

Forschungsinstitut für
krebskranke Kinder
Ludwig Boltzmann-Institut
für Zytogenetische Diagnostik
St. Anna Kinderspital, Wien

Zusammenfassung

Hämatologische Neoplasien und solide Tumoren weisen erworbene Chromosomenanomalien auf, welche wesentlich deren histopathologische und biologische Eigenschaften bestimmen. Im klinischen Bereich liefern diese spezifischen Karyotypmuster einzigartige diagnostische, differentialdiagnostische und prognostische Informationen, welche bereits in vielen Therapieprotokollen Verwertung finden. In der Grundlagenforschung helfen solche Analysen, Gene zu identifizieren, welche ursächlich am neoplastischen Transformationsprozess sowie an der Evolution und der Progression der Erkrankung beteiligt sind. Statistische Auswertungen dieser zytogenetischen Daten tragen überdies zur Erkennung von pathogenetisch relevanten Faktoren bei.

Schlüsselwörter

Zytogenetik, hämatologische Neoplasien, solide Tumore

Summary

Hematologic neoplasms and solid tumors contain acquired chromosomal abnormalities that significantly determine their histopathologic and biologic properties. In the clinical setting, particular karyotype patterns supply unique diagnostic, differential-diagnostic and prognostic informations that are already utilized in many treatment-protocols. In basic research, such analyses help to identify genes that are causatively involved in the neoplastic transformation process as well as in the evolution and progression of the disease. Moreover, statistical evaluation of these cytogenetic data contribute to the recognition of pathogenetic relevant factors.

Keywords

Cytogenetics, hematologic neoplasms, solid tumors

Die Tumorzytogenetik beschäftigt sich mit der Analyse erworbener Chromosomenanomalien bei hämatologischen Neoplasien und soliden Tumoren. Da ihr Auftreten ursächlich mit der neoplastischen Transformation assoziiert ist, kommen solche Veränderungen ausschließlich im neoplastischen Gewebe vor. Die Tumorzytogenetik ist mit wesentlich schwierigeren technischen, analytischen und interpretatorischen Problemen konfrontiert als die klinische und pränatale Zytogenetik. Eine erfolgreiche Analyse setzt eine Anreicherung von Metaphasen der entsprechenden Zellpopulationen voraus, welche durch deren spezifische Stimulierung erreicht wird. Aufgrund der speziellen Erfordernissen verschiedener Tumorgewebe an Wachstumsfaktoren ist es jedoch auch heute noch teilweise sehr schwierig, die entsprechenden selektiven Kulturbedingungen zu schaffen.

Abgesehen von Mosaiken findet man konstitutionelle Chromosomenanomalien in allen Körperzellen. Es handelt sich dabei in der Regel um sehr stabile und einfache Anomalien, wie zum Beispiel Trisomien, balancierte Translokationen, Inversionen und Mikrodeletionen. Im Gegensatz dazu sind tumor-assoziierte Karyotypanomalien häufig wesentlich komplexer und heterogener, das heißt, man kann innerhalb eines Gewebes Metaphasen mit vielen unterschiedlichen Veränderungen finden. Diese Variabilität ist fast immer durch die Evolution einer ursprünglich klonalen Zellpopulation verursacht, so daß man, abhängig von der zur Verfügung stehenden Da-

tenmenge, die Dynamik der Entwicklung solcher Karyotypanomalien stammbaumartig rekonstruieren kann (Johansson et al. 1994). Unabhängig von der Komplexität dieser Veränderungen muß jedoch auch in den aus Tumorzellen gewonnenen Metaphasen immer zumindest das Äquivalent eines kompletten haploiden Chromosomensatzes vorhanden sein.

