabellen waren über die Patientenummer als gemeinsames Datenfeld relational verknüpft. Ergänzt wurde die LCD durch kleine Hilfsprogramme zur Datenauswertung oder in Kombination mit einem Schreibprogramm zum Schreiben von Befundbriefen. Bei dem Entwurf einer Tabelle in ACCESS wird die jeweilige Art des Datenformates eines Datenfeldes festgelegt (als Zahl, Datum, ja/nein, Freitext, etc), so dass bei der Dateneingabe und bei späteren Datenbank-Abfragen ein bestimmtes Schema eingehalten werden muss, um zu einem Ergebnis zu kommen. So kann gewährleistet werden, dass bei einer Abfrage nur alle eindeutigen Datensätze berücksichtigt werden. In ACCESS besteht die Möglichkeit eine Abfrage durch einen Abfrage-Assistenten oder über einen SQL-Code zu erstellen. Durch Abfragen nach beliebigen Kriterienkombinationen konnten aus den zum Zeitpunkt meiner Arbeit vorliegenden ca. 2500 Datensätzen der LCD neue Tabellen mit selektierten Datensätzen erstellt werden. So konnte die computerlesbare zytogenetische Notation (SCCN) und die SCCN-Analysesoftware während ihrer Entwicklung anhand von unterschiedlichen zytogenetischen Datensätzen überprüft werden, welche alle möglichen Varianten an ISCN-Karyotypen enthielten. Um einen ausreichend großen Beispieldatensatz zu erhalten, wurden die Daten der von mir analysierten Patienten sowie zusätzlicher

Patienten, die den geforderten Kriterien entsprachen, durch eine gezielte Datenbankabfrage aus der LCD extrahiert. Auf diese Weise wurde eine neue Tabelle erstellt, welche die Daten des Patientenkollektivs enthielt, das als Beispieldatensatz für die automatisierte Analyse der zytogenetischen Daten dienen sollte. Zur Erstellung einer Tabelle mit dem für diese Arbeit benötigten Beispieldatensatz wurden folgende Felder der so genannten Haupttabelle abgefragt:

<u>Feldname</u>	<u>Inhalt</u>
FALL_NR	enthält eine fortlaufende Labornummer nach dem Schema Laborkennziffer, Bindestrich, Jahreszahl, fortlaufende vierstellige Nummer, Freitext mit maximal 10 Feldern
NAME	Patientennachname als Freitext mit maximal 30 Feldern
VORNAME	Patientenvorname als Freitext mit maximal 20 Feldern
GEBURTSDAT	Datum nach dem Schema TT.MM.JJ
SEX	Geschlecht des Patienten: m = männlich/ w = weiblich als Freitext mit 1 Buchstaben
AGE	Alter des Patienten bei Probenentnahme als Dezimalzahl
KLINDIAGN	enthält eine Abkürzung für die klinische Diagnose als Freitext (z.B. ALL für akute lymphatische Leukämie) mit maximal 40 Feldern
CYT_DIAGN	enthält die Kennung für Erstdiagnose (ED) oder Verlauf (VL) als Freitext
KONSTKARYO	der konstitutionelle Karyotyp des Patienten nach gültiger ISCN als Freitext
MODALCHROM	modale Chromosomenzahl der aberranten Mitosen als Dezimalzahl
KLONE	Anzahl der nachgewiesenen Klone als Dezimalzahl
KARYOTYPK1	Karyotyp nach gültiger ISCN des Klon 1 als Freitext mit maximal 255 Feldern
AUSGEW_K1	Anzahl der für diesen Klon analysierten Mitosen als Dezimalzahl
AUSGEW_K2 bis K4	Wie K1 analog für die Karyotypen der Klone 2 bis 4

### 2.1.2 Vorüberlegungen zur Entwicklung einer SCCN

Bei der Entwicklung einer computerlesbaren zytogenetischen Notation auf Basis der ISCN 1995 und entsprechender Analyseprogramme wurden mehrere Ziele formuliert:

- Die SCCN sollte die schnelle Analyse aller ganz-chromosomalen numerischen Aberrationen innerhalb einer Datensammlung ermöglichen;
- die in den ISCN-Karyotypen enthaltene Metainformation über Zugewinn und Verlust chromosomalen Materials aufgrund unbalancierter struktureller Veränderungen bzw. Zugewinnen derivativer Chromosomen sollte in einer für die Leukämiezytogenetik adäquaten Bandenauflösung verfügbar gemacht werden;
- die SCCN sollte so beschaffen sein, dass eine Erfassung der involvierten Chromosomen, Bruchpunkte und die Art der Aberration bei strukturellen Aberrationen erfassbar werden, so dass bei der Analyse einer Datensammlung so genannte „hot spots of rearrangements“ bzw. über- und unterrepräsentierte Arten struktureller Aberrationen durch Aufsummierung der Analyseergebnisse detektierbar werden;
- die SCCN sollte eine separate Erfassung fraglicher bzw. fehlerhafter Datensätze ermöglichen, so dass diese nicht in das Analyseergebnis eingehen bzw. diese einer möglichen Überarbeitung zugänglich zu machen;
- die zu entwickelnden SCCN-Analyseprogramme sollten eine getrennte Darstellung der Ergebnisse nach Zugewinnen und Verlusten sowie nach strukturellen Aberrationen liefern. Das Gesamtergebnis der Analyse einer Datensammlung sollte dabei durch die Aufsummierung der Einzelergebnisse pro Chromosom erfolgen. Die Darstellung der Analyseergebnisse sollte sowohl in tabellarischer Form (um sie einer weiteren computergestützten Bearbeitung zugänglich zu machen) als auch in grafischer Form erfolgen.

Um diese Ziele zu erreichen war es am sinnvollsten, die in den ISCN-Karyotypen der pro Patient vorkommenden Klone enthaltene Information in ihre quantitativen (Verlust und Zugewinn von chromosomalem Material) und qualitativen Bestandteile (an welchem Bruchpunkt fand welche Aberration statt) aufzuspalten. Diese Elemente

sollten fallbezogen in einer schon bestehenden Patienten-Datenbank in zwei getrennten Datenfeldern gespeichert werden. Zu diesem Zweck wurde die bestehende Patienten-Datenbank LCD um zwei Datenfelder erweitert:

NUMABERRAT	enthält den SCCN-Code für quantitative Aberrationen als Freitext mit maximal 255 Feldern
STRABERRAT	enthält den SCCN-Code für qualitative Aberrationen als Freitext mit maximal 255 Feldern

Nach diesem Schritt war es erforderlich den Aufbau des qualitativen und quantitativen SCCN-Strings zu entwickeln. Zu diesem Zweck lag es nahe, bestimmte Elemente der ISCN mit Ausdrücken, die bei der Programmierung verwendet werden, zu verknüpfen. Die Grundstruktur der SCCN kristallisierte sich dabei schnell heraus. Es wurden jedoch verschiedene Variationen der SCCN-Strings entworfen und mit den parallel entwickelten Analyseprogrammen auf ihre Computerlesbarkeit hin überprüft. Insbesondere wurde immer wieder getestet, ob ein fehlerfreies Analyseergebnis erzielt werden konnte. Hierzu wurde jeweils anhand von Testdatensätzen, die sämtliche möglichen Chromosomenaberrationen enthielten, parallel zu einer Analyse mit der SCCN-Software eine vollständig manuelle Analyse durchgeführt.

### **2.1.3 Beschreibung der im SCCN-String verwendeten Zeichen und Kürzel**

Um eine Eindeutigkeit und somit Computerlesbarkeit der in „NUMABERRAT“ und „STRABERRAT“ enthaltenen SCCN-Datenstrings zu gewährleisten, war die Verwendung spezifischer Zeichen und deren definierte Anordnung im Datenstring notwendig. Diese sind zum Teil durch die ISCN vorgegeben, zum Teil Ausdrücke, die bei einer Programmierung verwendet werden. Im Folgenden werden die in der SCCN enthaltenen Zeichen, Zahlen und Kürzel beschrieben:

Damit die Analyseergebnisse einem spezifischen Chromosom zugeordnet werden können, werden die Zahlen 0-9 (für die Beschreibung der Chromosomen 1 bis 22) bzw. die Buchstaben X und Y verwendet.

Für die Unterteilung in kurzen oder langen Chromosomenarm werden analog zur ISCN die Buchstaben p und q verwendet. Kommata („ , “) und runde Klammern „( )“ dienen zur Unterteilung des SCCN-Strings bzw. bilden seine Start- und Endpunkte. Zur Beschreibung von Zugewinnen oder Verlusten wurden das Plus- („,+“) und

Minuszeichen („-“) in den String aufgenommen. Darüber hinaus wurden das in der ISCN-Nomenklatur verwendete Fragezeichen („?“) zur Beschreibung ungesicherter Aberrationen sowie das Multiplikationszeichen („x“) übernommen. Zur Definition der Aberrationen werden die in Tabelle 4 aufgeführten ISCN-spezifischen Abkürzungen (Kurzschrift) verwendet.

**Tabelle 4: Liste der ISCN-Kürzel für strukturelle Veränderungen, welche für die Entwicklung des qualitativen SCCN-String verwendet wurden.**

<b>balancierte Aberration</b>	<b>unbalancierte Aberration</b>
t (Translokation)	i (Isochromosom)
inv (Inversion)	del (Deletion)
ins (Insertion)	der (Derivativchromosom)
	dic (Dizentrisches Chromosom)
	idic (Isodizentrisches Chromosom)
	add (Addition)
	dup (Duplikation)
	trp (Triplikation)
	qdp (Quadruplikation)
	ider (Isoderivativchromosom)
	psu dic (Pseudodizentrisches Chromosom)
	r (Ringchromosom)
	mar (Markerchromosom)

#### 2.1.4 Aufbau des SCCN-String

Um eine Computerlesbarkeit zu erreichen, war es notwendig den SCCN-String nach definierten Regeln aufzubauen. Diese werden im Folgenden näher erläutert:

Wenn in einem ISCN-Karyotyp nur ein spezifisches Ereignis dokumentiert wurde, kann der String aus einem einzelnen Ausdruck bestehen, der durch ein Komma beendet wird. Liegen dagegen mehr als ein Aberrationsereignis vor, besteht ein String aus mehreren Einzelausdrücken, die in definierter Reihenfolge aneinandergereiht werden.

Dabei wird die Zahl (1 bis 22) für das jeweils betroffene Chromosom von runden Klammern eingefasst. Durch die Klammern wird der Anfang und das Ende einer Chromosomenbezeichnung definiert. Die von einer Aberration betroffenen Banden

werden ebenfalls mit runden Klammern eingefasst. Subbanden werden hierbei im Gegensatz zur ISCN-Nomenklatur nicht durch einen Punkt abgetrennt.

Dem Ausdruck für das betroffene Chromosom oder –bande wird jeweils ein Plus- oder Minuszeichen bzw. ein ISCN-Ausdruck vorangestellt.

Einzelne Ausdrücke, die ein qualitatives oder quantitatives Aberrationsereignis beschreiben, werden mit einem Komma beendet, welches den Endpunkt dieses Einzelausdrucks definiert. Zwischen den einzelnen Ausdrücken und innerhalb eines Einzelausdrucks darf kein Leerzeichen stehen. Ein Leerzeichen (= Fehlen eines Zeichens) definiert das Ende eines Strings. Eine schematische Beschreibung des SCCN-Strings sowie erklärende SCCN- und ISCN-Beispiele sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Die für den SCCN-String verwendeten Banden und Subbanden beziehen sich auf eine Auflösung von 400 bphs.

**Tabelle 5: Schematischer Aufbau der SCCN, Translationsregeln und erklärende ISCN-Beispiele.**

Symbolische Beschreibung		Beispiele	
Nr	String <sup>a</sup>	ISCN-Karyotyp	SCCN-String
<b>quantitative Veränderungen</b>			
1	$\Delta(A),\Delta(B),$	48,XY,+8,+9	+(8),+(9),
2	$(A)\Delta(xayb),$	46,XX,del(1)(q32)	(1)-(q32q44),
3	$(A)\Delta(xayb),$	46,XY,dup(12)(p11p13)	(12)+(p13p11),
4	$(A)\Delta(xayb),$	46,XX,dup(2)(q11~21q35)	(2)+(q11q35),
5	$(A)\Delta(xa)x2,$	46,XY,add(15)(q26)x2	(15)-(q26)x2,
6	$(A)\Delta(xa),(B)\Delta(xayb),$	47,XX,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)	(9)+(q34),(22)+(p13q112),
7	$(A)\Delta(xa),\Delta(B),$ $(B)\Delta(xayb),$	47,XY,+22,der(22)t(9;22)(q34;q11)	(9)+(q34),+(22),(22)- (q112q13),
8	$(A)\Delta(xa)x2,(B)\Delta(xayb),$ $(B)\Delta(yaxb),$	47,XX,der(22)t(9;22)(q34;q11), +der(22)t(9;22)(q34;q11)	(9)+(q34)x2,(22)-(q112q13), (22)+(p13q112),
9	$(A)\Delta(xayb),(A)\Delta(ybxa),$	46,XY,idic(16)(q22)	(16)-(q22q24),(16)+(p133q22),
<b>qualitative Veränderungen</b>			
10	$\nabla(A)(xa),$	46,XX,del(1)(q32)	del(1)(q32),
11	$\nabla(A)(xayb),$	46,XX,add(1)(q42~43)	add(1)(q42q43),
<b>fragliche Veränderungen</b>			
12	$+?(A)$	47,XX,+?8	+?(8),
13	$(A)\Delta(x?ayb),$	46,XX,dup(2)(q2?1q35),	(2)+(q2?1q35),

<sup>a</sup>  $\Delta$  = Pluszeichen (+) oder Minuszeichen (-); A, B = Chromosomen; x, y = p- bzw. q-Arm; a, b = Chromosomen-Bande oder Subbande;  $\nabla$  = ISCN-Kürzel für den Typ des Rearrangements

### **2.1.5 Beschreibung des quantitativen SCCN-Strings**

Zur Beschreibung von Zugewinnen und Verlusten wird das aus der ISCN-Nomenklatur bekannte Plus- und Minuszeichen verwendet. Bei Zugewinnen bzw. Verlusten ganzer Chromosomen werden „+“ oder „-“ dem in runden Klammern enthaltenen Chromosom vorangestellt und der String mit einem Komma beendet. Zur Beschreibung von Zugewinnen und Verlusten einzelner Chromosomenabschnitte durch unbalancierte strukturelle Veränderungen bzw. Zugewinn eines derivativen Chromosoms beginnt der SCCN-String mit dem involvierten Chromosom. Anschließend folgt ein Plus- oder Minuszeichen zur Kategorisierung der Aberration in Zugewinn oder Verlust. Danach folgt die Angabe der beteiligten Chromosomenabschnitte bzw. -banden. Im Anschluss an die Eröffnungsklammer folgt das Zeichen p oder q als Bezeichnung für die Lage der Bande auf dem kurzen oder langen Chromosomenarm und dann die Bandenbezeichnung. Falls die numerische Veränderung nur eine Bande betrifft, folgt direkt nach der Bandenbezeichnung eine Endklammer. Wenn mehr als eine Chromosomenbande hinzugewonnen oder verloren wurde, werden übergangslos die jeweiligen Start- und Endbanden des Chromosomenabschnitts aufgeführt. Abschließend folgen die Endklammer und dann ein Komma zur Beendigung des Strings. Sowohl eine gleichzeitige Beteiligung von p- und q-Arm als auch die Beschränkung der numerischen Veränderungen auf nur einen Chromosomenarm können dargestellt werden. Die Schreibrichtung ist hierbei von p-terminal nach q-terminal. Wenn dieselben Chromosomenbanden mehrfach hinzugewonnen oder verloren wurden, wird dieses mittels eines Multiplikationszeichens und der Anzahl der Kopien im direkten Anschluss an die Endklammer der Bandenbezeichnung des Strings dargestellt. Falls eine weitere komplette numerische oder unbalancierte Veränderung vorliegt, folgt diese unmittelbar nach dem abschließenden Komma des vorangegangenen Strings. Folgt in diesem Datenfeld kein definiertes Zeichen mehr (z.B. Leerzeichen oder unbekanntes Zeichen), ist dies die Definition für die Beendigung des Lesevorgangs in diesem Feld.

### **2.1.6 Beschreibung des qualitativen SCCN-Strings**

Der qualitative SCCN-String ist ähnlich aufgebaut wie der quantitative Datenstring: An erster Stelle steht ein ISCN-Kürzel für die Art der strukturellen Veränderung. Hierbei wurden, wie weiter oben erläutert, die Abkürzungen der kurzen ISCN-Schreibweise weitgehend übernommen. Direkt nach der Angabe des Aberrations-

Kürzels folgt die von runden Klammern eingefasste Zahl (1 bis 22) für das von der Aberration betroffene Chromosom. Eine sofort nachfolgende Klammer umschließt die Angabe des Bruchpunktes auf Banden- bzw.- Subbandenniveau. Auch im qualitativen String werden die Subbanden ohne trennenden Punkt direkt an die Bandenangabe angefügt. Falls im ISCN-Karyotyp keine bandengenaue Angabe sondern mehrere mögliche Banden angegeben wurden (Angabe eines Bandenbereichs gekennzeichnet durch das Zeichen Tilde „~“), werden übergangslos die jeweiligen Anfangs- und Endbanden des Bandenbereichs aufgeführt. Ein abschließendes Komma beendet einen Einzelausdruck. Sollte dieselbe Aberration mehrfach am selben Bruchpunkt vorkommen, wird dieses durch ein Multiplikationszeichen im direkten Anschluss an die Endklammer eines Einzelausdrucks dargestellt. Falls im zu übersetzenden Karyotyp weitere Bruchpunkte von einem Rearrangement betroffen sind, werden diese übergangslos an das abschließende Komma des vorangegangenen Strings angefügt. Folgt in diesem Datenfeld kein definiertes Zeichen mehr (d.h. ein Leerzeichen oder unbekanntes Zeichen liegt vor), ist das Zeichen zur Beendigung des Lesevorgangs in diesem Feld.

### **2.1.7 Regeln für die Translation von ISCN zu SCCN**

Bei der Übersetzung eines ISCN-Karyotyps in den SCCN-String müssen nachfolgend aufgeführte Regeln zwingend berücksichtigt werden, damit eine fehlerfreie Analyse erfolgen kann:

- Der SCCN liegt eine Bandenauflösung von 400 bphs zugrunde, daraus folgt ein Anteil an möglichen Bruchpunkten von 396 Banden und Subbanden (Übersicht siehe Ideogramm-Karyogramm im Anhang).
- Bei einem Bruchpunkt im Zentromer eines Chromosoms wird analog zur ISCN 1995 die Bezeichnung p10 bzw. q10 verwendet.
- Analog zur ISCN 1995 wird bei der Translation in den SCCN-String die Reihenfolge Gonosomen X und Y gefolgt von den Chromosomen 1 bis 22 beibehalten.
- Die Reihenfolge der im SCCN-String angegebenen Banden führt vom Telomer des p-Arms zum Telomer des q-Arms eines Chromosoms.
- Bei einem Zugewinn oder Verlust von Chromosomenstücken wird sowohl die Anfangs- als auch die Endbande angegeben. Wenn im ursprünglichen Karyotyp hierzu keine Subbanden angegeben wurden, wird sowohl für den Anfangs- als auch Endpunkt

die Subbande berücksichtigt, die das größtmögliche Chromosomensegment begrenzt. Es kann dabei sowohl die Hauptbande als auch die jeweils abschließende Subbande im String aufgeführt werden, da bei der Analyse automatisch die abschließenden Subbanden auf 400 bphs-Niveau berücksichtigt werden. Wenn eine bestimmte Subbande, die dem 400 bphs-Niveau entspricht, im ISCN-Karyotyp angegeben wurde, wird diese als Bruchpunkt in den SCCN-String übernommen und nur diese bei der anschließenden Analyse als Bruchpunkt berücksichtigt.

- Ist bei einer spezifischen Aberration eine Subbande als Bruchpunkt aufgrund von Literaturdaten bekannt, wurde aber im ursprünglichen Karyotyp nicht angegeben, wird bei der manuellen Translation die Subbande im SCCN-String mit angegeben (z.B. Philadelphia-Translokation q112 statt q11).

- Bei Zugewinn oder Verlust eines Chromosomensegments, welches sich über mehrere Banden erstreckt, muss nicht jede Bande einzeln, sondern nur jeweilige die Start- und Endbande aufgeführt werden.

- Wurde im ursprünglichen Karyotyp ein Chromosomenbereich, der sich über mehrere Banden erstreckt, als fakultativer Bruchpunkt angegeben (gekennzeichnet durch „~“), wird dieser vollständig in den qualitativen SCCN-String überführt, so dass jeder mögliche Bruchpunkt als gleichwertig betrachtet und in der anschließenden Analyse mitgezählt wird. Analog dazu wird auch für den quantitativen SCCN-String verfahren, so dass hierbei jede fakultative Bande gleichwertig als hinzugewonnen oder verloren mitgezählt werden kann.

- Jede Veränderung, die aufgrund einer klonalen Evolution sowohl im Hauptklon als auch in den Subklon(en) vorkommt, wird sowohl für den qualitativen als auch für den quantitativen SCCN-String nur einmal gezählt, es sei denn eine Aberration liegt im Subklon in abweichender Anzahl zum Hauptklon vor.

- Im quantitativen SCCN-String werden nur Netto-Zugewinne und -Verluste d.h. tatsächliche Zugewinne und Verluste chromosomalen Materials aufgeführt. Bei einem Rearrangement unter Beteiligung von mehr als zwei Chromosomen und Derivatvchromosomen wird bei der Translation überprüft, ob tatsächlich chromosomale Imbalancen entstanden sind. Dagegen werden im qualitativen String alle im ursprünglichen Karyotyp vorkommenden verschiedenen Aberrationen und betroffenen Bruchpunkte berücksichtigt.

### **2.1.8 Übersetzung der ISCN-Karyotypen des Beispieldatensatzes in den SCCN-String**

Nach erfolgreicher Entwicklung und erfolgter Überprüfung der SCCN wurden die ISCN-Karyotypen des in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektivs manuell in den SCCN-Datenstring umgewandelt. D.h. ich übersetzte sämtliche ISCN-Karyotypen direkt in den qualitativen und quantitativen SCCN-String. Dabei wurden die Inhalte der Karyotypen 1 bis 4 zu jeweils einem SCCN-Datensatz innerhalb der Datenfelder „NUMABERRAT“ und „STRABERRAT“ zusammengefasst und von Hand eingetragen.

### **2.1.9 Analyse-Software**

Die Analyse-Software wurde entsprechend folgender Anforderungen programmiert:

- Die Analyse qualitativer und quantitativer Chromosomenveränderungen sollte getrennt erfolgen können.
- Die Analysen sollten für jedes Chromosom einzeln erfolgen können.
- Die in einer Datensammlung vorkommende Gesamtmenge an Aberrationen sollte durch Aufsummierung der Einzelaberrationen pro Chromosom und Bruchpunkt ermittelt werden. Die für die einzelnen Chromosomen und Bruchpunkte ermittelten Ergebnisse sollen dazu in getrennten Ergebnistabellen gesammelt werden bzw. für jedes Chromosom getrennt in grafischer Weise dargestellt werden. Fehlerhafte oder fragliche Daten sollten ebenfalls für getrennt für jedes Chromosom in einer zusätzlichen Tabelle gesammelt werden.
- Damit die Herkunft der gefundenen Daten sowie mögliche Fehlerquellen für den Anwender zurückverfolgbar sind, sollte in einer (temporären) Ergebnistabelle zusätzlich zur ermittelten Aberration die betreffende Fall-Identifikationsnummer und der Originalkaryotyp aufgeführt werden. Die Tabellen, welche die Ergebnisse der qualitativen und quantitativen Analysen sowie die fraglichen SCCN-Strings enthalten, sollten einer möglichen weiteren computergestützten Bearbeitung zur Verfügung stehen. Zu diesem Zweck sollte für diese Tabellen eine Exportfunktion ermöglicht werden.
- Damit der Anwender auffällige Analyseergebnisse mit einem Blick erfassen kann, sollten diese in Form eines in zytogenetischen Publikationen gängigen

Balkendiagramms grafisch dargestellt werden. Hierfür wurde zur besseren Anschauung ein nach 400 bphs aufgelöstes Ideogramm des jeweils analysierten Chromosoms gewählt. Die Summe der Aberrationen, die für eine Bande bzw. Bruchpunkt ermittelt wurde, sollte in Form eines an der jeweiligen Bande orientierten Balkens ablesbar sein. Je nach Höhe des Ergebnisses sollte dieser Balken kürzer oder länger und die Ergebnisse für die einzelnen Banden im Verhältnis zueinander unterschiedlich lang sein, so dass eine Akkumulation von Ereignissen auf einer oder mehreren Banden sofort auffallen kann. Die grafische Darstellung sollte getrennt für die einzelnen Chromosomen und getrennt nach qualitativer und quantitativer Analyse erfolgen. Darüber hinaus sollte der jeweils erreichte Minimal- und Maximalwert aufgeführt werden, damit die jeweilige Balkenlänge beurteilt werden kann.

Unter Berücksichtigung oben genannter Vorgaben wurden verschiedene Module programmiert („numerical analysis“ und „structural analysis“, siehe Abbildung im Anhang), um das jeweilige Analyse-Programm in die Lage zu versetzen die Einzelstrings abzulesen und in die Ergebnisse den entsprechenden Tabellen zuzuordnen. In diesen Modulen, die in der Sprache Visual Basic for Applications (VBA) programmiert wurden, sind die Anleitungen für die Erkennung eines Datenstrings programmiert. Sie enthalten zudem Hilfstabellen, die den Programmen zum Vergleich des SCCN-Strings mit den definierten Banden, Kürzeln und Zeichen dienen. In diesen Hilfstabellen sind alle nach der 400 bphs Auflösung möglichen (Sub-) Banden, Aberrationskürzel und Chromosomen enthalten. In einem eigenen Verzeichnis wurden zusätzliche Grafikelemente gespeichert, die die einzelnen Ideogramme in Form von Bilddateien im Bitmap-Format (\*.bmp) enthalten. Auf diese Grafiken greifen die Programme zu, um die Rechenergebnisse grafisch darzustellen. Außerdem wurde ein Modul geschrieben, welches die Ergebnisdarstellung in Form unterschiedlich langer farbiger Balken ermöglicht.

Die Analyse-Software wurde so programmiert, dass sie den Datenstring Zeichen für Zeichen abarbeitet, d.h. im Anschluss an einen bestimmten Ausdruck im String einen weiteren definierten Ausdruck erwartet, diesen findet und das Ergebnis in eine zeitgleich erstellte Ergebnis- oder Fehlertabelle wegschreibt. Wenn in einem Datenfeld kein definiertes Zeichen mehr folgt, ist dies das Zeichen für das Programm in das nächste Datenfeld zu springen, um dort weiterzusuchen oder die Suche zu beenden, falls

in der untersuchten Tabelle kein weiteres Datenfeld mehr folgt. Wenn ein Fragezeichen, ein Fehler in der SCCN-Logik oder ein unbekanntes Zeichen gefunden werden, werden diese in der Fehlertabelle gesammelt und stehen so der Kontrolle des Anwenders zur Verfügung.

## 2.2 Das Patientenkollektiv des Beispieldatensatzes

### 2.2.1 Zytogenetische Charakteristika der Patienten

Im Durchschnitt wurden 16 aberrante Mitosen pro Patient karyotypisiert, der Mittelwert für Klon 1 lag bei 19,3 Mitosen, für Klon 2 bei 11,7 Mitosen und für Klon 3 bei 8,8 Mitosen. Pro Patient wurden maximal drei verschiedene aberrante Klone gefunden. Bei 50 Patienten lagen t(9;22) und Zusatzaberration(en) in nur einem aberranten Klon vor (53,2% der Patienten), 38 Patienten wiesen zwei aberrante Klone (40,4% der Patienten) auf und lediglich sechs Patienten (6,4% der Patienten) hatten drei aberrante Klone. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Geschlecht und Anzahl der Klone ist nicht feststellbar (siehe Tabelle 6).

**Tabelle 6: Anzahl der vorhandenen Zellklone innerhalb des Patientenkollektivs aufgeschlüsselt nach dem Geschlecht der Patienten**

Klonanzahl	gesamt/%	männlich/%	weiblich/%
1	50/53,2	31/55,4	19/50,0
2	38/40,4	21/37,5	17/44,7
3	6/6,4	4/7,1	2/5,2
Gesamt	94/100	56/100	38/100

Wenn die Anzahl der Klone über das Patientenalter aufgeschlüsselt wird (siehe Tabelle 7), zeigt sich, dass in der Gruppe  $\geq 60$  Jahre signifikant weniger Patienten die Veränderungen in nur einem Klon aufweisen als in allen anderen Gruppen und auch als im Durchschnitt aller Patientengruppen. Dafür zeigt diese Gruppe den größten Anteil an Patienten mit zusätzlichen Veränderungen in zwei aberranten Klonen. In der Gruppe der 20- bis 29-jährigen findet sich dagegen der größte Anteil an Patienten mit nur einem aberranten Klon und mit dem kleinsten Anteil an Patienten mit zwei Klonen.

**Tabelle 7: Anzahl der vorhandenen Zellklone innerhalb der Patientengruppe aufgeschlüsselt nach dem Alter der Patienten.**

Alter/(Anzahl Patienten)	Klon 1	Klon 2	Klon 3
<20 J (5)	60% (3)	40% (2)	-
20-29 J (9)	78% (7)	11% (1)	11% (1)
30-39 J (20)	55% (11)	40% (8)	5% (1)
40-49 J (20)	55% (11)	35% (7)	10% (2)
50-59J (20)	55% (11)	40% (8)	5% (1)
>= 60 (20)	35% (7)	60% (12)	5% (1)
Durchschnitt	(56,3)	37,7%	6%

Am häufigsten hatten die Karyotypen modal 46 Chromosomen (21 Patienten, siehe Abbildung 3) gefolgt von modal 45 (19 Patienten) und modal 47 Chromosomen (16 Patienten). In verschiedene Ploidiegruppen unterteilt (Ploidiegruppen der GMALL-Studie: hypodiploid <46, pseudodiploid 46, hyperdiploid 47-50, hoch-hyperdiploid >50) hatte jedoch die größte Patientengruppe einen hyperdiploiden Karyotyp (32 Patienten hatten einen hyperdiploiden Chromosomensatz mit modal 47-50 Chromosomen). Je 21 Patienten hatten einen pseudodiploiden Karyotyp mit der Modalzahl 46 und einen hypodiploiden Karyotyp mit modal 44-45 Chromosomen. Einen hoch-hyperdiploiden Chromosomensatz von modal 51-59 Chromosomen hatten 19 Patienten. Bei einem Patienten wurde modal ein nahezu triploider Chromosomensatz mit 73 Chromosomen nachgewiesen (siehe dazu Abbildungen 3 und 4).

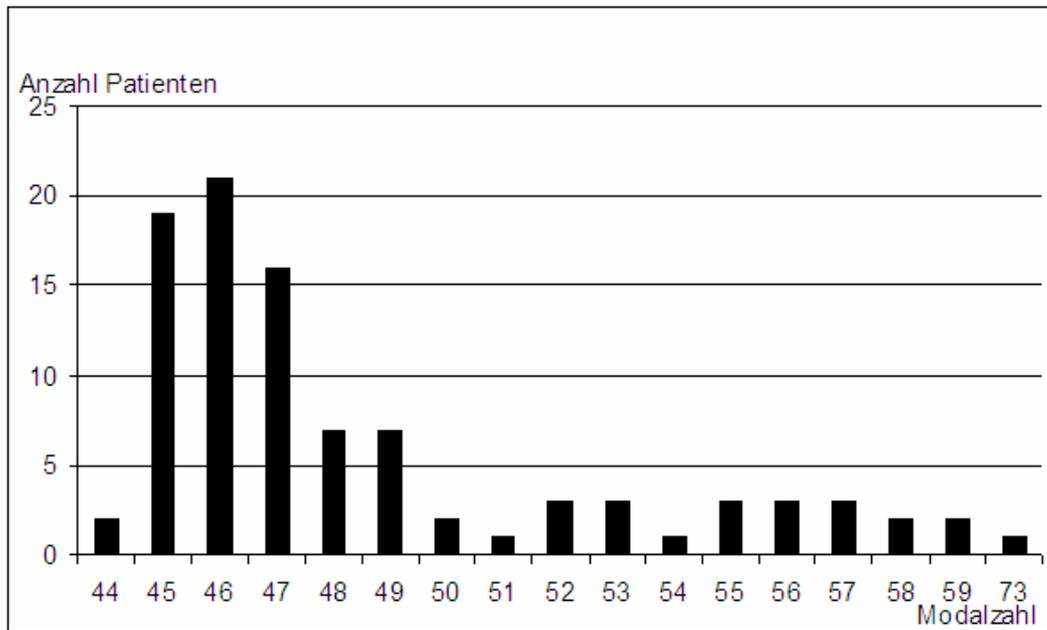


Abbildung 3: Anzahl der Patienten und mögliche Modalzahlen der Klone.

