

## FISH in der Diagnostik hämatologischer Neoplasien

Die hämatologischen Neoplasien umfassen ein sehr breites Spektrum, welches von den akuten Leukämien mit der akuten myeloischen (AML) und der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) zu Entitäten mit weniger aggressiven Verläufen wie den chronischen myeloproliferativen (CMPE) oder den myelodysplastischen Syndromen (MDS) reicht. Auf der Basis ihrer morphologischen, immunologischen und genetischen Eigenschaften lassen sich die einzelnen Entitäten darüber hinaus wiederum in eine Vielzahl von Subentitäten einteilen. Die Definition der jeweiligen Subtypen ist nicht nur für die biologische Subklassifizierung, sondern auch jeweils für die Einschätzung der Prognose und die Therapieplanung von hoher Relevanz. Beispielsweise können Patienten mit einer AML mit der Translokation  $t(15;17)/PML-RARA$ , der akuten Promyelozytenleukämie, in >80% durch die Kombination von Chemotherapie mit All-trans-Retinsäure (ATRA), einem Vitamin-A-Derivat, geheilt werden. Im Gegensatz dazu haben Patienten mit AML und  $MLL/11q23$ -Rearrangements eine ungünstige Prognose mit einem Gesamtüberleben unter 25%.

Die Definition des genetischen Risikoprofils hat daher bei sämtlichen hämatologischen Neoplasien eine hohe Bedeutung. Chromosomenbänderungsanalysen sind bei den akuten Leukämien, beim MDS sowie der Diagnose einer chronischen myeloischen Leukämie (CML) obligat und erlauben beispielsweise in etwa 55% aller AML-Fälle bei Erwachsenen und bei 60–80% der Patienten mit B-Linien-ALL die Detektion prognostisch relevanter chromosomaler Aberrationen. Allerdings lassen sich die chromosomalen Verände-

rungen bei den hämatologischen Neoplasien in vielen Fällen allein durch Chromosomenbänderungsanalysen nicht vollständig aufklären – beispielsweise komplexe Karyotypen bei der AML mit einer Vielzahl struktureller und numerischer Aberrationen. Ein weiteres Problem liegt im Zeitaufwand für die Chromosomenanalysen, da für einige spezifische Indikationen wie die akute Promyelozytenleukämie oder das Burkitt-Lymphom die genaue Zuordnung nach Möglichkeit noch am gleichen Tag zur Verfügung stehen sollte. Bei den niedrigmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL), z. B. der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) und multiplen Myelomen, erschwert darüber hinaus die eingeschränkte Zellproliferation in vitro die Durchführung von Chromosomenanalysen.

Basierend auf diesem Hintergrund sind die verschiedenen Techniken der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) aus der hämatologischen Diagnostik nicht mehr wegzudenken. Im Folgenden soll an den verschiedenen Krankheitskomplexen aufgezeigt werden, welchen Stellenwert die FISH-Analytik jeweils hat und für welche Fragestellungen sie eingesetzt wird. Dabei steht die FISH-Diagnostik nicht isoliert für sich, sondern ist in das Gesamtgefüge der diagnostischen Methoden eingebettet.

### Akute myeloische Leukämie

Die AML ist durch einen Anteil von mindestens 20% myeloischer oder myelomonozytärer Blasten im Knochenmark in Abgrenzung vom myelodysplastischen Syndrom definiert. Chromosomale Anomalien lassen sich in etwa 55% aller Fäl-

le nachweisen. Sie stellen den stärksten unabhängigen prognostischen Faktor sowohl in Bezug auf das Ansprechen auf die Therapie als auch auf das Überleben dar. Aus klinischer Sicht werden die AML zurzeit in 3 große prognostische Gruppen anhand ihres Karyotyps eingeteilt:

- günstig,
- intermediär und
- ungünstig.

Mit zunehmender Vielfalt der Therapieoptionen ist jedoch eine weitere Unterteilung zu erwarten, die sich an genetischen Parametern orientiert und für diese genetisch definierten Subgruppen die jeweils bestmögliche Therapie herausarbeitet, wie dies bereits für die akuten Promyelozytenleukämie geschehen ist.

