

Untersuchung genomischer
Alterationen bei myelodysplastischen
Syndromen (MDS) und juveniler
myelomonozytärer Leukämie (JMML)
im Kindesalter mittels
hochauflösender array-CGH

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

M.Sc. Inka Praulich
geboren am 31.08.1979
in Hannover

2013

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden in der folgenden Originalarbeit veröffentlicht:

Praulich I, Tauscher M, Göhring G, Glaser S, Hofmann W, Feurstein S, Flotho C, Lichter P, Niemeyer CM, Schlegelberger B and Steinemann D

Clonal heterogeneity in childhood myelodysplastic syndromes—Challenge for the detection of chromosomal imbalances by array-CGH

Genes, Chromosomes and Cancer, 49: 885–900, 2010

Referentin: Prof. Dr. med. Brigitte Schlegelberger

Korreferentin: Prof. Dr. phil. nat. Michaela Scherr

Tag der Promotion: 11.03.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung	1
1.1 Das hämatopoetische System.....	1
1.2 Myelodysplastische Syndrome	2
1.3 Zytogenetische Anomalien bei MDS und die Einteilung von MDS-Subtypen nach der FAB- und WHO-Klassifikation.....	5
1.4 MDS im Kindesalter	7
1.5 Die juvenile myelomonozytäre Leukämie	10
1.6 Der Nachweis chromosomaler Veränderungen mittels array-CGH.....	10
1.6.1 Komparative genomische Hybridisierung (CGH) und ihre Weiterentwicklung zur array-CGH	11
1.6.2 Genomische Kopienzahlvariationen	14
1.6.3 Kopienzahl neutrale Veränderungen	14
1.6.4 Array-basierte, genomweite Analysen bei MDS.....	15
1.7 Ziel der Arbeit.....	17
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Patientenmaterial	18
2.2 Material	20
2.3 Molekularbiologische Methoden	27
2.3.1 DNA-Extraktion aus Blut- und Knochenmarkzellen.....	27
2.3.2 BAC- und Fosmid-Präparation aus <i>E.coli</i>	27
2.3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	28
2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	28
2.3.5 Amplifikation von Nukleinsäuren.....	28
2.3.6 Sequenzierung auf DNA-Ebene	32
2.3.7 Vergleichende genomische Hybridisierung auf Basis der DNA-Chip- Technologie (<i>array comparative genomic hybridization</i> , array-CGH).....	34
2.4 Zellbiologische Methoden.....	41
2.4.1 Selektion von Zellsubpopulationen mittels Dichtegradientenzentrifugation	41
2.4.2 Positive Selektion von CD34+ Stammzellen aus PB-/KM-MNZ	41
2.4.3 Selektion von CFUs mittels Methylcellulose-Assays.....	42
2.5 Molekularzytogenetische Methoden	42
2.5.1 Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	42
2.5.2 Herstellung von FISH-Sonden	43
2.5.3 Vorbereitung der fixierten Zellen und Hybridisierung	45

3	Ergebnisse	46
3.1	Molekulare Karyotypisierung bei MDS und JMML im Kindesalter mittels BAC/PAC und Oligonukleotid array-CGH	46
3.1.1	Auswertung der BAC/PAC und Oligonukleotid array-CGH Daten vor dem Hintergrund heterogenen Probenmaterials	47
3.1.2	Numerische Chromosomenanomalien bei kindlichem MDS und JMML	54
3.1.3	Detektion von interstitiellen Alterationen von ≥ 5 Mb	56
3.1.4	Detektion genomischer Alterationen unterhalb der Nachweisgrenze der Metaphasenanalytik (≤ 5 Mb)	59
3.1.5	Detektion von Kopienzahl-Polymorphismen	63
3.1.6	Überprüfung submikroskopischer CNAs mithilfe eines Anwenderdesignierten Oligonukleotid CGH Arrays (eArray)	65
3.2	Überprüfung der Kopienzahlveränderungen mittels quantitativer real-time PCR auf DNA-Ebene	66
3.2.1	Detektion numerischer Chromosomenanomalien und Vergleich mit den Daten der Karyotypisierung und FISH Analysen	66
3.2.2	Überprüfung kleiner CNAs der array-CGH Analysen	67
3.3	Sequenzierung von Kandidatengenen	70
3.3.1	Sequenzanalyse von <i>NRAS</i> bei MDS und JMML	70
3.3.2	Sequenzanalyse von <i>MGMT</i> bei MDS und JMML	71
3.4	Genomweite Analyse einzelner myeloischer Kolonien	73
3.4.1	CFC-Assays mit CD34+ Zellen	73
3.4.2	CFC-Assay mit KM-MNZ eines MDS Patienten	74
3.4.3	Direkte DNA-Amplifikation mittels Multiple Displacement Amplification	75
3.4.4	Array-CGH mit amplifizierter DNA	76
3.4.5	Auswertung der array-CGH Daten amplifizierter DNA einzelner CFUs	77
3.4.6	Vergleich der Aberrationen einzelner CFUs mit den array-CGH Ergebnissen der MDS Patienten der Kohorte	81
3.5	Verteilung der CNAs bei MDS und JMML	81
4	Diskussion	82
4.1	Array-CGH bei MDS und JMML	82
4.1.1	Heterogenes Probenmaterial bei MDS	82
4.1.2	Vergleich der verwendeten array-CGH Plattformen	83
4.1.3	Möglichkeiten und Grenzen array-basierter Methoden zur Untersuchung genomischer Aberrationen	85
4.1.4	Deletionen in 17p13 und Inaktivierung von <i>TP53</i>	87
4.1.5	Interstitielle Deletion in 12p13 (<i>ETV6</i>)	88
4.1.6	Heterozygoter Verlust in 6q23 (<i>MYB</i>)	88
4.1.7	Heterozygote Deletion in 3p14	89
4.1.8	CNAs bei JMML	89

4.1.9	Sensitivität der Array-CGH	91
4.1.10	Auswertung der array-CGH Ergebnisse vor dem Hintergrund genomischer Kopienzahl-Polymorphismen (CNV)	92
4.1.11	Möglichkeiten zur Validierung von CNAs	93
4.2	Heterogenität des Probenmaterials	95
4.3	CFC-Assay zur Isolierung klonaler Leukämiezellen bei MDS	96
4.4	Molekulare Pathogenese der Myelodysplastischen Syndrome	98
4.5	Ausblick: Pathogenese und Diagnostik bei MDS	100
5	Zusammenfassung	103
6	Abstract	104
7	Literaturverzeichnis	105
8	Anhang	117
9	Lebenslauf	123
10	Publikationen	124
11	Danksagung	125
12	Selbständigkeitserklärung	126

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AML	Akute myeloische Leukämie
BAC	<i>engl. Bacterial Artificial Chromosome</i>
bp	Basenpaar
CCD	<i>engl. Charge-coupled Device</i>
CD	<i>engl. Cluster of Differentiation</i> , Unterscheidungsgruppen
CFU	<i>engl. Colony Forming Unit</i>
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nucleosid-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EWOG	<i>engl. European Working Group</i>
FAB	<i>engl. French American British</i>
FBS	Fötales Rinderserum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
g	(Erd-)Beschleunigung
GLAD	<i>engl. Gain and Loss Analysis of DNA</i>
h	Stunde
HSZT	Hämatopoietische Stammzelltransplantation
HZL	Haarzell-Leukämie, <i>engl. Hairy Cell Leukemia</i>
kb	Kilobasen
KM	Knochenmark
KMG	Granulozyten des Knochenmarks
KMMNZ	Mononukleäre Zellen des Knochenmarks
L, mL, μ L	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB	<i>engl. Lysogeny Broth</i>
LOH	<i>engl. Loss of Heterozygosity</i>
M, mM, μ M	molar (mol/L), millimolar, mikromolar
MAF	Minimale Allelfrequenz
MAR	<i>engl. Minimal Altered Region</i>
Mb	Megabasen
MC	<i>engl. Methylcellulose</i>
MDR-AML	<i>engl. MDS-derived AML</i>
MDS	Myelodysplastische Syndrome
mFISH	<i>engl. Multicolor FISH</i>
min	Minute
MPN	Myeloproliferative Neoplasie
NCBI	<i>engl. National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>engl. Next Generation Sequencing</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OD	optische Dichte
OMIM	<i>engl. Online Mendelian Inheritance In Man</i>
OT	Objekträger
PAC	<i>engl. P1-derived Artificial Chromosome</i>
PB	Peripheres Blut
PBG	Granulozyten des peripheren Blutes
PBMNZ	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>engl. Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>engl. Polymerase Chain Reaction</i>
PMT	Photoelektronenvervielfacher (<i>engl. Photomultiplier Tube</i>)
qPCR	Quantitative real-time PCR
RA	Refraktäre Anämie
RAEB	Refraktäre Anämie mit Exzess von Blasten
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAP	<i>engl. Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
sec	Sekunde
SKY	<i>engl. Spectral Karyotyping</i> , Spektrale Karyotypisierung
SNP	<i>engl. Single Nucleotide Polymorphism</i>

STR	<i>engl. Short Tandem Repeat</i>
T	Temperatur
t	Zeit
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TIFF	<i>engl. Tagged Image File Format (Bilddatei)</i>
TXT	Textdatei
üN	über Nacht
U	<i>engl. Unit (Einheit der Enzymaktivität)</i>
UPD	Uniparentale Disomie
VE-Wasser	voll entsalztes Wasser
WHO	<i>engl. World Health Organization</i>

1 Einleitung

1.1 Das hämatopoetische System

Blut ist eine Körperflüssigkeit, die sich aus unterschiedlichen Bestandteilen zusammensetzt. Alle Komponenten übernehmen eine wichtige Funktion im Körper. Das Blut besteht etwa zur Hälfte aus Plasma (ca. 55%), einer wässrigen Lösung, in der Proteine, Salze, Hormone und Nährstoffe gelöst sind. Außerdem enthält Blut etwa zu 45% zelluläre Bestandteile, die je nach Funktion und Beschaffenheit unterschieden werden in rote Blutkörperchen (Erythrozyten), weiße Blutkörperchen (Leukozyten) und Blutplättchen (Thrombozyten) (Tab. 1.1). Durch die stetige Zirkulation des Blutes werden Organe und Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt, Stoffwechsel- und Abfallprodukte der Körperzellen zu ihren Ausscheidungsorten transportiert und die Wärmeregulation des Körpers sichergestellt (Michl, 2010).

Tab. 1.1: Zellen des menschlichen Blutes

Zelltyp	Funktion	Zellzahl/ μL Blut
Erythrozyten	Sauerstofftransport	$4,5 - 5,5 \times 10^6$
Leukozyten		$4,0 - 11,0 \times 10^3$
→ Granulozyten	unspezifische Immunabwehr	
Neutrophile		$2,5 - 7,5 \times 10^3$
Eosinophile		$0,4 - 4,0 \times 10^2$
Basophile		$0,1 - 1,0 \times 10^2$
→ Lymphozyten	spezifische Immunabwehr	$1,5 - 3,5 \times 10^3$
→ Monozyten	unspezifische Immunabwehr	$2,0 - 8,0 \times 10^2$
Thrombozyten	Blutgerinnung	3×10^4

aus: Michl, 2010

Der Sauerstoff- und Kohlendioxidtransport erfolgt über die Erythrozyten, die mittels Hämoglobin („roter Blutfarbstoff“) den Sauerstoff binden können. Eine wichtige Aufgabe kommt den Leukozyten als wesentlicher Bestandteil des Immunsystems zu; körperfremde Zellen, wie Bakterien, Viren oder Pilze werden erkannt und unschädlich gemacht. Dabei lassen sich die Leukozyten je nach Aussehen und Funktion in 3 Gruppen einteilen: Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten (Tab. 1.1), wobei die Granulozyten und Monozyten die unspezifische Immunabwehr bilden und die Lymphozyten an der spezifischen Immunabwehr beteiligt sind. Die Thrombozyten haben eine wichtige Funktion bei der Blutgerinnung; sie verschließen umgehend Verletzungen an den Wänden der Blutgefäße, so dass die Blutung zum Stillstand kommt (Michl, 2010).

Alle Blutzellen werden im Knochenmark unter Einfluss von Wachstumsfaktoren (u.a. SCF, GM-CSF) und Zytokinen (u.a. IL-3, IL-6) gebildet; dieser Vorgang wird Hämatopoese genannt. Das Knochenmark ist ein rotes, schwammartiges Gewebe, das die Hohlräume im Inneren der Knochen ausfüllt. Dort entstehen durch spezifische Teilungs- und Reifungsprozesse aus einer Blutstammzelle im Verlauf der Hämatopoese myeloische und lymphatische Vorläuferzellen. Diese reifen im Knochenmark aus und werden als funktionsfähige Zellen anschließend in die Blutbahn entlassen (Michl, 2010).

Kommt es aber, wie bei den Leukämien, zu einer Störung der normalen Ausreifung der Blutzellen im Knochenmark, sammeln sich unreife Vorläuferzellen (Blasten) oder funktionsunfähige Blutzellen dort an und können im weiteren Verlauf der Erkrankung die gesunden Zellen im Knochenmark verdrängen. In Abhängigkeit der beteiligten Zelltypen werden die myeloischen von den lymphatischen Leukämien unterschieden.

1.2 Myelodysplastische Syndrome

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind eine heterogene Gruppe klonaler Erkrankungen der hämatopoetischen Stammzelle (HSZ), die durch inadäquate Reifungs- und Teilungsprozesse der Blutstammzellen charakterisiert werden (Janssen et al., 1989; Boulwood and Wainscoat, 2001; Weimar et al., 1994). Im Knochenmark der Patienten wird eine veränderte Gesamtzahl der Zellen beobachtet, die je nach Beeinträchtigung der Teilungsfunktion zu einer hohen (hyperzellulären), normalen oder erniedrigten (hypozellulären) Zelldichte führt. Ein charakteristisches Merkmal des MDS ist eine hochgradig abnorme Blutbildung im Knochenmark, wobei viele fehlgeformte Zellelemente auftreten, die an normale Blutzellen erinnern, die aber vorzeitig zugrunde gehen. Durch die gestörte Ausreifung der malignen HSZ können die Knochenmark- und Blutzellen ihre volle Funktion nicht mehr erfüllen, so dass Fehlbildungen der Blutzellen (Dysplasien) entlang einer oder mehrerer hämatopoetischen Zellreihen auftreten (Bennett et al., 1982; Aul et al., 1998).

Man geht gegenwärtig davon aus, dass die gestörte Hämatopoese beim MDS ein sog. Mehrschrittprozess ist (Nolte and Hofmann, 2009), bei dem in frühen Stadien ein verstärktes Absterben der Vorläuferzellen, der sog. programmierte Zelltod (Apoptose), auftritt (Clark and Lampert, 1990; Parker et al., 1998; Raza et al., 1995) (Abb. 1.1 B). Im nächsten Schritt geht den unreifen, mutierten Vorläuferzellen durch eine genetische Progression die Fähigkeit zur Apoptose verloren, so dass im Knochenmark (KM) und im Blut (PB) vermehrt unreife Blasten vorkommen (späte Stadien). Steigt der Anteil der Blasten auf über 19% in PB und KM, geht das MDS in eine akute myeloische Leukämie (AML) über (Abb. 1.1 C).

Die Manifestation der myelodysplastischen Syndrome ist durch das Auftreten von Zytopenien im Blut gekennzeichnet, d.h. die Anzahl für einzelne (Unizytopenie) oder mehrere (Panzytopenie) Zellreihen unterschreitet die jeweiligen Normwerte; siehe auch Tab 1.1. Es kommt je nach Stadium der Erkrankung ebenfalls zu einem Anstieg der unreifen, myeloischen Blasten im Knochenmark und einer Ausschwemmung ins Blut (Heaney and Golde, 1999).

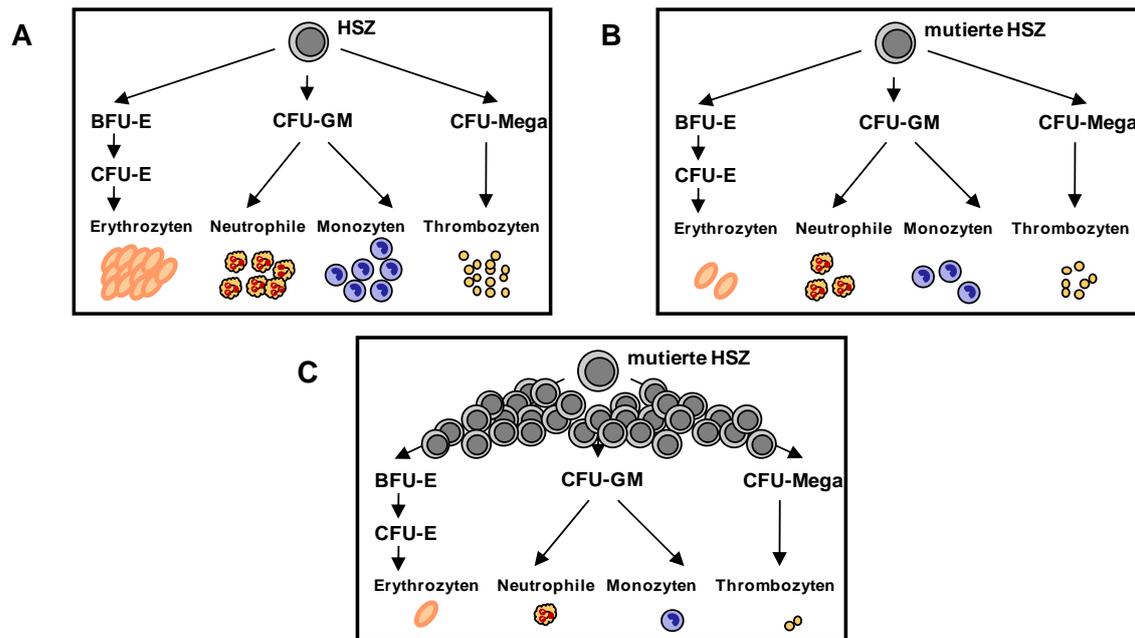


Abb. 1.1: Gestörte Hämatopoese bei MDS

(A) Normale Hämatopoese myeloischer Zellen. (B) Eingeschränkte Hämatopoese entlang aller Zellreihen bei RAEB. (C) Gestörte Hämatopoese mit Ansammlung unreifer Vorläuferzellen im Knochenmark bei MDS/AML. Abkürzungen: HSZ, hämatopoetische Stammzelle; BFU, *burst forming unit*; CFU, *colony forming unit*; E, Eosinophile; GM, Granulozyten-Makrophagen; Mega, Megakaryozyten; RAEB, refraktäre Anämie mit Exzess von Blasten. Adaptiert nach Corey et al., 2007.

Myelodysplastische Syndrome treten in allen Altersgruppen auf, vorwiegend sind jedoch ältere Erwachsene (> 60 Jahre) betroffen. Insgesamt wird das MDS mit einer Häufigkeit von jährlich ca. 4-5 Neuerkrankungen pro 100.000 Personen diagnostiziert, wobei die Anzahl der Betroffenen auf bis zu 50/100.000 in der Gruppe der über 70jährigen steigt (Aul et al., 2001). Bei etwa einem Drittel der Patienten kann ein MDS in eine akute myeloische Leukämie (AML) übergehen, was für die Betroffenen mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert ist (Heaney and Golde, 1999). Aber auch ohne den Übergang in eine akute Leukämie sterben viele MDS Patienten an den Komplikationen der auftretenden Dysplasien (Shadduck et al., 2007; Dayyani et al., 2010). Häufig werden schwere und chronische Anämien bei den Patienten diagnostiziert, d.h. dass durch die verringerte Zahl an Erythrozyten im Blut die Sauerstoffversorgung im Körper eingeschränkt ist und zu

Symptomen wie Müdigkeit, körperliche Schwäche und Kurzatmigkeit führen. Teilweise kommt es zu Leukozytopenien bei den MDS Patienten, die eine erhöhte Infektanfälligkeit zur Folge haben, so dass langwierige und schwer behandelbare bakterielle, virale oder mykotische Infektionen auftreten. Ein Mangel an Blutplättchen (Thrombozytopenie) äußert sich bei betroffenen Patienten durch starke Blutungen bei kleineren Verletzungen oder eine übermäßige Bildung von Blutergüssen. Da die Symptome bei myelodysplastischen Syndromen nicht spezifisch sind, muss für die sichere Diagnose eine gründliche Untersuchung des Blutes (Differentialblutbild) und des Knochenmarks (morphologische Begutachtung der Knochenmarkbiopsie) erfolgen. Zusätzlich werden die Knochenmarkzellen mithilfe der klassischen Zytogenetik (Karyotypisierung) und der Molekularzytogenetik auf Chromosomenanomalien untersucht. Die zytogenetischen Analysen können hilfreiche Informationen zur Bestätigung einer MDS-Diagnose liefern und ermöglichen prognostische Aussagen.

Bei über 90% der neu diagnostizierten MDS Fälle (sog. *de novo* oder primäre MDS) sind die krankheitsauslösenden Ursachen unbekannt (Hofmann et al., 2011). Umweltrisikofaktoren, wie z.B. die Einwirkung organischer Lösungsmittel (Benzole, halogenierte Kohlenwasserstoffe, Pestizide), aber auch der Kontakt mit Haarfärbemitteln, Alkoholkonsum und Rauchen werden als mögliche Auslöser für MDS diskutiert (Strom et al., 2005). Es besteht außerdem ein etwa 20%iges Risiko für Patienten, nach einer Behandlung mit Strahlen- oder Chemotherapie an therapieinduzierten Formen (t-MDS) zu erkranken.

Bislang gibt es für die Behandlung aller MDS-Subgruppen mit Ausnahme der allogenen Knochenmark- oder Blutstammzelltransplantation (engl. *peripheral blood stem cell transplantation*, PBSCT), die nicht bei allen Patienten durchführbar ist, keine kurative Therapie. In Abhängigkeit vom MDS-Subtyp, vom Alter, des allgemeinen Gesundheitszustandes, weiterer Begleiterkrankungen und der persönlichen Einstellungen der Patienten werden individuelle Behandlungspläne erstellt. Aufgrund des meist fortgeschrittenen Alters der Patienten beschränkt sich die Therapie häufig auf palliative Maßnahmen, die vor allem eine symptomorientierte (supportive) Behandlung des Knochenmarkversagens betreffen. Die beiden in Deutschland bis heute zugelassenen Medikamente werden zur Behandlung bestimmter Patienten mit MDS eingesetzt; zum einen kann bei transfusionsbedingter Eisenüberladung das Medikament Deferasirox (Hersteller: Novartis) gegeben werden und zum anderen ist das Medikament Azacitidin (Hersteller: Celgene) als demethylierende Substanz bei der Behandlung von Hochrisiko-MDS-Patienten geeignet.

1.3 Zytogenetische Anomalien bei MDS und die Einteilung von MDS-Subtypen nach der FAB- und WHO-Klassifikation

Bei etwa 50% der *de novo* MDS Patienten treten chromosomale Anomalien auf, womit die zytogenetische Analyse eine große Bedeutung bei der Diagnosestellung und Einordnung von Subtypen der MDS hat. Häufige Chromosomendefekte sind bei dieser Erkrankung der Verlust eines Chromosoms 7 (Monosomie 7), der Verlust genomischen Materials (Deletion) auf dem langen Arm der Chromosomen 5, 7, 12 und 20 (Haase et al., 2007; Nilsson et al., 2007). Außerdem werden auch Zugewinne ganzer Chromosomen in den malignen Zellpopulationen identifiziert, wie z.B. die Trisomie 8 oder Trisomie 21. Als weitere zytogenetische Veränderungen werden komplex aberrante Karyotypen mit mehr als drei gleichzeitig vorkommenden Chromosomenanomalien je malignem Klon identifiziert (Göhring et al., 2010; Schlegelberger et al., 2012), wohingegen balancierte Translokation, die zu Fusionsgenen führen können, bei MDS selten vorkommen (Haase, 2009) (Abb. 1.2). In der Gruppe mit sekundären MDS (sek. MDS) erhöht sich der Prozentsatz der Patienten mit zytogenetischen Aberrationen auf 80% (Pedersen-Bjergaard et al., 2002).

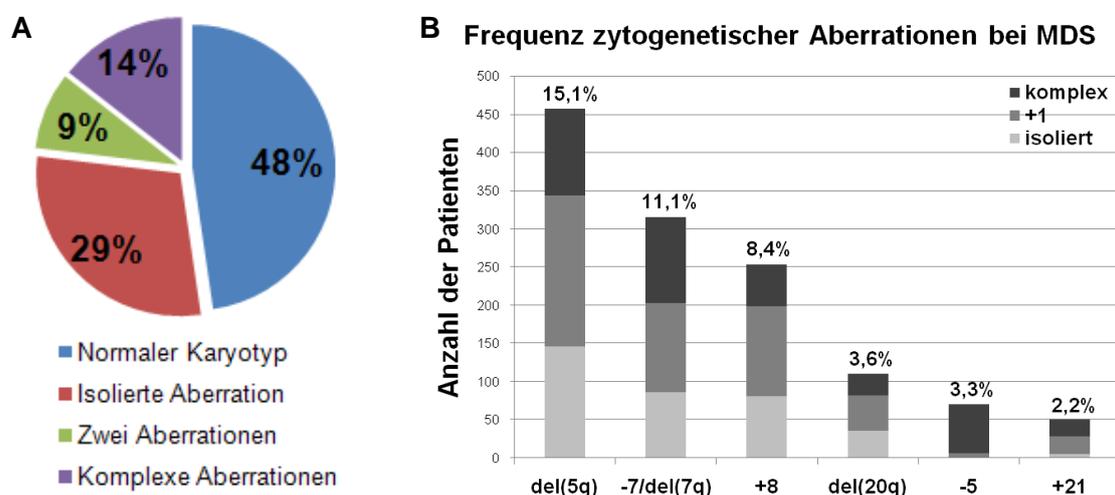


Abb. 1.2: Zytogenetische Anomalien bei MDS

(A) Prozentuale Verteilung zytogenetischer Anomalien bei MDS. (B) Frequenz der rekurrenten, zytogenetischen Aberrationen bei MDS. Abkürzung: del, Deletion. Adaptiert nach Haase et al., 2007.

Aufgrund der unterschiedlich starken Ausprägungen einzelner Merkmale, wie dem Anteil der Blasten im Knochenmark und im Blut, dem morphologischen Befund des Knochenmarks und dem Karyotyp, können die myelodysplastischen Syndrome in verschiedene Subtypen eingeordnet werden. Wichtig ist diese Einteilung im Hinblick auf die Prognose für die Patienten und mögliche Therapieansätze. Erstmals erfolgte die

Klassifizierung der MDS-Subtypen 1982 nach dem FAB-(French-American-British Cooperative Group) System (Bennett et al., 1982), ohne Einbeziehung zytogenetischer Informationen. Das wichtigste Kriterium bei der FAB-Klassifikation ist der Blastenanteil in Knochenmark und Blut. Eine Verfeinerung der Subtypen unter Berücksichtigung der Chromosomenanomalien bei MDS wurde von der WHO erstmals 2001 vorgeschlagen und ist in der aktuellen Ausgabe aus dem Jahr 2008 (Tab. 1.2) allgemein anerkannt (Vardiman et al., 2009).

Tab. 1.2: WHO-Klassifikation der MDS-Subtypen bei Erwachsenen

Subtyp	Blut	Knochenmark
Refraktäre Zytopenie mit Einliniendysplasie (RCUD): Refraktäre Anämie (RA), Refraktäre Neutropenie (RN), Refraktäre Thrombozytopenie (RT)	Uni- oder Bizytopenie, ≤ 1% Blasten	Unilineäre Dysplasie mit ≥ 10% der Zellen, < 5% Blasten
Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS)	Anämie, ≤ 1% Blasten	< 5% Blasten, ≥ 15% Ringsideroblasten
Refraktäre Zytopenie mit Mehrliniendysplasie (RCMD)	Zytopenie(n), ≤ 1% Blasten	Dysplasie in ≥ 10% der Zellen in ≥ 2 myeloischen Linien, ±15% Ringsideroblasten, < 5% Blasten
Unklassifizierbares MDS (MDS-U)	Zytopenie(n), ≤ 1% Blasten	Dysplasie in mindest. einer myeloischen Zellreihe, < 5% Blasten
Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss (RAEB I)	Zytopenie(n), < 5% Blasten	Uni- oder multilineäre Dysplasie, 5-9% Blasten
Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss (RAEB II)	Zytopenie(n), 5-19% Blasten	Uni- oder multilineäre Dysplasie, 10-19% Blasten
MDS mit isolierter del(5q)	Anämie, ≤ 1% Blasten	isolierte del(5q) Abnormalität, < 5% Blasten

aus: Vardiman et al., 2009

Als einzige zytogenetische Entität findet sich in der aktuellen MDS-Klassifikation der WHO eine Subgruppe für Patienten mit isolierter 5q-Deletion, da diese Patienten im Vergleich zu allen anderen MDS-Subtypen hinsichtlich der mittleren Lebenserwartung eine gute Prognose haben (Germing et al., 2000; Haase et al., 2007). Außerdem besteht für Patienten mit isolierter 5q-Deletion eine Therapiemöglichkeit mit dem Medikament Lenalidomid (Hersteller: Celgene) (List et al., 2005), was bzgl. seiner Wirksamkeit und dem Transformationsrisiko zur AML zurzeit im Rahmen klinischer Studien untersucht wird.

Zusätzlich zur WHO-Klassifikation hat noch ein weiteres System zur Abschätzung der Prognose für die MDS Patienten Bestand, das sog. Internationale Prognose-Score System (engl. *International Prognostic Scoring System*, IPSS). Neben dem Blastenanteil und den Chromosomenanomalien haben auch die Anzahl und Typen der Zytopenien einen Einfluss auf die Prognose für die Überlebenszeit und den Übergang zur AML (Greenberg et al., 1997). Grundsätzlich variiert das Risiko einer Progression zu akuter Leukämie sowohl zwischen als auch innerhalb der MDS-Subtypen, was auf eine heterogene Pathogenese der zugrunde liegenden Erkrankungen hindeutet.

1.4 MDS im Kindesalter

Während MDS bei den älteren Erwachsenen die häufigsten malignen Bluterkrankungen darstellen, ist das Auftreten im Kindesalter dagegen mit 1,8/1 Million Kindern bis 14 Jahren jährlich sehr selten (Hasle et al., 1999). Wie auch bei den Erwachsenen sind bei *de novo* MDS im Kindesalter die Ursachen für die Erkrankung weitgehend unbekannt (Hasle, 2011). Neben den primären MDS treten im Kindesalter auch sekundäre Erkrankungsformen auf.

Zu den im Folgenden aufgeführten sek. MDS gehören unter anderem die familiären Erkrankungen, die bei etwa 10% der Patienten beschrieben werden (Hasle et al., 1999). Des Weiteren wurde bei familiärem MDS eine Monosomie 7 als häufig auftretende Chromosomenaberration detektiert (Shannon et al., 1989). Es entstehen auch bei Kindern therapieinduzierte Erkrankungsformen nach Einwirkung von Strahlen- oder Chemotherapie (Pui et al., 1990). Außerdem treten sek. MDS häufig bei Kindern mit angeborenen Knochenmarkerkrankungen auf, wie z.B. Fanconi-Anämien, schweren kongenitalen Neutropenien oder Shwachman-Diamond-Syndromen (Niemeyer and Kratz, 2006).

Tab. 1.3: Unterschiede bei Kindern und Erwachsenen mit MDS

	Kinder	Erwachsene
Erkrankungshäufigkeit/Jahr/Million	1-2	> 30
RARS	< 2%	25%
Zytogenetische Aberrationen:	50%	40%
-7 / del(7q)	30%	10%
-5 / del(5q)	1-2%	20%
Mutationen in <i>NRAS</i>	selten	häufig

aus: Hasle, 2011

Bestimmte Merkmale der MDS bei Erwachsenen wie die Morphologie der Knochenmarkzellen oder immunophänotypische Charakteristika werden in vergleichbarer Weise bei MDS im Kindesalter beobachtet, jedoch gibt es auch deutliche Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen (Tab. 1.3). So werden z.B. die Subtypen RARS und MDS mit 5q-Anomalie im Kindesalter äußerst selten diagnostiziert (Niemeyer and Baumann, 2008; Hasle, 2011). Zudem treten bei den jungen Patienten mit refraktärer Zytopenie (RC) wesentlich häufiger Neutropenien und Thrombozytopenien auf, wohingegen bei erwachsenen RC Patienten isolierte Anämien vorherrschen (Elghetany, 2007). Im Gegensatz zu MDS bei Erwachsenen zeigt sich bei Kindern insbesondere in der Gruppe der RC (bei etwa 77%) eine Hypozellularität des Knochenmarks (Polychronopoulou et al., 2004; Niemeyer and Kratz, 2006; Kardos et al., 2003). Unter Berücksichtigung dieser Unterschiede wurde im Jahr 2003 eine eigene Klassifizierung für MDS im Kindesalter erstellt (Hasle et al., 2003). Bei RC Patienten mit einem Blastenanteil von weniger als 5% lässt sich die Diagnose MDS hauptsächlich durch Ausreifungsstörungen der Knochenmarkzellen bestätigen. Sobald der Blastenanteil im Knochenmark bei 5-19% liegt, wird dieses Krankheitsstadium als Refraktäre Anämie mit Exzess von Blasten (RAEB) bezeichnet. Als Übergang zur akuten Leukämie wird die Refraktäre Anämie mit Exzess von Blasten in Transformation (RAEB-T) bei Patienten mit mehr als 20% Blasten diagnostiziert (siehe Tab. 1.4). Zusätzlich enthält die Klassifikation für kindliche MDS den Subtyp der Myelodysplasie bezogenen, akuten myeloischen Leukämie (MDR-AML), der ebenfalls am Übergang zur AML steht. Die Betroffenen haben zwar einen Blastenanteil von größer als 30% im Knochenmark, es zeigt sich jedoch eine größere Übereinstimmung mit MDS-spezifischen Merkmalen. Nach einer Stammzelltransplantation besteht für die MDR-AML Patienten ein größeres Rückfallrisiko im Vergleich zu RAEB und RAEB-T (Hasle et al., 2003; Niemeyer and Baumann, 2008). Insbesondere die Unterscheidung zwischen MDS mit einem geringen Blastenanteil und aplastischer Anämie (AA) bzw. anderen, nicht-klonalen Knochenmarkerkrankungen stellt eine große Herausforderung dar. Auch die Differenzierung zwischen RAEB und AML erfordert neben der morphologischen Begutachtung die Einbeziehung zusätzlicher Parameter, um eine optimale Behandlungsstrategie für die Patienten zu entwickeln (Hasle et al., 2003).

Mithilfe der klassischen Zytogenetik lässt sich bei etwa 50% bis 70% der MDS im Kindesalter ein aberranter Karyotyp nachweisen (Elghetany, 2007), wobei Monosomie 7 die häufigste numerische Chromosomenanomalie ist, die bei etwa 30% der *de novo* MDS und bei 50% der t-MDS Patienten auftritt (Niemeyer and Baumann, 2008). Kardos *et al.* berichteten in ihrer retrospektiven Studie aus dem Jahr 2003, dass für Kinder mit refraktärer Anämie (RA) und Monosomie 7 eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit der Progression zu fortgeschrittenen MDS Stadien im Vergleich zu Patienten mit anderen

chromosomalen Anomalien oder normalem Karyotyp besteht (Kardos et al., 2003). In einer erst kürzlich veröffentlichten prospektiven Studie wurden zytogenetische Daten hinsichtlich ihrer prognostischen Aussage zum Krankheitsverlauf bei 192 Kindern mit fortgeschrittenem MDS (RAEB und RAEB-T) aus EWOG-MDS Studien ausgewertet (Göhring et al., 2010). Da sich kein Unterschied für das Gesamtüberleben bei den Patienten mit Monosomie 7 als alleinige Aberration im Vergleich zu den Patienten mit Monosomie 7 und zusätzlichen Aberrationen zeigte, wurden alle Patienten mit Monosomie 7 in einer Gruppe zusammengefasst. Für Patienten mit komplex aberranten Karyotypen mit ≥ 3 chromosomalen Aberrationen, die mindestens eine strukturelle Veränderung einschließen, ergab sich eine deutlich ungünstigere Prognose als für Patienten aus den Gruppen mit ≥ 3 klonalen Aberrationen ohne strukturelle Aberrationen oder für Patienten mit monosomalem Karyotyp. Als weitere chromosomale Aberrationen werden wie auch bei den erwachsenen MDS Patienten z.B. eine Trisomie 8 und eine interstitielle Deletion auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 gefunden (Göhring et al., 2010; Niemeyer and Kratz, 2006).

Zusätzliche genetische Veränderungen, wie weitere genomische Anomalien, Mutationen oder Methylierungsereignisse, die die Expression von Tumorsuppressorgenen oder Onkogenen verändern können, scheinen für die Pathogenese eines *de novo* MDS auch im Hinblick auf die Patienten mit normalem Karyotyp notwendig zu sein. Das Auftreten und die Relevanz dieser Veränderungen sind jedoch bei MDS im Kindesalter noch weitgehend unbekannt.

Tab. 1.4: Klassifikation der MDS-Subtypen bei Kindern

MDS Subtyp	PB	KM	weitere Kriterien
Refraktäre Zytopenie (RC)	< 2% Blasten	< 5% Blasten	Ausreifungsstörung der Knochenmarkzellen
Refraktäre Zytopenie mit Ringsideroblasten (RARS)			spezielle Eisenablagerungen in einzelnen Zellen, sehr selten im Kindesalter
Refraktäre Anämie mit Exzess von Blasten (RAEB)	2-19% Blasten	5-19% Blasten	
Refraktäre Anämie mit Exzess von Blasten in Transformation (RAEB-T)	20-29% Blasten	20-29% Blasten	
JMML			
Juvenile myelomonozytäre Leukämie (JMML)			Überschießende Produktion von Monozyten, Organinfiltration

aus: Rogge und Niemeyer, 2003

1.5 Die juvenile myelomonozytäre Leukämie

Die juvenile myelomonozytäre Leukämie (JMML) wurde zunächst als eine Form des MDS gesehen, stellt heutzutage jedoch ein eigenständiges Krankheitsbild dar. Das durchschnittliche Erkrankungsalter beträgt etwa 2 Jahre und Jungen sind doppelt so häufig betroffen wie Mädchen (Niemeyer et al., 1997; Luna-Fineman et al., 1999). Bei den JMML Patienten wird durch maligne HSZ eine überschießende Produktion von Zellen der granulozytären und monozytären Reihe ausgelöst. Diese Zellen wandern in großer Zahl vom Blut in andere Organe, wie Leber und Milz, sowie Lunge oder Darm. Die gesunden Stammzellen im Knochenmark werden durch die gesteigerte Produktion der entarteten Zellen verdrängt, so dass ein Mangel aller drei Blutzellreihen die Folge ist (Emanuel, 2004). Für die JMML konnte gezeigt werden, dass in den malignen Zellen der natürliche Kontrollmechanismus für die Zellteilung durch die permanente Aktivierung der RAS-Signalkaskade außer Kraft gesetzt ist (Flotho et al., 1999). Als zytogenetisches Merkmal tritt ebenso bei Kindern mit JMML eine Monosomie 7 auf, wobei kein Unterschied bzgl. des klinischen Verlaufs zwischen den Patienten mit und ohne Monosomie 7 beobachtet wird (Hasle et al., 2003; Niemeyer et al., 1997).

Die einzige Heilungschance für MDS und JMML Patienten ist die Knochenmark(SCT)- oder Blutstammzelltransplantation. Durch eine Strahlen- oder Chemotherapie werden alle eigenen Knochenmarkzellen der Patienten zerstört und anschließend durch die gesunden Stammzellen des Spenders ersetzt. Bis ein passender Spender gefunden ist, erhalten die Patienten häufig Bluttransfusionen, durch die Erythrozyten und Thrombozyten vorübergehend ersetzt werden können, sowie Antibiotika zur frühzeitigen Behandlung von Infektionen. Da die SCT eine sehr eingreifende Therapie ist, wird bei Patienten mit normalem Karyotyp und ohne behandlungsbedürftige Zytopenien im progressionsfreien Intervall, welches durchschnittlich 2 Jahre und bei RC Patienten bis zu 4 Jahre betragen kann, die „watch-and-wait“-Strategie angewendet. Durch die symptomatische Therapie und regelmäßige Kontrollen von Knochenmark und Blut ist es möglich, die Lebensqualität der Betroffenen möglichst lange zu erhalten (Rogge and Niemeyer, 2003).

1.6 Der Nachweis chromosomaler Veränderungen mittels array-CGH

Zytogenetische Untersuchungen finden heutzutage Anwendung in der Prä- und Postnataldiagnostik, z.B. bei Verdacht auf chromosomale Syndrome wie das Down-Syndrom, sowie zur Abklärung von Neoplasien bei Verdacht auf Leukämien und Lymphome. So ist mittels Karyotypisierung der Nachweis von numerischen und strukturellen Chromosomenanomalien mit einem Auflösungsvermögen von etwa 5 bis 10 Millionen Basenpaaren (Mb) möglich. In Ergänzung zu diesen traditionellen

Bänderungstechniken der Chromosomen wird für spezielle, diagnostische Fragestellungen zunehmend die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) eingesetzt. Mit dieser Technik können beispielsweise auch kleinere Deletionen im Bereich von 0,1 Mb an Interphase-Kernen detektiert werden. Eine notwendige Voraussetzung für die Durchführung von FISH Analysen ist allerdings die genaue Kenntnis über die chromosomale Lokalisation der Veränderung.

Während die klassische Zytogenetik zusammen mit der FISH-Analytik in der Leukämiediagnostik etablierte Techniken sind, finden auch neuere Methoden wie die komparative genomische Hybridisierung (engl., *comparative genomic hybridization*, CGH) und ihre Weiterentwicklung zur array-CGH (CGH Microarrays) mit einem wesentlich höheren Auflösungsvermögen Einzug in die Routinediagnostik (Kapitel 1.6.1). Zur Abklärung submikroskopischer Strukturaberrationen in der Stufendiagnostik bei Patienten mit mentaler Retardierung (MR) werden array-CGH Analysen mittlerweile routinemäßig schon angewendet (Vermeesch et al., 2007).

1.6.1 Komparative genomische Hybridisierung (CGH) und ihre Weiterentwicklung zur array-CGH

Anfang der neunziger Jahre wurde die komparative genomische Hybridisierung (CGH) erstmals zur Untersuchung genetischer Veränderungen auf chromosomaler und subchromosomaler Ebene bei soliden Tumoren beschrieben (Kallioniemi et al., 1992). Nach dem Prinzip der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung kann mithilfe dieser molekulargenetischen Methode in einer einzigen Hybridisierung das gesamte Tumor-Genom auf DNA-Imbalancen mit einer maximalen Auflösung von ca. 10 bis 20 Mb untersucht werden (Bentz et al., 1998; Kallioniemi et al., 1994; Weiss et al., 2003).

Für eine CGH-Analyse werden geringe Mengen an Tumor- und Referenz-DNA mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen, beispielsweise mit dem grünen Farbstoff Fluoreszein (FITC) und dem roten Farbstoff Rhodamin (TRITC) direkt oder indirekt markiert und zu gleichen Teilen gemischt auf normale Metaphasenchromosomen hybridisiert. Dabei konkurrieren Tumor- und Referenz-DNA um homologe Bindungsstellen auf den Chromosomen, so dass z.B. bei einem Überschuss einer bestimmten DNA-Sequenz im Tumor diese häufiger an die entsprechende chromosomale DNA bindet und das gekoppelte Fluorochrom bei der Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop überwiegt; entsprechend werden genetische Verluste des Tumors durch einen Überschuss an Signalintensität der Referenz-DNA deutlich. Liegen dagegen Tumor- und Referenz-DNA in gleichen Konzentrationen vor, ergibt sich bei simultaner Betrachtung beider Fluorochrome eine gelbe Mischfarbe. Die quantitative Auswertung einzelner Metaphasen erfolgt mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops und einer CCD-Kamera (engl. *charge coupled device*), wobei die Fluoreszenzbilder seriell für jedes Fluorochrom einzeln

aufgenommen und anschließend für die Quantifizierung zur Deckung gebracht werden. Um schließlich genomische Aberrationen der Tumorprobe zuverlässig beschreiben zu können, müssen für eine CGH-Analyse mehrere Metaphasenchromosomen mit adäquater Chromosomenlänge ausgewertet werden.

Durch die chromosomale CGH mit der Hybridisierung auf Metaphasenpräparaten wurde das Auflösungsvermögen der klassischen Zytogenetik nur unwesentlich verbessert. Eine deutliche Steigerung der Auflösung konnte durch die Entwicklung der array-CGH (auch: Matrix-CGH) auf Basis der DNA-Chip-Technologie erreicht werden (Solinas-Toldo et al., 1997; Pinkel et al., 1998; Wessendorf et al., 2002) (Abb. 1.3). Je nach Arrayformat sind die genomischen DNA-Sequenzen z.B. in unterschiedlichen Vektoren kloniert, wie BAC- (bis zu 300 kb), PAC- (130 – 150 kb) oder YAC- (200 – 2000 kb) Vektoren. Eine weitere Möglichkeit der stabilen Klonierung genomischer DNA in *low-copy* Plasmiden (1 bis 12 Plasmide pro Zelle) bieten Fosmid-Klone mit einer Insertlänge von etwa 40 kb. Mithilfe der DOP-PCR (Kapitel 2.5.2) erfolgt eine selektive Vervielfältigung dieser sog. Ziel-DNA, um eine Verunreinigung mit Vektor-DNA zu minimieren (Fiegler et al., 2003). Auf einem planaren, beschichteten Glasobjektträger werden diese genomischen DNA-Sequenzen anschließend mithilfe eines Roboters aufgebracht (engl. *spots*) und immobilisiert. Das heutzutage allerdings am weitesten verbreitete array-CGH Format basiert auf der Verwendung von Oligonukleotiden als Ziel- bzw. Sonden-DNA. Für die kommerzielle Produktion der Oligonukleotid CGH Arrays werden beispielsweise 60-mer Oligonukleotide mithilfe der *in situ* „SurePrint-Technologie“ (Agilent Technologies) direkt auf dem beschichteten Glasobjektträger synthetisiert. Die Auswahl der Sonden-DNA erfolgt nach bestimmten Qualitätskriterien wie z.B. der Schmelztemperatur der Oligonukleotide, der Wahrscheinlichkeit von Kreuzhybridisierungen u.a., um ein robustes Hybridisierungsverhalten zu gewährleisten. Die maximale Auflösung der unterschiedlichen Arrayformate ist demnach durch die Länge und den Abstand der genomischen DNA-Sequenzen festgelegt und kann beispielsweise für BAC/PAC CGH Arrays maximal 100 kb und bei Oligonukleotid CGH Arrays wenige Kilobasen betragen.

Die Vorbereitung der Tumor- und Referenz-DNA für array-CGH Analysen erfolgt ähnlich der Prozedur für die konventionelle CGH, wobei die Amplifikation mit gleichzeitigem Einbau unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe (Cy3-dCTP, grün und Cy5-dCTP, rot) meist direkt mittels *random priming* (Kapitel 2.3.7.1) durchgeführt wird. Die gereinigte, fluoreszenzmarkierte Tumor- und Referenz-DNA wird in gleichen Teilen gemischt und auf den Array hybridisiert. Unspezifisch gebundene DNA-Moleküle werden in den anschließenden Waschschritten entfernt, der Array mittels konfokalem Laser-Scanner gescannt und die Fluoreszenzintensitäten ausgewertet.

Neben einer hohen Auflösung bietet die array-CGH die Möglichkeit, verschiedene Untersuchungsmaterialien zu verwenden. Für die Analysen sind im Gegensatz zur klassischen Zytogenetik keine lebenden Zellen erforderlich. Es kann sowohl hochmolekulare DNA extrahiert aus frischem oder eingefrorenem Material, wie z.B. Gewebeproben oder Blut- bzw. Knochenmarkzellen eingesetzt werden, aber auch die Verwendung von DNA isoliert aus in Paraffin eingebettetem Tumormaterial (engl. *formalin fixed paraffin embedded*, FFPE) ist möglich (Little et al., 2006; Joosse et al., 2007). Des Weiteren konnte beispielweise von Geigl *et al.* gezeigt werden, dass sogar von Einzelzellen und von 5-10 Zellen gleichen Ursprungs mithilfe der array-CGH reproduzierbare genomische Profile erhalten werden können (Fiegler et al., 2007; Geigl et al., 2009).

Eine Einschränkung im Vergleich zur Chromosomenanalyse gibt es hinsichtlich der Detektion von strukturellen, chromosomalen Aberrationen ohne Änderung der DNA-Kopienzahl. Mittels array-CGH können lediglich unbalancierte Translokationen, bei denen es zu Zugewinnen oder Verlusten genetischen Materials kommt, jedoch keine balancierten Translokationen identifiziert werden.

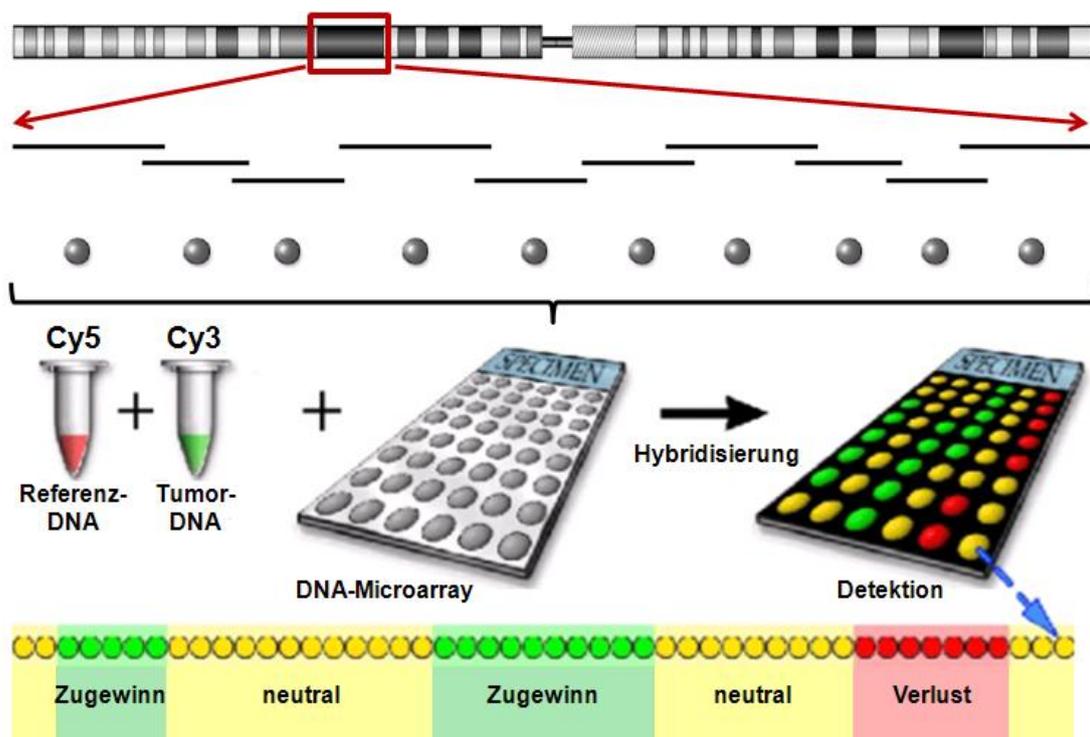


Abb. 1.3: Prinzip der array-CGH

Adaptiert von D. Steinemann (Institut für Zell- und Molekularpathologie).