Interessanterweise existieren keine neoplasie-assoziierten Anomalien, welche auch konstitutionell vorkommen. Umgekehrt können jedoch manche konstitutionelle Anomalien, wie zum Beispiel Trisomien der Chromosomen 21 und 8 sowie, wesentlich seltener, balancierte Translokationen zur neoplastischen Transformation von spezifischen Geweben prädisponieren. Solche Trisomien werden auch besonders häufig in benignen und malignen neoplastischen Geweben gefunden (Johansson et al. 1993; Seghezzi et al. 1996). Inwieweit es sich dabei tatsächlich um erworbene, neoplasie-spezifische Veränderungen oder aber um die Expansion eines chromosomal abnormalen Klons eines möglichen konstitutionellen Mosaiks handelt, ist noch offen (Seghezzi et al. 1996).

Neoplasie-assoziierte Karyotypanomalien korrelieren eng mit dem histopathologischen Subtyp einer Leukämie oder eines soliden Tumors und können deshalb diagnostisch verwertet werden (Mitelman et al. 1997; Mitelman et al. 1997; Grimwade et al. 1998, Ong and Le Beau 1998). Sie hängen stark von Umweltfaktoren wie geographischer Herkunft des Betroffenen und dessen damit verbundener spezifischer mutagener Exposition ab (Johansson et al. 1991; Andersen et al. 1998; Felix 1998). Andererseits spielen aber auch konstitutionelle Faktoren wie Geschlecht, Alter und Rasse eine nicht unwesentliche Rolle (Mertens et al. 1993; Johansson et al. 1996).

Prinzipiell kann man zwischen einfachen, krankheitsspezifischen Genrearrangements und sehr komplexen, relativ unspezifischen balancierten und unbalancierten Chromosomenrearrangements unterscheiden (Johansson et

al. 1996). Erstere treten überwiegend bei Leukämien, Lymphomen und mesenchymalen Tumoren wie zum Beispiel Sarkomen in Erscheinung und sind bei Neoplasien epithelialen Ursprungs sehr selten. Umgekehrt findet man bei den meisten epithelialen Neoplasien überwiegend den zweiten Typ, welcher wiederum bei Leukämien, Lymphomen und mesenchymalen Tumoren sehr selten ist. Primäre, krankheitsspezifische Veränderungen sind definitionsgemäß ausschließlich balancierte Chromosomenanomalien (Mitelman et al. 1997; Mitelman et al. 1997). Sekundäre Anomalien können entweder bereits bei Diagnosestellung zusätzlich vorhanden sein oder erst im Verlauf der Krankheit auftreten (Johansson et al. 1996; Johansson et al. 1994). Sie bestehen überwiegend aus unbalancierten Veränderungen. Primäre Anomalien werden insbesondere durch Umweltfaktoren induziert, wohingegen die sekundären Veränderungen eher durch konstitutionelle Faktoren determiniert werden (Johansson et al. 1996). Auch die sekundären Anomalien sind nicht zufällig verteilt, sondern korrelieren eng mit der jeweiligen zugrundeliegenden spezifischen primären Anomalie (Johansson et al. 1994). Eine klonale Evolution kann zu sehr komplexen Karyotypveränderungen führen. In solchen Fällen ist dann die korrekte Identifizierung der primären, krankheitsspezifischen Chromosomenanomalie schwierig, aber diagnostisch besonders wichtig.

Welche pathogenetische Bedeutung und molekularbiologischen Konsequenzen haben nun solche Karyotypanomalien? Balancierte Veränderungen wie reziproke Translokationen und Inversionen führen entweder zur Fusion oder Deregulation von Genen. Im Falle einer Genfusion kommt es zur Produktion einer hybriden RNA und in der Folge eines hybriden Proteins, welches gegenüber den physiologischen Ausgangsprodukten veränderte Eigenschaften aufweist und ursächlich zur neoplastischen Transformation beiträgt. Ein typisches Beispiel für eine solche Translokation ist das pathognomonische Merkmal der chronisch myeloischen Leukämie (CML), die $t(9;22)(q34;q21)$, wobei die Proto-Onkogene ABL am Chromosom