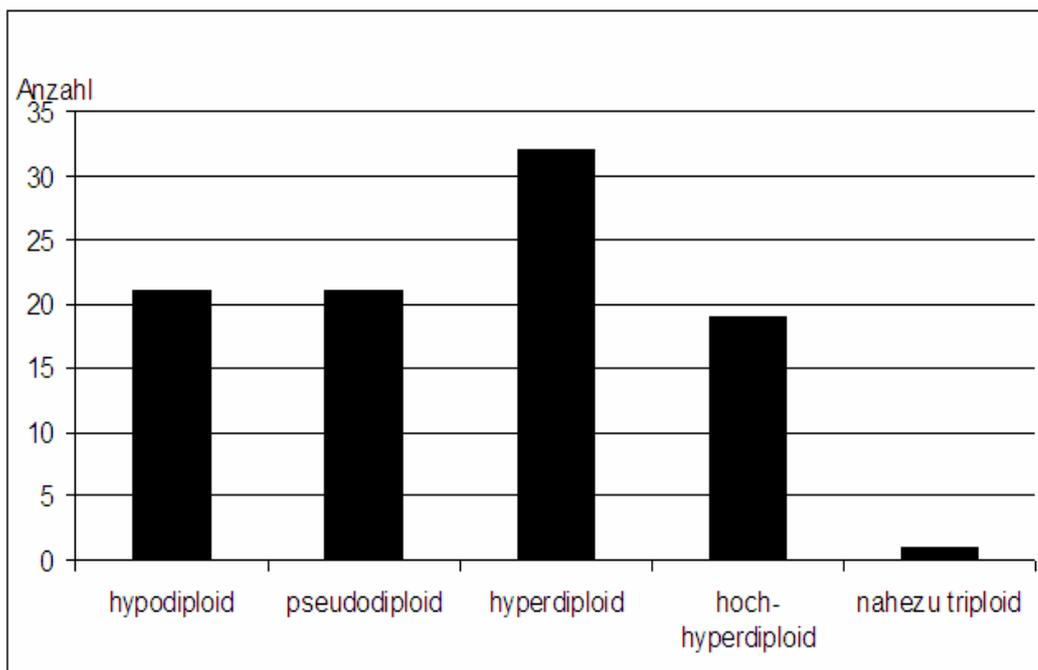
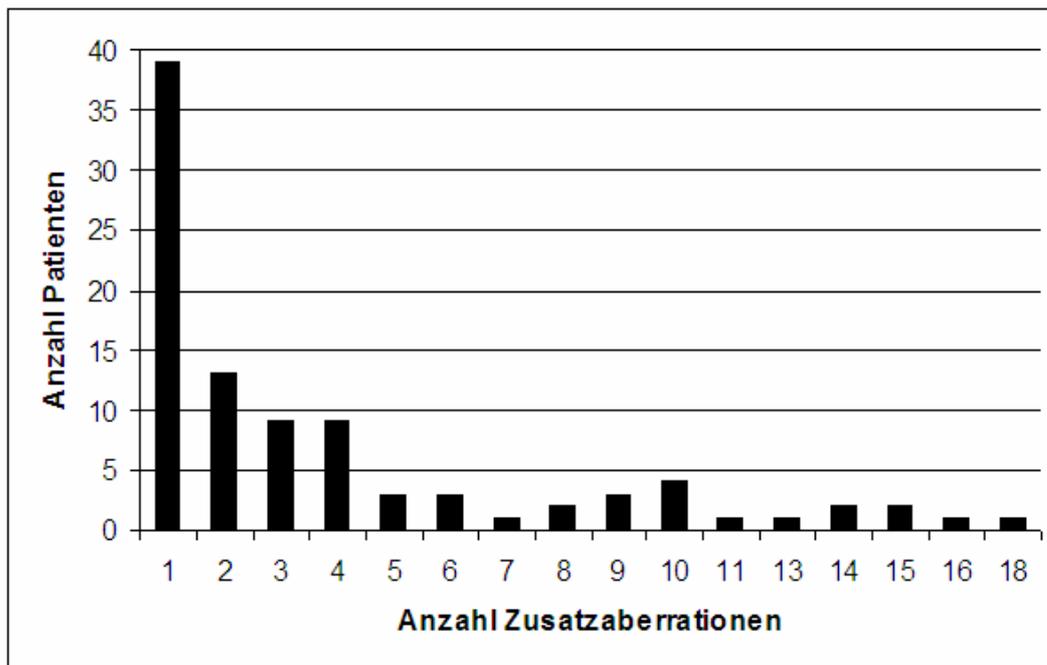


Abbildung 4: Anzahl der Patienten nach GMALL-Ploidiegruppen aufgeschlüsselt.

Am häufigsten wurde zusätzlich zur Philadelphia-Translokation nur eine weitere Aberration nachgewiesen (39 Patienten). Zwei zusätzliche Veränderungen fanden sich bei dreizehn Patienten. Jeweils neun Patienten hatten drei bzw. vier zusätzliche Aberrationen sowie vier Patienten hatten 10 Zusatzaberrationen; je drei Patienten hatten fünf, sechs bzw. neun weitere Veränderungen. Je zwei Patienten hatten acht, vierzehn oder fünfzehn Zusatzaberrationen und je ein Patient wies sieben, elf, dreizehn, sechzehn bzw. achtzehn weitere Veränderungen auf (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5: Anzahl der Patienten mit unterschiedlich vielen Zusatzaberrationen**

Wenn die Anzahl an Zusatzaberrationen für jede der sechs Altersgruppen einzeln aufgetragen wird (siehe Tabelle 8), zeigt sich, dass nicht nur auf das Gesamtkollektiv gesehen die meisten Patienten nur eine Zusatzaberration zur  $t(9;22)(q34;q11)$  hatten, sondern dieses auch innerhalb jeder Altersgruppe gilt. Eine Ausnahme bildet dabei die Gruppe der Unter-zwanzigjährigen, in der jedoch die wenigsten Patienten vertreten sind. Diese zeigen einen gegenüber dem Durchschnitt erhöhten prozentualen Anteil an Patienten mit mehr als vier Zusatzaberrationen.

**Tabelle 8: Anzahl der Zusatzaberrationen (ZA) aufgeschlüsselt nach dem Alter der Patienten**

Alter/(Anzahl Patienten)	1 ZA	2 ZA	3-4 ZA	> 4 ZA
< 20 (5)	20% (1)	20% (1)	-	60% (3)
20-29 (9)	56% (5)	11% (1)	-	33% (3)
30-39 (20)	40% (8)	5% (1)	35% (7)	20% (4)
40-49 (20)	35% (7)	20% (4)	20% (4)	25% (5)
50-59 (20)	55% (11)	10% (2)	15% (3)	20% (4)
>= 60 (20)	35% (7)	20% (4)	20% (4)	25% (5)
Durchschnitt	40,2%	14,3%	12%	27,2%

Wenn man die Art der Zusatzaberrationen betrachtet, fällt auf, dass als häufigste Aberration ein komplettes Chromosom hinzugewonnen oder verloren wurde (73 Zugewinne/Verluste). Eine zusätzliche unbalancierte Aberration wurde 38mal beobachtet. Deutlich seltener wurde eine zusätzliche balancierte Veränderung gefunden (achtmal). Darüber hinaus wurden Markerchromosomen insgesamt neunmal gefunden (siehe Tabelle 9). Offensichtlich führte der überwiegende Teil der vorhandenen Zusatzaberrationen zu einem Zugewinn bzw. Verlust chromosomalen Materials.

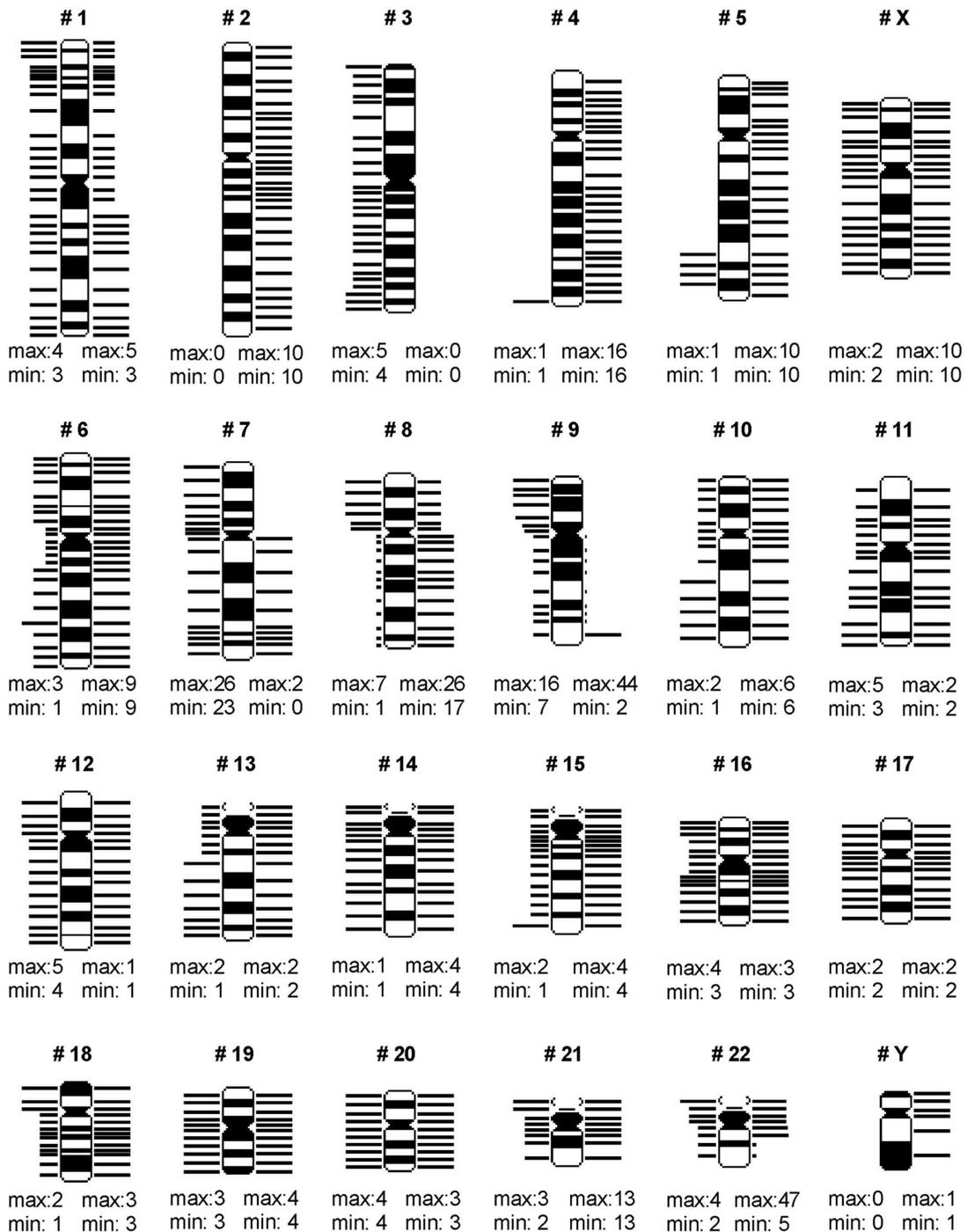
**Tabelle 9: Häufigkeiten der verschiedenen Arten von Zusatzaberrationen innerhalb des analysierten Patientenkollektivs.**

Art der Zusatzaberration	Anzahl	Prozent
Zugewinn/Verlust	73	57,0
unbalancierte Aberration	38	29,7
balancierte Aberration	8	6,3
Marker	9	7,0
Gesamt	128	100

## **2.3 *Ergebnisse der Metaanalyse von 94 Karyotypen mittels SCCN-Analysesoftware***

### **2.3.1 Ergebnisse der quantitativen Analysen**

Bei der quantitativen Analyse zeigte sich, dass alle 24 Chromosomen in Zugewinne oder Verluste chromosomalen Materials involviert sind. Insgesamt fanden **335** Ereignisse statt, die zu chromosomalen Imbalancen führten (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6: Ergebnisse der quantitativen Analyse für alle 24 Chromosomen. Die grafische Ergebnisdarstellung der 24 einzelnen Analyseläufe wurde zu einer Gesamtansicht zusammengefügt. Die Anzahl der Ereignisse pro Bruchpunkt ist in Form eines Balkens dargestellt. Links neben den Ideogrammen stehen die Verluste und rechts die Zugewinne an chromosomalem Material. Die Länge der Balken ist vom jeweiligen Maximal- und Minimalwert abhängig; die einzelnen Balkenlängen pro Chromosom stehen im Verhältnis zueinander.**

### 2.3.1.1 Zugewinne

Insgesamt wurden 224 Ereignisse gefunden, die zu chromosomalen Zugewinnen geführt haben. Dieser Wert entspricht 67% aller genetischen Imbalancen. Darüber hinaus wurden 23 Ereignisse mit fraglichen Zugewinnen in Fehlertabellen aufgeführt.

55,8% der Zugewinne (125 Ereignisse) sind auf den Zugewinn ganzer Chromosomen zurückzuführen, davon 75,2% (94 Ereignisse) in hoch-hyperdiploiden bis nahezu triploiden Chromosomensätzen. 44,2% der Zugewinne (99 Ereignisse) entspringen unbalancierten Rearrangements oder zusätzlichen Derivatvchromosomen.

Am häufigsten wurde Material der Chromosomen 22, 9, 8, 4, 21, X, 2 und 5 hinzugewonnen. Das Y-Chromosom wurde am seltensten und Chromosom 3 war überhaupt nicht von Zugewinnen betroffen

Der Zugewinn an 22er-Material (20,3% der Zugewinne) hat sein Maximum auf den Banden p13-q112 und ist hauptsächlich auf den 42maligen Zugewinn eines derivativen Chromosom  $der(22)t(9;22)$  zurückzuführen. Daneben wurde das Chromosom 22 viermal komplett hinzugewonnen. 19,1% der Zugewinne befinden sich auf dem Chromosom 9 mit einem deutlichen Maximum auf der Bande q34. Auch diese Zugewinne sind durch den ein- bis dreifachen Zugewinn eines  $der(22)t(9;22)$  begründet. Zudem lag zweimal ein isoderivatives Chromosom 9q vor. An dritter Stelle wurde Material des Chromosom 8 hinzugewonnen (11,3% der Zugewinne). Das Chromosom 8 wurde 16mal komplett und achtmal partiell (q10-q24.3) hinzugewonnen (durch das Vorliegen von Isochromosom 8q), so dass die maximalen Zugewinne für 8q10-q24.3 zu finden sind. Die Zugewinne von Chromosom 4 sind vollständig auf ganz-chromosomale Zugewinne zurückzuführen (16mal) und machen 6,9% der Zugewinne aus. Das gleiche gilt für die Chromosomen 21, X, 2 und 5, die ebenfalls ausschließlich im Ganzen hinzugewonnen wurden (5,6%, sowie jeweils 4,3% der Zugewinne).

Für die Chromosomen 1, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 und 20 wird ein zwei- bis neunmaliger Zugewinn gefunden. Abgesehen von Chromosom 1 sind diese Zugewinne ausschließlich auf den Zugewinn ganzer Chromosomen zurückzuführen. Chromosom 1 zeigt ein Maximum für die Banden q21-q44, es wurde dreimal ganz und zweimal partiell hinzugewonnen (eine Duplikation 1q21q44 sowie Zugewinn eines  $der(16)t(1;16)(q21;q12)$ ).

Die Zugewinne des Y-Chromosoms machen nur 0,4% der Zugewinne aus. Sie sind auf den einmaligen kompletten Zugewinn eines Y-Chromosoms zurückzuführen.

Die häufigsten bei den hoch-hyperdiploiden bis nahezu tetraploiden Karyotypen hinzugewonnenen Chromosomen waren #4 (12x), #21 (9x), #X und #2 (je 8x) sowie #6 und #7 (je 7x). Die Chromosomen 5 und 10 wurden jeweils 5mal im hoch-hyperdiploiden Karyotyp hinzugewonnen. Bei den hyperdiploiden Fällen wurden die Chromosomen 4, 5, und 21 neben einem zusätzlichen Philadelphia-Chromosom am häufigsten hinzugewonnen.

### **2.3.1.2 Verluste**

Es sind deutlich weniger Verluste chromosomalen Materials als Zugewinne zu verzeichnen. Es traten insgesamt 111 Ereignisse auf, die zu chromosomalen Verlusten führten. Das entspricht 33% aller Ereignisse, die zu chromosomalen Imbalancen führten. In den Fehlertabellen wurden zusätzlich nur vier fragliche Verluste gespeichert. 62,2% der Verluste (69 Ereignisse) sind auf den Verlust ganzer Chromosomen zurückzuführen, davon 1,4% (1 Ereignis) in pseudodiploiden und 26,1% (18 Ereignisse) in hypodiploiden Chromosomensätzen. Es lagen vier nahezu triploide Karyotypen vor, bei denen einige Chromosomen nicht in Trisomien, sondern nur in Disomien vorkommen. So kommen einige ganzchromosomale Verluste zustande. Nur 37,8% der Verluste (42 Ereignisse) entspringen unbalancierten Rearrangements.

Das Chromosom mit den häufigsten kompletten Monosomien war Chromosom 7. Überhaupt nicht in Verluste involviert waren das Y-Chromosom und Chromosom 2. Verluste, die nur auf komplette Monosomien zurückzuführen sind, betreffen die Chromosomen X, 14, 17, 19 und 20. Die Verluste von Material der Chromosomen 4 und 5 entstammen ausschließlich unbalancierten Aberrationen.

Am höchsten war der Verlust von Chromosom 7 Material (25,7% der Verluste), welcher insbesondere durch den Verlust eines kompletten #7 zustande kam (22mal), jedoch auch durch unbalancierte Aberrationen, die den p-Arm betreffen (zweimal Isochromosom 7q sowie einmal del 7p15). Dadurch liegt der Maximalverlust auf den Banden p15-p22. Ein weiterer Verlust durch eine unbalancierte Aberration wurde durch eine Deletion des q-Arms von #7 ab dem Zentromer verursacht.

Am zweithäufigsten gingen die Banden 9p22-p24 verloren (16x). Diese Verluste wurden überwiegend durch unbalancierte Aberrationen verursacht. Neben kompletten Monosomien 9 in sieben Fällen wird dieses durch unbalancierte strukturelle

Veränderungen verursacht. In sechs Fällen liegt eine Deletion des p-Arms, in zwei Fällen ein Isochromosom 9q und in einem Fall ein dizentrisches Chromosom dic(8;9) vor. Darüber hinaus wurde zweimal eine Addition an eine fragile Bande von #9 gefunden, welche jeweils nur in den Fehlertabellen und nicht in der Analyse berücksichtigt werden.

Deutlich seltener, jedoch am dritthäufigsten fehlten siebenmal die Banden 8p12-p23. Diese Verluste wurden fast vollständig durch unbalancierte Aberrationen verursacht. In vier Fällen lag ein Isochromosom 8q vor, jeweils einmal wurde eine Deletion von 8p bzw. ein dic(8;9) gefunden. In nur einem Fall lag dem Verlust eine komplette Monosomie 8 zugrunde.

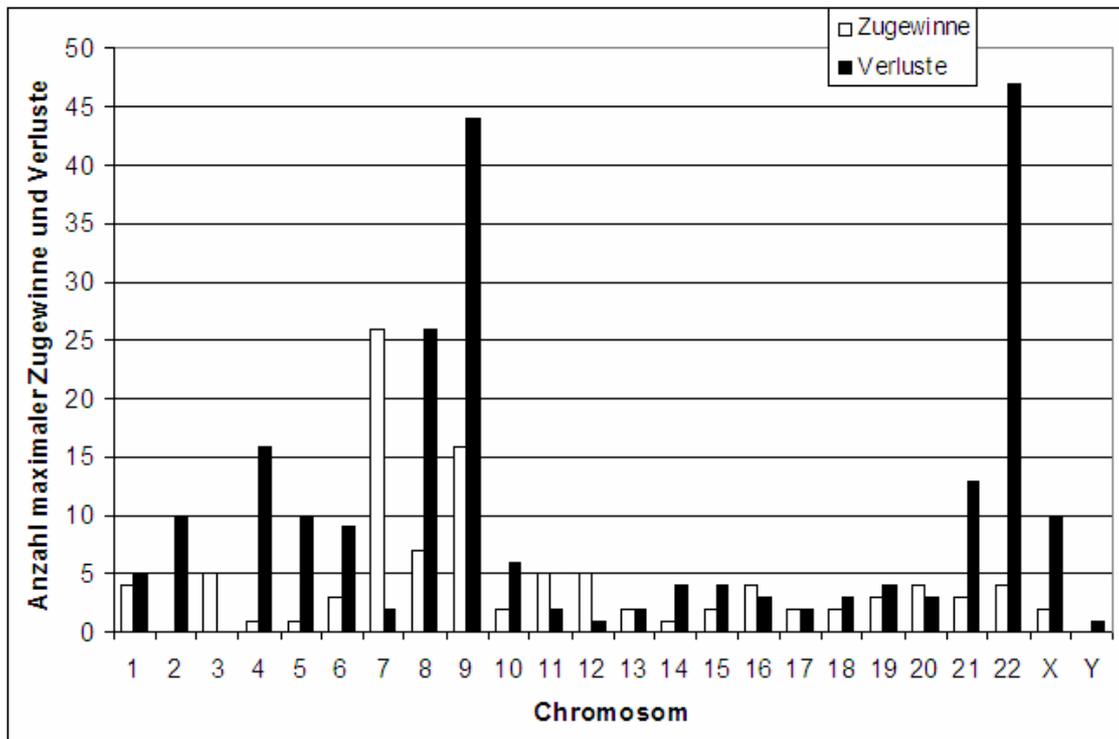
Weitere Akkumulationen mit jeweils fünf chromosomalen Verlusten fanden sich für die Banden 3p26 und 3q27-29 (davon drei komplette Monosomien), 11q23-25 (davon drei komplette Monosomien sowie eine Überlappung auf q23q25 verursacht durch zwei Deletionen), und 12p11.1-13 (davon vier komplette Monosomien).

Bemerkenswert sind darüber hinaus die jeweils vierfachen Verluste von 1p36 (drei komplette Monosomien), 16p13 und 16q12-q24 (davon zwei komplette Monosomien) und #20 (vier komplette Monosomien).

Bei der grafischen Auswertung der SCCN-Analyse fällt ein dreifacher Verlust von 6q23 auf. Dieser wurde durch eine Überlappung zweier verschiedener Deletionen (del6q23q27 und del6q15q23) verursacht.

Eher in geringem Maße (1-2x) oder gar nicht fehlte Material der Chromosomen #X, #Y, #2, #4, #5, #10, #13, #14, #15, #17 und #18. Bei diesen Chromosomen fand der Verlust durch maximal eine unbalancierte Aberration statt.

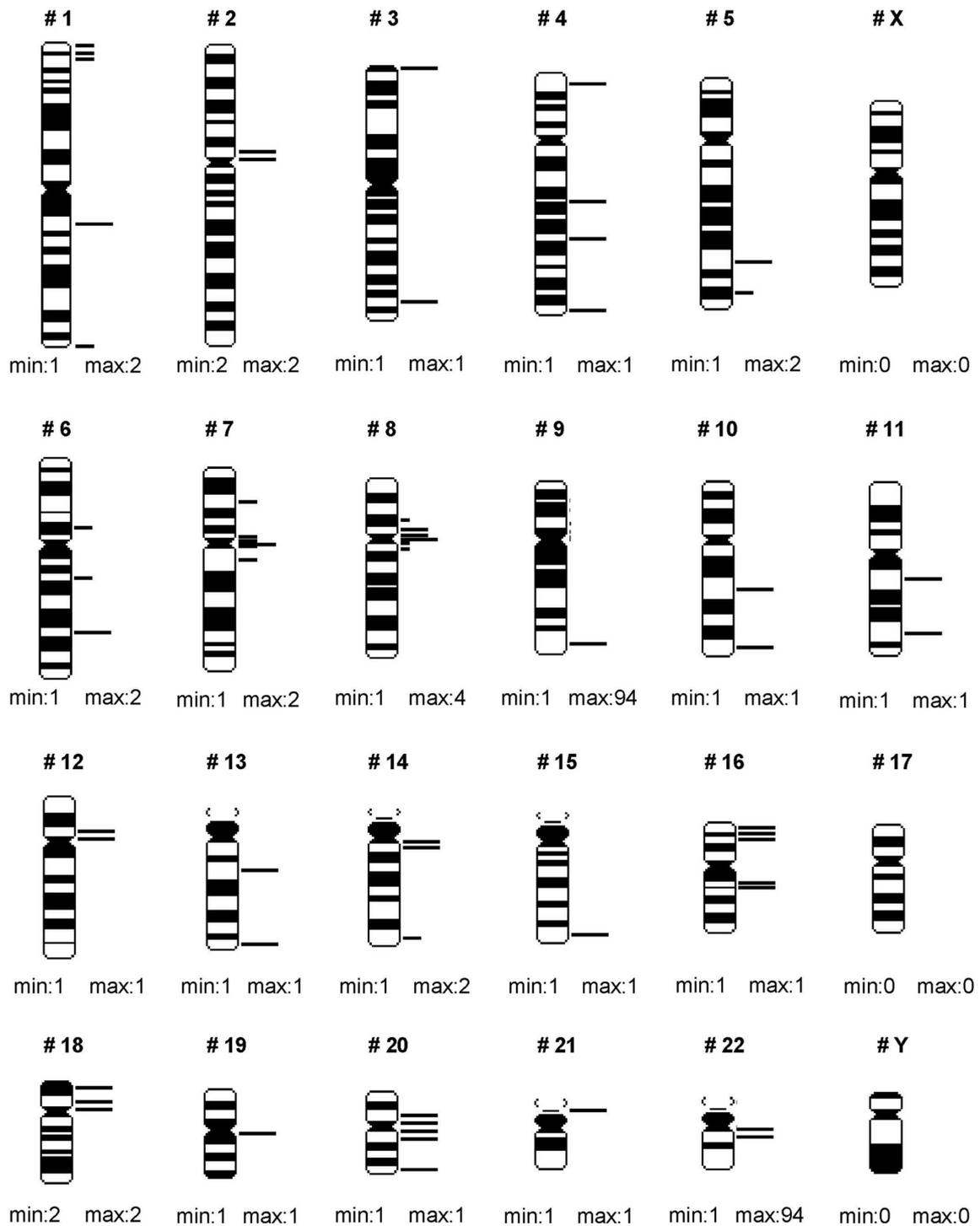
Ganz-chromosomale Verluste bei nahezu triploiden Karyotypen: Hierbei fällt auf, dass die Art der verlorenen (oder nicht hinzugewonnenen) Chromosomen ähnlich ist. Bei allen vier Fällen fehlte jeweils ein Chromosom #3 und #9, immerhin bei drei Patienten fehlte ein Chromosom #1, #7, #11, #12, #16 und #19.



**Abbildung 7: Anzahl maximaler chromosomaler Zugewinne und Verluste pro Chromosom.**

### 2.3.2 Ergebnisse der qualitativen Analysen

Insgesamt fanden an 255 Bruchpunkten Rearrangements statt, die zu strukturellen Aberrationen führten. Ohne die von der Philadelphia-Translokation betroffenen Bruchpunkte 9q34 und 22q11 mit einzubeziehen, fanden 67mal an verschiedenen Bruchpunkten Ereignisse statt (siehe Abbildung 8).



**Abbildung 8: Ergebnisse der qualitativen Analyse für alle 24 Chromosomen. Die grafische Ergebnisdarstellung der 24 einzelnen Analyseläufe wurde zu einer Gesamtansicht zusammengefügt. Rechts neben den Ideogrammen ist die Anzahl der Ereignisse pro Bruchpunkt in Form von Balken dargestellt. Die Länge der Balken ist vom jeweiligen Maximal- und Minimalwert abhängig; die einzelnen Balkenlängen pro Chromosom stehen im Verhältnis zueinander.**

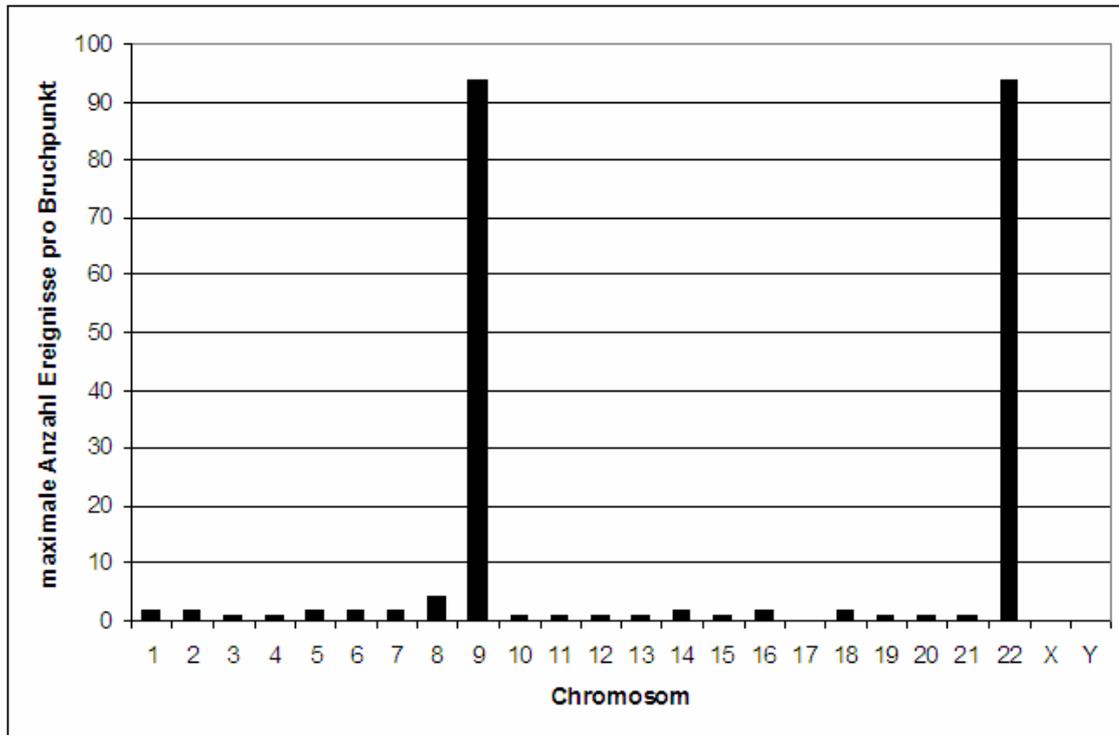
Durch die Analyse wurden sowohl unbalancierte als auch balancierte Veränderungen nachgewiesen. Dabei machten die balancierten den größten Anteil aus, was auf die Anwesenheit der t(9;22) in jedem Karyotyp zurückzuführen ist. Ohne den Anteil der durch die t(9;22) verursachten Brüche liegen jedoch überwiegend unbalancierte Veränderungen vor.