Nach zytogenetischen Aspekten lassen sich 3 große Gruppen unterscheiden:

1. AML mit balancierten Rearrangements,
2. AML mit unbalancierten Rearrangements und
3. AML mit normalem Karyotyp.

Bei etwa 20% aller Patienten finden sich die balancierten Rearrangements  $t(15;17)(q22;q12)/PML-RARA$ ,  $t(8;21)(q22;q22)/AML-ETO$  und Inversion  $inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)/CBFB-MYH11$  – die beiden Letzteren werden als „core binding factor“ (CBF)-Leukämien bezeichnet. All diese Subtypen sind auch auf morphologischer Ebene durch spezifische Erscheinungsbilder gekennzeichnet; die akute Promyelozytenleukämie (APL) zeigt „faggot cells“ mit Bündeln von Auer-Stäbchen, die  $inv(16)$  eine atypische Eosinophile mit dunklen Granula, und bei der  $t(8;21)$  finden sich lan-

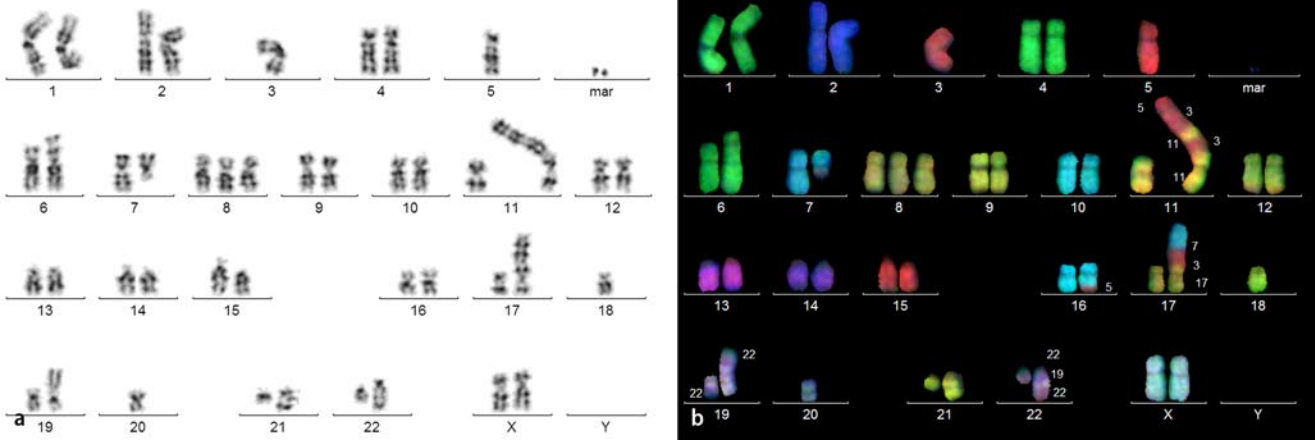


Abb. 1 ▲ Konventionelle Chromosomenanalyse (a) und 24-Farben-FISH (b) bei AML mit komplex aberrantem Karyotyp

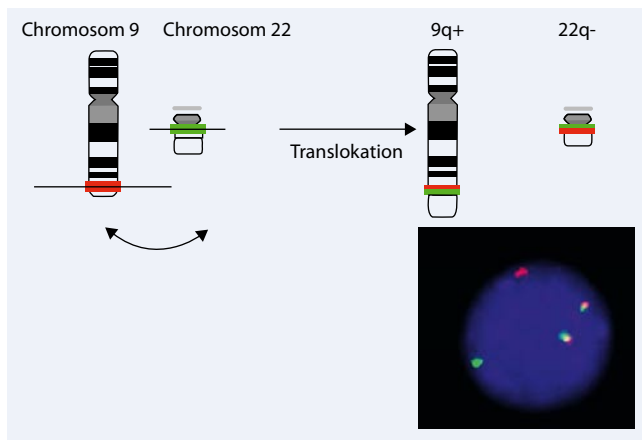


Abb. 2 ◀ Schematische Darstellung eines FISH-Assays zum Nachweis eines *BCR-ABL*-Rearrangements sowie Interphasekern mit *BCR-ABL*-Rearrangement