9 und BCR am Chromosom 22 fusionieren. Fusionsprodukte sind sowohl auf DNA-Ebene mit Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) unter Anwendung von genspezifischen Sonden als auch auf mRNA-Niveau mittels reverser Transkriptase und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) nachzuweisen. Bei der zweiten Art von Translokation wird das Onkogen in die Nähe regulatorischer Einheiten eines anderen Gens verlagert und verursacht dadurch dessen permanente unphysiologische Aktivierung. Ein typisches Beispiel dafür ist die Translokation $t(8;14)(q23;q34)$ des Burkitt-Lymphoms. Dabei wird das MYC Proto-Onkogen vom Chromosom 8 auf das Chromosom 14 vor das Gen der schweren Kette des Immunglobulins transloziert und durch Immunglobulin-spezifische Enhancersequenzen auf Dauer hochreguliert (Ong and Le Beau 1998). Diese Art von Translokationen sind mit FISH nur zum Teil und mit PCR praktisch nicht detektierbar (Siebert et al. 1998).

Bei den quantitativen Karyotypanomalien findet man Zugewinn oder Verlust von Chromosomenmaterial. Die pathogenetische Rolle von numerischen Chromosomenanomalien und Isochromosomen ist noch völlig unklar (Mertens, Johansson, and Mitelman 1994). Genamplifikationen können intrachromosomal in Form von sogenannten „homogeneous staining regions (HSR)“ oder extrachromosomal in Form von sogenannten „double minutes (DM)“ vorliegen. Die Multiplikation entweder eines einzelnen Proto-Onkogens oder aber eines Chromosomenabschnitts führt zu einer vermehrten Expression und Produktion von Proteinen, welche von in der amplifizierten Region gelegenen Genen codiert werden (Schwab 1998). Der Verlust einzelner Chromosomen oder die Deletion bestimmter Chromosomenabschnitte impliziert, daß in diesen Regionen pathogenetisch relevante Tumorsuppressorgene lokalisiert sind (Johansson et al. 1993; Mertens et al. 1997). Die Größe dieser Deletionen sind von Patient zu Patient sehr unterschiedlich. Man nimmt daher an, daß das für die Tumor- oder Leukämieentwicklung relevante Gen im kleinsten gemeinsam deletierten Be-

reich lokalisiert sein muß. Um solche Gene identifizieren zu können, benötigt man daher viele solche Deletionen, welche dann mittels FISH und molekulargenetischen Methoden feiner analysiert und kartiert werden können.

Die bisher beschriebenen Zusammenhänge belegen klar, welche Bedeutung die Tumorzytogenetik für die Grundlagenforschung hat. Zytogenetische Befunde bilden eine wesentliche Voraussetzung für die molekulargenetische Identifizierung der in den entsprechenden Chromosomenanomalien involvierten Gene. Viele der bei den wichtigsten und am häufigsten vorkommenden spezifischen Chromosomenrearrangements betroffenen Gene wurden bereits über diesen Mechanismus isoliert. Da eine entsprechende ausführliche Darstellung der spezifischen Chromosomenrearrangements und der daran beteiligten Gene den Rahmen dieses Artikels sprengen würde, verweise ich den interessierten Leser auf eine über das Internet frei zugängliche Datenbank, in der die relevanten Informationen gesammelt und laufend aktualisiert werden („Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology“, <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer>). Durch innovativer molekulargenetischer Methoden und der zunehmenden Zahl an verfügbaren FISH-Proben ist die Identifizierung und Klonierung solcher Gene auch immer einfacher und rascher durchzuführen. Eine wichtige Aufgabe der Zytogenetik besteht in diesem Zusammenhang nun insbesondere auch darin, immer wieder neue, aber potentiell interessante Chromosomenrearrangements zu entdecken, um damit deren weitere molekulargenetische Analyse zu ermöglichen. Die neuen Entwicklungen der FISH, wie die vergleichende Genomhybridisierung („comparative genomic hybridization“; CGH) und die Vielfarben-FISH mit Chromosomen-spezifischen Painting- und Telomersonden, sind für solche Zwecke ganz besonders hilfreich, da man damit auch zytogenetisch kaum oder nicht erkennbare Veränderungen entdecken kann (Knuutila et al. 1998). Solche Methoden werden auch wesentlich zur De-