Bei den verschiedenen vorkommenden Arten von strukturellen Aberrationen wurden Translokationen und Deletionen am häufigsten registriert. Deutlich seltener kamen dizentrische Chromosomen, Isochromosomen und Additionen vor. Weitere Arten struktureller Aberrationen wurden gar nicht oder nur in sehr geringer Anzahl registriert (siehe Tabelle 10).

**Tabelle 10: Art der registrierten qualitativen Veränderung (ohne die Philadelphia-Translokation) sortiert nach Häufigkeit.**

Art der strukturellen Aberration	Häufigkeit absolut	Prozent von Gesamtanzahl
Translokation	19	28,4
Deletion	18	26,9
Dizentrisches Chromosom	9	13,4
Isochromosom	8	11,9
Addition	7	10,5
Inversion	2	3,0
Insertion	1	1,5
Duplikation	1	1,5
Derivatvchromosom	1	1,5
Iso-Derivatvchromosom	1	1,5

Bei der qualitativen Analyse der Patientendaten zeigte sich, dass bis auf das Chromosom 17 alle Autosomen in strukturelle Aberrationen involviert waren. Die beiden Gonosomen X und Y waren nicht an chromosomalen Rearrangements beteiligt. Durch die computergestützte Analyse der qualitativen SCCN-Patientendaten wurde aufgedeckt, dass nur ein geringer Anteil an Chromosomenregionen rekurrent an Rearrangements beteiligt war. Der größte Teil der betroffenen Bruchpunkte war nicht häufiger als einmal in Aberrationen involviert (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9: Maximale Anzahl an Ereignissen pro Bruchpunkt aufgeschlüsselt nach Chromosomen.**

Die Chromosomen, die am häufigsten von strukturellen Veränderungen betroffen wurden, waren, bedingt durch die allseits präsente Philadelphia-Translokation, die Chromosomenbanden 9q34 und 22q11.1q11.2 (jeweils 94mal). Darüber hinaus war kein weiterer Bruchpunkt häufiger als viermal an strukturellen Rearrangements beteiligt. Die perizentrische Region (definiert als die Bereiche p11-q11) von Chromosom 8 bildet hierbei eine Ausnahme; sie war in insgesamt acht Ereignisse involviert. Es wurde ein Maximum von vier Ereignissen für das Zentromer mit der Bande 8q10 verzeichnet, welches durch das Vorliegen von  $i(8)(q10)$  in vier Fällen verursacht wurde. Darüber hinaus war der Bruchpunkt p11 dreimal beteiligt, was auf ein  $dic(8;9)(p11;p13)$ , eine  $t(2;8)(p11;p11)$  sowie eine  $t(8;19)(p11;q11)$  zurückzuführen ist. Zusätzlich war die Bande q11, bedingt durch eine  $t(8;21)(p12)$ , einmal an Rearrangements beteiligt.

Auch für die perizentrischen Regionen anderer Chromosomen wurden mehrere Ereignisse verzeichnet. Für die Chromosomenbande 2p11 wurde je eine  $t(2;8)(p11;p11)$  und  $t(2;14)(p11;q32)$  dokumentiert. Beim Chromosom 7 wurde in zwei Fällen eine Beteiligung von q10 (bedingt durch ein  $i(7)(q10)$ ) und in je einem Fall eine Beteiligung von p11 und q11 (bedingt durch  $dic(7;12)(p11;p11)$  und  $del(7)(q11)$ ) nachgewiesen.

Außerdem waren die Banden 9p11 und 9q10 wiederholt in Chromosomenumbauten involviert (p11 viermal, q10 zweimal). Die dem zugrunde liegenden Aberrationen waren del(9)(p11) (dreimal), ins(9;?)(p11), i(9)(q10) und ider(9)(q10) (je einmal).

Nur jeweils einmal waren die perizentrischen Regionen der Chromosomen 12, 14, 18, 19, 20 und 22 in strukturelle Veränderungen einbezogen. Die entsprechenden Rearrangements waren ein dic(7;12)(p11;p11), eine t(14;18)(q11;p11), eine t(14;20)(q11;q13.3), ein dic(18;20)(p11;p11), ein dic(20;22)(q11;p11).

Zusammengefasst gesehen zeigte eine Anzahl von 23 Fällen (24,5%) Rearrangements an den perizentrischen Chromosomenregionen, wobei diese in sieben Fällen (7,4%) durch ein Isochromosom und in fünf Fällen (5,3%) durch dizentrische Translokationen verursacht wurden.

### 3. Diskussion

#### 3.1 Die computergestützte Analyse großer tumorzytogenetischer Datensammlungen

Es ist unbestritten, dass durch die Metaanalyse großer tumorzytogenetischer Datensammlungen rekurrente Primär- und Sekundäraberrationen sowie wiederholt in Bruchereignisse involvierte Chromosomenregionen detektiert und zytogenetische Subgruppen innerhalb einer bestimmten Krankheitsentität definiert werden können (Heim & Mitelman 1986; Schnittger et al. 2002). Je größer hierbei die Anzahl der analysierten Patienten ist, desto statistisch gesicherter ist sowohl das jeweilige Ergebnis als auch die Wahrscheinlichkeit minimal rekurrente Aberrationen zu finden. Durch die Metaanalyse tumorzytogenetischer Datensammlungen konnten in der Vergangenheit beispielsweise Assoziationen von spezifischen Aberrationen mit bestimmten AML FAB-Subklassen identifiziert (Klaus et al. 2004), zytogenetische Subgruppen mit unterschiedlicher prognostischer Relevanz innerhalb einer Therapiestudie definiert (Secker-Walker et al. 1997) bzw. (Mancini et al. 2005) oder das Muster zytogenetischer Veränderungen bei der pädiatrischen prä-B-ALL mit einer *tel/aml1*-Genfusion definiert werden (Andreasson et al. 1997; Forestier et al. 2007). Viele chromosomale Bruchpunkte konnten als Hot Spots chromosomaler Rearrangements identifiziert werden (Chilcote et al. 1985). Letztendlich kann die Identifizierung der an der Pathogenese einer bestimmten Neoplasie beteiligten Gene in vielen Fällen auf die Auswertung tumorzytogenetischer Datensammlungen zurückgeführt werden (Kamb et al. 1994).

Seit Anfang der 1980er Jahre stehen Personal-Computer für die wissenschaftliche Arbeit in medizinischen Instituten zur Verfügung (Hallgren 1980; Sladen 1984; Persson & Dyer 1985). Zytogenetische Patientendaten werden mindestens seit dieser Zeit in Datenbanken gespeichert (Videbech & Nielsen 1979). So sind in den letzten 25 Jahren in den einzelnen wissenschaftlich arbeitenden tumorzytogenetischen Instituten große Datensammlungen mit Chromosomenbefunden von Leukämiepatienten entstanden (Heim & Mitelman 1986; Musilova et al. 1990).

Bei einer Zusammenführung der Datenbestände einzelner Institute, z.B. im Rahmen von Therapiestudien, entstehen ebenfalls große Datensammlungen mit zum Teil mehreren

hundert Datensätzen. Gerade in den vergangenen Jahren wurde der Wunsch nach einer gemeinsamen Nutzung tumorzytogenetischer Daten u.a. durch die Bildung nationaler (Kompetenznetz Akute und chronische Leukämie, Kompetenznetz Lymphome, Kompetenznetz Pädiatrische Onkologie und Hämatologie) und internationaler (European Leukemia Net, ELN) Kompetenznetze für Leukämien und Lymphome enorm verstärkt. Die zytogenetische Diagnostik im Rahmen von nationalen und internationalen Studien wird aber in verschiedenen Referenzlaboren durchgeführt (Dugas et al. 2003), so dass zum Zwecke der Metaanalyse von Chromosomenbefunden aus den einzelnen Datensammlungen der Referenzlabore eine gemeinsame Datenbank erstellt werden muss.

Eine weitere für die wissenschaftliche Arbeit verfügbare Sammlung tumorzytogenetischer Daten existiert in Form der seit Mitte der 1990er Jahre bestehenden „Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer“ (Mitelman *et al.* 2007b). In dieser Datenbank waren zum Ende 2007 die Karyotypen von nahezu 54000 in der Literatur publizierten Fällen solider und hämatologischer Tumore gespeichert. Auf der Homepage dieser Datensammlung besteht die Möglichkeit einer Selektion der Chromosomenbefunde z.B. nach Krankheitsentität, so dass z.B. bei einer Abfrage aller dokumentierten Fälle einer bestimmten Erkrankung leicht eine Tabelle mit mehreren tausend Datensätzen zustande kommt. Da diese Tabelle exportiert werden kann, stehen die in ihr enthaltenen Karyotypen einer Metaanalyse zur Verfügung.

Eine Metaanalyse tumorzytogenetischer Daten erfolgt üblicherweise nicht an der Gesamtmenge von Chromosomenbefunden einer Datenbank. Im Vorfeld einer Analyse werden die Daten daher durch die Verwendung einzelner oder einer Kombination von mehreren Kriterien aus einer umfangreicheren Datensammlung selektiert. Eine Selektion der gewünschten Datensätze kann mittels Volltext-Abfragen erfolgen. Die Abfrage-Ergebnisse werden in einer neu erstellten Datentabelle gespeichert. Vor einer Analyse müssen dann noch eventuell redundante Daten aus dieser Datentabelle entfernt werden (z.B. wenn mehr als ein Untersuchungsergebnis pro Patient gespeichert wurde). Um eine hoch-selektierte Patientensammlung zu erhalten, aus der alle redundanten Daten entfernt wurden, sind häufig mehrere Abfrageschritte erforderlich. Auch nach dem Selektionsprozess kann die Anzahl der in der Datensammlung enthaltenen Datensätze noch sehr hoch sein. Nach dem Selektionsprozess kann die eigentliche

Metaanalyse der Chromosomenbefunde erfolgen, die in der Regel sehr zeitaufwändig ist. Um die für eine vollständige Metaanalyse erforderliche Zeit zu minimieren, ist eine weitestgehend computerisierte Auswertung der Karyotypen wünschenswert. Zu Beginn dieser Arbeit besaß die wissenschaftliche Gemeinschaft jedoch kein allgemein verfügbares Werkzeug für eine vollständig computerisierte Analyse von nach ISCN 1995 dokumentierten Chromosomenbefunden, obwohl unterschiedliche Autoren schon seit Beginn der elektronischen Speicherung von Chromosomenbefunden Versuche in diese Richtung unternommen haben (Brodeur et al. 1982; Kamada et al. 1983; Hashimoto et al. 1989; Cooper & Friedman 1990; Plaat et al. 1999). Diese Programme konnten sich jedoch nicht für den allgemeinen Gebrauch durchsetzen und wurden darüber hinaus auch nicht an anhaltende Weiterentwicklung der ISCN angepasst.

Unter anderen entwickelten N. Kamada et al. in 1981 die erste Version einer Software, welche erst 1983 veröffentlicht wurde (Kamada et al. 1983). Mit diesem Programm konnten normal diploide sowie aberrante Karyotypen analysiert werden, welche nach der ISCN 1978 in Kurz- oder Langschrift dokumentiert worden waren. Eine Analyse der jeweiligen Datensätze mit diesem Programm war nur möglich, wenn die zu analysierenden ISCN-Karyotypen absolut fehlerfrei dokumentiert worden waren. Die Berücksichtigung einer bestimmten Bandenauflösung bei der Dokumentation des Chromosomenbefundes war hierbei nicht vonnöten. Als Ergebnis einer Analyse lieferte das Programm die Art einer strukturellen oder numerischen Aberration und die Nummern der hiervon betroffenen Chromosomen sowie die jeweils betroffenen Bruchpunkte. Chromosomale Imbalancen infolge unbalancierter Rearrangements wurden durch dieses Programm nicht erfasst. Die Ergebnisse wurden für jeden Datensatz einzeln ausgegeben und abgespeichert. Es erfolgte keine Summierung der Analyse aller Datensätze zu einem Gesamtergebnis.

Diese Software wurde 1987 von den Autoren überarbeitet (Hashimoto et al. 1989), so dass fortan auch eine computerisierte Analyse von Karyotypen möglich war, die nach der inzwischen gültigen ISCN-Version (ISCN 1985 1985) dokumentiert worden waren. Darüber hinaus sollte mit diesem Programm auch die Analyse unvollständiger Karyotypen ermöglicht werden. Es konnten ISCN-Karyotypen sowohl in Kurz- als auch in Langschrift bzw. Karyotypen von ungebänderten Chromosomen analysiert werden. Das Programm wurde um die in der ISCN 1985 neu hinzu gekommenen Symbole und

Chromosomenbanden erweitert. Außerdem wurden die Ergebnisse nicht mehr nur für einen einzelnen Datensatz ausgegeben, sondern mit Hilfe weiterer Programme konnte die Frequenz der einzelnen Aberrationsarten, der betroffenen Chromosomen und Bruchpunkte innerhalb einer Datensammlung dokumentiert werden. Doch auch mit diesem überarbeiteten Programm wurden Zugewinne oder Verluste infolge unbalancierter Rearrangements nicht erfasst, so dass große zytogenetische Datensammlungen nur unvollständig analysiert werden konnten. Es scheint, dass auch dieses Programm keine weite Verbreitung innerhalb der wissenschaftlichen Gemeinschaft gefunden hat. Dafür spricht, dass keine Veröffentlichung über eine Weiterentwicklung der Software an die fortschreitende Veränderung der ISCN-Nomenklatur erfolgte.

Seit 1986 wurde in der Arbeitsgruppe um J. M. Friedman an einem in Prolog geschriebenen Programm zur Interpretation von ISCN-Karyotypen programmiert (Friedman et al. 1986). Über die zweite Version dieses ISCN Experts liegt eine Veröffentlichung aus dem Jahr 1990 vor (Cooper & Friedman 1990). Dieses Programm war als eine Erleichterung zur Interpretation von konstitutionellen Chromosomenbefunden gedacht, die in Kurzschrift nach ISCN 1985 dokumentiert worden waren. Bei einer Analyse wurde jeweils ein einzelner Karyotyp interpretiert, wobei der ISCN-Datenstring als Ausdruck einer algebraischen Notation betrachtet wurde. Dazu wurde diese analog zu einem mathematischen Ausdruck in seine Einzelkomponenten zerlegt. Die Bedeutung der Zeichen und Operatoren und ihrer Beziehung zueinander wurde durch mehrere hundert Prolog-Regeln festgelegt, die der ISCN 1985 entsprachen, wobei fehlerhafte Karyotypen zurückgewiesen wurden. Die Ergebnisse wurden in zwei verschiedenen Formen ausgegeben: zum einen erfolgte eine Darstellung von strukturellen Aberrationen in Form der ISCN-Langschrift, wodurch dem Zytogenetiker die Visualisierung eines Rearrangements erleichtert werden sollte. Zum anderen wurde der ISCN-Karyotyp in Prolog-Funktionen umgewandelt, die einem festen Schema folgten. Diese Prolog-Funktionen reflektierten sowohl die Anzahl der Chromosomen, die Kombination der Gonosomen, die Anzahl der Kopien der einzelnen Chromosomen, die Art eines Rearrangements, die in ein Rearrangement involvierten Chromosomen und Bruchpunkte in Kombination mit der Art des Rearrangements, Chromosomen mit zusätzlichem unbekanntem Material und die Häufigkeit der

verschiedenen Chromosomenbanden bei Imbalancen. Die Langschrift und die Prolog-Funktionen wurden in mehreren Datenfeldern einer relationalen Datenbank gespeichert, und so die Ergebnisse vieler ISCN-Interpretationen gesammelt. Durch Datenbank-Abfragen nach unterschiedlichsten Kriterien konnte anschließend eine Metaanalyse einer solchen Datensammlung erfolgen, wodurch offenbar ein großer Teil der chromosomalen Imbalancen und sämtliche Bruchpunkte detektiert werden konnte. Von den hier vorgestellten Programmen scheint der ISCN Expert für eine voll computerisierte Metaanalyse größerer zytogenetischer Datensammlungen in besonderer Weise geeignet gewesen zu sein, zumal die Autoren für zukünftige Versionen des ISCN-Experts eine Interpretation von neoplastischen Chromosomenbefunden sowie eine grafische Darstellung des aberranten Karyogramms planten. Sicherlich wäre auf der Basis des ISCN-Expert auch eine Automatisierung der Datenbank-Abfragen möglich gewesen. In der Literatur ist jedoch leider kein weiterer Artikel über eine Weiterentwicklung des ISCN-Expert zu finden, so dass auch aus dieser Quelle kein Programm zur Metaanalyse von tumorzytogenetischen Befunden, die nach ISCN 1995 dokumentiert wurden, zur Verfügung steht. Über weitere Programme zur automatisierten Analyse von ISCN Karyotypen, insbesondere zur Automatisierung der Analyse von Chromosomenbefunden nach ISCN 1995, liegen über das Jahr 1990 hinaus keine Veröffentlichungen von weiteren Autoren vor.

Aufgrund der Nichtverfügbarkeit einer Software zur automatisierten Analyse von ISCN-1995 Karyotypen, kann daher eine computergestützte Datenauswertung von zytogenetischen Datensammlungen nur in eingeschränktem Maß erfolgen. Das hierfür eingesetzte Mittel ist die Datenbank-Abfrage, die von jedem Datenbankprogramm ermöglicht wird.

Bei einer Analyse einer Datenbanktabelle anhand von mehreren Einzelabfragen erhält man neue Datentabellen, die alle Datensätze beinhalten, die einem bestimmten Abfragekriterium entsprechen. Das könnten z.B. alle Datensätze mit ganz chromosomalem Zugewinn oder Verlust eines bestimmten Chromosoms sein, alle Datensätze mit Rearrangements unter Beteiligung eines bestimmten Chromosoms oder alle Datensätze mit Derivatvchromosom. Für die Ermittlung aller ganz chromosomalen Zugewinne und Verluste müssen auf diese Weise müssen allein 48 einzelne Datenbank-Abfragen durchgeführt werden. Für eine vollständige Analyse von

Chromosomenbefunden sind wesentlich mehr Einzelabfragen erforderlich. Eine Analyse mit Hilfe von Datenbankabfragen wird zusätzlich dadurch erschwert, dass Chromosomenbefunde in unterschiedlichen Bandenauflösungsstadien dokumentiert werden können. Dementsprechend hoch kann die Varianz an möglichen chromosomalen Bruchpunkten innerhalb einer Datenbank sein, wodurch sich die Abfragefrequenzen zusätzlich erhöhen können.

Im Anschluss an eine Einzelabfrage muss aus den jeweiligen Ergebnistabellen die genaue Anzahl der einzelnen Aberrationsereignisse ermittelt werden, was aufwändiger und fehleranfälliger wird, je komplexer der Karyotyp eines einzelnen Datensatzes aufgebaut ist. Die Abfrageergebnisse müssen (im einfachsten Fall mittels Strichlisten) manuell dokumentiert werden. Für eine weitere Verwendung der Ergebnisse bietet es sich an, diese in Tabellen oder einer Datenbank zu speichern.

Da ISCN-Karyotypen „Metainformationen“ enthalten, die ohne Kenntnis der ISCN-Regeln nicht erfasst werden können, sind einer Analyse über Volltext-Abfragen Grenzen gesetzt. Durch Abfragen können chromosomale Imbalancen infolge unbalancierter Rearrangements nicht und die chromosomalen Bruchpunkte nur ungenügend erfasst werden. So kann eine Ermittlung der chromosomalen Zugewinne und Verluste infolge unbalancierter Aberrationen und die präzise Bruchpunktermittlung nur dadurch erfolgen, dass jeder Karyotyp einzeln begutachtet wird. Nur im Vergleich der einzelnen Aberrationen miteinander kann dann der tatsächliche Netto-Zugewinn und Verlust von chromosomalem Material ermittelt werden. Die jeweiligen Ereignisse müssen manuell dokumentiert und die Einzelergebnisse zusammengezählt werden, um eventuelle Häufungen von Aberrationsereignissen aufzufinden. Der hierfür erforderliche Zeitaufwand ist umso höher je komplexer ein Karyotyp ist. Aus diesen Gründen ist eine Metaanalyse größerer oder sehr komplexer tumorzytogenetischer Datensammlungen ohne ein Werkzeug zur voll automatisierten Analyse enorm zeitaufwändig und durch die erforderlichen umfangreichen Arbeitsschritte auch sehr fehleranfällig.

Die manuelle Auswertung zytogenetischer Daten ist selbst mit Unterstützung von elektronischen Tabellen und Textabfragen umständlich und zeitraubend. Da zum Beginn dieser Arbeit kein allgemein verfügbares Werkzeug für eine vollständig computerisierte Analyse tumorzytogenetischer Daten nach ISCN 1995 zur Verfügung stand, haben einige tumorzytogenetische Institute unterschiedliche Verfahren entwickelt,

um in Datenbanken gespeicherte tumorzytogenetische Daten zeitsparend und weitgehend computergestützt analysieren zu können. Es wurden Verfahren entwickelt, durch die die Anzahl der erforderlichen Abfrageschritte bei einer Metaanalyse reduziert werden kann und sowohl die im ISCN-Karyotyp enthaltenen Metainformationen bezüglich chromosomaler Imbalancen als auch die betroffenen chromosomalen Bruchpunkte einer Datenbank-Abfrage zugänglich gemacht werden. Dieses wurde u. a. dadurch erreicht, dass innerhalb relational verknüpfter Datenbanken zusätzliche Tabellen und Datenfelder angelegt wurden, in denen die im Karyotyp enthaltene Metainformation fallspezifisch gespeichert wird. Hierzu sind verschiedene Lösungsansätze möglich, die jedoch alle individuelle Lösungen sind und darüber hinaus nicht publiziert wurden.

Solche Zusatztabelle können beispielsweise Datenfelder für die Nummer des von einer numerischen oder strukturellen Aberration betroffenen Chromosoms, für eine Beschreibung der Aberration nach gültiger ISCN, für den auf dem Chromosom ggf. betroffenen Bruchpunkt, für die Art der Aberration (Verlust oder Zugewinn bei ganz chromosomalen Veränderungen oder die Art der strukturellen Aberration), Datenfelder in denen dokumentiert wird, auf welchem Chromosomenarm der Bruchpunkt liegt, ein Datenfeld, welches beschreibt, ob die vorliegende Aberration balanciert oder unbalanciert ist, sowie Datenfelder zur Dokumentation der infolge einer unbalancierten Aberration hinzugewonnenen oder verlorenen Chromosomenbanden enthalten (mündliche Mitteilung Prof. Harbott, Gießen). Zusätzlich kann ein numerischer Aberrationscode zur Beschreibung des Aberrationsstatus eingeführt werden, der in einer anderen Tabelle gespeichert wird. Der Aberrationscode kodiert für bekannte spezifische Aberrationen, Ploidiestatus, Komplexität des aberranten Karyotyp bzw. dokumentiert einen Normalbefund. Die Erfassung dieser Zusatzdaten erfolgt zeitgleich mit der Befunderstellung und erfordert ein gewisses Maß an zusätzlichem Zeitaufwand. Datensätze, die vor Einführung der Zusatztabelle und Datenfelder erstellt worden waren, müssen retrospektiv mit einem erheblich höheren Zeitaufwand um die erforderlichen Daten ergänzt werden. Durch diese Art der Dokumentation wird das Spektrum an spezifischen Abfragen erheblich erweitert, so dass durch eine Kombination verschiedener Abfragekriterien sämtliche chromosomalen Imbalancen und betroffenen Bruchpunkte aller Chromosomen durch Einzelabfragen erfasst werden können.

Bei einem anderen Lösungsansatz (mündliche Mitteilung 2003, Frau Dr. rer. medic. Brigitte Mohr, Dresden) wird pro mögliches Chromosom eine Zusatztablette erstellt, in der für jede auf diesem Chromosom (bei einer festgelegten Bandenaufklärung) existierende Bande ein Datenfeld vorliegt. Zur Dokumentation struktureller Aberrationen wird der auf dem jeweiligen Chromosom betroffene Bruchpunkt mit Datenfeldern aus einer anderen Tabelle, die mit der ersten relational verknüpft ist kombiniert. Diese enthält Datenfelder für alle in der ISCN festgelegten Arten an strukturellen Aberrationen. Ebenso verhält es sich mit der Speicherung von chromosomalen Zugewinnen oder Verlusten. Die Erfassung dieser zusätzlichen Daten erfolgt ebenfalls während der Endbefundung eines Falles und zwar jeweils über das Setzen eines Zeichens der Kategorie ja/nein im Datenfeld der betroffenen Chromosomenbande. Ob Patientendaten retrospektiv um diese Angaben ergänzt wurden, ist mir nicht bekannt. Auch durch diese Vorgehensweise werden die Möglichkeiten einer Datenbankanalyse via Einzelabfragen deutlich vergrößert.

Sicherlich existieren in verschiedenen wissenschaftlichen Instituten noch weitere Lösungsansätze, die mit den oben beschriebenen Methoden in bestimmten Eigenschaften übereinstimmen.

Tumorzytogenetische Datensammlungen, die wie in den oben beschriebenen Beispielen um Informationen erweitert worden sind, können mittels mehrerer Datenbank-Abfragen vollständig, d.h. inklusive der in den ISCN-Karyotypen enthaltenen Metainformation, analysiert werden. Eine Rationalisierung der wissenschaftlichen Metaanalyse der bestehenden tumorzytogenetischen Datensammlungen innerhalb der einzelnen Institute kann hierdurch sicherlich erreicht werden. Eine vollständig automatisierte Datenbank-Analyse ist auf diese Weise jedoch nicht gegeben. Zudem sind die oben beschriebenen Lösungsansätze aus mehreren Gründen nicht als optimal anzusehen:

So entstehen durch die Einführung zusätzlicher Tabellen und Datenfelder zum Teil sehr unübersichtliche Datenbanken. Dieses Problem kann nur bedingt dadurch gelöst werden, dass spezielle Formulare zur Dateneingabe programmiert werden. Obwohl bei einer Datenbankanalyse Arbeitszeit eingespart werden kann, muss doch Zeit dafür aufgewendet werden, die zusätzliche Karyotyp-Information der einzelnen Fälle in die Datenbank einzupflegen. Mit einer zunehmenden Anzahl an auszufüllenden Datenfeldern steigen der erforderliche Arbeitsaufwand und die Fehleranfälligkeit bei

der Dateneingabe. Darüber hinaus ist der zur Dateneingabe erforderliche Zeitaufwand umso höher und fehleranfälliger, je komplexer ein aberranter Karyotyp ist. Der zusätzliche Arbeitsaufwand zum Zeitpunkt der Endbefundung eines Falles ist vielleicht tolerabel, bei retrospektiv zu ergänzenden Datensammlungen summiert sich der nötige Zeitaufwand jedoch erheblich. Weiterhin ist nicht von der Hand zu weisen, dass auch die für eine vollständige Analyse erforderlichen Abfragen einen nicht unerheblichen Aufwand an Arbeitszeit bedeuten. Datenbankabfragen, die nicht korrekt formuliert werden, können zu fehlerhaften oder unvollständigen Ergebnissen führen. Eine Dokumentation der jeweiligen Abfrageergebnisse kann nur manuell erfolgen, was ebenfalls einen zusätzlich Aufwand bedeutet und fehleranfällig ist.

Ein weiterer Mangel der bereits existierenden Lösungsansätze ist überdies, dass diese datenbankspezifisch sind, so dass es beim Wechsel des verwendeten Datenbankprogramms, beim Upgrading von Software oder bei einer Umstellung von Computersystemen zu Problemen bis zu einer vollständigen Unbrauchbarkeit kommen kann.

Ein überaus bedeutender Mangel der oben beschriebenen Rationalisierungslösungen ist die Tatsache, dass es sich jeweils um „Insellösungen“ handelt, die speziell für die Bedürfnisse eines einzelnen Instituts entwickelt wurden, daher nur in diesem einen Institut angewendet werden und somit nicht allgemeingültig sind. Daher ist eine rationalisierte Analyse der so dokumentierten Chromosomenbefunde spätestens dann hinfällig, wenn tumorzytogenetische Datensammlungen verschiedener Institute zusammengeführt werden (Dugas et al. 2002). Eine gemeinsame Metaanalyse wird nicht nur durch die unterschiedlichen verwendeten Datenbanken, sondern auch durch den variablen Aufbau der Datensätze erschwert. Individuell verwendete Datenfelder und Tabellen sind dann nicht mehr verwendbar. So sind die oben beschriebenen Beispiele bei einer Zusammenführung der Datensammlungen von keinem Nutzen. Auch bieten diese Lösungsansätze keine Vorteile, wenn z.B. im Rahmen eines Literatur-Review Chromosomenbefunde analysiert werden sollen, die aus der Mitelman-Datenbank (Mitelman *et al.* 2007a) selektiert wurden. Tumorzytogenetische Karyotypen werden darüber hinaus mit einem weiten Spektrum an Bandenauflösung dokumentiert. Die Banden werden in einem Bereich von ca. 150 bis 500 bphs angegeben. Hierdurch kommt es zu einer uneinheitlichen Angabe von Banden und Subbanden, welche eine Metaanalyse zusammengeführter Daten erschwert. Innerhalb der Expertengruppe des

Teilprojektes „Zytogenetik“ des Deutschen Kompetenznetzes Akute und chronische Leukämie wurde eine prospektive Vereinheitlichung der Datenbanken auf ein „minimal data set“ mit einem Minimum an gemeinsamen Datenfeldern und einer definierten Bandenauflösung der Karyotypen vereinbart (Expertentreffen des Teilprojektes Zytogenetik des Kompetenznetz Leukämie 2003, Marburg). Eine retrospektive Anpassung der Daten auf das „minimal data set“, erwies sich jedoch aufgrund der hierzu erforderlichen Arbeitsleistung als unmöglich. Das „minimal data set“ schließt außerdem keine Datenfelder mit ISCN-Metainformationen ein. Auch im Rahmen pädiatrischer Leukämiestudien besteht aktuell keine Vereinheitlichung der Datenbanken der jeweiligen Referenzlabore. Ein „minimal data set“ ist in der Zukunft geplant (mündliche Mitteilung Prof. Harbott, Gießen). Somit ist auch innerhalb der tumorzytogenetischen Kompetenznetze und Therapiestudien weiterhin mit der oben beschriebenen Problematik bei einer Analyse zusammengeführter Daten zu rechnen.

Alle bisher beschriebenen Verfahren und Programme zur Analyse zytogenetischer Datensammlungen haben gemein, dass ein zusätzlicher Arbeitsaufwand für eine grafische Aufbereitung der Ergebnisse zu Zwecken etwaiger Veröffentlichungen erforderlich ist. Eine grafische Aufbereitung kann am PC mit Hilfe eines Zeichenprogramms durchgeführt werden. Die allgemein übliche Darstellungsweise erfolgt in Form von Balkendiagrammen, denen ein Ideogramm des betroffenen Chromosoms beigelegt ist (Johansson et al. 1993; Heerema et al. 2004a; Forestier et al. 2007). Durch die Art dieser Darstellung ist auf einen Blick ersichtlich, welche Chromosomenbereiche auffällig häufig oder selten von Bruchereignissen oder von chromosomalen Imbalancen betroffen sind. Bei der Entwicklung eines Verfahrens zur voll automatisierten Analyse von Chromosomenbefunden bietet es sich an, sowohl eine tabellarische als auch grafische Darstellung der Analyseergebnisse zu ermöglichen, um so zu einer maximalen Zeitersparnis zu gelangen.

Aus oben angeführten Gründen ist ersichtlich, dass eine voll automatisierte Analyse von Chromosomenbefunden auf Basis der ISCN sehr erstrebenswert ist. Durch sie könnte nicht nur bei der wissenschaftlichen Arbeit eines Einzellabors viel Arbeitszeit eingespart werden, sondern sie ist für eine Metaanalyse von zusammengeführten Datensammlungen unterschiedlicher Institute oder von Chromosomenbefunden aus der

Mitelman-Datenbank unerlässlich, da in diesen Fällen der ISCN-Karyotyp als einzige gemeinsame Informationsquelle zur Verfügung steht.