1.6.2 Genomische Kopienzahlvariationen

Mithilfe der genomweiten array-CGH ist es heutzutage möglich, selbst kleinste DNA-Kopienzahlveränderungen (engl. *copy number alterations*, CNAs) auf der Basis einzelner Gene zu untersuchen. Die Nutzung dieser hochauflösenden Techniken liefert gleichzeitig einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der natürlichen genomischen Variabilität, wie sie z.B. von Redon *et al.* in einer Studie mit 270 gesunden Individuen unterschiedlicher Populationen untersucht wurde. Nach seiner Definition sind diese strukturellen genomischen Varianten (engl. *copy number variations*, CNVs) DNA-Segmente mit einer Größe von ≥ 1 kb, die eine variable Kopienzahl im Vergleich zu einem Referenzgenom aufweisen. CNVs können laut Redon sowohl eine einfache Struktur besitzen, aber auch als komplexe Zugewinne oder Verluste homologer Sequenzen an unterschiedlichen Stellen des Genoms auftreten (Redon *et al.*, 2006). In den folgenden Jahren wurden die CNVs in zahlreichen Studien mithilfe von Anwender-designten, hochaufgelösten CNV Arrays hinsichtlich ihrer Größe und ihres Auftretens weiter charakterisiert. Perry *et al.* konnten 2008 unter anderem zeigen, dass etwa 88% der bis dahin untersuchten CNVs deutlich kleiner waren als bislang angenommen (Perry *et al.*, 2008). Die Anzahl dieser strukturellen Varianten beim Menschen wird aktuell mit etwa 30000 CNVs angegeben (Conrad *et al.*, 2010; Mills *et al.*, 2011). Somit wird auch deutlich, dass die Interpretation von array-CGH Daten eines Patientenkollektivs vor dem Hintergrund der CNV-Problematik erfolgen muss, um somatische CNAs mit Krankheits-assoziiertem Potential auswerten zu können. Ob das Auftreten bestimmter CNVs oder eine Häufung von CNVs bei gesunden Individuen eine genetische Prädisposition für bestimmte Erkrankungen darstellt, wird weiterhin diskutiert (Vissers *et al.*, 2009; Shlien *et al.*, 2008). Informationen zu bekannten CNVs sind z.B. in der "Database of Genomic Variants" (Lafrate *et al.*, 2004), die stetig auf der Basis von Veröffentlichungen aktualisiert wird, frei im Internet zugänglich (<http://projects.tcag.ca/variation/>).

1.6.3 Kopienzahl neutrale Veränderungen

Doch nicht nur genomische Imbalancen in Form von CNAs werden bei der Analyse von Tumormaterial unterschiedlicher Erkrankungen gefunden. Auch der Verlust der Heterozygotie (engl. *loss of heterozygosity*, LOH), bei dem die Kopienzahl unverändert ist, kann aufgrund einer uniparentalen Disomie (UPD) auftreten. Dabei stammen beide homologen Chromosomen von nur einem Elternteil, so dass rezessive Mutationen homozygot vorliegen und im Fall eines Tumorsuppressorgens zu einer Inaktivierung führen. UPD einer bestimmten Chromosomenregion kann phänotypische Ausprägungen bedingen (Bsp. „Prader-Willi Syndrom“, PWS bei $\text{upd}(15)\text{mat}$). Solche Kopienzahl neutralen LOHs können mithilfe der Hochdurchsatz-SNP-Analysetechnik (engl. *single nucleotide polymorphisms*, SNPs), nicht aber mittels konventioneller array-CGH nachgewiesen werden. Bei den SNP Arrays (SNP-a) handelt es sich um Oligonukleotid-

basierte Formate, bei denen im Unterschied zu den CGH Arrays wesentlich kürzere Sonden-DNA (25 bp) verwendet wird. Diese 25-mer Oligonukleotide überspannen die jeweiligen SNPs und bedingen durch ihre geringe Länge und ihre vorgegebene Sequenz eine weniger spezifische Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten Tumor- und Referenz-DNA. Ein weiterer limitierender Faktor ist die Verteilung der SNPs im Genom, so dass bei Verwendung von SNP-a eine geringere genomweite Auflösung im Vergleich zur array-CGH erhalten wird (Tiu et al., 2007; Wolber et al., 2006; Davies et al., 2005). Die Abgrenzung zwischen somatischen und konstitutionellen Mutationen (vererbaren Keimbahn-Mutationen) wird bei den SNP-a Analysen durch die Hybridisierung von DNA unterschiedlicher Zellpopulationen des gleichen Patienten erreicht. So können bei MDS Patienten je nach Verfügbarkeit z.B. die Zellen der Mundschleimhaut oder die CD3-positiven T-Lymphozyten (T-Zellen), die normalerweise nicht in die MDS-Pathogenese involviert sind, zum direkten Vergleich der genomischen Profile untersucht werden (Gondek et al., 2007b; Jaju et al., 2000).

1.6.4 Array-basierte, genomweite Analysen bei MDS

Zytogenetische und molekularzytogenetische Analysen gehören mittlerweile zur Standarddiagnostik bei MDS, da bei etwa 50% der Patienten Chromosomenveränderungen detektiert werden können und diese bei der Diagnosesicherung und Prognoseabschätzung eine wichtige Rolle spielen (Greenberg et al., 1997). Die genomweite Untersuchung submikroskopischer Läsion bei MDS mittels array-basierter Methoden wurde erstmals von Paulsson *et al.* im Jahr 2006 beschrieben. Bei 9 von 10 MDS und AML Patienten mit Trisomie 8 wurden unter Verwendung von BAC/PAC CGH Arrays mit einer genomweiten Auflösung von 100 kb neben den zytogenetisch sichtbaren Chromosomenanomalien auch kleinere, kryptische Aberrationen einer Größe von 0,5 bis 2,2 Mb detektiert. Die Überprüfung der array-CGH Ergebnisse erfolgte mittels FISH Analysen an fixierten Knochenmarkzellen und nach Ausschluss der bekannten CNVs wurden noch 9 Aberrationen (Zugewinne und heterozygote Verluste) bei 4 MDS bzw. AML Patienten als „Neoplasie-assoziierte“ CNAs bewertet (Paulsson et al., 2006). In den folgenden Jahren wurden weitere retrospektive array-CGH Studien bei erwachsenen MDS Patienten mit und ohne Chromosomenanomalien veröffentlicht. Unter anderem berichteten O’Keefe *et al.* in ihrer Studie mit 38 Patienten unterschiedlicher MDS-Subgruppen und 11 gesunden Kontrollen, dass durch den Einsatz der BAC/PAC array-CGH mit einer genomweiten Auflösung von 1 Mb bei 14 von 17 Patienten (82,4%) mit normalem Karyotyp und bei 17 von 19 Patienten (89,5%) mit bekannten Chromosomenanomalien zusätzliche Läsionen identifiziert werden konnten. Zur Überprüfung einzelner array-CGH Ergebnisse wurden sowohl quantitative PCR-Assays auf Basis von Mikrosatelliten (engl. *short tandem repeat*, STR) wie auch SNP-a Analysen durchgeführt. Im Vergleich zu den gesunden Kontrollen fand sich bei den MDS Patienten

eine größere Anzahl genomischer Läsionen, die überwiegend durch aberrante Fluoreszenzsignale einzelner BAC-Sonden detektiert wurden (O'Keefe et al., 2007).

Aufgrund der höheren Auflösung und des wachsenden Angebots der kommerziellen Hersteller wurden zunehmend Oligonukleotid CGH Arrays für genomweite Analysen genutzt. In einer Kohorte mit 12 MDS und einem AML Patienten mit isolierter 5q-Deletion konnten Evers *et al.* durch die Verwendung von Oligonukleotid CGH Arrays mit einer Auflösung von 35 kb neben der exakten Bruchpunktbestimmung in 5q zusätzliche Aberrationen nachweisen. Sie berichteten auch über eine MDS Patientin, bei der mithilfe der klassischen Zytogenetik aufgrund unzureichender Chromosomenqualität nur die 5q-Deletion identifiziert wurde. Mittels array-CGH konnte bei dieser Patientin nachträglich ein komplex aberrantes, genomisches Profil aufgedeckt werden (Evers et al., 2007).

Durch die Entwicklung array-basierter Methoden auf der Basis von Oligonukleotid-Sonden und der zunehmenden Identifikation von SNPs im humanen Genom konnten die kommerziellen Hersteller hochauflösende SNP-a anbieten. So wurden seit dem Jahr 2007 auch in der MDS Forschung das Auftreten und die prognostische Relevanz von Kopienzahl neutralen LOHs in SNP-a Studien mit größeren MDS Patientenkohorten untersucht (Gondek et al., 2008;Gondek et al., 2007a). Da sich mit Einschränkungen bei der genomweiten Auflösung auch über SNP-a Analysen chromosomale Kopienzahlveränderungen detektieren lassen, wurden unter anderem von Mohamedali *et al.* Korrelationen zwischen UPDs bzw. CNAs und dem klinischen Verlauf der Patienten untersucht. Bei 46% der MDS Patienten wurden UPDs identifiziert, die jedoch keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben im Vergleich zu den Patienten ohne UPDs zeigten. Es konnte jedoch eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Deletionen und einem kürzeren Gesamtüberleben der Patienten, sowie mit einem hohem IPSS Wert gefunden werden (Mohamedali et al., 2007).

1.7 Ziel der Arbeit

Auf der Basis der Karyotypisierung innerhalb der Leukämiediagnostik der EWOG-MDS Studie konnten häufig auftretende genomische Anomalien bei Kindern mit myelodysplastischen Syndromen (MDS), wie z.B. Monosomie 7, Trisomie 8 oder Deletionen auf dem kurzen Arm von Chromosom 12, nachgewiesen und hinsichtlich der Prognose für die Subgruppen ausgewertet werden. Vereinzelt wurden durch regionsspezifische Untersuchungen mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) kleine Veränderungen, wie beispielsweise eine Deletion in 17p (Verlust von *TP53*) bei MDS Patienten oder die heterozygote *NF1* Deletion bei Patienten mit juveniler myelomonozytärer Leukämie (JMML) festgestellt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten mithilfe der genomweiten, hochauflösenden array-CGH Technik in Form von BAC/PAC und Oligonukleotid CGH Arrays submikroskopische Aberrationen bei Kindern mit MDS und JMML analysiert werden. Die Kohorte sollte sich aus MDS und JMML Patienten mit Monosomie 7 als einziger, numerischer Chromosomenaberration zusammensetzen.

Die Auswertung der genomischen Defekte sollte vor dem Hintergrund der potentiell betroffenen Signalwege und bekannter Kopienzahlvariationen (engl. *copy number variations*, CNVs), die in der Normalbevölkerung vorkommen, erfolgen. Des Weiteren sollte eine Überprüfung der Ergebnisse aus den array-CGH Untersuchung mit unabhängigen Methoden durchgeführt werden.

Aufgrund der geringen Anzahl der Patienten mit *de novo* MDS im Kindesalter, der oft begrenzten Probenmengen und dem variierenden Anteil maligner Zellen in der Gesamtzellpopulation bei Niedrig-Risiko MDS Patienten, steht für die array-CGH Analysen größtenteils heterogenes Untersuchungsgut zur Verfügung. Aus diesem Grund war eine Anreicherung und Analyse der malignen, aberranten Zellen mithilfe von Colony Forming Cell (CFC) Assays auf Basis von halbviskosen Methylcellulose-Medien ein weiteres Ziel, um eine klonale Zellpopulation mittels array-CGH untersuchen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenmaterial

Zur Untersuchung der genomischen Veränderungen bei kindlichen MDS und JMML wurde Probenmaterial von insgesamt 75 Patienten verwendet (56 Patienten mit MDS und 19 Patienten mit JMML; Tab. 2.1, Tab. 2.2 und Tab. 8.1, Anhang). Die DNA wurde aus mononukleären Zellen (MNZ) oder Granulozyten (G) der EDTA-antikoagulierten oder heparinisierten Knochenmark- und Blutproben extrahiert, wobei das DNA-Material teilweise aus der Studienzentrale der European Working Group of MDS in Childhood (EWOG)-MDS Studien (Kinderklinik der Universitätsklinik Freiburg) zur Verfügung gestellt wurde. Die zur Diagnosestellung und innerhalb des Krankheitsverlaufes notwendige zytogenetische Untersuchung der EWOG-MDS Studienteilnehmer wurde als Referenzanalytik im Institut für Zell- und Molekularpathologie (IZMP) der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Restmaterial aus der Diagnostik (z.B. in Methanol/Eisessig fixierte Zellen) stand der Forschung zur Verfügung und konnte für spezifische Fragestellungen innerhalb dieser Arbeit verwendet werden.

Die Entnahme und Verwendung des Materials für wissenschaftliche Zwecke erfolgte nach Information und Einwilligung der Eltern der betroffenen Kinder und nach positiver Begutachtung der zuständigen Ethikkommission der Universität Freiburg¹. Die Diagnosen wurden innerhalb der EWOG-Studien zwischen 1995 und 2009 auf der Basis klinischer Daten, zytogenetischer und pathologischer Begutachtungen gestellt. Über die EWOG-MDS Studienzentrale wurden ebenfalls alle klinischen Daten der Patienten erhalten.

¹ Ethikvotum Nr. 247/05 für die Studie „EWOG-MDS 2006“, Projektleiterin: Prof. Dr. C. Niemeyer. Die Studie wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki und nach den ICH-GCP-Richtlinien E6 und E11 (CPMP/ICH/135/95) ausgeführt.

Tab. 2.1: Daten der MDS Patienten

Patienten-ID	Geschl./ Alter (J.)	Diagnose	% Blasten	Karyotyp [Anzahl der analysierten Metaphasen]	Tod
D144 ^a	m/15	RAEB	8	48,XY,+Y,-7,+21,+22 [6]	ja
D164 ^a	w/16	RC	2	46,XX	nein
D170 ^a	w/10	sek. RAEB	15	k.E.	ja
D184 ^a	w/9	RAEB	15	45,XX,-7	ja
D226 ^a	m/2	RAEB	9	45,XY,del(6)(q21),-7 [12]	nein
D240 ^a	w/1	RC	3	46,XX [11]	nein
D248 ^a	m/13	RAEB	9	46,XY	ja
D249 ^a	w/13	RC	8	46,XX,9qh-	nein
D250 ^a	w/14	RAEB-T	2	46,XX	ja
D253 ^a	m/20	MDR-AML	21	45,XY,-7	ja
D267 ^a	m/16	RAEB	6	41-45,XY,+1,-3,-5,-7,-10,-17,+mar	ja
D271 ^a	m/13	RAEB	7	45,XY,-7	nein
D272 ^a	w/12	RC	8	46,XY	ja
D279 ^a	m/14	RC	3	46,XY,?t(9;11)(p22;q23)	nein
D287 ^a	m/9	sek. RAEB	3	45,XY,-7 [6]	nein
D305 ^a	m/9	RAEB	12	45,XY,-7,del(12)(p11) [1] ^c	ja
D308 ^a	w/15	RAEB	14	46,XX	nein
D362 ^a	m/9	RAEB-T	24	46,XY	ja
D380 ^a	w/14	RAEB-T	29	46,XX	ja
D403 ^a	m/6	sek. RAEB (rez.)	k.A.	43~49,XY,t(1;11)(q43;q21), del(4)(q25),+5,del(5)(q23q34)x2, +der(6)t(3;6)(q13;q13),-7,+8, del(14)(q32), add(17)(p12), -20,1-mar,+r [15]	k.A.
D468	m/9	unkl. MDS	5	45,XY,-7[17]/ 45,XY,idem, del(12)(p11p12) [3]	ja
D492	m/18	unkl. MDS	n.d.	45,XY,-7 [4]/ 46,XY [11]	ja
D493	m/5	RAEB	9	45,XY,-7 [20]	nein
D510	w/9	RAEB-T	29	45,XX,-7 [10]/ 46,idem,+21 [5]	ja
D514	w/14	RC	k.A.	45,XX,-7 [18]/ 46,XX [2]	k.A.
D515	m/3	RAEB		45,XY,-7 [11]/ 47,XY,+8 [5] / 46,XX [5]	
D521	m/12	sek. CMML	k.A.	45,XY,add(3)(q28),-7 [18]/ 46,XY [2]	nein
D522	w/11	MDR-AML	n.d.	45,XX,-7 [16]/ 46,XX [4]	ja
D522	w/13	MRD-AML	n.d.	45,XX,-7 [13]/ 46,XX [2]	ja
D529	m/7	RC	0	46,XY,der(4)t(4;7)(q25;q33),der(7) t(4;7)(q2?5;q21) [3]/ 46,XY [17]	nein
D531	m/13	RAEB	9	45,XY,-7 [4]/ 45,XY,del(5)(q14q34),-7 [16]	ja
D585	m/5	RC	0	46,XY [19]/ 45,XY,-7 [1]	nein
D593	f/10	MDR-AML	39	45,XX,t(3;17)(q26;q23),-7 [13]/ 46,XX [2]	ja
D621	m/16	RC	0	45,XY,-7 [10]/ 46,XY [10]	ja
D637	m/7	RC	n.d.	45,XY,-7,der(18;21)(q10;q10) [1]	nein
D680	f/12	RC	1	45,XX,-7 [2]	nein
D726	f/9	RAEB	9	45,XX,-7 [11]/ 46,XX [4]	nein
D731 ^b	f/5	RAEB	8	45,XX,-7,del(12)(p11p13) [11]	nein
D762	m/9	RAEB	15	45,XY,-7 [12]/ 46,XY [3]	nein
keine	m/9	FA, sek. MDS	k.A.	45,XY,-7 [15]	k.A.

Abkürzungen: m, männlich; w, weiblich; k.A., keine Angabe; k.E., kein Ergebnis; sek., sekundär; n.d., nicht detektiert; unkl., unklassifizierbar; sek. CMML, sekundäre Chronische myelomonozytäre Leukämie; rez., rezidiv; ^a array-CGH durchgeführt von M. Tauscher (IZMP, MHH); ^b Karyotyp eines früheren Zeitpunktes (vor KMT); ^c über FISH bestätigt (sonst keine Aberrationen, nicht im Karyotyp)

Tab. 2.2: Daten der JMML Patienten

Patienten-ID	Geschlecht/ Alter (Monate)	Diagnose	Karyotyp
D003 ^a	w/3	JMML	46,XX
D102 ^a	m/44	JMML	46,XY
D115 ^a	m/3	JMML	46,XY
D119 ^a	w/20	JMML	46,XX
D124 ^a	m/60	JMML	46,XY
D126 ^a	m/5	JMML	46,XY
D213 ^a	w/27	JMML	46,XX
D316 ^a	w/39	JMML	46,XX
D341 ^{a/b}	m/6	JMML	46,XY
D378*	w/62	JMML	46,XX
D402	w/13	JMML	45,XX,-7 [11]/ 46,XX [4]
D448 ^a	m/1	JMML	46,XY
D474	m/50	JMML	45,XY,-7 [20]
D541	w/14	JMML	45,XX,-7 [14]/ 46,XX [1]
D566 ^b	m/71	JMML	45,XY,-7 [15]
D581	m/63	JMML	45,XY,-7 [1]
D600	w/11	JMML	45,XX,-7 [5]/ 46,idem,+mar [15]
D612	m/89	JMML	45,XY,-7 [15]
D614	m/22	JMML	45,XY,-7 [15]

Abkürzungen: m, männlich; w, weiblich; ^a array-CGH durchgeführt von M. Tauscher (IZMP, MH Hannover); ^b Patienten mit bekannter *NF1*-Deletion

2.2 Material

Tab. 2.3: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
LeukoSep© Röhrchen	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
sterile Röhrchen (50 mL, 15 mL)	Sarstedt (München)
Optical 96-well Platten und optical 8-cap Streifen für das iCycler System	Applied Biosystems (Darmstadt)
Glaskapillaren (Verwendung für LightCycler)	Roche (Mannheim)
Microcon YM-30	Millipore (Billerica, USA)
Einmal-Pasteurpipetten (Glas)	Brand (Wertheim)
Faltenfilter (#1575 1/2)	Schleicher&Schuell (Dassel)
Reaktionsgefäße für PCR (0,2 mL)	Bio-Rad (München)
Reaktionsgefäße (2 mL, 1,5 mL, 0,5 mL)	Nerbe (Winsen/Luhe)
dunkle Reaktionsgefäße (1,5 mL und 0,5 mL)	StarLab (Ahrensburg)

Tab. 2.4: Kits und CGH Arrays

Material	Hersteller
BAC/PAC CGH Arrays (versch. Serien)	DKFZ (B. Radlwimmer, P. Lichter)
CD34 MicroBead Kit (human)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
CGH Labeling Kit	Agilent Technologies (Waldbronn)
CGH Hybridization Kit	Agilent Technologies (Waldbronn)
CGH Wash Buffer 1 and 2 Set	Agilent Technologies (Waldbronn)
Cy3 TM -dCTP, Cy5 TM -dCTP	Amersham Bioscience (GE Healthcare, Freiburg)
DTCS Quick Start MasterMix (Sequenzierung)	Beckman Coulter (Krefeld)
Exo-SAP IT	USB (Cleveland, USA)
FastTag Polymerase	Roche (Mannheim)
Oligonukleotid CGH Array: 244K, 105K, 105K eArray	Agilent Technologies (Waldbronn)
PCR-Purification Kit	Jena Bioscience (Jena)
QiaAmp Micro Kit	Qiagen (Hilden)
QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit	Qiagen (Hilden)
REPLIq-Kit	Qiagen (Hilden)

Tab. 2.5: Chemikalien und Lösungsmittel

Chemikalien und Lösungsmittel	Hersteller
20xSSC (Pulver)	Abbott (Wiesbaden)
Sephadex G50 Fine	Amersham (Freiburg)
Ficoll®Paque	GE Healthcare (München)
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Ethanol	J.T. Baker (Griesheim)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich (München)
Isopropanol	J.T. Baker (Griesheim)
DNase freies Wasser	J.T. Baker (Griesheim)
Formamid (deionisiert)	AppliChem (Darmstadt)
Ethidiumbromid (1% Lösung)	Merck (Darmstadt)
Dextransulfat (Natrium Salz)	Sigma Aldrich (München)
Fixogum	Marabuwerke (Tamm)
Glycerin (87%)	Merck (Darmstadt)
Tween-20	Merck (Darmstadt)
Igepal CA-630	Sigma Aldrich (München)
Eindeckmedium mit DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindol)	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Betaine anhydrous	Sigma Aldrich (München)
Salzsäure (HCl, 1N)	Merck (Darmstadt)
Natronlauge (NaOH, 1N)	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker (Griesheim)
Chloramphenicol (CA)	Calbiochem/Merck (Darmstadt)
Natriumazid (NaN ₃)	Merck (Darmstadt)
ULTRAhyb Hybridisierungspuffer	Ambion (Austin, USA)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Roth (Karlsruhe)
10% SDS-Lösung	Sigma Aldrich (München)

Tab. 2.6: Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Bestandteile (Hersteller)
1x PBS	ohne Ca ²⁺ , ohne Mg ²⁺ (Biochrom, Berlin)
0,5 M EDTA	
1x TBE	10,87 g Tris 5,503 g Borsäure 4,384 g EDTA
TE-Puffer (pH 7,6)	10 mM Tris 1 mM EDTA
Proteinase-K-Puffer	50 mM Tris (pH 7,6) 25 mM EDTA 0,5% Igepal 0,5% SDS
6 M NaCl	
10x Rote Lyse Puffer	0,372 g EDTA (MG=372,2 g/mol) 10 g KHCO ₃ (MG=100,12 g/mol) 61,5 g NH ₄ Cl (MG=53,49 g/mol) + in 600 mL ddH ₂ O lösen, auf 1 L auffüllen und autoklavieren
P1	15 mM Tris (pH 8,0) 10 mM EDTA (pH 8,0)
P2	0,2 M NaOH 1% SDS
P3	3 M KAc (pH 5,5)
Fixativ	Methanol/Eisessig-Mischung (3:1)

Tab. 2.7: Materialien für molekularbiologische Analysen

Material	Hersteller
Agarose (TopVision LE GQ)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Humane Cot1-DNA	Invitrogen (Karlsruhe)
AluI	Fermentas (St. Leon-Rot)
RsaI	Fermentas (St. Leon-Rot)
Proteinase K	Merck (Darmstadt)
RNase	Qiagen (Hilden)
Mikroliter Spritze	Hamilton (Bonaduz, Schweiz)

Tab. 2.8: Materialien und Medien für zellbiologische Arbeiten

Material	Hersteller
RPMI1640	Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)
Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma Aldrich (München)
Fötales Rinderserum (FBS)	Biochrom (Berlin)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom (Berlin)
Zellkulturschalen, steril (35 mm)	BD Bioscience (Heidelberg)
Zellkulturschalen, steril (100 mm)	Sarstedt (München)

Tab. 2.9: FISH-Sonden

BAC / Sonde (Farbe)	Fragment-Länge	Genort	Anbieter/Hersteller
RP11-142O6 (orange), RP11-285M22 (AC131274.9) (aqua)	145 kb (NF1), 158 kb	17q11.2, 17p11.2- p11.1	Source Bioscience, ehem. ImaGenes (Berlin)
RP11-3B7 (orange), RP11-44M22 (grün)	170 kb, 158 kb	3p21.3 3p24.3	BlueGnome (Cambridge, UK)
KBI-10204 (EV11)	-	3q26	Kreatech (Amsterdam, NL)
LSI ERG1 (orange), D5S23, D5S721 (grün)	-	5q31 5p15.2	Vysis (Abbott, Wiesbaden)
LSI MYB (aqua)	-	6q23	Vysis (Abbott, Wiesbaden)
LSI CDKN2A (orange), CEP9 (grün), → alte Bez.: LSI p16	-	9p21 9p11-q11	Vysis (Abbott, Wiesbaden)
LSI TEL (grün)	-	12p13	Vysis (Abbott, Wiesbaden)
LSI TP53 (orange)	-	17p13.1	Vysis (Abbott, Wiesbaden)

Tab. 2.10: Oligonukleotide (Mutationsanalyse)

Name	Sequenz 5 → 3	Tm	Ann.-Temp.
MGMT			
Exon2	for : GTTTTQATATACGACCAGCC rev : TACTCCTCGGTTGCTTCAGC	55,9°C 62,5°C	td60-55
Exon3	for : CGATGTGTGGAGGCAGGG rev : TCAGCGATCGTTAATAAGTC	64,5°C 56,3°C	td60-55
Exon4	for : GCTGCTGAAGCCGTTTGTCC rev : ATGACACCCTGCCACCTGC	64,5°C 64,5°C	td60-55
Exon5	for : TTGGCCTTGACCCCAAAGAC rev : GTGTCGCTCAAACATCCATCC	62,5°C 62,6°C	td60-55
NRAS			
Exon2	for : TTTAAGAACCAAATGGAAGGTCAC rev : GGTAAGATGATCCGACAAGTGAG	60,6°C 61,2°C	55°C
Exon3	for : ATTGAACTTCCCTCCCTCCCTG rev : CCTCATTTCCCCATAAAGATTCA	64,9°C 61,3°C	55°C
Exon4	for : TACCCAGCCTAATCTTGTTTTTC rev : GGATCACATCTCTACCAGAGTTAATC	58,7°C 58,7°C	57°C
Exon5	for : ATTTGGATTGTGTCCGTTGAG rev : AACACCAGCACTCCTCCAAA	59,8°C 60,7°C	56°C
Exon6	for : CCCTATTCCTGGCAATGACC rev : TGAGAATACATTTCCAAACTTGTC	61,6°C 60,6°C	57°C
3'UTR (615 bp)	for : AGAGCCACTTTCAAGGTAGGAC rev : GCCAGTTTATAGAGAATAGAGCCG	62,7°C 62,7°C	td60-57
3'UTR (689 bp)	for : GGCTCTATTCTCTAAACTGGCATC rev : CTGTAGAGGGTGGGGTGAGAAG	62,9°C 66,4°C	td60-57

Abkürzungen: Ann.-Temp., Annealingtemperatur; Tm, Schmelztemperatur; td, *touchdown*

Tab. 2.11: Oligonukleotide (Quantitative, genomische real-time PCR)

Name	Sequenz 5 → 3	Tm	Ann.-Temp.
GPR15 (3q11.2) Referenzlokus	for : AGCTCCTACATGATCTCCGTC rev : CCAGATGCTGGCACAGACTAC	62,5°C 64,5°C	58°C
CFTR (7q31.2) Monosomie 7	for : GTCACCAAAGCAGTACAGCCTC rev : GGTGTAGGAGCAGTGTCCCTCAC	64,5°C 66,4°C	58°C
HOXA (7p15.2)			
HOXA 9	for : ACTCCGTTACAATCAGCATTCA rev : ACCAGACGAACAGTGAGGAAAT	58,9°C 60,8°C	57°C
HOXA10	for : CAAGAGGCAAAGAAAAGCGTTA rev : CAAGCAGTTCCTCCAAAAGTCA	58,9°C 60,8°C	59°C
HOXA13	for : TACCTTCCCCACTGACCCTCTA rev : AGAAGACAAGGGAGAAGGCAAG	64,5°C 62,6°C	59°C
NRAS (1p13.2)			
NRAS_2	for : CACACAGGGATGTTATGGAAAG rev : GAGCCTTAGGTGCCACTTACTG	60,8°C 64,5°C	58°C
NRAS_4	for : ACAGCCCCCACCAAGGAG rev : CGCATGACTCGTGGTTTCG	63,5°C 62,5°C	59°C
NRAS_5	for : CATAGAACAGCAGCATCACC rev : CAATCCTTCTCAAACCTTCAG	56,8°C 52,5°C	57°C
NRAS_9-10	for : GTTTCATTTTCATTCCCATTTCAGA rev : ACCTTCTCTTTGCCTTTATTTGG	60,2°C 60,0°C	55°C
NF1 (17q11.2)			
NF1_1	for : TAGTTATCAGTTGGTGG rev : CGACAGAGTTACCACACG	52,4°C 59,9°C	52°C
NF1_2	for : CCTCTGGTCACAATACTCCCG rev : CCTTACTGCCACTGTTGCTGC	64,5°C 64,5°C	60°C
NF1_3	for : CCCTCTCAGTTCTGTTATCTTTCTC rev : GATACTCCAGATAAAATGACATAAGG	62,9°C 59,9°C	57°C

Abkürzungen: Ann.-Temp., Annealingtemperatur; Tm, Schmelztemperatur

Tab. 2.12: Internet-Datenbanken

Name	Adresse
Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC)	http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/
Database of Genomic Variants	http://projects.tcag.ca/variation/
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
The European Bioinformatics Institute and Genome Research (Ensembl)	http://www.ensembl.org/index.html
TargetScanHuman	http://www.targetscan.org/vert_60/
University of California, Santa Cruz (UCSC)	http://genome.ucsc.edu/

Tab. 2.13: Internet-Computerprogramme

Name	Funktion, Adresse
Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
In-silico PCR	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr
NetPrimer	http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/

Tab. 2.14: Computerprogramme

Name	Funktion, Anbieter
Excel 2007	Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft ® (Redmond, USA)
Feature Extraction 9.1.3.1	Software zur automatisierten Datenextraktion aus TIFF-Dateien für die Anwendung der Oligonukleotid Arrays Agilent Technologies Inc. (Waldbronn)
R2.2.1, R2.6, R2.9 (versch. Versionen)	Statistische Auswertung von Microarraydaten Download über: Mirror Germany (http://bioconductor.statistik.tu-dortmund.de)
GenePix Pro 4.1	Software zum Einscannen und Auswerten der TIFF-Imagedateien bei microarrays Axon Instruments (Union City, USA)
FISHView 2.0	Software zur Bearbeitung von FISH-Bildern Applied Spectral Imaging (Edingen)
iCycler IQ Software, Version 3.1.7050	Software zur Berechnung von CT-Werten bei der quantitativen real-time PCR Bio-Rad (München)
DNA Analytics 4.0.76	Software zur Auswertung der Kopienzahlveränderungen bei microarrays Agilent Technologies Inc. (Waldbronn)
CEQ8000 Genetic Analysis System, Version 10.0.29	Software zur Sequenzauswertung Beckman Coulter (Krefeld)

Tab. 2.15: Geräte

Geräte	Hersteller
Agarosegel-Elektrophorese-Kammern, Easy Cast® (Model B1A)	OWL Separation Systems/Thermo Scientific (Rochester, NY, U.S.A.)
Agilent Fluoreszenzscanner (#G2565BA)	Agilent Technologies (Waldbronn)
ASP (Automated Slide Processor)	Amersham/ GE Healthcare (München)
Bioanalyzer	Agilent (Waldbronn)
CEQ8000	Beckman Coulter (Krefeld)
Zytozentrifuge	Thermo Scientific (Dreieich)
Digitale Kompaktkamera (PowerShot)	Canon (Krefeld)
Durchlichtmikroskop	Zeiss (Göttingen)
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss (Göttingen)
Gel Doc System	Bio-Rad (München)
GenePix Fluoreszenzscanner (#4000B)	Axon Instruments (Union City, USA)
Hybridisierungsöfen (#G2545A)	Agilent Technologies (Waldbronn)
iCycler	Bio-Rad (München)
Inkubationsschrank	Heraeus (Hanau), Memmert (Schwabach)
LightCycler 1.5	Roche (Mannheim)
NanoPhotometer	Implen (München)
PCR Maschinen	Biometra (Göttingen), Applied Biosystems (Darmstadt), Bio-Rad (München)
Rotations-Vakuum-Konzentrator	Christ (Osterode im Harz)
Elektrophorese Power Supply E835	Consort (Turnhout, Belgien)
Thermomixer	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge (#5415D)	Eppendorf (Hamburg)
Wasserbäder	GFL (Burgwedel)
Zentrifugen	Beckman Coulter (Krefeld)

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 DNA-Extraktion aus Blut- und Knochenmarkzellen

Die Extraktion genomischer DNA erfolgte über die Methode des Aussalzens bei großen bis mittleren Zellpellets (mindestens 1×10^7 Zellen/Probe), wohingegen das QIAamp Micro Kit (Qiagen) für die DNA-Extraktion aus kleineren Zellpellets nach Angaben des Herstellers eingesetzt wurde. Tiefgefrorene Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, anschließend unmittelbar durch Zentrifugation das Einfriermedium abgetrennt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Um direkt nach der Dichtegradientenseparation mittels Ficoll®Paque (GE Healthcare) die genomische DNA aus den Zellen zu extrahieren, wurden die Zellfraktionen zweifach mit 1x PBS gewaschen und die Zellen anschließend pelletiert.

Große bis mittlere Zellpellets (1×10^7 Zellen) wurden durch Zugabe von Proteinase K Lösung (25 μL einer 10 mg/mL Stammlösung) und Proteinase K Puffer ($V = 500 \mu\text{L}$) resuspendiert, wobei die Lyse und der Proteinabbau im Wasserbad bei 55°C für mindestens 3 bis 4 Stunden oder über Nacht erreicht wurde. Die Zugabe von 6 M NaCl ($V = 200 \mu\text{L}$) führt durch Dehydratisierung zum Ausfallen der Proteine. Durch die RNase Behandlung (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) für 1 Stunde bei 37°C wurden RNA-Kontaminationen eliminiert. Die DNA wurde anschließend mit Isopropanol präzipitiert, das Pellet mit 70% EtOH gewaschen und in DNase freiem Wasser oder TE Puffer gelöst.

Um eine hohe DNA-Ausbeute auch bei Proben mit geringen Zellzahlen ($< 5 \times 10^6$ Zellen) zu erzielen, wurde für die DNA-Isolierung das QIAamp Micro Kit (Qiagen) verwendet. Nach Herstellerangaben wurde durch die Zugabe von Lysepuffer die Zellmembran aufgelöst und der Proteinverdau unter Zusatz von Proteinase K erreicht. Anschließend wurden die Silicagel-Säulen mit dem Lysat beladen, wobei die DNA an der Matrix immobilisiert wird. Nach einigen Waschschritten wurde die DNA mit DNase freiem Wasser eluiert und bei 4°C bzw. -20°C gelagert.

2.3.2 BAC- und Fosmid-Präparation aus *E.coli*

Für die Herstellung von Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungs (FISH) Sonden wurden BAC- und Fosmid-Klone mit den entsprechenden genomischen Zielsequenzen (Tab. 2.9) in LB-Medium mit den erforderlichen Antibiotika (Chloramphenicol) für 16 Stunden bei 37°C kultiviert. Die Isolierung der BAC-/Fosmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Bakterienlyse, wobei durch die Verwendung eines Faltenfilters denaturierte Proteine und weitere Zellbestandteile von der DNA-Lösung abgetrennt wurden. Die anschließende DNA-Präzipitation wurde durch Zugabe von 0,7 (v/v) Isopropanol erreicht, das DNA-Pellet mit 70% EtOH entsalzt und in DNase freiem Wasser gelöst.

2.3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die photometrische Messung von Quantität und Qualität der Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen basiert auf dem Absorptionsmaximum von RNA und DNA bei 260 nm. Proteine absorbieren bei einer Wellenlänge von 280 nm, so dass über den Quotienten der Absorption $A_{260/280}$ die Reinheit der Nukleinsäurelösungen ($A_{260/280}$ zwischen 1,8 und 2,0) bestimmt werden kann. Zusätzlich deutet der Quotient $A_{260/230}$ mit Werten kleiner als 2,0 auf Verunreinigungen durch Puffer, Salze oder niedermolekulare Substanzen hin. Die Berechnung der DNA-Konzentrationen wässriger Lösungen erfolgt nach Bestimmung der Optischen Dichte (OD) bei der Wellenlänge 260 nm nach folgender Formel:

$$\text{dsDNA: } \quad \text{OD}_{260} \times 50 \text{ (}\mu\text{g/mL)} \times 0,1 \text{ (Schichtdicke Kuvette bzw. Länge Strahlengang)} = \text{Konzentration (ng/}\mu\text{L)}$$

Für die photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösungen wurde das NanoPhotometer (Implen) verwendet, da bei diesem Gerät besonders geringe Analysevolumen (minimal 1,5 μL) eingesetzt werden können.

2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Um eine Kontrolle der PCR-Reaktionen durchführen zu können, aber auch zur Überprüfung der Integrität genomischer und BAC-/Fosmid-DNA, erfolgte eine größenabhängige Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel. Abhängig von der Fragmentgröße wurden Gelkonzentrationen von 0,8% bis 2% Agarose (w/v) in 1x TBE-Puffer verwendet. Das Gel wurde mit den DNA-Proben in Ladepuffer beladen und über das Anlegen einer Spannung von 10-15 V/cm in einer Elektrophoresekammer aufgetrennt. Das fluoreszierende Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, so dass durch die Anregung mit UV-Licht (254 nm) im Gel Doc System (Bio-Rad) die DNA-Banden im Gel sichtbar gemacht werden können.

2.3.5 Amplifikation von Nukleinsäuren

2.3.5.1 Polymerase-Kettenreaktion

Über die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) können beliebige DNA-Sequenzen selektiv aus der heterogenen Mischung genomischer Gesamt-DNA vervielfältigt (amplifiziert) werden. Unter Verwendung zweier Oligonukleotide (Primer), die die spezifische Basensequenz flankieren und mit jeweils einem der Stränge auf beiden Seiten des DNA-Abschnitts hybridisieren, einer ausreichenden Menge der vier dNTPs und einer hitzebeständigen DNA-Polymerase erfolgt eine exponentielle Vervielfältigung der Zielsequenz (Mullis and Faloona, 1987).

Für die nachfolgende Sequenzierung wurden PCR-Ansätze mit jeweils 60 ng genomischer DNA nach dem Standard-Protokoll erstellt (Tab. 2.16).

Tab. 2.16: PCR Standard-Protokoll

Komponenten	Volumen
dNTPs (1,25 mM)	3,00 μ L
10x PCR Puffer (ohne MgCl ₂)	2,50 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	1,50 μ L
Primer for (10 μ M)	1,00 μ L
Primer rev (10 μ M)	1,00 μ L
Taq-Polymerase (5 U/ μ L)	0,15 μ L
DNA (20 ng/ μ L)	3,00 μ L
DNase freies Wasser	12,85 μ L
Gesamtvolumen	25,00 μ L

Die PCR ist charakterisiert durch ein zyklisches Temperaturprofil, wobei die DNA-Doppelhelix zunächst durch einen initialen Denaturierungsschritt bei 95°C aufgespalten wird. Es folgen je nach PCR-Ansatz 30-40 Zyklen bestehend aus Denaturierung (95°C), Anlagerung der Primer (*annealing*, 50-70°C) und Neusynthese des komplementären DNA-Stranges durch die DNA-Polymerase (*elongation*, 72°C), ausgehend von der 3'-OH-Gruppe der Oligonukleotide. Je Primerpaar variiert die Annealingtemperatur in Abhängigkeit ihrer spezifischen Schmelztemperaturen (Tab. 2.10 und Tab. 2.11). Die durchschnittliche Synthesegeschwindigkeit der DNA-Polymerase beträgt etwa 500-1000 bp/min, so dass sich die gewählte Elongationszeit nach der Länge und dem GC-Gehalt des Amplikons richtet (Tab. 2.17).

Tab. 2.17: PCR Standard-Programm

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	3 min	1
95°C	0,5 min	x 30-40
50-70°C	0,5 min	
72°C	0,5- 2 min	
72°C	2 min	1
4°C	∞ min	1

2.3.5.2 Quantitative, genomische real-time PCR

Die quantitative real-time PCR (qPCR) auf der Basis genomischer DNA bietet eine Möglichkeit zur Validierung von array-CGH Ergebnissen. In Echtzeit kann bei dieser Methode die Zunahme der amplifizierten DNA-Fragmente nach jedem PCR-Zyklus detektiert werden. Die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green (Absorption: 498 nm, Emission: 522 nm), der in doppelsträngige DNA-Moleküle interkaliert und damit die Fluoreszenz proportional zur Menge der amplifizierten Fragmente ansteigt, ermöglicht die Quantifizierung der PCR-Produkte im Verlauf der Reaktion (Morrison et al., 1998).

Für jede Probe wird der sog. CT-Wert (engl. *cycle threshold*) erfasst, also der PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenzintensität der Probe einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Die Festlegung des Schwellenwertes sollte unter Berücksichtigung der Hintergrundfluoreszenz erfolgen, so dass die Messung der CT-Werte am Anfang der exponentiellen Amplifikationsphase stattfinden kann. Die Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes ist in Tab. 2.18 angegeben, wobei alle Proben als Triplikate analysiert wurden.

Tab. 2.18: qPCR Standard-Protokoll

Komponenten	Volumen
2x QuantiTaq SYBRGreen	10,00 µL
DNase freies Wasser	7,00 µL
Primer for (10 µM)	1,00 µL
Primer rev (10 µM)	1,00 µL
DNA (20 ng/µL)	1,00 µL
Gesamtvolumen	20,00 µL

Das verwendete Standard-Programm für die qPCR ist im Folgenden angegeben (Tab. 2.20). Nach 40 Amplifikationszyklen wurde jeweils am Ende des Laufes eine Schmelzkurve erstellt, anhand dieser die Spezifität der PCR-Produkte überprüft werden konnte. Dabei erfolgte eine kontinuierliche Messung der Fluoreszenzintensitäten je 0,5°C Temperatursteigerung alle 5 sec.

Tab. 2.19: qPCR Standard-Programm

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	15 min	1
95°C	15 sec	x 40
50-70°C	25 sec	
72°C	25 sec	
72-95°C	je 5 sec ein Anstieg um 0,5°C	
4°C	∞ min	1

Die Durchführung der qPCR Analysen fand mit dem LightCycler 1.5 (Roche) statt, wobei die Anzahl der Analyseplätze auf 32 Kapillare pro Lauf beschränkt war. Über die LightCycler Gerätesoftware wird für jeden Lauf der Schwellenwert zur CT-Berechnung automatisch festgesetzt. Dieses System zeichnet sich durch eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Analysen aus und ermöglicht durch den Einsatz von Glaskapillaren (mit großer relativer Oberfläche) kurze Zykluszeiten von weniger als 1 Minute. Um auch größere Probenanzahlen (bis 96 Proben pro Lauf) simultan untersuchen zu können, wurde der iCycler (Biorad) mit den gleichen qPCR-Ansätzen und qPCR-Programmen verwendet. Die Festlegung des Schwellenwertes konnte bei diesem System sowohl automatisch als auch manuell nach den o.g. Kriterien gewählt werden.

2.3.5.3 Bestimmung der Effizienz für qPCR-Analysen

Für jedes lokusspezifische Primerpaar wurde zunächst anhand einer Verdünnungsreihe genomischer DNA (50 ng / 25 ng / 12,5 ng / 6,25 ng) die Effizienz des qPCR Assays nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Effizienz (E)} = 10^{-1/m} - 1$$

Zur Berechnung der Effizienz muss zunächst die Steigung m der Standardkurve bestimmt werden. Liegt diese bei $m = -3,32$, wird theoretisch eine Effizienz von 100% für den qPCR Assay erhalten.

2.3.5.4 $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur Berechnung der genortspezifischen DNA-Kopienzahl

Um im Folgenden die DNA-Kopienzahl eines Kandidatengens (engl. *gene of interest*, GOI) relativ zu einem internen, diploiden Referenzlokus (REF) zu bestimmen, erfolgte die Berechnung nach der von Livak entwickelten $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Livak and Schmittgen, 2001).

$$\Delta\Delta C_T = \frac{E(GOI)^{(C_{T\text{normale Probe}_{GOI}} - C_{T\text{Tumor Probe}_{GOI}})}{E(REF)^{(C_{T\text{normale Probe}_{REF}} - C_{T\text{Tumor Probe}_{REF}})}}$$

Als Referenz wurde ein 150 bp großes Amplikon auf Chromosom 3q26 (*GPR15*) verwendet, da für diesen Bereich keine Kopienzahlveränderungen in den array-CGH Untersuchungen gefunden wurden.

2.3.5.5 Vervielfältigung genomischer DNA (*Whole Genome Amplification = WGA*)

Die Vervielfältigung der genomischen DNA einzelner Zellkolonien aus dem Colony Forming Cell (CFC) Assay war erforderlich, um ausreichend Ausgangsmaterial für array-CGH Analysen zur Verfügung zu haben. Über die Methode der „Multiple Displacement Amplification“ (MDA) wurde mit dem REPLig Kit (Qiagen) die DNA nach Herstellerangaben direkt aus den Koloniezellen amplifiziert. Bei der Reaktion binden zufällige Hexamer-Primer an die vorab denaturierten DNA-Stränge, gefolgt von einer kontinuierlichen Synthese des Gegenstranges durch die *Phi29* DNA-Polymerase. Durch dessen 3'→5' Exonuclease-Aktivität und eine hohe Prozessivität werden bereits amplifizierte DNA-Fragmente erneut als Matrize genutzt, so dass auch bei geringer Ausgangs-DNA-Menge von 0,3 bis 300 ng bis zu 10 µg DNA pro Ansatz erzeugt werden können (Dean et al., 2002).

Zunächst erfolgte die alkalische Denaturierung der genomischen DNA für 10 min auf Eis, die durch Zugabe von Stop Buffer (zur Neutralisation) unterbrochen wurde. Je Ansatz wurden 19 µL des Reaktionspuffers (unbekannter Zusammensetzung), 1 µL *Phi29* DNA-Polymerase und 20 µL DNase freies Wasser gegeben und die Reaktion bei 30°C für 16 Stunden inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Hitzeeinwirkung (65°C, 3 min) inaktiviert und die amplifizierte DNA bei 4°C gelagert. Vor dem Einsatz der amplifizierten DNA wurde diese zunächst mithilfe von Microcon YM-30 Filtern (Millipore) gereinigt (Lage et al., 2003), um möglichst keine Reagenzien aus der WGA in die nächste Reaktion zu überführen.

2.3.6 Sequenzierung auf DNA-Ebene

Nach dem Didesoxy-Verfahren (Sanger et al., 1977) erfolgte die Sequenzierung von kodierenden (Exonen) und nichtkodierenden, potentiell regulatorischen (3'UTR) Genabschnitten mit dem GenomeLab DTCS Quick Start Master Mix (Beckman Coulter) unter Verwendung des Sequenziergerätes CEQTM8000 (Beckman Coulter).

Bei diesem Verfahren erfolgt auf der Basis eines zuvor generierten, genortspezifischen PCR-Produktes eine erneute Amplifikation, bei der jedoch nur der Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer und eine Mischung aus dNTPs und fluoreszenzmarkierten Didesoxynucleotiden (ddNTPs) eingesetzt wird. Bei Einbau der 4 unterschiedlich markierten ddNTPs kommt es zum Kettenabbruch. Somit liegt am Ende der PCR ein Gemisch aus basenspezifisch terminierten DNA-Fragmenten vor, das mittels Kapillargelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt werden kann. Über ein Online-Detektionssystem werden die vier unterschiedlichen Fluorochrome erfasst (Smith et al., 1986), so dass die resultierende Sequenz anschließend computergestützt ausgewertet werden kann.

2.3.6.1 Enzymatische Reinigung der PCR-Produkte

Die genspezifischen PCR-Produkte für *NRAS* und *MGMT* bilden den Ausgangspunkt für die Sequenzanalyse. Über eine enzymatische Reinigung mittels ExoSAP-IT (USB) wurden nicht verbrauchte dNTPs und überschüssige Primer aus der initialen PCR für den nachfolgenden Einsatz in der Sequenzierungs-PCR verdaut. Je Ansatz wurden 5 µL des PCR-Produktes mit 2 µL ExoSAP-IT vermischt und für 15 min bei 37°C inkubiert, Die Inaktivierung der Enzyme wurde durch einen terminalen Temperaturschritt für 15 min bei 80°C erreicht. Die PCR-Produkte wurden anschließend direkt als Template für die Sequenzierungs-PCR eingesetzt.

2.3.6.2 Sequenzierungs-PCR

Um eine zuverlässige Sequenzanalyse durchführen zu können, wurden beide Stränge der PCR-Produkte analysiert. Nach folgendem Protokoll wurden jeweils 2 Ansätze pro PCR-Fragment erstellt (Tab. 2.20).