ge Auer-Stäbchen. Diesen Subtypen ist eine günstige Prognose nach Standardtherapie zu eigen, weshalb bei Patienten, welche nach der Induktionschemotherapie eine komplette Remission mit <5% Blasten im Knochenmark erreichen, eine allogene Stammzelltransplantation in der Regel nicht mehr durchgeführt wird.

Zum Nachweis der 3 genannten Translokationen bzw. der *inv(16)* stehen FISH-Sonden zur Verfügung, die auch an Interphasekernen eingesetzt werden können. Insbesondere für die Diagnose einer APL mit der *PML-RARA*-Fusion hat die Interphase-FISH-Analytik eine besondere Bedeutung: Sie klärt binnen weniger Stunden, ob die entsprechende Aberration vorliegt, sodass ggf. mit der Therapie mit ATRA begonnen werden kann. Dies kann bei rechtzeitigem Einsatz das Auftreten der lebensbedrohlichen thrombotischen bzw. Blutungskomplikationen limitieren oder gar verhindern, welche für diesen AML-Subtyp typisch sind.

Zu dieser Gruppe von reziproken Rearrangements, welche auch innerhalb der WHO-Klassifikation [12] eine besondere Wertung erfahren, zählen ferner die prognostisch ungünstigen *MLL/11q23*-Rearrangements („mixed lineage leukemia-Gen“). *MLL*-Rearrangements wurden mit >50 verschiedenen Partnergenen beschrieben und können auch mit FISH-Sonden an Interphasekernen identifiziert werden.

Patienten mit normalem Karyotyp oder beispielsweise mit einer Trisomie 8 gehören zur „intermediären Risikogruppe“, welche allerdings sehr heterogen ist, hier ist in Zukunft eine weitere Aufschlüsselung zu erwarten.

Die 3. Gruppe umfasst unbalancierte Veränderungen und komplexe Karyotypen mit  $\geq 3$  klonalen Aberrationen, welche prognostisch als äußerst ungünstig einzustufen sind [5, 16, 18]. Hier wird frühzeitig eine allogene Transplantation angestrebt, um den damit verbundenen Immuneffekt auszunützen. Für ei-

ne Vielzahl von Aberrationen aus dieser Gruppe – beispielsweise Deletionen im langen Arm von Chromosom 5 (zumeist in den Regionen 5q13,3–5q33,1) oder Deletionen im langen Arm von Chromosom 7 oder Monosomien (–7) bzw. Trisomien (+8, +11, +13, +21) stehen Interphase-FISH-Sonden zur Verfügung. Das Gleiche gilt für Veränderungen an 3q wie die *inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)*.

Die vollständige Aufklärung komplexer Karyotypen wird durch „chromosome painting“ bzw. 24-Farben-FISH an Metaphasechromosomen ermöglicht (■ Abb. 1).

Somit ist es möglich, einen Teil der rekurrenten zytogenetischen Aberrationen bei der AML mit Interphase-FISH abzubilden (■ Tab. 1). Dies dient zum einen der Bestätigung der Befunde der Chromosomenanalyse. Darüber hinaus ist mittels Interphase-FISH-Screening-Untersuchungen immer noch eine Risikostratifizierung möglich, falls Chromosomenanalysen aufgrund schlechter Knochenmarkprobenqualität nicht möglich sind. Zudem kann die Interphase-FISH aufgrund der höheren Sensitivität im Vergleich zur Chromosomenanalyse zur Verlaufsdagnostik im Sinne einer Bestimmung der residuellen Leukämiezelllast („minimal residual disease“; MRD) eingesetzt werden. [3] Dies spielt v. a. bei den 15% aller Patienten mit komplex aberranten Karyotypen eine Rolle, da in dieser Subgruppe meist keine genetischen Marker für eine molekulare Verlaufsdagnostik mittels PCR zur Verfügung stehen.