### ***3.2 SCCN: ein geeignetes Werkzeug für eine vollständig automatisierte Analyse von zytogenetischen Daten***

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine voll automatisierte und vollständige Metaanalyse von Chromosomenbefunden möglich ist, wenn hierzu eine auf der ISCN 1995 basierende vereinfachte zytogenetische computerlesbare Notation (SCCN) als Informationsquelle verwendet wird. Durch die Übersetzung eines ISCN-Karyotyps in die SCCN wird dieser in seine qualitativen und quantitativen Bestandteile zerlegt. Die Generierung der SCCN erfolgt nach einfachen Regeln. Der alphanumerische Aufbau des qualitativen und quantitativen SCCN-Strings ist logisch und die im String verwendeten Zeichen eindeutig. Die streng definierten Zeichenfolgen der SCCN waren daher mit geeigneten Programmen einfach zu lesen, was anhand der eingesetzten Software-Module beweisbar war. So konnten bei der Metaanalyse der Chromosomenbefunde einer selektierten Patientengruppe Chromosomenregionen, -banden oder -strukturen schnell hinsichtlich einer wiederholten Involvierung in Zugewinne, Verluste oder Umlagerungen überprüft werden. Somit ist durch die Entwicklung der SCCN eine ideale Ausgangsbasis für eine vollständige Automatisierung der Analyse von Chromosomenbefunden geschaffen worden.

Eine Verwendung der SCCN zur Metaanalyse tumorzytogenetischer Datenbestände ist den zum Zeitpunkt dieser Arbeit verwendeten Möglichkeiten zur Rationalisierung der wissenschaftlichen Auswertung in mehrfacher Hinsicht überlegen:

Mit Hilfe der SCCN ist eine vollkommene Automatisierung der Analyse möglich. Die unter 3.1 aufgeführten Beispiele zur Rationalisierung der Analyse ermöglichen zwar eine Reduktion der Anzahl der erforderlichen Abfrageschritte und einen Zugang zur ISCN-Metainformation, jedoch findet die Auswertung weiterhin auf Basis von Einzelabfragen statt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Vorgehensweise zeitintensiv und häufig fehleranfällig ist. Bei einer Metaanalyse unter Verwendung der SCCN sind außer einer Abfrage zur Erstellung einer hoch-selektierten Ausgangsdatensammlung keine weiteren Datenbank-Abfragen notwendig. Durch den Einsatz der SCCN konnte mit den hier verwendeten Softwaremodulen eine vollständige quantitative und qualitative Analyse in nur 48 Teilschritten erfolgen (je 24 Aktionen für die qualitative

und quantitative Analyse). Durch eine entsprechende Optimierung der verwendeten Softwaremodule ist es sicherlich möglich, die erforderliche Anzahl an Analyseschritten noch weiter zu reduzieren und den benötigten Zeitaufwand dadurch noch stärker zu minimieren.

Im Gegensatz zu den unter 3.1 beschriebenen modifizierten Datenbanken müssen nur zwei zusätzliche Datenfelder in der jeweils verwendeten Datentabelle generiert werden, um die qualitative und quantitative Information des ISCN-Karyotyps im SCCN-String zu speichern. Auf diese Weise wird das Zustandekommen umfangreicher und unübersichtlicher oder zusätzlicher Datentabellen vermieden. Die in dieser Arbeit verwendete ACCESS-Datenbank LCD limitierte die maximale Anzahl an möglichen Zeichen pro Datenfeld auf 255. Diese Zeichenmenge erwies sich zur Dokumentation der SCCN von Leukämiepatienten als ausreichend. Möglicherweise stellt diese Limitierung bei wesentlich komplexeren Karyotypen als den hier dargestellten, z.B. von Patienten mit soliden Tumoren (Glassman 1997; Hoglund *et al.* 2002), ein Problem dar. Dieses ließe sich jedoch ohne Zweifel durch die Verwendung eines anderen Datenbankprogramms (z.B. File Maker pro) lösen.

Die Verwendung der SCCN ist nicht nur auf eine individuell entworfene Datenbank beschränkt. Sie kann im Gegensatz zu den unter 3.1 erwähnten Beispielen datenbankunabhängig benutzt werden, solange die Chromosomenbefunde in tabellarischer Form vorliegen. Im Gegensatz zu den Analysemethoden, die mit zusätzlichen Tabellen und Datenfeldern arbeiten, ist die SCCN daher als ein Werkzeug zur gemeinsamen Analyse von Chromosomenbefunden, die in verschiedenen Laboren dokumentiert wurden, besonders geeignet. Da bei der automatisierten Analyse via SCCN lediglich die ISCN-Karyotypen als Datenquelle verwendet werden, ist es unerheblich welches Datenbank-Programm zur Speicherung von Chromosomenbefunden verwendet wurde. Bei der Zusammenführung von Datensammlungen ist es lediglich erforderlich, dass die Chromosomenbefunde entsprechend den ISCN-Regeln in einem Datenfeld innerhalb einer Tabelle gespeichert wurden. Für eine Zusammenführung von Datensammlungen in eine gemeinsame neue Datenbanktabelle müssen nur die entsprechenden Tabelleninhalte zusammengefügt werden. In dieser Tabelle müssen dann nur noch zwei weitere Datenfelder für den qualitativen und quantitativen SCCN-String generiert werden. Ebenso verhält es sich

bei einer Metaanalyse von Chromosomenbefunden, die der Mitelman-Datenbank entnommen wurden. Die tabellarisch vorliegenden ISCN-Karyotypen müssen zu diesem Zweck ebenfalls in einer neu erstellten Datenbanktafel gespeichert und zwei Datenfelder für die SCCN hinzugefügt werden.

Durch die Entwicklung der SCCN wird erstmalig eine vollautomatische Analyse von zytogenetischen Datenbeständen ermöglicht, deren Chromosomenbefunde nach ISCN 1995 dokumentiert wurden. Mit den in der Vergangenheit entwickelten Programmen (Kamada et al. 1983; Hashimoto et al. 1989; Cooper & Friedman 1990) konnten Chromosomenbefunde bis maximal zum Entwicklungsstand der ISCN 1985 analysiert werden. Aufgrund des einfachen und logischen Aufbaus des SCCN-Strings kann auch eine automatisierte Analyse von Chromosomenbefunden durchgeführt werden, die nach zukünftigen ISCN-Versionen wie z.B. der zur Zeit gültigen ISCN 2005 (Shaffer & Tommerup 2006) dokumentiert wurden. Eine Anpassung von entsprechenden Softwaremodulen an eventuell zukünftig neu eingeführte ISCN-Abkürzungen ist ohne großen Programmieraufwand möglich. Bei der Aktualisierung der ISCN zur aktuell gültigen ISCN 2005 wurden keine neuen Abkürzungen oder ISCN-Regeln für die Dokumentation von Chromosomenbefunden aus der klassischen Chromosomenbandenanalyse eingeführt, so dass die SCCN bisher keiner Anpassung bedarf.

Unter Verwendung der SCCN ist erstmals eine vollständige Analyse tumorzytogenetischer Chromosomenbefunde möglich. Abgesehen davon, dass die unter 3.1 beschriebenen Analyseprogramme nicht in der Lage sind Karyotypen aktueller ISCN-Versionen zu analysieren, ist die Verwendung der SCCN zur automatisierten Analyse den inzwischen veralteten Programmen von Kamada und Hashimoto auch insoweit überlegen, als nicht nur eine Bruchpunktanalyse und die Erfassung von kompletten Mono- und Trisomien erfolgt, sondern auch sämtliche chromosomalen Imbalancen bei einer quantitativen Analyse erfasst werden. Diese werden zwar von dem etwas moderneren ISCN-Expert bei einer Metaanalyse berücksichtigt, jedoch wurde dieses Programm nicht zu einer uneingeschränkten Analyse tumorzytogenetischer Daten weiterentwickelt. Darüber hinaus wurde nur die Übersetzung des ISCN-Strings in eine Prolog-Funktion automatisiert, jedoch nicht die eigentliche Metaanalyse, die in der letzten Version von 1990 über manuell zu erstellende Einzelabfragen erfolgen musste.

Selbst wenn diese zuletzt vor über fünfzehn Jahren entwickelten Programme noch verfügbar wären, sind sie mit den heute aktuellen Betriebssystemen nicht kompatibel und können dadurch mit den heute verwendeten PC's nicht benutzt werden.

Mit der Umformung von ISCN-Karyotypen in die SCCN konnte eine Standardisierung der Bandenauflösung von Chromosomenbefunden auf 400 bphs erzielt werden, womit gewährleistet ist, dass bei der Analyse jede betroffene Chromosomen(Sub-)bande als Bruchpunkt in die Ergebnistabelle übernommen werden kann. Bei der Anpassung einer höheren Bandenauflösung auf 400 bphs könnte das Analyseergebnis eventuell zu ungenau sein, da eine möglicherweise betroffene Subbande bei dieser Auflösung nicht berücksichtigt wird. Da bei Chromosomenpräparaten von neoplastischen Zellen jedoch selten eine Bandenauflösung >400 bphs erreicht wird, dürfte dieser Umstand nicht sehr ins Gewicht fallen. Eher könnten im umgekehrten Fall (bei einer Steigerung der Bandenauflösung von 150 auf 400 bphs) zu viele Banden als Bruchpunkt berücksichtigt werden, wie z.B. bei der Dokumentation der spezifischen Aberration  $t(1;19)(q23;p13.3)$ . Bei einer geringen Bandenauflösung < 400 bphs würde im ISCN-Karyotyp nur die Bande 19p13 angegeben, im SCCN-String würde jedoch eine Angabe der Subbanden 19p13.1-13.3 erfolgen. Neben dem bekannten Bruchpunkt 19p13.3 würden also „fälschlicherweise“ zwei Bruchpunkte dokumentiert, in denen gar kein Bruchereignis stattfand. So könnte bei einer Analyse eine Akkumulation von Ereignissen auf Bruchpunkten entstehen, die gar nicht betroffen sind. So eine Akkumulation würde bei der grafischen Darstellung der Ergebnisse sofort auffallen. Die vermeintliche Involvierung von Chromosomenbanden ist aber ein Problem eher allgemeiner Natur. Aufgrund der allgemein schlechten Chromosomenqualität neoplastischer Mitosen kann häufig keine genaue Bruchpunktbezeichnung erfolgen. Häufig ist eine Bruchpunktbezeichnung aufgrund einer geringen Bandenauflösung nur innerhalb eines Chromosomenbereiches oder auf Banden- und nicht auf Subbandenebene möglich. Somit ist die Dokumentation „falscher“ (Sub-)banden nicht im eigentlichen Sinne ein Problem der Anpassung der SCCN an 400 bphs. Im Gegenteil können durch diese Art der Dokumentation z.B. bei einer grafischen Ergebnisdarstellung durch eine Akkumulation von Ereignissen auf einen Chromosomenbereich Hinweise auf einen „hot Spot“ gegeben werden, welche den Analysierenden dazu veranlassen sich diesen Bereich mit Hilfe geeigneter Methoden näher anzusehen.

Eine gewisse Ungenauigkeit im Analyseergebnis kommt auch dadurch zustande, dass der tatsächliche Bruchpunkt innerhalb einer im Karyotyp angegebenen (Sub-)bande häufig nicht bekannt ist. Bei der Entwicklung der SCCN wurde jedoch festgelegt, dass eine (Sub-)bande als vollständig hinzugewonnen oder verloren gewertet wird, obwohl ein bestimmter Bandenanteil möglicherweise noch vorhanden ist oder nicht hinzugewonnen wurde. Dies ist z.B. der Fall, wenn sich der tatsächliche Bruchpunkt in der Mitte der (Sub-)bande befindet.

Bei der häufig vorkommenden unbalancierten Aberration  $der(19)t(1;19)(q23;p13.3)$  liegt dann also ein Zugewinn von Material des Chromosom 1 ab der Bande q23 bis q44 vor, obwohl davon auszugehen ist, dass nicht die komplette q23-Bande an das Chromosom 19 transloziert wurde. Ebenso verhält es sich mit dem aus dem derivativen Chromosom 19 resultierenden Verlust der Bande 19p13.3, die eher nicht komplett verloren wurde, da das Bruchereignis vermutlich nicht unbedingt an dem genauen Übergang von 19p13.2 zu 19p13.3 stattfand. Auch diese Ungenauigkeit ist kein eigentliches Problem der SCCN, sondern tritt immer bei der Analyse von Chromosomenbefunden auf. Eine Metaanalyse tumorzytogenetischer Daten kann immer nur Ergebnisse auf Bandenniveau liefern. Wenn eine Bande nach zytogenetischer Chromosomenanalyse auffällig häufig in chromosomale Imbalancen involviert ist, wird man mittels molekulargenetischer Methoden innerhalb dieser Bande nach dem genauen Bruchpunkt und dem beteiligten Gen(en) suchen. Sollte eine neue minimal rekurrente Aberration entdeckt werden, werden weitere molekulargenetische Untersuchungen sicher zu einer genaueren Definition des jeweiligen Bruchpunktes und der beteiligten Gene beitragen.

Bei der Programmierung der Analyse-Software wurde berücksichtigt, dass die Ergebnisse der qualitativen und quantitativen Analyse der einzelnen Chromosomen sowohl in tabellarischer als auch in grafischer Form dargestellt werden. Durch die Präsentation der Ergebnisse in Tabellen sind diese einer weiteren statistischen Auswertung zugänglich. Sie können problemlos exportiert und in jedem beliebigen tabellarischen Format gespeichert werden. Somit entfällt die manuelle Erstellung einer Ergebnistabelle. Mit demselben Analyseschritt erfolgt eine grafische Präsentation der Ergebnisse. Bei einer grafischen Darstellung in Form der hier gewählten Balkendiagramme erschließen sich Akkumulationen von Ereignissen auf eine bestimmte Chromosomenregion auf einen Blick. So fällt beispielsweise bei der

Metaanalyse der Testdatenbank der maximale Verlust von Chromosom 6q-Material auf der Bande 6q23 sofort auf. Der maximale Verlust ist bedingt durch ein Überlappen von deletierten Chromosomenabschnitten von nur zwei Fällen. Anhand dieses Ergebnisses lässt sich die Effektivität der eingesetzten Analysesoftware zur Aufdeckung minimaler deletierter Chromosomensegmente aus ISCN-Karyotypen gut demonstrieren.

Dadurch, dass auch die Grafiken exportierbar sind, kann eine weitere grafische Bearbeitung der Ergebnisse entfallen, da sie somit zur weiteren Verwendung (z.B. in Veröffentlichungen oder Vorlesungen) zur Verfügung stehen.

Es erwies sich zudem als vorteilhaft, dass die Verwendung des Zeichens „?“ bei der Umwandlung fraglicher Chromosomenbefunde in den SCCN-String beibehalten wird. Hierdurch wird verhindert, dass eine fragliche Aberration in das Endergebnis einfließt und somit das Analyseergebnis möglicherweise verfälscht wird. SCCN-Strings, die ein „?“ enthalten, werden von den verwendeten Software-Modulen nicht völlig zurückgewiesen (wie es bei dem Analyseprogramm ISCN-Expert der Fall ist (Cooper & Friedman 1990), sondern bei der qualitativen und quantitativen Analyse zusammen mit Datensätzen, die einen Syntax-Fehler innerhalb des SCCN-Strings aufweisen, in Kombination mit der Fall-Identifikationsnummer in gesonderten Ergebnistabellen /Fehlertabellen erfasst, so dass sie einer späteren Überarbeitung zugänglich sind. Die SCCN kann somit in Kombination mit entsprechenden Analyseprogrammen auch dazu eingesetzt werden fehlerhafte ISCN-Karyotypen innerhalb einer Datensammlung aufzufinden. Es konnte gezeigt werden (Hiller et al. 2005), dass ca. 10% der in der Mitelman-Datenbank (Mitelman *et al.* 2007b) gespeicherten Karyotypen fehlerhaft sind. Der häufigste Fehler ist hierbei die Angabe falscher bzw. nicht vorhandener Chromosomenbanden.

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit war es leider nicht möglich, den ISCN-Code automatisch in einen qualitativen und quantitativen SCCN-String zu übersetzen. Der SCCN-String musste manuell erstellt werden. Dabei erfolgte die Umwandlung der Chromosomenbefunde in den SCCN-String zeitgleich mit der Befunderstellung. Da die SCCN und die Softwaremodule innerhalb unserer Arbeitsgruppe genutzt werden sollten, mussten die bereits in der LCD vorhandenen Chromosomenbefunde retrospektiv umgewandelt werden. Zumindest bei der retrospektiven Translation wurde ein großes Maß an Arbeitszeit gebunden. Eine zeitnahe Übersetzung in die SCCN-Strings fiel nicht wesentlich ins Gewicht. Allerdings zeigte sich zumindest bei der retrospektiven

Translation, dass diese Vorgehensweise eine hohe Konzentration des Bearbeiters erfordert und dadurch fehleranfällig ist. Ein häufiger Fehler bei der Übersetzung war das Fehlen von oder ein Zuviel an trennenden Zeichen wie Kommata oder Klammern, was beim Auslesen der SCCN-Strings durch die Software-Module in den erstellten Fehlertabellen auffiel. Außerdem erwies sich die Ermittlung von Netto-Zugewinnen oder –Verlusten von Chromosomenabschnitten gerade bei komplexeren Karyotypen mit vielen unbalancierten Aberrationen als sehr zeitaufwändig. In dieser Hinsicht weist die Verwendung der SCCN keinen Vorteil gegenüber den in 3.1 beschriebenen Datenbanken auf. Da im vorliegenden Entwicklungsstadium der SCCN auch bei einer Zusammenführung von Datensammlungen unterschiedlicher tumorzytogenetischer Labore oder für die Metaanalyse von Chromosomenbefunden aus der Mitelman-Datenbank eine retrospektive Umwandlung der ISCN-Karyotypen in einen qualitativen und quantitativen SCCN-String manuell erfolgen muss, ist der Einsatz der SCCN zur computerisierten ISCN-Auswertung zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht optimal. Damit die Metaanalyse von Datensammlungen tatsächlich den größtmöglichen zeitlichen Gewinn gegenüber den bislang angewendeten Analysemethoden erbringt und die vorhandenen Fehlerquellen eliminiert werden, muss die Konvertierung von ISCN-Karyotyp in die SCCN-Strings unbedingt automatisiert werden. Anhand des Programms ISCN-Expert ist ersichtlich, dass eine automatisierte Übersetzung der ISCN in einen computerlesbaren Datenstring mit einem hierfür entwickelten Programm grundsätzlich möglich ist. Darüber hinaus veröffentlichten Yen et al. in 2005 das Cytoband Query System (CQS), dessen Algorithmus nach Ansicht der Autoren geeignet scheint ISCN-Formeln in den SCCN-Code zu übersetzen (Yen et al. 2005).

Somit ist die Entwicklung der SCCN als ein erster Schritt auf dem Weg zu einer vollständig automatisierten Analyse von großen Datenbanken mit tumorzytogenetischen Chromosomenbefunden anzusehen. Damit sich der Aufwand an manueller Analyse auf die Erstellung einer Tabelle mit einem selektierten Patientenpool beschränkt, ist eine automatisierte Translation der ISCN-Karyotypen in den qualitativen und quantitativen SCCN-String unbedingt notwendig. Dieser zweite Entwicklungsschritt sollte möglichst schnell erfolgen und wurde nach Abschluss meiner Arbeit innerhalb der Arbeitsgruppe Tumorgenetik des Instituts für Klinische Genetik der Philipps-Universität Marburg durchgeführt (Hiller et al. 2005).

Nach Abschluss meiner Arbeit wurde die SCCN und ihre entsprechende Analyse-Software bereits veröffentlicht (Bradtke et al. 2003) und steht somit der wissenschaftlichen Gemeinschaft als ein Werkzeug zur Verfügung, welches den Anwender zu einer automatisierten Analyse großer zytogenetischer Datenbestände im Hinblick auf die vollständige Erfassung chromosomaler Imbalancen und Bruchpunkte befähigt.

### 3.3 Analyse der Zusatzaberrationen von $t(9;22)(q34;q11)$

Bei der Metaanalyse der Chromosomenbefunde von 94 Philadelphia-positiven ALL-Patienten wurden keine neuen, minimal rekurrenten Zusatz-Aberrationen entdeckt. Vielmehr bewegten sich die vorhandenen rekurrenten chromosomalen Imbalancen und involvierten Bruchpunkte im Rahmen der aus der Literatur bekannten Werte.

So konnte gezeigt werden, dass durch die überwiegende Mehrzahl der vorhandenen Zusatzaberrationen eine Veränderung der Menge chromosomalen Materials stattfindet. Hierdurch kommt es zu einer Verminderung oder Erhöhung der Gendosis im Zellkern der Leukämiezellen. Dieser Umstand wurde bereits von verschiedenen Autoren beschrieben, die Sekundäraberrationen von Philadelphia-positiven erwachsenen oder pädiatrischen ALL-Patienten untersucht haben (Groupe Français de Cytogénétique Hématologique 1996; Heerema et al. 2004a). In der vorliegenden Patientengruppe wurde insgesamt mehr Chromosomenmaterial hinzugewonnen als verloren. Dieses Ergebnis überrascht nicht, da ein Zusammenhang zwischen der  $t(9;22)$  und einer Hyperdiploidie bereits lange bekannt ist (Groupe Français de Cytogénétique Hématologique 1996), (Rieder et al. 1996), (Walters et al. 1990), (Westbrook et al. 1992). Bei der Philadelphia-negativen pädiatrischen ALL konnte gezeigt werden, dass hoch-hyperdiploide Karyotypen aus der Non-Disjunction von Chromosomen in einer einzelnen Mitose resultieren, welche sehr früh in der Leukämogenese aufzutreten scheint (Onodera et al. 1992), (Panzer-Grumayer et al. 2002), (Paulsson et al. 2005). Hieraus könnte man schließen, dass die Chromosomzugewinne bei der Philadelphia-positiven ALL mit hoch-hyperdiploidem Karyotyp ebenfalls das Ergebnis eines einzelnen Aberrationsereignisses sind anstelle von vielfachen numerischen Veränderungen.

Darüber hinaus wurden wiederholte Zugewinne für die Chromosomenbereiche 9q34 und 22p13-q11.2 gefunden. Diese wurden hauptsächlich durch das Vorhandensein zusätzlicher Philadelphia-Chromosomen [ $+der(22)t(9;22)(q34;q11.2)$ ] verursacht, welche bei bis zu 26% aller Philadelphia-positiven ALL's beobachtet werden (Groupe Français de Cytogénétique Hématologique 1996), (Rieder et al. 1996), (Faderl et al. 2000). Darüber hinaus führte außerdem der Zugewinn eines kompletten Chromosom 22 zu einer erhöhten Gendosis. Da im Bereich 22p13-q11.1 nur Heterochromatin, Zentromer- und NOR-Material lokalisiert ist, muss der „hot Spot“ die Erhöhung der

Gendosis auf der Bande 22q11.2 und zwar proximal vom Bruchpunkt innerhalb des *bcr*-Gens liegen. Möglicherweise spielen noch unbekannte Gene auf Chromosom 22 zusammen mit der *bcr/abl* Genfusion eine Rolle in der Progression einer Philadelphia-positiven ALL. Die weitaus seltener nachgewiesenen Zugewinne mit Schwerpunkt auf den langen Armen von Chromosom 1 und 8 sowie Verluste von Chromosom 7 oder auf 6q, 8p und 9p bestätigen ebenfalls vorangegangene Ergebnisse von Untersuchungen rekurrenter, sekundärer Aberrationen bei Philadelphia-positiver ALL (Rieder et al. 1996), (Takeuchi et al. 1995), (Johansson et al. 1994), (Dabaja et al. 1999).

Die chromosomalen Verluste waren auf dem Chromosom 7 am höchsten und innerhalb von Chromosom 7 war das am häufigsten verlorene Material auf dem p-Arm lokalisiert. Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass 7p ein Ziel der Verringerung der Gendosis auf Chromosom 7 bei Philadelphia-positiver ALL ist. Andere Autoren haben bei der pädiatrischen ALL tatsächlich den p-Arm von Chromosom 7 als kritische Region für den Verlust von Chromosom 7-Material nachweisen können (Heerema et al. 2004b). Es ist anzunehmen, dass der Verlust von 7p auch eine Rolle bei der Progression der Philadelphia-positiven adulten ALL spielt. Die betroffenen Gene sind dabei unbekannt.

Ein ebenfalls erhöhter Verlust von chromosomalem Material mit einem Peak auf 9p24-p21 war für den kurzen Arm von Chromosom 9 aufgefallen. Insbesondere für die Bande 9p21 ist ein Tumor-Suppressorgen bekannt (p16 bzw. *CDKN2A*), dessen homo- bzw. heterozygoter Verlust oder Mutation eine Rolle bei der Entwicklung verschiedener Neoplasien inklusive der ALL spielt (Aguiar et al. 1997; Faderl et al. 1999).

Zusätzlich war bei der Metaanalyse der 94 adulten ALL-Patienten ein maximaler Verlust von Chromosom 6q-Material auf der Bande 6q23 zu verzeichnen, welcher durch ein Überlappen von deletierten Chromosomenabschnitten von nur zwei Fällen bedingt wurde. Verluste von Chromosom 6q-Material werden häufig bei lymphatischen Neoplasien gefunden (Merup et al. 1998a). Insbesondere der Bereich 6q21-q23 liegt bei ALL-Patienten häufig heterozygot vor (Jackson et al. 2000). Darüber hinaus wurde eine Deletion des q-Arms von Chromosom 6 als Sekundäraberration zu verschiedenen Primäraberrationen bei Patienten mit einer ALL nachgewiesen (Johansson et al. 1994). Es wird vermutet, dass es durch den Verlust der Heterogenität eines oder mehrerer Tumorsuppressor-Gen(e) zu einer Krankheitsprogression kommt.

Die Metaanalyse der vorliegenden Patientengruppe erbrachte einen häufigen Zugewinn von Chromosom 8q-Material. Dieser wurde insbesondere durch Isochromosomen von

Chromosom 8 herbeigeführt. Das i(8)(q) ist als rekurrente Sekundäraberration bei Patienten mit B-Zell ALL bekannt insbesondere bei Philadelphia-positiven Patienten (Mossafa et al. 1994) und wird darüber hinaus häufig bei lymphoproliferativen Erkrankungen, Non Hodgkin's Lymphomen bzw. verschiedenen soliden Tumoren gefunden (Mertens et al. 1994).

Die Bruchpunkt-Analyse erbrachte außer einer Häufung auf 9q34 und 22q11 keine rekurrente Involvierung einzelner Chromosomenbanden. Die mit jeweils nur zwei Bruchereignissen am häufigsten betroffenen Banden waren 1q21, 5q31, 6q23 und 18p11. Der Bruchpunkt 1q21 ist bei ALL-Patienten gelegentlich in verschiedene Rearrangements involviert, dabei können verschiedene auf 1q21 lokalisierte Gene betroffen sein (u.a. *AF1q*, *ARNT*, *BCL9*) (Willis et al. 1998). Die Bande 5q31 ist der minimalst deletierte Bereich bei 5q-Deletionen myeloproloiferativer Erkrankungen (Van den Berghe & Michaux 1997), es werden bei diesen Entitäten jedoch auch Rearrangements unter Einbeziehung von 5q31 gefunden (Baranger et al. 1994). Dieses legt den Schluss nahe, dass nicht nur der Verlust von 5q31, sondern auch seine Inaktivierung noch unbekannter Gene infolge eines 5q31-Rearrangements zu einem Verlust der Heterogenität und somit zu einer Krankheitsprogression myeloproliferativer Erkrankungen führen kann. Möglicherweise spielen ähnliche Prozesse auch bei der Philadelphia-positiven ALL eine Rolle, zumal 5q31-Deletionen in geringerem Umfang auch bei akuten lymphatischen Leukämien beobachtet werden (Van den Berghe & Michaux 1997). Ähnliches könnte auch für den Bruchpunkt 6q23 gelten, für den u.a. sowohl bei pädiatrischer als auch adulter ALL häufig der Verlust der Heterogenität vorliegt (Merup *et al.* 1998b).

Darüber hinaus zeigte sich ein perizentromerisches Rearrangement bei 24,5% der strukturellen Aberrationen, wovon 7,4% auf Isochromosomen und 5,3% auf dizentrische Translokationen entfallen. Dieses lässt vermuten, dass die perizentromerischen Regionen der Chromosomen Ziele chromosomalen Rearrangements bei der Philadelphia-positiven ALL sind. Es konnte schon früher gezeigt werden, dass Reagenzien wie zum Beispiel Mitomycin C und ionisierende Strahlung Brüche innerhalb der zentromerischen Region oder den heterochromatiden Bereichen der Chromosomen 1, 9 und 16 verursachen können (Berger & Busson-Le Coniat 1999), (Johansson & Mertens 1988). Ferner wurde z.B. für Patienten mit ICF

(Immundefizienz, Zentromerinstabilität, faziale Dysmorphien)-Syndrom und einer durch DNA-Methyltransferasedefizienz bedingten Hypomethylierung von Satellit II-DNA gezeigt, dass perizentromerische Strukturveränderungen auf eine konstitutionelle Veranlagung zurückzuführen sein können (Miniou et al. 1997; Xu et al. 1999). Bisher liegen die Ursachen für gehäufte perizentromerische Umlagerungen bei der Philadelphia-positiven ALL im Dunkeln.

Das zur Überprüfung der SCCN und der Softwaremodule ausgewählte Patientenkollektiv ist möglicherweise zu klein, um minimal rekurrent involvierte Bruchpunkte aufzudecken. Nichtsdestotrotz konnte durch den Nachweis einer wiederholten Involvierung bestimmter Chromosomenbanden in Bruchereignisse und eine Veränderung ihrer Gendosis im Gesamtkaryotyp ein Hinweis auf mögliche chromosomale „hot-Spots“ aufgezeigt werden.

### **3.4 Ausblick**

Es sich gezeigt hat, dass die SCCN nur dann ein geeignetes Werkzeug zur Metaanalyse großer und/oder zusammengeführter Datensammlungen von Chromosomenbefunden ist, wenn eine automatisierte Konvertierung des ISCN-Codes in die SCCN-Strings erfolgt. Im Anschluss an meine Arbeit wurde von Prof. H. Rieder ein von der DFG gefördertes Projekt beantragt, welches eine Automatisierung der Übersetzung von ISCN-Karyotyp in einen qualitativen und einen quantitativen SCCN-String und eine Optimierung der Analyse-Software zum Ziel hat. Das Projekt wurde genehmigt und inzwischen wurde ein Programm zur automatischen Konvertierung von ISCN-Karyotypen in die SCCN entwickelt (Hiller et al. 2005). Dieses ISCN-SCCN-Umwandlungsmodul wurde mit den bereits für diese Arbeit zur Auswertung der SCCN entwickelten Programm-Modulen in einem kompletten Programmpaket zu einem computergestützten System für die Analyse von zytogenetischen Datenbeständen zusammengefasst (Cytogenetic Database Analysis System, CyDAS). CyDAS wurde Plattform-unabhängig und internetfähig programmiert. CyDAS kann aus dem Internet herunter geladen und auf dem eigenen PC verwendet werden, es ist aber auch eine Online-Analyse von Chromosomenbefunden möglich. Neben der Metaanalyse von Chromosomenbefunden können Ideogramme derivativer Chromosomen oder auch vollständiger Karyogramme automatisch gezeichnet werden, außerdem können auf der Internet-Seite einzelne Karyotypen auf

ihre korrekte Schreibweise hin überprüft werden. Die SCCN dient im Rahmen von CyDAS darüber hinaus als Grundlage für ein Abhängigkeitsnetzwerk, mit dem statistische Korrelationen zwischen Rearrangements grafisch veranschaulicht werden können sowie als Grundlage zur Erstellung eines putativen Evolutionspfades während einer tumoralen Progression.

CyDAS wurde Wissenschaftlern/innen aus nicht-kommerziellen Forschungseinrichtungen unentgeltlich zur Verfügung gestellt (<http://www.cydas.org>) und zu diesem Zweck auf vielen Kongressen und Tagungen der wissenschaftlichen Öffentlichkeit bekannt gemacht. Die CyDAS-Software wird inzwischen von vielen Forschungseinrichtungen benutzt und hat sich als ein geeignetes Werkzeug zur Metaanalyse zusammengeführter Datensammlungen z.B. im Rahmen des Teilprojektes Zytogenetik des Kompetenznetz „Akute und chronische Leukämie“ erwiesen.