Tab. 2.20: Protokoll für die Sequenzierungs-PCR

Komponenten	Volumen
Seq-Mix (DTCS Quick Start MasterMix)	4,00 µL
Primer (10 µM for bzw. rev)	3,20 µL
PCR-Produkt (nach Reinigung)	2,00 µL
Gesamtvolumen	20,00 µL

Das Temperaturprofil für die Sequenzierungs-PCR ist im Folgenden angegeben (Tab. 2.21).

Tab. 2.21: PCR Programm für die Sequenzierung

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	1 min	1
95°C	20 sec	x 30
50°C	20 sec	
60°C	2 min	
4 °C	∞ min	1

2.3.6.3 Natriumacetat-Präzipitation der PCR-Produkte

Bevor die markierten PCR-Produkte aus der Sequenzierungsreaktion mittels Kapillargelelektrophorese aufgetrennt werden können, ist eine erneute Reinigung der Produkte erforderlich, weil durch überschüssige Reagenzien überlagernde Effekte (sog. *dye blobs*) entstehen können. Die Präzipitation der PCR-Produkte wurde mithilfe einer Ethanol/Natriumacetat Fällung durchgeführt (Tab. 2.22).

Tab. 2.22: Zusammensetzung des Fällungsansatzes

Komponenten	Volumen
3M NaAc (Stop Solution)	4,00 µL
Glycogen	1,00 µL
EtOH (95 %) (T= -20°C)	60,00 µL
PCR-Sequenzierungsprodukt	20,00 µL
Gesamtvolumen	85,00 µL

Nach guter Durchmischung der Komponenten erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 13200 rcf und 4°C. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig entfernt, das Pellet mit 200 µL EtOH (70%) überschichtet und für 20 min bei -20°C gelagert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Pellet in einem Rotations-Vakuum-Konzentrator (Christ) für 15 min bei 37°C getrocknet und nachfolgend in 40 µL SLS-Puffer (*Sample Loading Solution*, Beckman Coulter) gelöst.

2.3.7 Vergleichende genomische Hybridisierung auf Basis der DNA-Chip-Technologie (*array comparative genomic hybridization, array-CGH*)

Die Methode der array-CGH stellt eine Weiterentwicklung der vergleichenden genomischen Hybridisierung auf der Ebene von Metaphasenchromosomen dar (Solinas-Toldo et al., 1997), bei der die genomweite Auflösung durch den Einsatz der DNA-Chip-Technologie im Vergleich zur konventionellen CGH um ein Vielfaches erhöht werden konnte (Kapitel 1.6.1).

Auf beschichteten Glasobjektträgern werden definierte Nukleinsäuresequenzen (Ziel-DNA) aufgebracht und immobilisiert, wobei diese Zielsequenzen entweder als genomische DNA, kloniert und amplifiziert in BAC-/PAC-Vektoren oder als Oligonukleotidsequenzen auf dem Array repräsentiert sind. Nach einem festgelegten Muster (engl. *grid*, Gitter) erfolgt das Aufbringen der Ziel-DNA. Mittels Random Priming (Feinberg and Vogelstein, 1983) werden Test- und Referenz-DNA mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (Cy3TM-dCTP und Cy5TM-dCTP) markiert und simultanen hybridisiert (Abb. 1.3). Nach Entfernung unspezifisch gebundener DNA-Fragmente durch ein abgestimmtes Waschprotokoll, werden die DNA-Arrays mit einem Laserscanner in den entsprechenden Anregungswellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe eingelesen. Auf Basis der resultierenden Bilddatei (TIFF) erfolgt die Auswertung der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten, die miteinander in Beziehung gesetzt die Identifikation genomischer Verluste oder Zugewinne ermöglichen. In dieser Arbeit wurden folgende CGH Arrays verwendet:

Tab. 2.23: CGH Arrays

	BAC/PAC		Oligonukleotid	
	6k	8k	244K	105K
Anzahl der Klone/Sonden	6437	8049	236381	99026
Anzahl der Klone des 1 Mb Klonset ^a	3428	3428	-	-
Anzahl der Klone in TSG- und Onkogen-Regionen	1000	2000	-	-
<i>tiling</i> (Chr.: 1p, 1q, 19, 22)	-	2000	-	-
Anzahl der Replikate (5x)	-	-	1000	525
Interne Kontrollsonden	-	-	5045	4626
Sondenabstand (genomweit)	1 Mb	1 Mb	8,9 kb	22 kb
Sondenabstand (Referenzgene)	-	-	7,4 kb	19 kb
Design ID	-	-	014693	014698
Grid File	3k_V5	3k_V6	014693_D_20060615	014698_D_20060615

Bezugsquellen: BAC/PAC CGH Arrays, DKFZ (AG Peter Lichter); Oligonukleotid CGH Arrays, Agilent (Waldbronn); Abkürzungen: Chr., Chromosom; kb, Kilobasen; TSG, Tumorsuppressorgen; ^a 1 Mb Klonset von Dr. N.P. Carter (Fiegler et al., 2003). Die Informationen zu den BAC/PAC CGH Arrays sind adaptiert nach Landwehr, 2009.

Außerdem wurde mithilfe des eArray Online Service (Agilent) ein Anwender-designter Array (MDS-1) im 105K-Format erstellt. Die Auswahl der Sonden, die insgesamt 36 chromosomale Regionen hochaufgelöst abdecken (Tab. 8.2, Anhang), erfolgte über die *HD search function* mit einer Auflösung von 3 Sonden pro 1000 bp. Die restlichen Sonden wurden mit den „Katalogsonden“ aus der Agilent Datenbank aufgefüllt. Für die Datenextraktion wurde das Grid File 021498_D_F_20080917 verwendet.

2.3.7.1 Markierungsreaktion für BAC/PAC CGH Arrays

Die Fluoreszenzmarkierung von Test- und Referenz-DNA wurde mit dem BioPrime Array CGH Genomic Labeling System Kit (Invitrogen) basierend auf dem mCGH Protokoll 2.0 der Arbeitsgruppe Peter Lichter (DKFZ) durchgeführt: Ausgehend von einer DNA-Gesamtmenge von 750 ng je Reaktion wurde nach folgendem Schema (Tab. 2.24) ein dreifacher Markierungsansatz erstellt.

Tab. 2.24: Markierungsansatz für BAC/PAC CGH Arrays

Komponenten	Kontroll-DNA	Test-DNA
DNA	750 ng	750 ng
Betaine (5 M)	max. 60 µL	max. 60 µL
2,5x Random Primer Solution	60 µL	60 µL
10x dCTP Nucleotide Mix	15 µL	15 µL
Cy5 TM -dCTP	3 µL	-
Cy3 TM -dCTP	-	3 µL
Exo-Klenow-Fragment (40 U/µL)	3 µL	3 µL
Gesamtvolumen	141 µL	141 µL

Nach der Kombination der DNA-Lösung mit 60 μL 5M Betaine zur Stabilisierung der DNA und 60 μL 2,5x Random Primer Solution, wurde die Mischung für 5 min bei 95°C denaturiert. Durch die unmittelbare Abkühlung des Ansatzes für 5 min auf Eis, wurde sicher gestellt, dass die DNA-Stränge weiterhin getrennt vorliegen. Für die anschließende Fluoreszenzmarkierung wurden jeweils 15 μL 10x dCTP Nucleotide Mix, 3 μL Cy5TM-dCTP (Kontroll-DNA) bzw. 3 μL Cy3TM-dCTP (Test-DNA) und 1 μL Exo-Klenow-Fragment auf Eis in dunklen Reaktionsgefäßen kombiniert. Die enzymatische Reaktion erfolgte für etwa 16 Stunden bei 37°C und wurde dann durch Zugabe von 15 μL Stop Buffer (0,5 M EDTA, pH 8,0) unterbrochen.

Im folgenden Schritt wurden durch den Einsatz von Microcon YM-30 Filtern (Millipore) nach dem Größenausschlussprinzip überschüssige Primer und nichteingebaute Nucleotide entfernt. Der Filter wurde zunächst mit 200 μL 0,1x TE Puffer angefeuchtet, anschließend der Markierungsansatz (150 μL) zugegeben und die Säule für 10 min bei 13000 rcf und RT zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 300 μL 0,1x TE Puffer und einer Zentrifugation für 10 min bei 13000 rcf und RT. Abschließend wurden 70 μL 0,1x TE Puffer mittig auf den Filter pipettiert, die Säule umgedreht in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die markierte DNA durch Zentrifugation für 1 min bei 13000 rcf und RT vom Filter gespült. Zur Überprüfung der Amplifikation und Markierungseffizienz wurde für jeden Ansatz die Konzentration und Einbaurrate der Fluoreszenznucleotide spektrophotometrisch gemessen. Die DNA-Konzentration wurde über die OD₂₆₀ bestimmt, während zur Berechnung der jeweiligen Einbauraten die Absorption bei 650 nm (Cy5TM) bzw. 550 nm (Cy3TM) ermittelt wurde.

$$\text{Einbaurrate Cy5}^{\text{TM}} = (A_{260} * 250,000 \text{ (cm}^{-1} \text{ M}^{-1})) / (A_{650} * 6,600)$$

$$\text{Einbaurrate Cy3}^{\text{TM}} = (A_{260} * 150,000 \text{ (cm}^{-1} \text{ M}^{-1})) / (A_{550} * 6,600)$$

Jeweils 15 μg der Cy5TM- und Cy3TM- markierten DNA wurden mit 200 μL Cot1-DNA (1 mg/mL), 1/10 (v/v) 3M NaOAc unter Zugabe von 800 μL 100% EtOH für 20 min bei -20°C gefällt. Die DNA wurde anschließend für 15 min bei 13000 rcf und RT pelletiert, mit 70% EtOH entsalzt und der Überstand restlos entfernt. Das DNA-Pellet wurde in 200 μL ULTAhyb Puffer aufgenommen und über etwa 2-3 Stunden bei 40°C im Themomixer (Eppendorf) vollständig gelöst.

Vor der Hybridisierung wurde der DNA-Ansatz für 10 min bei 75°C denaturiert und ohne weiteres Mixen auf 40°C wieder abgekühlt (*re-annealing*). Über einen letzten Zentrifugationsschritt für 15 min bei 13000 rcf und 40°C erfolgte die Abtrennung möglicher Präzipitate. Die gelöste DNA wurde mittels angewärmter Hamilton-Spritze (37°C) auf den BAC/PAC Array appliziert.

2.3.7.2 Hybridisierung der BAC/PAC CGH Arrays

Um eine optimale Hybridisierung der BAC/PAC CGH Arrays zu erreichen, müssen die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente aktiv über den Objektträger bewegt werden. Demnach wurde eine automatische Hybridisierungsstation (Automated Slide Processor, ASP) mit einer maximalen Kapazität von 12 Hybridisierungen pro Lauf verwendet. Über eine Membranpumpe erfolgte bei diesem Gerät eine ausreichende Mischung der DNA-Lösung über einen Zeitraum von 44 Stunden bei 38°C, wobei die Hybridisierungslösung in den Kammern jeweils nacheinander für 5 min über den Array bewegt wurde. Nach Ablauf der Hybridisierungszeit folgte ein Waschprotokoll, bestehend aus:

- 1) bei RT: 50% FA/2x SSC/0,1% Tween 20
- 2) bei 40°C: 50% FA / 2x SSC / 0,1% Tween 20 (2 Durchgänge)
- 3) bei RT: 2x SSC / 0,05% Tween 20

Nach dem letzten Waschschrift wurden die BAC/PAC CGH Arrays unverzüglich aus den Kammern entfernt, für 1 min in 1x PBS mit 0,05% Tween20 gewaschen und durch Zentrifugation (2 min bei 100 rcf und RT) getrocknet.

2.3.7.3 Einlesen der BAC/PAC CGH Arrays und Datenextraktion

Die BAC/PAC CGH Arrays wurden unmittelbar nach Trocknung in einem Fluoreszenzscanner (Axon) eingelesen, der parallel die Fluoreszenzintensitäten des Cy3TM- (Emissionsmaximum: 570 nm) und Cy5TM- (Emissionsmaximum: 670 nm) Kanals detektieren kann. Die generierten Bilder wurden als TIFF-Dateien je Kanal abgespeichert, so dass die Rohdaten für die anschließende Auswertung zur Verfügung standen. Über die zugehörige Scannersoftware Genepix Pro 4.1 (Axon Instruments) erfolgte die Datenextraktion, wobei zunächst ein array-Format-spezifisches Raster (sog. Grid File), in dem zu jedem Spot die Informationen des BAC/PAC Klons hinterlegt sind, mit den fluoreszierenden Sonden (Spots) in Deckung gebracht und manuell angepasst wurde. Als extrahierte Daten wurden die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten der Spots und des lokalen Hintergrundes, sowie weitere Informationen zur Spotqualität in tabellarischer Form abgespeichert (engl. *gene pix result*, gpr). Die Normalisierung und weitere Auswertung der CGH Daten erfolgte mithilfe der statistischen Programmiersprache R in der Bioconductor-Umgebung (Gentleman et al., 2004).

2.3.7.4 Normalisierung und Auswertung der BAC/PAC CGH Arrays

Vor der statistischen Auswertung von array-CGH Daten ist eine Normalisierung der Fluoreszenzsignale erforderlich, um technische Variationen im Experiment, wie z.B. einen unterschiedlichen Einbau der Fluoreszenzfarbstoffe in die DNA, auszugleichen. Die *Print Tip Loess* Normalisierung (Smyth et al., 2003) wurde angewendet, um zudem Unregelmäßigkeiten der einzelnen Druckköpfe (engl. *print tip*) bei der Herstellung der BAC/PAC Arrays einzubeziehen. Als Qualitätsparameter für die Auswertung der einzelnen Spots wurden ein Verhältnis der Spot-Intensität zum Hintergrund von $>3,0$ und eine Standardabweichung der Triplikate von $<0,2$ gewählt. Zur Ermittlung der chromosomalen Bruchpunkte wurde der GLAD (engl. *Gain and Loss Analysis of DNA*) Algorithmus (Hupe et al., 2004) angewendet und Kopienzahlveränderungen wurden auf der Basis von mindestens 2 aufeinanderfolgenden BAC-Sonden mit \log_2 ratios oberhalb $+0,2$ bzw. unterhalb $-0,2$ (entsprechend heterozygoter Aberrationen) ausgewertet. Die Zusammenstellung und Anpassung der Skripte erfolgte durch Dr. Anja Weigmann und Dr. Winfried Hofmann (IZMP).

2.3.7.5 Markierungsreaktion für Oligonukleotid CGH Arrays

Im Gegensatz zum Markierungsprotokoll für die BAC/PAC array-CGH (Kapitel 2.3.7.1) wurde zunächst eine Restriktion der genomischen DNA mit AluI und RsaI (Fermentas) nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Tab. 2.25). Der vollständige Verdau wurde durch Inkubation des Ansatzes für 2 Stunden bei 37°C erreicht, gefolgt von der Hitzeinaktivierung des Enzyms für 20 min bei 65°C . Die Überprüfung der Integrität der DNA fand exemplarisch für eine Probe mit einem DNA-Chip des Bioanalyzers (Agilent) statt.

Tab. 2.25: Restriktionsansatz für Oligonukleotid CGH Arrays

Komponenten	Kontroll-DNA	Test-DNA
DNA	1 -2 μg	1 -2 μg
DNase freies Wasser	20 μL	20 μL
10x Tango Buffer (incl. BSA)	2,8 μL	2,8 μL
Alu I (10 U/ μL)	0,5 μL	0,5 μL
Rsa I (10 U/ μL)	0,5 μL	0,5 μL
Gesamtvolumen	26 μL	26 μL

Die Markierungsreaktion erfolgte ebenfalls durch Random Priming nach dem Herstellerprotokoll mit dem CGH Labeling Kit (Agilent) (Tab. 2.26). Nach Zugabe von 5 μL Random Primer zur verdauten DNA wurde der Ansatz für 3 min bei 95°C denaturiert und alle weiteren Komponenten auf Eis zugegeben. Während der Inkubationszeit von

2 Stunden bei 37°C erfolgte die Amplifikation und direkte Fluoreszenzmarkierung der DNA. Durch Erhitzen auf 65°C für 10 min wurde die Restaktivität des Enzyms gestoppt.

Tab. 2.26: Markierungsansatz für Oligonukleotid CGH Arrays

Komponenten	Kontroll-DNA	Test-DNA
DNA-Lösung	26 µL	26 µL
2,5x Random Primer Solution	5 µL	5 µL
5x Puffer	10 µL	10 µL
10x dNTP Nucleotide Mix	5 µL	5 µL
Cy5 TM -dCTP (1mM)	3 µL	-
Cy3 TM -dCTP (1mM)	-	3 µL
Exo-Klenow-Fragment (40 U/µL)	1 µL	1 µL
Gesamtvolumen	50 µL	50 µL

Die Aufreinigung des Markierungsansatzes erfolgte mithilfe der Microcon YM-30 Filter (Millipore). Jeder Ansatz wurde mit 430 µL 1xTE Puffer verdünnt, auf die Säule übertragen und für 10 min bei 8000 rcf und RT zentrifugiert, gefolgt von einem Waschschrift mit 480 µL 1xTE Puffer.

Für die 244K bzw. 105K Arrays wurde die gereinigte, markierte DNA in 80 µL bzw. 40 µL 1xTE aufgenommen und die Konzentration und Einbaurate der Fluoreszenzfarbstoffe bestimmt. Für die anschließende Hybridisierung der Oligonukleotid CGH Arrays wurden Kontroll- und Test-DNA im gleichen Verhältnis eingesetzt.

2.3.7.6 Hybridisierung der Oligonukleotid CGH Arrays

Der Hybridisierungsansatz für die Oligonukleotid Arrays bestand neben der markierten Kontroll- und Test-DNA-Lösung aus Cot1-DNA, sowie Blocking Reagenz zum Blockieren von repetitiven Sequenzen und aus dem bei RT flüssigen Hybridisierungspuffer (CGH Hybridization Kit) Die erforderlichen Volumina für die unterschiedlichen Plattformen sind der Tab. 2.27 zu entnehmen.

Tab. 2.27: Hybridisierungsansatz für Oligonukleotid CGH Arrays

Komponenten	244K	105K
markierte DNA (gesamt)	mind. 140 µL	mind. 70 µL
Cot1-DNA [1 mg/mL]	50 µL	25 µL
10x blocking agent	52 µL	26 µL
2x hybridisation buffer	260 µL	130 µL
Gesamtvolumen	500 µL	250 µL

Nach der Denaturierung des Ansatzes für 3 min bei 95°C, erfolgte die Abkühlung auf 37°C für 30 min (*re-annealing*). Für die Hybridisierung wurden 490 µL (244K) bzw. 250 µL (105K) des Ansatzes auf dem Glasobjektträger (sog. *gasket slide*) innerhalb der Gummidichtung verteilt, mit dem Array zu einem „Sandwich“ zusammengesetzt und in die Array-Halterung eingespannt. Durch eine stetige Rotation (20 Umdrehungen/min) im Hybridisierungssofen (Agilent) für 40 Stunden bei 65°C wurde über die Blasenbewegung innerhalb des Sandwichs eine ausreichende Verteilung der markierten DNA-Fragmente sichergestellt.

Das verwendete Waschprotokoll für die hybridisierten Arrays ist in Tab. 2.28 angegeben. Zum Öffnen des Sandwichs wurde dieses komplett in Wash Buffer 1 (CGH Wasch Buffer 1 and 2 Set) getaucht, um den Luftkontakt zu minimieren. Nach dem vierten Waschschrift erfolgte eine langsame Entnahme des Arrays aus der Stabilization Solution, so dass der Objektträger trocken eingescannt werden konnte.

Tab. 2.28: Waschprotokoll für Oligonukleotid CGH Arrays

Ablauf	Puffer	Temperatur	Zeit
Sandwich öffnen	Wash Buffer 1	RT	
1. Waschschrift	Wash Buffer 1	RT	5 min
2. Waschschrift	Wash Buffer 2	37°C	1 min
3. Waschschrift	Acetonitril	RT	1 min
4. Waschschrift	Stabilization Solution	RT	30 sec

2.3.7.7 Einlesen der Oligonukleotid CGH Arrays und Datenauswertung

Alle Oligonukleotid CGH Arrays wurden mit dem Fluoreszenzscanner #G2565BA (Agilent) mit den Standardeinstellungen für CGH Arrays (100% PMT, Scannerauflösung: 5 µm) eingelesen und der Barcode erfasst. Die Auswertung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte mithilfe der Software Feature Extraction 9.1.3.1 (Agilent), wobei zu den Bilddateien der Arrays automatisch über die Barcode-Information das zugehörige Grid File geladen wurde. Für die anschließende Datenextraktion wurde das Standard-CGH Protokoll (CGH-v4_91) verwendet, wobei die Fluoreszenzintensitäten sowohl als Rohdaten wie auch als Linear/LOWESS normalisierte \log_2 ratios in einer TXT-Datei gespeichert wurden. Mithilfe der DNA Analytics Software 4.0.76 (Agilent) wurden die genomischen Aberrationen anschließend visualisiert. Zur Identifikation der aberranten Intervalle wurde der ADM-2 (engl. *aberration detection method 2*) Algorithmus gewählt, der basierend auf einer statistischen Auswertung alle Bereiche mit durchgehend hohen oder niedrigen \log_2 ratios detektiert (Lipson et al., 2006).

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Selektion von Zellsubpopulationen mittels Dichtegradientenzentrifugation

Über die Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll®Paque (GE Healthcare) wurden die Zellpopulationen der Blut- bzw. Knochenmarkproben separiert. Dabei wird eine Anreicherung von mononukleären Zellen (B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen und Thrombozyten) nach der Zentrifugation oberhalb des Ficoll®Paque-Gradienten erreicht, während die Granulozyten, Erythrozyten und toten Zellen sich als Sediment am Boden des Röhrchens sammeln. Maximal 5 mL Blut oder Knochenmark wurden vorsichtig auf einen 3 mL Ficoll®Paque-Gradienten geschichtet und bei 20°C für 20 min und 400 rcf ohne Bremse zentrifugiert. Der weiße Ring, in dem sich die MNZ sammeln, wurde in ein neues 15 mL Röhrchen überführt, in 1x PBS oder Rote Lyse Puffer resuspendiert und mehrfach gewaschen (Zentrifugation: 10 min bei 400 rcf). Das Zellpellet wurde entsprechend der Größe in ≥ 1 mL Einfriermedium (RPMI1640, 10% FBS, 8% DMSO) resuspendiert und bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

Das Granulozyten-/Erythrozytensediment wurde mit dem fünffachen Volumen an Rote Lyse Puffer aufgefüllt und die Erythrozytenlyse durch Inkubation für 10 min bei 20°C erreicht. Die Zellen wurden anschließend für 10 min bei 300 rcf pelletiert und erneut mit Rote Lyse Puffer oder 1x PBS gewaschen. Das Einfrieren erfolgte wie oben beschrieben.

2.4.2 Positive Selektion von CD34+ Stammzellen aus PB-/KM-MNZ

Die Isolierung hämatopoetischer Stammzellen aus Blut und Knochenmark ist über eine zelltypspezifische Expression bestimmter membrangebundener Glykoproteine, sog. Unterscheidungsgruppen (engl. *cluster of differentiation*, CD) möglich. HSZ und Vorläuferzellen sind unter anderem positiv für das CD34-Antigen und können mithilfe einer magnetischen Antikörperseparation (engl. *Magnetic Cell Separation*, MACS) angereichert werden. Bei dieser positiven Selektion binden die entsprechenden Zellen an Antikörper-beschichtete Eisenpartikel (engl. *microbeads*) und können anschließend im Magnetfeld von nicht-gebundenen Zellen abgetrennt werden. Für die Überprüfung des Selektionsergebnisses wird die immunphänotypische Durchflusszytometrie (engl. *Fluorescent Antibody Cell Separation*, FACS) eingesetzt.

In dieser Arbeit wurden CD34+ Zellen aus dem Vollblut gesunder Probanden nach Herstellerangaben isoliert. Der Separationsschritt mit Antikörper-beschichteten MicroBeads wurde zweimal nacheinander durchgeführt, um eine möglichst reine Zellpopulation zu erhalten (CD34 MicroBead Kit Manual, Miltenyi Biotech). Für die Verwendung der Zellen in den anschließenden Methylcellulose-Assays war das Arbeiten unter sterilen Bedingungen erforderlich.

2.4.3 Selektion von CFUs mittels Methylcellulose-Assays

Um die Proliferationskapazität hämatopoetischer Vorläuferzellen zu untersuchen, wurden Kurzzeitkulturen mithilfe von halbviskosen Methylcellulose-Medien (engl. *methyl cellulose*, MC) durchgeführt. Diese Untersuchungen ermöglichen die Quantifizierung und Identifikation der sich entwickelnden Zellkolonien (engl. *colony forming unit*, CFU) nach 14 Tagen, die sowohl in der Transplantationsmedizin als Qualitätskontrolle für gesunde Knochenmarkspender als auch in der Hämatologie zur Charakterisierung hämatopoetischer Erkrankungen eingesetzt werden (Coutinho et al., 1993). Durch eine ausreichende Verdünnung der Zellen im MC-Medium, das je nach Untersuchungsziel unterschiedliche Konzentrationen und Zusammensetzungen an hämatopoetischen Wachstumsfaktoren enthält, wird die Bildung vereinzelter Kolonien ermöglicht. Für bestimmte wissenschaftliche Fragestellungen können distinkte Kolonien weiteren Analysen zugeführt werden.

Die Kultivierung von CD34+ Blutstammzellen gesunder Probanden und der MNZ von MDS Patienten erfolgte aus heparinisierem Blut bzw. EDTA-antikoaguliertem Knochenmark, das nicht länger als 24 Stunden *ex vivo* gelagert wurde. Die Zellen wurden nach Angaben des Herstellers mit einer Endkonzentration von 1×10^5 Zellen/mL eingesetzt. Zwei Zellkulturschalen (\varnothing 35 mm) mit jeweils 1 mL zellhaltigem MC-Medium (#04534, 1% Penicillin/Streptomycin) wurden pro Patient für maximal 24 Tage bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die morphologische Beschreibung der Kolonien bzw. Cluster erfolgte nach den Vorgaben von Nissen-Druey *et al.*, 2005.

2.5 Molekularzytogenetische Methoden

2.5.1 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung ist eine häufig angewandte Methode zur zytogenetischen Untersuchung fixierter Präparate, wie z.B. Gewebe oder einzelner Zellen. Nach dem Prinzip der molekularen Hybridisierung einzelsträngiger Nukleinsäuren erfolgt die sequenzspezifische Anlagerung der komplementären, markierten Sonden an die Target-Moleküle. Auf diese Weise können z.B. in der Tumorgenetik insbesondere Translokationsereignisse, aber auch genomische Kopienzahlveränderungen in Form von bekannten Deletionen mit einer Größe von ≥ 100 kb detektiert werden. Der Nachweis nebeneinander liegender, verdoppelter Abschnitte (sog. Tandemduplikationen) ist dagegen mittels FISH nicht möglich, weil mikroskopisch keine sichere Separation der Fluoreszenzsignale möglich ist.

Alle FISH Analysen mit kommerziellen Sonden (Abbott, Kreatech) wurden in der zytogenetischen Routinediagnostik nach dem Standardprotokoll durchgeführt und ausgewertet. Die Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten BAC-Sonden des Anbieters

BlueGnome erfolgte nach Herstellerangaben. Die FISH-Sonde für die perizentromerische Region des Chromosoms 17 wurde freundlicherweise von Tim Focken (IZMP) zur Verfügung gestellt.

2.5.2 Herstellung von FISH-Sonden

Auf der Basis von BAC- und Fosmid-Klonen erfolgte die Herstellung der regionsspezifischen FISH-Sonden. Die Sondensequenz wurde zunächst über eine PCR mit degenerativen Oligonukleotid-Primern (engl. *degenerate oligonucleotide primer*, DOP) vervielfältigt, bei der eine sequenzunabhängige Amplifikation der Ausgangs-DNA möglich ist (Telenius et al., 1992). Auf diese Weise generierte PCR-Sonden enthalten keine Vektoranteile mehr, da das Gemisch der universellen Primer ausschließlich zur menschlichen, genomischen DNA komplementär ist. Über einen zweistufigen DOP-PCR-Prozess können alle regionsspezifischen FISH-Sonden generiert werden.

Die isolierte BAC- oder Fosmid-DNA (Kapitel 2.3.2) wurde zunächst über eine initiale DOP-PCR nach folgendem Ansatz amplifiziert.

Tab. 2.29: DOP-PCR, 1. Ansatz

Komponenten	Volumen
dNTPs (1 mM je dNTP)	2,50 µL
10xPCR Puffer (ohne MgCl ₂)	5,00 µL
MgCl ₂ (25 mM)	10,00 µL
DOP Primer Mix (100 mM)	2,00 µL
Taq-Polymerase (5 U/µL)	0,50 µL
DNA (100 ng/µL)	1,00 µL
DNase freies Wasser	29,00 µL
Gesamtvolumen	50,00 µL

In den ersten PCR-Zyklen wird bei niedrigen Annealing-Temperaturen die unspezifische Primeranlagerung an die Ziel-DNA ermöglicht, gefolgt von einer exponentiellen Amplifikation der Fragmente über die endständigen Primersequenzen (Tab. 2.30).

Tab. 2.30: PCR Programm für die DOP-PCR (1. Ansatz)

Temperatur	Zeit	Zyklen
96 °C	5 min	1
94 °C	1 min	x 9
20-72°C	+0,5°C/5 sec	
94 °C	1 min	x 35
62 °C	1 min	
72 °C	30 sec	
72-95 °C	+0,5°C/5 sec	1
4 °C	∞ min	1

Im nächsten Schritt erfolgte der Einbau von aminoallyl (aa)-dUTPs zur indirekten Markierung der FISH-Sonden mithilfe einer zweiten PCR.

Tab. 2.31: DOP-PCR, 2. Ansatz

Komponenten	Volumen
dNTP Mix 2:1 aa-dUTP:dTTP (10 mM)	2,50 μ L
10xPCR Puffer (ohne MgCl ₂)	5,00 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	10,00 μ L
DOP Primer Mix (100 mM)	2,00 μ L
Taq-Polymerase (5 U/ μ L)	0,50 μ L
DNA (aus 1. PCR)	1,00 μ L
DNase freies Wasser	29,00 μ L
Gesamtvolumen	50,00 μ L

Tab. 2.32: PCR Programm für die DOP-PCR (2. Ansatz)

Temperatur	Zeit	Zyklen
94 °C	5 min	1
94 °C	1 min	x 35
62 °C	1 min	
72 °C	1 min	
4 °C	∞ min	1

Vor der Markierungsreaktion war es erforderlich, die PCR-Produkte aufzureinigen (PCR-Purification Kit, Jena Bioscience). Eine Gesamtmenge von 3 μ g amplifizierter aaDNA wurde anschließend für 5 min bei 99°C denaturiert und die restlichen Komponenten des Markierungsansatzes auf Eis zugegeben.

Tab. 2.33: Protokoll für den Markierungsansatz

Komponenten	Volumen
DNA (3 μ g)	12,50 μ L
1M NaHCO ₃ Puffer (pH 8,5)	7,50 μ L
Fluorophor NHS-Ester (60 μ g)	5,00 μ L
Gesamtvolumen	25,00 μ L

Die Verknüpfung der Farbstoffe mit den aa-dUTPs erfolgte über *N*-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ester, wobei die Reaktion lichtgeschützt für 1 Stunde bei RT inkubiert wurde. Ungebundene Fluoreszenzmoleküle wurden anschließend über Gelfiltration (Sephadex G50, GE Healthcare) entfernt. Über eine photometrische Messung wurden die Konzentration der gereinigten Sonden-DNA und die Absorption der verwendeten Fluorophore zur Berechnung der Markierungseffizienz bestimmt. In Abhängigkeit der jeweiligen Sondenkonzentration wurde nach folgendem Schema der Hybridisierungs-Mix zusammengestellt.

Tab. 2.34: Zusammensetzung Hybridisierungs-Mix

Komponenten	Volumen
100% Formamid (Endkonz.: 50%)	5,00 μ L
20x SSC (Endkonz.: 2x)	2,50 μ L
Cot1-DNA (Endkonz.: 30fach)	variabel
Dnase freies Wasser	variabel
FISH-Sonde (Endkonz.: 5-10 ng/ μ L)	variabel
20% Dextransulfat / 60% Formamid	12,50 μ L
Gesamtvolumen	25,00 μ L

Die resultierende Endkonzentration der Sonden-DNA im Hybridisierungs-Mix richtete sich nach der Markierungseffizienz und dem gleichzeitigen Einsatz mehrerer Sonden.

2.5.3 Vorbereitung der fixierten Zellen und Hybridisierung

Die Hybridisierung der FISH-Sonden erfolgte sowohl an Metaphasenchromosomen-Präparaten zur Überprüfung der physikalischen Kartierung als auch an Interphasekernen. Um eine ausreichende Spreitung der Metaphasenchromosomen zu erzielen, wurden die fixierten Zellen in einer Klimakammer (22°C, 48% rel. Luftfeuchtigkeit) auf gesäuberte, gekühlte Objektträger (OT) ausgetropft. Für die Untersuchung numerischer Aberrationen an Interphasekernen erfolgte das Aufbringen der Zellen mithilfe einer Zytozentrifuge (Thermo Scientific). Dabei wurden 230 μ L des eiskalten Fixativ in der Halterung (Cytofunnel) vorgelegt und zusammen mit der Zellsuspension auf den Objektträger zentrifugiert. Nach einer 3minütigen Pepsin-Behandlung zur Permeabilisierung der Kernmembran wurden die OT mit VE-Wasser gespült und über eine aufsteigende EtOH-Reihe (70% / 95% / 99%) dehydriert. Es wurden 2 μ L des Hybridisierungsansatzes aufgetragen, eingedeckt (\varnothing 10 mm Deckglas) und mit Fixogum (Marabuwerke) abgedichtet. Nach einem Denaturierungsschritt für 10 min bei 80°C erfolgte die Hybridisierung der FISH-Sonden über Nacht in einer Feuchteammer bei 37°C. Zum Entfernen nichtgebundener und unspezifisch bindender DNA-Fragmente wurden die OT für 2 min in 0,4x SSC mit 0,3% Igepal (Sigma Aldrich) bei 75°C gewaschen und anschließend in aufsteigender EtOH-Reihe dehydriert. Die Gegenfärbung der Chromosomen mit DAPI erfolgte mit dem Eindecken des Präparates (Eindeckmedium, Vector Laboratories). Die Auswertung der FISH-Untersuchungen erfolgte mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Zeiss). Für die Aufnahme einzelner Hybridisierungsergebnisse wurde eine CCD-Kamera (Canon) und die Software FISHView 2.0 (Applied Spectral Imaging) genutzt.

3 Ergebnisse

Innerhalb der vorliegenden Arbeit stand die genomweite Untersuchung von chromosomalen Anomalien bei kindlichem MDS und JMML im Mittelpunkt. Auf Basis der gewonnenen array-CGH Daten erfolgte eine Überprüfung der Ergebnisse mit unabhängigen Methoden. Unter anderem wurden FISH Analysen mit kommerziellen Sonden und selbstgenerierten BAC-Sonden zur Kontrolle somatischer Veränderungen angewendet. Durch die Etablierung von quantitativen real-time PCR Assays mit genomischer DNA war es außerdem möglich, Kopienzahlveränderungen auf Basis einzelner Gene zu überprüfen. Des Weiteren wurde mithilfe der direkten Sequenzierung der Mutationsstatus potentieller Kandidatengene innerhalb der CNAs überprüft.

Um auf die Problematik des inhomogenen Probenmaterials bei der Untersuchung von MDS Patienten einzugehen, wurden im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Strategien verfolgt, die eine Anreicherung maligner Zellen bzw. Zellpopulationen zum Ziel hatten. Neben der parallelen Untersuchung von Granulozyten und mononukleären Zellen des gleichen Patienten wurde die Kultivierung hämatopoetischer Zellen in Methylcellulose-Assays mit anschließender Untersuchung individueller Zellklone getestet.

3.1 Molekulare Karyotypisierung bei MDS und JMML im Kindesalter mittels BAC/PAC und Oligonukleotid array-CGH

Als Ausgangsmaterial für array-CGH Analysen bei kindlichem MDS und JMML wurde je nach Verfügbarkeit genomische DNA unterschiedlicher Zellpopulationen (mononukleäre Zellen, Granulozyten oder Gesamtzellen) aus dem Knochenmark oder dem Blut verwendet. Die Proben wurden gegengeschlechtlich hybridisiert, so dass beispielsweise bei weiblichen Patienten und der Verwendung der männlichen Referenz-DNA (Ref XY, zusammengestellt aus DNA extrahiert aus PB-MNZ von 5 gesunden Spendern) der Zugewinn eines X-Chromosoms und der Verlust des Y-Chromosoms als interne Kontrolle genutzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 19 MDS und 8 JMML Patienten mittels BAC/PAC array-CGH (8K) und/oder Oligonukleotid array-CGH (105K und 244K) untersucht. Zusammen mit den Ergebnissen vorangegangener array-CGH Analysen wurden die Daten von insgesamt 58 Patienten (39 Patienten mit MDS und 19 Patienten mit JMML) ausgewertet und auf rekurrente Alterationen überprüft. Da die genomweite Auflösung der BAC/PAC CGH Arrays durch die Anzahl und die Größe der verwendeten BAC/PAC Klone festgelegt wird, können beispielsweise mithilfe der 8K CGH Arrays in hochaufgelösten Regionen chromosomale Anomalien bis zu einer minimalen Größe von 100 kb detektiert werden.

Um bei den MDS und JMML Patienten auch Kopienzahlveränderungen auf dem Niveau einzelner Gene identifizieren zu können, wurden außerdem kommerziell erhältliche Oligonukleotid CGH Arrays mit einer maximalen Auflösung von 7,4 kb (244K) eingesetzt.

3.1.1 Auswertung der BAC/PAC und Oligonukleotid array-CGH Daten vor dem Hintergrund heterogenen Probenmaterials

In Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probenahme und dem Erkrankungssubtyp liegt bei den MDS und JMML Patienten größtenteils inhomogenes Untersuchungsgut vor. Die Auswertung der array-CGH Ergebnisse erfolgte in dieser Arbeit demnach vor dem Hintergrund dieser Problematik und der Sensitivität der entsprechenden Plattform. Für die BAC/PAC CGH Arrays wurden Kopienzahlveränderungen auf der Basis von mindestens 2 aufeinanderfolgenden BAC Klonen mit \log_2 ratios oberhalb +0,2 bzw. unterhalb -0,2 (entsprechend heterozygoter Aberrationen) ausgewertet. Wie in Abb. 3.1 dargestellt, konnte der Verlust des Chromosoms 7 für alle Patienten mit bekannter Monosomie 7, ausgenommen #D492 (\log_2 ratio: -0,00663) und #D514 (\log_2 ratio: -0,14868), detektiert werden. Bei #D164 wurde auf dem kurzen Arm des Chromosoms 7 eine interstitielle Deletion in 7p21.3-p15.3 mit einer Größe von 12 Mb nachgewiesen (Tab. 3.1).

Die Datenauswertung der Oligonukleotid CGH Arrays erfolgte mit dem Programm DNA Analytics (Version 4.0.76, Agilent) unter Berücksichtigung der jeweiligen Qualitätswerte, berechnet als Standardabweichung über alle Oligonukleotid Sonden (engl. *derivative log ratio spread*, DLRS). Eine geringe Standardabweichung resultiert in kleinen DLRS-Werten, wobei Werte kleiner 0,2 eine sehr gute Array-Qualität widerspiegeln. Insgesamt wurden bei 2 RC Patienten (12%) DLRS-Werte <0,2, bei 7 MDS Patienten (44%) DLRS-Werte zwischen 0,2 und 0,3 und bei 7 MDS Patienten (44%) DLRS-Werte >0,3 erhalten. Bei den JMML Patienten lagen die DLRS-Werte für 4 Patienten (40%) zwischen 0,2 und 0,3 und für die restlichen 6 Patienten (60%) wurden DLRS-Werte >0,3 berechnet (Tab. 3.1 und Tab. 3.2).

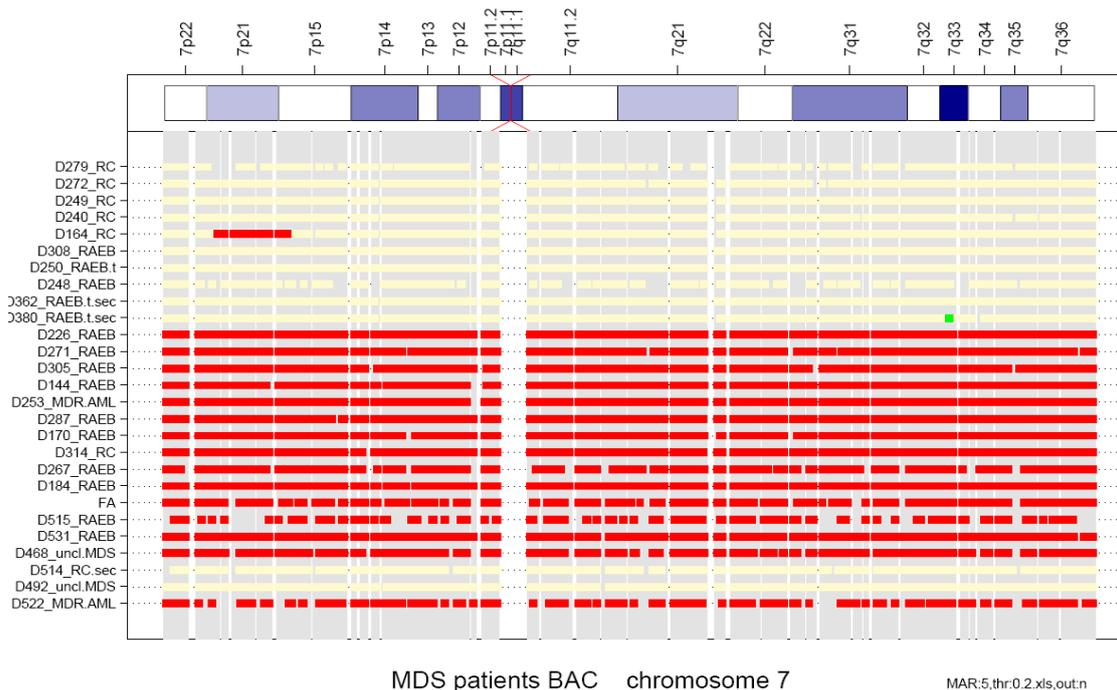


Abb. 3.1: Multiples Alignment des Chromosoms 7 der MDS Patienten

Oben ist das Ideogramm des Chromosoms 7 von pter bis qter dargestellt. Unterhalb des Ideogramms sind die normalisierten Kopienzahlen entsprechend der BAC/PAC array-CGH Analysen abgebildet. Auf der linken Seite sind die D-Nummern der Patienten und die jeweiligen Diagnose angegeben. Bei diesem multiplen Alignment stellen die roten Balken einen chromosomalen Verlust dar, während die gelben Balken einen unveränderten Kopienzahlstatus ($2n$) anzeigen. Abkürzungen: MAR, *minimal altered region*; thr, *threshold*; out, *outlier*; n, *no*

Weiterhin besteht bei der Auswertung der Oligonukleotid CGH Arrays mittels DNA Analytics die Möglichkeit, über die Einstellung von Aberrationsfiltern die Anzahl falsch positiver Ergebnisse zu minimieren. Die \log_2 ratios für die Detektion von Kopienzahlveränderungen wurden für die Auswertung der MDS und JMML Proben auf 0,3 und die minimale Anzahl aberranter Oligonukleotid Sonden auf 10 eingeschränkt (Standardeinstellungen). Für die Berechnung chromosomaler Aberrationen wurde der ADM-2 Algorithmus (Lipson et al., 2006) angewendet. Die Einstellung des ADM-2 Detektionsgrenzwertes (engl. *threshold*) erfolgte in Abhängigkeit der jeweiligen DLRS-Werte und der über konventionelle Karyotypisierung oder FISH identifizierten Chromosomenanomalien.

Welchen Einfluss die Einstellung des Aberrationsfilters bezüglich der \log_2 ratios zur Detektion bekannter Kopienzahlveränderungen hatte, wird in Abb. 3.2 (Tab. 8.3, Anhang) deutlich. Während bei den Standardeinstellungen die Monosomie 7 bei den betroffenen Patienten (#D468, #D493, #D510, #D515, #D531, #D593, #D726, #D731, #D762 und FA) detektiert werden konnte, wurde der Verlust des Chromosoms 7 bei der Einstellung stringenter Filterkriterien (\log_2 ratio aberranter Sonden: 0,5) für #D515, #D726, #D731 und #D762 nicht mehr angezeigt.

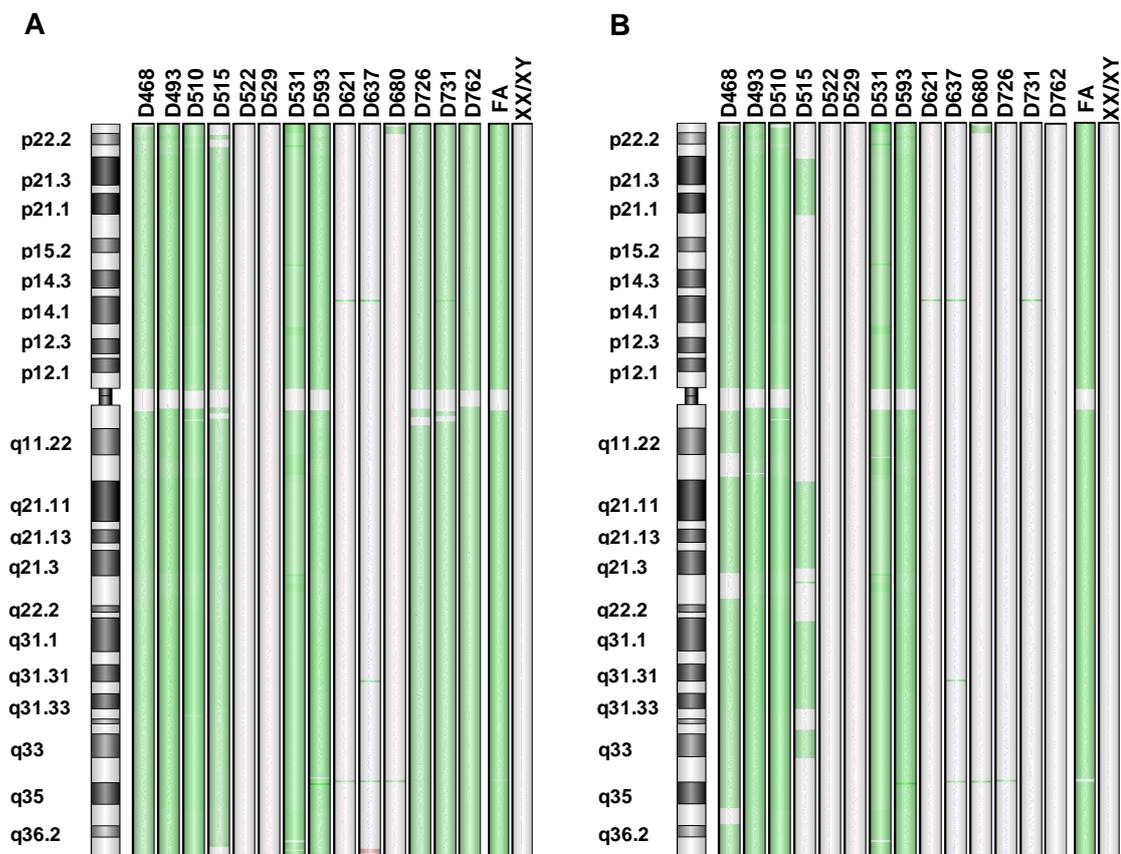


Abb. 3.2: Multiples Alignment des Chromosoms 7 bei array-CGH Auswertungen mit untersch. Filtereinstellungen

(A und B) Jeweils auf der linken Seite ist in vertikaler Richtung das Ideogramm des Chromosoms 7 von pter bis qter dargestellt (DNA Analytics). Die grünen Balken repräsentieren einen Verlust, während die grauen Balken einen unveränderten Kopienzahlstatus darstellen. In horizontaler Richtung sind die D-Nummern der Patienten angegeben, sowie die Hybridisierung der Kontrollen XX/XY. (A) Filtereinstellungen: durchschnittlicher \log_2 ratio = 0,3 und minimale Anzahl aberranter Sonden = 10. (B) Filtereinstellungen: durchschnittlicher \log_2 ratio = 0,5 und minimale Anzahl aberranter Sonden = 10.