## Akute lymphatische Leukämie

Die ALL kann man nach genetischen Gesichtspunkten zum einen nach der Ploidie einteilen. Ein „hochhyperdiploider Karyotyp“ mit >50 Chromosomen ist prognostisch günstiger als ein normaler oder hypodiploider Karyotyp. Chromosomale Zugewinne finden sich beim „hochhyperdiploiden Karyotyp“ v. a. bei den Chromosomen 4, 6, 10, 14, 18 und 21.

Außerdem wird eine Klassifizierung nach strukturellen Veränderungen – meist balancierten Rearrangements – vorgenommen: Die häufigste Aberration bei Erwachsenen ist die Philadelphia-Translokation – t(9;22)(q34;q11), die auf molekularer Ebene zu einem *BCR-ABL*-Rearrangement führt (■ **Tab. 2**). Diese findet sich v. a. bei B-Vorläufer-Leukämien und ist prognostisch sehr ungünstig, weshalb sie als Indikation zur allogenen Stammzelltransplantation gilt. Bei etwa 5% aller Fälle ist das *BCR-ABL*-Rearrangement kryptisch, d. h. durch Chromosomenbänderungsanalysen nicht detektierbar, wohingegen mittels FISH und PCR (Polymerasekettenreaktion) in allen Fällen eine Detektion gelingt. Angesichts der Möglichkeit der Therapieerweiterung durch Tyrosinkinaseinhibitoren in Ergänzung zur Chemotherapie bei diesem Subtyp hat die Detektion dieser Translokation eine große Bedeutung.

Die Burkitt-ALL/reife B-ALL zeigt auf morphologischer Ebene basophile Blasten mit vielen Vakuolen. Die meisten Fälle sind mit einer t(8;14)(q24;q32)/*IgH-MYC* assoziiert (■ **Tab. 2**). Daneben finden sich auch Rearrangements des in der Chromosomenbande 8q24 lokalisierten *MYC*-Protoonkogens innerhalb der Varianten t(2;8) und t(8;22). Mitunter ergeben sich durch die große Lymphomlast bei diesem Subtyp vital bedrohliche Situationen, weshalb umgehend mit der Therapie begonnen werden muss. Bei entsprechendem Verdacht ist daher rasch die entsprechende Interphase-FISH-Diagnostik auf *MYC*-Rearrangements einzuleiten.

Vor allem im Kindesalter findet man die prognostisch günstige balancierte Translokation t(12;21)(p13;q22)/*ETV6-AML1*-Fusion. Sie lässt sich mittels Chromosomenbänderungsanalyse aufgrund der Lage der Bruchpunkte nur sehr schwer er-

medgen 2008 · 20:367–373 DOI 10.1007/s11825-008-0131-x  
© Springer Medizin Verlag 2008

U. Bacher · C. Haferlach

## FISH in der Diagnostik hämatologischer Neoplasien

### Zusammenfassung

Sämtliche hämatologische Neoplasien zeigen eine große klinische Variabilität. Allerdings lassen sich die Entitäten in eine Vielzahl von Prognose bestimmenden Subtypen auf der Basis genetischer Marker einteilen. Die individuelle Abstimmung der Therapie erfordert daher eine exakte Klassifikation des genetischen Subtyps. In Verbindung mit der Chromosomenanalyse spielt die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) dabei eine zentrale Rolle – für die weitere Aufklärung von Befunden der Chromosomenanalyse, z. B. bei akuten Leukämien, oder die Klassifikation diverser Subtypen, wie bei den Non-Hodgkin-Lymphomen. In Abhängigkeit von der Erkrankung kommt der FISH-Analyse eine unterschiedliche Bedeutung zu. Sie wird zum ei-

nen als Methode der ersten Wahl zur genetischen Charakterisierung einer Erkrankung, z. B. des multiplen Myeloms, angewandt, oder kommt in Kombination mit der Chromosomenbänderungsanalyse zum Einsatz. Ferner kommt ihr eine essenzielle Bedeutung zu, wenn eine rasche Bestätigung einer Diagnose erforderlich ist, wie bei der akuten Promyelozytenleukämie mit t(15;17)/*PML-RARA*-Rearrangement, bei der ein sofortiger Therapiebeginn mit All-trans-Retinsäure (ATRA) notwendig ist.