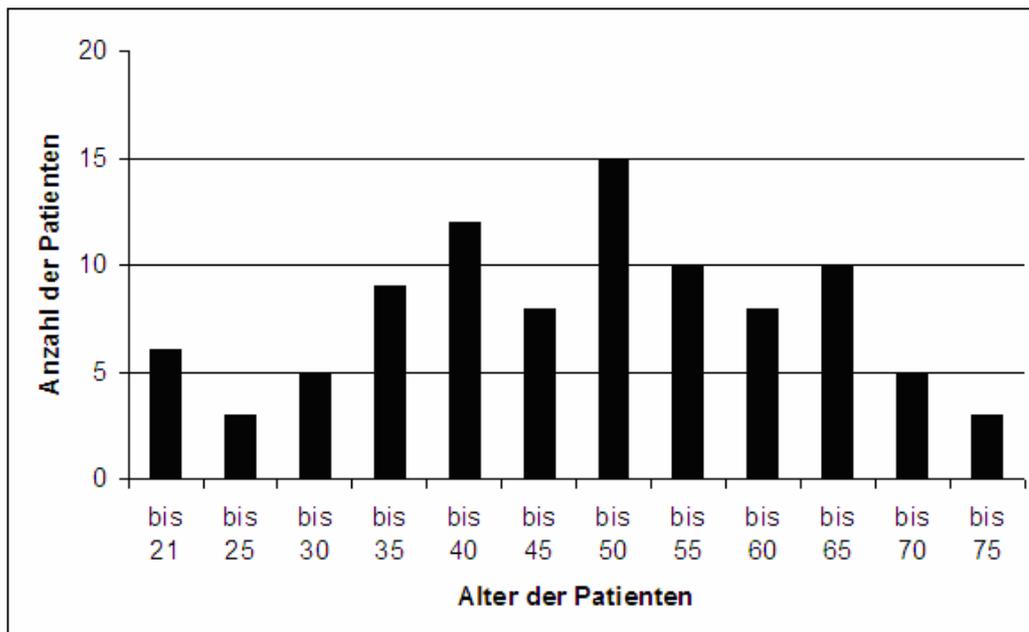
Somit konnte ich mit dieser Arbeit dazu beitragen, dass nun jedem Wissenschaftler eine vollautomatische, vollständige und umfassende Analyse großer tumorzytogenetischer Datenbestände möglich ist.

## 4. Patienten und Material

### 4.1 Patientenkollektiv und Probenmaterial

Material von ALL-Patienten aus verschiedenen deutschen ALL-Therapiestudien wurde bei Diagnosestellung molekularzytogenetisch und zytogenetisch untersucht. Die jeweiligen Befunde wurden in einer Datenbank (LCD) gespeichert. Aus dieser Patientensammlung wurde über eine Datenbankabfrage eine Subgruppe von 94 Patienten gebildet. Der Karyotyp dieser Patienten musste eine Philadelphia-Translokation bzw. ein *bcr/abl*-Rearrangement sowie zusätzliche Aberrationen aufweisen. Der jüngste Patient war bei Diagnosestellung neun Jahre und der älteste 73 Jahre alt. Der Altersmedian lag bei 45,8 Jahren. Es waren 38 Frauen und 56 Männer vertreten (Geschlechterverhältnis w:m = 1:1,47). Die Altersverteilung der Patienten ist in Abbildung 10 dargestellt.

Im Anhang werden die Karyotypen der Patienten und weitere klinische Daten aufgeführt.



**Abbildung 10: Altersverteilung der untersuchten Patienten bei Diagnosestellung.**

Die Untersuchungen wurden an unkultiviertem und kultiviertem Knochenmarkspirat oder peripherem Blut der Patienten durchgeführt. Das Material wurde den Patienten von

den behandelnden Ärzten im Rahmen der studienbegleitenden zentralen zytogenetischen Diagnostik nach schriftlicher Einwilligung entnommen. Das Probenmaterial wurde nach der sterilen Entnahme heparinisiert und anschließend per Expressdienst verschickt. In der Regel kam das Material am Morgen des Folgetages im Diagnostik-Labor an, so dass zwischen Probenentnahme und Zellkultur maximal 24 Stunden lagen.

## **4.2 Material**

### **4.2.1 Medien, Lösungen, Enzyme und Kits**

#### Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren in p.A. Qualität

Antibiotic-Antimycotic 100x	GIBCO
Aqua ad iniecta	B.Braun
Colcemid®	Life Technologies
Cytokine/Growth-Factor-Mix	PAN Biotech
DAPI (4'-6'-Diamidino-2Phenylindol)	Sigma
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck
Essigsäure, 100% wasserfrei	Merck
Ethanol 100% vergällt	Merck
Ethanol absolut, 100%	Riedel de Haen
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech
Giemsa Azur-Eosin-Methylenblau Lösung f. Mikroskopie	Merck
Glycerin	Merck
KaryoMAX Colcemid Solution (10µg/ml Medium)	GIBCO
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Mc Coy's 5a Medium	GIBCO
Natronlauge/Natriumhydroxid	Merck
Natriumchlorid	Riedel de Haen
RPMI 1640 with L-Glutamine und Bicarbonat, ohne Phenolrot, 100ml	PAN Biotech
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck
Triton X-100	Sigma
Tween20	Sigma
Vectashield Antifade	Vector Laboratories

Puffer, Lösungen und Medien

**20xSSC Stammlösung pH 7:**

175,3 g NaCl  
88,2 g tri-Na<sub>3</sub>-Citrat x 2H<sub>2</sub>O  
1000 ml A.bidest

**4xSSC pH 7:**

400 ml 20xSSC  
600 ml Aqua dest.

**4xSSCT pH7:**

100 ml 4xSSC  
0,05 ml Tween 20

**0,075M hypotone KCl-Lösung:**

5,595 g KCl  
1 l Aqua dest.

**Acetic Saline:**

8,82 g tri-Natrium-Citrat-Dihydrat (0,03M)  
5,53 gNaCl (0,095M)  
1l Aqua dest.

**5% Giemsa-Färbelösung:**

95 ml Phosphatpuffer  
5 ml Giemsa-Farbe

**Ethanol 70%:**

700 ml Ethanol vergällt  
300 ml Aqua dest.

**Ethanol 30%:**

300 ml Ethanol vergällt  
700 ml Aqua dest.

**DNase 100µg/µl:**

100mg DNase  
100ml Glycerin 50%

**2xSSC pH 7:**

100 ml 20xSSC  
1 l Aqua dest.

**1xSSC:**

50 ml 20xSSC  
950 ml Aqua dest.

**0,1xSSC:**

10 ml 20xSSC  
980 ml Aqua dest.

**Phosphatpuffer pH 6,8:**

1,14g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
0,49g K<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1 l Aqua dest

**Fixativ-Lösung:**

3 Teile Ethanol unvergällt  
1 Teil Essigsäure

**DAPI-Färbelösung 0,7µg/ml:**

100 ml 4xSSC  
100 µl DAPI

**Ethanol 50%:**

500 ml Ethanol vergällt  
500 ml Aqua dest.

**0,07N NaOH:**

7 ml 1N NaOH  
93 ml Aqua dest.

### Medien

Für die Kultivierung von Zellen aus Knochenmark und peripherem Blut wurden folgende Medien verwendet:

#### **Kulturmedium RPMI (unstimuliert):**

4 ml RPMI-1640

1 ml FCS

0,04 ml Antibiotic/Antimitotic

#### **Kulturmedium Mc Coy's (unstimuliert):**

4 ml Mc Coy's 5a

1 ml FCS

0,04 ml Antibiotic/Antimitotic

#### **Kulturmedium RPMI oder Mc Coy's (stimuliert):**

4 ml RPMI-1640 oder Mc Coy's 5a

1 ml FCS mit Growth Factor Mix

0,04 ml Antibiotic/Antimitotic

### DNA-Sonden

#### **LSI BCR/ABL ES Dual Color Translokationssonde (Vysis):**

10 µl Sondenmix pro Hybridisierungsareal 22 x 22 mm:

1 µl Sonde

2 µl Aqua ad iniect.

7 µl Hybridisierungspuffer

#### **24XCyte Human mFISH (Multicolor FISH) Painting Kit (MetaSystems):**

12 µl gebrauchsfertiger Sondenmix pro Hybridisierungsareal 24 x 24 mm

### Enzyme

DNase, Grade III, 100mg

Roche

Verbrauchsmaterial und Geräte

Corbit-Balsam	Hecht
Deckgläschen 24x60mm	Menzel
Deckgläschen 24x24mm	Menzel
Durchlichtmikroskop Axioskop	Zeiss
Fluoreszenz-Filterkombination nach Pinkel	AHF Analysetechnik
Fixogum	Marabu
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss
Greiner-bio-one, Cellstar, Zentrifugenröhrchen 14 ml, PS	Greiner
Immersionsöl für Fluoreszenz-Mikroskopie	Zeiss
Objektträger, geschnitten mit Mattrand 76x26mm	Menzel
Objektträger, gereinigt, Kanten geschnitten, Mattrand 76x26mm	Marienfeld
Pasteurpipetten Glas, 150 mm	Mainz
Pipettenspitzen 1µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf
Färbeküvette POM (200ml Reaktionsgefäße aus Polyoxymethylen, mit Deckel und Trägereinsatz für 25 OT)	vitlab
Corbit-Balsam	Hecht
Deckgläschen 24x60mm	Menzel
Deckgläschen 24x24mm	Menzel
Durchlichtmikroskop Axioskop	Zeiss
Fluoreszenz-Filterkombination nach Pinkel	AHF Analysetechnik
Fixogum	Marabu
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss
Greiner-bio-one, Cellstar, Zentrifugenröhrchen 14 ml, PS	Greiner
Immersionsöl für Fluoreszenz-Mikroskopie	Zeiss
Objektträger, geschnitten mit Mattrand 76x26mm	Menzel
Objektträger, gereinigt, Kanten geschnitten, Mattrand 76x26mm	Marienfeld
Pasteurpipetten Glas, 150 mm	Mainz
Pipettenspitzen 1µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf

## 5. Methoden

### 5.1 Chromosomenbandenanalysen

#### 5.1.1 Grundlagen der Chromosomenpräparation

Menschliche Chromosomen wurden schon im späten neunzehnten Jahrhundert beobachtet. Jedoch erst in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts waren die Präparationstechniken soweit entwickelt, dass eine genaue Differenzierung möglich war. Prinzipiell können alle Zellen zytogenetisch untersucht werden, die sich spontan oder nach Stimulation teilen. Voraussetzung ist es, die Mitose der Zelle im Metaphasestadium zu fixieren. Hierfür wird einer Zellkultur eine bestimmte Menge des Spindelgiftes der Herbstzeitlosen, Colchizin, zugefügt. Da nun durch die Zerstörung der Spindelfasern ein Auseinanderweichen der Schwesterchromatiden unterbunden wird, bleibt die Zelle im Stadium der Metaphase fixiert und kann für die Chromosomenanalyse präpariert werden. Die Präparation umfasst zwei elementare Schritte: eine hypotone Behandlung, bei der das Chromatin in einen Quellungszustand versetzt wird und die Zellmembran platzt, sowie eine Fixierung mit Alkohol/Eisessig im Verhältnis 3:1. Von besonderer Wichtigkeit für die Chromosomenqualität sind das gewählte Verfahren des Auftropfens, die externen Auftropfbedingungen (Luftdruck, Luftfeuchtigkeit und Temperatur) sowie die Trocknungsbedingungen des Präparates. Hierzu existieren sehr viele Rezepte, die individuell in jedem Chromosomenlabor variiert werden. Inzwischen werden sogar „Klimakammern“ oder „Präparationsroboter“ professionell vertrieben, die gleichbleibende Präparationsbedingungen gewährleisten sollen.

#### 5.1.2 Herstellung von Chromosomenpräparaten

##### a. Aufarbeitung der Materialproben

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung für die in dieser Arbeit verwendeten Chromosomenpräparate wurden heparinisieretes Blut und/oder Knochenmarkproben verwendet. Es kamen stimulierte und unstimulierte Kurzzeit- (4 Stunden Kulturzeit), und Langzeitpräparationen (24 – 72 Stunden Kulturzeit) zur Anwendung, wobei die Präferenz bei den 24h- und 48h-Kulturen lag. Ein Teil der Präparate für die

zytogenetischen Untersuchungen wurde aus bereits im tumorgenetischen Labor Marburg fixierten und archivierten Zellsuspensionen hergestellt.

#### b. Kulturansatz

In 12 ml Zentrifugenröhrchen vorportioniertes und vorher an Zellreihen getestetes 1ml fetales Kälberserum (FCS) einer definierten Charge wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und das Röhrchen mit Fallnummer und Kulturdaten versehen. Unter sterilen Bedingungen wurden 4 ml RPMI-1640 oder McCoy's 5a Medium (mit 1 ml Antibiotic/Antimitotic auf 100 ml Medium) hinzugefügt (Endvolumen 5 ml). Die Kulturmedien dienen der Bereitstellung essentieller Nährstoffe und wirken einer Verschiebung des pH-Wertes entgegen. So sollen Störungen, die nach der Entnahme des Materials durch Änderung des Milieus entstehen können, vermieden werden. Gegebenenfalls wurden die Zellkulturen mit einem Growth-Factor-Mix supplementiert (z.B. ALL-Mix, AML-Mix). Pro Kultur wurden maximal 0,5 ml KM-Aspirat oder peripheres Blut hinzugegeben. Dieses Vorgehen geschah in Abhängigkeit von der Leukozytenzahl im peripheren Blut zum Zeitpunkt der Materialentnahme, welche dem Labor von den Einsendern mitgeteilt wurde. Als Richtwert galt: 10.000 Leukozyten/ $\mu$ l Blut = 0,5 ml auf 5ml Medium, dieses entspricht ca.  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml Medium.

#### c. Kultivierung

Die Kulturröhrchen wurden verschraubt und schrägstehend für (4h), 24h, 48h und/oder 72h bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Dabei war es wichtig sie jeden Tag einmal vorsichtig zu mischen, damit die nach unten sedimentierten Zellen optimaler mit Nährstoffen versorgt wurden.

#### d. Ernte der Zellen und Präparation

Am Morgen des jeweiligen Erntetages wurde die Zellkultur durch Zugabe von jeweils 0.1 ml des Spindelgiftes Colchizin (Colcemid®) abgebrochen. Die Colcemid-Endkonzentration betrug 0,2  $\mu$ g/ml Medium. Die Röhrchen wurden zur Durchmischung vorsichtig über Kopf gekippt und für 2h bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Zusätzlich wurden zur Verhinderung von DNA-Verklumpungen 50  $\mu$ l DNase zugegeben. Die Kulturen wurden nach Ablauf der 2h-Colcemid-Einwirkungszeit auf

einem Vortex-Schüttler vorsichtig gemischt und anschließend bei 195 g für 7 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet von Hand sorgfältig resuspendiert. Auf einem Vortex schüttelnd wurden ca. 7 ml 0,075M hypotone KCl-Lösung (RT) schnell eingefüllt, wobei auf eine homogene Durchmischung geachtet wurde. Die KCl-Lösung blieb für 15 min bei RT auf den Zellen (hypotoner Schock), anschließend wurde bei 95 g für 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet vorsichtig von Hand resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden 0,5 ml eiskaltes Fixativ bei leichtem Schütteln innerhalb von ca. 30 sec zugegeben, dann mit 7 ml Fixativ bei schnellem Schütteln aufgefüllt und anschließend bei ca. 160 g für 7 min abzentrifugiert. Nun wurde noch mindestens zweimal in gleicher Weise 7 ml Fixativ aufgefüllt und wieder abzentrifugiert bis der Überstand klar und das Pellet weiß war. Zum Ende dieser Waschschrte wurden entweder sofort Präparate hergestellt oder die Fixate in Kryoröhrchen gefüllt und bei -20°C archiviert. Archivierte Fixate wurden vor dem Auftropfen erneut zweimal mit frischem Fixativ gewaschen, um die Qualität der Chromosomenpräparate zu verbessern. Vor der Herstellung von Chromosomenpräparaten wurde die Dichte der Zellsuspension so eingestellt, dass eine leicht milchige Flüssigkeit entstand. Eine derart eingestellte Suspension war notwendig, damit eine optimale Zelldichte auf den Präparaten erzielt wurde.

#### e. Vorbereitung der Objektträger

Damit Chromosomen und Zellkerne auf dem Glas eines Objektträgers (OT) optimal haften können, müssen diese vollkommen fettfrei sein. Um dieses zu erreichen wurde eine entsprechende Anzahl Objektträger (Menzel, mit Mattrand) für mindestens 30 min in vergälltem 100% Ethanol entfettet, anschließend viermal mit A. bidest gewaschen und im Wasser stehend mit Eiswürfeln aus A. bidest. bedeckt und im Kühlschrank bis zur weiteren Verwendung bei 4-8°C gekühlt. Die Verwendung eisgekühlter, nasser OT verbessert die Spreitung der sChromosomen. Zusätzlich wurde in einer feuchten Kammer aus Edelstahl aufgetropft, in der ein höherer Wasserdampf-Druck als in der Umgebungsluft herrschte. Diese war auf einer 42°C warmen Heizplatte platziert. Hierdurch konnten jeweils gleichbleibende Bedingungen erzielt werden. Durch den Einsatz einer hohen Luftfeuchtigkeit kann die Chromosomenspreitung zusätzlich verbessert werden, da einerseits direkt nach dem Auftropfen Ethanol aus dem Zellkern

verdampft und andererseits gleichzeitig Wasser eindringt, was den Zellkern zum Platzen bringt und so die Chromosomen freigelegt werden.

#### f. Auftropfen

Die gut eingestellte Zellsuspension wurde in eine Glas-Pasteurpipette aufgenommen und ca. 8 Tropfen aus unterschiedlicher Höhe auf den eisgekühlten, nassen Objektträger aufgetropft und dieser anschließend korrekt beschriftet. Die Qualität der Präparate wurde unmittelbar nach deren Trocknung unter dem Mikroskop (Phasenkontrast) kontrolliert und ggf. ein weiteres Präparat hergestellt. Bis zur späteren Färbung/Bänderung der Objektträger wurden diese anschließend (geschützt vor manueller Einwirkung) bei Raumtemperatur mindestens 36 Stunden gealtert. Die restliche Zellsuspension wurde mit Fixativ auf 4 ml aufgefüllt und zur späteren Verwendung (z.B. FISH-Analysen) in Kryoröhrchen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Pro Kultur wurde in der Regel ein Präparat hergestellt.

### 5.1.3 Chromosomenfärbung

Für die Chromosomenbandenanalysen wurden wie oben hergestellte und gealterte Präparate aus heparinisiertem Blut oder Knochenmarkproben verwendet. Die Chromosomen wurden durch die ASG-Färbung (Acetic Saline und Giemsa-Chromosomenbanden-Färbung), modifiziert nach Fonatsch (Fonatsch et al. 1980), gebändert. Hierzu wurden maximal zwei Chromosomenpräparate pro Gefäß in einer fest verschließbaren Plastikzuvette über Nacht bei  $60^{\circ}\text{C}$  in einer Lösung von 0,03M tri-Natriumcitrat und 0,095M NaCl im Wärmeschrank inkubiert und danach in einer 5% Giemsa-Lösung in Phosphatpuffer für 2-3 min gefärbt. Nach Lufttrocknung und ca. zweistündiger Inkubation bei  $60^{\circ}\text{C}$  im Trockenschrank wurden die Präparate mit Corbit-Balsam und einem 24x60 mm Deckgläschen eingedeckt.

## 5.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

### 5.2.1 Grundlagen der Technik

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurde gegen Ende der 60er Jahre basierend auf den Arbeiten zur situ-DNA-DNA-Hybridisierung von Gall und Pardue (Pardue & Gall 1969) entwickelt. Die FISH-Technik verbindet zytogenetische und molekulargenetische Techniken. Daher ist für diese Methode auch der Begriff „molekularzytogenetische Analyse“ gebräuchlich.

Bei der FISH werden an ganze Chromosomen oder spezifische Chromosomenabschnitte fluorochrom-markierte, komplementäre DNA-Sonden anhybridisiert, so dass diese unter UV-Auflicht unter Zuhilfenahme spezifischer UV-Filter identifiziert werden können. Die Größe der hierbei eingesetzten Sonden-DNA kann von 0,01Mb bis > 1Mb betragen. In der Regel sind Sonden für lokusspezifische Proben 150 kb bis 800 kb groß. Größere DNA-Fragmente können Probleme haben die Zielsequenz zu penetrieren oder sie formen große Aggregate, welche die Hintergrundstrahlung erhöhen und die verfügbare Menge an Sondenmaterial verringern.

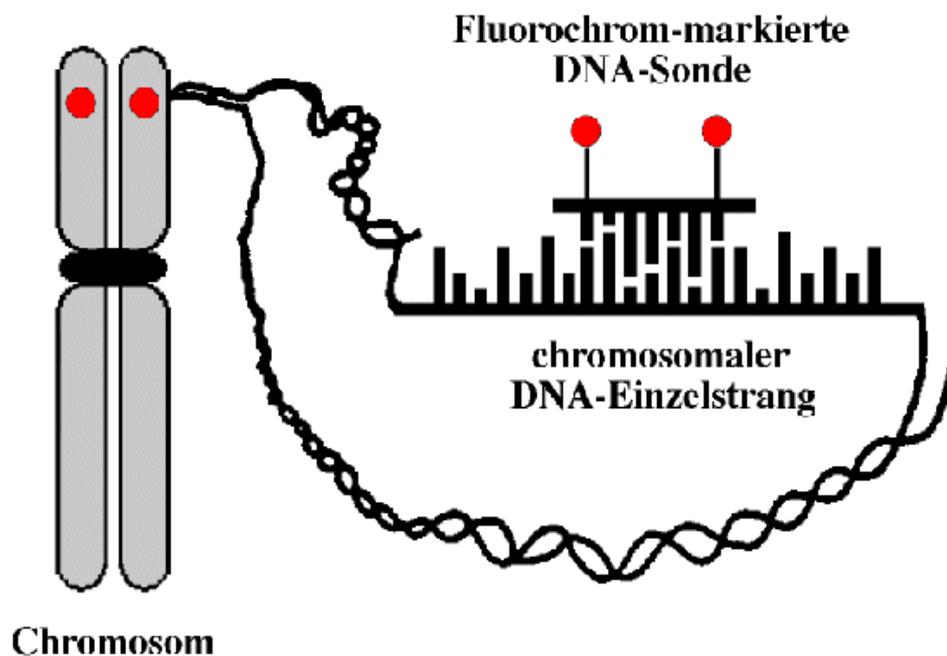


Abbildung 11: Schematische Darstellung der FISH-Technik.

Die spezifischen DNA-Sonden werden entweder mittels eines PCR-Schrittes oder Nick-Translation direkt mit einem Fluorochrom markiert oder werden mit einem Hapten (i.d.R. Biotin) markiert an das in einem zusätzlichen Detektionsschritt ein avidingekoppeltes Fluorochrom anhybridisiert wird. Bei direkt markierten Sonden werden Fluorochrom-markierte Nucleotide in die DNA-Sonden eingebaut, die ein ausreichend starkes Signal für die mikroskopische Analyse emittieren und somit kein zusätzliches Detektionsverfahren notwendig ist.

Bei der in-situ-Hybridisierung wird die Eigenschaft von Einzelstrang-DNA genutzt, sich an korrespondierende Einzelstrang-Sequenzen anzulagern. Daher ist diese Technik je nach Fragestellung sowohl im Interphasezellkern als auch an Metaphasechromosomen anwendbar. So wird es zum Beispiel möglich, die Anzahl der Kopien eines einzelnen Chromosoms oder –bereiches auch dann zu ermitteln, wenn keine Zellen in Teilung zu finden sind (z.B. bei Direktpräparationen, Ausstrichen, unkultiviertem Gewebe, Tumorschnitten, Kulturversagern).

Um eine Hybridisierung der in Hybridisierungspuffer + Formamid befindlichen spezifischen DNA-Sonden an die Ziel-DNA (i.d.R. Chromosomenpräparate auf Objektträger) zu erreichen, werden beide unter definierten Bedingungen nahe des DNA-Schmelzpunktes bei ca. 72 – 74°C denaturiert. Die anschließende Hybridisierung der beiden komplementären Einzelstränge findet unter humiden Bedingungen für mehrere Stunden bei 37°C in einer feuchten Kammer statt. Die hierfür benötigte Hybridisierungsdauer hängt von der Art der eingesetzten Sonden ab.

Durch stringente post-Hybridisierungs-Waschungen wird überschüssige, nicht gebundene DNA entfernt, die ansonsten bei der mikroskopischen Auswertung zu verstärkter Hintergrundstrahlung oder zu Störsignalen führen kann.

Die mikroskopische Auswertung erfolgt an einem Auflicht Fluoreszenz-Mikroskop mit einer 100 W Quecksilberdampf Lampe unter Zuhilfenahme von speziellen Anregungs-Filtern, die nur bestimmte Wellenlängen des Lichtes durchlassen und so für jedes eingesetzte Fluorochrom spezifisch sind (Optimum des Fluorochroms). DNA-Sonden können aus einer selber erstellten Bibliothek mittels PCR selbst hergestellt werden oder es werden kommerziell erhältliche Sonden verwendet.

Bei den verwendeten komplementären DNA-Sonden kann es sich je nach Fragestellung um locus-, telomer- und zentromerspezifische Sonden sowie ganzchromosomale oder armspezifische Paintsonden handeln. Falls es darum geht, die Anzahl der Kopien eines

Chromosoms zu bestimmen (z.B. Monosomien oder Trisomien), wird in der Regel eine zentromerspezifische Sonde, die mit einem bestimmten Fluorochrom markiert wurde, verwendet. Meistens wird dabei eine zweite, für ein anderes Chromosom codierende Sonde, die mit einem unterschiedlichen Fluorochrom markiert wurde, als Kontrollsonde hinzugegeben. Die Kombination von zwei Fluorochromen und zwei Chromosomenloci macht man sich ebenfalls zunutze, um den Nachweis einer Mikrodeletion zu führen. Hierbei wird eine lokusspezifische Sonde mit einer weiteren locusspezifischen oder zentromerspezifischen Sonde desselben Chromosoms kombiniert. Zwei unterschiedlich markierte locusspezifische Sonden, die denselben Locus telomer- und zentromerseitig flankieren und sich dabei überlagern werden als so genannte „Break Apart-Sonden“ zur Detektion von Rearrangements unter Beteiligung eines bestimmten Bruchpunktes verwendet. Das durch die Überlagerung der beiden Sonden entstehende Fusionssignal wird im Falle eines Rearrangements in zwei unterschiedlichfarbige Einzelsignale gesplittet. Umgekehrt verhält es sich im Falle der Translokationssonden, die zur Detektion bekannter Translokationen verwendet werden. Im Falle einer Translokation entsteht durch die Zusammenlagerung zweier unterschiedlich markierter Chromosomenloci ein Fusionssignal. Die Existenz verschiedener Fluorochrome und die Entwicklung spezifischer Filter lassen darüber hinaus eine Kombination von mehr als zwei Sonden zu.

Die voran stehend beschriebenen Verfahren können sowohl zur Analyse von Metaphase- als auch Interphasechromosomen verwendet werden. Im Gegensatz dazu werden Paintsonden ausschließlich zur Analyse von Metaphasechromosomen verwendet. Auch hierbei können mehrere Fluorochrome verwendet werden mit denen z.B. p- und q-Arm spezifische Sonden für ein Chromosom oder für unterschiedliche ganze Chromosomen markiert werden (z.B. zur Darstellung einer Translokation oder großen Deletion).

Eine Besonderheit bei der Kombination von Fluorochromen stellt die 24-Farben- oder auch Multicolor-FISH dar. Ziel dieser Analysemethode ist die gleichzeitige Darstellung und Identifikation aller 24 Chromosomen. Bei dieser 1996 entwickelten Methode (Speicher *et al.* 1996) werden die Chromosomen mit einer Kombination unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe so markiert, dass der gesamte Chromosomensatz durch Multispektral-Klassifizierung karyotypisiert werden kann. Obwohl es eine beachtliche Anzahl von Fluorochromen gibt, reicht diese dennoch nicht

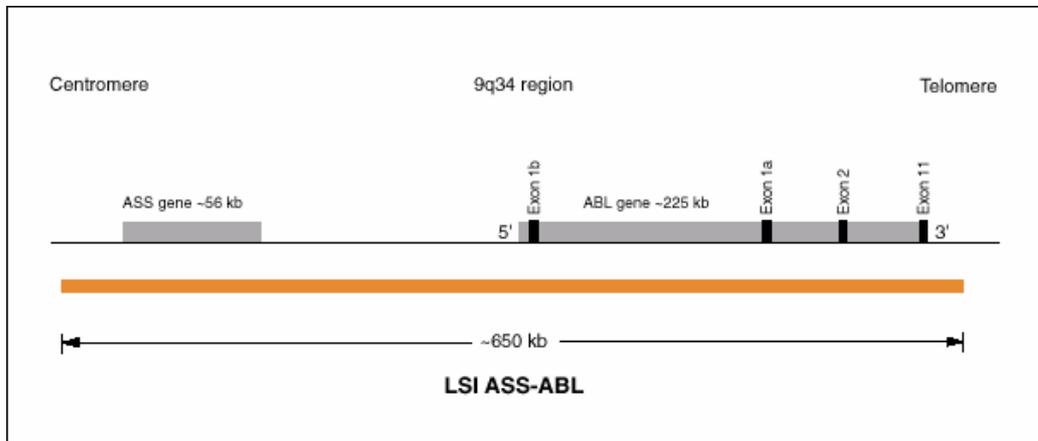
aus, um alle 24 verschiedenen Chromosomen eines kompletten Chromosomensatzes mit einem jeweils spezifischen Fluorochrom zu markieren. Dabei werden bei der M-FISH die Chromosomen mit fünf verschiedenen Fluorochromen markiert. Das erlaubt  $2^5 = 32$  verschiedene Kombinationen, so dass Klassifikation der Chromosomen auf binären Informationen beruht und daher auch als ‚combinatorial labelling‘ bezeichnet wird. Die für die M-FISH Technik notwendigen Fluoreszenzfarbstoffe zu finden, ist eine Aufgabe mit vielen Parametern. Es steht lediglich eine beschränkte Anzahl organischer Fluorochrome zur Verfügung, die an die Chromosomen gebunden werden können. Um die Fluoreszenzen durch Filter optimal voneinander trennen zu können, ist eine möglichst breite Verteilung über die beschränkte spektrale Bandbreite anzustreben, so dass sich die Spektralbereiche der einzelnen Fluorochrome möglichst nicht überlappen. Zudem sollte das Absorptionsspektrum gegenüber dem Emissionsspektrum verschoben sein (Stokes-Verschiebung), damit das absorbierende Licht herausgefiltert werden kann, und so nur das erwünschte emittierte Licht im Bild erscheint. Auch das Spektrum der Lampe muss mit den Filtern und Absorptionsspektren harmonisieren. Eingesetzt werden Xenon-Lampen, Quecksilber-Xenon-Lampen, Halogen-Lampen und mehrere Laser-Lichtquellen. Einige Sonden sind nur mit einem Fluorochrom, andere mit zwei oder drei verschiedenen Fluorochromen markiert. Um jedem Chromosom eine einzigartige Farbkennung zuzuordnen, wird bei der 24-Farben-FISH die Sonden-DNA eines jeden Chromosoms mit bis zu drei Fluorochromen gleichzeitig markiert. Als Ergebnis dieser Kombination erhält jedes Chromosom ein spezifisches Farbspektrum und eine spezifische Fluorochromkombination. Mittels Multicolor-FISH können ganzchromosomale Zugewinne und Verluste eindeutig zugeordnet sowie interchromosomale Umbauten wie Translokationen, Additionen, Insertionen und komplexe Rearrangements bzw. die chromosomale Herkunft von Markerchromosomen identifiziert werden. Zur Analyse intrachromosomalen Rearrangements wie Duplikationen oder Inversionen oder von kleineren Deletionen ist diese Methode nicht geeignet. Das Auflösungsvermögen dieser Methode liegt mit maximal 10Mbp ungefähr in der Größenordnung einer Chromosomenbande. Die Auswertung einer M-FISH Färbung ist nur mit Hilfe einer speziellen Software möglich. Der Methode des M-Bandings liegt das gleiche Prinzip der Kombination von Fluorochromen zugrunde, wobei hier die einzelnen Banden eines Chromosoms mit unterschiedlichen Fluorochrom-Kombinationen markiert werden.