Tab. 3.1: Ergebnisse der array-CGH Analysen für MDS Patienten

Patienten-ID	Diagnose	Karyotyp	FISH Ergebnisse	DLRS	Array-CGH Ergebnisse
D144	RAEB	48,XY,+Y,-7,+21,+22 [6]	k.M.	-	arr 7p22.3q36.3(188,000-158,656,000)x1, 21q11.2q22.3(13,462,000-46,926,000)x3, 22q11.1q13.33(15,621,000-49,454,000)x3, Yp11.31q12(2,845-57,545)x2
D164	RC	46,XX	k.M.	-	arr 7p21.3p15.3(8,951,000-20,952,000)x1
D170	sek. RAEB	k.E.	75% nuc ish cent7 (CEP7x1)	-	arr 7p22.3q36.3(188,000-158,656,000)x1
D184	RAEB	45,XX,-7	k.M.	-	arr 7p22.3q36.3(188,000-158,656,000)x1, 9q33.3q34(127,659,000-140,118,000)x1, 17p13.3p13.1(343,000-8,011,000)x1, 19p13.3q13.43(211,00- 63,687,00)x1
D226	RAEB	45,XY,del(6)(q21),-7 [12]	k.M.	-	arr 6q15q23.3(91,251,000-137,615,000)x1, 7p22.3q36.3(188,000-158,656,000)x1
D240	RC	46,XX [11]	k.M.	-	keine CNA
D248	RAEB	46,XY	k.M.	-	keine CNA
D249	RC	46,XX,9qh-	k.M.	-	keine CNA
D250	RAEB-T	46,XX	k.M.	-	keine CNA
D253	MDR-AML	45,XY,-7	k.M.	-	arr 7p22.3q36.3(188,000-158,656,000)x1
D267	RAEB	41-45,XY,+1,-3,-5,-7,-10,-17,+mar	k.M.	-	arr 5q11.1q35.3(49,908,000-180,627,000)x1, 7p22.3q36.3(188,000-158,656,000)x1, 17p13.3p11.2(343,000-21,192,000)x1
D271	RAEB	45,XY,-7	k.M.	-	arr 7p22.3q36.3(188,000-158,656,000)x1
D272	RC	46,XY	k.M.	-	keine CNA
D279	RC	46,XY,7(9;11)(p22;q23)	k.M.	-	arr 14q32.2q32.33(99,165,000-105,352,000)x1
D287	sek. RAEB	45,XY,-7 [6/6]	k.M.	-	arr 7p22.3q36.3(188,000-158,656,000)x1
D305	RAEB	45,XY,-7,del(12)(p11) [1]	k.M.	-	arr 7p22.3q36.3(188,000-158,656,000)x1, 12p13.31p11.22(9,582,000-30,549,000)x1
D308	RAEB	46,XX	k.M.	-	keine CNA
D314	RC	45,XY,-7	k.M.	-	arr 7p22.3q36.3(188,000-158,656,000)x1
D362	RAEB-T	46,XY	k.M.	-	keine CNA
D380	RAEB-T	46,XX	k.M.	-	arr 3p14.3p12.3(55,606,000-79,097,000)x1
D468	unki. MDS	45,XY,-7[17]/ 45,XY,idel,del(12)(p11p12) [3]	35% nuc ish cent7 (CEP7x1), 16% nuc ish 12p13 (TELx1)	0,3677	arr 7p22.2q36.3(2,156,938-158,498,226)x1
D492	unki. MDS	45,XY,-7 [4]/ 46,XY [11]	10% nuc ish cent7 (CEP7x1)	-	keine CNA
D493	RAEB	45,XY,-7 [20]	68% nuc ish cent7 (CEP7x1)	0,3005	arr 7p22.3q36.3(140,013-158,767,981)x1

Fortsetzung Tab. 3.1: Ergebnisse der array-CGH Analysen für MDS Patienten

<u>D510</u>	RAEB-T	45,XX,-7 [10]/ 46, idem, +21 [5]	0,2454	arr 7p22.3q36.3(140,013-158,077,476)x1
<u>D514</u>	RC	45,XX,-7 [18]/ 46,XX [2]	-	keine CNA
<u>D515^a</u>	RAEB	45,XY,-7 [11]/ 47,XY,+8 [5]/ 46,XY [5]	0,2861	arr 7p22.3q36.3(7,010,635-156,372,718)x1, 8p23.3-p23.2(248,088-2,229,927)x3, 8p21.3(21,408,450-23,345,467)x3, 8p11.23p11.22(39,356,395-39,505,456)x3, 8p11.21(41,259,479-42,764,119)x3, 8q22.1(94,896,584-96,377,698)x3, 8q24.13(123,852,091-124,786,950)x3, 8q24.3(140,782,494-146,128,899)x3
<u>D521</u>	sek. CMML	45,XY,add(3)(q28),-7 [18]/ 46,XY [2]	0,3326	arr 2q35(219,426,095-220,232,166)x3, 2q36.1q37.3(224,368,178-240,915,472)x1, 3q26.1q28(166,346,088-190,832,166)x3, 7p22.3q36.3(1,693,146-158,811,468)x1, 9p24.3p21.1(152,931-31,372,445)x3
<u>D522</u>	MDR-AML	45,XX,-7 [16]/ 46,XX [4]	-	arr 7p22.3q36.3(188,000-158,656,000)x1
<u>D522</u>	MDR-AML	45,XX,-7 [13]/ 46,XX [2]	0,4031	keine CNA
<u>D529</u>	RC	46,XY,der(4)t(4;7)(q25;q33), der(7)t(4;7)(q25;q21) [3]/ 46,XY [17]	0,1497	keine CNA
<u>D531</u>	RAEB	45,XY,-7 [4]/ 45,XY,del(5)(q14q34),-7 [16]	0,4938	arr 5q31.1q35.2(130,797,035-174,102,537)x1, 6q23.2q24.1(134,091,417-139,859,183)x1, 7p22.3q36.3(265,249-158,747,971)x1
<u>D585</u>	RC	46,XY [19] / 45,XY,-7 [1]	0,1818	keine CNA
<u>D593</u>	MDR-AML	45,XX,t(3;17)(q26;q23),-7 [13]/ 46,XX [2]	0,3440	arr 7p22.3q36.3(140,013-158,811,468)x1
<u>D621</u>	RC	45,XY,-7 [10]/ 46,XY [10]	0,3021	keine CNA
<u>D637</u>	RC	45,XY,-7,der(18;21) [1]	0,3427	keine CNA

Fortsetzung Tab. 3.1: Ergebnisse der array-CGH Analysen für MDS Patienten

<u>D680</u>	RC	45,XX,-7 [2]	23% nuc ish cen7 (CEP7x1)	0,3196	arr 7p22.3p22.2(908,940-2,167,370)x1, 7q34(141,967,354-142,192,230)x1
<u>D726</u>	RAEB	45,XX,-7 [11]/ 46,XX [4]	80% nuc ish cen7 (CEP7x1)	0,2481	arr 7p22.3q36.3(140,013-158,811,468)x1
<u>D731^b</u>	RAEB	45,XX,-7,del(12)(p11p13) [11]	45% nuc ish cen7 (CEP7x1), 66% nuc ish 12p13 (TELx1)	0,3593	arr 7p22.3q36.3(149,068-158,811,468)x1, 12p13.31p11.21(9,626,536-31,163,091)x1
<u>D762</u>	RAEB	45,XY,-7 [12]/ 46,XY [3]	77% nuc ish cen7 (CEP7x1)	0,2461	arr 7p22.3q36.3(178,208-158,618,183)x1
keine	FA, sek. MDS	45,XY,-7 [15]	59% nuc ish cen7 (CEP7x1)	0,3031	arr 7p22.3q36.3(140,013-158,811,468)x1

Abkürzungen: CNA, copy number alteration; DLRS, derivative log ratio spread; k.M., kein Material verfügbar; D493, array-CGH Analyse mittels Oligonukleotid Array (105K bzw. 244K); ^a Ein zusätzliches Chromosom 8 in 25% der Kerne (FISH) bei #D515 stellt sich in der array-CGH Analyse als fragmenthafter Zugewinn dar. ^b Der Karyotyp (#D731) wurde zu einem früheren Zeitpunkt bestimmt, jedoch liegt auch dieser Zeitpunkt vor der Knochenmarktransplantation. Array-CGH-Auswertungen mit Standardeinstellungen (Kapitel 3.1.1)

Tab. 3.2 Ergebnisse der array-CGH Analysen für JMML Patienten

Patienten-ID	Diagnose	Mutation/ Syndrom	Karyotyp	FISH Ergebnisse	DLRS	Array-CGH Ergebnisse
D003	JMML	Neurofibr.	46,XX	k.M.	-	arr 3q22.1q29(135,384,000-199,069,000)x3, 6q16.3q27(101,471,000-170,732,000)x1 keine CNA
D102	JMML	Neurofibr.	46,XY	k.M.	-	keine CNA
D115	JMML	Neurofibr.	46,XY	k.M.	-	keine CNA
D119	JMML	PTPN11-Mut.	46,XX	k.M.	-	keine CNA
D124	JMML	PTPN11-Mut.	46,XY	k.M.	-	arr 19p13.3q13.43(211,000-63,687,000)x3
D126	JMML	Neurofibr.	46,XY	k.M.	-	keine CNA
D213	JMML	KRAS-Mut.	46,XX	k.M.	-	keine CNA
D316	JMML	PTPN11-Mut.	46,XX	k.M.	-	arr 12q13.11q14.1(44,988,000-56,561,000)x3, 19p13.3q13.43(211,000-63,687,000)x3, 21q11.2q22.11(13,545,000-30,765,000)x1, 21q22.11q22.3(32,934,000-46,846,000)x3 arr 17q11.2(26,023,760-27,351,212)x1
D341 ^a	JMML	Neurofibr. (NF1-Deletion)	46,XY	k.M.	0,5322	keine CNA
D378	JMML	Neurofibr.	46,XX	k.M.	0,6200	keine CNA
D402	JMML	PTPN11-Mut.	45,XX,-7[11]/46,XX[4]	k.M.	0,2736	arr 7p22.3q36.3(2,767,638-158,793,114)x1 (viele nicht validierte Deletionen)
D448	JMML	-	46,XY	k.M.	-	arr 7p22.3q36.3(223,000-158,577,000)x1
D474	JMML	KRAS-Mut.	45,XY,-7[20]	k.M.	-	arr 7p22.3q36.3(908,940-156,782,733)x1
D541	JMML	PTPN11-Mut.	45,XX,-7[14]/46,XX[1]	k.M.	0,3472	arr 7p22.3q36.3(140013-158,811,468)x1, 17q11.2(26023760-27386090)x1
D566 ^a	JMML	Neurofibr. (NF1-Deletion)	45,XY,-7[15]	98% nuc ish 17q11 (NF1x1)	0,2857	arr 7p22.3q36.3(140013-158,811,468)x1, 17q11.2(26023760-27386090)x1
D581	JMML	-	45,XY,-7[1]	k.M.	0,2201	arr 7p22.3q36.3(140,013-158,811,468)x1
D600	JMML	PTPN11-Mut.	46,XX,-7,+mar[15]/ 46,idem,-mar[5]	49% nuc ish cen8 (CEP8x3), nuc ish 16p (subtel16px2)	0,3844	arr 7p22.3q36.3(140,013-158,811,468)x1, 8p12q11.21(36,673,794-50,142,678)x3
D612	JMML	-	45,XY,-7[15]	k.M.	0,2161	arr 7p22.3q36.3(140,013-158,811,468)x1
D614	JMML	PTPN11-Mut.	45,XY,-7[15]	k.M.	0,3155	arr 7p22.3q36.3(140,013-158,811,468)x1

Abkürzungen: DLRS, derivative log ratio spread; Mut., Mutation; Neurofibr., Diagnose einer Neurofibromatose 1. D493, array-CGH Analyse mittels Oligonukleotid Array (105K bzw. 244K); ^a Bestätigung der NF1-Deletion mittels Oligonukleotid array-CGH (244K) bei #D341 und #D566 (Steinemann et al., 2010)

3.1.2 Numerische Chromosomenanomalien bei kindlichem MDS und JMML

In der Gruppe der JMML und MDS Patienten wurden neben der Monosomie 7 weitere numerische Chromosomenalterationen über konventionelle Karyotypisierung identifiziert. Solange der Anteil aberranter Zellen oberhalb der Nachweisgrenze der array-CGH lag, konnten diese auch innerhalb der vorliegenden genomweiten Untersuchung bestätigt werden wie beispielsweise bei #D144 (Tab. 3.1). Die Monosomie 7, Trisomie 21 und Trisomie 22 sowie der Zugewinn eines Y-Chromosoms konnten mittels BAC/PAC array-CGH nachgewiesen werden (Abb. 3.3). Für den Patienten #D515, bei dem über Karyotypisierung und FISH Analysen ein zusätzliches Chromosom 8 in 5 von 21 Metaphasen und 25% der Interphasen-Kerne detektiert wurde, stellte sich diese Trisomie 8 als „fragmenthafter“ Zugewinn am Detektionslimit der array-CGH Analyse von etwa 25% dar (Tab. 3.1). Für #D170 mit ergebnisloser Karyotypisierung konnten neben der Monosomie 7, die vorab durch FISH Analysen identifiziert wurde, weitere chromosomale Veränderungen ausgeschlossen werden.

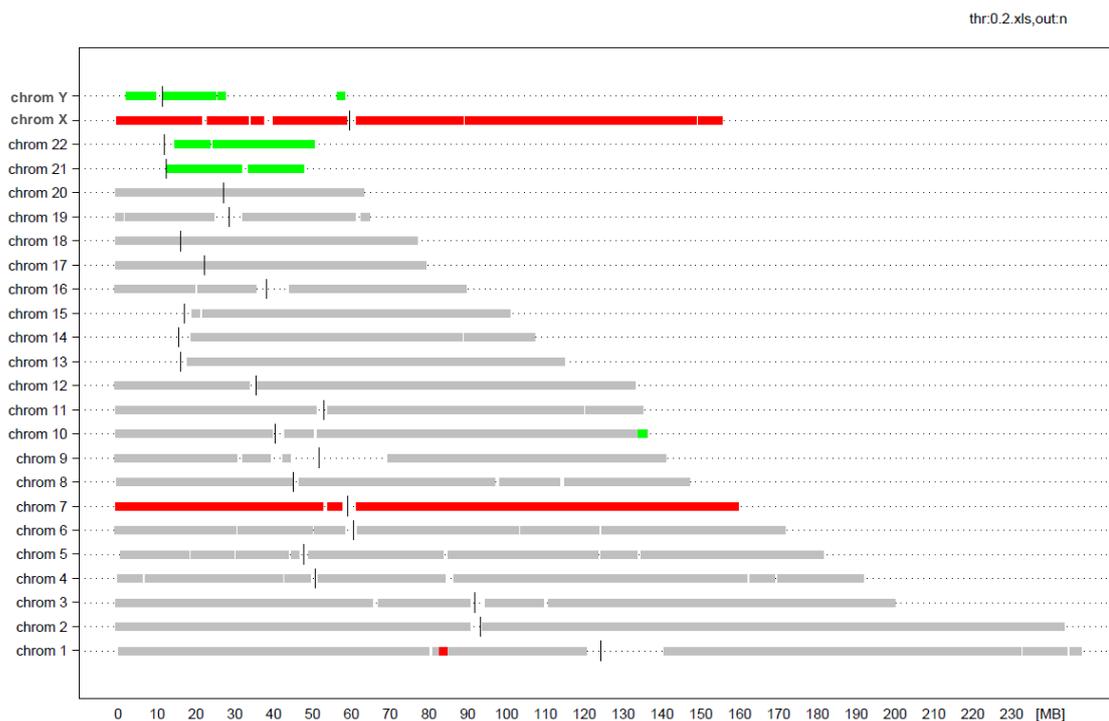


Abb. 3.3: Genomisches Profil (#D144)

BAC/PAC array-CGH Auswertung in Form eines *GLAD states plot*, bei dem der Kopienzahlstatus der Chromosomen 1 bis 22, X und Y in horizontaler Orientierung dargestellt ist. Auf der X-Achse sind die chromosomalen Positionen von 0 bis 230 Mb angegeben. Rote Balken = Verluste, grüne Balken = Zugewinne, graue Balken = diploider Kopienzahlstatus (2n). Abkürzungen: chrom, Chromosom

Beim Vergleich der \log_2 ratios (244K) für das Chromosom 7 und der Anzahl der Metaphasen mit Monosomie 7 bei MDS und JMML ergaben sich deutliche Unterschiede. So lagen z.B. bei den JMML Patienten #D541, #D581 und #D612 die Mittelwerte der \log_2 ratios für das Chromosom 7 bei -0,42 und -0,46, was auf einen heterozygoten Verlust in etwa 50% der Zellen hindeutet. Für die anderen JMML Patienten (#D402, #D521, #D566, #D600 und #D614) ergaben sich durchschnittliche \log_2 ratios zwischen -0,71 und -0,81, die mit einer heterozygoten Deletion in >70% der Zellen korrelieren (Abb. 3.4 A). Die entsprechenden klonalen Anteile der Monosomie 7 auf Metaphasenebene betrugen 73% bis 100% für alle Patienten. Eine vergleichbare Gruppierung konnte auch für die MDS Patienten erstellt werden (Abb. 3.4 B).

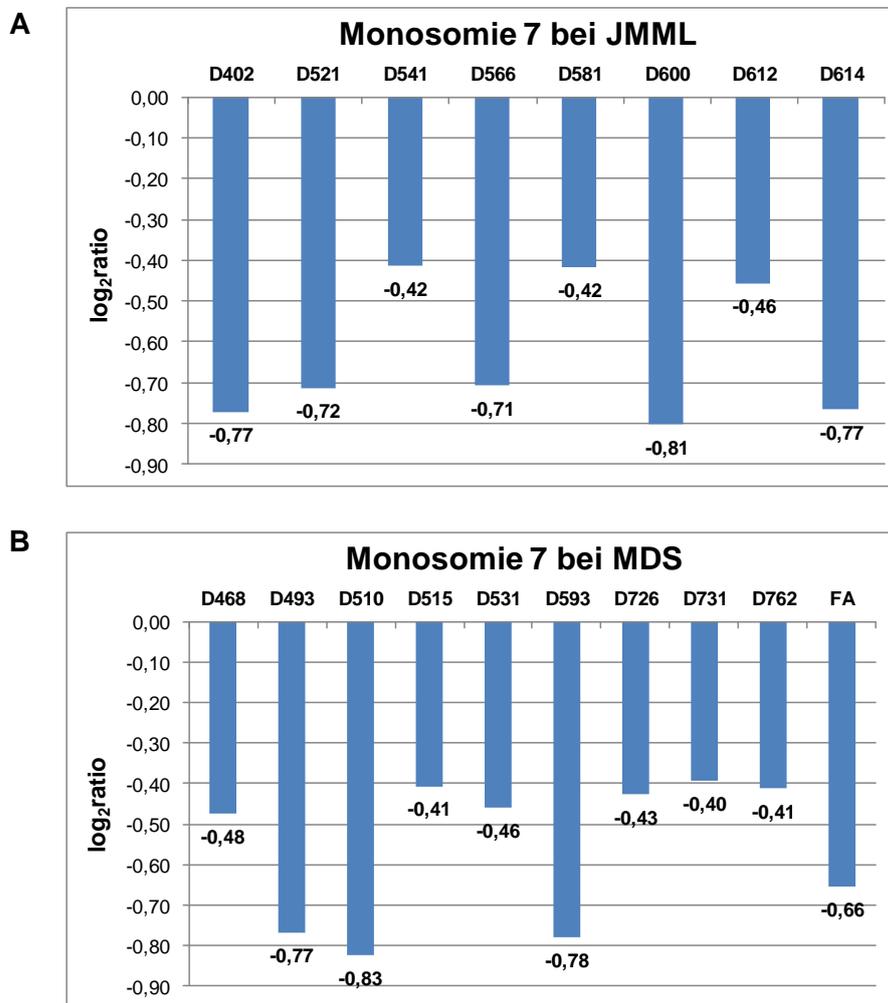


Abb. 3.4: Vergleich der \log_2 ratios für das Chromosom 7

(A und B) Die durchschnittlichen \log_2 ratios für das Chromosom 7 sind je Patient angegeben. Die JMML Patienten sind entsprechend ihrer D-Nummer aufsteigend von links nach rechts geordnet. (A) Auswertung der array-CGH \log_2 ratios bei JMML. (B) Auswertung der array-CGH \log_2 ratios bei MDS.

3.1.3 Detektion von interstitiellen Alterationen von ≥ 5 Mb

Ein Beispiel für die Detektion von Kopienzahlveränderungen genomischen Materials ist anhand des Verlustes auf Chromosom 12p in Abb. 3.5 A-D dargestellt. Diese Deletion wurde bei #D731 bei der zytogenetischen Analyse in 12 von 15 untersuchten Metaphasenchromosomen identifiziert und konnte mithilfe der hochaufgelösten Oligonukleotid array-CGH auf einen Bereich von 9,626536 Mb bis 31,163091 Mb eingegrenzt werden. Die Bruchpunkte konnten in diesem Fall innerhalb bekannter variabler Bereiche (CNV_3874 und CNV_6982, Hs_hg18_CNV_20080404) eingegrenzt werden. Diese Deletion wird von 1825 Oligonukleotid-Sonden abgedeckt und hat eine Größe von 21,537 Mb. Mit einem durchschnittlichen \log_2 ratio von -0,3878 konnte zudem bestätigt werden, dass dieser Verlust in 12p13.31-p11.21 wie auch die Monosomie 7 mit einem durchschnittlichen \log_2 ratio von -0,39317 im gleichen malignen Klon vorkommen und demnach somatische Veränderungen darstellen (vgl. Ergebnisse der Karyotypisierung, Tab. 3.1). Telomerwärts dieser Deletion konnte zudem ein Zugewinn von 380 kb in 12p13.31 über 46 Oligonukleotid-Sonden mit einem durchschnittlichen \log_2 ratio von 0,68955 detektiert werden. Für #D468 wurde ebenfalls ein Verlust in 12p11-p12 über konventionelle Karyotypisierung identifiziert. Diese Deletion konnte jedoch nicht mit array-CGH bestätigt werden, da sie nur in 3 von 20 untersuchten Metaphasen und 16% der Interphase-Kerne detektiert wurde (Abb. 3.5 E, F). Damit liegt der Anteil aberranter Zellen in der Gesamtpopulation unterhalb der Nachweisgrenze für die molekulare Karyotypisierung.

Weitere Deletionen bis zu einer minimalen Größe von 5 Mb wurden bei Patienten mit kindlichem MDS mittels array-CGH Analysen identifiziert (Tab. 3.1): ein Verlust von 23,491 Mb in 3p14.3-p12.3 (#D380), innerhalb dieser Region ist das Tumorsuppressorgen *FHIT* (*fragile histidine triad*, NG_007551.1) lokalisiert. Ein Verlust von 46,364 Mb in 6q15-q23.3 bei #D226, die exakten Bruchpunkte konnten bei 91,251 Mb (*MAP3K7*) und bei 137,615 Mb (*IL22RA2*) lokalisiert werden. Eine Deletion in 9q33.3-q34.3 (12,459 Mb) und der Verlust des Chromosoms 19 wurde bei #D184 nachgewiesen. Außerdem wurden Verluste des kurzen Arms des Chromosoms 17 bei zwei Patienten (#D184 und #D267) detektiert (Abb. 3.6). Das Tumorsuppressorgen *TP53* (*tumor protein p53*, NG_017013.1) ist in der deletierten Region lokalisiert.

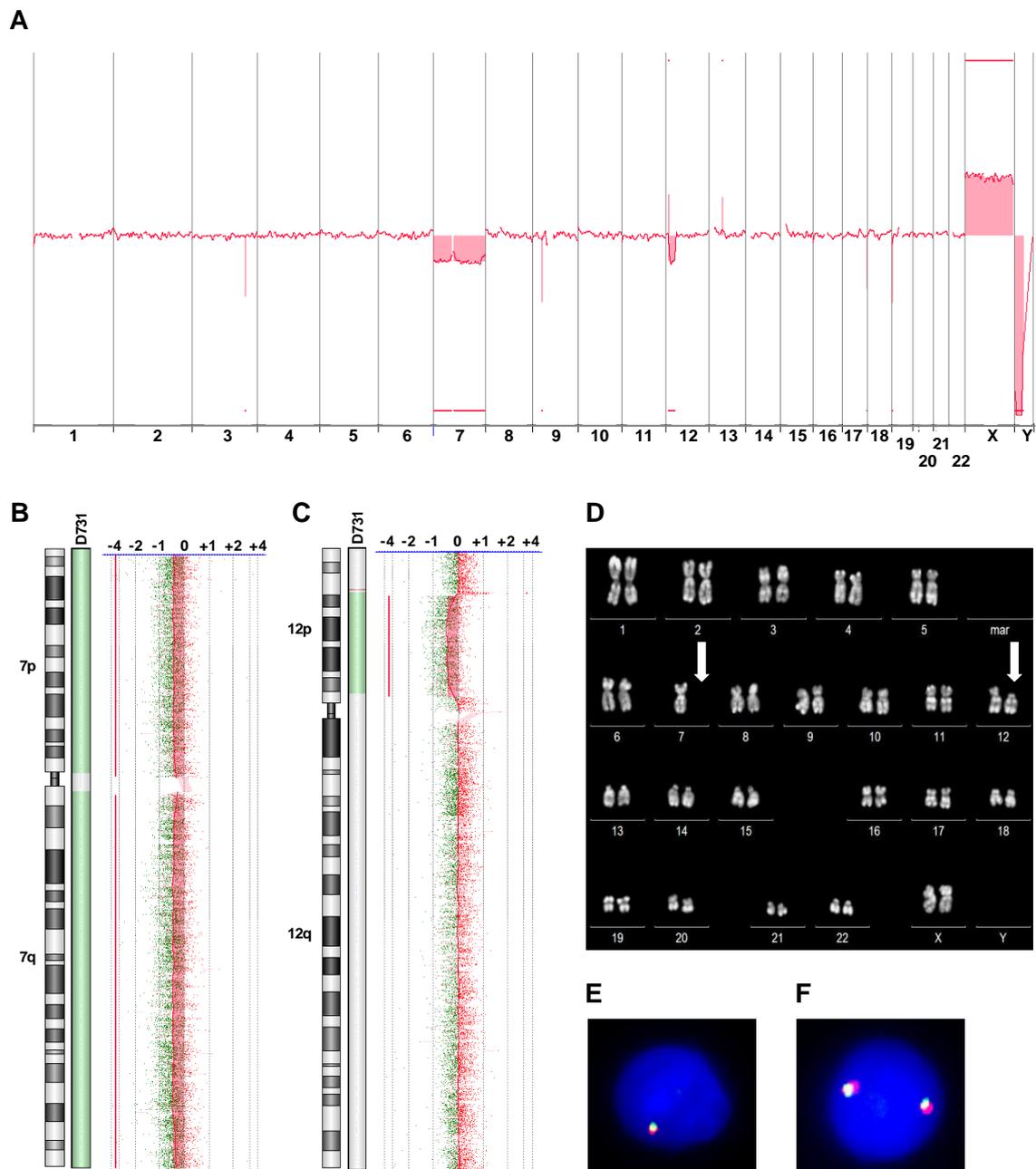


Abb. 3.5: Chromosomale Veränderungen (#D731)

(A) 244k array-CGH Analyse: In horizontalen Richtung sind die Chromosomen von 1 bis 22, X und Y dargestellt. Farbige Flächen unterhalb der Basislinie zeigen Deletionen (Chr. 7), wohingegen farbige Flächen oberhalb der Basislinie als Zugewinn ausgewertet werden (Chr. X). (B) Das Ideogramm des Chromosoms 7 ist in vertikaler Richtung links dargestellt. Die Monosomie 7 wird durch die farbige unterlegte Fläche angezeigt. (C) Das Ideogramm des Chromosoms 12 ist in vertikaler Richtung links dargestellt. Die interstitielle Deletion 12 wird durch die farbige unterlegte Fläche angezeigt. (D) Karyogramm. Monosomie 7 und del(12p) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. (E und F) FISH an Interphase-Kernen bei #D468 mit der Sonde TEL (12p13) mit heterozygoter Deletion (E) und einer normalen Signalkonstellation (F).

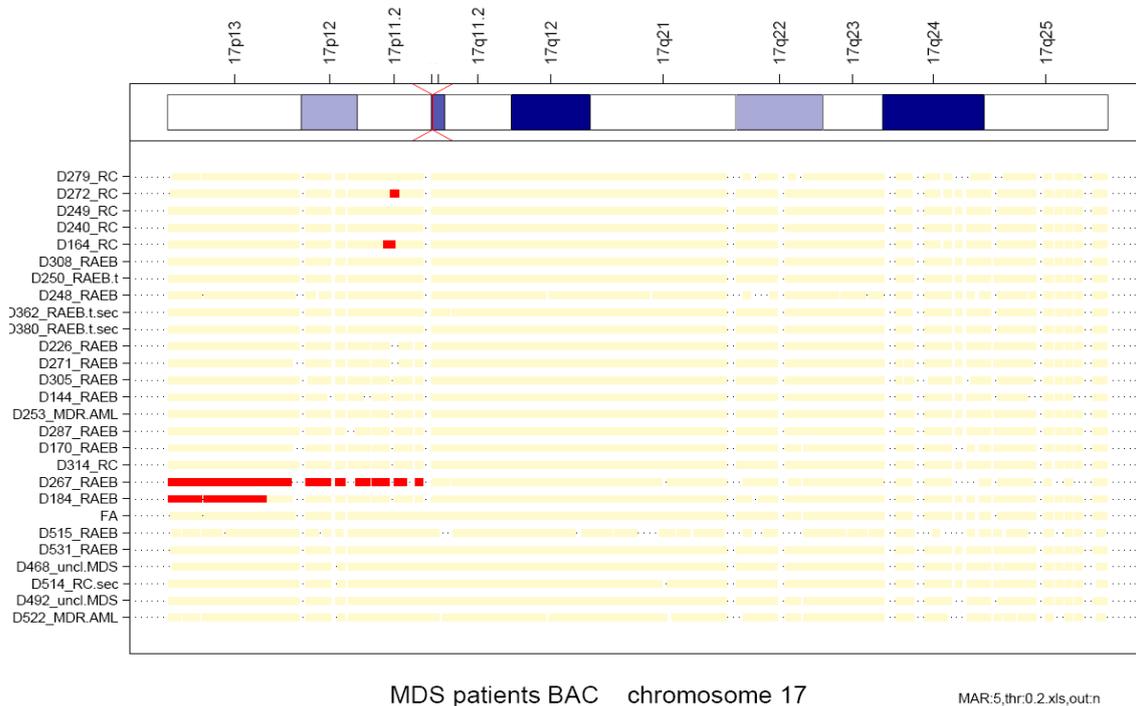


Abb. 3.6: Multiples Alignment des Chromosoms 17 der MDS Patienten

Unterhalb des Ideogramms von Chromosom 17 sind die normalisierten Kopienzahlen von pter nach qter entsprechend der BAC/PAC array-CGH Analyse dargestellt. Auf der linken Seite sind die D-Nummern der Patienten und die jeweiligen Diagnose angegeben. Gelbe Balken bedeuten eine Kopienzahl von 2n, rote Balken bzw. Punkte stellen den Verlust chromosomalen Materials dar.

In der Gruppe der JMML Patienten wurde übereinstimmend auf der BAC/PAC und Oligonukleotid array-CGH Plattform für #D600 ein Zugewinn von 11,1492 Mb (36,673794 Mb bis 47,822993 Mb) innerhalb der Zentromerregion des Chromosoms 8 (8p12-q11.1) detektiert (Abb. 8.1 A-D, Anhang). Über die konventionelle Karyotypisierung wurde ein zusätzliches Markerchromosom unbekanntes Ursprungs identifiziert. Die FISH Analyse mit einer Zentromer 8-spezifischen Sonde (CEP8, Abbott) zeigte in 49% der Interphasen-Kerne drei Signale in Übereinstimmung mit den array-CGH Ergebnissen. Da im Rahmen dieser Arbeit keine DNA aus CD3-positiven Zellen (T-Zellen) oder aus Hautzellen von #D600 zur Überprüfung der Keimbahnveränderungen verfügbar war, konnte der Zugewinn des Zentromers 8 nicht eindeutig als somatische Veränderung geklärt werden. In weiterführenden FISH Analysen an Mundschleimhautzellen konnten Ripperger *et al.* in dem oben beschriebenen und einem weiteren Fall zeigen, dass bei diesen Patienten jeweils eine konstitutionelle Mosaik-Trisomie 8 vorlag (Ripperger *et al.*, 2011).

Bei #D521 konnten für den Zugewinn in 3q28 mittels array-CGH die chromosomalen Bruchpunkte von 166,346088 Mb und 190,832166 Mb angegeben werden (Abb. 8.2 A, Anhang). Zusätzlich wurde bei diesem Patienten ein Zugewinn in 9p24.3-p21.1 detektiert. Bei der anschließenden Überprüfung dieser Aberration mithilfe der FISH-Sonde LSI p16 (9p21) auf Metaphasenebene zeigte sich, dass das zusätzliche Material von 9p nach 2q transloziert war (Abb. 8.2 D, Anhang). Ein kleiner Zugewinn in 2q35 mit einer Größe von 806 kb (151 Oligonukleotid-Sonden) weist möglicherweise auf die genaue Bindungsstelle des zusätzlichen Materials und damit auf eine unbalancierte Translokation der(2)t(2;9) hin (Abb. 8.2 B-C, Anhang).

3.1.4 Detektion genomischer Alterationen unterhalb der Nachweisgrenze der Metaphasenanalytik (≤ 5 Mb)

Mithilfe der Oligonukleotid array-CGH wurde für #D531 der Verlust einer 5,767 Mb großen Region auf dem langen Arm des Chromosoms 6 identifiziert. Die exakte Lokalisation der genomischen Bruchpunkte in 6q23.2-q24.1 konnte von 134,091617 Mb bis 139,859042 Mb angegeben werden, wobei diese Deletion durch insgesamt 495 Oligonukleotid-Sonden abgedeckt wird. Das *MYB* Gen (*v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog*, NG_012330.1) ist in dieser Region auf Chromosom 6 lokalisiert. Während die Monosomie 7 in allen untersuchten Metaphasen identifiziert wurde und sich mittels array-CGH ein durchschnittlicher \log_2 ratio von -0,46220 für das Chromosom 7 ergab, wurde der Verlust in 5q für einen geringeren Anteil der Metaphasen (16 von 20) ermittelt. Anhand der vergleichbaren \log_2 ratio Werte für den Verlust in 5q (-0,37190) und für die neu identifizierte Deletion in 6q (-0,34172) wurde deutlich, dass beide Läsionen weniger präsent waren als die Monosomie 7. Über eine simultane Hybridisierung von FISH-Sonden zur Überprüfung der Deletionen in 5q (ERG1, Abbott) und 6q (MYB, Abbott) konnte gezeigt werden, dass beide Aberrationen im gleichen malignen Klon mit einer Häufigkeit von 34 % der fixierten Zellen vorkommen (Abb. 3.7 D).

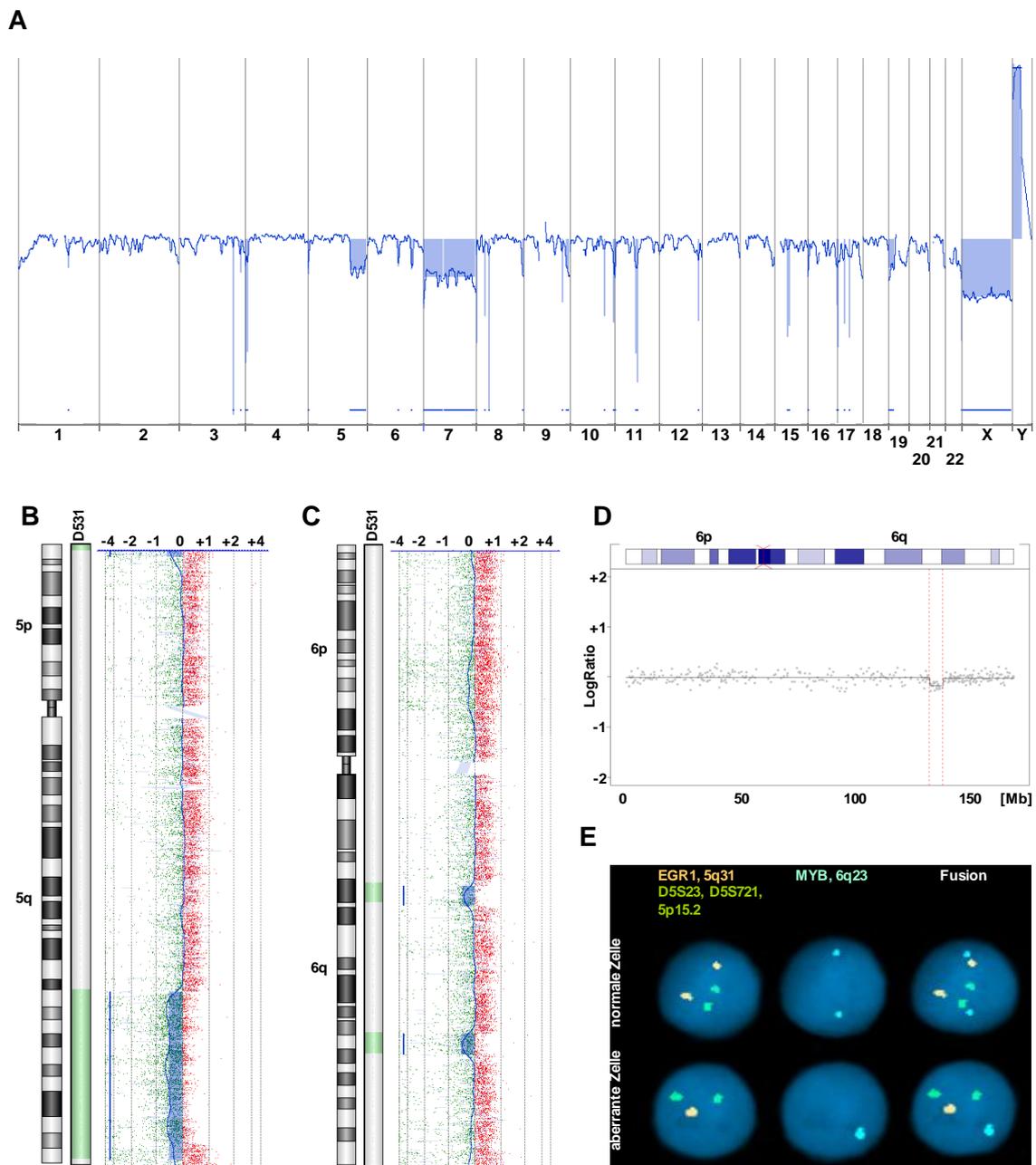


Abb. 3.7: Chromosomale Veränderungen (#D531)

(A) 244K array-CGH Analyse: In horizontal Richtung sind die Chromosomen von 1 bis 22, X und Y dargestellt. Farbige Flächen unterhalb der Basislinie zeigen Deletionen (Chr. 7, Chr. X), wohingegen farbige Flächen oberhalb der Basislinie als Zugewinn ausgewertet werden (Chr. Y). (B) Das Ideogramm des Chromosoms 5 ist in vertikaler Richtung links dargestellt. Die Deletion in 5q31.1-q35.2 wird durch die farbig unterlegte Fläche angezeigt. (C) Zwei Deletionen in 6q16.1 und in 6q23.2-q24.1 werden durch die farbig unterlegten Flächen angezeigt. (D) Die Deletion in 6q23.2-q24.1 wird auf der BAC/PAC Array Plattform mit einem leicht abweichenden Kopienzahlstatus innerhalb der gestrichelten, roten Linien angezeigt. (E) FISH Analysen mit einer Kombination von Sonden zur simultanen Überprüfung beider Deletionen. In der oberen Reihe sind normale Zellen und in der unteren Reihe die Interphasen des Patienten dargestellt. Die Kerne links zeigen die Ergebnisse für die lokusspezifische Sonde ERG1 (5q31) in orange und der Kontrollsonde D5S23 (5p15) in grün; in der mittleren Reihe ist die Hybridisierung der lokusspezifische Sonde ERG1 (6q23) in aqua. Auf der rechten Seite sind die Ergebnisse der simultanen Hybridisierung gezeigt.

Bei #D566 mit Monosomie 7 und bekannter Deletion des *NF1* Genortes (NG_009018.1) in 17q11.2 wurde dieser Verlust durch negative Werte zweier aufeinanderfolgender Klone (RP11-229K15 und RP11-142O6) des 8k BAC/PAC CGH Arrays identifiziert. Die höher aufgelöste Oligonukleotid array-CGH Plattform (244K) ermöglichte die genauere Angabe der chromosomalen Bruchpunkte von 26,023760 Mb bis 27,386090 Mb. Die FISH Analyse mit genortspezifischen BAC-Sonden (RP11-45H13 und RP11-142O6) und einer Kontrollsonde für die perizentromerische Region des Chromosoms 17 (RP11-285M22) bestätigte den Verlust von *NF1* in 98% der Interphasen-Kerne (Abb. 3.8).

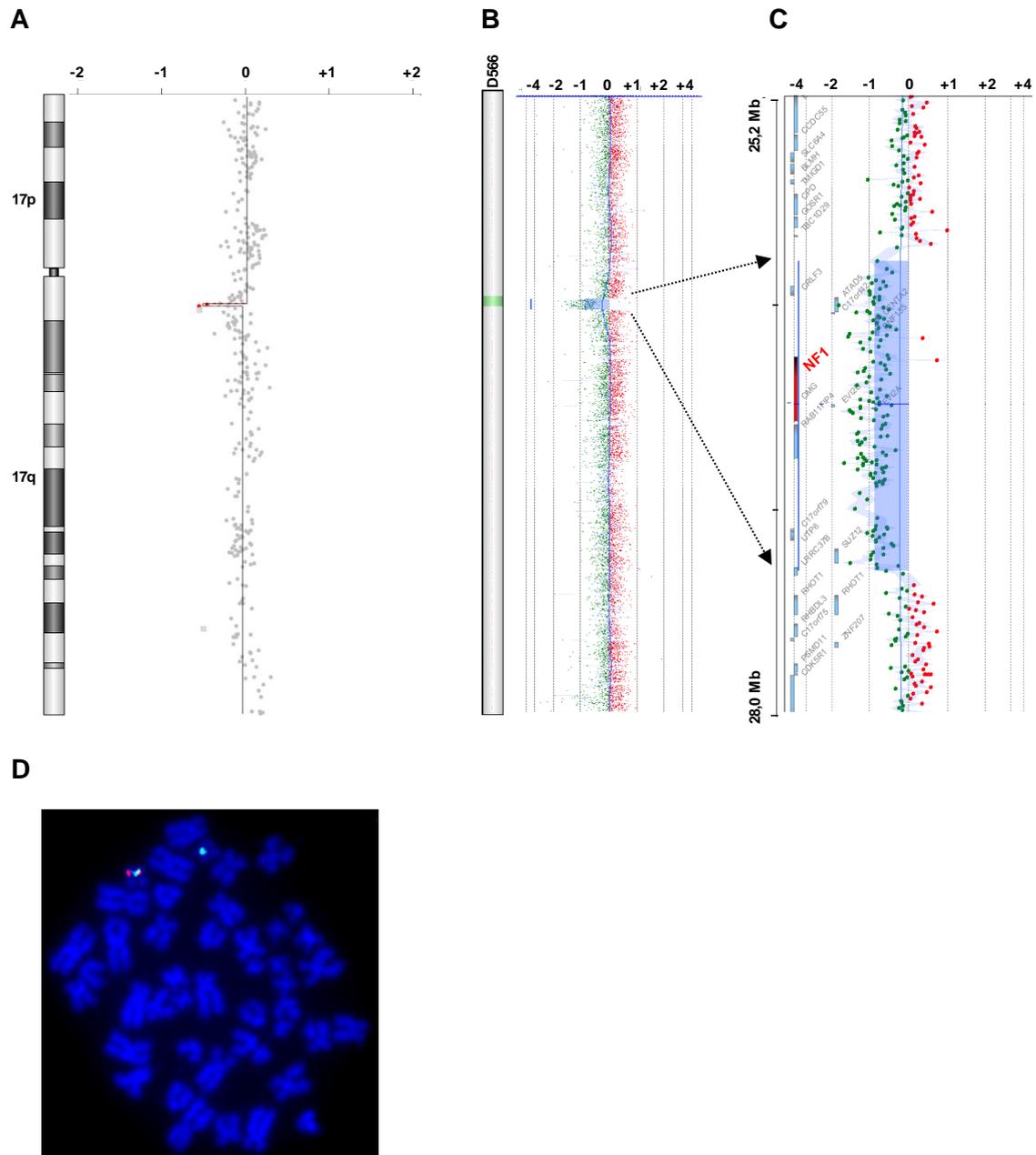


Abb. 3.8: *NF1*-Deletion (#D566)

(A, B und C) Das Ideogramm des Chromosoms 17 ist in vertikaler Richtung links dargestellt. Die *NF1*-Deletion in 17q11.2 wurde als Deletion mittels BAC/PAC array-CGH (A) und Oligonukleotid array-CGH (B) bestätigt werden. (C) Im Detail ist der Verlust in 17q11.2 (Bildausschnitt: 25294969-28006418, 2,71 Mb) angegeben, die farbig unterlegte Fläche zeigt die Deletion an. (D) FISH Analyse an Metaphasenchromosomen. Mithilfe einer genortspezifischen Sonde (RP11-142O6, rot) und einer Sonde für die perizentromerische Region des Chromosoms 17 (RP11-285M22, grün) konnte der Verlust in *NF1* (ein rotes Signal, zwei grüne Kontrollsignale) gezeigt werden.

3.1.5 Detektion von Kopienzahl-Polymorphismen

Neben krankheits-assoziierten Kopienzahlveränderungen werden mittels hochauflösender array-CGH auch polymorphe, genomische Regionen (engl. *copy number variations*, CNVs) ohne Krankheitsrelevanz detektiert. Die CNVs sind in der Datenbank „Database of Genomic Variants“ (DGV, <http://projects.tcag.ca/variation/>) basierend auf einer Vielzahl genomischer Studien der Normalbevölkerung unterschiedlicher Abstammung zusammengefasst. Diese zumeist konstitutionellen Veränderungen, wie z.B. CNVs in 3q26.1, 4q13.2 (*UGT2B17*), 6p21.32 (*HLA-DRB5*), 7p14.1 (*TARP*) oder 22q11.23 (*GSTT1*) konnten bei einem Großteil der untersuchten Patienten nachgewiesen werden (Tab. 3.3). Homozygote Deletionen wurden mit einem durchschnittlichen \log_2 ratio von $\leq -2,0$ detektiert, wobei heterozygote CNVs durch \log_2 ratios von $\pm 1,0$ und entsprechend hoher p-Werte charakterisiert wurden. Aufgrund der kleinen Patientenkohorte konnte die Relevanz der jeweiligen CNVs als prädisponierender Faktor oder auch krankheitsrelevanter Veränderung für die Patienten nicht abschließend geklärt werden.

In der Tabelle 3.3 sind die am häufigsten auftretenden CNVs in der Patientenkohorte mit den jeweiligen \log_2 ratios angegeben. Für #D762 wurden sowohl die mononukleären Zellen wie auch die Granulozyten des Knochenmarks untersucht, die homozygote Deletion des *UGT2B17* Genortes wurde aber ausschließlich in der Granulozytenfraktion identifiziert. Im Fall eines sog. *GSTT1* (*Glutathione S-transferase theta 1*) Null-Genotyps resultiert die homozygote Deletion für die Patienten in einem Totalverlust des kodierten Enzyms.

Tab. 3.3: CNVs bei MDS und JMML Patienten

Gen, Lokalisation	Start (Mb)- Stopp (Mb)	Variations- nummer	Patienten-ID (Diagnose)	log2ratio (244K)	Referenz (DGV)	
- 3q26.1	163997028- 164101976	CNV_38965	D341 (JMML)	-0,955728	Wheeler et al. (2008)	
			D468 (unkl. MDS)	-0,872569		
			D529 (RC)	-0,8592		
			D531 (RAEB)	-4,077785		
			D566 (JMML)	-0,879296		
			D614 (JMML)	-0,774237		
			D621 (RC)	-0,907448		
			D680 (RC)	-0,908026		
			D731 (RAEB)	-0,961271		
<i>UGT2B17</i> , 4q13.2	69069363- 69166014	CNV_23279	D468 (unkl. MDS)	0,686971	Levy et al. (2007)	
			D493 (RAEB)	0,546975		
			D515 (RAEB)	0,407901		
			D529 (RC)	0,648569		
			D581 (JMML)	0,65689		
			D593 (MDR-AML)	0,865528		
			D600 (JMML)	0,721119		
			D614 (JMML)	0,71839		
			D621 (RC)	0,597705		
			D726 (RAEB)	0,818853		
			D762 (RAEB,G)	-3,857544		
<i>HLA-DRB5</i> , 6p21.32	32585931- 32601162	CNV_59326, CNV_57323	D510 (RAEB-T)	1,5309	Ahn et al. (2009), Mills et al. (2006)	
			D593 (MDR-AML)	1,825883		
			D637 (RC)	2,435323		
			D680 (RC)	2,915769		
	32595202- 32630048	CNV_57327	FA, sek. MDS	D510 (RAEB-T)	1,587335	
				D402 (JMML)	-0,366552	Ahn et al. (2009)
				D581 (JMML)	0,621549	
				D731 (RAEB)	-2,374766	
				D762 (RAEB)	1,016153	
				D762 (RAEB)	1,016153	
<i>TARP</i> , 7 p14.1	38262501- 38313100	CNV_57600	D468 (unkl. MDS)	-1,050156	Ahn et al. (2009)	
			D541 (JMML)	-1,426973		
			D612 (JMML)	-1,038946		
			D621 (RC)	-1,049315		
			D637 (RC)	-1,459094		
			D680 (RC)	-1,530599		
			D726 (RAEB)	-1,127986		
			D731 (RAEB)	-1,125516		
<i>GSTT1</i> , 22q11.23	22705966- 22725505	CNV_23327	D468 (unkl. MDS)	-3,12196	Levy et al. (2007)	
			D468 (unkl. MDS)	-2,815256		
			D515 (RAEB)	0,949306		
			D522 (MDR-AML)	-3,011602		
			D529 (RC)	-0,339753		
			D531 (RAEB)	-2,666534		
			D581 (JMML)	-1,954773		
			D614 (JMML)	-3,248877		
			D637 (RC)	-2,893582		
			D680 (RC)	-2,95207		
			D680 (RC)	-2,95207		
			FA, sek. MDS	-2,141765		

Abkürzungen: DGV, Database of Genomic Variants. Stand DGV: April 2008 (variation.hg18.v4); G, Granulozyten. Array-CGH Auswertungen mit Standardeinstellungen (Kapitel 3.1.1).

3.1.6 Überprüfung submikroskopischer CNAs mithilfe eines Anwender-designten Oligonukleotid CGH Arrays (eArray)

Zur Identifikation submikroskopischer Kopienzahlveränderungen auf Basis einzelner Gene wurden die hochauflösenden 244K Oligonukleotid CGH Arrays mit wenig stringenten Filterkriterien (\log_2 ratio aberranter Sonden: 0,3 und minimale Anzahl aberranter Sonden: 3) ausgewertet. Die Anzahl der detektierbaren CNAs stieg stark an (Daten nicht gezeigt). Die Überprüfung der einzelnen CNAs in potentiell krankheitsrelevanten Genorten wurde mithilfe eines Anwender-designter eArray MDS-1 durchgeführt, auf dem 36 Regionen hochaufgelöst mit 3 Oligonukleotid-Sonden pro 1000 bp dargestellt wurden (Tab. 8.2, Anhang). Die Auswertung der eArray-Daten bei 5 MDS Patienten (#D522, #D529, #D585, #D621 und #D637) ergab bis auf die bekannten CNVs keine Übereinstimmungen. Die mittels 244K CGH Array identifizierte, potentielle Deletion des *NRAS* Genortes (1p13.2) konnte u.a. bei #D637 mithilfe des hochaufgelösten eArrays nicht bestätigt werden (Abb. 3.9 A). Dagegen wurde der CNV in 22q11.23 (*GSTT1*) zuverlässig auf beiden Plattformen nachgewiesen (Abb. 3.9 B).