### Schlüsselwörter

FISH · Chromosomenanalysen · Risikostratifizierung · Prognose · Leukämie

## FISH in the diagnosis of hematological neoplasias

### Abstract

All hematological malignancies are characterized by considerable clinical heterogeneity. The diverse entities can be subdivided into a variety of prognosis-defining subtypes on the basis of cytogenetic aberrations and molecular mutations. To adapt the intensity of treatment to the patient's individual risk profile, an exact classification of the subtypes on the basis of genetic markers is essential. Diverse fluorescent *in situ* hybridization (FISH) techniques thereby play a central role in interaction with classic chromosome banding analyses for clarifying findings of chromosome analyses, such as in the acute leukemias, or for classifying the diverse subtypes, as in the non-Hodgkin's lymphomas. Depending on

the disease, the clinical impact of FISH varies. It is used as the method of choice for genetic characterization (e.g., in multiple myeloma) or is used in combination with chromosome banding analysis. Furthermore, interphase FISH is essential when rapid confirmation of the diagnosis is needed, as in acute promyelocytic leukemia with the t(15;17)/*PML-RARA* rearrangement, for which therapy with all-trans retinoic acid (ATRA) should be immediately started.

### Keywords

FISH · Chromosome banding · Risk stratification · Prognosis · Leukemia

**Tab. 1 Interphase-FISH-Analytik bei AML**

Zytogenetische Aberration	Indikation
Reziproke Translokationen	
t(15;17)(q21;q12)/PML-RARA	Akute Promyelozytenleukämie (FAB M3/M3v)
t(8;21)(q22;q22)/AML1-ETO	FAB M2 mit langen Auer-Stäbchen
inv(16)/t(16;16)(p13q22)/CBFB-MYH11	FAB M4eo
MLL/11q23-Rearrangements	Monozytäre AML, therapieassoziierte AML
Trisomien	+8 Bestätigung der entsprechenden Befunde in der Chromosomenanalyse +11 Screening nach rekurrenten Aberrationen, falls keine Chromosomenanalyse möglich +13 +21
Monosomien	-7
Strukturelle Aberrationen	5q 7q

FAB French-American-British-Classification, international verwendete Klassifikation der AML

**Tab. 2 Frequenz zytogenetischer Aberrationen bei der ALL des Erwachsenen**

Aberration	Gene	Immunologischer Subtyp	Frequenz [%]
t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL	c-ALL	25–30
t(4;11)(q21;q23)	MLL-AF4	Pro-B-ALL	6
t(8;14)(q24;q32)	IGH-MYC	B-ALL	5
t(1;19)(q23;p13)	E2A-PBX1	Prä-B-ALL	3
t(10;14)(q24;q11)	HOX11-TCR	T-ALL	3
t(12;21)(p13;q22)	ETV6-AML1	Prä-B-ALL	<1
9p	p16INK4A	T-, prä-B-ALL	15
6q	?	c-, prä-B, T-ALL	6
t(14q11)	TCR	T-ALL	6

kennen und wird daher in der Regel mittels FISH und PCR nachgewiesen.

MLL/11q23-Rearrangements, welche auch bei der AML zu finden sind, lassen sich auch bei der ALL feststellen und sind auch hier prognostisch ungünstig. Am häufigsten ist die t(4;11)(q21;q23)/MLL-AF4 in besonderer Assoziation zur Pro-B-ALL. Die Interphase-FISH-Diagnostik spielt hier ebenso wie die PCR eine tragende Rolle (■ Tab. 2).