### 5.3 Molekularzytogenetische Untersuchung der *t(9;22)(q34;q11)* und ihrer Sekundäraberrationen

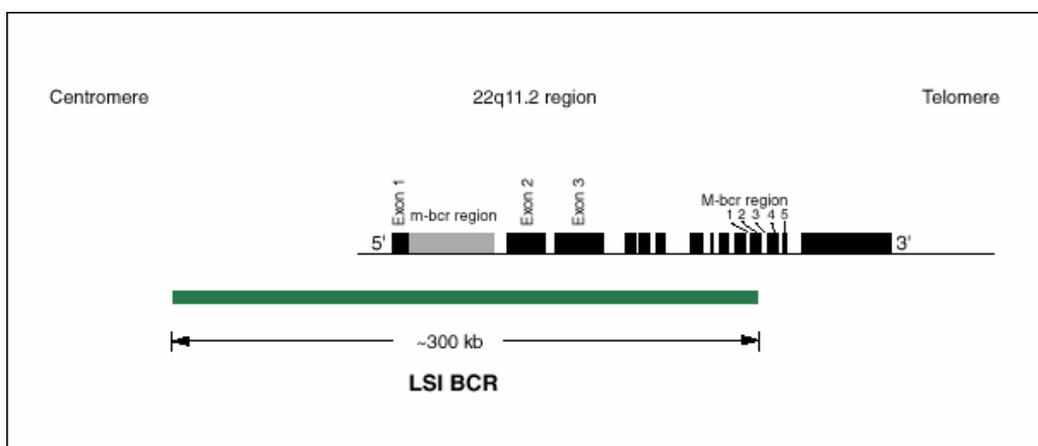
#### 5.3.1 Beschreibung der lokus-spezifischen Translokations-Sonden

In meinen Untersuchungen verwendete ich ausschließlich direkt markierte, kommerziell erhältliche DNA-Sonden der Firma Vysis. Als Fluorochrome wurden Spectrum Orange<sup>TM</sup> (TRITC) und Spectrum Green<sup>TM</sup> (FITC) verwendet (LSI BCR/ABL ES mit *abl* auf 9q34 und *bcr* auf 22q11.2). Die Gegenfärbung der Chromosomen-DNA erfolgte mit DAPI (4'-6'-Diamidino-2Phenylindol).

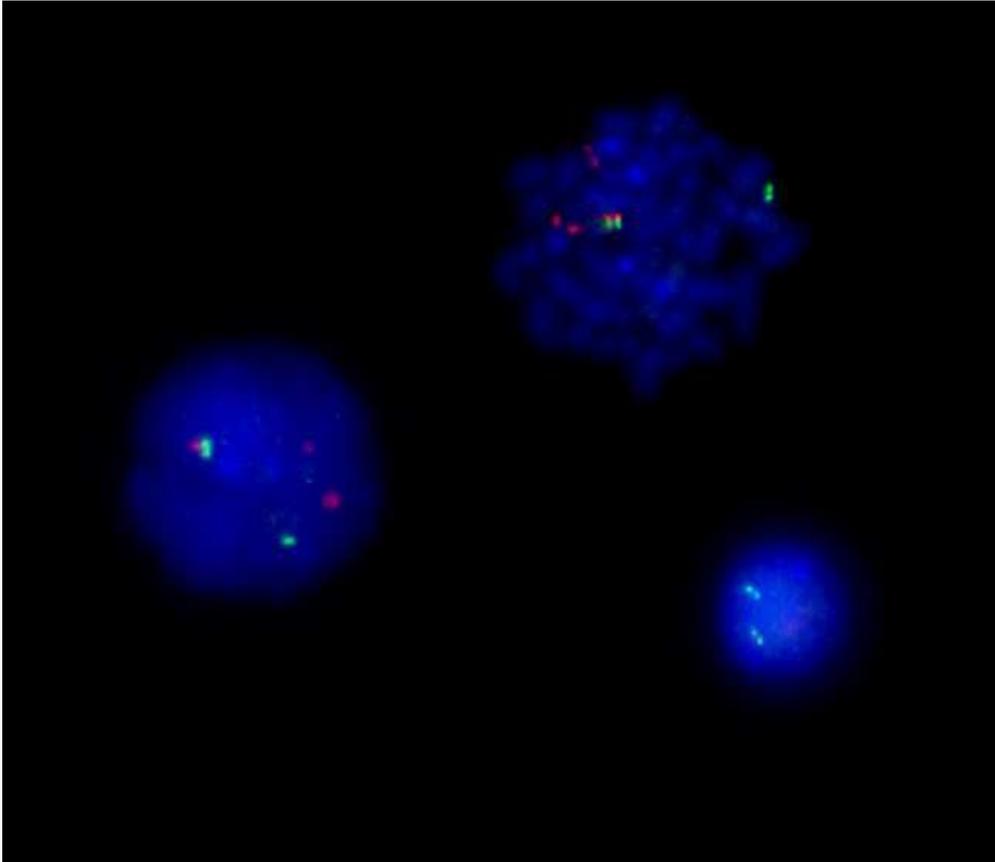
Mit diesen Translokations-Sonden kann die *bcr/abl*-Fusion (Philadelphia-Translokation) der Chromosomen 22 und 9 sowohl bei einer Beteiligung der Major (M) als auch der minor (m) Bruchpunktregion des *bcr*-Gens auf Chromosom 22 nachgewiesen werden. Auf der 9q34-Bande umfasst die Sonde mit einer Größe von ca. 650 kb am 5'-Ende das ca. 65 kb große *ASS*-Gen bis zum 3'-Ende zum Exon 11 mit dem ca. 225 kb großen *abl*-Gen zwischen Exon 1b und 1a. Auf der 22q11.2 Region umfasst die ca. 300 kb große Sonde Exon 1 am 5'-Ende bis zur *M-bcr*-Region am 3'-Ende. Die *bcr*-Sonde war mit dem Fluorochrom Spectrum Green<sup>TM</sup> und die *abl*-Sonde mit dem Fluorochrom Spectrum Orange<sup>TM</sup> direkt markiert. Bei einer Fusion unter Beteiligung der M-Bruchpunktregion findet man typischerweise neben je einem roten und grünen Signal auf den normalen Chromosomen 9 und 22 ein gelbes Fusionssignal bestehend aus *bcr*- und *abl*-Anteilen, welches sich auf dem derivativen Chromosom 22 befindet. Zusätzlich wird ein kleines rotes Signal für den auf dem derivativen Chromosom 9 verbliebenen *abl*-Rest gefunden. Falls der Bruch in 22q11.2 in der m-Bruchpunktregion stattfindet, werden neben je einem roten und grünen Signal auf den normalen Chromosomen 9 und 22 je ein Fusionssignal auf dem derivativen Chromosom 22 und dem derivativen Chromosom 9 gefunden.



**Abbildung 12: Lage der verwendeten Sonden auf dem Chromosom 9 (Abbildung entnommen aus dem Katalog der Fa. Vysis).**



**Abbildung 13: Lage der verwendeten Sonden auf dem Chromosom 22 (Abbildung entnommen aus dem Katalog der Fa. Vysis).**



**Abbildung 14: Sondenkombination der BCR/ABL ES-Sonde bei Fusion von *bcr* (grün) und *abl* (rot) mit Bruchpunkt im minor-Breakpoint von *bcr*. Der auf dem derivativen Chromosom 9 verbliebene Rest von *abl* ist als schwächeres Extrasignal erkennbar.**

### 5.3.2 Beschreibung der Multicolor-FISH-Sonden

In meinen Untersuchungen verwendete ich das 24XCyte Human mFISH (Multicolor FISH) Painting Kit der Firma MetaSystems. Dieses Kit enthält 24 verschiedene Paint-Sonden, die für die 24 verschiedenen menschlichen Chromosomen spezifisch sind. Die Sonden waren mit den Fluorochromen DEAC (Diethylamino-coumarin), FITC (Fluoresceinisothiocyanat), Spectrum Orange™, Texas Red® und Cy™5 markiert. Jede Paint-Sonde wurde mit einem von fünf verschiedenen Fluorochromen oder einer einmaligen Kombination dieser Fluorochrome markiert, wobei bis zu drei Fluorochrome miteinander kombiniert worden waren. Die chromosomspezifischen Fluorochrom-Kombinationen sind in Abbildung 12 dargestellt. Die Gegenfärbung der Chromosomen-

DNA erfolgte mit DAPI/Antifade (4'-6'-Diamidino-2Phenylindol), welches ebenfalls im Kit enthalten war.

#	DEAC Ex 426nm/ Em 480nm	FITC Ex 502nm/ Em 530nm	Spectrum Orange™ Ex 559nm/ Em 588nm	Texas Red® Ex 595nm/ Em 615nm	Cy™5 Ex 649nm/ Em 670nm
1					
2	DEAC				
3				Texas Red	
4		FITC			
5			Spectrum Orange		
6		FITC			Cy5
7	DEAC				
8				Texas Red	Cy5
9			Spectrum Orange		Cy5
10	DEAC	FITC		Texas Red	
11		FITC		Texas Red	
12		FITC	Spectrum Orange		
13	DEAC			Texas Red	
14	DEAC		Spectrum Orange		
15			Spectrum Orange	Texas Red	
16	DEAC	FITC			Cy5
17		FITC		Texas Red	Cy5
18		FITC	Spectrum Orange		Cy5
19	DEAC			Texas Red	Cy5
20	DEAC		Spectrum Orange		Cy5
21			Spectrum Orange	Texas Red	Cy5
22	DEAC	FITC		Texas Red	Cy5
X	DEAC	FITC	Spectrum Orange		
Y	DEAC		Spectrum Orange	Texas Red	

Abbildung 15: 24Xyte Markierungsschema (Abbildung wurde entnommen aus dem Katalog der Fa. Metasystems).

### 5.3.3 FISH-Analysen

#### 5.3.3.1 Vorbereitung der Objektträger und Herstellung von Chromosomen-Präparaten für FISH-Analysen

Für die erfolgreiche FISH-Analyse ist die Beschaffenheit der verwendeten Objektträger von großer Wichtigkeit. Laborinterne Test (hier nicht dargestellt) hatten ergeben, dass Objektträger der Firma Marienfeld die beste Zellhaftung gewährleisteten. Bevor eine Zellsuspension nach Direktpräparation oder Zellkultur auf den Objektträger aufgetropft wurde, musste dieser völlig fettfrei sein. Eine erforderliche Menge Objektträger wurde

für mindestens 30 Minuten in vergälltes 100%iges Ethanol gestellt. Anschließend wurde der Alkohol in mindestens drei Waschschrritten mit destilliertem Wasser entfernt. Für den letzten Waschschrtritt wurde, um Rückstände auf dem OT zu vermeiden, hochreines Ampuwa-Wasser (B.Braun) verwendet und auf den OT's belassen. Damit die OT's eiskalt waren, wurden sie mit Eiswürfeln aus Ampuwa überschichtet und bis zur Verwendung bei 4-8°C gelagert. Die OT wurden täglich frisch vorbereitet.

Vor dem Auftropfen wurde die Zellsuspension bei 900 U/min für 7 Minuten abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und verworfen und das Pellet auf die gewünschte Zelldichte eingestellt. Unter Zuhilfenahme einer ungebrauchten Pasteurpipette wurden bis zu vier Tropfen auf den noch nassen, kalten OT aus einer Höhe von ca. 8 cm auf ein Hybridisierungsareal aufgetropft. Anschließend wurde das Präparat auf seine Beschaffenheit, sowie gegebenenfalls auf Mitosenindex und Qualität der Metaphasen im Mikroskop (Phasenkontrast) kontrolliert und bei Raumtemperatur mindestens 2 Stunden bei 60°C, am besten über Nacht bei RT, luftgetrocknet.

Wenn die Zellpräparate durch eine Direktpräparationen von Knochenmark und peripherem Blut hergestellt werden mussten, wurden je nach Anzahl der Leukozyten im aktuellen Blutbild des Patienten zu gleichen Teilen das Untersuchungsmaterial und hochreines, unsteriles destilliertes Wasser in einem 12ml Zentrifugenröhrchen gemischt. In der Regel wurden 2 ml Material + 2 ml Wasser verwendet und je zwei Zentrifugenröhrchen angelegt. Anschließend wurde bei 95g für 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet von Hand resuspendiert. Auf einem Vortex-Schüttler wurden dann bei schnellem Schütteln zügig 7 ml eiskaltes Fixativ hinzugefügt. Bei ca. 160g wurde anschließend für 7 min abzentrifugiert und der Vorgang noch 2 – 3mal wiederholt, die Zelldichte eingestellt und Präparate hergestellt bzw. die Suspension bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **5.3.3.2 Durchführung von FISH-Analysen**

#### **5.3.3.2.1 FISH mit LSI-Sonden**

##### **a. Herstellung der Präparate**

Präparate für die FISH-Analysen mit der BCR/ABL ES-Sonde wurden nach oben genannter Methode hergestellt (siehe Kapitel 5.1.3 und 5.3.3.1). Um sparsam mit dem

vorhandenen Material umzugehen, reichte es aus pro Hybridisierungsfeld von etwa 22x22mm ca. 4 Tropfen der gut eingestellten Zellsuspension aufzutropfen.

b. Denaturierung der Zellkerne mit NaOH

Die nachstehenden Arbeitsschritte wurden alle in POM-Gefäßen durchgeführt:

Die Objektträger wurden je 1 min in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert (100%, 70%, 50%, 30% Ethanol), dann 1 min in 0,1 x SSC/pH 7,0 bei RT gewaschen (1 x SSC = 0,15M NaCl, 0,017M Na-Citrat) und anschließend 30 min in 2 x SSC/pH 7,0 bei 70° im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Objektträger in der 2 x SSC stehend im Wasserbad auf 37°C heruntergekühlt und 1 min in 0,1 x SSC bei RT gewaschen, danach bei RT 1-2 min in 0,07 N NaOH denaturiert. Im Anschluss daran wurden die Präparate je 1 min in 4°C kalter 0,1 x SSC/pH 7,0 und 4°C kalter 2 x SSC/pH 7,0 gewaschen. Danach wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 100%) dehydriert. Nach einer Trocknungszeit von mindestens 30 min konnte die in der Zwischenzeit ebenfalls denaturierte Sondenmischung (s.u.) aufgetragen werden.

c. Vorbereitung, Denaturierung und Auftragen der DNA-Sonden, Hybridisierung

Die LSI BCR/ABL ES-Sonde wurde nach Hersteller-Anleitung direkt vor der Verwendung gemischt. Die Mischung erfolgte in lichtundurchlässigen braunen Eppendorff-Reaktionsgefäßen, die vorher autoklaviert worden waren. Die lichtempfindlichen Sonden und der Hybridisierungspuffer wurden im Dunkeln auf RT aufgetaut, kurz gevortext und 1-3 sek abzentrifugiert und die benötigte Menge Sondenmix hergestellt. Der Ansatz (10µl pro Hybridisierungsareal) wurde in dem Eppendorff Reaktionsgefäß für 5 min bei 75°C in einem Wasserbad denaturiert, anschließend kurz abzentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung auf einer 45°C warmen Heizplatte warm gehalten. Die luftgetrockneten, zuvor denaturierten Objektträger wurden auf der Heizplatte ebenfalls für einige Minuten angewärmt, 10µl Sondenmix (Mikroliterpipette) vorsichtig auf ein Hybridisierungsfeld aufgetragen und sofort mit einem Deckglas 22x22mm eingedeckt und mit FIXOGUM Gummilösung versiegelt, wodurch ein Verdunsten der Sonde unterbunden werden sollte. Anschließend wurden die Präparate über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank in einer feuchten Kammer

liegend (mit feuchten Tüchern ausgelegte Edelstahlkammer) inkubiert, damit Ziel- und Sonden-DNA unter optimalen Bedingungen hybridisieren konnten.

#### d. Posthybridisierungswaschungen und Gegenfärbung

Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden bei gedämpftem Licht durchgeführt. Im Anschluss an die Hybridisierungszeit wurden die Deckgläschen vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette von den Objektträgern abgehoben und diese dann für 5 Minuten bei  $75 \pm 1^\circ\text{C}$  in  $1 \times \text{SSC}/\text{pH } 7,0$  gewaschen, um überschüssige bzw. unspezifisch gebundene Sonden-DNA zu entfernen. Nach weiteren 5 Minuten in  $2 \times \text{SSC}/0.1\% \text{ Triton } \times 100 \text{ pH } 7,0$  bei RT, wurden die Chromosomen bzw. Zellkerne der noch nassen Präparate für mindestens 2 Minuten in einer DAPI-Lösung (4'-6'-Diamidino-2Phenylindol), gegengefärbt. Zur Konservierung der Fluoreszenz wurde auf das Hybridisierungsfeld der noch feuchten Präparate jeweils ein Tropfen kommerziell erhältliches Eindeckmedium (Vectashield Antifade) aufgetragen und mit einem Deckglas  $24 \times 50 \text{ mm}$  eindeckt. Die nun für die Fluoreszenzmikroskopie fertigen Objektträger wurden bis zur Analyse am Fluoreszenzmikroskop kühl und dunkel in einem  $4^\circ\text{C}$ -Kühlschrank aufbewahrt. Nach diesem Verfahren erstellte und gelagerte FISH-Präparate sind über Jahre haltbar.

#### 5.3.3.2.2 *Multicolor-FISH*

##### a. Herstellung der Präparate

Da bei der Multicolor-FISH-Analyse die Anzahl und Qualität der zur Verfügung stehenden Mitosen von großer Wichtigkeit ist, wurden die M-FISH Präparate wie Präparate für die Chromosomenbandenanalyse hergestellt (siehe Kapitel 5.1.3) und anschließend unter dem Lichtmikroskop im Phasenkontrast beurteilt. Bei einem guten Mitosenindex war ein Hybridisierungsfeld von etwa  $22 \times 22 \text{ mm}$  ausreichend, hierfür wurden ca. 4 Tropfen der gut eingestellten Zellsuspension verwendet. Bei einem niedrigen Mitosenindex wurde auf demselben Objektträger ein zweites oder deutlich größeres Hybridisierungsfeld angelegt, um dadurch die Anzahl der analysierbaren Mitosen zu erhöhen. Die Präparate wurden am Tag vor der Hybridisierung hergestellt und übernacht bei Raumtemperatur gealtert.

b. Vorbehandlung und Denaturierung der Chromosomenpräparate

Die nachstehenden Arbeitsschritte wurden alle in POM-Gefäßen durchgeführt:

Die Objektträger wurden je 1 min in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert (100%, 70%, 50%, 30% Ethanol), dann 1 min in 0,1 x SSC/pH 7,0 bei RT gewaschen und anschließend 30 min in 2 x SSC/pH 7,0 bei 70° im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Objektträger in der 2 x SSC stehend im Wasserbad auf 37°C heruntergekühlt und 1 min in 0,1 x SSC bei RT gewaschen, danach bei RT 1-2 min in 0,07 N NaOH denaturiert. Im Anschluss daran wurden die Präparate je 1 min in 4°C kalter 0,1 x SSC/pH 7,0 und 4°C kalter 2 x SSC/pH 7,0 gewaschen. Danach wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 100%) dehydriert. Nach einer Trocknungszeit von ca.10 min konnte der in der Zwischenzeit ebenfalls denaturierte Sondenmix (s.u.) auf das Hybridisierungsareal aufgetragen werden.

c. Denaturierung der Sonden und Hybridisierung

Pro 24x24 mm Deckgläschen wurden 12µl des gebrauchsfertigen Sondenmix in ein zuvor autoklaviertes, lichtundurchlässiges Eppendorff-Reaktionsgefäß pipettiert. Der Sondenmix wurde vorher im Dunkeln bei RT aufgetaut, kurz gevortext, 1-3 sek abzentrifugiert und die benötigte Menge entnommen. Der Sondenmix wurde in dem Eppendorff Reaktionsgefäß für 5 min bei 75°C in einem Wasserbad denaturiert, anschließend kurz (ca. 30 sek) auf Eis gestellt und dann für 30 min im 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Die luftgetrockneten, zuvor denaturierten Objektträger mit den Chromosomenpräparaten wurden auf einer ebenfalls 37°C warmen Heizplatte kurz vorgewärmt. Vor dem anschließenden Auftragen des Sondenmix wurde dieser kurz abzentrifugiert, 12 µl Sondenmix mit einer Mikroliterpipette vorsichtig und möglichst luftblasenfrei auf ein 24x24 mm Deckgläschen aufgetragen und dieses möglichst luftblasenfrei auf das Hybridisierungsareal aufgelegt. Das Deckgläschen wurde mit FIXOGUM Gummilösung umrandet, wodurch ein Verdunsten der Sonde unterbunden werden sollte. Nach Antrocknung des FIXOGUM (unter Lichtschutz) wurden die Präparate in eine bei 37°C vorgewärmte feuchte Kammer (mit feuchten Tüchern ausgelegte Edelstahlkammer) gelegt und diese dann für drei Tage bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert, damit Ziel- und Sonden-DNA unter optimalen Bedingungen hybridisieren konnten. Während der Hybridisierungszeit war es sinnvoll, die feuchte

Kammer auf eine eventuelle Austrocknung hin zu kontrollieren und gegebenenfalls etwas Wasser nachzufüllen. Es war dabei jedoch wichtig, dass keine Kondensationstropfen vom Deckel der feuchten Kammer auf die Präparate fallen konnten, weil dieses die Signalqualität negativ beeinflusste.

#### d. Posthybridisierungswaschungen

Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden bei gedämpften Licht durchgeführt.

Nach drei Tagen Hybridisierung wurden die Chromosomenpräparate der feuchten Kammer entnommen und das FIXOGUM vorsichtig abgezogen. Die Deckgläschen wurden vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette von den Objektträgern abgehoben und diese dann für 5 Minuten bei  $75 \pm 1^\circ\text{C}$  in  $1\times\text{SSC}/\text{pH } 7,0$  gewaschen, um überschüssige bzw. unspezifisch gebundene Sonden-DNA zu entfernen. Anschließend wurden die Objektträger für 5 min bei RT in  $4\times\text{SSCT}$  inkubiert.

#### e. Detektion der biotin-markierten Sonden mit Cy5, Amplifikation der Cy5-Signale

##### Blocking-Schritt

Auf ein  $24\times 60$  mm Deckgläschen wurden jeweils  $50 \mu\text{l}$  des im Kit enthaltenen Blocking-Reagenz aufpipettiert, das Deckgläschen mit dem Objektträger angehoben und mit dem Objektträger unten liegend für 15 min in einer vorgewärmten feuchten Kammer bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde das Deckgläschen vorsichtig entfernt und der Objektträger in eine Küvette mit  $4\times\text{SSCT}$  überführt.

Zur Amplifikation der Cy5-Signale konnten bis zu drei Detektionsschritte notwendig sein:

Detektion 1: Pro Objektträger wurden  $50 \mu\text{l}$  des Blocking-Reagenz mit  $1 \mu\text{l}$  Detektions-Reagenz 1+3 gemischt und davon  $50 \mu\text{l}$  auf das Hybridisierungsareal gegeben, anschließend mit einem  $24\times 60$  mm Deckgläschen eingedeckt, überschüssige Flüssigkeit vorsichtig entfernt und in einer feuchten Kammer bei  $37^\circ\text{C}$  für 15 min inkubiert. Nach Entfernung des Deckgläschens wurde das Präparat zweimal für jeweils 3 min in  $4\times\text{SSCT}$  bei RT unter sanftem Schütteln gewaschen.

Detektion 2: wie Detektion 1, jedoch wurden  $50 \mu\text{l}$  Blocking-Reagenz mit Detektions-Reagenz 2 vermischt.

Detektion 3: siehe Detektionsschritt 1. Anschließend wurde der Objektträger für 3 min in 1xPBS unter sanftem Schütteln gewaschen und dann stehend im Dunkeln getrocknet.

f. Gegenfärbung

Auf den luftgetrockneten Objektträger wurden 20 µl des im Kit mitgelieferten DAPI/Antifade aufgetragen und dieser dann möglichst luftblasenfrei mit einem 24x60 mm Deckgläschen eingedeckt. Nach Abschluss dieses Procedere war eine sofortige Auswertung der Präparate möglich. Auf diese Weise hergestellte Präparate wurden kurzfristig bei 4°C und langfristig bei -20°C gelagert, ohne dass Qualitätsverluste bemerkbar waren.

## **5.4 Auswertungen**

### **5.4.1 Chromosomenbandenanalysen**

Die ASG-gebänderten und eingedeckten Chromosomenpräparate wurden mit einem Durchlichtmikroskop bei 100facher Vergrößerung in der Übersicht durchgemustert. Die gewünschten Metaphasen wurden dann bei 1000facher Vergrößerung mittels des Aufnahme- und Karyotypisierprogrammes IKAROS der Firma Metasystems dokumentiert, das betreffende Bild mit den entsprechenden Software-Tools optimiert und anschließend karyotypisiert. Zur Aufdeckung klonaler Chromosomenaberrationen wurde in der Regel ein Minimum von 20 Metaphasen pro Patient analysiert. Aufgrund schlechter Teilungsraten konnte diese Anzahl in manchen Fällen nicht erreicht werden. Grundsätzlich galt eine numerische Aberration dann als klonal, wenn sie in mindestens 3 Metaphasen gefunden wurde. Eine klonale strukturelle Aberration musste in einem Minimum von zwei Mitosen vorkommen. Zum Ausschluss von klonalen Aberrationen bei Fällen mit einem normalen Karyotyp musste ebenfalls ein Minimum von 20 Metaphaseplatten analysiert werden. Die Chromosomenbefunde wurden gemäß der international gültigen Standardnomenklatur ISCN 1995 beschrieben und in einer Datenbank gespeichert. In der Regel wurden maximale Bandenauflösungen von ca. 250 bphs erreicht. Bei dieser Chromosomenqualität bleiben viele Veränderungen kryptisch, daher erfolgte in einigen Fällen eine weitere Abklärung der Aberrationen mittels Multicolor-FISH.

## 5.4.2 Fluoreszenz-mikroskopische Auswertung

### 5.4.2.1 Philadelphia-Translokation

Die Fluoreszenz-Signale der FISH-Analysen wurden an einem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Das Fluoreszenz-Mikroskop war ausgestattet mit einer Pinkel-Filterkombination, bei der die Anregungsfilter von Strahlenteiler und Sperrfilter unabhängig wählbar sind. Die für die jeweiligen Fluorochrome benötigten Anregungswellen (-Filter) können gewechselt werden, während Strahlenteiler und Sperrfilter in Position bleiben. Neben Einzelfiltern für jedes Fluorochrom (DAPI, FITC und Texas Red) kam ein Doppelbandfilter zum Einsatz mit dem FITC- und Texas Red-Signale gleichzeitig betrachtet werden können. Mittels dieser Filterkombination konnten die gelben Fusionssignale betrachtet werden. Das Mikroskop war mit einem 100W Quecksilberdampfbrenner ausgestattet.

In die Auswertung wurde jede Kernart miteinbezogen, das heißt die Kerne wurden nicht nach Größe oder Form selektiert. Es wurden jedoch nur solche Zellkerne berücksichtigt, bei denen der gesamte Kern ohne Überlappungen mit anderen Zellkernen oder Artefakten sichtbar war. Für jeden Kern wurde die Anzahl der unterschiedlich-farbigen, eindeutigen Hybridisierungssignale ermittelt und deren Kombination miteinander dokumentiert. Bei eng beieinander liegenden Signalen gleicher Fluoreszenz galt: War der Abstand zwischen den Signalen kleiner als der Durchmesser des größten Signals entsprachen sie einem Signal; War der Abstand größer als der Signaldurchmesser des größten Signals wurden zwei Signale gezählt. Die Signale konnten jedoch „gesplittet“ sein und dadurch einen Abstand größer ein Signaldurchmesser haben. Wenn sie jedoch mit einem sichtbaren DNA-Faden verbunden waren, wurden sie ebenfalls als nur ein Signal gewertet. Zusätzlich zur Anzahl der unterschiedlichen Hybridisierungssignale wurde bewertet, ob eine Zusammenlagerung (Kokalisation/Fusion) von *bcr*- und *abl*-Signalen vorlag. Eine Kokalisation wurde registriert, wenn durch komplette oder teilweise Überlagerung eines FITC und Texas Red-Signals ein eindeutig gelbes Fusionssignal aufleuchtete, entsprechend dem von Chase et al. beschriebenen Bewertungskriterium A (Chase et al. 1997). Um eine zufällige Überlappung von Signalen auszuschließen, die keiner Fusion entsprachen, bzw. um die genaue Anzahl der Signale zu ermitteln, wurde während der Auswertung eines Zellkerns mit dem Feintrieb des Mikroskopes in verschiedenen Tiefen fokussiert. Eine genaue Dokumentation

jeglicher Sondenkonstellation war wichtig, weil diese erste Hinweise auf das Vorliegen einer Zusatzaberration unter Einbeziehung der Chromosomen 9 und 22 liefern konnten (z.B. Isochromosom 9q oder +der(22)t(9;22) oder numerische Abweichungen). Es wurden mindestens (sofern die Zellzahl des Präparates es hergab) 200 Zellkerne in die Auswertung einbezogen. Die Ergebnisse der FISH-Auswertung (Absolutzahlen der einzelnen Sondenkonstellationen) wurden patientenbezogen in ein Formular einer Datenbank eingegeben, welches automatisiert den prozentualen Anteil an Kernen mit einem, bzw. zwei Fusionssignalen errechnete.

#### **5.4.2.1.1 Ermittlung der Cut-Off-Level**

Die Anzahl an Kernen mit Fusionssignal musste über dem Cut-Off-Level (Grenzwert) für die Sondenkombination 2 rote, 1 grünes, 1 Fusionssignal liegen, damit der jeweilige Patient als *bcr/abl*-positiv bewertet wurde. Der Cut-off-Level wurde durch Hybridisierung der BCR/ABL ES-Sonde an Präparaten von unkultiviertem peripherem Blut ermittelt. Dadurch, dass bei jeder Hybridisierung ein Testpräparat mitlief und die jeweiligen Auswertergebnisse in einer ACCESS-Datenbank dokumentiert wurden, konnte über eine große Datenmenge verfügt werden. Aus diesen Daten wurde für jede Sondenkonstellation der Mittelwert und die Standardabweichung aller Untersuchungen gebildet. Der jeweilige Wert des Cut-Off-Level wurde dann aus der Summe des Mittelwertes und der dreifachen Standardabweichung gebildet.

Der Cut-Off-Level für die bei einer Fusion von *bcr* und *abl* typischen Sondenkombination (2 rote Signale, 1 grünes Signal, 1 Fusionssignal) lag bei 6%.