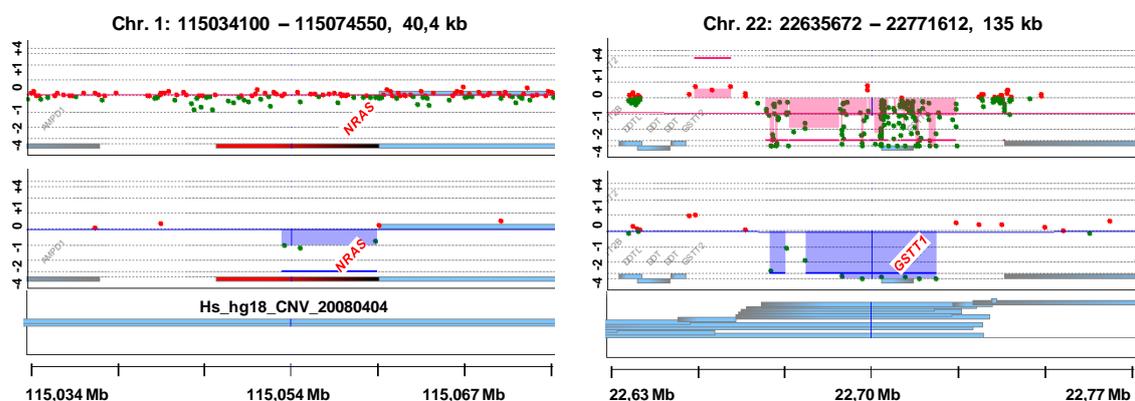


Abb. 3.9: Vergleich der eArray- und der 244K Arrays-Ergebnisse (#D637)

Profil der Kopienzahlen für die Gene *NRAS* (1p13.2) und *GSTT1* (22q11.23). Der eArray deckt den *NRAS* Genort mit 34 Sonden ab (oben links), im Vergleich zu 3 Sonden auf dem 244K Array (Mitte links). Der *GSTT1* Genort wird auf der eArray Plattform mit 126 Sonden abgedeckt (oben rechts), im Vergleich zu 9 Sonden auf dem 244K Array (Mitte rechts). In der unteren Reihe sind die bekannten CNVs für diese Gene basierend auf den Einträgen in der DGV zusammengefasst (Hs_hg18_CNV_20080404). Jeder blaue Balken repräsentiert einen CNV-Eintrag in der Datenbank.

3.2 Überprüfung der Kopienzahlveränderungen mittels quantitativer real-time PCR auf DNA-Ebene

3.2.1 Detektion numerischer Chromosomenanomalien und Vergleich mit den Daten der Karyotypisierung und FISH Analysen

Eine Möglichkeit der Überprüfung von Kopienzahlveränderungen der array-CGH Analysen auf DNA-Ebene bietet die Anwendung der real-time quantitativen PCR (qPCR). Da eine Verifizierung detektierter CNAs über FISH von der Größe der verwendeten Sonden (BACs oder Fosmide) sowie vom Auflösungsvermögen der Mikroskopie abhängig ist, können mithilfe der qPCR-Fragmente Aberrationen auf Basis einzelner Gene überprüft werden. Zunächst wurde ein Referenzlokus gewählt, der bei allen Patienten als diploid (2n) auf der Oligonukleotid CGH Plattform identifiziert wurde. Dieser Referenzlokus ist im Gen *GPR15* (3q21.1) innerhalb des Exons 1 lokalisiert. Für die Überprüfung von CNAs bei MDS und JMML Patienten auf DNA-Ebene wurde je nach Lokus eine unterschiedliche Anzahl von Genabschnitten mittels qPCR untersucht.

Um eine schnelle und zuverlässige Screening-Methode zur Überprüfung der Monosomie 7 zu erstellen und einen Vergleich zu weiteren potentiellen CNAs ziehen zu können, wurde ein Fragment im *CFTR* Lokus (7q31) für Patienten mit Monosomie 7 überprüft. Der Abgleich mit Daten aus der Karyotypisierung und den FISH Untersuchungen erfolgte für jeden Patienten soweit entsprechendes Material verfügbar war.

Die Daten der qPCR Analyse des *CFTR* Genortes für die untersuchten MDS Patienten waren zu den jeweiligen array-CGH Ergebnissen vergleichbar. Des Weiteren zeigte sich eine gute Übereinstimmung zwischen qPCR Werten und dem prozentualen Anteil Monosomie 7 tragender Zellen aus FISH Analysen (Abb. 3.10). Für #D762 konnte übereinstimmend zu den Ergebnissen der array-CGH Analyse gezeigt werden, dass das Auftreten der Monosomie 7 deutlicher in der Granulozytenfraktion detektiert werden konnte als für die mononukleäre Zellfraktion des Knochenmarks. In den Fällen, bei denen nur eine geringe Anzahl aberranter Klone im Untersuchungsgut vorhanden war (z.B. #D621 mit 15% nuc ish cen7 (CEP7x1)), waren die $\Delta\Delta c_T$ -Werte für *CFTR* in 7q31 (#D621 mit 0,81) auch nur geringfügig abweichend von der diploiden Kontrolle (1,00). Bei den Patienten mit einem hohen Prozentsatz an aberranten Klonen in der FISH Analyse (84% bis 88%) betragen die korrespondierenden $\Delta\Delta c_T$ -Werte für *CFTR* zwischen 0,43 und 0,53.

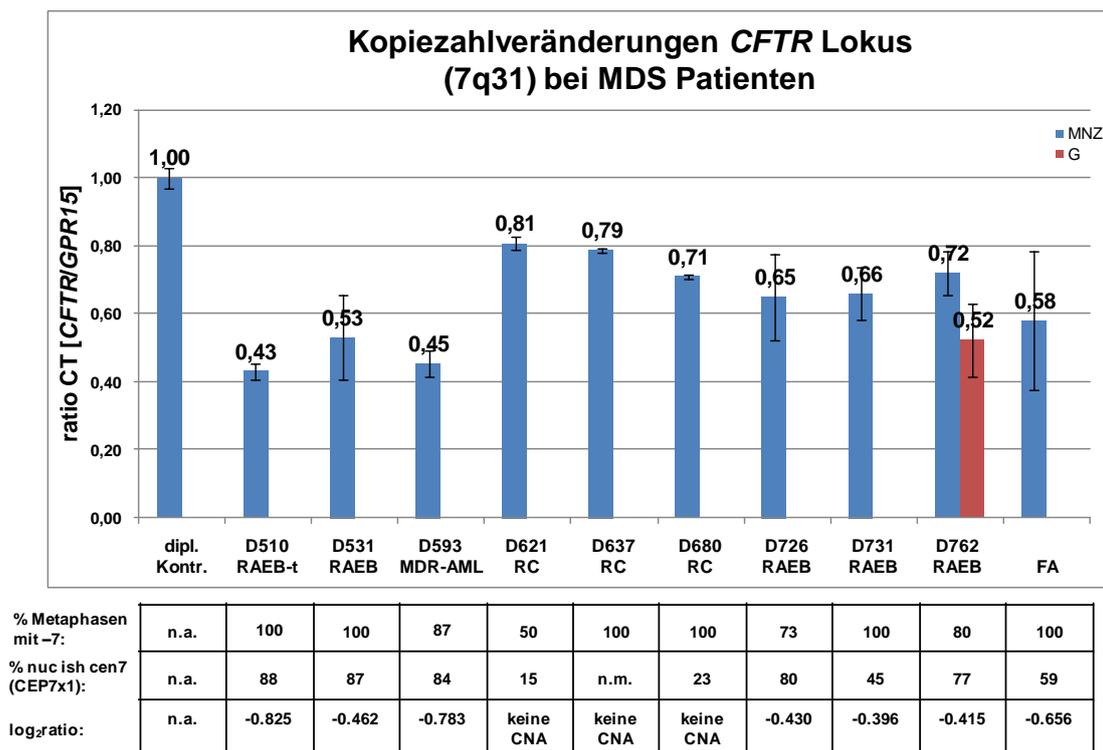


Abb. 3.10: Vergleich des Kopienzahlstatus von Chromosom 7 auf Basis von qPCR Daten, Karyotypisierung, FISH und array-CGH

Im Diagramm wird der Kopienzahlstatus im *CFTR* Genort normalisiert zum Referenzgen *GPR15* für 10 Patienten angegeben. Die blauen Balken zeigen die qPCR Ergebnisse für mononukleäre Zellen (MNZ) der Patienten, der rote Balken steht für die Analyse unter Verwendung von Granulozyten (G). In der Tabelle unten sind die korrespondierenden Ergebnisse der Karyotypisierung, FISH Untersuchungen und die durchschnittlichen log₂ratios (berechnet über die log₂ratios aller Sonden des Chromosoms 7) der array-CGH angegeben.

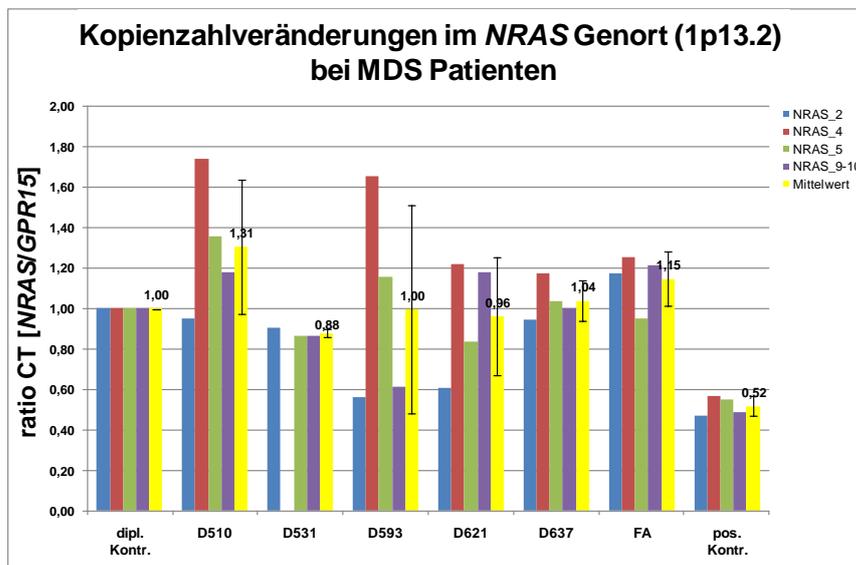
3.2.2 Überprüfung kleiner CNAs der array-CGH Analysen

Zur Validierung kleiner CNAs wurden neben dem e-Array (Kapitel 3.1.6) ausgewählte Genorte (*NRAS*, *NF1*, *HOXA*) zusätzlich mittels qPCR Assays überprüft. Dabei wurden je Genort mindestens drei Genabschnitte analysiert. Wie in Abb. 3.11 A dargestellt, wurde die zunächst auf der Oligonukleotid-Plattform (244K) detektierte Kopienzahlveränderung im *NRAS* Genort für die untersuchten MDS Patienten übereinstimmend mit den Ergebnissen des eArrays MDS-1 mittels qPCR nicht bestätigt. Die $\Delta\Delta c_T$ -Werte der einzelnen Amplikons im *NRAS* Genort für #D637 ergaben im Mittel einen Wert von $\Delta\Delta c_T = 1,04$ im Vergleich zur diploiden Kontrolle. Die geringe Standardabweichung für #D531, #D637 und FA, sowie auch bei der Positivkontrolle Granta519 mit einem heterozygoten Verlust in 1p und einem entsprechenden $\Delta\Delta c_T$ Mittelwert von 0,52 unterstreicht die Stabilität des qPCR Assays. Dagegen zeigen die $\Delta\Delta c_T$ -Werte der Amplikons bei #D510 und #D593 eine hohe Standardabweichung und sind aus diesem Grund nur eingeschränkt auswertbar.

Eine weitere fragliche, kleine Kopienzahlveränderung wurde bei zwei MDS Patienten mit geringer Anzahl Monosomie 7 tragender Zellen mittels 244K auf Chromosom 7p15.2 detektiert. Im betroffenen Bereich sind die *HOXA* Gene als Cluster organisiert, wobei ein Zugewinn für den *HOXA9-13* Genort bei #D522 und #D621 detektiert wurde. Die Überprüfung dieser CNAs erfolgte zum einen mittels eArray MDS-1 und zusätzlich über qPCR, wobei drei Genabschnitte innerhalb von *HOXA9*, *HOXA10* und *HOXA13* gewählt wurden. Insgesamt wurden 26 EWOG-MDS Patienten mithilfe dieses qPCR Assays untersucht und mit einer Positivkontrolle, der Zelllinie HBL-2 mit einem zusätzlichen Chromosom 7, verglichen (Abb. 3.11 B und Tab. 8.1, Anhang). Monosomie 7 konnte für 19 Patienten (#D144, #D147, #D152, #D170, #D171, #D265, #D287, #D320, #D420, #D427, #D516, #D534, #D548, #D587, #D593, #D633, #D650, #D676 und #D678) mittels qPCR eindeutig detektiert werden. Für drei Patienten (#D634, #D637 und #D726) schwankten die $\Delta\Delta c_T$ -Werte der einzelnen PCR-Amplikons im *HOXA* Genort sehr stark, so dass die Monosomie 7 auf diesem Wege nicht detektiert werden konnte. Der potentielle Zugewinn bei #D621 im Vergleich zur Positivkontrolle konnte aufgrund der hohen Standardabweichung nicht eindeutig bestätigt werden. Die Auswertung des Anwender-designten eArrays MDS-1 zeigte bei #D621 zudem keinen Zugewinn im hochaufgelösten Bereich des *HOXA* Clusters.

Die Deletion des *NF1* Genortes bei #D566 konnte neben der Bestätigung über eine regionspezifische FISH Analyse auch mithilfe eines qPCR Assays verifiziert werden (Abb. 3.12). Das Vorkommen der *NF1*-Deletion in 98% der Interphasen-Kerne ließ sich bei der qPCR Analyse als $\Delta\Delta c_T$ Mittelwert von 0,39 für die drei überprüften Genabschnitte berechnen. In den anderen untersuchten Fällen (#D521, #D541, #D581 und #D612) ergab sich keine Abweichung von der diploiden Kontrolle.

A



B

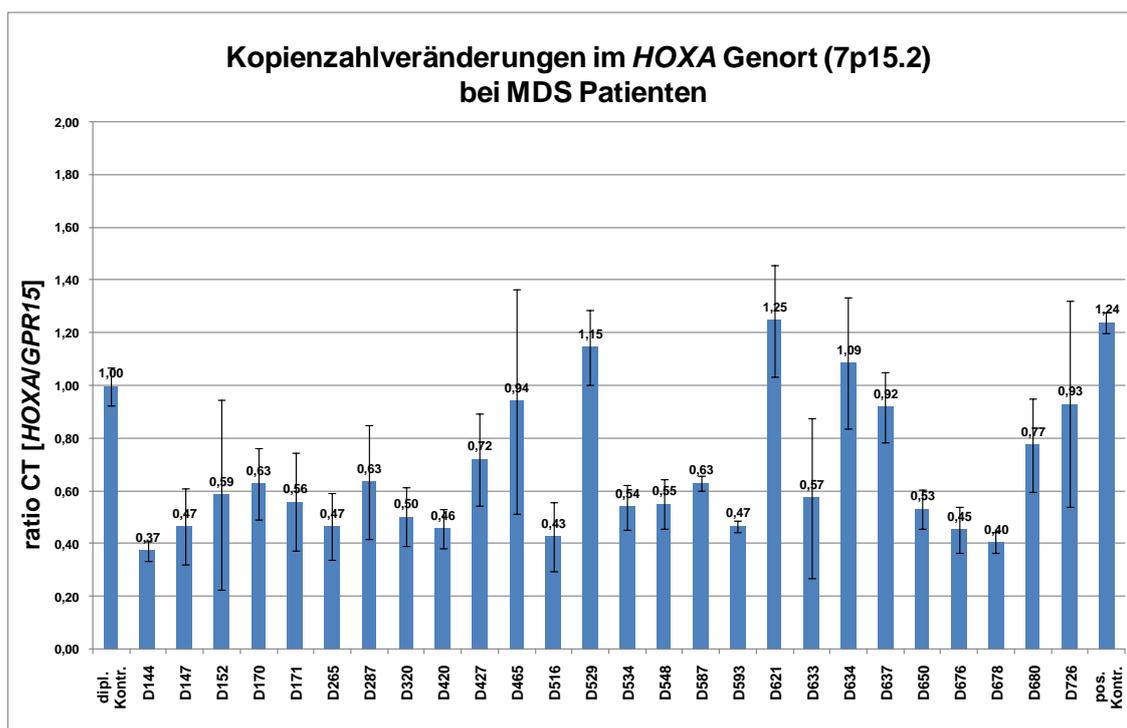


Abb. 3.11: Überprüfung des *NRAS* und *HOXA* Kopienzahlstatus bei MDS (qPCR)

(A) Im Diagramm wird der Kopienzahlstatus im *NRAS* Genort normalisiert zum Referenzgen *GPR15* für die diploid Kontrolle (dipl. Kontr.), 6 MDS Patienten und die positive Kontrolle (pos. Kontr., Granta519) mit einem heterozygoten Verlust in 1p angegeben. Die farbigen Balken stehen jeweils für unterschiedliche Amplikons im *NRAS* Genort, der gelbe Balken gibt den Mittelwert und die Standardabweichung je Probe an. (B) Die Mittelwerte und die jeweiligen Standardabweichungen von 3 Amplikons im *HOXA* Cluster werden für die diploid Kontrolle, 26 MDS Patienten und die Positivkontrolle (HBL-2) normalisiert zum Referenzgen *GPR15* dargestellt.

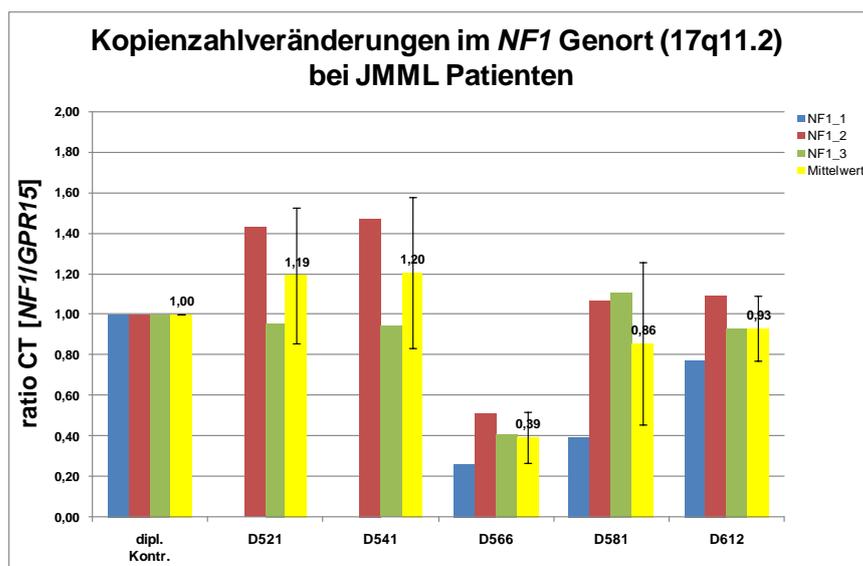


Abb. 3.12: *NF1* Deletion bei JMML (qPCR)

Im Diagramm wird der Kopienzahlstatus im *NF1* Genort normalisiert zum Referenzgen *GPR15* für die diploid Kontrolle (dipl. Kontr.) und 5 Patienten dargestellt. Die farbigen Balken stehen jeweils für unterschiedliche Amplikons im *NF1* Genort, der gelbe Balken gibt den Mittelwert und die Standardabweichung für jede Probe an.

3.3 Sequenzierung von Kandidatengen

Die Mutationsanalyse potentiell relevanter Kandidatengene (wie *NRAS* oder *MGMT*) erfolgte über die direkte Sequenzierung.

3.3.1 Sequenzanalyse von *NRAS* bei MDS und JMML

Es wurden alle kodierenden Exons sowie die nicht translatierte 3'UTR des *NRAS* Gens bei 8 MDS und 4 JMML Patienten sequenziert (Tab. 3.4). Innerhalb der untersuchten Patientenkohorte wurden keine aktivierenden Mutationen im *NRAS* Gen gefunden. In der 3'UTR wurde ein bekannter SNP (rs14804, c.872C>T, Heterozygotenfrequenz: 0,229 mit einer Standardabweichung von $\pm 0,249$) nachgewiesen. Dieser SNP lag in jedem Fall heterozygot vor, so dass der potentielle Verlust eines Allels, wie es laut array-CGH in zwei Fällen (#D402 und #D566) angedeutet wurde, nicht bestätigt werden konnte.

Tab. 3.4: NRAS Sequenzierung

Patienten-ID	Diagnose	3' UTR	244K array-CGH ^a
D402	JMML	rs14804 (heterozygot)	Deletion
D510	RAEB-T	-	Deletion
D531	RAEB	-	Deletion
D566	JMML	rs14804 (heterozygot)	Deletion
D581	JMML	rs14804 (heterozygot)	normal
D593	MDR-AML	-	Deletion
D612	JMML	-	Deletion
D621	RC	-	Deletion
D637	RC	-	Deletion
D680	RC	-	Deletion
D726	RAEB	-	normal
keine	FA, sek. MDS	rs14804 (heterozygot)	normal

^a Filtereinstellungen bei der Auswertung der Oligonukleotid array-CGH: \log_2 ratio aberranter Sonden: 0,3 und minimale Anzahl aberranter Sonden: 3; Abkürzungen: n.a., nicht analysiert; sek., sekundär

3.3.2 Sequenzanalyse von *MGMT* bei MDS und JMML

Der auf dem 8k BAC/PAC CGH Array doppelt gespottete Klon RP11-300B2 stellte sich in allen untersuchten Patienten als aberrant dar. Dieser Klon bildet die Region 10q26.3 mit dem 5'-UTR Bereich des Gens *MGMT* (*O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase*, ENSG00000170430) ab. Die telomerwärts lokalisierten BAC-Klone RP11-218C11 und RP11-109A6, die das Gen *MGMT* ebenfalls abdecken, zeigten einen normalen Kopienzahlstatus. Die Oligonukleotid-basierte CGH Analyse (#D468, #D515, #D522 und #D531) ergab keinen Hinweis auf den potentiellen Verlust im *MGMT* Gen. Trotzdem erfolgte die Sequenzierung der 4 kodierenden Exons bei 8 Patienten (Tab. 3.5).

Tab. 3.5: *MGMT* Sequenzierung, Exon 3

Patienten-ID	Diagnose	Ergebnis
D403	sek. RAEB	-
D468	unkl. MDS	-
D515	RAEB	rs1803965 (heterozygot) rs12917 (homozygot)
D531	RAEB	rs1803965 (homozygot) rs12917 (homozygot)
D541	JMML	-
D600	JMML	rs1803965 (heterozygot)
D612	JMML	-
keine	FA, sek. MDS	-

Abkürzungen: unkl., unklassifizierbar

Innerhalb des Exons 3 konnten zwei SNPs detektiert werden. Der SNP rs1803965 (c.252C>T, Heterozygotenfrequenz: 0,245) lag bei #D515 und #D600 (Abb. 3.13, links) heterozygot vor und bei #D531 wurde dieser SNP als homozygote Variation identifiziert. Zusätzlich wurde das homozygote Vorliegen des SNPs rs12917 (c.343C>T, p.L115F, minimale Allelfrequenz (MAF): 0,15) bei #D515 und #D531 (Abb. 3.13, rechts) detektiert. Aufgrund fehlenden Referenzmaterials von #D515 und #D531 konnte die Abklärung des somatischen Auftretens dieses SNPs nicht erfolgen.

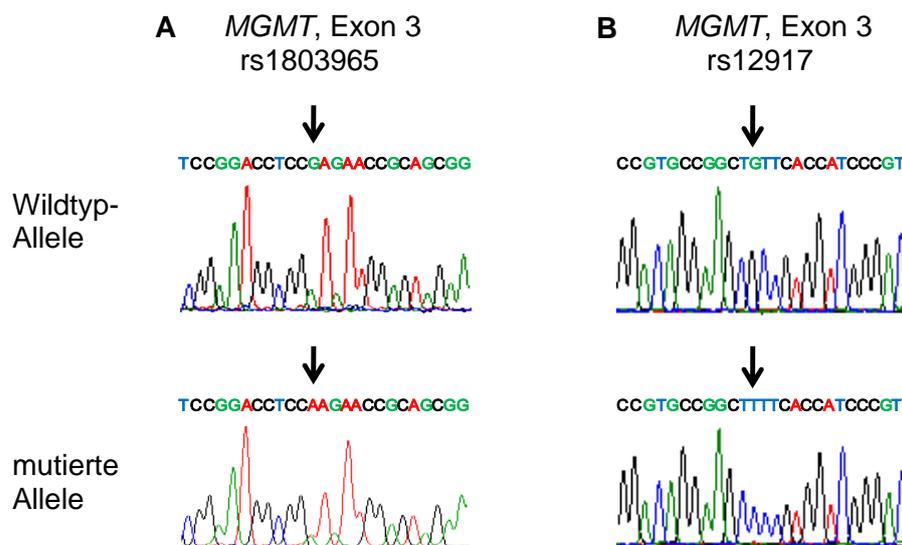


Abb. 3.13: Sequenzanalyse des *MGMT* Gens

(A und B) In der oberen Reihe sind die Elektropherogramme und Wildtyp-Sequenzen für die beiden detektierten SNPs im Exon 3 des *MGMT* Gens dargestellt. In der unteren Reihe sind die jeweils mutierten Allele gezeigt. (A, unten) Für den SNP rs1803965 wurde u.a. bei #D515 eine heterozygote Variante festgestellt (c.252C>T). Die Sequenzauswertung ist in die Rückwärtsrichtung dargestellt, d.h. an der cDNA-Position 252 wurde ein Austausch der Base Guanin zu Adenin nachgewiesen. (B, unten) Für den SNP rs12917 konnte u.a. bei #D531 ein homozygotes Auftreten identifiziert werden (c.343C>T).

3.4 Genomweite Analyse einzelner myeloischer Kolonien

Die Problematik des heterogenen Tumormaterials ist insbesondere bei Patienten mit Niedrig-Risiko-MDS festzustellen, da je nach Stadium der Erkrankung nur ein geringer Teil der Zellen die krankheitsrelevanten Merkmale trägt und der Anteil gesunder Zellen im Untersuchungsmaterial überwiegt. Auch eine Selektion nach Oberflächenmarkern wie z.B. CD34 (für hämatopoetische Stammzellen) oder die Isolierung der Granulozyten aus Gesamtzellen des Knochenmarks bzw. Blutes liefern eine Mischung aus gesunden und malignen Zellen. Vor diesem Hintergrund wurden Methylcellulose-Assays, auch Colony Forming Cell (CFC) Assays genannt, mit CD34+ Zellen oder den mononukleären Zellen aus dem Knochenmark durchgeführt, um nach Vereinzeln der hämatopoetischen Stammzellen einzelne Zellklone zu kultivieren und diese anschließend auf genomische Alterationen zu untersuchen.

3.4.1 CFC-Assays mit CD34+ Zellen

Die CD34+ Zellen wurden aus dem Blut gesunder Probanden separiert und über einen Zeitraum von 14 Tagen im Methylcellulose-Medium (#04534, Stem Cell Technologies) kultiviert (Abb. 3.14), um die Morphologie und das Zellwachstum der CFUs von gesunden Kontrollen und MDS Patienten zu vergleichen. Am Ende der Kultivierung erfolgte die selektive Isolierung einzelner Zellkolonien aus dem Methylcellulose-Medium. Weil die Zellzahl einzelner Kolonien zu gering war, um über die direkte Nukleinsäureextraktion eine ausreichende Menge DNA für die array-CGH Analyse zu erhalten, wurde das genomische Material der Kolonien amplifiziert. Entsprechend wurde auch Kontroll-DNA aus einem Pool von Kolonien gesunder, weiblicher Probanden amplifiziert.

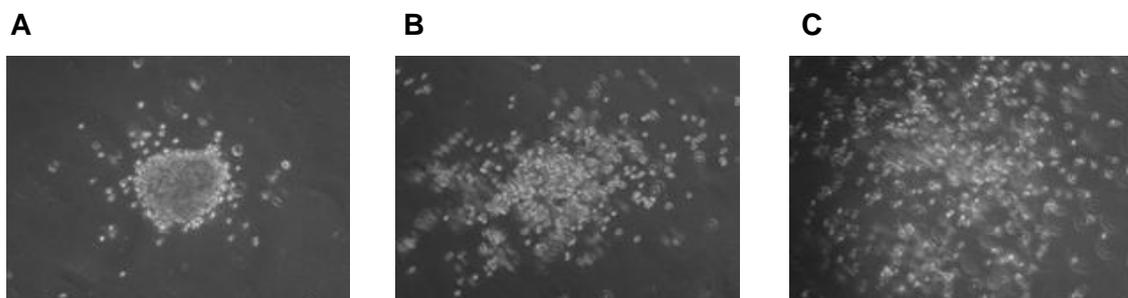


Abb. 3.14: CFUs auf Methylcellulose

(A, B und C) Koloniewachstum bei Kultivierung von CD34+ Zellen gesunder Probanden über einen Zeitraum von 14 Tagen. Kamera: Canon PowerShot, Vergrößerung: x40. (A) CFU-Eo. (B) CFU-G. (C) CFU-M. Abkürzungen: CFU, *colony forming unit*; G, Granulozyten; M, Markophagen; Eo, Eosinophile

3.4.2 CFC-Assay mit KM-MNZ eines MDS Patienten

Zur Untersuchung genomischer Anomalien auf dem Niveau einzelner Zellklone wurden die Zellen des Patienten #D762 im Methylcellulose-Medium kultiviert. Bei diesem Patienten stand EDTA-antikoaguliertes Knochenmark zur Verfügung, wobei die mononukleären Zellen des Knochenmarks mit einer Endkonzentration von 1×10^5 vitalen Zellen/mL Methylcellulose-Medium eingesetzt wurden. Obwohl nach Herstellerangaben der Einsatz von heparinisiertem Material favorisiert werden sollte, konnte die Entwicklung von Zellhaufen (<50 Zellen, engl. *cluster*) und Zellkolonien (>50 Zellen) auch bei EDTA-antikoaguliertem Knochenmark beobachtet werden. Aufgrund der eingeschränkten Patientenzahl und fehlendem Material gesunder Probanden gleichen Alters als Kontrolle erfolgte keine quantitative Auswertung der CFC-Assays. Die Kolonien und Cluster wurden hinsichtlich ihrer Morphologie beschrieben.

Im Vergleich zur Zellkultur der CD34+ Zellen aus dem Blut gesunder Probanden war das Koloniewachstum bei #D762 (RAEB) deutlich eingeschränkt. Es bildeten sich keine normal großen Kolonien im Vergleich zu gesunden Kontrollen erwachsener Probanden, dafür wurden Cluster mit weniger als 50 Zellen gezählt. Das verlangsamte Wachstum der Zellen eines Clusters ist in Abb. 3.15 dargestellt. Bei #D762 konnten nach einer Kultivierungszeit von 24 Tagen lediglich 6 myeloische Zellkolonien und Cluster (1x CFU-G (Granulozyten) #3, 1x CFU-Eo (Eosinophile) #4, 2x CFU-GM (Granulozyten/Makrophagen) #5 und #8, sowie 2x CFU-M (Makrophagen) #6 und #7) aus dem Methylcellulose-Medium isoliert werden.

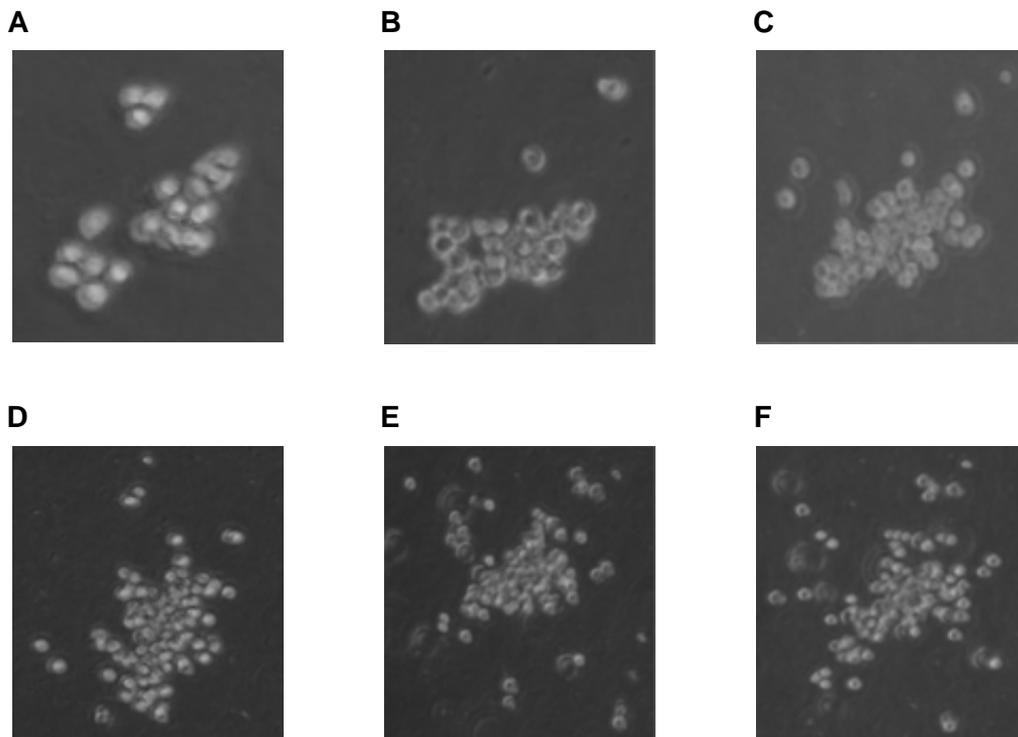


Abb. 3.15: CFUs bei MDS (#D762) auf Methylcellulose

Kamera: Canon PowerShot, Vergrößerung: x100. (A) Tag 7. (B) Tag 10. (C) Tag 15. (D) Tag 17. (E) Tag 23. (F) Tag 24.

3.4.3 Direkte DNA-Amplifikation mittels Multiple Displacement Amplification

Da die genomischen Profile einzelner Zellklone eines MDS Patienten untersucht werden sollten, diese Kolonien bzw. Cluster aber nur aus etwa 50-100 Zellen bestanden, war es erforderlich, die DNA für array-CGH Analysen zu amplifizieren. Um möglichst große Fragmente gleichmäßig zu amplifizieren, erfolgte die Vervielfältigung der DNA mittels Multiple Displacement Amplification (MDA) mithilfe des REPLI-g Kits (Qiagen). Die elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten genomischen DNA einer Kolonie im 0,8%igen Agarosegel ergab mehrere Banden mit DNA-Fragmenten größer als 10000 bp (Abb. 3.16). Zur anschließenden Reinigung der DNA wurden YM-30 Größenausschlussfilter (Millipore) verwendet und die DNA-Konzentration photometrisch und über qPCR gemessen. Bei erfolgreicher Amplifikationsreaktion wurden zwischen 4-5 µg DNA pro Ansatz erhalten.

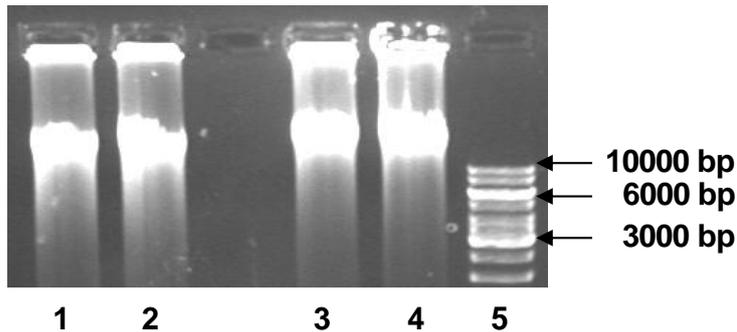


Abb. 3.16: Gelbild der amplifizierten DNA aus CFUs (#D762)

Gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA aus den Kolonien #3(1), #5(2), #6(3) und #7(4) im 0,8%igen Agarosegel. Auf der rechten Seite ist die DNA-Leiter 10 kb (5) dargestellt.

3.4.4 Array-CGH mit amplifizierter DNA

Die genomischen Profile der über Methylcellulose vereinzelteten Cluster streuten im Vergleich zu den genomischen Profilen nicht-amplifizierter DNA deutlich stärker, was sich durch erhöhte DLRS-Werte im Vergleich zu nicht-amplifizierter DNA widerspiegelt (Tab. 3.6). Da über das MDA Verfahren zur Amplifikation von DNA möglicherweise Verzerrungen (engl. *bias*) entstehen (Pinard et al., 2006), wurde beim Einsatz amplifizierter Proben-DNA sowohl die Verwendung der auf die gleiche Weise amplifizierten Referenz-DNA wie auch nicht-amplifizierte Referenz-DNA (Ref XX) eingesetzt. Ein Vergleich der array-CGH Profile von amplifizierter DNA der Kolonie #7 gegen nicht-amplifizierte Referenz-DNA (Ref XX) und gegen amplifizierte, gepoolte DNA aus den Kolonien gesunder Kontrollen verdeutlicht die höhere Standardabweichung bei Verwendung der nicht-amplifizierten Referenz (Ref XX) bei allen Chromosomen (Abb. 3.17, Tab. 8.4, Anhang). Auf Grund des starken Hintergrundrauschens wurden aberrante Regionen kleiner 3,5 Mb (entsprechend 500 Oligonukleotid-Sonden) nicht ausgewertet. Es wird zudem deutlich, dass eine Deletion des Chromosoms 19 detektiert wird.

Trotz der höheren Standardabweichungen (DLRS-Werte) wurde für die folgenden array-CGH Analysen die nicht-amplifizierte DNA der Referenz (Ref XX) verwendet. Diese DNA ist hochmolekular und diente bei allen array-CGH Analysen als gut charakterisierter Standard. Beim Einsatz der nicht-amplifizierten Referenz-DNA, sowie auch bei der Verwendung der amplifizierten, gepoolten Referenz-DNA konnten übereinstimmende Aberrationen detektiert werden (Tab. 3.6).

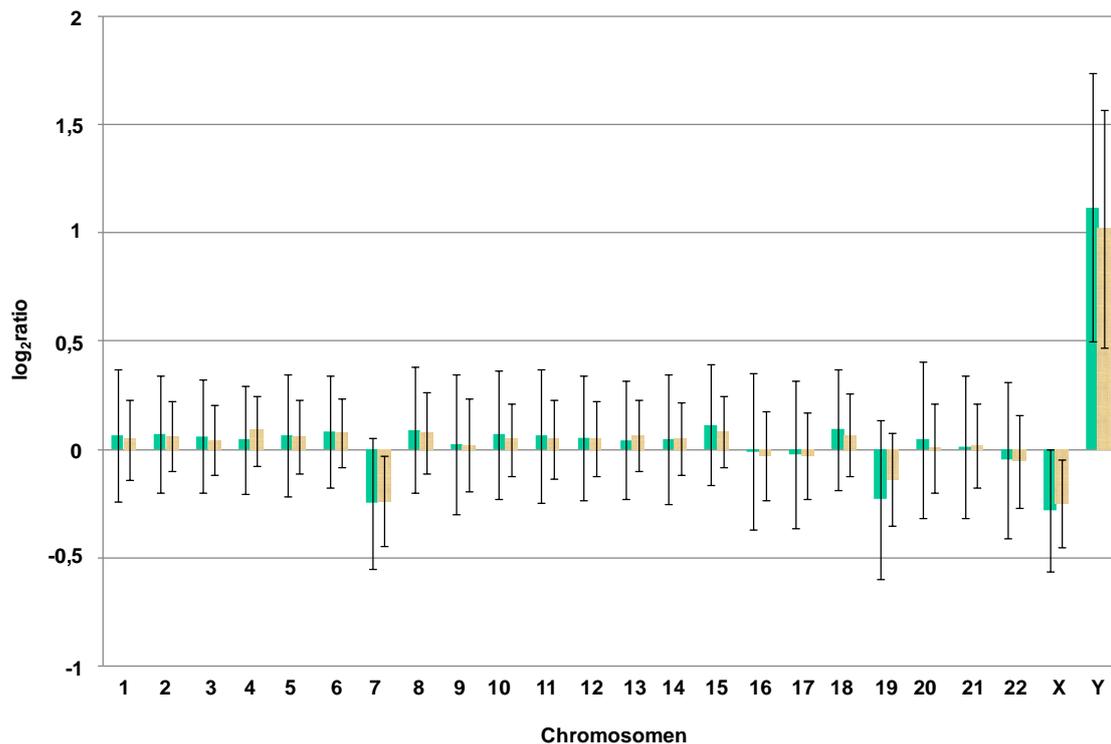


Abb. 3.17: Vergleich der genomischen Profile der Kolonie #7 bei Verwendung der nicht-amplifizierten Referenz-DNA (Ref XX) und der amplifizierten, gepoolten DNA aus den Kolonien gesunder Kontrollen

Auf der y-Achse ist der \log_2 ratio aufgeführt und entlang der x-Achse sind jeweils die durchschnittlichen \log_2 ratios der Chromosomen 1 bis 22, X und Y mit den dazugehörigen Standardabweichungen dargestellt. Die grünen Balken repräsentieren die Ergebnisse der array-CGH der amplifizierten DNA des Clusters #7 vs. Ref XX und die gelben Balken zeigen die array-CGH Ergebnisse des Clusters #7 vs. der amplifizierten, gepoolten DNA aus den Kolonien gesunder Kontrollen.

3.4.5 Auswertung der array-CGH Daten amplifizierter DNA einzelner CFUs

Zur Untersuchung genomischer Anomalien einzelner Zellklone bei #D762 erfolgten array-CGH Analysen (244K) auf Basis der amplifizierten DNA aus Zellen einer Kolonie bzw. eines Clusters. Insgesamt konnten 6 array-CGH Analysen einzelner Zellklone ausgewertet werden. Trotz der hohen Standardabweichung wurden bei stringenten Filtereinstellungen (ADM-2 Grenzwert: 40) zwischen 0 und 21 Kopienzahlveränderungen je Zellklon detektiert. Monosomie 7 zeigte sich beispielsweise in 3 von 6 untersuchten Zellklonen (#4, #6 und #7), vergleichbar mit der Detektion des Verlustes von Chromosom 7 in etwa 50% der Granulozyten des Knochenmarks (\log_2 ratio: -0,5) bei Verwendung nicht-amplifizierter DNA (Tab. 3.6). Zusätzlich konnte ein Verlust einer Größe von 4,86 Mb auf Chromosom 3p21.31-p21.1 für zwei der Zellklone mit Monosomie 7 (#6 und #7) sowie auch für eine weitere Kolonie (#3) mit einzelnen deletierten Regionen auf Chromosom 7 detektiert werden (Abb. 3.18). Weitere Kopienzahlveränderungen in einer Größe zwischen 3,71 und 7,35 Mb konnten in 3 Clustern (#3, #6 und #7) identifiziert werden. Einige potentiell betroffene Regionen sind

im Folgenden aufgelistet: ein Verlust von 5q35.2-q35.3 (*FGFR4*, *FLT4*, *RAB24*, *RASGEF1C*), eine Deletion in 9q34.2-q34.3 (*CARD9*, *COBRA1*, *MIR126*, *NOTCH1*, *VAV2*) und Verluste von 14q32.2-q32.33 (IGH Lokus, *JAG2*, *XRCC3*) und von 17p13.3-p13.1 (*TP53*). Übereinstimmende Verluste in 16p11.2 konnten ebenfalls für zwei Cluster (#3 und #7) identifiziert werden, sowie auch eine Deletion in 21q22.3 für die beiden Cluster #3 und #6.

Abgesehen von der Monosomie 7 gab es keine weiteren Übereinstimmungen der beschriebenen Kopienzahlveränderungen einzelner Kolonien im Vergleich zu den Ergebnissen der nicht-amplifizierten, genomischen DNA bei #D762. Zur Überprüfung der array-CGH Ergebnisse einzelner Zellklone wurde eine FISH Analyse mit einer regionsspezifischen BAC-Sonde für 3p21.3 (RP11-3B7) an Methanol-/Eisessig fixierten Knochenmarkzellen und an nativen Knochenmarkausstrichen von #D762 durchgeführt. Der Prozentsatz der Zellen mit der Signalkonstellation für eine Deletion in 3p21.3 lag unterhalb der für die Sonde ermittelten Grenzwerte (engl. *cut off level*). Ebenfalls konnte die Deletion des kurzen Arms von Chromosom 17p13.1 mithilfe der FISH Analyse (LSI tp53) nicht bestätigt werden.

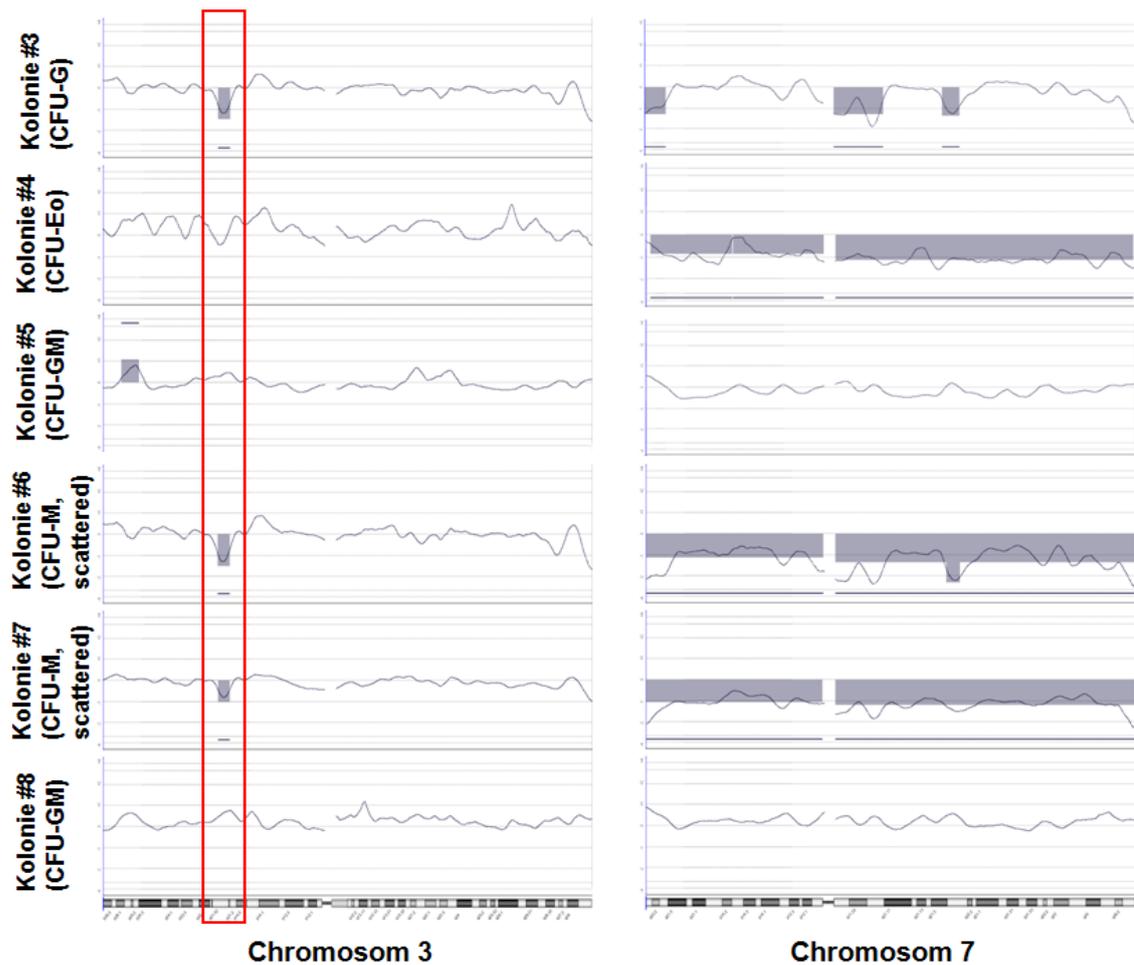


Abb. 3.18: Genomische Profile einzelner CFUs (#D762)

Die Morphologie der CFUs ist auf der linken Seite angegeben. Die Kopienzahlveränderungen der Chromosomen 3 (links) und 7 (rechts) sind für 6 CFUs als Alignment dargestellt. Blau unterlegte Flächen zeigen die Verluste und Zugewinne. Die Deletion in 3p21.31-p21.1 ist für 3 der 6 CFUs im roten Kasten hervorgehoben.

3.4.6 Vergleich der Aberrationen einzelner CFUs mit den array-CGH Ergebnissen der MDS Patienten der Kohorte

Um zu überprüfen, ob es sich bei den genomischen Läsion einzelner Kolonien (#D762) möglicherweise um rekurrente Veränderungen handelt, wurden die array-CGH Ergebnisse der CFUs mit den Aberrationen bei MDS Patienten der Kohorte verglichen. Es zeigten sich Übereinstimmungen größerer Deletionen mit $\geq 4,649$ Mb bei acht Patienten (Tab. 3.7). Unter anderem wurde der Verlust in 5q35.2-q35.3 und eine Deletion in 9q34.2-q34.3, die bei drei CFUs (#3, #6 und #7) detektiert wurden, auch bei #D184 gefunden. Des Weiteren konnte eine Übereinstimmung für den Verlust in 14q32.2-q32.33 bei den drei o.g. Kolonien und bei #D279 beobachtet werden, sowie eine Deletion auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 (17p13.3-p13.1) ebenfalls für #D187 und #D267 identifiziert wurde. Ein Verlust in 16p11.2 (bekannte CNV-Region, DGV) wurde bei #D170, #D271, #D287 und in den Kolonien #3 und #7 identifiziert.

Tab. 3.7: Vergleich der Deletionen einzelner Zellklone (#D762) mit den Aberrationen der MDS Patienten der Kohorte

Aberration	Position	Größe (Mb)	MC-Klone	MDS Patienten
5q35.2-q35.3	175590532 – 180544250	4,954	#3, #6, #7	D184, D531
9q34.2-q34.3	135227964 – 139877084	4,649	#3, #6, #7	D184
14q32.2-q32.33	99446119 – 105355086	5,909	#3, #6, #7	D279
16p11.2	27016596 – 34059789	7,043	#3, #7	D170, D271, D287
17p13.3-p13.1	28969 – 7380502	7,352	#3, #6, #7	D184, D267

3.5 Verteilung der CNAs bei MDS und JMML

In der Gruppe der MDS wurden bei den array-CGH Analysen bis auf die bekannten, numerischen Chromosomenaberrationen keine rekurrenten Veränderungen identifiziert. Für individuelle Patienten der Kohorte konnten hingegen genomische Alterationen nachgewiesen werden, wobei vorwiegend Deletionen in folgenden Regionen vorlagen: in 3p14.3-p12.3 (*FHIT*), in 6q23 (*MYB*), in 7p21.3-p15.3, in 9q33.3-q34.3 und in 17p13 (*TP53*) (Tab. 3.1). In Übereinstimmung mit den array-CGH Ergebnissen der CFUs wurde die Deletion in 5q35.2-q35.3 auch bei Patienten mit fortgeschrittenen MDS (RAEB) gefunden (Tab. 3.7).