Bei der T-ALL zeigen sich häufig balancierte Rearrangements mit Bruchpunkten in den Regionen 7q32–q36 und 14q11–q13, wo die T-Zell-Rezeptor(TCR)-Gene lokalisiert sind.

### Chronische myeloische Leukämie

Die CML grenzt sich von den übrigen CMPE klar durch das Vorliegen einer Philadelphia-Translokation ab. Charakteristisch ist eine Stadienabfolge von einer chronischen Phase mit <5% Blasten bis hin zur Blastenkrise. Mittels einer Kombination von Chromosomenanalysen, FISH und PCR kann das Ansprechen auf die Therapie sehr genau beurteilt werden

[2, 15]. Die CML gilt seit Einführung der Tyrosinkinaseinhibitoren wie Imatinib daher als Modell für die Verzahnung hämatologischer Diagnostik und zielgerichteter Therapie („targeted therapy“).

In 95% aller Fälle von CML sind die Standard-Philadelphia-Translokation t(9;22)(q34;q11) bzw. eine variante Philadelphia-Translokation in der klassischen Chromosomenanalyse nachweisbar. Allerdings entzieht sich in etwa 5% aller Fälle das BCR-ABL-Rearrangement der Chromosomenanalyse. Diese kryptischen Rearrangements, die meist durch submikroskopische Insertionen entstehen, können aber mittels Interphase-FISH oder PCR detektiert werden (■ Abb. 2; [15]).

Interphase-FISH bietet gegenüber der PCR den Vorteil, dass auch Fälle mit seltenen atypischen BCR-ABL-Transkripten detektiert werden können. Auch submikroskopische Deletionen im Bereich der Bruchpunktregion können erfasst werden, deren prognostische Bedeutung zurzeit kontrovers diskutiert wird.

Außerdem ermöglicht die Interphase-FISH eine rasche Diagnose der CML, was im Fall von sehr hohen Leukozytenzahlen

mit Viskositätsstörungen von vitaler Bedeutung sein kann. Daneben kann die Interphase-FISH in der Verlaufsdiagnostik eingesetzt werden, wenngleich die Sensitivität unterhalb derjenigen der PCR liegt.

Von Bedeutung sind die FISH-Techniken auch für die Aufklärung so genannter varianter Philadelphia-Translokationen, bei welchen 22q entweder an ein anderes Chromosom als 9 transloziert ist („einfache Varianten“) oder bei welchen neben den Chromosomen 9 und 22 mehrere andere Chromosomen einbezogen sind („komplexe Varianten“).

FISH sollte allerdings bei der Erstdiagnose der Erkrankung immer komplementär zur Chromosomenanalyse eingesetzt werden und kann diese nicht ersetzen: Zusätzliche chromosomale Veränderungen in der Philadelphia-positiven Hämatopoese („klonale Evolution“), welche einen Risikofaktor für den Progress der Erkrankung darstellen, können nur durch Chromosomenanalysen identifiziert werden. Unter Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren treten darüber hinaus mitunter klonale Veränderungen in der Philadelphia-negativen Hämatopoese auf, gelegentlich in Assoziation zur Entwicklung sekundärer myeloischer Neoplasien wie MDS oder AML.

### Chronische lymphatische Leukämie

Die CLL aus dem Formenkreis der niedrigmalignen Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) repräsentiert die häufigste Leukämie bei Erwachsenen in westlichen Breitengraden. Aufgrund der erheblichen Variabilität im klinischen Verlauf – ein Teil der Patienten bleibt jahrelang asymptomatisch, während andere binnen kürzester Zeit einen Progress zeigen – gewinnt die individuelle Abstimmung der Therapieintensität auch bei dieser Entität zunehmend an Bedeutung [11]. Die Abschätzung der Prognose beruht auf einem Zusammenspiel der Zytomorphologie, mit welcher der Reifegrad der lymphatischen Zellen beurteilt wird, bestimmten Eigenschaften in der Immunphänotypisierung sowie dem molekularen Immunglobulinschwerkettengenmutationsstatus.