#### **5.4.2.2 Detektion von Chromosomenaberrationen mittels Multicolor-FISH-Analyse**

Die Aufnahme der Mitosen nach Multicolor-FISH Hybridisierung erfolgte ebenfalls an oben aufgeführtem Fluoreszenzmikroskop. Die Präparate wurden bei 400facher Vergrößerung unter Zuhilfenahme eines DAPI-Filters nach geeigneten Mitosen mändernd durchmustert. Geriet eine geeignet erscheinende Mitose in den Focus, wurde auf das 100fach/Öl Objektiv gewechselt und die Mitose bei 1000facher Vergrößerung mittels ISIS-Software (Firma MetaSystems, Altlussheim, Deutschland) aufgenommen. Bei der M-FISH Technik wird für jedes Fluorochrom ein einzelnes Bild aufgenommen, das Aufschluss über die Existenz des Fluorochroms in den einzelnen Chromosomen gibt. Es ist deshalb von entscheidender Bedeutung, dass für die Aufnahme eines Bildes

nur das gewünschte Fluorochrom zum Leuchten angeregt wird, und das Bild nur im Spektralbereich des zu erwartenden emittierten Lichtes aufgenommen wird. Die Belichtung des Chromosomensatzes erfolgte daher mit Licht eines klar abgegrenzten Wellenlängenbereichs und die Bildaufnahme unter Verwendung entsprechender optischer Filter. Die Belichtung und Bildaufnahme erfolgte hierbei für jedes Fluorochrom gesondert, nachdem der entsprechende Filter am Fluoreszenzmikroskop gewechselt wurde. Auf diese Weise wurden sechs Einzelbilder erzeugt, die von der Software zu einem Gesamtbild zusammengefügt wurden. Anschließend erfolgte die Bildanalyse. Diese umfasste die Schritte Bildsegmentierung, Bildverschiebung, Objektgenerierung und –editierung und Klassifikation.

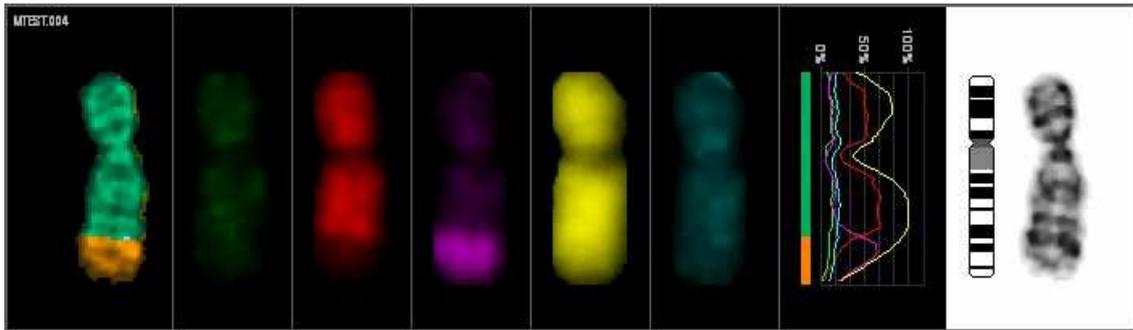
Als Eingangsdaten standen dementsprechend sechs Mikroskopbilder desselben Chromosomensatzes zur Verfügung. Eines der Graustufenbilder dient dabei als Referenzbild (DAPI-Bild) für die Erstellung einer Segmentierungsmaske und für die Segmentierung und Objekterkennung, die anderen fünf sind Fluoreszenzbilder, die den Chromosomensatz innerhalb eines bestimmten spektralen Bereichs (dem des Fluorochroms) abbilden. In den Fluoreszenzbildern erscheint der Hintergrund schwarz und die Chromosomen, falls sie mit der entsprechenden Fluoreszenzfarbe markiert wurden, in helleren Grautönen. Als erster Arbeitsschritt nach der Aufnahme erfolgte eine Bildverschiebung (Pixel Shift). Da die sechs Bilder nacheinander aufgenommen wurden und zwischen den Aufnahmen ein optischer Filter gewechselt wurde, können die Bilder gegeneinander verschoben sein. Mittels des Pixel Shift können die Einzelaufnahmen der Chromosomen genau übereinander gelegt werden. Da das DAPI-Bild als Referenzbild fungiert, werden alle Fluoreszenzbilder gegenüber dem DAPI-Bild verschoben. Dieser Schritt erleichtert die spätere Zuordnung der Chromosomen und verhindert Artefakte an den Chromosomenrändern. Als nächster Bildverarbeitungsschritt erfolgte die Segmentierung. Da in keinem der Fluoreszenzbilder alle Chromosomen leuchten, muss für die Segmentierung ein sechstes Bild in der DAPI-Färbung aufgenommen werden, das alle Chromosomen relativ kontrastreich abbildet. Auf diesem Bild erfolgte die Segmentierung, indem jeweils ein Schwellenwert festgelegt wurde. Anschließend wurden die Objektkonturlinien erzeugt. Da sich die Chromosomen in den Mikroskopbildern jedoch häufig berühren oder gar überlappen, ist durch Anwendung des Schwellenwertes allein keine vollständige

Separation der Chromsomen zu erreichen. Daher mussten die Chromosomencluster zusätzlich durch manuelles Editieren auftrennt werden.

Nachdem alle Chromosomen klar voneinander getrennt wurden, konnte mit der Karyotypisierung begonnen werden, wozu ebenfalls das DAPI-Bild benutzt wurde. Mittels DAPI-Färbung ist es möglich auf den Chromosomen eine Fluoreszenz-Q-Bänderung zu erzeugen, welche, wenn das Bild invertiert wird, wie eine G-Bänderung erscheint. Auf diese Weise ist eine eindeutige Zuordnung der Chromosomen möglich. Außerdem konnte eine eindeutige Zuordnung der Chromosomen erfolgen, indem ein Chromosom in den fünf verschiedenen Farbkanälen einzeln betrachtet und die Farbkombination mit dem Farbschema verglichen wird. Nachdem das Karyogramm erstellt wurde, wurden den Chromosomen über einen vorher generierten Klassifikator Falschfarben zugeordnet, um die Beurteilung der Chromosomen zu erleichtern.

In manchen Fällen reichte die Analyse der Metaphasen über Falschfarben aus. Meistens musste jedoch aufgrund einer geringen Bandenauflösung und starken Kondensation der Chromosomen eine Analyse mit Hilfe der verschiedenen Farbkanäle erfolgen, damit die Farbkombination fraglicher Chromosomenabschnitte zu einer chromosomalen Zuordnung führen konnte.

Eine Aneuploidie zeigt sich im Fehlen einer Kopie oder dem Vorhandensein zusätzlicher Kopien eines Chromosoms. Im Falle eines interchromosomalen Rearrangements wie z.B. einer Addition wurde ein Abschnitt mit abweichender Fluorochromkombination auf einem Chromosom gefunden (s. Abbildung 16). Ein Markerchromosom konnte unter Umständen aus mehreren Chromosomen zusammengesetzt sein, dessen Abschnitte unterschiedlichste Farbkombination aufwiesen.



**Abbildung 16: Arbeitsweise der ISIS-Software am Beispiel einer Addition an den q-Arm eines Chromosom 9 (Abbildung wurde aus dem Katalog der Fa. Metasystems entnommen).**

Es wurde angestrebt pro Patient mindestens fünf aberrante Mitosen zu analysieren. Wenn die Aberrationen in verschiedenen Zellklonen vorlagen, mussten entsprechend mehr Mitosen karyotypisiert werden.

## ***5.5 Verwaltung von Patientendaten und zytogenetischen Befunden***

### **5.5.1 Verwendete Hard- und Software**

Zur Erstellung der verwendeten Datenbanken, Entwicklung der SCCN und Programmierung einer Analyse-Software wurde jeweils ein Personal-Computer verwendet, der mit einem Windows 2000 Betriebssystem sowie dem Softwarepaket Office 2000 (Microsoft Corporation) versehen war. Office 2000 beinhaltet das Datenbankprogramm ACCESS 2000 (ACCESS 2000 Professional, Microsoft Corporation), mit dem relationale Datenbanken erstellt werden können. Zur Programmierung der Softwaremodule wurde darüber hinaus das Programm Visual Basics for Applications (VBA, Microsoft Office 2000, Microsoft Corporation) verwendet.

Um zu zeigen, dass eine automatisierte Analyse zytogenetischer Daten mittels der SCCN möglich ist, wurde eine Analyse-Software programmiert. Diese wurde so gestaltet, dass eine getrennte numerische und strukturelle Analyse erfolgen kann. Die Programmierung dieser Softwaremodule wurde von Herrn Harald Balz von der Arbeitsgruppe Tumorgenetik des Instituts für Klinische Genetik der Philipps-Universität Marburg in enger theoretischer Zusammenarbeit mit mir durchgeführt.

## 6. Literaturverzeichnis

- Aguiar, R. C., H. Sill, J. M. Goldman, and N. C. Cross, 1997 The commonly deleted region at 9p21-22 in lymphoblastic leukemias spans at least 400 kb and includes p16 but not p15 or the IFN gene cluster. *Leukemia* **11**: 233-238.
- Andreasson, P., B. Johansson, B. Strombeck, M. Donner, F. Mitelman *et al.* 1997 Childhood acute lymphoblastic leukaemia with ider(21)(q10)t(12; 21)(p12;q22): a new recurrent abnormality showing ETV6/CBFA2 fusion. *British Journal of Haematology* **98**: 216-218.
- Baranger, L., N. Szapiro, J. Gardais, J. Hillion, J. Derre *et al.* 1994 Translocation t(5;12)(q31-q33;p12-p13): A non-random translocation associated with a myeloid disorder with eosinophilia. *British Journal of Haematology* **88**: 343-347.
- Berger, R., and M. Busson-Le Coniat, 1999 Centric and pericentric chromosome rearrangements in hematopoietic malignancies. *Leukemia* **13**: 671-678.
- Bradtke, J., H. Balz, C. Fonatsch, B. Heinze, A. Jauch *et al.* 2003 Computer aided analysis of additional chromosome aberrations in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia using a simplified computer readable cytogenetic notation. *BMC.Bioinformatics*. **4**: 4.
- Brodeur, G. M., A. A. Tsiftis, D. L. Williams, F. W. Luthardt, and A. A. Green, 1982 Statistical analysis of cytogenetic abnormalities in human cancer cells. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **7**: 137-152.
- Caspersson, T., L. Zech, C. Johansson, and E. J. Modest, 1970 Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma* **30**: 215-227.
- Chase, A., F. Grand, J. G. Zhang, N. Blackett, J. Goldman *et al.* 1997 Factors influencing the false positive and negative rates of BCR- ABL fluorescence in situ hybridization. *Genes, Chromosomes & Cancer* **18**: 246-253.
- Chilcote, R. R., E. Brown, and J. D. Rowley, 1985 Lymphoblastic leukemia with lymphomatous features associated with abnormalities of the short arm of chromosome 9. *New England Journal of Medicine* **313**: 286-291.
- Cooper, G., and J. M. Friedman, 1990 Interpreting chromosomal abnormalities using Prolog. *Comput.Biomed.Res.* **23**: 153-164.
- Dabaja, B. S., S. Faderl, D. Thomas, J. Cortes, S. O'Brien *et al.* 1999 Deletions and losses in chromosomes 5 or 7 in adult acute lymphocytic leukemia: incidence, associations and implications. *Leukemia* **13**: 869-872.
- Denver Conference, 1960 A proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosomes. *Lancet* **i**: 1063-1065.
- Dugas, M., D. Messerer, J. Hasford, T. Haferlach, B. Heinze *et al.* 2003 German multicenter study group for adult ALL (GMALL): recruitment in comparison to ALL incidence and its impact on study results. *Annals of Hematology* **82**: 83-87.
- Dugas, M., C. Schoch, S. Schnittger, A. Kohlmann, W. Kern *et al.* 2002 Impact of integrating clinical and genetic information. *In Silico.Biol.* **2**: 383-391.
- Edwards, J. H., D. G. Harnden, A. H. Cameron, V. M. CROSSE, and O. H. WOLFF, 1960 A new trisomic syndrome. *Lancet* **1**: 787-790.
- Faderl, S., H. M. Kantarjian, T. Manshouri, C. Y. Chan, S. Pierce *et al.* 1999 The prognostic significance of p16INK4a/p14ARF and p15INK4b deletions in adult acute lymphoblastic leukemia. *Clin.Cancer Res.* **5**: 1855-1861.

- Faderl, S., H. M. Kantarjian, D. A. Thomas, J. Cortes, F. Giles *et al.* 2000 Outcome of Philadelphia chromosome-positive adult acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* **36**: 263-273.
- Fonatsch, C., M. Schaadt, H. H. Kirchner, and V. Diehl, 1980 A possible correlation between the degree of karyotype aberrations and the rate of sister chromatid exchanges in lymphoma lines. *International Journal of Cancer* **26**: 749-756.
- FORD, C. E., K. W. JONES, P. E. POLANI, J. C. DE ALMEIDA, and J. H. BRIGGS, 1959 A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* **1**: 711-713.
- Forestier, E., M. K. Andersen, K. Autio, E. Blennow, G. Borgstrom *et al.* 2007 Cytogenetic patterns in ETV6/RUNX1-positive pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: A Nordic series of 245 cases and review of the literature. *Genes, Chromosomes & Cancer* **46**: 440-450.
- Francke, U., and N. Oliver, 1978 Quantitative analysis of high-resolution trypsin-giemsa bands on human prometaphase chromosomes. *Hum.Genet.* **45**: 137-165.
- Friedman, J. M., J. P. Smith, M. E. Smith, J. S. Helgeson, P. N. Howard-Peebles *et al.* 1986 Automated interpretation of cytogenetic nomenclature. *AAMSI Congress 86: Proceedings of the Congress on Medical Informatics* 358-361.
- Glassman, A. B., 1997 Cytogenetics. An evolving role in the diagnosis and treatment of cancer. *Clin.Lab Med.* **17**: 21-37.
- Groupe Français de Cytogénétique Hématologique, 1996 Cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia: Correlations with hematologic findings and outcome. A collaborative study of the Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique. *Blood* **87**: 3135-3142.
- Hallgren, R. C., 1980 Exploiting the personal computer in the research laboratory. *IEEE Trans.Biomed.Eng* **27**: 161-164.
- Hashimoto, T., N. Kamada, H. Yamamoto, and M. Munaka, 1989 A computer program for analysis of chromosome abnormalities. *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi* **52**: 38-48.
- Heerema, N. A., J. Harbott, S. Galimberti, B. M. Camitta, P. S. Gaynon *et al.* 2004a Secondary cytogenetic aberrations in childhood Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia are nonrandom and may be associated with outcome. *Leukemia* **18**: 693-702.
- Heerema, N. A., J. B. Nachman, H. N. Sather, M. K. La, R. Hutchinson *et al.* 2004b Deletion of 7p or monosomy 7 in pediatric acute lymphoblastic leukemia is an adverse prognostic factor: a report from the Children's Cancer Group. *Leukemia* **18**: 939-947.
- Heim, S., and F. Mitelman, 1986 Secondary chromosome aberrations in the acute leukemias. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **22**: 331-338.
- Hiller, B., J. Bradtke, H. Balz, and H. Rieder, 2005 CyDAS: a cytogenetic data analysis system. *Bioinformatics.* **21**: 1282-1283.
- Hoglund, M., D. Gisselsson, T. Sall, and F. Mitelman, 2002 Coping with complexity. multivariate analysis of tumor karyotypes. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **135**: 103-109.
- ISCN, 1992 *Guidelines for Cancer Cytogenetics - Supplement to An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.* Karger,S., Basel.
- ISCN 1985, 1985 *An International System of Human Cytogenetic Nomenclature.* Karger,S., Basel.

- ISCN 1995, 1995 (*An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*). S. Karger, Basel.
- Jackson, A., P. Carrara, V. Duke, P. Sinclair, M. Papaioannou *et al.* 2000 Deletion of 6q16-q21 in human lymphoid malignancies: a mapping and deletion analysis. *Cancer Res* **60**: 2775-2779.
- JACOBS, P. A., and J. A. STRONG, 1959 A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* **183**: 302-303.
- Johansson, B., and F. Mertens, 1988 Frequency and distribution of mitomycin C-induced structural chromosome aberrations in lymphocytes from non-Hodgkin lymphoma patients. *Cytogenet. Cell Genet.* **48**: 79-83.
- Johansson, B., F. Mertens, and F. Mitelman, 1993 Cytogenetic deletion maps of hematologic neoplasms: circumstantial evidence for tumor suppressor loci. *Genes, Chromosomes & Cancer* **8**: 205-208.
- Johansson, B., F. Mertens, and F. Mitelman, 1994 Secondary chromosomal abnormalities in acute leukemias. *Leukemia* **8**: 953-962.
- Kamada, N., H. Yamamoto, K. Tanaka, M. Ohtaki, H. Ueoka *et al.* 1983 Analysis and rearrangement of human karyotypes by computer. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **10**: 17-22.
- Kamb, A., N. A. Gruis, J. Weaver-Feldhaus, Q. Liu, K. Harshman *et al.* 1994 A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* **264**: 436-440.
- Klaus, M., T. Haferlach, S. Schnittger, W. Kern, W. Hiddemann *et al.* 2004 Cytogenetic profile in de novo acute myeloid leukemia with FAB subtypes M0, M1, and M2: a study based on 652 cases analyzed with morphology, cytogenetics, and fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **155**: 47-56.
- Lejeune, J., R. TURPIN, and M. GAUTIER, 1959 [Mongolism; a chromosomal disease (trisomy).]. *Bull. Acad. Natl. Med.* **143**: 256-265.
- Mancini, M., D. Scappaticci, G. Cimino, M. Nanni, V. Derme *et al.* 2005 A comprehensive genetic classification of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of the GIMEMA 0496 protocol. *Blood* **105**: 3434-3441.
- Mertens, F., B. Johansson, and F. Mitelman, 1994 Isochromosomes in neoplasia. *Genes, Chromosomes & Cancer* **10**: 221-230.
- Merup, M., T. C. Moreno, M. Heyman, K. Ronnberg, D. Grandt *et al.* 1998a 6q deletions in acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* **91**: 3397-3400.
- Merup, M., T. C. Moreno, M. Heyman, K. Ronnberg, D. Grandt *et al.* 1998b 6q deletions in acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* **91**: 3397-3400.
- Miniou, P., M. Jeanpierre, D. Bourc'his, A. C. Coutinho Barbosa, V. Blanquet *et al.* 1997 alpha-satellite DNA methylation in normal individuals and in ICF patients: heterogeneous methylation of constitutive heterochromatin in adult and fetal tissues. *Hum. Genet.* **99**: 738-745.
- Mitelman F., Johansson B. & Mertens F. Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer (2007). Mitelman, F., Johansson, B., and Mertens, F. The Cancer And Genome Anatomy Project . 2007b. Ref Type: Electronic Citation
- Mitelman, F., B. Johansson, and F. Mertens, 2007a Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer (2007). <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman> .

- Mossafa, H., J. L. Huret, A. Brizard, F. Guilhot, M. Lessard *et al.* 1994 Isochromosome 8q: A new recurring secondary anomaly in adults with B-lineage acute lymphoid leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **73**: 84-85.
- Musilova, J., R. Hovorka, Z. Zemanova, K. Michalova, and S. Svacina, 1990 [Experience with a computer database in a cytogenetic laboratory]. *Cas.Lek.Cesk.* **129**: 742-744.
- N.N., 1972 Paris Conference (1971): Standardization in human cytogenetics 5. *Cytogenetics.* **11**: 317-362.
- Nowell, P. C., and D. A. Hungerford, 1960 A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science* **132**: 1497.
- Onodera, N., N. R. McCabe, and C. M. Rubin, 1992 Formation of a hyperdiploid karyotype in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **80**: 203-208.
- Panzer-Grumayer, E. R., K. Fasching, S. Panzer, K. Hettinger, K. Schmitt *et al.* 2002 Nondisjunction of chromosomes leading to hyperdiploid childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia is an early event during leukemogenesis. *Blood* **100**: 347-349.
- Pardue, M. L., and J. G. Gall, 1969 Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **64**: 600-604.
- PATAU, K., 1960 The identification of individual chromosomes, especially in man. *Am.J.Hum.Genet.* **12**: 250-276.
- PATAU, K., D. W. SMITH, E. THERMAN, S. L. INHORN, and H. P. WAGNER, 1960 Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. *Lancet* **1**: 790-793.
- Paulsson, K., H. Morse, T. Fioretos, M. Behrendtz, B. Strombeck *et al.* 2005 Evidence for a single-step mechanism in the origin of hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer* **44**: 113-122.
- Persson, A. V., and V. E. Dyer, 1985 Use of the personal computer in clinical research. *Surg.Clin.North Am.* **65**: 131-138.
- Plaat, B. E., W. M. Molenaar, M. F. Mastik, H. J. Hoekstra, G. J. Te Meerman *et al.* 1999 Computer-assisted cytogenetic analysis of 51 malignant peripheral-nerve-sheath tumors: sporadic vs. neurofibromatosis-type-1-associated malignant schwannomas. *International Journal of Cancer* **83**: 171-178.
- Rieder, H., W. D. Ludwig, W. Gassmann, J. Maurer, J. W. G. Janssen *et al.* 1996 Prognostic significance of additional chromosome abnormalities in adult patients with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology* **95**: 678-691.
- Rowley, J. D., 1973 Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**: 290-293.
- Schnittger, S., C. Schoch, M. Dugas, W. Kern, P. Staib *et al.* 2002 Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* **100**: 59-66.
- Secker-Walker, L. M., H. G. Prentice, J. Durrant, S. Richards, E. Hall *et al.* 1997 Cytogenetics adds independent prognostic information in adults with acute lymphoblastic leukaemia on MRC trial UKALL XA. *British Journal of Haematology* **96**: 601-610.
- Shaffer L.G. & Tommerup N. ISCN 2005. 2006. Karger (Oktober 2005).  
Ref Type: Generic

- Sladen, J. G., 1984 The personal computer as a clinical research and teaching tool. *Am.J.Surg.* **147**: 654-659.
- Speicher, M. R., S. G. Ballard, and D. C. Ward, 1996 Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genetics* **12**: 368-375.
- Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature, 1978 ISCN (1978). An international system for human cytogenetic nomenclature. *Birth Defects Orig.Artic.Ser.* **14**: 313-404.
- Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature, 1981 ISCN (1981). An international system for human cytogenetic nomenclature--high-resolution banding (1981). *Cytogenet.Cell Genet.* **31**: 5-23.
- Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature, 1985 ISCN 1985. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1985). *Birth Defects Orig.Artic.Ser.* **21**: 1-117.
- Takeuchi, S., C. R. Bartram, M. Wada, A. Reiter, Y. Hatta *et al.* 1995 Allelotype analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* **55**: 5377-5382.
- Van den Berghe, H., and L. Michaux, 1997 5q-, Twenty-five years later: A synopsis. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **94**: 1-7.
- Videbech, P., and J. Nielsen, 1979 Electronic data processing in the Danish cytogenetic central register and EDP problems of registers in general. *Clin.Genet.* **15**: 137-146.
- Walters, R., H. M. Kantarjian, M. J. Keating, E. H. Estey, J. Trujillo *et al.* 1990 The importance of cytogenetic studies in adult acute lymphoblastic leukemia. *American Journal of Medicine* **89**: 579-587.
- Warford, A., 1988 In situ hybridisation: a new tool in pathology. *Med.Lab Sci.* **45**: 381-394.
- Westbrook, C. A., A. L. Hooberman, C. Spino, R. K. Dodge, R. A. Larson *et al.* 1992 Clinical significance of the BCR-ABL fusion gene in adult acute lymphoblastic leukemia: A cancer and leukemia group B study (8762). *Blood* **80**: 2983-2990.
- Willis, T. G., I. R. Zalcberg, L. A. Coignet, I. Wlodarska, M. Stul *et al.* 1998 Molecular cloning of translocation t(1;14)(q21;q32) defines a novel gene (BCL9) at chromosome 1q21. *Blood* **91**: 1873-1881.
- Xu, G. L., T. H. Bestor, D. Burchis, C. L. Hsieh, N. Tommerup *et al.* 1999 Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* **402**: 187-191.
- Yen, K. H., C. Lee, H. S. Liu, and C. L. Ho, 2005 A precise and scalable method for querying genes in chromosomal banding regions based on cytogenetic annotations. *Bioinformatics.* **21**: 3469-3474.

## 7. Anhang

### 7.1 Verzeichnis der Abkürzungen und Zeichen der ISCN 1995/2005 (Auszug)

**Tabelle 11: In der ISCN verwendete Zeichen mit erklärenden Beispielen.**

<b>Zeichen</b>	<b>Erklärung</b>
1-22, X, Y	Chromosom Nr. 1 – 22, X und Y
p, q	kurzer Arm, langer Arm eines Chromosoms
Pluszeichen (+)	Zugewinn
Minuszeichen (-)	Verlust
Tilde (~)	Betroffener Bereich
Pfeil -> oder →	von...bis in der Langschreibweise
Doppelpunkt(e) einfach (:) bzw. doppelt (::)	Bruch bzw. Bruch und Reunion in der Langschreibweise
Multiplikationszeichen (x)	mehrfache Kopien strukturell veränderter Chromosomen
runde Klammern ()	Umfassung strukturell veränderter Chromosomen und Bruchpunkte
Fragezeichen (?)	fragliche Identifizierung eines Chromosoms oder einer Chromosomenstruktur
Komma (,)	Trennung von Chromosomennummern, Geschlechtschromosomen und Chromosomabnormalitäten
Semikolon (;)	Trennung von veränderten Chromosomen und Bruchpunkten in strukturellen Rearrangements von mehr als einem Chromosom

**Tabelle 12: In der ISCN verwendete Abkürzungen mit erklärenden Beispielen.**

Kürzel	Bedeutung	Beispiel
add	Addition	add(1)(q44) Verlängerung des q-Arms eines Chromosom 1 durch Material unbekanntem chromosomalen Ursprungs, dadurch Verlust von Anteilen der Bande 1q44
der	Derivativ-chromosom	der(22)t(9;22)(q34;q11.2) im Karyotyp wurde ein derivatives Chromosom 22 nach einer Translokation (9;22) nachgewiesen; der Translokationspartner liegt nicht vor; dadurch Zugewinn von 9q34 und Verlust von 22q11.2-q13.3
dic	Dizentrisches Chromosom	dic(9;12)(q12;q13) aus den zwei Chromosomen 9 und 12 ist ein Chromosom mit zwei Zentromeren entstanden, welches aus Chromosom 9p24.3-q12 und 12q13-p13 besteht. Die Bereiche von 9q12-q34 bzw. 12q13-q24.3 gingen verloren
dup	Duplikation	dup(1)(q32q44) Verlängerung des q-Arms eines Chromosom 1 durch die Verdoppelung der Chromosomenbanden 1q32-q44
i	Isochromosom	i(17)(q10) es liegt ein Isochromosom bestehend aus dem p-Arm eines Chromosom 17 vor; hierdurch Verlust von 17p13-p10 und Zugewinn von 17q10-q25.3
ider	Isoderivativ-chromosom	ider(22)(q10)t(9;22)(q34;q11.2) es liegt ein Chromosom bestehend aus den langen Armen eines zuvor durch eine Translokation t(9;22) veränderten Chromosom 22 vor; hierdurch Verlust von 22p13-p10 und Zugewinn von 22q10-q11.2 sowie 9q34
idic	Isodizentrisches Chromosom	idic(17)(p11) es liegt ein Chromosom 17 mit zwei Zentromeren und bestehend aus zwei q-Armen sowie perizentromerischen Anteilen von 17p vor, hierdurch Verlust von 17p12-p13 und Zugewinn von 17p11-q25.3
inc	Incomplete Karyotype	Karyotyp ist aufgrund einer schlechten Chromosomenqualität nicht vollständig und kann nicht beschriebene Aberrationen enthalten
ins	Insertion	ins(5;2)(p14;q22q32) innerhalb des p-Arms eines Chromosom 5 befindet sich bedingt durch eine Insertion das Chromosomensegment 2q22-q32
inv	Inversion	inv(9)(p21q13) perizentrische Inversion eines Chromosom 9 unter Einbeziehung des p- und q-Arms
r	Ringchromosom	r(2)(p14q31) es liegt ein geschlossener Ring vor, welcher aus Anteilen des p- und q-Arms von Chromosom 2 besteht, dadurch Verlust von 2p14-p25 und 2q31-q37. Es fehlen außerdem die Telomere von Chromosom 2
t	Translokation	t(9;22)(q34;q11.2) Translokation zwischen den q-Armen eines Chromosom 9 und 22
trp	Triplikation	trp(1)(q32q44) Verlängerung des q-Arms eines Chromosom 1 durch die Verdreifachung der Chromosomenbanden 1q32-q44

7.2 Ideogramme der 24 Chromosomen des Menschen

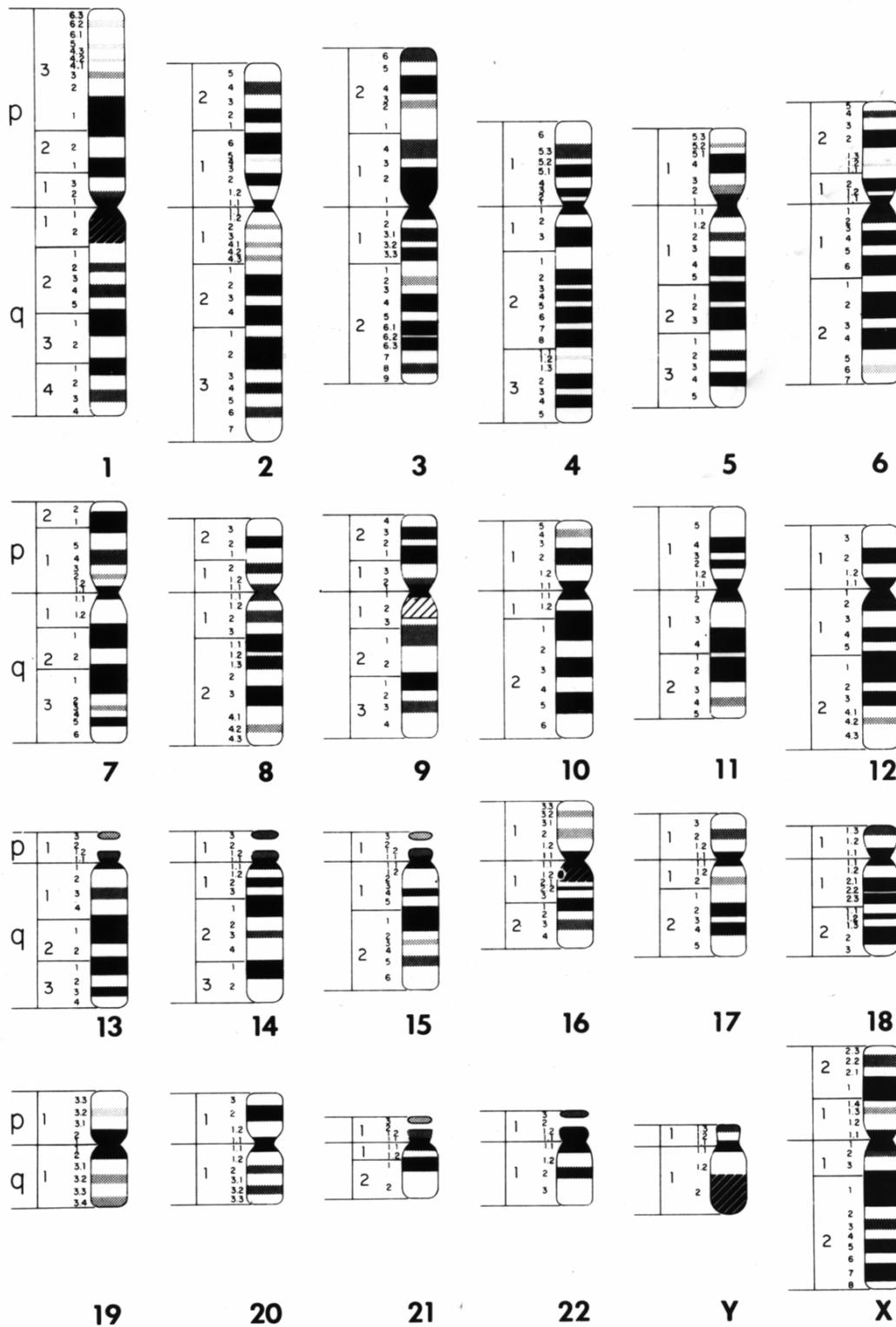


Abbildung 17: Ideogramme der 24 Chromosomen des Menschen in einer Bandenauflösung von 400 bphs.