Abgesehen von der bereits bekannten *NF1* Deletion traten in der Gruppe der JMML keine weiteren genomischen Alterationen auf.

4 Diskussion

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung genomischer Aberrationen bei Kindern mit myelodysplastischen Syndromen und juveniler myelomonozytärer Leukämie mithilfe der array-CGH Technik. Insbesondere in der Gruppe der kindlichen MDS ist die Suche nach rekurrenten Anomalien von großer Bedeutung, denn hier sind die krankheitsauslösenden Ursachen noch weitgehend unbekannt (Baumann et al., 2008; Hasle, 2011). Die Entdeckung genetischer Läsionen könnte helfen, die Biologie der Erkrankung besser zu verstehen sowie potentielle Zielstrukturen (engl. *targets*) zu finden, auf deren Grundlage verbesserte Therapieansätze zur Behandlung von MDS im Kindesalter entwickelt werden können.

Mithilfe der klassischen Chromosomenanalyse und der molekularen Zytogenetik wurden bei etwa 50% bis 70% der kindlichen MDS Patienten genomische Aberrationen nachgewiesen, am häufigsten eine Monosomie 7, eine Trisomie 8 sowie interstitielle Deletionen in 12p und auch komplex aberrante Karyotypen (Niemeyer and Baumann, 2008; Boehrer et al., 2009; Göhring et al., 2010). In Einzelfällen wurden weitere genomische Veränderungen beschrieben, wie z.B. eine Deletion auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17, die mit einem Verlust des *TP53* Genortes assoziiert ist (Silveira et al., 2009) oder ein Zugewinn auf dem langen Arm des Chromosoms 1 (Morero et al., 2006). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war eine genomweite Untersuchung von Primärmaterial kindlicher Patienten mit MDS aller Subtypen und mit JMML mit unterschiedlichen Methoden möglich. Im Folgenden werden die Ergebnisse der jeweiligen Analysen vor dem Hintergrund der aktuellen Erkenntnisse zur Pathogenese des MDS diskutiert.

4.1 Array-CGH bei MDS und JMML

4.1.1 Heterogenes Probenmaterial bei MDS

Für die Untersuchung genomischer Läsionen bei kindlichen MDS und JMML konnte im Rahmen dieser Arbeit sowohl Probenmaterial aus der Studienzentrale der EWOG-MDS Studie (Kinderklinik der Universitätsklinik Freiburg) als auch die asservierten Knochenmark- und Blutzellen der Patienten genutzt werden, bei denen die zytogenetische Referenzanalytik im IZMP erfolgte. Aufgrund der oft begrenzten Probenmengen und der geringen Zellzahl im Knochenmark und Blut stand insbesondere bei kindlichen MDS Patienten teilweise sehr wenig Untersuchungsmaterial zur Verfügung. Zusätzlich erschwert ein geringer Anteil maligner Zellen im Untersuchungut bei Niedrig-Risiko MDS

Patienten die Detektion genetischer Aberrationen. Aus diesem Grund wurden verschiedene Strategien entwickelt, um eine Charakterisierung kleiner Subpopulationen maligner Zellen zu ermöglichen. Neben der parallelen Untersuchung von Granulozyten und mononukleären Zellen des gleichen Patienten, wurde auch eine Isolierung und Anreicherung maligner Zellen über CFC-Assays erreicht.

4.1.2 Vergleich der verwendeten array-CGH Plattformen

Insgesamt wurden 58 Patienten (39 Patienten mit MDS/sek. MDS und 19 Patienten mit JMML) mittels BAC/PAC und/oder Oligonukleotid-basierten array-CGH auf rekurrente Aberrationen untersucht. Zu Beginn des Projektes wurden die Analysen mithilfe von 6k und 8k BAC/PAC CGH Arrays (Peter Lichter, DKFZ Heidelberg), so dass für 24 MDS Patienten array-CGH Daten mit einer genomweiten Auflösung von etwa 1 Mb verfügbar waren (Tab. 3.1). Für 12 MDS Patienten erfolgten die array-CGH Analysen ausschließlich mittels Oligonukleotid CGH Arrays. Bei den folgenden Patienten wurden parallel CGH-Analysen mit den 8k BAC/PAC und Oligonukleotid Arrays durchgeführt: #D468, #D515, #D522 und #D531, wobei ein direkter Vergleich der Ergebnisse beider array-Formate für drei MDS Patienten (#D468, #D515 und #D531) möglich war. So wurden bei #D531 beispielsweise die Monosomie 7 und die Deletion in 6q23 in beiden Analysen zuverlässig detektiert (Abb. 3.7). Als weitere Übereinstimmung wurde für #D531 ein Verlust in der Region 8p23.1 gefunden (Abb. 4.1 A), die auf dem BAC/PAC Array durch drei BAC Klone (RP11-287P18, RP11-257J3 und RP11-1005B13) und auf dem Oligonukleotid Array durch 13 Sonden (931,853 kb) abgedeckt wird. Diese Deletion liegt in einem bekannten CNV-Bereich, der in der „Database of Genomic Variants“ (DGV, (Lafraite et al., 2004)) sowohl als Zugewinn wie auch als Verlust gelistet ist (Abb. 4.1 B). An diesem Beispiel wird deutlich, dass eine zuverlässige Identifikation kleiner CNAs bzw. CNVs (< 1 Mb in Abhängigkeit der entsprechenden Sondenverteilung bzw. Auflösungsvermögens) prinzipiell möglich ist. Bei #D522 konnte aufgrund geringer Probenmengen nicht das gleiche Material auf beiden array-CGH Plattformen untersucht werden, so dass die Monosomie 7 mittels BAC/PAC Array nur für die Probe mit einem Anteil von 43% aberranter Zellen (43% nuc ish cen7 (CEP7x1)) bestätigt werden konnte.

Mittlerweile ist ein umfangreiches Angebot von Oligonukleotid CGH Arrays kommerzieller Hersteller verfügbar, so dass diese array-CGH Formate überwiegend zur Detektion genomischer Aberrationen sowohl in der Stufendiagnostik bei mentaler Retardierung (Vermeesch et al., 2007) wie auch in diversen Forschungsprojekten verwendet werden. Während beim Einsatz von BAC/PAC CGH Arrays die maximale genomweite Auflösung durch die Größe und den Abstand der verwendeten BAC bzw. PAC Klone festgelegt ist,

bieten Oligonukleotid CGH Arrays eine wesentlich höhere Auflösung, die von der Anzahl der verwendeten Sonden abhängt und sogar flexibel durch ein Anwender-spezifisches Design angepasst werden kann.

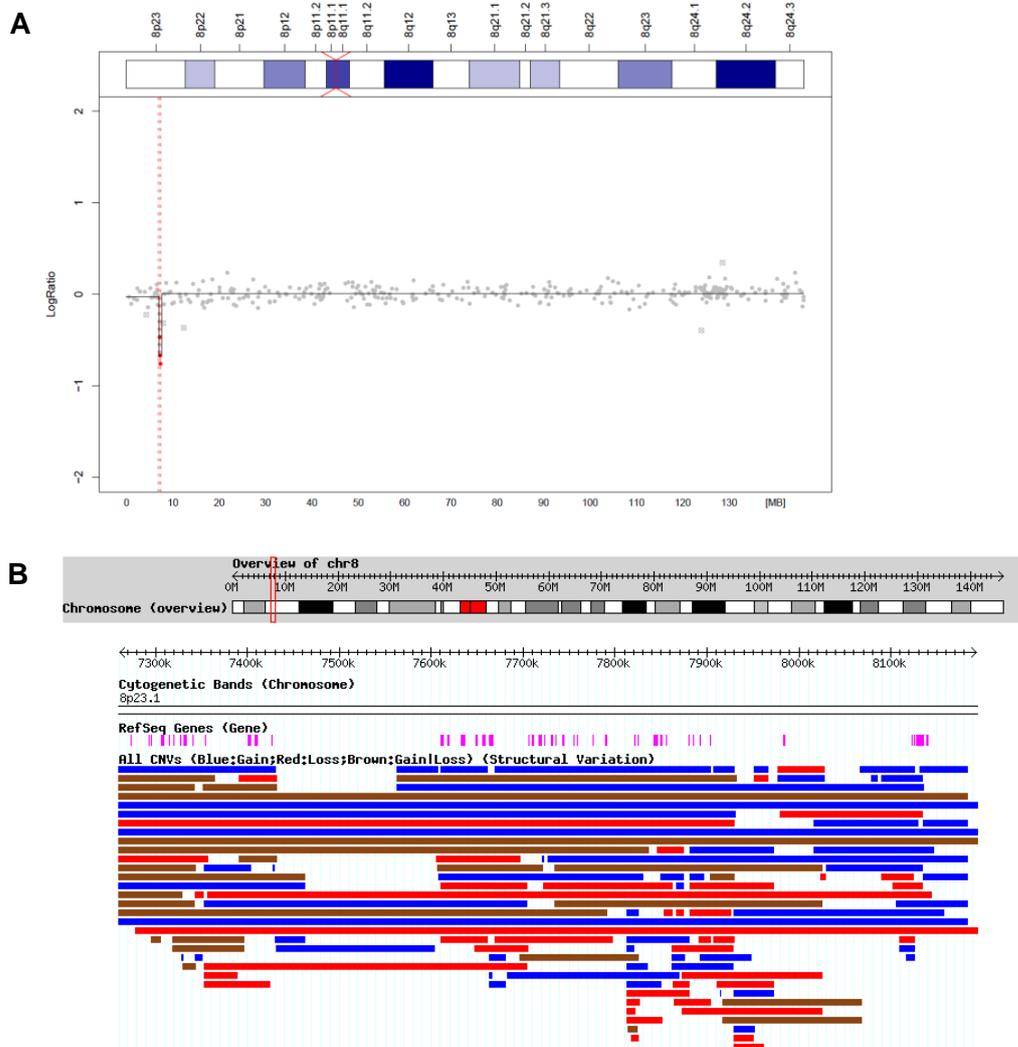


Abb. 4.1: Deletion in 8p23.1

(A) BAC/PAC array-CGH Auswertung für das Chromosom 8 bei #D531. In 8p23.1 wird durch 3 aufeinanderfolgende BAC/PAC Klone (rote, gestrichelte Linie) der Verlust angezeigt. (B) In 8p23.1 findet sich eine bekannte CNV-Region, wie hier in der DGV-Ansicht dargestellt. Die pinkfarbenen Balken stellen in komprimierter Form einzelne Gene dar. Im unteren Teil sind die Ergebnisse einzelner Studien als farbige Balken zusammengefasst (blau = Zugewinn, rot = Verlust, braun = Zugewinn/Verlust).

Innerhalb dieses Projektes erfolgten zur Überprüfung der genomischer Aberrationen bei 5 MDS Patienten (#D522, #D529, #D585, #D621 und #D637) zusätzliche array-CGH Analysen mit dem Anwender-designten eArray (MDS-1, Agilent). Durch das individuelle Design der eArrays ist eine Feinkartierung von chromosomalen Aberrationen in krankheitsrelevanten Bereichen möglich, jedoch hat die Wahl der Methode zum Erstellen

der eArrays einen bedeutenden Einfluss auf die Qualität der Sonden. Wird wie bei dem eArray MDS-1 ein bestimmter Sondenabstand im Designprogramm (Agilent) gewählt, basiert die Auswahl der Sondensequenzen vorrangig auf dieser Vorgabe, so dass beispielsweise auch in Regionen mit vielen Sequenzwiederholungen Sonden erstellt werden. Folglich wird eine starke Streuung der \log_2 ratios einzelner Sonden beim direkten Vergleich der 244K- mit der eArray-Plattform erhalten, wie sie am Beispiel des bekannten CNV im *GSTT1* Genort bei #D637 deutlich wird (Abb. 3.9). Die Qualität der Sonden wird über sog. *probe performance scores* angegeben und in Abhängigkeit von Sequenzwiederholungen, GC-Gehalt der Sequenz, Wahrscheinlichkeit von Kreuzhybridisierungen und Hybridisierungstemperatur berechnet. Die Werte liegen zwischen 0 und 1, wobei hohe Werte eine größere Wahrscheinlichkeit für eine gute Hybridisierungsqualität und damit eine zuverlässige Bindung der DNA-Sequenzen an die Sonde widerspiegeln (Giles et al., 2010). Werden die eArrays dagegen nur mit den getesteten „Katalogsonden“ aus der Agilent Datenbank erstellt, wird eine hohe Hybridisierungsqualität seitens des Herstellers angegeben, wobei eine geringere Auflösung in Bereichen mit ungeeigneten Sequenzen in Kauf genommen werden muss.

4.1.3 Möglichkeiten und Grenzen array-basierter Methoden zur Untersuchung genomischer Aberrationen

Über die klassische Karyotypisierung können bei den hämatologischen Neoplasien chromosomale Veränderungen identifiziert werden, die u.a. zur Klassifikation und Prognoseabschätzung bei MDS eine wichtige Rolle spielen (Greenberg et al., 1997; Haase et al., 2007). Die Untersuchung der Metaphasenchromosomen macht jedoch die Kultivierung der Knochenmarkszellen erforderlich. Ein Vorteil array-basierter Anwendungen gegenüber der Karyotypisierung ist die Untersuchung von Interphase-DNA, ohne dass sich teilende Zellen notwendig sind (O'Keefe et al., 2007; Tiu et al., 2007). Evers *et al.* berichteten in ihrer array-CGH Studie über eine erwachsene MDS Patienten, bei der aufgrund unzureichender Chromosomenqualität in der Karyotypisierung nur die 5q-Deletion sicher identifiziert werden konnte. Über eine zusätzliche array-CGH Analyse wurde bei der Patientin ein Verlust mehrerer, ganzer Chromosomen in der gleichen Zellpopulation mit 5q- gefunden und somit ein komplex aberranter Karyotyp aufgedeckt (Evers et al., 2007). In der hier untersuchten Patientenkohorte konnte für #D170 mit ergebnisloser Chromosomenanalyse ein genomisches Profil mithilfe der array-CGH erstellt werden. Es bestätigte sich die vorab mittels FISH identifizierte Monosomie 7 und weitere chromosomale Aberrationen konnten ausgeschlossen werden.

Das Detektionslimit für den Nachweis genomischer Veränderungen liegt bei der array-CGH zwischen 20% und 35%, d.h. mindestens dieser Anteil aberranter Zellen muss im Untersuchungsgut vorhanden sein, damit eine Veränderung detektierbar ist (Armengol et al., 2009; Evers et al., 2007; Garnis et al., 2005). Gerade diese technische Vorgabe stellt vermutlich bei der molekularen Karyotypisierung von MDS ein Problem dar, denn hier handelt es sich um eine Erkrankung, bei der verschiedene dysplastische Klone den oligoklonalen Stammzellpool bilden (O'Keefe et al., 2007). Abhängig vom MDS Subtyp und dem Zeitpunkt der Probenahme kann demnach der Anteil maligner Zellen im Untersuchungsgut sehr unterschiedlich sein. Im Hinblick auf die o.g. Problematik wurden verschiedene Filterkriterien zur Detektion von genomischen Anomalien auf der Oligonukleotid-Plattform getestet. Dabei wurden die Filtereinstellungen (\log_2 ratio aberranter Sonden: 0,3 und minimale Anzahl aberranter Sonden: 10) anhand der vorab identifizierten Chromosomenveränderungen wie z.B. der Monosomie 7 ausgewählt (Abb. 3.2, Tab. 8.3, Anhang). Die endgültige Auswertung aberranter Regionen erfolgte mithilfe des ADM-2 Algorithmus (Lipson et al., 2006). Für alle Patienten wurden die Aberrationsdaten bei ADM-2 Schwellenwerten von 5, 6, 8 und 10 erfasst. Die größten Übereinstimmungen mit den bekannten Chromosomenanomalien wurden bei einem minimalen ADM-2 Schwellenwert von 6 gefunden. Mit diesen Einstellungen wurde #D515 die Trisomie 8 als fragmenthafter Zugewinn auf der array-CGH Plattform dargestellt. Die korrespondierenden Ergebnisse der Metaphasen- und FISH-Analytik ergaben in 25% der Zellen diese numerische Anomalie, so dass auch mittels array-CGH gezeigt werden konnte, dass die Trisomie 8 bei diesem Patienten in einem kleineren malignen Klon im Vergleich zur Monosomie 7 auftrat (Tab. 3.1).

Für die Analyse der BAC/PAC Arrays wurden CNAs auf der Basis von zwei aufeinanderfolgenden Sonden mit \log_2 ratios von $\pm 0,2$ ausgewertet. Bei #D492 wurde die Monosomie 7 mittels array-CGH nicht identifiziert, was sich durch den geringen Anteil maligner Zellen im Untersuchungsmaterial (10% nuc ish cen7) erklären lässt. Im Fall #D514 wurde mithilfe zytogenetischer Analysen ein hoher Anteil von Zellen mit Monosomie 7 gefunden (mindest. 76%), jedoch wurde keine Übereinstimmung auf array-CGH Basis erhalten. Diese Diskrepanz konnte nicht abschließend geklärt werden.

Im Vergleich zur klassischen Chromosomenanalyse können mithilfe der array-CGH keine balancierten strukturellen Anomalien wie Translokationen oder Inversionen identifiziert werden. Diese Limitierung stellt jedoch bei der genomischen Analyse der MDS kaum eine Einschränkung dar, weil bei diesen Erkrankungen überwiegend unbalancierte Aberrationen in Form von Deletionen und Monosomien vorliegen (Haase, 2009; Pedersen-Bjergaard et al., 2002; Davids and Steensma, 2010). Ist in seltenen Fällen eine Aufklärung chromosomaler Umbauten oder nicht zuzuordnender Markerchromosomen erforderlich, wird u. a. in der hämatologischen Stufendiagnostik zusätzlich eine spektrale Karyo-

typisierung (SKY) oder multicolor-FISH (mFISH) durchgeführt. Bei dieser sog. Vielfarben-FISH lassen sich die einzelnen Metaphasenchromosomen der Patientenprobe mithilfe chromosomenspezifischer Sonden darstellen, wobei durch die Verwendung von 5 verschiedenen Fluorochromen in unterschiedlichen Kombinationen jedes Chromosom ein charakteristisches Emissionsspektrum aufweist (Schröck et al., 1996; Macville et al., 1997). Mithilfe der SKY-Analyse sind die Untersuchungen balancierter Translokationen sowie die Aufklärung komplex aberranter Karyotypen möglich.

Als weitere array-basierte Methode zur molekulargenetischen Untersuchung von MDS wird neben der array-CGH auch die Hochdurchsatz-SNP-Analysetechnik (SNP-a) eingesetzt. Mit diesem Verfahren können sowohl genomischen Anomalien wie auch LOH-Ereignisse in Form von Kopienzahl neutralen Veränderungen, wie z.B. uniparentalen Disomien (UPD) analysiert werden. Durch die geringe Länge der SNP-überspannenden Sonden (etwa 25 bp) und ihre vorgegebene Sequenz kommt es jedoch zu einer weniger sensitiven Hybridisierung, so dass die stärkere Streuung der Fluoreszenzsignale zusammen mit der Verteilung der SNPs im Genom eine geringere genomweite Auflösung bedingt. In den ersten SNP-a Studien bei MDS wurden für 46% der erwachsenen Patienten UPDs beschrieben, die zu diesem Zeitpunkt jedoch noch keinen Aufschluss zu krankheitsassoziierten Veränderungen in den betroffenen Genen ergaben (Gondek et al., 2007a; Gondek et al., 2008; Mohamedali et al., 2007).

4.1.4 Deletionen in 17p13 und Inaktivierung von *TP53*

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der genomischen Studien bei MDS im Erwachsenenalter konnten in der hier untersuchten Kohorte bei zwei Patienten (#D184 und #D267, 5%) Deletionen in 17p13 mit einer Größe von 7,668 Mb und 20,849 Mb aufgedeckt werden. Auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 ist in der deletierten Region das Tumorsuppressorgen *TP53* lokalisiert, das als Transkriptionsfaktor eine wichtige Bedeutung bei der Kontrolle des Zellzyklus, der Induktion der Apoptose und der DNA-Reparatur hat. In SNP-a Untersuchungen wurden neben genomischen Verlusten auch Kopienzahl neutrale UPDs in 17p beschrieben (Gondek et al., 2008; Langemeijer et al., 2009). Die Inaktivierung von *TP53* durch Deletion und/oder Mutationen in der DNA-Bindedomäne geht bei MDS und AML Patienten häufig mit dem Auftreten komplex aberranter Karyotypen und einer schlechten Prognose einher (Hirai, 2003; Martinez-Ramirez et al., 2004; Schoch et al., 2005; Haferlach et al., 2008; Zatkova et al., 2009). Für beide Patienten (#D184 und #D267) trat innerhalb des ersten Jahres nach Diagnosestellung ein Krankheitsprogress ein, der jeweils zum Tod führte. In weiteren Studien wurden *TP53* Deletionen und Mutationen beim kindlichen MDS untersucht. Silveira *et al.* berichteten in ihren FISH Untersuchungen bei Patienten aller Subtypen von

einer hohen Inzidenz hemizygoter und homozygoter *TP53* Deletionen bei 18 von 19 Patienten (Silveira et al., 2009). In keiner weiteren Studie wurde über ein dermaßen hohes Auftreten von *TP53* Anomalien berichtet. In einer kleineren Studie von Saito et al. wurde bei der Analyse von 9 kindlichen MDS Patienten in einem Fall mit der(5;17)(p10;q10) eine heterozygote Deletion und eine Mutation des zweiten Allels (c.410T>A, p.L137Q) beschrieben. Bei diesem Patienten wurde die schlechte Prognose mit einer Resistenz gegenüber der Chemotherapie für den kleinen Klon mit *TP53* Anomalien vermutet (Saito et al., 2011).

4.1.5 Interstitielle Deletion in 12p13 (*ETV6*)

Interstitielle Deletionen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 sind bei hämatologischen Neoplasien bekannte Aberrationen (Sato et al., 1995;Paulsson et al., 2006;Gondek et al., 2008), die auch bei MDS und AML bei Erwachsenen mittels SNP-a gefunden wurden (Akagi et al., 2009;Haferlach et al., 2011). In der hier untersuchten MDS Kohorte trat diese interstitielle Deletion bei 2 von 39 Patienten (5%) auf. Die deletierte Region enthält eine sehr hohe Dichte an Genen, die unter anderem eine wichtige Rolle in der Zellzyklusregulation spielen, wie z.B. *KIP1*, welches für das Kinase inhibierende Protein P27 kodiert und *GDI D4 (ARHGDIB)*, ein negativer Regulator des RAS-Signalweges. Außerdem ist in dem deletierten Bereich *ETV6* (ets variant 6) lokalisiert, ein Gen, das zu einer großen Familie von Transkriptionsfaktoren (*E26 transforming specific*, ETS) gehört. Für *ETV6* werden ebenfalls häufig Translokationen, wie z.B. t(12;21) bei akuter lymphatischer Leukämie bei Kindern beschrieben (Odero et al., 2003;Wlodarska et al., 1998). Des Weiteren wurden in einer aktuellen Untersuchung zur klonalen Evolution bei AML Patienten mit Rezidiv u.a. rekurrente Mutationen im *ETV6* Gen mithilfe neuer, hochauflösender Sequenzierungstechniken (*whole genome sequencing*) zum Zeitpunkt des Rückfalls identifiziert (Ding et al., 2012).

4.1.6 Heterozygoter Verlust in 6q23 (*MYB*)

In der deletierten Region 6q23, nachgewiesen bei zwei Patienten (#D226 und #D531), ist u. a. das Gen *MYB* lokalisiert, was zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren gehört, die eine wichtige Rolle in der Regulation der Hämatopoese spielen. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Tiere mit geringem *Myb* Expressionslevel einen myeloproliferativen Phänotyp entwickeln, der einer essentiellen Thrombozytopenie beim Menschen sehr ähnlich ist (Garcia et al., 2009). Darüberhinaus wurden auch Zugewinne des *MYB* Genlokus bei Kindern mit Lymphoblastischen Lymphomen (Schraders et al., 2009), bei Patienten mit T-Zell akuter lymphoblastischer Leukämie (T-ALL) (Lahortiga et al., 2007) und bei einem MDR-AML Patienten gefunden (Ripperger et al., 2009). Auf der Basis

dieser Befunde lässt sich vermuten, dass Kopienzahlveränderungen des *MYB* Genortes möglicherweise ein onkogenes Potential haben können.

4.1.7 Heterozygote Deletion in 3p14

Die Deletion auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 bei #D380 mit einer Größe von 23,491 Mb stellt ein gutes Modell zur Erklärung der Entstehung somatischer CNA dar. Die chromosomalen Bruchereignisse finden in Regionen statt, die bekannt sind für Chromosomenbrüche: *FRA3B*. Es handelt sich um sog. *fragile sites* (FS) (Glover, 2006). Während in gesunden Zellen diese FS normalerweise stabil sind, kommt es an diesen Stellen in Tumorzellen nach einer partiellen DNA-Replikationsinhibierung oft zu chromosomalen Läsionen in Form von Umbauten oder interstitiellen Deletionen. Bislang wurden insgesamt 11 FS kloniert, wobei *FRA3B* die erste Region war, die präzise innerhalb eines Tumorsuppressorgens (*FHIT*) lokalisiert werden konnte (Ohta et al., 1996; Wilke et al., 1994). Verluste in *FRA3B* werden häufig bei soliden Tumoren gefunden (Druck et al., 1997) und sind mit einer Inaktivierung von *FHIT* assoziiert (Zanesi et al., 2001). In einer SNP-a Studie bei 174 erwachsenen MDS Patienten wurde über eine Mikroduplikation in der Region 3p14.2-p14.3 (1,68 Mb) berichtet (Gondek et al., 2008). Darüberhinaus liegen keine Informationen zu einem veränderten Kopienzahlstatus in 3p14.3-p12.3 bei hämatologischen Erkrankungen vor (OMIM 601153).

4.1.8 CNAs bei JMML

Die juvenile myelomonozytäre Leukämie bei Kindern ist eine aggressive myeloproliferative Neoplasie, die durch eine übermäßige Produktion von Monozyten und Granulozyten gekennzeichnet ist. Wie für MPN charakteristisch, behalten die betroffenen Zellen ihre Differenzierungsfähigkeit, verdrängen aber durch ihre Überzahl die gesunden hämatopoetischen Zellen aus dem Knochenmark und es kommt zur Infiltration diverser Organe, wie z.B. der Leber, der Milz, des Magen-Darm-Trakts und der Lunge (Niemeyer et al., 1997). Die Entdeckung genetischer Läsionen in diversen Genen der RAS/MAPK-Signalkaskade (engl. *Ras/mitogen-activated protein kinase*), die eine permanente Aktivierung des Signalweges zur Folge haben und somit den natürlichen Kontrollmechanismus für die Zellteilung der HSZ stören, führte zu einem besseren Verständnis der Pathogenese der Erkrankung (Flotho et al., 2007; Flotho et al., 1999; Niemeyer and Kratz, 2006). Unter anderem wurden bei 35% der JMML Patienten somatische Punktmutationen im Gen *PTPN11* gefunden, das für die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-2 kodiert und bei weiteren 25% der Patienten konnten aktivierende Punktmutationen in den Onkogenen *NRAS* und *KRAS* nachgewiesen werden (Miyachi et al., 1994; Tartaglia et al., 2003). Etwa 11% der JMML Patienten leiden unter einer

Neurofibromatose Typ 1. Die Inaktivierung beider Allele des Tumorsuppressorgens *NF1*, einem negativen Regulator der RAS-Kaskade, führt zu einer unkontrollierten Zellproliferation (Shannon et al., 1994). In einer neueren SNP-array Studie konnten bei JMML Patienten über die Detektion einer uniparentalen Disomie in der Region 11q Mutationen im Proto-Onkogen *CBL* identifiziert werden (Loh et al., 2009). *CBL* kodiert für eine E3 Ubiquitin Ligase, die unter anderem das Protein Grb2 upstream von RAS reguliert. Es wurde bereits beschrieben, dass *CBL*-Mutationen eine kontinuierliche Aktivierung des RAS-Signalkaskade auslösen können (Schmidt and Dikic, 2005). Basierend auf Informationen zu bekannten *CBL*-Mutationen bei anderen myeloischen Erkrankungen fanden Loh *et al.* ebenfalls diverse Punktmutationen in Exon 8 und Exon 9, wobei am häufigsten der Tyrosinrest Y371 betroffen war. Da diese Läsionen ausschließlich in der Gruppe der JMML Patienten ohne Mutationen in den Genen *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11* oder einer *NF1*-Deletion detektiert wurden, konnten somit für weitere 10% bis 15% der Patienten pathogene Mutationen identifiziert werden.

Zur Überprüfung submikroskopischer Kopienzahlveränderungen bei JMML wurden in dieser Arbeit array-CGH Analysen von 19 JMML Patienten ausgewertet. Als einzige rekurrente zytogenetische Veränderung wurde bei acht Patienten die bekannte Monosomie 7 mittels Oligonukleotid array-CGH bestätigt. Beim Vergleich der \log_2 ratios für Chromosom 7 (array-CGH) und dem Auftreten der Monosomie 7 in den ausgewerteten Metaphasen ergaben sich jedoch Unterschiede (Abb. 3.4). Für #D541, #D581 und #D612 lagen die \log_2 ratios bei -0,42 und -0,46, was auf einen heterozygoten Verlust des Chromosoms 7 in etwa 50% der Zellen hindeutet. Die Monosomie 7 wurde für diese Patienten in 93% bis 100% der Metaphasen gefunden. Für die anderen Patienten (#D402, #D521, #D566, #D600 und #D614) ergaben sich \log_2 ratios zwischen -0,71 und -0,81, wobei die Monosomie 7 in 73% bis 100% der Metaphasen detektiert wurde. Diese Unterschiede können sich zum einen aus der variablen Anzahl der untersuchten Metaphasen in der Zytogenetik ($n=15-20$ und $n=1$ (#D581)) ergeben, sowie vom möglicherweise selektiven Wachstum der malignen Zellklone abhängig sein. Für die array-CGH Analysen wurde DNA aus mononukleären Zellen des Knochenmarks verwendet, so dass ein Abgleich der FISH-Ergebnisse mit den array-CGH Ergebnissen möglicherweise größere Übereinstimmungen ergeben hätte. Monosomie 7 ist mit etwa 30% die häufigste chromosomale Läsion bei Kindern mit JMML. Hinsichtlich des klinischen Verlaufs der Erkrankung konnten jedoch keine Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne Monosomie 7 beobachtet werden (Hasle et al., 2003).

In der Gruppe der JMML wurde für zwei Patienten (#D341 und #D566) die bekannte *NF1*-Deletion in 17q11.2 als monoallelischer Verlust mit exakt den gleichen Bruchpunkten bestätigt (Abb. 3.9). Im Vergleich zu anderen genetischen Läsionen, wie der biallelischen

NF1-Inaktivierung durch Mutationen, wurde diese interstitielle Deletion von 1,362 Mb bei JMML Patienten in 2 von 15 Fällen (13%) identifiziert (Steinemann et al., 2010).

4.1.9 Sensitivität der Array-CGH

Die hochauflösende array-CGH ist eine leistungsstarke Methode zur Analyse submikroskopischer Läsionen. In Abhängigkeit der Array-Plattform und der Probenqualität ist es möglich, Kopienzahlveränderungen auf Basis einzelner Gene zu identifizieren. In der Arbeit von Thiel *et al.* wurden auf diese Weise Deletionen des *TET2* Genortes (4q24) und interstitielle Deletionen im *RUNX1* Gen (21q22.12) bei erwachsenen MDS Patienten nachgewiesen. Eine Validierung der array-CGH Ergebnisse erfolgte mittels Anwender-designten Oligonukleotid Arrays, qPCR und bruchpunktüberspannender PCR auf DNA-Ebene (Thiel et al., 2011).

Für 16 kindliche MDS Patienten der Kohorte, die mithilfe der 244K Arrays mit einem durchschnittlichen Sondenabstand von 7,4 kb untersucht wurden, erfolgte die Auswertung der array-CGH Daten mit einer minimalen Anzahl aberranter Sonden von 10 (Standardeinstellung) und mit einer minimalen Sondenanzahl von 3 (wenig stringente Filtereinstellungen). Eine Vielzahl kleiner Anomalien wurde mit den o.g. Filtereinstellungen ausgewertet und auf dieser Basis der eArray MDS-1 mit 36 hochaufgelösten Regionen (3 Sonden/1000 bp) erstellt. Mithilfe dieser Anwender-designten Plattform wurden bei den 5 parallel untersuchten Patienten (#D522, #D529, #D585, #D621 und #D637) bis auf die konstitutionellen CNVs keine der vorab detektierten Aberrationen bestätigt. Übereinstimmend wurde bei den qPCR Analysen für die Genorte *NRAS* und *HOXA* ein diploider Kopienzahlstatus detektiert (Abb. 3.11). Die Aufdeckung einer hohen Rate an falsch-positiven CNAs im kb-Bereich unterstreicht die Notwendigkeit der Ergebnisvalidierung mit zusätzlichen Methoden. Dennoch erfolgten in einigen genomweiten Studien bei Erwachsenen MDS Patienten keine derartigen Überprüfungen (Mohamedali et al., 2007; Tyybakinoja et al., 2007; Starczynowski et al., 2008; Heinrichs et al., 2009).

Wie auch bei array-CGH und SNP-a Studien bei erwachsenen Patienten konnten beim kindlichen MDS nur wenige rekurrente, genomische Anomalien auf submikroskopischer Ebene identifiziert werden (Evers et al., 2007; O'Keefe et al., 2007; Maciejewski and Mufti, 2008; Gelsi-Boyer et al., 2009; Thiel et al., 2011).

4.1.10 Auswertung der array-CGH Ergebnisse vor dem Hintergrund genomischer Kopienzahl-Polymorphismen (CNV)

Die methodische Weiterentwicklung der Array-Techniken zur genomweiten Untersuchung submikroskopischer Läsionen lieferte innerhalb der letzten Jahre u. a. einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der genomischen Architektur. Auf diese Weise wurde in großangelegten CNV-Studien mit gesunden Individuen unterschiedlicher Populationen eine Vielzahl struktureller, genomischer Varianten gefunden (Redon et al., 2006; Conrad et al., 2010; Craddock et al., 2010; Perry et al., 2008). Viele der erhobenen CNV-Informationen werden beispielsweise in der frei zugänglichen Internetdatenbank "Database of Genomic Variants" (Iafate et al., 2004) zusammengetragen. Die DGV wurde innerhalb dieser Arbeit zur Beurteilung somatischer Anomalien der array-CGH Analysen herangezogen. Für eine zuverlässigere Auswertung potentiell somatischer CNAs ist jedoch die Verwendung von DNA-Referenzmaterial des gleichen Patienten anzustreben, um patientenspezifische CNVs sicher ausschließen zu können (Heinrichs et al., 2009; Mohamedali et al., 2007; Albertson and Pinkel, 2003). Bei der genomweiten Untersuchung von MDS-Probenmaterial werden insbesondere bei SNP-a Analysen zur Abklärung somatischer UPDs die genomischen Profile der aus Blut separierten CD3-positiven T-Lymphozyten (T-Zellen) untersucht, da diese Zellen normalerweise nicht von der MDS-Pathogenese betroffen sind (Gondek et al., 2007b; Jaju et al., 2000). Vorteilhaft ist, dass die T-Zellen in wenigen Arbeitsschritten über eine CD3-positive Selektion aus dem gleichen Probenmaterial gewonnen werden können. Die Extraktion patientenspezifischer Referenz-DNA ist alternativ auch aus Mundschleimhautzellen möglich.

Konstitutionelle CNVs in Form von homozygoten Deletionen wurden innerhalb dieser Arbeit z.B. auf der 244K Plattform mit einem durchschnittlichen \log_2 ratio von $\leq -2,0$ detektiert und heterozygote CNVs ließen sich durch \log_2 ratios von $\pm 1,0$ und entsprechend hoher p-Werte charakterisieren. Außerdem deuteten gleichzeitig auftretende Deletionen und Zugewinne in der gleichen chromosomalen Region auf das Vorhandensein eines CNVs hin (Tab. 3.3, Abb. 4.1 B). Bis auf den sog. *GSTT1* Null-Genotyp, der bei 9 von 25 untersuchten Patienten (36%) identifiziert wurde, lagen für keinen der weiteren CNVs Informationen aus molekulargenetischen oder funktionellen Untersuchungen bei kindlichen Leukämien vor. In der hier untersuchten Patientenkohorte wurde in Übereinstimmung mit den vorab beschriebenen Ergebnissen von Davies *et al.* kein Unterschied bezüglich der CNV-Häufigkeit im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt (Davies et al., 2000). Im Gegensatz dazu kommen Dahabreh *et al.* bei der Auswertung ihrer Meta-Analyse zu *GSTT1*-Studien mit insgesamt 1471 MDS Fällen und 1907 Kontrollen zu dem Schluss, dass eine signifikante Assoziation zwischen dem *GSTT1* Null-Genotyp und einem erhöhten Risiko zur Entwicklung eines MDS besteht (Dahabreh et al.,

2010). Das Gen *GSTT1* kodiert für eine Glutathion-S-Transferase, die zu einer Gruppe von detoxifizierenden Enzymen gehört und elektrophile Verbindungen und Metabolite mit L-Glutathion umsetzt. Für den Deletionspolymorphismus im *GSTT1* Genort wurde in der Umweltmedizin eine metabolische Relevanz für Umweltschadstoffe beschrieben, molekulargenetische Analysen werden aber auch in diesem Bereich aufgrund der inkonsistenten Datenlage nicht empfohlen (Schulz, 2004).

4.1.11 Möglichkeiten zur Validierung von CNAs

In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden zur Überprüfung von CNAs der array-CGH Analysen angewendet. In Abhängigkeit der CNA-Größe, des verfügbaren Materials und der Fragestellung wurden unter anderem FISH Analysen, qPCR Assays und Sequenzierungen durchgeführt.

Für stabile Chromosomenanomalien wie beispielsweise Monosomie 7 konnte über den etablierten qPCR Assay mit einem PCR-Fragment im *CFTR* Gen eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Karyotypisierung, der FISH Analysen und der array-CGH \log_2 ratios gezeigt werden (Abb. 3.10). Über vergleichbare Ergebnisse der konventionellen Chromosomenanalyse, FISH und array-CGH zum Nachweis sichtbarer Chromosomenveränderungen wie del(5q), del(7q), Monosomie 7 oder Trisomie 8 bei erwachsenen MDS Patienten wurde bereits berichtet (Makishima et al., 2010). Für den Fall, dass beispielsweise ausschließlich DNA-Material der Patienten vorhanden ist oder dass ein genspezifisches PCR Screening bei einer großen Patientenkohorte durchgeführt werden soll, stellt die qPCR eine geeignete Untersuchungsmethode zum relativen Nachweis des Kopienzahlstatus dar (Duno et al., 2004). Am Beispiel des qPCR Assays zur Bestätigung der Monosomie 7 konnte außerdem gezeigt werden, dass hemizygoten Deletionen mit einem minimalen Anteil von 15% bzw. 23% der Zellen bezogen auf die korrespondierenden FISH Ergebnisse durch geringfügig abweichende $\Delta\Delta C_T$ -Werte (0,81 und 0,71) im Vergleich zur diploiden Kontrolle zuverlässig detektiert werden können. Diese Veränderungen wurden aufgrund des Detektionsgrenzwertes nicht mittels array-CGH nachgewiesen (Abb. 3.10). Vergleichbare dynamische Messbereiche (engl. *dynamic range*) von 22% bis 96% (Porta et al., 2007) und 18% bis 95% (Mattarucchi et al., 2006) wurden für Monosomie 7 spezifische qPCR Assays beschrieben. Ein weiterer Vorteil der qPCR ist die hohe Flexibilität beim Design der gen- oder lokusspezifischen Assays, denn die Primersets können individuell generiert werden. Entsprechend wurden qPCR Assays für die Überprüfung des Kopienzahlstatus der Gene *NRAS* und *NF1*, sowie für das Gencluster *HOXA* erstellt, wobei jeweils mindestens 3 Genabschnitte untersucht wurden (Kapitel 3.2.2). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des hochaufgelösten eArrays MDS-1 wurden für *NRAS* und *HOXA* keine Veränderungen der DNA-Kopienzahl im

Vergleich zur diploiden Kontrolle und der entsprechenden Positivkontrollen nachgewiesen (Abb. 3.11). Die teilweise hohen Standardabweichungen der $\Delta\Delta c_T$ -Mittelwerte bei einigen Patienten spiegeln möglicherweise die genomische Variabilität innerhalb der jeweiligen Genorte in Einklang mit den Ergebnissen der array-CGH Analysen (244K) wider. Die heterozygote *NF1*-Deletion bei #D566 wurde dagegen als stabile CNA zuverlässig detektiert (Abb. 3.12).

Neben der quantitativen Überprüfung der array-CGH Ergebnisse erfolgte für die Gene *NRAS* und *MGMT* eine Sequenzanalyse mithilfe der direkten Sequenzierung nach dem Didesoxy-Verfahren (Sanger et al., 1977). In den o.g. Genorten wurden vorab Deletionen auf Basis der array-CGH Daten bei wenig stringenten Filtereinstellungen identifiziert. Für *NRAS* sind sowohl bei erwachsenen MDS Patienten (Christiansen et al., 2005; Bacher et al., 2007) wie auch bei Kindern mit JMML (Flotho et al., 1999) rekurrente Mutationen in den Codons 12, 13, und 61 bekannt, die als Klasse I Mutationen zu einer Aktivierung der RAS-Kaskade führen. Bei den hier untersuchten MDS und JMML Patienten wurden keine pathogenen Mutationen im *NRAS* Gen gefunden, wobei generell über ein geringes Auftreten von *NRAS* Mutationen bei kindlichem MDS berichtet wurde (Jekic et al., 2004). In Übereinstimmung mit den untersuchten Laborparametern innerhalb der EWOG-MDS Studien wurden ferner keine aktivierenden Mutationen bei den Patienten #D402, #D566 und #D581 gefunden (Tab. 3.4). Lediglich ein heterozygoter SNP (rs14804, c.872C>T) wurde in der 3'UTR bei 4 von 12 Patienten identifiziert. Dieser SNP ist downstream der let-7 miRNA Bindungsstelle lokalisiert und befindet sich innerhalb der potentiellen Bindungsstelle für zwei schlecht konservierte miRNAs, miR-218 und miR-636 (TargetScanHuman, Release 5.1). Ein LOH im *NRAS* Genort wurde damit auch auf diesem Wege widerlegt.

Die Auswertung der 8k BAC/PAC Array Daten deutete für den doppelt gespotteten Klon RP11-300B2 (10q26.3) bei in allen Patienten mit Monosomie 7 auf einen Verlust hin. Dieser Klon bildet den 5'UTR Bereich des *MGMT* Gens ab. Die parallele Untersuchung von vier Patienten mit dem Oligonukleotid-basierten Format ergab dagegen keinen Hinweis auf den potentiellen Verlust im *MGMT* Gen, so dass der Klon RP11-300B2 möglicherweise falsch kartiert ist oder eine fehlerhafte Zuordnung des Klons über das *grid file* bei der Auswertung der 8k BAC/PAC Arrays erfolgte. Bei der Sequenzanalyse des *MGMT* Gens wurden bei 8 MDS und JMML Patienten zwei bekannte SNPs (rs1803965 und rs12917) im Exon 3 nachgewiesen (Kapitel 3.3.2). In dieser Arbeit war es aufgrund fehlenden DNA-Referenzmaterials der gleichen Patienten und einer zu geringen Patientenzahl nicht möglich, das somatische Auftreten des SNPs rs12917 zu klären.

4.2 Heterogenität des Probenmaterials

Generell stellt die molekulargenetische Analyse bei MDS aufgrund des oftmals heterogenen Probenmaterials eine Herausforderung dar. Es konnten beispielsweise bislang keine eindeutigen immunphänotypischen Parameter für die betroffenen Zellen identifiziert werden (Falco et al., 2011). In durchflusszytometrischen Studien beim erwachsenen MDS wurde jedoch eine Korrelation zwischen der quantitativen Auswertung der myeloischen Reifung, charakterisiert durch die Expressionslevel von CD34, CD117 und CD11b/CD66, und einer prognostischen Bedeutung für das Überleben der Patienten beobachtet (Falco et al., 2011; van de Loosdrecht et al., 2008).

Eine Ausnahme bildet allerdings die zytogenetisch definierte Subgruppe der erwachsenen MDS Patienten mit 5q-Deletion. Unter anderem konnten Nilsson *et al.* mithilfe von FISH Analysen zeigen, dass in mindestens 92% der multipotenten Stamm- und Vorläuferzellen mit einem distinkten Immunphänotyp (CD34+CD38-Thy1-) der 5q-Verlust auftrat (Nilsson et al., 2007; Nilsson et al., 2000). Ferner wurde in 99% der Granulozyten dieser Patienten die 5q-Deletion nachgewiesen, was die Hypothese bestätigte, dass die gesunden CD34+CD38-Thy1- Zellen durch ihre malignen „Kontrahenten“ vollständig aus dem Knochenmark verdrängt werden (Nilsson et al., 2000).

Eine Untersuchung immunphänotypischer Parameter bei Kindern mit fortgeschrittenen MDS wurde im Jahr 2008 von Veltroni *et al.* vorgestellt. Mithilfe der 4-Farben-Multiparameter-Durchflußzytometrie wurde innerhalb einer kleinen Kohorte mit 26 Patienten ein Phänotyp (CD34+CD117+CD11a+CD11b+CD64-CD65-CD15-) definiert, der signifikant häufiger bei MDS im Vergleich zu AML auftrat. Eine Überprüfung der malignen Zellen hinsichtlich der vorliegenden Chromosomenanomalien wie Monosomie 7 erfolgt in dieser Studie nicht (Veltroni et al., 2009).

Mit dem Ziel, die hämatopoetischen Vorläuferzellen bei MDS zu untersuchen, wurden für einige array-CGH und SNP-a Studien bei Erwachsenen diese Zellen anhand ihrer CD34-Positivität aus dem Knochenmark der Patienten isoliert (Starczynowski et al., 2008; Heinrichs et al., 2009; Gondek et al., 2007a; Vercauteren et al., 2010). Doch auch bei dieser Zellfraktion handelt es sich um eine Mischung aus gesunden und malignen, sowie myeloischen und lymphatischen Vorläuferzellen (McKenna et al., 2001; Loken et al., 2008). Dennoch wurden chromosomale Veränderungen im Vergleich zu den Gesamtzellen des KM (Heinrichs et al., 2009) und im Vergleich zu den Granulozyten des PB (Vercauteren et al., 2010) bei MDS Patienten deutlicher detektiert.

Eine weitere Möglichkeit zur Anreicherung myeloischer Zellen ist die Separation von Knochenmark über eine Dichtegradientenzentrifugation. Dabei erfolgt zwar nur eine Größenauffrennung der Zellen, jedoch konnte übereinstimmend mit den Ergebnissen von Gerritsen *et al.* (Gerritsen et al., 1992) gezeigt werden, dass durch die Verwendung der

Granulozytenfraktion stabile Veränderungen wie z.B. Monosomie 7 deutlichere Ergebnisse bei den array-CGH- und qPCR-Analysen lieferten (Abb. 3.10, Tab. 3.6). Anhand der DLRS-Werte zur Beurteilung der Array-Qualität wurde außerdem deutlich, dass es sich bei dieser Zellfraktion um qualitativ schlechteres Ausgangsmaterial handelt, weil hier nicht nur die intakten Granulozyten sondern vermutlich auch die Verunreinigung des Sediments durch tote Zellen einen Einfluss auf die Präanalytik hat. Die Anreicherung maligner Zellen mithilfe von CFU-Assays und die anschließende Untersuchung der genomischen Profile einzelner Kolonien werden im folgenden Kapitel diskutiert.

4.3 CFC-Assay zur Isolierung klonaler Leukämiezellen bei MDS

Mit dem Ziel, möglichst einheitliche Populationen maligner Zellen zu untersuchen, wurden die hämatopoetischen Zellen eines Patienten (#D762) in CFC-Assays kultiviert. Im Vergleich zur gesunden Kontrolle entwickelten sich bei dem Patienten keine normal großen Kolonien und das Koloniewachstum war stark verzögert (24 Tage), wie es für kindliche und erwachsene RAEB Patienten bereits beschrieben wurde (Bernimoulin et al., 2008; Polychronopoulou et al., 2004; Nissen-Druey et al., 2005). Es konnten lediglich 6 myeloische Zellkolonien und Cluster mit z.T. weniger als 50 Zellen aus dem Methylcellulose-Medium isoliert werden. Die geringe Zellzahl je Kolonie machte eine Amplifikation der genomischen DNA für die nachfolgenden array-CGH Analysen erforderlich. Über das MDA Verfahren wurde ausreichend hochmolekulare DNA erhalten (Spits et al., 2006), wobei die DNA-Integrität über eine gelelektrophoretische Auftrennung kontrolliert wurde (Abb. 3.16). Eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung der Qualität amplifizierter DNA für die Anwendung in der array-CGH wurde in der Arbeit von Knijnenburg *et al.* beschrieben. Mithilfe einer Multiplex-PCR wurden mehrere, unterschiedlich große Amplikons in verschiedenen Genorten in einem Ansatz amplifiziert. Reproduzierbare PCR-Ergebnisse wurden bei der Verwendung von MDA-amplifizierter DNA von mindestens 30 Zellen bzw. 200 pg Ausgangs-DNA erhalten (Knijnenburg et al., 2007).

Insgesamt konnten die Daten der array-CGH Analysen von 6 myeloischen Zellkolonien ausgewertet werden. Die genomischen Profile mit amplifizierter DNA streuten deutlich stärker im Vergleich zu den Ergebnissen der nicht-amplifizierten DNA des gleichen Patienten (Tab. 3.6). Wie schon in mehreren vorangegangenen Studien beschrieben, werden höhere array-CGH Standardabweichungen bzw. DLRS-Werte bei Verwendung von amplifizierter DNA aus Einzelzellen oder einem Pool mit wenigen Zellen erhalten (Le Caignec et al., 2006; Geigl et al., 2009). Neben der gewählten Methode zur WGA kann ebenfalls die DNA-Markierungsreaktion mittels Random Priming, die auf einer Amplifikation mit gleichzeitigem Einbau der Fluoreszenzmoleküle beruht, zu weiteren

Verzerrungen (*bias*) und damit zu einer größeren Streuung der array-CGH Profile führen (Knijnenburg et al., 2007). Bedingt durch die Klonalität der Zellen eines Clusters wurde für die Detektion heterozygoter Veränderungen ein durchschnittlicher \log_2 ratio von $\pm 1,0$ vorausgesetzt. Die Filterkriterien zur Auswertung genomischer Veränderungen der Koloniezellen wurden aufgrund der hohen DLRS-Werte auf einen durchschnittlichen \log_2 ratio aberranter Sonden von $\pm 0,9$ und eine minimale Anzahl aberranter Sonden von 500 (etwa 3,5 Mb) eingestellt. Es wurde außerdem ein ADM-2 Grenzwert von 40 gewählt.