chiffrierung komplexer Karyotypanomalien beitragen. Es ist zu erwarten, daß dadurch das Spektrum der krankheitsspezifischen Anomalien wesentlich erweitert werden kann. Wie bereits schon von bisher konventionell gewonnenen zytogenetischen Daten, insbesondere von Untersuchungen von Sekundärleukämien abzuleiten ist, bilden wahrscheinlich auch die bisher als unspezifisch oder als biologisch irrelevant angesehenen Chromosomenanomalien solch komplexer Karyotypveränderungen ganz charakteristische Muster (Johansson et al. 1991; Johansson et al. 1993; Mertens et al. 1993; Johansson et al. 1994; Johansson et al. 1996; Mertens et al. 1997; Mitelman et al. 1997; Mitelman et al. 1997, Andersen et al. 1998). Diese codieren sicherlich noch viele wertvolle Hinweise auf auslösende Faktoren und pathogenetische Mechanismen.

Neben den Proto-Onko- und Tumorsuppressorgenen verdienen im Zusammenhang mit der Zytogenetik noch zwei weitere Genklassen Erwähnung. Die Ausschaltung von sogenannten „mismatch repair“- oder Mutatorgenen verursachen genomweite Störungen, vor allem in repetitiven Sequenzen (Loeb 1998). Interessanterweise induzieren aber solche Mutationen anscheinend keine Chromosomenanomalien (Lengauer et al. 1998). Andererseits führen Mutationen der sogenannten „mitosis checkpoint“ Gene zu massiven Störungen der Chromosomenverteilungen (Lengauer et al. 1998).

Mindestens so bedeutend wie der Beitrag den die Tumorzytogenetik für die Grundlagenforschung leistet, ist jener für die klinische Forschung und für das Management der betroffenen Patienten. Chromosomenanalysen helfen bei der diagnostischen und differentialdiagnostischen Abklärung und liefern wertvolle prognostische Hinweise, welche bereits auch Eingang in diversen Therapieprotokollen zur Stratifizierung der Patienten gefunden haben (Grimwade et al. 1998; Ong and Le Beau 1998; Pui and Evans 1998; Mitelman et al. 1997). Die Ergebnisse zytogenetischer Untersuchungen werden auch in Klassifikationssystemen

berücksichtigt. Sie erlauben außerdem, neue spezifische Krankheitsbilder zu definieren und andere besser abzugrenzen. In vielen Fällen kann die relevante Chromosomenanomalie bereits auf Grund charakteristischer klinischer und zellmorphologischer Besonderheiten mit großer Wahrscheinlichkeit vorausgesagt werden. Wegen diversen technischen Unzulänglichkeiten ist die Zytogenetik für die Überwachung des Therapieerfolges nicht direkt, sondern nur in Form der FISH geeignet. Die Definition spezifischer chromosomaler Marker schafft jedoch auch die Voraussetzungen für molekulargenetische Techniken, welche dann für den direkten Nachweis der minimalen Resterkrankung eingesetzt werden können.

Insbesondere bei Leukämien, Lymphomen und mesenchymalen Tumoren haben die Ergebnisse zytogenetischer Analysen ihre klinische Bewährungsprobe schon lange bestanden. Sie liefern Informationen, welche mit keiner anderen Laboruntersuchung in dieser Form zur Verfügung gestellt werden können. Eine zytogenetische Abklärung sollte daher bei allen diesen Fällen unumgänglicher Bestandteil einer modernen und umfassenden Diagnostik sein. Epitheliale Tumoren mit ihren wesentlich komplexeren Karyotypanomalien stellen hingegen weiterhin eine besondere Herausforderung für den Tumorzytogenetiker dar. Mit den neuen molekularen zytogenetischen Techniken sind aber auch bei den Analysen dieser Neoplasien bereits in naher Zukunft spektakuläre Fortschritte zu erwarten.