## 7.3 Ergebnisse der quantitativen Analyse am Beispiel von Chromosom 9

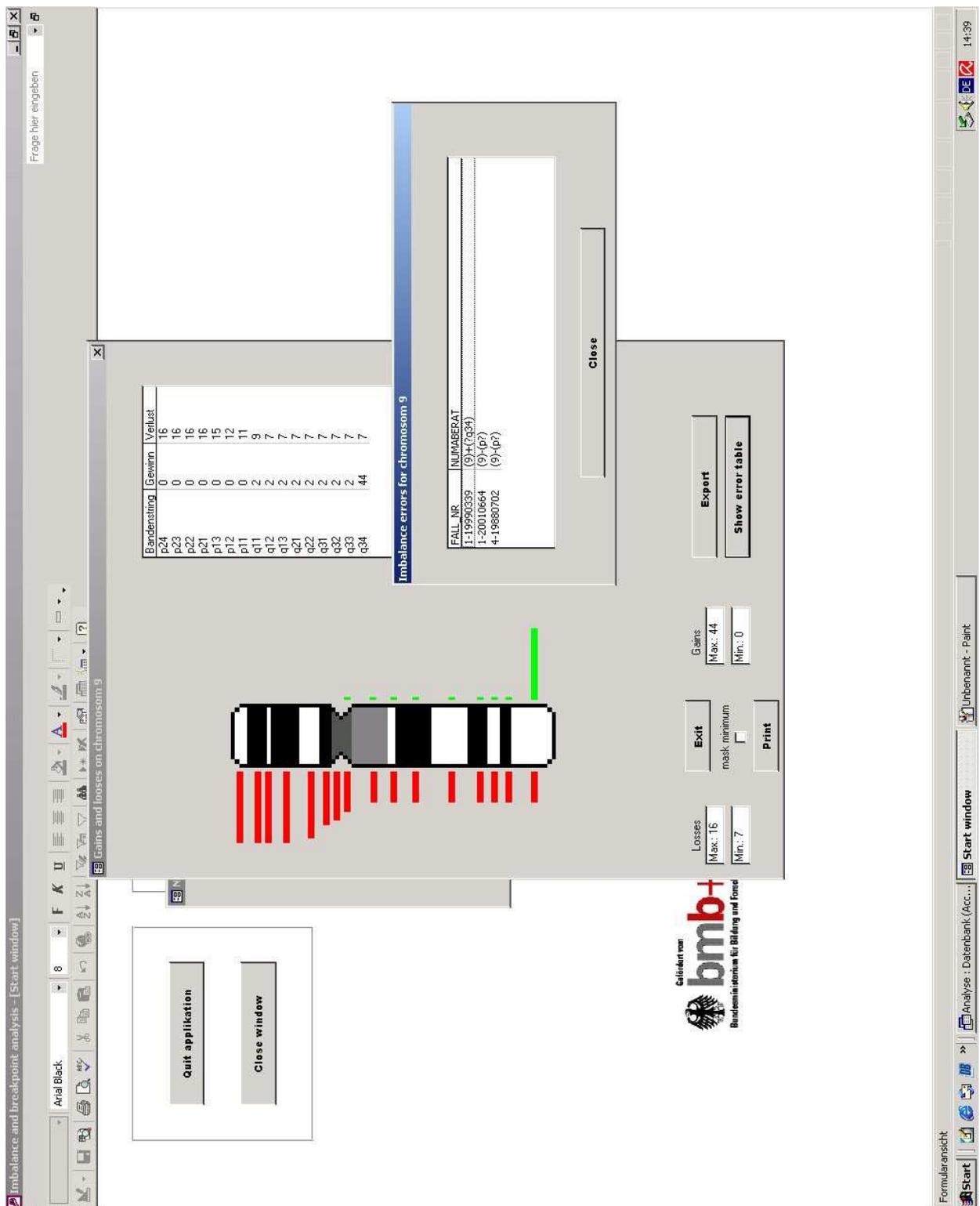


Abbildung 18: Gezeigt wird ein Screenshot der Ergebnisse der quantitativen Analyse von Chromosom 9. Zusätzlich wurde die Fehlertabelle mit den fraglichen SCCN-Strings eingefügt.

## 7.4 Ergebnisse der qualitativen Analyse am Beispiel von Chromosom 6

structural changes on chromosome 6

Bande	t	del	inv	dic	idic	dup	add	der	i	ins	mar
p25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
p24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
p23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
p22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
p213	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
p212	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
p211	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
p12	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
p112	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
p111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
q11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
q12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
q13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
q14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
q15	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
q16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
q21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
q22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
q23	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
q24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
q25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
q26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
q27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
centromer	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Breakpoint errors for chromosome 6

fallnr	vorgang	bruchpunkt
3-19960010	del	q271

Close

Exit    Export    Show error table    Print

Quit applikation    Close window

Getident von **bmb**  
Bundesministerium für Bildung und Forschung

Formularansicht    Start    Analyse : Datenbank (Acc...    Start window    Unbenannt - Paint    15:29

Abbildung 19: Gezeigt wird ein Screenshot der Ergebnisse der qualitativen Analyse von Chromosom 6. Zusätzlich wurde die Fehlertabelle mit den fraglichen SCCN-Strings eingefügt.

## 7.5 ISCN-Karyotypen und SCCN-Strings der 94 ALL-Patienten

**Tabelle 13: Karyotypen der 94 Patienten mit ALL, Philadelphia-Translokation und zusätzlichen Aberrationen sowie dessen Übersetzung in den quantitativen und qualitativen SCCN-String. Die einzelnen aberranten Klone wurden durch einen Schrägstrich getrennt. Die Fälle mit der Nummer 62,63, 64, 65, 66, 68, 69, 71, 72, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 82, 83, 85, 86, 87, 89, 90, 91 und 92 wurden nicht von mir bearbeitet, sondern die zytogenetischen Daten zur Vergrößerung der Beispieldatensammlung per Datenbank-Abfrage aus der LCD entnommen.**

Fallnr.	Alter/ Geschl.	Karyotype(n)/Anzahl Mitosen	quantitativer SCCN-String/qualitativer SCCN-String
1	35/m	46,XY,t(9;22)(q34;q11),t(14;20)(q11;q13.3)[28]	0/t(9)(q34),t(20)(q133),t(14)(q11),t(22)(q11),
2	48/m	45,XY,-7,t(9;22)(q34;q11)[19]	-(7),/t(9)(q34),t(22)(q11),
3	57/m	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[6]/49,XY,+5,t(9;22)(q34;q11),+16,+21[7]	+(5),+(16),+(21),/t(9)(q34),t(22)(q11),
4	58/w	47,XX,t(9;22)(q34;q11),+?15[13]	+?(15),/t(9)(q34),t(22)(q11),
5	71/m	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[11]/46,XY,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)[2]	(9)+(q34),(22)+(p13q112),/t(9)(q34),t(22)(q11),
6	48/m	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[10]/47,XY,add(1)(p36),del(6)(p12),t(9;22)(q34;q11),del(11)(q23),+der(22)t(9;22)[11]	(1)-(p36p361),(6)-(p25p12),(9)+(q34),(11)-(q23q25), (22)+(p13q112),/add(1)(p363),add(1)(p362),add(1)(p361), del(6)(p12),t(9)(q34),del(11)(q23),t(22)(q11),
7	18/w	52,XX,+?4,t(9;22)(q34;q11),+?14,+?15,+?17,+?20,+der(22)t(9;22)[20]	+?(4),(9)+(q34),+?(14),+?(15),+?(17),+?(20),(22)+(p13q112),/ t(9)(q34),t(22)(q11),
8	73/w	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[3]/46,XX,t(9;22)(q34;q11),i(7)(q10)[3]	(7)+(q10q36),(7)-(p22p10),/i(7)(q10),t(9)(q34),t(22)(q11),
9	57/m	47,XY,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)[8]	(9)+(q34),(22)+(p13q112),/t(9)(q34),t(22)(q11),
10	63/m	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[11]/46,XY,t(9;22)(q34;q11)[2]	(9)+(q34),(22)+(p13q112),/t(9)(q34),t(22)(q11),
11	39/m	47,XY,i(8)(q10),+i(8)(q10),t(9;22)(q34;q11)[9]/48,XY,i(8)(q10),+i(8)(q10)x2,t(9;22)(q34;q11)[2]	(8)+(q10q243)x3,(8)-(p23p10),/i(8)(q10),t(9)(q34),t(22)(q11),
12	37/m	57~58,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[5]	(9)+(q34),(22)+(p13q112),/t(9)(q34),t(22)(q11),
13	35/m	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[15]/49,XY,+2,+4,i(8)(q10),t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)[15]	+(2),+(4),(8)+(q10q243),(8)-(p23p10),(9)+(q34),(22)+(p13q112),/ i(8)(q10),t(9)(q34),t(22)(q11),
14	42/w	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[13]/46,XX,del(7)(p?),+8,-9,der(9)t(9;22)(q34;q11)ins(9;7)(p11?;?),der(22)t(9;22),+mar,inc[cp7]	+(8),-(9),+(?),/del(7)(p?),ins(7)(?),ins(9)(p11),t(9)(q34),t(22)(q11),
15	59/m	46,XY,t(9;22)(q34;q11),del(10)(q22q26)[16]	(10)-(q22q26),/t(9)(q34),del(10)(q22),del(10)(q26),t(22)(q11),
16	26/m	51~56,XY,+2,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[16]	+(2),(9)+(q34),(22)+(p13q112),/t(9)(q34),t(22)(q11),
17	70/w	48,XX,i(8)(q10),+i(8)(q10),t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)[3]/49,XX,+8,+8,t(9;22)(q34;q11),+17[20]	+(8)x2,(8)+(q10q243)x3,(8)-(p23p10),(9)+(q34),+(17), (22)+(p13q112),/i(8)(q10),t(9)(q34),t(22)(q11),
18	61/m	45,XY,-7,t(9;22)(q34;q11)[20]	-(7),/t(9)(q34),t(22)(q11),
19	55/w	46,XX,t(9;22)(q34;q11),del(11)(q13)[20]	(11)-(q13q25),/t(9)(q34),del(11)(q13),t(22)(q11),
20	40/w	45,XX,t(9;22)(q34;q11),dic(20;22)(q11;p11)[24]	(20)-(q111q133),(22)-(p13p111),/t(9)(q34),dic(20)(q11), dic(22)(p11),t(22)(q11),
21	59/m	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[6]/44,XY,t(9;22)(q34;q11),-8?,-11?,-11?,+mar[9]	-?(8),-?(11)x2,/t(9)(q34),t(22)(q11),
22	38/m	47,XY,+2,t(9;22)(q34;q11)[20]	+(2),/t(9)(q34),t(22)(q11),

Fallnr.	Alter/ Geschl.	Karyotype(n)/Anzahl Mitosen	quantitativer SCCN-String/qualitativer SCCN-String
23	32/m	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[2]/49,XY,t(9;22)(q34;q11),+21,+21,+der(22)t(9;22)[10]	(9)+(q34),+(21)x2,(22)+(p13q112),/t(9)(q34),t(22)(q11),
24	66/m	46,XY,t(2;8)(p11;p11),t(9;22)(q34;q11),add(16)(p13)[4]	(16)-(p13p133),/t(2)(p11),t(8)(p11),t(9)(q34),add(16)(p13),t(22)(q11),
25	39/m	46~48,XY,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)(q34;q11),[inc][2]	(9)+(q34),(22)+(p13q112)/t(9)(q34),t(22)(q11),
26	44/m	47,XY,+5,t(9;22)(q34;q11)[12]	+(5),/t(9)(q34),t(22)(q11),
27	50/m	56,XY,+X,+4,+5,+6,t(9;22)(q34;q11),+?10,+11,+12,+14,+?17,+der(22)t(9;22)[10]	+(X),+(4),+(5),+(6),+(9)+(q34),+?(10),+(11),+(12),+(14),+?(17), (22)+(p13q112),/t(9)(q34),t(22)(q11),
28	29/m	46,XY,t(2;14)(p11;q32),t(9;22)(q34;q11)[3]	0/t(2)(p11),t(9)(q34),t(14)(q32),t(22)(q11),
29	25/w	45,XX,-7,t(9;22)(q34;q11)[10]	-(7),/t(9)(q34),t(22)(q11),
30	48/m	47,XY,t(5;9)(q31;p12),t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)[17]	(9)+(q34),(22)+(p13q112),/t(5)(q31),t(9)(p12),t(9)(q34),t(22)(q11),
31	42/m	45,XY,-7,t(9;22)(q34;q11)[12]	-(7),/t(9)(q34),t(22)(q11),
32	66/m	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[2]/45,XY,t(9;22)(q34;q11),dic(18;20)(p11;p11)[19]	(18)-(p11p11), (20)-(p13p11),/t(9)(q34),t(22)(q11), dic(18)(p11),dic(20)(p11),
33	36/m	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[11]/47,XY,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)[6]	(9)+(q34),(22)+(p13q112),/t(9)(q34),t(22)(q11),
34	25/w	46,XX,ider(9)(q10)t(9;22)(q34;q11),der(22)t(9;22)[15]	(9)+(q10q34), (9)-(p24p10), (22)+(q11q13),/t(9)(q34), ider(9)(q10),t(22)(q11),
35	51/m	45,XY,-7,t(9;22)(q34;q11)[7]	-(7),/t(9)(q34),t(22)(q11),
36	63/w	47,XX,dup(1)(q21q44),t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)[4]/46,X,-X,dup(1)(q21q44),-7,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22),+mar[2]	-(X), (1)+(q21q44), -(7), (9)+(q34), (22)+(p13q112), +(?)/dup(1)(q21), dup(1)(q44), t(9)(q34), t(22)(q11),
37	27/m	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[4]/56~60,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22),inc[8]	(9)+(q34),(22)+(p13q112),/t(9)(q34),t(22)(q11),
38	23/m	46,XY,der(9)t(9;22)(q34;q11)del(9)(p13),der(22)t(9;22)[8]	(9)-(p24p13),/t(9)(q34),del(9)(p13),t(22)(q11),
39	34/m	45,XY,dic(7;12)(p11;p11),t(9;22)(q34;q11)[11]	(7)-(p22p11), (12)-(p13p11),/dic(7)(p11),dic(12)(p11),t(9)(q34), t(22)(q11)
40	50/w	46,XX,t(9;22)(q34;q11),t(14;18)(q11;p11)[9]/47,XX,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)[2]	(9)+(q34),(22)+(p13q112),/t(9)(q34),t(22)(q11),t(14)(q11), t(18)(p11),
41	29/w	46,XX,t(9;22)(q34;q11),der(16)t(1;16)(q21;q12)[12]	(1)+(q21q44), (16)-(q12q24),/t(1)(q21),t(9)(q34),t(16)(q12), t(22)(q11),
42	73/w	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[2]/48,XX,t(9;22)(q34;q11),+?8,+?12[5]	+?(8),+?(12),/t(9)(q34),t(22)(q11),
43	53/w	52,XX,+4,+6,t(9;22)(q34;q11),+10,+17,+18,+21[3]	+(4),+(6),+(10),+(17),+(18),+(21),/t(9)(q34),t(22)(q11),
44	56/m	46~47,XY,t(9;22)(q34;q11),+?der(22)t(9;22)[4]	?(9)+(q34),?(22)+(p13q112),/t(9)(q34),t(22)(q11),
45	60/w	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[3]/55~58,XX,+X,+2,add(3)(q27),+4,+5,+6,t(9;22)(q34;q11),+13?,+15?,+18?,+der(22)t(9;22)[21]	+(X),+(2), (3)-(q27q29),+(4),+(5),+(6),+(9)+(q34),+?(13),+?(15), +?(18), (22)+(p13q112),/add(3)(q27),t(9)(q34),t(22)(q11),
46	43/w	46,XX,der(4)t(4;9)(q23;p22),t(8;19)(p11;q11),der(9)t(4;9)(q23;p22),t(9;22)(q34;q11),der(22)t(9;22)[4]	0/t(4)(q23),t(8)(p11),t(9)(p22),t(9)(q34),t(19)(q11),t(22)(q11),
47	41/m	46,XY,der(9)t(9;22)(q34;q11)del(9)(p11),der(22)t(9;22)(q34;q11)[10]	(9)-(p24p11),/del(9)(p11),t(9)(q34),t(22)(q11),
48	42/m	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[2]/47,XY,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)[2]/48,XY,+6,t(9;22)(q34;q11),add(15)(q26),+der(22)t(9;22)[18]	+(6), (9)+(q34), (15)-(q26), (22)+(p13q112),/t(9)(q34), add(15)(q26),t(22)(q11),

Fallnr.	Alter/ Geschl.	Karyotype(n)/Anzahl Mitosen	quantitativer SCCN-String/qualitativer SCCN-String
49	33/m	73,XXYY,+2,-3,+4,+8,-9,t(9;22)(q34;q11),der(9)t(9;22),+10,-11,-12,+16,+18,-21,der(22)t(9;22),+2mar[10]	+ (2),-(3),+(4),+(8),-(9),+(10),-(11),-(12),+(16),+(18),-(21),+(22),/t(9)(q34),t(22)(q11),
50	57/w	45,XX,-7,t(9;22)(q34;q11)[16]/45,XX,add(6)(q23),-7,t(9;22)(q34;q11)[13]	-(7),-(6)-(q23q27),/t(9)(q34),t(22)(q11),add(6)(q23),
51	43/w	50,XX,+X,+8,t(9;22)(q34;q11),del(9)(p21),+22,+der(22)t(9;22)[10]	+(X),+(8),(9)+(q34),(9)-(p21p24),(22)+(p13q112),+(22),/t(9)(q34),t(22)(q11),del(9)(p21),
52	60/w	46,XX,+4,+5,dic(8;9)(p11;p13),t(9;22)(q34;q11)[31]/46,XX,+4,+5,del(6)(q15q23),dic(8;9)(p11;p13),t(9;22)(q34;q11)[6]	+(4),+(5),(8)-(p23p111),(9)-(p24p13),(6)-(q15q23),/del(6)(q15),del(6)(q23),dic(8)(p11),dic(9)(p13),t(9)(q34),t(22)(q11),
53	47/w	46,XX,der(9)t(9;22)(q34;q11)add(9)(p?),der(22)t(9;22)[4]	(9)-(p?)/t(9)(q34),t(22)(q11),
54	39/m	46,XY,del(7)(q11),t(9;22)(q34;q11)[17]	(7)-(q111q36),/del(7)(q11),t(9)(q34),t(22)(q11),
55	20/m	54~56,XY,+X,+4,+4,+6,i(7)(q10),t(9;22)(q34;q11),+10,-12,+19,+20,+21,+der(22)t(9;22)(q34;q11),+2~4mar[cp11]	+(X),+(4)x2,+6,(7)-(p22q10),(7)+(q10q36),(9)+(q34),+(10),-(12),+(19),+(20),+(21),(22)+(p13q112),+(?)/t(9)(q34),t(22)(q11),i(7)(q10),
56	47/m	46,XY,t(9;22)(q34;q11) [8]/45,XY,-7,t(9;22)(q34;q11)[12]	-(7),/t(9)(q34),t(22)(q11),
57	39/m	47,XY,+4,del(7)(p15),t(9;22)(q34;q11)[10]/47,XY,+4,del(7)(p15),t(9;22)(q34;q11),add(4)(q35)[7]/47,XY,add(3)(p26),+4,add(4)(q35),del(7)(p15),t(9;22)(q34;q11)[3]	(3)-(p26),+(4),(4)-(q35),(7)-(p22p15),/add(3)(p26),add(4)(q35),del(7)(p15),t(9)(q34),t(22)(q11),
58	65/m	46,XY,inv(4)(p16q27),t(9;22)(q34;q11)[3]/45,XY,inv(4)(p16q27),-7,t(9;22)(q34;q11)[15]	-(7),/t(9)(q34),t(22)(q11),inv(4)(p16),inv(4)(q27),
59	26/m	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[1]/45,XY,t(9;22)(q34;q11),-20[10]/46,XY,t(9;22)(q34;q11),-20,+mar[2]	-(20),+(?)/t(9)(q34),t(22)(q11),
60	47/m	59~60,XY,+2,+4,+5,+del(6)(q2?1),+8,t(9;22)(q34;q11),+10,+13,+14,+15,+19,+20,+21,+22,+der(22)t(9;22)(q34;q11),+mar[cp8]	+(2),+(4),+(5),(6)+(p25q2?1),+(8),(9)+(q34),+(10),+(13),+(14),+(15),+(19),+(20),+(21),+(22),(22)+(p13q112),+(?)/del(6)(q2?1),t(9)(q34),t(22)(q11),
61	50/m	47,XY,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[1]/48,XY,+1,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[2]/49,XY,+1,+1,+6,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[2]	+(1)x2,+6,(9)+(q34),(22)+(p13q112),/(9)(q34),t(22)(q11),
62	68/m	48,XY,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)(q34;q11)x2[4]	(9)+(q34)x2,(22)+(p13q112)x2,t(9)(q34),t(22)(q11),
63	36/w	53,XX,+4,t(9;22)(q34;q11),i(8)(q10),+18,+19,+2xder(22)t(9;22)(q34;q11)[7]	+(4),(8)+(q10q243),(8)-(p23p10),(9)+(q34)x2,+18,+19,(22)+(p13q112)x2,/t(9)(q34),t(22)(q11),i(8)(q10),
64	53/m	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[2]/46,XY,t(9;22)(q34;q11),del(9)(p12)[9]	(9)-(p24p12),/t(9)(q34),t(22)(q11),del(9)(p12),
65	46/w	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[2]/46,XX,t(9;22)(q34;q11),i(9)(q10)[10]/47,XX,t(9;22)(q34;q11),+8,del(8)(p12),i(9)(q10)[24]	+(8),(8)-(p23p12),(9)+(q10q34),(9)-(p24p10),/del(8)(p12),t(9)(q34),i(9)(q10),t(22)(q11),
66	30/m	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[11]/44,XY,-7,-9,t(9;22)(q34;q11)[11]	-(7),-(9),/t(9)(q34),t(22)(q11),
67	14/w	45,XX,t(9;22)(q34;q11),add(9)(p?),-7[13]	-(7),/t(9)(q34),t(22)(q11),add(9)(p?),
68	42/w	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[3]/58,XX,-X,-1,-3,-6,-7,+8,-9,t(9;22)(q34;q11),-10,-12,-14,-16,-17,-19,-20,+21,-22,+der(22) 46,XX,t(9;22)(q34;q11)[27]	-(X),-(1),-(3),-(6),-(7),+(8),(9)+(q34),-(9),-(10),-(12),-(14),-(16),-(17),-(19),-(20),+(21),-(22),(22)+(p13q112),/t(9)(q34),t(22)(q11),
69	61/w	48,XX,+5,+8,t(9;22)(q34;q11)[5]/48,XX,+5,+8,del(9)(p13),t(9;22)(q34;q11)[2]/49,XX,+5,+8,del(9)(p13),t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)[4]	+(5),+(8),(9)-(p24p13),(9)+(q34),(22)+(p13q112),/t(9)(q34),del(9)(p13),t(22)(q11),
70	9/m	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[1]/50~55,XY,+X,+4,+5,+6,+14,+15,+20,+21,	+(X),+(4),+(5),+(6),(9)+(q34),+(14),+(15),+(20),+(21),

Fallnr.	Alter/ Geschl.	Karyotype(n)/Anzahl Mitosen	quantitativer SCCN-String/qualitativer SCCN-String
		+der(22)t(9;22)(q34;q11)[33]	(22)+(p13q112),/t(9)(q34),t(22)(q11),
71	67/m	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[2]/ 47,XY,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[27]	(9)+(q34),(22)+(p13q112),/t(9)(q34),t(22)(q11),
72	30/m	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[3]/55~58,XY,+X,+Y,+2,+4,+5,+6,+8, t(9;22)(q34;q11),+16,+21,+der(22)t(9;22)(q34;q11)[6]	+(X),(Y),(2),(4),(5),(6),(8),(9)+(q34),(16),(21), (22)+(p13q112),/t(9)(q34),t(22)(q11),
73	17/m	45,XY,-7,t(9;22)(q34;q11)[13]	-(7),/t(9)(q34),t(22)(q11),
74	65/w	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[14]/45,XX,-7,t(9;22)(q34;q11)[10]	-(7),/t(9)(q34),t(22)(q11),
75	39/w	49,XX,+7,t(9;22)(q34;q11),+?11,+?12,+der(22)t(9;22)(q34;q11)[7]	+?(7),(9)+(q34),+?(11),+?(12),(22)+(p13q112),/t(9)(q34),t(22)(q11),
76	19/m	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[13]/54,XY,+X,+2,+4,t(9;22)(q34;q11),+10,+13,+15, +21,+der(22)t(9;22)(q34;q11)[3]	+(X),(2),(4),(9)+(q34),(10),(13),(15),(21),(22)+(p13q112),/ t(9)(q34),t(22)(q11),
77	39/w	47,XX,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[2]/47,XX,+8,-9, t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[3]	+(8),-(9),(9)+(q34),(22)+(p13q112),/t(9)(q34),t(22)(q11),
78	37/m	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[7]/46,XY,t(9;22)(q34;q11),del(5)(q31q34)[7]	(5)-(q31q34),/t(9)(q34),t(22)(q11),del(5)(q31),del(5)(q34),
79	52/w	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[8]/47,XX,+8,t(9;22)(q34;q11)[14]	+(8),/t(9)(q34),t(22)(q11),
80	47/m	51~53,XY,+X,+8,t(9;22)(q34;q11),+21,+22,+1-3xder(22)t(9;22)(q34;q11)[32]	+(X),(8),(9)+(q34)x3,(21),(22),(22)+(p13q112)x3,/ t(9)(q34),t(22)(q11),
81	50/w	55~56,XX,+X,+2,+4,+6,+8,t(9;22)(q34;q11),+11,+14,+19,+21, +der(22)t(9;22)(q34;q11)[22]	+(X),(2),(4),(6),(8),(9)+(q34),(11),(14),(19),(21), (22)+(p13q112),/t(9)(q34),t(22)(q11),
82	60/m	48,XY,+X,+8,der(9)t(9;22)(q34;q11),ider(22)t(9;22)(q34;q11)[15]	+(X),(8),(9)+(q34),(22)+(q10q112),(22)-(p13p10),/t(9)(q34), t(22)(q11),i(22)(q10),
83	64/w	50,XX,+1,+?4,t(9;22)(q34;q11),+?10,+?14,[5]	+(1),+?(4),+?(10),+?(14),/t(9)(q34),t(22)(q11),
84	32/m	47~49,XY,t(9;22)(q34;q11),+1-3mar[6]	+(?)/t(9)(q34),t(22)(q11),
85	52/w	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[13]/45,XX,-7,t(9;22)(q34;q11)[18]	-(7),/t(9)(q34),t(22)(q11),
86	31/m	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[19]/45,XY,-7,t(9;22)(q34;q11)[8]	-(7),/t(9)(q34),t(22)(q11),
87	62/w	59,XXX,-1,-3,-7,-9,t(9;22)(q34;q11),-11,-12,-13,-16,-17,-18,-19,+21,-22, +der(22)t(9;22)(q34;q11)[33]	-(1),-(3),-(7),-(9),(9)+(q34),-(11),-(12),-(13),-(16),-(17),-(18),-(19), +(21),-(22)/ (22)+(p13q112),/t(9)(q34),t(22)(q11),
88	55/w	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[1]/44,XX,-7,-13, ?der(13)t(9;13)(q11;q34)t(9;22)(q34;q11),der(22)t(9;22)(q34;q11)[21]	-(7),-(13),(13)-(q34),/t(9)(q34),t(13)(q34),t(22)(q11),
89	53/w	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[1]/51~55,XX,+2,+4,+5,-7,+8,+8,t(9;22)(q34;q11), +10,+15,+mar[7]	+(2),(4),(5),-(7),(8)x2,(10),(15),(15),/t(9)(q34),t(22)(q11),
90	65/w	59,XXX,-1,-3,-7,-8,-9,t(9;22)(q34;q11),-11,-15,-16,-19,-20,-21, +der(22)t(9;22)(q34;q11)[22]	-(1),-(3),-(7),-(8),-(9),(9)+(q34),-(11),-(15),-(16),-(19),-(20),-(21), (22)+(p13q112),/t(9)(q34),t(22)(q11),
91	55/m	46,XY,t(9;22)(q34;q11),del(13)(q14)[3]	(13)-(q14q34),/t(9)(q34),del(13)(q14),t(22)(q11),
92	32/w	45,XX,-7,t(9;22)(q34;q11)[12]	-(7),/t(9)(q34),t(22)(q11),
93	54/w	46,XX,der(9)t(9;22)(q34;q11)del(9)(p11),der(22)t(9;22)(q34;q11)[18]	(9)-(p24p11),/t(9)(q34),t(22)(q11),
94	48/m	45,XY,-7,t(9;22)(q34;q11),der(21)t(8;21)(q11;p12)[13]	-(7),(8)+(q11q243),(21)-(p12),/t(9)(q34),t(22)(q11), t(8)(q11),t(21)(p12),

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir diese Dissertation ermöglicht haben. Mein Dank gilt dabei insbesondere Herrn Prof. Harald Rieder für das interessante Thema und die anregende Zusammenarbeit, sowie Herrn Prof. Michael Bölker, der die Aufgabe übernommen hat meine Arbeit zu betreuen. Ich danke auch ganz besonders Harald Balz, der die Programmierung der benötigten Analyseprogramme erfolgreich bewältigt und somit entscheidend dazu beigetragen hat, dass die SCCN nicht nur ein rein theoretisches Werk geblieben ist.

Für die Übernahme der Begutachtung bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Renkawitz-Pohl und Frau Prof. Hassel.

Meinem Ehemann, Dietmar Mörschel, danke ich für die Unterstützung bei der Erstellung der Dokumentvorlage Dissertation und für seine Geduld und Nachsicht, die er in der Zeit des Zusammenschreibens mir gegenüber bewiesen hat.

Danke an alle, die immer daran geglaubt haben, dass ich diese Dissertation beende und von diesen ganz besonders Frau Prof. Elisabeth Gödde, durch die ich die Humangenetik und die zytogenetische Diagnostik von Leukämien kennen gelernt habe.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Jutta Bradtke  
geboren am: 19.02.1967

### Schulische Ausbildung:

1973-1977 Grundschule in Steinhagen  
1977-1986 Kreisgymnasium Halle/Westf.,  
Abschluss: Abitur (2,6)

### Berufsausbildung:

08/86-06/88 Fa. Walter Grossjohann, Bielefeld, Abschluss  
Gärtnergesellin

### Hochschulausbildung:

10/1988-11/1994 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum mit  
den Studienschwerpunkten Mikrobiologie und  
Pflanzenphysiologie, **Abschluss: Diplom-Biologin (gut)**  
07/93-11/94 Diplomarbeit am Lehrstuhl f. Umwelttechnik u. –  
management der Universität Witten/Herdecke  
**„Untersuchungen über die mutagene Wirksamkeit von  
organischen Abwasserinhalten vor und nach UV-  
Bestrahlung und Ozonung“**

### Fortbildung:

03/95-03/96 Umweltakademie Fresenius, Dortmund  
Weiterbildung zur Euro-Umweltmanager/in

### Berufliche Tätigkeiten:

11/95-06/96 Wissenschaftliche Angestellte in der Humangenetischen  
Laborpraxis Prof. Dr. med. E. Gödde, Iserlohn  
07/96-04/2001 Leiterin des zytogenetischen Labors von Frau Prof.  
Dr.med. E. Gödde innerhalb der Gemeinschaftspraxis für  
Laboratoriumsmedizin und Humangenetik,  
Recklinghausen  
04/2001-12/2004 Wissenschaftliche Angestellte im Rahmen des  
Kompetenznetzes „Akute und chronische Leukämie“ am  
Institut für Klinische Genetik, AG Tumorgenetik (Leiter  
Prof. Dr. med. H. Rieder), MZ für Humangenetik der  
Philipps-Universität Marburg  
01/2005-09/2005 Leiterin des zytogenetischen Labors der humangenetischen  
Laborpraxis von Frau Dr. Dipl.-med. K. Pötschick, Berlin  
10/2005- Wissenschaftliche Angestellte des Onkogenetischen  
Labors der Universitäts-Kinderklinik Gießen (Leiter Prof.  
Dr. J. Harbott), Justus-Liebig-Universität Gießen