Um den Einfluss der WGA Methode auf die Auswertung der array-CGH Daten bewerten zu können, wurden für die amplifizierte DNA der Kolonie #7 (#D762) zwei Hybridisierungen durchgeführt. Als Referenz-DNA wurde einerseits die nicht-amplifizierte Ref XX und in der zweiten Hybridisierung die auf gleiche Weise amplifizierte Referenz-DNA aus Kolonien gesunder Probanden eingesetzt. Für alle Chromosomen ergab sich ein vergleichbarer Kopienzahlstatus, jedoch wurde eine höhere Standardabweichung bei Verwendung der nicht-amplifizierten Ref XX festgestellt (Abb. 3.17, Tab. 8.4, Anhang). Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen anderer Studien (Knijnenburg et al., 2007; Fuhrmann et al., 2008). Trotz der höheren Standardabweichungen (DLRS-Werte) wurde für alle array-CGH Analysen der myeloischen Kolonien bei #D762 die Ref XX verwendet, weil diese hochmolekulare DNA bereits als Referenz für alle vorangegangenen Experimente diente. Die Wahl der Referenz-DNA wurde in der Literatur bereits kontrovers diskutiert (Lage et al., 2003; Cardoso et al., 2004; Johnson et al., 2006).

Bei den array-CGH Analysen einzelner myeloischer Kolonien konnten für 3 von 6 Kolonien (#3, #6 und #7) Verluste in 17p13.3-p13.1 mit einer Größe von 7,352 Mb identifiziert werden (Abb. 3.19). Deletionen und/oder Mutationen im Tumorsuppressorgen *TP53* sind mit einer schlechten Prognose assoziiert und kommen wie bereits beschrieben (Kapitel 4.1.4) häufig bei Patienten mit fortgeschrittenem MDS vor. Aufgrund fehlenden Materials war eine Überprüfung dieser Deletion an Koloniezellen mithilfe einer weiteren Methode nicht möglich. Die FISH Analysen mit einer kommerziellen Sonde (LSI TP53) an fixierten Knochenmarkzellen und nativen Knochenmarkausstrichen des Patienten #D762 bestätigten die *TP53* Deletion nicht. Für die 3 o.g. Kolonien wurde außerdem eine Deletion in 3p21.1-p31 (4,68 Mb) identifiziert (Abb. 3.19), die mithilfe einer regionsspezifischen BAC-Sonde (RP11-3B7) an den nativen und fixierten Knochenmarkzellen ebenfalls nicht bestätigt werden konnte. Des Weiteren wurden die genomischen Profile aller untersuchten Kolonien mit den array-CGH Ergebnissen der Patientenkohorte verglichen. Es konnten Übereinstimmungen für 5 Deletionen einer Größe zwischen 4,649 und 7,352 Mb nachgewiesen werden (Tab. 3.7). Anhand der vorliegenden array-CGH Daten für die myeloischen Kolonien kann eine Existenz kleiner Zellpopulationen mit zusätzlichen genomischen Aberrationen, die in den CFC-Assays

auswachsen, nicht eindeutig belegt werden. Die Analyse einer größeren Anzahl myeloischer Kolonien mehrerer Patienten ist unter anderem erforderlich, um potentielle Läsionen eingehender untersuchen zu können. Außerdem sind weiterführende Experimente an dieser Stelle notwendig, um beispielsweise die Kultivierungsbedingungen der hämatopoetischen Zellen zu optimieren. Wie Thompson *et al.* bei erwachsenen MDS Patienten zeigen konnte, wachsen die HSZ im Methylcellulose-Medium unter hypoxischen Bedingungen deutlich besser (Thompson *et al.*, 2007).

4.4 Molekulare Pathogenese der Myelodysplastischen Syndrome

Bislang sind die krankheitsauslösenden Ursachen für *de novo* MDS im Erwachsenen- und Kindesalter bei mehr als 90% der Patienten nicht bekannt (Hasle, 2011; Hofmann *et al.*, 2011). Neben der Einwirkung von ionisierender Strahlung, Zytostatika oder chemischen Substanzen werden auch familiäre Erkrankungsformen beschrieben. Weil MDS eine sehr heterogene Gruppe darstellen, sind wahrscheinlich unterschiedliche Mechanismen für die Entstehung und Progression dieser Erkrankung verantwortlich.

Auf molekularer Ebene scheint die Pathogenese des MDS ein mehrstufiger Prozess zu sein (Nolte and Hofmann, 2009). In frühen MDS Stadien wird ein verstärktes Absterben der Vorläuferzellen beobachtet (Clark and Lampert, 1990; Parker *et al.*, 1998; Raza *et al.*, 1995), wohingegen in fortgeschrittenen Stadien durch die maligne Transformation der hämatopoetischen Stammzelle die Fähigkeit zur Apoptose verlorengeht und sich vermehrt unreife Blasten im Knochenmark und im Blut ansammeln. Als zugrunde liegender Mechanismus wird wie bei vielen anderen Krebserkrankungen die sog. Zweitschritthypothese der Tumorentstehung von Knudson diskutiert (Knudson, Jr., 1971). Nach diesem Model führt eine Inaktivierung beider Allele eines Gens durch Mutation und/oder Deletion zu einem Funktionsverlust. Des Weiteren wurden bei MDS epigenetische Alterationen gefunden, so dass insgesamt die Akkumulation von verschiedenen molekularen Veränderungen bei Transkriptionsfaktoren, Tumorsuppressorgenen und Genen des Zellzyklus und der DNA-Reparatur ein dereguliertes Expressionsmuster zur Folge hat (Hofmann and Koeffler, 2002). So zeigte sich bei erwachsenen MDS Patienten in epigenetischen Studien, dass eine verstärkte globale Methylierung der CpG-Inseln in den Promotor-Regionen von Genen vorliegt (Jiang *et al.*, 2009; Issa *et al.*, 1997). Durch den Einsatz von demethylierenden Substanzen konnte insbesondere für erwachsene Patienten mit Hochrisiko-MDS ein gutes Therapieansprechen und geringeres Risiko für den Übergang zur AML festgestellt werden (Leone *et al.*, 2002).

Durch die (Weiter-) Entwicklung molekulargenetischer Methoden wie beispielsweise die genomweiten Array-Techniken zur Analyse submikroskopischer Aberrationen und der hochauflösenden Sequenzierung (engl. *next generation sequencing*, NGS) zur Untersuchung kompletter Genome oder Exome (Gesamtheit der kodierenden Sequenzen), wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl molekulargenetischer Studien vorwiegend beim erwachsenen MDS durchgeführt.

Mithilfe von hochauflösenden SNP-a Analysen wurden u.a. große Bereiche kopienzahlneutraler UPDs und kleine Deletionen in 4q bei Patienten mit myelodysplastischen und myeloproliferativen Neoplasien gefunden (Langemeijer et al., 2009; Delhommeau et al., 2009; Jankowska et al., 2009). Innerhalb der kleinsten, rekurrenten LOH Region in 4q24 liegt das Gen *TET2* (Tet Methylcytosine Dioxygenase 2), das für ein Enzym kodiert, was die Hydroxylierung von 5-Methylcytosin in CpG-Inseln katalysiert und eine wichtige Rolle in der normalen Myelopoese spielt (Ko et al., 2010). Bei der Sequenzanalyse von *TET2* wurden bei 14% bis 26% der untersuchten MDS Patienten viele unterschiedliche Mutationen in den kodierenden Abschnitten gefunden, so dass *TET2* als potentiell Tumor-suppressorgen bei MDS identifiziert wurde. In der Studie von Langemeijer *et al.* wurden bei 104 Kindern mit AML und B-ALL, den am häufigsten vorkommenden hämatologischen Erkrankungen im Kindesalter, *TET2* Mutationen untersucht (Langemeijer et al., 2011). Bei nur 4% der kindlichen AML Patienten wurden Mutationen im *TET2* Gen festgestellt, womit ein wesentlich geringeres Auftreten im Vergleich zu erwachsenen AML Patienten ermittelt wurde. Informationen zu *TET2* Mutationen bei kindlichen myelodysplastischen Syndromen liegen bislang noch nicht vor. In der hier untersuchten MDS Patientenkohorte wurden keine submikroskopischen Deletion in 4q24 gefunden.

Als zweithäufigste, genetische Anomalien wurden bei 6% bis 20% der erwachsenen MDS Mutationen im *ASXL1* Gen identifiziert, das als Tumorsuppressorgen bei der epigenetischen Regulation eine Rolle spielt (Gelsi-Boyer et al., 2009; Boulwood et al., 2010; Thol et al., 2011a). Außerdem wurden weitere genetische Läsionen bei MDS in folgenden Genen gefunden, die an der epigenetischen Modifikation der DNA beteiligt sind: *EZH2*, das für eine Histon-Methyltransferase kodiert und in 7q36.1 lokalisiert ist (Ernst et al., 2010); *DNMT3A*, das ebenfalls für eine Methyltransferase kodiert (Thol et al., 2011b); *IDH1*, das für ein zytoplasmatisches Enzym (Isocitrate Dehydrogenase) kodiert und indirekt die DNA-Hypomethylierungsfunktion von *TET2* blockiert (Thol et al., 2010; Figueroa et al., 2010). Zusammengefasst unterstreichen diese neuen molekulargenetischen Ergebnisse, dass epigenetische Modifikationen bei der Pathogenese des MDS einen sehr bedeutenden Einfluss haben.

4.5 Ausblick: Pathogenese und Diagnostik bei MDS

Seit Einführung der ersten Klassifikation für die myelodysplastischen Syndrome im Erwachsenenalter vor etwa 30 Jahren (Bennett et al., 1982) wurden u.a. in einer der weltweit umfangreichsten MDS Datenbanken, dem Düsseldorfer MDS Register, bislang mehr als 3500 Patienten aufgenommen. Durch eine systematische Auswertung der morphologischen, klinischen, zytogenetischen und molekulargenetischen Daten der Patienten und der kontinuierlichen Asservierung von Verlaufspuben können prospektiv wertvolle Informationen zur MDS Pathogenese gewonnen werden (Germing and Haas, 2009). Im Jahr 1993 wurde die „European Working Group of MDS in Childhood“ (EWOG-MDS) gegründet, bei der über die EWOG-Studienzentrale (Uniklinik Freiburg) klinische Daten und Probenmaterial der kindlichen MDS und JMML Patienten systematisch erfasst und asserviert werden. Aufgrund der weitaus geringeren Patientenzahlen bedingt durch das seltene Auftreten dieser hämatologischen Neoplasien im Kindesalter, wurden beispielsweise nur wenige molekulargenetische Studien zur Untersuchung genomischer Veränderungen in der Gruppe der kindlichen MDS durchgeführt. Im Gegensatz dazu konnte die Pathogenese bei JMML innerhalb der EWOG-MDS Studien auf molekularer Ebene detailliert untersucht werden. Bei dieser Erkrankung handelt es sich um eine myeloproliferative Neoplasie, bei der vorwiegend die malignen Monozyten und Granulozyten im Untersuchungsgut zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zu finden sind. Es wurden molekulare Läsionen in unterschiedlichen Genen innerhalb des RAS-Signalweges bei JMML gefunden, die eine maligne Proliferation der myeloischen Zellen auslösen (Flotho et al., 1999; Flotho et al., 2007; Niemeyer et al., 2010; Steinemann et al., 2010). Zusätzlich lieferte die Auswertung der Verlaufsdaten innerhalb der EWOG-MDS Studien für MDS und JMML Patienten nach Stammzelltransplantation wichtige Erkenntnisse zur Umsetzung verbesserter Therapiemöglichkeiten (Locatelli et al., 2005; Strahm et al., 2011).

Eine große Herausforderung für die Analyse erkrankungsspezifischer, molekularer Mechanismen bei MDS stellt die Heterogenität des Probenmaterials dar. Während bei der Untersuchung akuter Leukämien bereits etablierte Zellkulturmodelle zur Verfügung stehen, gibt es für *in vitro* Experimente bei MDS nach der Beurteilung von Drexler *et al.*, die insgesamt 31 aus MDS abstammende Zelllinien untersuchten, möglicherweise nur drei nicht ausreichend charakterisierte Modellsysteme, die alle während der leukämischen Phase (RAEB oder RAEB-T) der Patienten etabliert wurden (Drexler et al., 2009). Bei der Generierung von Mausmodellen wird ebenfalls deutlich, dass es nach wie vor nicht möglich war, alle phänotypischen Merkmale der MDS in einem einzigen Modell umzusetzen (Wegrzyn et al., 2011). So wurden beispielsweise Mausmodelle mit einem großen, synthetischen Verlust in 5q generiert, die analog zur humanen, deletierten Region

das kritische Gen *RPS14* enthalten (Ebert et al., 2008; Barlow et al., 2010). Des Weiteren wurden mithilfe transgener und knockout-Mäuse der Einfluss des *NUP98/HOXD13*-Fusionsgens als potentieller Inhibitor der normalen myeloischen Differenzierung (Pineault et al., 2003; Choi et al., 2009) und der Einfluss des Mikroumfelds (engl. *microenvironment*) der umgebenden Stromazellen untersucht (Raaijmakers et al., 2010; Calvi et al., 2003). Trotz aller Schwierigkeiten bei der Umsetzung, wird die Generierung eines Mausmodells mit einem kompletten MDS Phänotyp gefordert, um zukünftig neue Medikamente oder eine prä-klinische Evaluation neuer Therapieansätze durchführen zu können (Wegrzyn et al., 2011).

Eine Basis für weitere molekulare Untersuchungen zur Identifikation rekurrenter Anomalien bei kindlichen und erwachsenen MDS wird die Anwendung von hochauflösenden Sequenzierungstechniken wie z.B. NGS sein. Mithilfe dieser neuen Verfahren können mehrere Tausend bis zu einer Million Sequenzierungsreaktionen parallel ablaufen, so dass eine vollständige Sequenzanalyse potentieller Kandidatengene oder die Sequenzierung kompletter Genome oder Exome möglich ist. Die jeweiligen Genabschnitte werden in der mehrstufigen Präanalytik angereichert (engl. *sequence capture*) und anschließend im Hochdurchsatz sequenziert. Je nach Abdeckung (engl. *coverage*) der Amplikons können seltene Sequenzvarianten mit einer Nachweisgrenze von 1% bis 5% detektiert werden. Diese verbesserte Sensitivität und die Möglichkeit zur massiven, parallelen Sequenzanalyse der NGS-Technologie bietet bei der molekularen Analyse der MDS im Vergleich zu den Standardmethoden den Vorteil, dass auch in kleinen malignen Klonen Mutationen in potentiellen Kandidatengenomen identifiziert werden können (Smith et al., 2010; Welch and Link, 2011). In ihrer aktuellen Untersuchung konnten Ding *et al.* ebenfalls Hinweise auf eine klonale Evolution bei AML erhalten, indem sie Genom-Sequenzierungen von Probenmaterial zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf (Diagnose und Rezidiv) individueller Patienten durchführten (Ding et al., 2012).

Am Beispiel der Identifikation der *BRAF V600E* Mutation bei der Haarzell-Leukämie (HZZ) konnte gezeigt werden, dass diese Läsion eine Aktivierung der RAS-Signalkaskade in den malignen Zellen auslöst (Tiacci et al., 2011). Die *BRAF V600E* Mutation lässt sich mithilfe sensitiver Schmelzkurvenanalysen selbst bei einer geringen Mengen zirkulierender „haariger Zellen“ im PB nachweisen und bei unklarer Morphologie bietet der Mutationsnachweis ein Unterscheidungskriterium im Vergleich zu anderen NHL (Tiacci et al., 2012). Ähnliche molekulare Marker wären für eine frühe und sichere Diagnose eines MDS und auch für die Progression in eine AML sehr wünschenswert.

Es zeigte sich bei den zytogenetischen und molekulargenetischen Untersuchungen der MDS in den letzten Jahren, dass nicht nur eine einzige, sondern viele unterschiedliche Mutationen auftreten. Diese Beobachtungen decken sich mit der ausgeprägten Heterogenität der Erkrankung, wobei die bislang identifizierten Gene und Genmutationen vor dem Hintergrund ihrer Wirkung innerhalb der betroffenen Signalwege oder ihrer Funktion bei epigenetischen Modifikationen zusammen bewertet werden müssen (Schlegelberger et al., 2012). Durch die neu identifizierten, molekulargenetischen Parameter wie z.B. *TET2* oder *TP53* Mutationen, können hilfreiche Informationen zur Diagnosestellung und Prognoseabschätzung gewonnen werden. Es ist zu erwarten, dass diese Analysen in nächster Zeit in der hämatologischen Diagnostik bei MDS im Erwachsenenalter Einzug finden. Durch die derartige Identifikation potentieller Targets könnten möglicherweise in Zukunft nicht nur prognostische Aussagen getroffen werden, sondern auch Aussagen für die Stratifizierung beim Einsatz neuer Medikamente.

5 Zusammenfassung

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind eine heterogene Gruppe myeloischer Erkrankungen, die durch eine ineffektive Hämatopoese mit Dysplasien und Zytopenien einer oder mehrerer hämatopoetischer Zellreihen gekennzeichnet sind. Bei älteren Erwachsene gehören MDS zu den häufigsten hämatologischen Erkrankungen, wohingegen MDS im Kindesalter selten ist. Bei etwa 50% der Patienten werden zytogenetische Anomalien identifiziert, wobei Monosomie 7 die häufigste numerische Chromosomenanomalie im Kindesalter darstellt. Während zytogenetische Profile wichtige Informationen zur Prognose und dem möglichen Erkrankungsprogress der Patienten liefern, sind die grundlegenden Läsionen, die zur Entwicklung von MDS im Kindesalter führen, noch weitgehend unbekannt. Zur Untersuchung genomischer Imbalancen bei MDS im Kindesalter wurden bei 58 MDS und JMML Patienten hochauflösende BAC/PAC und Oligonukletid array-basierte Methoden zur komparativen genomische Hybridisierung (array-CGH) eingesetzt. Innerhalb der MDS Kohorte wurden für vereinzelte Patienten chromosomale Alterationen identifiziert, die eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der MDS im Kindesalter spielen können. Unter anderem wurden folgende Deletionen gefunden: in 3p14.3-p12.3 (Verlust des Tumorsuppressorgens *FHIT*), in 6q23 (Verlust von *MYB*), in 7p21.3-p15.3, in 9q33.3-q34.3 und in 17p13 (Verlust des Tumorsuppressorgens *TP53*). Abgesehen von der bereits bekannten *NF1* Deletion bei einem Patienten wurden keine weiteren genomischen Alterationen in der Gruppe der JMML nachgewiesen. Viele der kleinen Kopienzahlveränderungen, die mithilfe der hochauflösenden Oligonukletid array-CGH Plattform identifiziert wurden, konnten mit unabhängigen Methoden nicht bestätigt werden. Dagegen wurden stabile chromosomale Aberrationen, wie z.B. Monosomie 7, *NF1* Deletion oder konstitutionelle Kopienzahlpolymorphismen (CNV) aufgrund hetero- oder homozygoten Alterationen unter Anwendung quantitativer real-time PCR auf genomischer Ebene oder FISH Analysen zuverlässig bestätigt.

Zusätzlich wurden verschiedene Strategien getestet, wie z.B. die parallele Untersuchung von Granulozyten und mononukleären Knochenmarkzellen des gleichen Patienten oder die Analyse amplifizierter DNA einzelner myeloischer Kolonien, um kleine Subpopulationen malignen Zellen bei MDS mit hochauflösender array-CGH zu charakterisieren. Für die Granulozytenfraktion wurden robustere array-CGH Ergebnisse im Vergleich zu den mononukleären Zellen erhalten und bei der Isolierung einzelner Kolonien der Colony Forming Cell (CFC) Assays zeigten sich ebenfalls sehr reine Zellfraktionen. Aufgrund starker Streuung bei der Analyse amplifizierter DNA aus myeloischen Kolonien wurden ausschließlich große Kopienzahlveränderungen ausgewertet, die jedoch nicht über unabhängige Methoden validiert werden konnten. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei MDS kleine Subpopulationen vorliegen, die in den CFC Assays wachsen. Weitere Studien mit verbesserten Protokollen zur Zellkultivierung und die Analyse einer größeren Anzahl von Kolonien je Patient sind notwendig, um zu klären, ob die Untersuchung einzelner myeloischer Kolonien eine Möglichkeit sein könnte, um die Heterogenität des Tumormaterials bei MDS zu überwinden.

Zusammenfassend liefern die vorliegenden Ergebnisse einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung genomischer Veränderungen in dieser kleinen Subgruppe der myeloischen Erkrankungen im Kindesalter.

Schlagwörter: Myelodysplastische Syndrome im Kindesalter, array-CGH, chromosomale Aberrationen

6 Abstract

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of myeloid disorders characterized by an ineffective hematopoiesis with dysplasia and cytopenias affecting one or more hematopoietic lineages. In the elderly, MDS constitute one of the most frequent hematologic malignancies, but MDS is a rare disease in childhood. In approximately 50% of patients, cytogenetic abnormalities were found, with monosomy 7 being the most frequent alteration in children. While distinct cytogenetic profiles yield some important information for patient's prognosis and disease progression, the underlying genetic defects predisposing to MDS in children are largely unknown.

To study genomic imbalances in childhood MDS, high-resolution BAC/PAC and oligonucleotide array-based comparative genome hybridization (array-CGH) were applied to a series of 58 pediatric MDS and JMML patients. Within the MDS cohort, subtle chromosomal alterations containing potential candidate genes, which may play an important role in the pathogenesis of childhood MDS, could be identified in individual cases. They included a loss of 3p14.3-p12.3, which contains the putative tumor suppressor gene *FHIT*, a deletion of 6q23 containing *MYB*, a loss of 7p21.3-p15.3, a loss of 9q33.3-q34.3 and loss of 17p13 containing *TP53*. With the exception of the already known *NF1* deletion in one patient, no additional genomic alterations could be identified in the group of JMML. While several small copy number changes revealed by high-resolution oligonucleotide array-CGH could not be validated by independent methods, stable chromosomal aberrations, e.g. monosomy 7, *NF1* deletion or constitutional copy number polymorphisms (CNV) in the case of hemi- and homozygous alterations could be reliably detected by applying a quantitative real-time PCR approach on the genomic level or FISH analysis.

Moreover, different approaches, e.g. paired analysis of different cell populations from the same patient or the analysis of single myeloid colonies, were investigated to overcome the difficulty of characterizing small tumor subpopulations in MDS by high-resolution array-CGH. The granulocytic cell fraction gave more robust results in comparison to mononuclear cells, while array-CGH data from distinct colonies obtained from one MDS patient revealed highly pure cell fractions. Due to noisier profiles of amplified DNA, only gross copy number changes were seen that could not be validated by independent methods. Although it cannot be excluded that very small populations were present and grew into colonies in the Colony Forming Cell (CFC) assays, further studies with improved cell cultivation protocols and screening of a larger number of colonies per patient are needed to elucidate whether array-CGH on distinct myeloid colonies might be useful to overcome the inherent problem of cell heterogeneity in the bone marrow of MDS patients. In conclusion, these observations may yield an important contribution to elucidate genomic changes in this small subset of myeloid disorders in children.

Keywords: myelodysplastic syndromes in childhood, array-CGH, chromosomal aberrations

7 Literaturverzeichnis

Ahn SM, Kim TH, Lee S, Kim D, Ghang H, Kim DS, Kim BC, Kim SY, Kim WY, Kim C, Park D, Lee YS, Kim S, Reja R, Jho S, Kim CG, Cha JY, Kim KH, Lee B, Bhak J, and Kim SJ. 2009. The first Korean genome sequence and analysis: full genome sequencing for a socio-ethnic group. *Genome Res* 19:1622-1629.

Akagi T, Shih LY, Ogawa S, Gerss J, Moore SR, Schreck R, Kawamata N, Liang DC, Sanada M, Nannya Y, Deneberg S, Zachariadis V, Nordgren A, Song JH, Dugas M, Lehmann S, and Koeffler HP. 2009. Single nucleotide polymorphism genomic arrays analysis of t(8;21) acute myeloid leukemia cells. *Haematologica* 94:1301-1306.

Albertson DG, and Pinkel D. 2003. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum Mol Genet* 12 Spec No 2:R145-R152.

Armengol L, Villatoro S, Gonzalez JR, Pantano L, Garcia-Aragones M, Rabionet R, Caceres M, and Estivill X. 2009. Identification of copy number variants defining genomic differences among major human groups. *PLoS One* 4:e7230.

Aul C, Bowen DT, and Yoshida Y. 1998. Pathogenesis, etiology and epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 83:71-86.

Aul C, Giagounidis A, and Germing U. 2001. Epidemiological features of myelodysplastic syndromes: results from regional cancer surveys and hospital-based statistics. *Int J Hematol* 73:405-410.

Bacher U, Haferlach T, Kern W, Haferlach C, and Schnittger S. 2007. A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 92:744-752.

Barlow JL, Drynan LF, Hewett DR, Holmes LR, Lorenzo-Abalde S, Lane AL, Jolin HE, Pannell R, Middleton AJ, Wong SH, Warren AJ, Wainscoat JS, Boulwood J, and McKenzie AN. 2010. A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q- syndrome. *Nat Med* 16:59-66.

Baumann I, Niemeyer CM, Bennett JM, and Shannon K. 2008. Childhood myelodysplastic syndrome. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, editors. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC Press, pp 104-107.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, and Sultan C. 1982. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 51:189-199.

Bentz M, Plesch A, Stilgenbauer S, Döhner H, and Lichter P. 1998. Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 21:172-175.

Bernimoulin M, Stern M, Tichelli A, Jotterand M, Gratwohl A, and Nissen C. 2008. Leukemic cluster growth in culture is an independent risk factor for acute myeloid leukemia and short survival in patients with myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol* 119:226-235.

Boehrer S, Ades L, Tajeddine N, Hofmann WK, Kriener S, Bug G, Ottmann OG, Ruthardt M, Galluzzi L, Fouassier C, Tailler M, Olaussen KA, Gardin C, Eclache V, de BS, Thepot S, Fenaux P, and Kroemer G. 2009. Suppression of the DNA damage response in acute myeloid leukemia versus myelodysplastic syndrome. *Oncogene* 28:2205-2218.

Boulwood J, Perry J, Pellagatti A, Fernandez-Mercado M, Fernandez-Santamaria C, Calasanz MJ, Larrayoz MJ, Garcia-Delgado M, Giagounidis A, Malcovati L, la Porta MG, Jadersten M, Killick S, Hellstrom-Lindberg E, Cazzola M, and Wainscoat JS. 2010. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 24:1062-1065.

Boulwood J, and Wainscoat JS. 2001. Clonality in the myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol* 73:411-415.

Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringham FR, Milner LA, Kronenberg HM, and Scadden DT. 2003. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425:841-846.

Cardoso J, Molenaar L, de Menezes RX, Rosenberg C, Morreau H, Moslein G, Fodde R, and Boer JM. 2004. Genomic profiling by DNA amplification of laser capture microdissected tissues and array CGH. *Nucleic Acids Res* 32:e146.

Choi CW, Chung YJ, Slape C, and Aplan PD. 2009. A NUP98-HOXD13 fusion gene impairs differentiation of B and T lymphocytes and leads to expansion of thymocytes with partial TCRB gene rearrangement. *J Immunol* 183:6227-6235.

Christiansen DH, Andersen MK, Desta F, and Pedersen-Bjergaard J. 2005. Mutations of genes in the receptor tyrosine kinase (RTK)/RAS-BRAF signal transduction pathway in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 19:2232-2240.

Clark DM, and Lampert IA. 1990. Apoptosis is a Common Histopathological Finding in Myelodysplasia: the Correlate of Ineffective Haematopoiesis. *Leuk Lymphoma* 2:415-418.

Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, Aerts J, Andrews TD, Barnes C, Campbell P, Fitzgerald T, Hu M, Ihm CH, Kristiansson K, Macarthur DG, MacDonald JR, Onyiah I, Pang AW, Robson S, Stirrups K, Valsesia A, Walter K, Wei J, Tyler-Smith C, Carter NP, Lee C, Scherer SW, and Hurles ME. 2010. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* 464:704-712.

Corey SJ, Minden MD, Barber DL, Kantarjian H, Wang JC, and Schimmer AD. 2007. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nat Rev Cancer* 7:118-129.

Coutinho LH, Gilleece MH, DeWinter EA, Will A, and Testa NG. 1993. Clonal and long-term cultures using human bone marrow. In: Testa NG, Molineux G, editors. *Haemopoiesis: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press, pp 75-106.

Craddock N, Hurles ME, Cardin N, Pearson RD, Plagnol V, Robson S, Vukcevic D, Barnes C, Conrad DF, Giannoulatou E, Holmes C, Marchini JL, Stirrups K, Tobin MD, Wain LV, Yau C, Aerts J, Ahmad T, Andrews TD, Arbury H, Attwood A, Auton A, Ball SG, Balmforth AJ, Barrett JC, Barroso I, Barton A, Bennett AJ, Bhaskar S, Blaszczyk K, Bowes J, Brand OJ, Braund PS, Bredin F, Breen G, Brown MJ, Bruce IN, Bull J, Burren OS, Burton J, Byrnes J, Caesar S, Clee CM, Coffey AJ, Connell JM, Cooper JD, Dominiczak AF, Downes K, Drummond HE, Dudakia D, Dunham A, Ebbs B, Eccles D, Edkins S, Edwards C, Elliot A, Emery P, Evans DM, Evans G, Eyre S, Farmer A, Ferrier IN, Feuk L, Fitzgerald T, Flynn E, Forbes A, Forty L, Franklyn JA, Freathy RM, Gibbs P, Gilbert P, Gokumen O, Gordon-Smith K, Gray E, Green E, Groves CJ, Grozeva D, Gwilliam R, Hall A, Hammond N, Hardy M, Harrison P, Hassanali N, Hebaishi H, Hines S, Hinks A, Hitman GA, Hocking L, Howard E, Howard P, Howson JM, Hughes D, Hunt S, Isaacs JD, Jain M, Jewell DP, Johnson T, Jolley JD, Jones IR, Jones LA, Kirov G, Langford CF, Lango-Allen H, Lathrop GM, Lee J, Lee KL, Lees C, Lewis K, Lindgren CM, Maisuria-Armer M, Maller J, Mansfield J, Martin P, Massey DC, McArdle WL, McGuffin P, McLay KE, Mentzer A, Mimmack ML, Morgan AE, Morris AP, Mowat C, Myers S, Newman W, Nimmo ER, O'Donovan MC, Onipinla A, Onyiah I, Ovington NR, Owen MJ, Palin K, Parnell K, Pernet D, Perry JR, Phillips A, Pinto D, Prescott NJ, Prokopenko I, Quail MA, Rafelt S, Rayner NW, Redon R, Reid DM, Renwick, Ring SM, Robertson N, Russell E, St CD, Sambrook JG, Sanderson JD, Schuilenburg H, Scott CE, Scott R, Seal S, Shaw-Hawkins S, Shields BM, Simmonds MJ, Smyth DJ, Somaskantharajah E, Spanova K, Steer S, Stephens J, Stevens HE, Stone MA, Su Z, Symmons DP, Thompson JR, Thomson W, Travers ME, Turnbull C, Valsesia A, Walker M, Walker NM, Wallace C, Warren-Perry M, Watkins NA, Webster J, Weedon MN, Wilson AG, Woodburn M, Wordsworth BP, Young AH, Zeggini E, Carter NP, Frayling TM, Lee C, McVean G, Munroe PB, Palotie A, Sawcer SJ, Scherer SW, Strachan DP, Tyler-Smith C, Brown MA, Burton PR, Caulfield MJ, Compston A, Farrall M, Gough SC, Hall AS, Hattersley AT, Hill AV, Mathew CG, Pembrey M, Satsangi J, Stratton MR, Worthington J, Deloukas P, Duncanson A, Kwiatkowski DP, McCarthy MI, Ouwehand W, Parkes M, Rahman N, Todd JA, Samani NJ, and Donnelly P. 2010. Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 464:713-720.

Dahabreh IJ, Giannouli S, Gota V, and Voulgarelis M. 2010. GSTT1 and GSTM1 polymorphisms and myelodysplastic syndrome risk: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 126:1716-1723.

Davids MS, and Steensma DP. 2010. The molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Cancer Biol Ther* 10:309-319.

Davies JJ, Wilson IM, and Lam WL. 2005. Array CGH technologies and their applications to cancer genomes. *Chromosome Res* 13:237-248.

Davies SM, Robison LL, Buckley JD, Radloff GA, Ross JA, and Perentesis JP. 2000. Glutathione S-transferase polymorphisms in children with myeloid leukemia: a Children's Cancer Group study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:563-566.

Dayyani F, Conley AP, Strom SS, Stevenson W, Cortes JE, Borthakur G, Faderl S, O'Brien S, Pierce S, Kantarjian H, and Garcia-Manero G. 2010. Cause of death in patients with lower-risk myelodysplastic syndrome. *Cancer* 116:2174-2179.

Dean FB, Hosono S, Fang L, Wu X, Faruqi AF, Bray-Ward P, Sun Z, Zong Q, Du Y, Du J, Driscoll M, Song W, Kingsmore SF, Egholm M, and Lasken RS. 2002. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:5261-5266.

Delhommeau F, Dupont S, Della V, V, James C, Trannoy S, Masse A, Kosmider O, Le Couedic JP, Robert F, Alberdi A, Lecluse Y, Plo I, Dreyfus FJ, Marzac C, Casadevall N, Lacombe C, Romana SP, Dessen P, Soulier J, Viguie F, Fontenay M, Vainchenker W, and Bernard OA. 2009. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 360:2289-2301.

Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, Ritchey JK, Young MA, Lamprecht T, McLellan MD, McMichael JF, Wallis JW, Lu C, Shen D, Harris CC, Dooling DJ, Fulton RS, Fulton LL, Chen K, Schmidt H, Kalicki-veizer J, Magrini VJ, Cook L, McGrath SD, Vickery TL, Wendl MC, Heath S, Watson MA, Link DC, Tomasson MH, Shannon WD, Payton JE, Kulkarni S, Westervelt P, Walter MJ, Graubert TA, Mardis ER, Wilson RK, and DiPersio JF. 2012. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 481:506-510.

Drexler HG, Dirks WG, and Macleod RA. 2009. Many are called MDS cell lines: one is chosen. *Leuk Res* 33:1011-1016.

Druck T, Hadaczek P, Fu TB, Ohta M, Siprashvili Z, Baffa R, Negrini M, Kastury K, Veronese ML, Rosen D, Rothstein J, McCue P, Cotticelli MG, Inoue H, Croce CM, and Huebner K. 1997. Structure and expression of the human FHIT gene in normal and tumor cells. *Cancer Res* 57:504-512.

Duno M, Hove H, Kirchhoff M, Devriendt K, and Schwartz M. 2004. Mapping genomic deletions down to the base: a quantitative copy number scanning approach used to characterise and clone the breakpoints of a recurrent 7p14.2p15.3 deletion. *Hum Genet* 115:459-467.

Ebert BL, Pretz J, Bosco J, Chang CY, Tamayo P, Galili N, Raza A, Root DE, Attar E, Ellis SR, and Golub TR. 2008. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 451:335-339.

Elghetany MT. 2007. Myelodysplastic syndromes in children: a critical review of issues in the diagnosis and classification of 887 cases from 13 published series. *Arch Pathol Lab Med* 131:1110-1116.

Emanuel PD. 2004. Juvenile myelomonocytic leukemia. *Curr Hematol Rep* 3:203-209.

Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, Waghorn K, Zoi K, Ross FM, Reiter A, Hochhaus A, Drexler HG, Duncombe A, Cervantes F, Oscier D, Boultonwood J, Grand FH, and Cross NC. 2010. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet* 42:722-726.

Evers C, Beier M, Poelitz A, Hildebrandt B, Servan K, Drechsler M, Germing U, Royer HD, and Royer-Pokora B. 2007. Molecular definition of chromosome arm 5q deletion end points and detection of hidden aberrations in patients with myelodysplastic syndromes and isolated del(5q) using oligonucleotide array CGH. *Genes Chromosomes Cancer* 46:1119-1128.

Falco P, Levis A, Stacchini A, Ciriello MM, Geuna M, Notari P, Omede P, Pautasso M, Prato G, Stroia G, Gioia D, Bonferroni M, Cametti G, Ferrero D, Freilone R, Gaidano G, Marinone C, Marmont F, Pollio B, Salvi F, Saglio G, and Girotto M. 2011. Prognostic relevance of cytometric quantitative assessment in patients with myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol* 87:409-418.

Feinberg AP, and Vogelstein B. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132:6-13.

Fiegler H, Carr P, Douglas EJ, Burford DC, Hunt S, Scott CE, Smith J, Vetrie D, Gorman P, Tomlinson IP, and Carter NP. 2003. DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer* 36:361-374.

Fiegler H, Geigl JB, Langer S, Rigler D, Porter K, Unger K, Carter NP, and Speicher MR. 2007. High resolution array-CGH analysis of single cells. *Nucleic Acids Res* 35:e15.

Figuerola ME, bdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, Li Y, Bhagwat N, Vasanthakumar A, Fernandez HF, Tallman MS, Sun Z, Wolniak K, Peeters JK, Liu W, Choe SE, Fantin VR, Paietta E, Lowenberg B, Licht JD, Godley LA, Delwel R, Valk PJ, Thompson CB, Levine RL, and Melnick A. 2010. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 18:553-567.

Flotho C, Kratz C, and Niemeyer CM. 2007. Targeting RAS signaling pathways in juvenile myelomonocytic leukemia. *Curr Drug Targets* 8:715-725.

Flotho C, Valcamonica S, Mach-Pascual S, Schmahl G, Corral L, Ritterbach J, Hasle H, Arico M, Biondi A, and Niemeyer CM. 1999. RAS mutations and clonality analysis in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). *Leukemia* 13:32-37.

- Fuhrmann C, Schmidt-Kittler O, Stoecklein NH, Petat-Dutter K, Vay C, Bockler K, Reinhardt R, Ragg T, and Klein CA. 2008. High-resolution array comparative genomic hybridization of single micrometastatic tumor cells. *Nucleic Acids Res* 36:e39.
- Garcia P, Clarke M, Vegiopoulos A, Berlanga O, Camelo A, Lorvellec M, and Frampton J. 2009. Reduced c-Myb activity compromises HSCs and leads to a myeloproliferation with a novel stem cell basis. *EMBO J* 28:1492-1504.
- Garnis C, Coe BP, Lam SL, MacAulay C, and Lam WL. 2005. High-resolution array CGH increases heterogeneity tolerance in the analysis of clinical samples. *Genomics* 85:790-793.
- Geigl JB, Obenauf AC, Waldispuehl-Geigl J, Hoffmann EM, Auer M, Hormann M, Fischer M, Trajanoski Z, Schenk MA, Baumbusch LO, and Speicher MR. 2009. Identification of small gains and losses in single cells after whole genome amplification on tiling oligo arrays. *Nucleic Acids Res* 37:e105.
- Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccia N, Lagarde A, Prebet T, Nezri M, Sainy D, Olschwang S, Xerri L, Chaffanet M, Mozziconacci MJ, Vey N, and Birnbaum D. 2009. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 145:788-800.
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, and Zhang J. 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5:R80.
- Germing U, Gattermann N, Strupp C, Aivado M, and Aul C. 2000. Validation of the WHO proposals for a new classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients. *Leuk Res* 24:983-992.
- Germing U, and Haas R. 2009. 25 Jahre MDS-Register. In: Ulrich Germing RH, editor. *Myelodysplastische Syndrome*. Düsseldorf: Düsseldorf University Press. p 1-2.
- Gerritsen WR, Donohue J, Bauman J, Jhanwar SC, Kernan NA, Castro-Malaspina H, O'Reilly RJ, and Bourhis JH. 1992. Clonal analysis of myelodysplastic syndrome: monosomy 7 is expressed in the myeloid lineage, but not in the lymphoid lineage as detected by fluorescent in situ hybridization. *Blood* 80:217-224.
- Giles S, Jacobs S, and De Witte A. 2010. eArray custom CGH microarrays FAQ. In: www.opengenomics.com/earray. Agilent Technologies Inc., pp 1-11.
- Glover TW. 2006. Common fragile sites. *Cancer Lett* 232:4-12.
- Göhring G, Michalova K, Beverloo HB, Betts D, Harbott J, Haas OA, Kerndrup G, Sainati L, Bergstraesser E, Hasle H, Stary J, Trebo M, van den Heuvel-Eibrink MM, Zecca M, van Wering ER, Fischer A, Noellke P, Strahm B, Locatelli F, Niemeyer CM, and Schlegelberger B. 2010. Complex karyotype newly defined: the strongest prognostic factor in advanced childhood myelodysplastic syndrome. *Blood* 116:3766-3769.
- Gondek LP, Dunbar AJ, Szpurka H, McDevitt MA, and Maciejewski JP. 2007a. SNP array karyotyping allows for the detection of uniparental disomy and cryptic chromosomal abnormalities in MDS/MPD-U and MPD. *PLoS One* 2:e1225.
- Gondek LP, Haddad AS, O'Keefe CL, Tiu R, Wlodarski MW, Sekeres MA, Theil KS, and Maciejewski JP. 2007b. Detection of cryptic chromosomal lesions including acquired segmental uniparental disomy in advanced and low-risk myelodysplastic syndromes. *Exp Hematol* 35:1728-1738.
- Gondek LP, Tiu R, O'Keefe CL, Sekeres MA, Theil KS, and Maciejewski JP. 2008. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood* 111:1534-1542.
- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, and Bennett J. 1997. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 89:2079-2088.
- Haase D. 2009. Zytogenetische Merkmale von myelodysplastischen Syndromen. In: Ulrich Germing RH, editor. *Myelodysplastische Syndrome*. Düsseldorf: Düsseldorf University Press. p 53-70.
- Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstocker M, Nosslinger T, Hildebrandt B, Kundgen A, Lubbert M, Kunzmann R, Giagounidis AA, Aul C, Trumper L, Krieger O, Stauder R, Muller TH, Wimazal F, Valent P, Fonatsch C, and Steidl C. 2007. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 110:4385-4395.

- Haferlach C, Bacher U, Kohlmann A, Schindela S, Alpermann T, Kern W, Schnittger S, and Haferlach T. 2011. CDKN1B, encoding the cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27), is located in the minimally deleted region of 12p abnormalities in myeloid malignancies and its low expression is a favorable prognostic marker in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 96:829-836.
- Haferlach C, Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Kern W, and Haferlach T. 2008. Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 22:1539-1541.
- Hasle H. 2011. Pediatric Hematology. In: Hematology Education 2011. European Hematology Association. p 294-301.
- Hasle H, Arico M, Basso G, Biondi A, Cantu RA, Creutzig U, Fenu S, Fonatsch C, Haas OA, Harbott J, Kardos G, Kerndrup G, Mann G, Niemeyer CM, Ptoszkova H, Ritter J, Slater R, Stary J, Stollmann-Gibbels B, Testi AM, van Wering ER, and Zimmermann M. 1999. Myelodysplastic syndrome, juvenile myelomonocytic leukemia, and acute myeloid leukemia associated with complete or partial monosomy 7. European Working Group on MDS in Childhood (EWOG-MDS). *Leukemia* 13:376-385.
- Hasle H, Niemeyer CM, Chessells JM, Baumann I, Bennett JM, Kerndrup G, and Head DR. 2003. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia* 17:277-282.
- Heaney ML, and Golde DW. 1999. Myelodysplasia. *N Engl J Med* 340:1649-1660.
- Heinrichs S, Kulkarni RV, Bueso-Ramos CE, Levine RL, Loh ML, Li C, Neuberg D, Kornblau SM, Issa JP, Gilliland DG, Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Estey EH, and Look AT. 2009. Accurate detection of uniparental disomy and microdeletions by SNP array analysis in myelodysplastic syndromes with normal cytogenetics. *Leukemia* 23:1605-1613.
- Hirai H. 2003. Molecular mechanisms of myelodysplastic syndrome. *Jpn J Clin Oncol* 33:153-160.
- Hofmann WK, and Koeffler HP. 2002. Important features of myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol* 76 Suppl 2:222-227.
- Hofmann WK, Platzbecker U, Mahlknecht U, Stauder R, Passweg J, and Germing U. 2011. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO): Myelodysplastische Syndrome (MDS). In: Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO), <http://www.dgho-onkopedia.de/onkopedia/leitlinien/mds>.
- Hupe P, Stransky N, Thiery JP, Radvanyi F, and Barillot E. 2004. Analysis of array CGH data: from signal ratio to gain and loss of DNA regions. *Bioinformatics* 20:3413-3422.
- Iafate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, and Lee C. 2004. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36:949-951.
- Issa JP, Baylin SB, and Herman JG. 1997. DNA methylation changes in hematologic malignancies: biologic and clinical implications. *Leukemia* 11 Suppl 1:S7-11.
- Jaju RJ, Jones M, Boultonwood J, Kelly S, Mason DY, Wainscoat JS, and Kearney L. 2000. Combined immunophenotyping and FISH identifies the involvement of B-cells in 5q- syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 29:276-280.
- Jankowska AM, Szpurka H, Tiu RV, Makishima H, Afable M, Huh J, O'Keefe CL, Ganetzky R, McDevitt MA, and Maciejewski JP. 2009. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* 113:6403-6410.
- Janssen JW, Buschle M, Layton M, Drexler HG, Lyons J, van den Berghe H, Heimpel H, Kubanek B, Kleihauer E, and Mufti GJ. 1989. Clonal analysis of myelodysplastic syndromes: evidence of multipotent stem cell origin. *Blood* 73:248-254.
- Jekic B, Novakovic I, Lukovic L, Kuzmanovic M, Popovic B, Pastar I, Milasin J, Bunjevacki G, and Bunjevacki V. 2004. Low frequency of NRAS and KRAS2 gene mutations in childhood myelodysplastic syndromes. *Cancer Genet Cytogenet* 154:180-182.
- Jiang Y, Dunbar A, Gondek LP, Mohan S, Rataul M, O'Keefe C, Sekeres M, Sauntharajah Y, and Maciejewski JP. 2009. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood* 113:1315-1325.

Johnson NA, Hamoudi RA, Ichimura K, Liu L, Pearson DM, Collins VP, and Du MQ. 2006. Application of array CGH on archival formalin-fixed paraffin-embedded tissues including small numbers of microdissected cells. *Lab Invest* 86:968-978.

Joose SA, van Beers EH, and Nederlof PM. 2007. Automated array-CGH optimized for archival formalin-fixed, paraffin-embedded tumor material. *BMC Cancer* 7:43.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, and Pinkel D. 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258:818-821.

Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, and Pinkel D. 1994. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 10:231-243.

Kardos G, Baumann I, Passmore SJ, Locatelli F, Hasle H, Schultz KR, Stary J, Schmitt-Graeff A, Fischer A, Harbott J, Chessells JM, Hann I, Fenu S, Rajnoldi AC, Kerndrup G, Van Wering E, Rogge T, Nollke P, and Niemeyer CM. 2003. Refractory anemia in childhood: a retrospective analysis of 67 patients with particular reference to monosomy 7. *Blood* 102:1997-2003.

Knijnenburg J, van der BM, Tanke HJ, and Szuhai K. 2007. Optimized amplification and fluorescent labeling of small cell samples for genomic array-CGH. *Cytometry A* 71:585-591.

Knudson AG, Jr. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:820-823.

Ko M, Huang Y, Jankowska AM, Pape UJ, Tahiliani M, Bandukwala HS, An J, Lamperti ED, Koh KP, Ganetzky R, Liu XS, Aravind L, Agarwal S, Maciejewski JP, and Rao A. 2010. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* 468:839-843.

Lage JM, Leamon JH, Pejovic T, Hamann S, Lacey M, Dillon D, Segraves R, Vossbrinck B, Gonzalez A, Pinkel D, Albertson DG, Costa J, and Lizardi PM. 2003. Whole genome analysis of genetic alterations in small DNA samples using hyperbranched strand displacement amplification and array-CGH. *Genome Res* 13:294-307.

Lahortiga I, De KK, Van VP, Graux C, Cauwelier B, Lambert F, Mentens N, Beverloo HB, Pieters R, Speleman F, Odero MD, Bauters M, Froyen G, Marynen P, Vandenberghe P, Wlodarska I, Meijerink JP, and Cools J. 2007. Duplication of the MYB oncogene in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 39:593-595.

Landwehr C. 2009. Etablierung und Anwendung von molekular-zytogenetischen Methoden an reproduktionsgenetischen und klinisch-genetischen Fragestellungen. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr rer nat) der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, pp 47-48.

Langemeijer SM, Jansen JH, Hooijer J, van HP, Stevens-Linders E, Massop M, Waanders E, van Reijmersdal SV, Stevens-Kroef MJ, Zwaan CM, van den Heuvel-Eibrink MM, Sonneveld E, Hoogerbrugge PM, van Kessel AG, and Kuiper RP. 2011. TET2 mutations in childhood leukemia. *Leukemia* 25:189-192.

Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M, Stevens-Linders E, van HP, van Kessel AG, Raymakers RA, Kamping EJ, Verhoef GE, Verburgh E, Hagemeijer A, Vandenberghe P, de WT, van der Reijden BA, and Jansen JH. 2009. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 41:838-842.

Le Caignec C, Spits C, Sermon K, De Rycke M, Thienpont B, Debrock S, Staessen C, Moreau Y, Fryns JP, Van Steirteghem A, Liebaers I, and Vermeesch JR. 2006. Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH. *Nucleic Acids Res* 34:e68.

Leone G, Teofili L, Voso MT, and Lübbert M. 2002. DNA methylation and demethylating drugs in myelodysplastic syndromes and secondary leukemias. *Haematologica* 87:1324-1341.

Levy S, Sutton G, Ng PC, Feuk L, Halpern AL, Walenz BP, Axelrod N, Huang J, Kirkness EF, Denisov G, Lin Y, MacDonald JR, Pang AW, Shago M, Stockwell TB, Tsiamouri A, Bafna V, Bansal V, Kravitz SA, Busam DA, Beeson KY, McIntosh TC, Remington KA, Abril JF, Gill J, Borman J, Rogers YH, Frazier ME, Scherer SW, Strausberg RL, and Venter JC. 2007. The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol* 5:e254.

Lipson D, Aumann Y, Ben-Dor A, Linial N, and Yakhini Z. 2006. Efficient calculation of interval scores for DNA copy number data analysis. *J Comput Biol* 13:215-228.