Da bei niedrigmalignen NHL die klassische Chromosomenanalyse durch die

**Tab. 3** Korrelation rekurrenter genetischer Veränderungen nach der Interphase-FISH-Analyse bei B-CLL mit der Prognose. (Nach [19])

Zytogenetische Aberration	Medianes Überleben [Monate]
del(13)(q14)	133
+12	114
„Normaler Karyotyp“	111
del(11)(q22q23)	79
del(17)(p13)	32

geringere In-vitro-Proliferationsfähigkeit der malignen Zellen behindert ist, hat hier zurzeit die Interphase-FISH diagnostisch die größte Bedeutung; Prognostisch günstig sind Deletionen des Chromosomenabschnitts 13q [del(13)(q14)], sofern sie als alleinige Veränderung beobachtet werden. Eine Trisomie 12 und das Fehlen zytogenetischer Aberrationen in der Interphase-FISH-Analytik („normaler Karyotyp“) bedeuten eine intermediäre Prognose. Hingegen sind 11q- und besonders TP53-Deletionen auf 17p13 prognostisch sehr ungünstig (■ **Tab. 3**; [19]).

Anhand der Interphase-FISH-Untersuchung auf das Vorliegen einer t(11;14)(q13;q32)/*IgH-CCND1* kann ferner eine Abgrenzung zum Mantelzelllymphom (MCL) erfolgen. Dies ist von Bedeutung, da sowohl die B-CLL als auch das MCL aberrant CD5 exprimieren und sich somit in der Immunphänotypisierung nicht sicher voneinander unterscheiden lassen.

## Non-Hodgkin-Lymphome

Das Spektrum der NHL ist sehr breit. Man unterscheidet zum einen Vorläufer- von reifen Lymphomen, ferner Lymphome der T- und B-Linie. In jeder Kategorie lässt sich dann wiederum eine Vielzahl von Subtypen voneinander abgrenzen. Die häufigsten niedrigmalignen B-NHL werden durch das folliculäre Lymphom, das MCL und das Marginalzonenlymphom repräsentiert. Das diffus großzellige Lymphom (B-DLCL) repräsentiert im Gegensatz dazu ein Vorläuferlymphom. Die meisten B-NHL-Fälle betreffen die B-Linie, während T-Lymphome kaum 20% aller Fälle von NHL ausmachen. Noch seltener sind „Natural Killer“-Zell-Lymphome.

**Tab. 4** Beispiele für reziproke Rearrangements bei verschiedenen NHL

Entität	Zytogenetik	Molekulares Rearrangement
Follikuläres Lymphom	t(14;18)(q32;q21)	<i>IgH-BCL2</i>
Mantelzelllymphom	t(11;14)(q13;q32)	<i>IgH-CCND1</i>
MALT-Lymphom	t(11;18)(q21;q21)	<i>AP12-MALT1</i>
DLBCL	t(3;V)(q27;V)	<i>BCL6</i> -Rearrangements
Anaplastisches großzelliges Lymphom	t(2;V)(p23;V)	<i>ALK</i> -Rearrangements

DLBCL „diffuse large B cell lymphoma“, MALT „mucosa associated lymphatic tissue“; V variable Partnerchromosomen

Die WHO-Klassifikation der Lymphome basiert auf der früheren REAL-Klassifikation (REAL: Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms) und bezieht morphologische, immunologische und genetische Kriterien ein [12].

Häufig sind Gene, welche die Ketten der Immunglobuline (bei B-Linien-Lymphomen) oder der T-Zell-Rezeptoren (bei T-Lymphomen) kodieren, in die subtypspezifischen Rearrangements involviert. Beim Burkitt-Lymphom (dem Korrelat zur reifen B-ALL) mit der t(8;14)(q24;q32) wird *MYC* in die Nähe des Genlocus für die schwere Kette der Immunglobuline (*IgH*-Locus) auf Chromosom 14 transloziert, wodurch *MYC* überexprimiert wird.