Literatur

Andersen MK, Johansson B, Larsen SO, Pedersen-Bjergaard J (1998) Chromosomal abnormalities in secondary MDS and AML. Relationship to drugs and radiation with specific emphasis on the balanced rearrangements. *Haematologica*. 83: 483-488.

Felix CA (1998) Secondary leukemias induced by topoisomerase-targeted drugs. *Biochim.Biophys.Acta* 1400: 233-255.

Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A (1998) The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 92: 2322-2333.

Johansson B, Heim S, Mandahl N, Mertens F, Mitelman F (1993) Trisomy 7 in nonneoplastic cells. *Genes Chromosomes Cancer* 6: 199-205.

Johansson B, Mertens F, Mitelman F (1991) Geographic heterogeneity of neoplasia-associated chromosome aberrations. *Genes Chromosomes Cancer* 3: 1-7.

Johansson B, Mertens F, Mitelman F (1993) Cytogenetic deletion maps of hematologic neoplasms: circumstantial evidence for tumor suppressor loci. *Genes Chromosomes Cancer* 8: 205-218.

Johansson B, Mertens F, Mitelman F (1994) Secondary chromosomal abnormalities in acute leukemias. *Leukemia* 8: 953-962.

Johansson B, Mertens F, Mitelman F (1996) Primary vs. secondary neoplasia-associated chromosomal abnormalities-balanced rearrangements vs. genomic imbalances? *Genes Chromosomes Cancer* 16: 155-163.

Knuutila S, Bjorkqvist AM, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Monni O, Szymanska J, Larramendy ML, Tapper J, Pere H, El-Rifai W, Hemmer S, Wasenius VM, Vidgren V, Zhu Y (1998) DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol.* 152: 1107-1123.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396: 643-649.

Loeb LA (1998) Cancer cells exhibit a mutator phenotype. *Adv. Cancer Res.* 72: 25-56.

Mertens F, Johansson B, Hoglund M, Mitelman F (1997) Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res* 57: 2765-2780.

Mertens F, Johansson B, Mitelman F (1993) Age- and gender-related heterogeneity of cancer chromosome aberrations. *Cancer Genet Cytogenet*

70: 6-11.

Mertens F, Johansson B, Mitelman F (1994) Isochromosomes in neoplasia. *Genes Chromosomes Cancer* 10: 221-230.

Mitelman F, Johansson B, Mandahl N, Mertens F (1997) Clinical significance of cytogenetic findings in solid tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 95: 1-8.

Mitelman F, Mertens F, Johansson B (1997) A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat. Genet* 15: 417-474, 1997

Ong ST, Le Beau MM (1998) Chromosomal abnormalities and molecular genetics of non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Oncol* 25:447-460.

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

Schwab M (1998) Amplification of oncogenes in human cancer cells. *Bioessays* 20: 473-479.

Seghezzi L, Maserati E, Minelli A, Dellavecchia C, Addis P, Locatelli F, Angioni A, Balloni P, Miano C, Cavalli P, Danesino C, Pasquali F (1996) Constitutional trisomy 8 as first mutation in multistep carcinogenesis: clinical, cytogenetic, and molecular data on three cases. *Genes Chromosomes Cancer* 17: 94-101.

Siebert R, Matthiesen P, Harder S, Zhang Y, Borowski A, Zuhlke-Jenisch R, Metzke S, Joos S, Weber-Matthiesen K, Grote W, Schlegelberger B (1998) Application of interphase fluorescence in situ Hybridization for the detection of the Burkitt translocation t(8; 14)(q24; q32) in B-cell lymphomas. *Blood* 91: 984-990.

Korrespondenzadresse

Univ. Prof. Dr. Oskar A. Haas
 Forschungsinstitut für krebskranke Kinder und
 Ludwig Boltzmann-Institut für Zytogenetische Diagnostik
 St. Anna Kinderspital
 Kinderspitalgasse 6
 A-1090 Wien
 Tel 0043 1 40170 480
 Fax 0043 1 40170 481
 o.a.haas@magnet.at

Anzeige