- List A, Kurtin S, Roe DJ, Buresh A, Mahadevan D, Fuchs D, Rimsza L, Heaton R, Knight R, and Zeldis JB. 2005. Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 352:549-557.
- Little SE, Vuononvirta R, Reis-Filho JS, Natrajan R, Iravani M, Fenwick K, Mackay A, Ashworth A, Pritchard-Jones K, and Jones C. 2006. Array CGH using whole genome amplification of fresh-frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tumor DNA. *Genomics* 87:298-306.
- Livak KJ, and Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Locatelli F, Nollke P, Zecca M, Korthof E, Lanino E, Peters C, Pession A, Kabisch H, Uderzo C, Bonfim CS, Bader P, Dilloo D, Stary J, Fischer A, Revesz T, Fuhrer M, Hasle H, Trebo M, van den Heuvel-Eibrink MM, Fenu S, Strahm B, Giorgiani G, Bonora MR, Duffner U, and Niemeyer CM. 2005. Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML): results of the EWOG-MDS/EBMT trial. *Blood* 105:410-419.
- Loh ML, Sakai DS, Flotho C, Kang M, Fliegau M, Archambeault S, Mullighan CG, Chen L, Bergstraesser E, Bueso-Ramos CE, Emanuel PD, Hasle H, Issa JP, van den Heuvel-Eibrink MM, Locatelli F, Stary J, Trebo M, Wlodarski M, Zecca M, Shannon KM, and Niemeyer CM. 2009. Mutations in CBL occur frequently in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood* 114:1859-1863.
- Loken MR, van de LA, Ogata K, Orfao A, and Wells DA. 2008. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from a working conference. *Leuk Res* 32:5-17.
- Luna-Fineman S, Shannon KM, Atwater SK, Davis J, Masterson M, Ortega J, Sanders J, Steinherz P, Weinberg V, and Lange BJ. 1999. Myelodysplastic and myeloproliferative disorders of childhood: a study of 167 patients. *Blood* 93:459-466.
- Maciejewski JP, and Mufti GJ. 2008. Whole genome scanning as a cytogenetic tool in hematologic malignancies. *Blood* 112:965-974.
- Macville M, Veldman T, Padilla-Nash H, Wangsa D, O'Brien P, Schröck E, and Ried T. 1997. Spectral karyotyping, a 24-colour FISH technique for the identification of chromosomal rearrangements. *Histochem Cell Biol* 108:299-305.
- Makishima H, Rataul M, Gondek LP, Huh J, Cook JR, Theil KS, Sekeres MA, Kuczkowski E, O'Keefe C, and Maciejewski JP. 2010. FISH and SNP-A karyotyping in myelodysplastic syndromes: improving cytogenetic detection of del(5q), monosomy 7, del(7q), trisomy 8 and del(20q). *Leuk Res* 34:447-453.
- Martinez-Ramirez A, Urioste M, Alvarez S, Vizmanos JL, Calasanz MJ, Cigudosa JC, and Benitez J. 2004. Cytogenetic profile of myelodysplastic syndromes with complex karyotypes: an analysis using spectral karyotyping. *Cancer Genet Cytogenet* 153:39-47.
- Mattarucchi E, Marsoni M, Passi A, Lo CF, Pasquali F, and Porta G. 2006. Establishment and study of different real-time polymerase chain reaction assays for the quantification of cells with deletions of chromosome 7. *J Mol Diagn* 8:218-224.
- McKenna RW, Washington LT, Aquino DB, Picker LJ, and Kroft SH. 2001. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. *Blood* 98:2498-2507.
- Michl M. 2010. Allgemeiner Teil, Grundlagen. In: Michl M, editor. *Basics Hämatologie*. München: Urban und Fischer Verlag. p 2-29.
- Mills RE, Luttig CT, Larkins CE, Beauchamp A, Tsui C, Pittard WS, and Devine SE. 2006. An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome. *Genome Res* 16:1182-1190.
- Mills RE, Walter K, Stewart C, Handsaker RE, Chen K, Alkan C, Abyzov A, Yoon SC, Ye K, Cheetham RK, Chinwalla A, Conrad DF, Fu Y, Grubert F, Hajirasouliha I, Hormozdiari F, Iakoucheva LM, Iqbal Z, Kang S, Kidd JM, Konkel MK, Korn J, Khurana E, Kural D, Lam HY, Leng J, Li R, Li Y, Lin CY, Luo R, Mu XJ, Nemesh J, Peckham HE, Rausch T, Scally A, Shi X, Stromberg MP, Stutz AM, Urban AE, Walker JA, Wu J, Zhang Y, Zhang ZD, Batzer MA, Ding L, Marth GT, McVean G, Sebat J, Snyder M, Wang J, Ye K, Eichler EE, Gerstein MB, Hurler ME, Lee C, McCarroll SA, and Korb JO. 2011. Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. *Nature* 470:59-65.
- Miyauchi J, Asada M, Sasaki M, Tsunematsu Y, Kojima S, and Mizutani S. 1994. Mutations of the N-ras gene in juvenile chronic myelogenous leukemia. *Blood* 83:2248-2254.

- Mohamedali A, Gaken J, Twine NA, Ingram W, Westwood N, Lea NC, Hayden J, Donaldson N, Aul C, Gattermann N, Giagounidis A, Germing U, List AF, and Mufti GJ. 2007. Prevalence and prognostic significance of allelic imbalance by single-nucleotide polymorphism analysis in low-risk myelodysplastic syndromes. *Blood* 110:3365-3373.
- Morerio C, Rapella A, Tassano E, Lanino E, Micalizzi C, Rosanda C, and Panarello C. 2006. Gain of 1q in pediatric myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 30:1437-1441.
- Morrison TB, Weis JJ, and Wittwer CT. 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24:954-8, 960, 962.
- Mullis KB, and Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350.
- Niemeyer CM, Arico M, Basso G, Biondi A, Cantu RA, Creutzig U, Haas O, Harbott J, Hasle H, Kerndrup G, Locatelli F, Mann G, Stollmann-Gibbels B, van't Veer-Korthof ET, van WE, and Zimmermann M. 1997. Chronic myelomonocytic leukemia in childhood: a retrospective analysis of 110 cases. European Working Group on Myelodysplastic Syndromes in Childhood (EWOG-MDS). *Blood* 89:3534-3543.
- Niemeyer CM, and Baumann I. 2008. Myelodysplastic syndrome in children and adolescents. *Semin Hematol* 45:60-70.
- Niemeyer CM, Kang MW, Shin DH, Furlan I, Erlacher M, Bunin NJ, Bunda S, Finklestein JZ, Sakamoto KM, Gorr TA, Mehta P, Schmid I, Kropshofer G, Corbacioglu S, Lang PJ, Klein C, Schlegel PG, Heinzmann A, Schneider M, Stary J, van den Heuvel-Eibrink MM, Hasle H, Locatelli F, Sakai D, Archambeault S, Chen L, Russell RC, Sybingco SS, Ohh M, Braun BS, Flotho C, and Loh ML. 2010. Germline CBL mutations cause developmental abnormalities and predispose to juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet* 42:794-800.
- Niemeyer CM, and Kratz C. 2006. Myelodysplastische Syndrome und juvenile myelomonozytäre Leukämie. In: Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer CM, Ritter J, editors. *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag. p 715-723.
- Nilsson L, Astrand-Grundstrom I, Arvidsson I, Jacobsson B, Hellstrom-Lindberg E, Hast R, and Jacobsen SE. 2000. Isolation and characterization of hematopoietic progenitor/stem cells in 5q-deleted myelodysplastic syndromes: evidence for involvement at the hematopoietic stem cell level. *Blood* 96:2012-2021.
- Nilsson L, Eden P, Olsson E, Mansson R, Astrand-Grundstrom I, Strombeck B, Theilgaard-Monch K, Anderson K, Hast R, Hellstrom-Lindberg E, Samuelsson J, Bergh G, Nerlov C, Johansson B, Sigvardsson M, Borg A, and Jacobsen SE. 2007. The molecular signature of MDS stem cells supports a stem-cell origin of 5q myelodysplastic syndromes. *Blood* 110:3005-3014.
- Nissen-Druey C, Tichelli A, and Meyer-Monard S. 2005. Human hematopoietic colonies in health and disease. *Acta Haematol* 113:5-96.
- Nolte F, and Hofmann WK. 2009. Zytogenetische Merkmale von myelodysplastischen Syndromen. In: Ulrich Germing RH, editor. *Myelodysplastische Syndrome*. Düsseldorf: Düsseldorf University Press. p 71-84.
- O'Keefe CL, Tiu R, Gondek LP, Powers J, Theil KS, Kalaycio M, Lichtin A, Sekeres MA, and Maciejewski JP. 2007. High-resolution genomic arrays facilitate detection of novel cryptic chromosomal lesions in myelodysplastic syndromes. *Exp Hematol* 35:240-251.
- Odero MD, Carlson K, Lahortiga I, Calasanz MJ, and Rowley JD. 2003. Molecular cytogenetic characterization of breakpoints in 19 patients with hematologic malignancies and 12p unbalanced translocations. *Cancer Genet Cytogenet* 142:115-119.
- Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, Siprashvili Z, Mori M, McCue P, Druck T, Croce CM, and Huebner K. 1996. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 84:587-597.
- Parker JE, Fishlock KL, Mijovic A, Czepulkowski B, Pagliuca A, and Mufti GJ. 1998. 'Low-risk' myelodysplastic syndrome is associated with excessive apoptosis and an increased ratio of pro- versus anti-apoptotic bcl-2-related proteins. *Br J Haematol* 103:1075-1082.
- Paulsson K, Heidenblad M, Strombeck B, Staaf J, Jonsson G, Borg A, Fioretos T, and Johansson B. 2006. High-resolution genome-wide array-based comparative genome hybridization reveals cryptic chromosome changes in AML and MDS cases with trisomy 8 as the sole cytogenetic aberration. *Leukemia* 20:840-846.
- Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Christiansen DH, and Nerlov C. 2002. Genetic pathways in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Blood* 99:1909-1912.

- Perry GH, Ben-Dor A, Tsalenko A, Sampas N, Rodriguez-Revenga L, Tran CW, Scheffer A, Steinfeld I, Tsang P, Yamada NA, Park HS, Kim JI, Seo JS, Yakhini Z, Laderman S, Bruhn L, and Lee C. 2008. The fine-scale and complex architecture of human copy-number variation. *Am J Hum Genet* 82:685-695.
- Pinard R, de Winter A, Sarkis GJ, Gerstein MB, Tartaro KR, Plant RN, Egholm M, Rothberg JM, and Leamon JH. 2006. Assessment of whole genome amplification-induced bias through high-throughput, massively parallel whole genome sequencing. *BMC Genomics* 7:216.
- Pineault N, Buske C, Feuring-Buske M, Abramovich C, Rosten P, Hogge DE, Aplan PD, and Humphries RK. 2003. Induction of acute myeloid leukemia in mice by the human leukemia-specific fusion gene NUP98-HOXD13 in concert with Meis1. *Blood* 101:4529-4538.
- Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, and Albertson DG. 1998. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20:207-211.
- Polychronopoulou S, Panagiotou JP, Kossiva L, Mavrou A, Anagnostou D, and Haidas S. 2004. Clinical and morphological features of paediatric myelodysplastic syndromes: a review of 34 cases. *Acta Paediatr* 93:1015-1023.
- Porta G, Maserati E, Mattarucchi E, Minelli A, Pressato B, Valli R, Zecca M, Bernardo ME, Lo CF, Locatelli F, Danesino C, and Pasquali F. 2007. Monosomy 7 in myeloid malignancies: parental origin and monitoring by real-time quantitative PCR. *Leukemia* 21:1833-1835.
- Pui CH, Hancock ML, Raimondi SC, Head DR, Thompson E, Wilimas J, Kun LE, Bowman LC, Crist WM, and Pratt CB. 1990. Myeloid neoplasia in children treated for solid tumours. *Lancet* 336:417-421.
- Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, Schoonmaker JA, Ebert BL, Al-Shahrour F, Hasserjian RP, Scadden EO, Aung Z, Matza M, Merckenschlager M, Lin C, Rommens JM, and Scadden DT. 2010. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature* 464:852-857.
- Raza A, Gezer S, Mundle S, Gao XZ, Alvi S, Borok R, Rifkin S, Iftikhar A, Shetty V, Parcharidou A, Loew J, Marcus B, Khan Z, Chaney C, Showel J, Gregory S, and Preisler H. 1995. Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 86:268-276.
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, Gonzalez JR, Gratacos M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, and Hurles ME. 2006. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444:444-454.
- Ripperger T, Steinemann D, Göhring G, Finke J, Niemeyer CM, Strahm B, and Schlegelberger B. 2009. A novel pedigree with heterozygous germline RUNX1 mutation causing familial MDS-related AML: can these families serve as a multistep model for leukemic transformation? *Leukemia* 23:1364-1366.
- Ripperger T, Tauscher M, Praulich I, Pabst B, Teigler-Schlegel A, Yeoh A, Göhring G, Schlegelberger B, Flotho C, Niemeyer CM, and Steinemann D. 2011. Constitutional trisomy 8p11.21-q11.21 mosaicism: a germline alteration predisposing to myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 155:209-217.
- Rogge T, and Niemeyer CM. 2003. Myelodysplastische Syndrome (MDS) im Kindesalter. *WIR, Zeitschrift der Deutschen Kinderkrebsstiftung e V* 3:10-12.
- Saito S, Matsuda K, Taira C, Sano K, Tanaka-Yanagisawa M, Yanagisawa R, Nakazawa Y, Sakashita K, Shiohara M, and Koike K. 2011. Genetic analysis of TP53 in childhood myelodysplastic syndrome and juvenile myelomonocytic leukemia. *Leuk Res* 35:1578-1584.
- Sanger F, Nicklen S, and Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467.
- Sato Y, Suto Y, Pietenpol J, Golub TR, Gilliland DG, Davis EM, Le Beau MM, Roberts JM, Vogelstein B, Rowley JD, and Bohlander SK. 1995. TEL and KIP1 define the smallest region of deletions on 12p13 in hematopoietic malignancies. *Blood* 86:1525-1533.
- Schlegelberger B, Göhring G, Thol F, and Heuser M. 2012. Update on cytogenetic and molecular changes in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 53:525-536.
- Schmidt MH, and Dikic I. 2005. The Cbl interactome and its functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:907-918.

- Schoch C, Kern W, Kohlmann A, Hiddemann W, Schnittger S, and Haferlach T. 2005. Acute myeloid leukemia with a complex aberrant karyotype is a distinct biological entity characterized by genomic imbalances and a specific gene expression profile. *Genes Chromosomes Cancer* 43:227-238.
- Schraders M, van Reijmersdal SV, Kamping EJ, van Krieken JH, van Kessel AG, Groenen PJ, Hoogerbrugge PM, and Kuiper RP. 2009. High-resolution genomic profiling of pediatric lymphoblastic lymphomas reveals subtle differences with pediatric acute lymphoblastic leukemias in the B-lineage. *Cancer Genet Cytogenet* 191:27-33.
- Schröck E, du MS, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, and Ried T. 1996. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273:494-497.
- Schulz T. 2004. Genetische Polymorphismen (Sequenzvariationen) von Fremdstoff-metabolisierenden Enzymen und ihre Bedeutung in der Umweltmedizin. Mitteilung der Kommission "Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin". *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 47:1115-1123. Springer Verlag.
- Shadduck RK, Latsko JM, Rossetti JM, Haq B, and Abdulhaq H. 2007. Recent advances in myelodysplastic syndromes. *Exp Hematol* 35:137-143.
- Shannon KM, O'Connell P, Martin GA, Paderanga D, Olson K, Dinndorf P, and McCormick F. 1994. Loss of the normal NF1 allele from the bone marrow of children with type 1 neurofibromatosis and malignant myeloid disorders. *N Engl J Med* 330:597-601.
- Shannon KM, Turhan AG, Chang SS, Bowcock AM, Rogers PC, Carroll WL, Cowan MJ, Glader BE, Eaves CJ, and Eaves AC. 1989. Familial bone marrow monosomy 7. Evidence that the predisposing locus is not on the long arm of chromosome 7. *J Clin Invest* 84:984-989.
- Shlien A, Tabori U, Marshall CR, Pienkowska M, Feuk L, Novokmet A, Nanda S, Druker H, Scherer SW, and Malkin D. 2008. Excessive genomic DNA copy number variation in the Li-Fraumeni cancer predisposition syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:11264-11269.
- Silveira CG, Oliveira FM, Valera ET, Ikoma MR, Borgonovo T, Cavalli IJ, Tone LG, and Rogatto SR. 2009. New recurrent deletions in the PPARgamma and TP53 genes are associated with childhood myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 33:19-27.
- Smith AE, Mohamedali AM, Kulasekararaj A, Lim Z, Gaken J, Lea NC, Przychodzen B, Mian SA, Nasser EE, Shooter C, Westwood NB, Strupp C, Gattermann N, Maciejewski JP, Germing U, and Mufti GJ. 2010. Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. *Blood* 116:3923-3932.
- Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SB, and Hood LE. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321:674-679.
- Smyth GK, Yang YH, and Speed T. 2003. Statistical issues in cDNA microarray data analysis. *Methods Mol Biol* 224:111-136.
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, Cremer T, and Lichter P. 1997. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20:399-407.
- Spits C, Le Caignec C, De Rycke M, Van Haute L, Van Steirteghem A, Liebaers I, and Sermon K. 2006. Optimization and evaluation of single-cell whole-genome multiple displacement amplification. *Hum Mutat* 27:496-503.
- Starczynowski DT, Vercauteren S, Telenius A, Sung S, Tohyama K, Brooks-Wilson A, Spinelli JJ, Eaves CJ, Eaves AC, Horsman DE, Lam WL, and Karsan A. 2008. High-resolution whole genome tiling path array CGH analysis of CD34+ cells from patients with low-risk myelodysplastic syndromes reveals cryptic copy number alterations and predicts overall and leukemia-free survival. *Blood* 112:3412-3424.
- Steinemann D, Arning L, Praulich I, Stuhmann M, Hasle H, Stary J, Schlegelberger B, Niemeyer CM, and Flotho C. 2010. Mitotic recombination and compound-heterozygous mutations are predominant NF1-inactivating mechanisms in children with juvenile myelomonocytic leukemia and neurofibromatosis type 1. *Haematologica* 95:320-323.
- Strahm B, Nollke P, Zecca M, Korthof ET, Bierings M, Furlan I, Sedlacek P, Chybicka A, Schmutz M, Bordon V, Peters C, O'Marcaigh A, de Heredia CD, Bergstraesser E, Moerloose BD, van den Heuvel-Eibrink MM, Stary J, Trebo M, Wojcik D, Niemeyer CM, and Locatelli F. 2011. Hematopoietic stem cell transplantation

for advanced myelodysplastic syndrome in children: results of the EWOG-MDS 98 study. *Leukemia* 25:455-462.

Strom SS, Gu Y, Gruschkus SK, Pierce SA, and Estey EH. 2005. Risk factors of myelodysplastic syndromes: a case-control study. *Leukemia* 19:1912-1918.

Tartaglia M, Niemeyer CM, Fragale A, Song X, Buechner J, Jung A, Hahlen K, Hasle H, Licht JD, and Gelb BD. 2003. Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 34:148-150.

Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, and Tunnacliffe A. 1992. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13:718-725.

Thiel A, Beier M, Ingenhag D, Servan K, Hein M, Moeller V, Betz B, Hildebrandt B, Evers C, Germing U, and Royer-Pokora B. 2011. Comprehensive array CGH of normal karyotype myelodysplastic syndromes reveals hidden recurrent and individual genomic copy number alterations with prognostic relevance. *Leukemia* 25:387-399.

Thol F, Friesen I, Damm F, Yun H, Weissinger EM, Krauter J, Wagner K, Chaturvedi A, Sharma A, Wichmann M, Göhring G, Schumann C, Bug G, Ottmann O, Hofmann WK, Schlegelberger B, Heuser M, and Ganser A. 2011a. Prognostic significance of ASXL1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 29:2499-2506.

Thol F, Weissinger EM, Krauter J, Wagner K, Damm F, Wichmann M, Göhring G, Schumann C, Bug G, Ottmann O, Hofmann WK, Schlegelberger B, Ganser A, and Heuser M. 2010. IDH1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes are associated with an unfavorable prognosis. *Haematologica* 95:1668-1674.

Thol F, Winschel C, Ludeking A, Yun H, Friesen I, Damm F, Wagner K, Krauter J, Heuser M, and Ganser A. 2011b. Rare occurrence of DNMT3A mutations in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 96:1870-1873.

Thompson JE, Conlon JP, Yang X, Sanchez PV, and Carroll M. 2007. Enhanced growth of myelodysplastic colonies in hypoxic conditions. *Exp Hematol* 35:21-31.

Tiacci E, Schiavoni G, Forconi F, Santi A, Trentin L, Ambrosetti A, Cecchini D, Sozzi E, Francia di CP, Di BC, Pulsoni A, Foa R, Inghirami G, and Falini B. 2012. Simple genetic diagnosis of hairy cell leukemia by sensitive detection of the BRAF-V600E mutation. *Blood* 119:192-195.

Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, Holmes A, Kern W, Martelli MP, Pucciarini A, Bigerna B, Pacini R, Wells VA, Sportoletti P, Pettrossi V, Mannucci R, Elliott O, Liso A, Ambrosetti A, Pulsoni A, Forconi F, Trentin L, Semenzato G, Inghirami G, Capponi M, Di RF, Patti C, Arcaini L, Musto P, Pileri S, Haferlach C, Schnittger S, Pizzolo G, Foa R, Farinelli L, Haferlach T, Pasqualucci L, Rabadan R, and Falini B. 2011. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* 364:2305-2315.

Tiu R, Gondek L, O'Keefe C, and Maciejewski JP. 2007. Clonality of the stem cell compartment during evolution of myelodysplastic syndromes and other bone marrow failure syndromes. *Leukemia* 21:1648-1657.

Tyybakinoja A, Vilpo J, and Knuutila S. 2007. High-resolution oligonucleotide array-CGH pinpoints genes involved in cryptic losses in chronic lymphocytic leukemia. *Cytogenet Genome Res* 118:8-12.

van de Loosdrecht AA, Westers TM, Westra AH, Drager AM, van dV, V, and Ossenkoppele GJ. 2008. Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood* 111:1067-1077.

Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellstrom-Lindberg E, Tefferi A, and Bloomfield CD. 2009. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114:937-951.

Veltroni M, Sainati L, Zecca M, Fenu S, Tridello G, Testi AM, Merlone AD, Buldini B, Leszl A, Lo NL, Longoni D, Bernini G, and Basso G. 2009. Advanced pediatric myelodysplastic syndromes: can immunophenotypic characterization of blast cells be a diagnostic and prognostic tool? *Pediatr Blood Cancer* 52:357-363.

Vercauteren SM, Sung S, Starczynowski DT, Lam WL, Bruyere H, Horsman DE, Tsang P, Leitch H, and Karsan A. 2010. Array comparative genomic hybridization of peripheral blood granulocytes of patients with myelodysplastic syndrome detects karyotypic abnormalities. *Am J Clin Pathol* 134:119-126.

Vermeesch JR, Fiegler H, de Leeuw N, Szuhai K, Schoumans J, Ciccone R, Speleman F, Rauch A, Clayton-Smith J, Van Ravenswaaij C, Sanlaville D, Patsalis PC, Firth H, Devriendt K, and Zuffardi O. 2007. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *Eur J Hum Genet* 15:1105-1114.

- Vissers LE, Bhatt SS, Janssen IM, Xia Z, Lalani SR, Pfundt R, Derwinska K, de Vries BB, Gilissen C, Hoischen A, Nesteruk M, Wisniewiecka-Kowalik B, Smyk M, Brunner HG, Cheung SW, van Kessel AG, Veltman JA, and Stankiewicz P. 2009. Rare pathogenic microdeletions and tandem duplications are microhomology-mediated and stimulated by local genomic architecture. *Hum Mol Genet* 18:3579-3593.
- Wegrzyn J, Lam JC, and Karsan A. 2011. Mouse models of myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 35:853-862.
- Weimar IS, Bourhis JH, De Gast GC, and Gerritsen WR. 1994. Clonality in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 13:215-221.
- Weiss MM, Snijders AM, Kuipers EJ, Ylstra B, Pinkel D, Meuwissen SG, van Diest PJ, Albertson DG, and Meijer GA. 2003. Determination of amplicon boundaries at 20q13.2 in tissue samples of human gastric adenocarcinomas by high-resolution microarray comparative genomic hybridization. *J Pathol* 200:320-326.
- Welch JS, and Link DC. 2011. Genomics of AML: clinical applications of next-generation sequencing. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011:30-35.
- Wessendorf S, Fritz B, Wrobel G, Nessling M, Lampel S, Goettel D, Kuepper M, Joos S, Hopman T, Kokocinski F, Döhner H, Bentz M, Schwaenen C, and Lichter P. 2002. Automated screening for genomic imbalances using matrix-based comparative genomic hybridization. *Lab Invest* 82:47-60.
- Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, Shen Y, Chen L, McGuire A, He W, Chen YJ, Makhijani V, Roth GT, Gomes X, Tartaro K, Niazi F, Turcotte CL, Irzyk GP, Lupski JR, Chinault C, Song XZ, Liu Y, Yuan Y, Nazareth L, Qin X, Muzny DM, Margulies M, Weinstock GM, Gibbs RA, and Rothberg JM. 2008. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature* 452:872-876.
- Wilke CM, Guo SW, Hall BK, Boldog F, Gemmill RM, Chandrasekharappa SC, Barcroft CL, Drabkin HA, and Glover TW. 1994. Multicolor FISH mapping of YAC clones in 3p14 and identification of a YAC spanning both FRA3B and the t(3;8) associated with hereditary renal cell carcinoma. *Genomics* 22:319-326.
- Wlodarska I, La SR, Baens M, Dierlamm J, Uyttebroeck A, Selleslag D, Francine A, Mecucci C, Hagemeijer A, van den BH, and Marynen P. 1998. Fluorescence in situ hybridization characterization of new translocations involving TEL (ETV6) in a wide spectrum of hematologic malignancies. *Blood* 91:1399-1406.
- Wolber PK, Collins PJ, Lucas AB, De WA, and Shannon KW. 2006. The Agilent in situ-synthesized microarray platform. *Methods Enzymol* 410:28-57.
- World Health Organization. 2008. Myelodysplastic Syndromes. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, editors. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press, pp 87-107.
- Zanesi N, Fidanza V, Fong LY, Mancini R, Druck T, Valtieri M, Rudiger T, McCue PA, Croce CM, and Huebner K. 2001. The tumor spectrum in FHIT-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10250-10255.
- Zatkova A, Merk S, Wendehack M, Bilban M, Muzik EM, Muradyan A, Haferlach C, Haferlach T, Wimmer K, Fonatsch C, and Ullmann R. 2009. AML/MDS with 11q/MLL amplification show characteristic gene expression signature and interplay of DNA copy number changes. *Genes Chromosomes Cancer* 48:510-520.

8 Anhang

Tab. 8.1: Daten der MDS Patienten für *HOXA* qPCR

Patienten-ID	Geschl./Alter (J.)	Diagnose	Karyotyp
D147	m/	RC	45,XY,-7/45,idem,?del(18)(q1?)
D152	w/	RC	45,XY,-7
D171	w/	RC	45,XY,-7
D265	w/	sek. RAEB-T	43-45,XY,add(5)(p11),add(6)(q11),-7,-8,-12,+17,-19,-20,+2mar[cp7]
D320	m/	sek. RA	46,XX,-7,+mar
D420	w/	MDS mit Myelofibrose	45,XX,-7
D427	w/	RAEB	46,XX,-7,+21
D465	w/17	sek. RA	47,XX,+der(1)t(1;6)(p12;p12)
D516	w/	sek. RAEB	45,XY,del(4)(q31),-7
D534	w/	RAEB	45,XY,-7[26]/46,XY[1]
D548	w/	MDR-AML	46,XX,inv(3)(q21q26)[1]/45,XX,idem,-7[19]
D587	w/	RAEB	47,XY,-7,+21,+21[8]/46,XY[7]
D633	w/	sek. RAEB	45,XY,-7
D634	m/8	sek. RAEB	45,XY,1qh+,?t(2;3),-7
D650	w/	sek. RAEB	45,XX,-7,del(18)(q22)[11]/45,idem,der(6)t(3;6)(q13;p24)[2]/45,idem,-del(18),del(13)[?]
D767	w/	RC	45,XX,-7
D678	w/	sek. RC	45,XX,-7

Tab. 8.2: Design des eArrays MDS-1

Lokalisation	Genort	Start (bp)	Ende (bp)
1p13.1	<i>NRAS</i>	114916781	115031056
1p12	<i>HAO2</i>	119544635	119706548
1p36.32	<i>MEGF6</i>	3380000	3600000
2p16.1	<i>REL</i>	60970287	61125486
2q31.1	<i>HOXD13</i>	176607690	176950820
3p24.1	<i>EOMES</i>	27643035	27841142
3p14.3	<i>FLNB</i>	57980000	58200000
5q13.3	<i>GFM2</i>	74000000	74120000
7p15.2	<i>HOXA Cluster</i>	26850984	27097243
7q31.2	<i>CFTR</i>	116607640	116953672
8p12	<i>DUSP4</i>	29170000	29300000
9q31.1	<i>BAAT</i>	101110000	101330000
9q34.2	<i>RXRA</i>	133900000	134560000
9q34.3	<i>GPSM1</i>	136450000	136580000
9q34.3	<i>NOTCH1</i>	136607277	136778927
10q24.31	<i>MRPL43, PDZD7</i>	102620000	102900000
10q26.3	<i>ADAM8</i>	134928571	135097182
11p15.5	<i>IFITM1</i>	248948	404621
11p15.5	<i>HRAS</i>	505016	562275
11p12	<i>API5</i>	43232466	43364034
11q13.3	<i>FGF3</i>	69149258	69411130
11q13.5	<i>WNT11</i>	75519196	75744367
12p12.1	<i>KRAS</i>	25221973	25346687
12q13.11	<i>HDAC7A</i>	46410000	46700000
14q13.2	<i>SLC25A21</i>	36180008	36815352
15q14	<i>GOLGA8A</i>	32398138	32726442
16p13.3	<i>MSLN, MPFL</i>	700000	830000
16q22.2	<i>HYDIN</i>	69540000	69840000
17p11.2	<i>MAPK7</i>	19170000	19280000
17q12	<i>SNIP</i>	33830000	34100000
17q21.31	<i>KIAA1267</i>	41420000	42160000
19p13.3	<i>RPS15</i>	1342416	1469238
20q11.21	<i>ID1</i>	29605110	29730045
22q13.1	<i>PDGFB</i>	37903252	38000415
22q11.23	<i>GSTT1</i>	22606654	22747341
22q11.21	<i>ZNF74</i>	19033444	19168877

Abkürzungen: bp, Basenpaare

Tab. 8.3: Auswertung der Monosomie 7 bei MDS mit unterschiedlichen array-CGH Filtereinstellungen

Pat-ID	DLRS	Monosomie 7	Monosomie 7	Monosomie 7	log ₂ ratio	
		log ₂ ratio	MP [Anzahl]	FISH	0,3*	0,5 [#]
D468	0,368	-0,477	100% [20]	35%	X	X
D493	0,300	-0,770	100% [20]	66%	X	X
D510	0,245	-0,825	100% [15]	88%	X	X
D515	0,286	-0,408	52% [21]	59%	X	nein
D531	0,494	-0,462	100% [20]	87%	X	X
D593	0,344	-0,782	87% [15]	83%	X	X
D726	0,248	-0,429	73% [15]	80%	X	nein
D731	0,359	-0,396	100% [11]	45%	X	nein
D762	0,246	-0,415	80% [15]	77%	X	nein

Abkürzungen: Pat-ID, Patienten-ID; DLRS, Derivative Log Ratio Spread; MP, Metaphasen; *Standard-Filtereinstellungen bei der Auswertung von Oligonukleotid array-CGH Daten mit einer minimalen Anzahl aberranter Sonden=10 und einem durchschnittlichen log₂ratio aberranter Sonden=0,3; [#]Auswertung von Oligonukleotid array-CGH Daten mit einem durchschnittlichen log₂ratio aberranter Sonden=0,5 (siehe auch Abb. 3.2)

Tab. 8.4: Array-CGH Auswertungen des Clusters #7 (#D762) bei Verwendung der nicht-amplifizierten DNA Ref XX und der amplifizierten DNA gesunder Koloniezellen

Chrom.	Sondenanzahl	Cluster #7 vs. Ref XX		Cluster #7 vs. ampli.-DNA ^a	
		Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
1	19431	0,0663	0,3038	0,0448	0,1837
2	18671	0,0715	0,2691	0,0610	0,0723
3	16006	0,0607	0,2617	0,0443	0,0582
4	13514	0,0452	0,2517	0,0863	0,1596
5	13358	0,0645	0,2820	0,0583	0,1720
6	13439	0,0823	0,2595	0,0770	0,1611
7	13351	-0,2496	0,3040	-0,2385	0,2087
8	11064	0,0892	0,2909	0,0779	0,1898
9	9479	0,0261	0,3238	0,0195	0,2151
10	11127	0,0697	0,2954	0,0453	0,1695
11	11535	0,0622	0,3105	0,0464	0,1838
12	11253	0,0546	0,2887	0,0501	0,1750
13	7727	0,0435	0,2727	0,0647	0,1640
14	8258	0,0459	0,3003	0,0501	0,1675
15	8100	0,1135	0,2779	0,0822	0,1628
16	6881	-0,0095	0,3604	-0,0287	0,2073
17	7831	-0,0218	0,3388	-0,0287	0,1987
18	5816	0,0917	0,2791	0,0679	0,1892
19	6051	-0,2297	0,3680	-0,1379	0,2158
20	5385	0,0445	0,3639	0,0071	0,2073
21	3406	0,0123	0,3301	0,0189	0,1955
22	4123	-0,0471	0,3611	-0,0548	0,2130
X	11061	-0,2814	0,2824	-0,2492	0,2050
Y	1295	1,1201	0,6177	1,0200	0,5474

^a Als Referenz-DNA wurde die amplifizierte DNA aus Kolonien gesunder Probanden verwendet. Abkürzungen: ampli., amplifiziert; Chrom., Chromosom; Ref, Referenz; Stabw., Standardabweichung

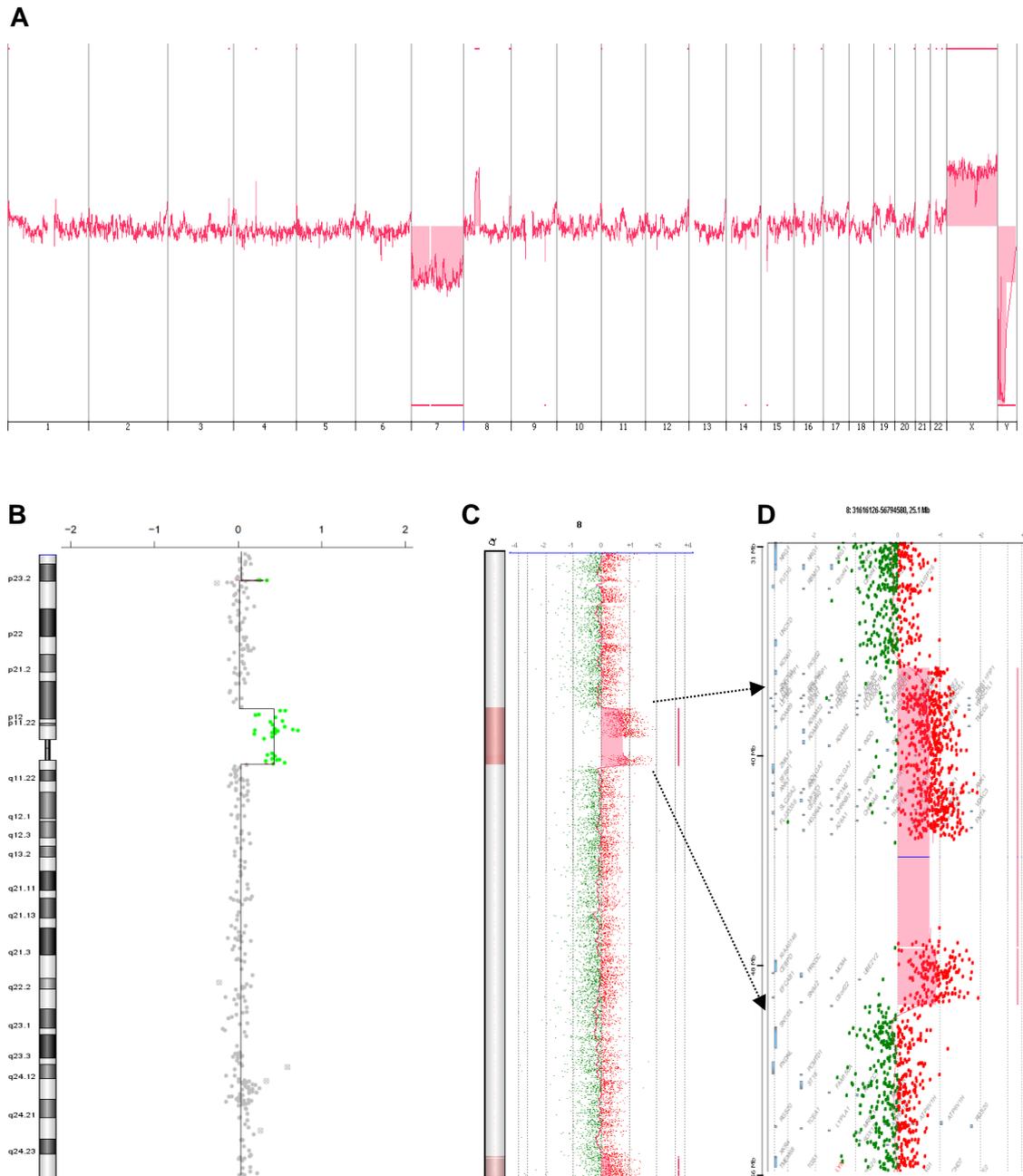


Abb. 8.1: Chromosomale Veränderungen (#D600)

(A) 244K array-CGH Analyse: In horizontaler Richtung sind die Chromosomen von 1 bis 22, X und Y dargestellt. Farbige Flächen unterhalb der Basislinie zeigen Deletionen (Chr. 7, Chr. Y), wohingegen farbige Flächen oberhalb der Basislinie als Zugewinn ausgewertet werden (Chr. X). (B) Das Ideogramm des Chromosoms 8 ist in vertikaler Richtung links dargestellt. Der Zugewinn in der Zentromerregion des Chromosoms 8 ist auf der BAC/PAC array-CGH Plattform durch die grünen Punkte und den positiven \log_2 ratio für diese Region dargestellt. (C) 244K array-CGH Auswertung für das Chromosom 8. Die farbige Fläche zeigt den Zugewinn in der Zentromerregion an (D) Detailansicht des Zugewinns in 8p12-q11.1 (Bildausschnitt: 31616126-56794580, 25,1 Mb).

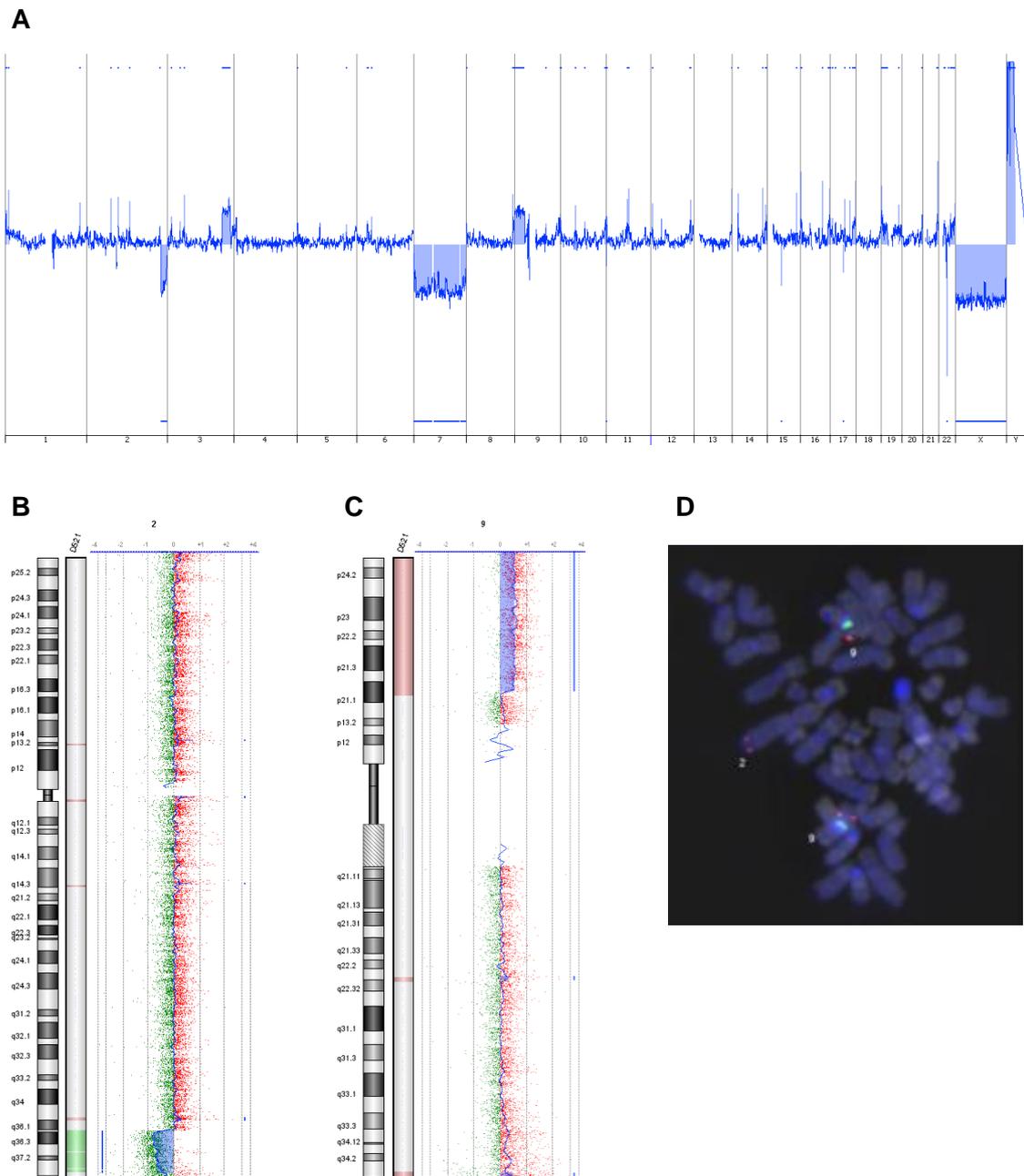


Abb. 8.2: Chromosomale Veränderungen (#D521)

(A) 244K array-CGH Analyse: In horizontaler Richtung sind die Chromosomen von 1 bis 22, X und Y dargestellt. Farbige Flächen unterhalb der Basislinie zeigen Deletionen (Chr. 2q, Chr. 7, Chr. X), wohingegen farbige Flächen oberhalb der Basislinie als Zugewinn ausgewertet werden (Chr. 9p, Chr. Y). (B) Das Ideogramm des Chromosoms 2 ist in vertikaler Richtung links dargestellt. In 2q35 wurde der heterozygote Verlust von 806,071 kb aufgedeckt. (C) Das Ideogramm des Chromosoms 9 ist in vertikaler Richtung links dargestellt. Der heterozygote Zugewinn überspannt die chromosomale Region 9p24.3-p21.1. (D) Bei der FISH Analyse an Metaphasenchromosomen konnte über eine kommerzielle Sonde für 9p21 (LSI p16, rot) mit einer Zentromer 9 spezifischen Sonde (grün) die Translokation der(2)t(2;9) gezeigt werden (Aufnahme: PD Dr. med. G. Göhring, IZMP).

9 Lebenslauf

Name: Inka Praulich

Geburtstag: 31.08.1979

Geburtsort: Hannover

Ausbildung und Beruf

1992-1999 Geschwister-Scholl-Gymnasium Berenbostel
Abschluss: Abitur

09/1999 – 07/2003 Studiengang Technologie nachwachsender Rohstoffe an der
Fachhochschule Hannover, FB Bioverfahrenstechnik

Diplomarbeit bei der Cognis Deutschland GmbH & Co. KG
(heute: BASF), Düsseldorf
Thema: Lösemittelreduzierte Korrosionsschutzlacke auf
Epoxidbasis
Betreuung: Prof. Dr. Ohlinger, Dr. Birnbrich

Abschluss: Dipl.-Ing. (FH) Technologie nachwachsender Rohstoffe

10/2003 – 12/2005 Studiengang Life Science an der Gottfried Wilhelm Leibniz
Universität Hannover

Masterarbeit bei der Sartorius AG, Göttingen
Thema: Methoden- und Materialentwicklung zur Beurteilung
mikroporöser Proteinarrays
Betreuung: Prof. Dr. Scheper, Dr. Hollas

Abschluss: M.Sc. Life Science

seit 07/2006 Promotion im Institut für Zell- und Molekularpathologie der
Medizinischen Hochschule Hannover
Leitung: Prof. Dr. med. Schlegelberger

Thema: Untersuchung genomischer Alterationen bei
myelodysplastischen Syndromen (MDS) und juveniler
myelomonozytärer Leukämie (JMML) im Kindesalter mittels
hochauflösender array-CGH

seit 02/2010 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Labor für molekulare Hämatologie
und Onkologie, Klinik I für Innere Medizin, Uniklinik Köln

10 Publikationen

Ripberger T, Tauscher M, **Praulich I**, Pabst B, Teigler-Schlegel A, Yeoh A, Göhring G, Schlegelberger B, Flotho C, Niemeyer CM, Steinemann D

Constitutional trisomy 8p11.21-q11.21 mosaicism: a germline alteration predisposing to myeloid leukaemia

British Journal of Haematology, 155 (2): 209-217, 2011

Praulich I, Tauscher M, Göhring G, Glaser S, Hofmann W, Feurstein S, Flotho C, Lichter P, Niemeyer CM, Schlegelberger B, Steinemann D

Clonal heterogeneity in childhood myelodysplastic syndromes—Challenge for the detection of chromosomal imbalances by array-CGH

Genes, Chromosomes and Cancer, 49: 885–900, 2010

Steinemann D, Arning L, **Praulich I**, Stuhmann M, Hasle H, Starý J, Schlegelberger B, Niemeyer CM, Flotho C

Mitotic recombination and compound-heterozygous mutations are predominant NF1-inactivating mechanisms in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) and neurofibromatosis type 1

Haematologica, 95 (2): 320-323, 2009

Steinemann D, **Praulich I**, Otto N, Göhring G, Niemeyer CM, Schlegelberger B

Mutation analysis of the HAX1 gene in childhood myelodysplastic syndrome

British Journal of Haematology, 145 (4): 533-534, 2009

Vorträge:

Praulich I

Kindliches MDS – genomische Analyse mittels array-CGH

1. Niedersächsisches Humangenetikertreffen, Hannover, November 1, 2008

Praulich I, Kratz C, Flotho C, Göhring G, Weigmann A, Lichter P, Niemeyer C, Schlegelberger B, Steinemann D

Matrix-CGH (Comparative Genomic Hybridization) zur Analyse genomischer Aberrationen bei myelodysplastischen Syndromen im Kindesalter

21. Tumorzytogenetische Arbeitstagung, Uslar – Volpriehausen, Mai 22-24, 2008

Praulich I, Kratz C, Flotho C, Göhring G, Weigmann A, Lichter P, Niemeyer C, Schlegelberger B, Steinemann D

Genome-wide copy number analysis in childhood MDS using array-CGH

3rd ELN Workshop, Genetics of MDS, Wien, September 25-26, 2007

Poster:

Praulich I, Kratz C, Flotho C, Göhring G, Lichter P, Niemeyer C, Schlegelberger B, Steinemann D
Rearrangement of the HOXA gene cluster at 7p15 in children with MDS identified by high resolution array-CGH

Mechanisms of early differentiation: embryogenesis, myogenesis (cardiac differentiation) and hematopoiesis / lymphopoiesis, Barsinghausen, September 1-5, 2008

Praulich I, Kratz C, Flotho C, Göhring G, Lichter P, Niemeyer C, Schlegelberger B, Steinemann D
Genome-wide copy number analysis in childhood MDS using array-CGH

European Haematology Association, Copenhagen, 12-15 June 2008

11 Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. med. Brigitte Schlegelberger und PD Dr. rer. nat. Doris Steinemann für die Überlassung dieser sehr interessanten und aktuellen Aufgabenstellung in der Grundlagenforschung zur Leukämieentstehung. Durch ihre Unterstützung, ihre hilfreichen Anregungen und die gute Betreuung ermöglichten sie mir, dass ich mich intensiv mit der Thematik auseinandersetzen konnte. Ich danke ihnen außerdem, dass sie meine Teilnahme an nationalen und internationalen Konferenzen unterstützt haben.

Ich danke auch Prof. Dr. phil. nat. Michaela Scherr für die Übernahme des Korreferats und Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper für die Bereitschaft, den Prüfungsvorsitz zu übernehmen.

Für das stets offene und gute Arbeitsklima im Labor bedanke ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen, insbesondere bei Marcel Tauscher, Friederike Grundstedt, Dr. Noreen Otto, Marlies Eilers, Bernd Haermeyer und Elke Stürmer. Für die Unterstützung bei bioinformatischen Fragestellungen bedanke ich mich bei Dr. Anja Weigmann und ganz besonders bei Dr. Winfried Hofmann. Vielen Dank auch für die nette Arbeitsatmosphäre im Büro und damit an meine „Leidensgenossen“ Reena, Holger, Kathrin, Stefanie, Beate, Tim und Susanne; ich denke gerne an die Zeit mit euch im „Kinderzimmer“ zurück!

Ein besonderer Dank gilt Gillian Teicke, die mit ihrer herzlichen Art und ihrem unermüdlichen Einsatz dazu beigetragen hat, dass am Ende stets eine „runde Sache“ rausgekommen ist. Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern der EWOG-MDS Studie (Freiburg) bedanken, durch die eine unkomplizierte Bearbeitung von Fragestellungen mit klinischem Bezug möglich gemacht wurde.

Ich danke allen Menschen in meinem Umfeld, die es mir ermöglicht haben, diese Dissertation anzufertigen und mich während der gesamten, arbeitsintensiven Zeit der Erstellung unterstützt haben. Vielen Dank für die hilfreichen Anregungen, die Diskussionsbereitschaft und die investierte Zeit fürs Korrekturlesen! Nicht zuletzt gilt ein herzlicher Dank an meine Familie und Freunde, die mir durch ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre Hilfsbereitschaft eine uneingeschränkte Unterstützung entgegengebracht haben.

12 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Untersuchung genomischer Alterationen bei myelodysplastischen Syndromen (MDS) und juveniler myelomonozytärer Leukämie (JMML) im Kindesalter mittels hochauflösender array-CGH“

selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Hannover, den

Inka Praulich