Translokationen von Protoonkogenen in den Schwerkettenlocus wurden auch beim folliculären Lymphom mit der t(14;18)(q32;q21) mit Involvierung von *BCL2*, beim MCL mit der t(11;14)(q13;q32) unter Beteiligung von *BCL1* (*CCND1*) sowie bei den hochmalignen B-Zell-Lymphomen mit der t(3;14)(q27;q32) unter Beteiligung von *BCL6* beschrieben (■ **Tab. 4**). Für die genannten Veränderungen stehen Interphase-FISH-Sonden zur Verfügung.

## Multiples Myelom

Das multiple Myelom aus der Kategorie der niedrigmalignen NHL repräsentiert die häufigste Neoplasie im Skelettsystem. Die meisten Patienten erkranken im höheren Lebensalter. Ein breites Spektrum therapeutischer Möglichkeiten steht zur Verfügung, welches neben konventionellen Chemotherapien neue Substanzen wie Thalidomid oder Revlimid, Hochdosischemotherapien mit autologer Stammzell-

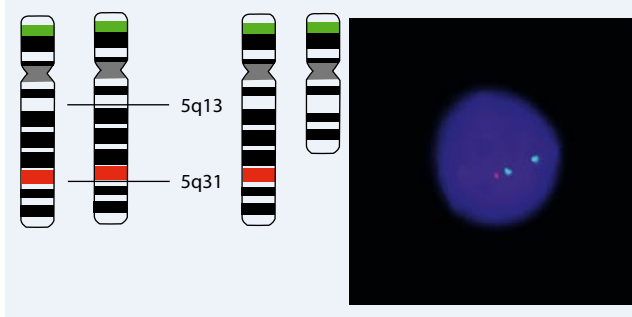
transplantation oder in Einzelfällen gar allogene Transplantationen umfasst.

Aufgrund der großen Variabilität der Prognose mit einem Überleben zwischen einigen Monaten und mehreren Jahren gewinnt die Definition des individuellen Risikoprofils auch bei dieser Entität für die Therapieplanung zunehmende Bedeutung. Aufgrund der geringen Proliferationskapazität der Myelomzellen hat Interphase-FISH dabei eine essenzielle Bedeutung. Bei geringerer Infiltration im Knochenmark ist es für eine valide FISH-Diagnostik notwendig, die Plasmazellen anzureichern beispielsweise mittels magnet-assoziiertes Sortierung (MACS).

Deletionen am langen Arm von Chromosom 13 – del(13)(q14) – werden als prognostisch ungünstig eingestuft [7, 20]. Als noch ungünstiger erwiesen sich *TP53*-Deletionen auf 17p13. Translokationen unter Beteiligung der *IgH*-Gene in der Chromosomenbande 14q32 sind weitere häufige Aberrationen, wobei verschiedene Partnergene vorhanden sind [6]. Während die t(14;16)(q32;q23) mit *MAF* und t(4;14)(p16;q32) mit *FGFR3* prognostisch ungünstig sind [9], ist die Translokation t(11;14)(q13;q32) mit *CCND1* als Partnergen als prognostisch eher günstig anzusehen. Diese Aberrationen können sämtlich durch Interphase-FISH abgebildet werden.

Daneben findet man Zugewinne der Chromosomen 3, 7, 9, 11 und 15 sowie Verluste der Chromosomen 1, 13 und 22.

Sämtliche größeren Studien beziehen bereits die Risikostratifizierung nach Interphase-FISH in die Therapieplanung beim multiplen Myelom ein.



**Abb. 3** ◀ Schematische Darstellung eines FISH-Assays zum Nachweis einer 5q31-Deletion sowie Interphasekerns mit 5q31-Deletion

## Myelodysplastische Syndrome

MDS sind klonale Erkrankungen hämatopoetischer Stammzellen. Im peripheren Blut resultieren Zytopenien aus einer uneffektiven Hämatopoese, wobei das Knochenmark meist hyperzellulär ist. Dabei zeigt sich eine große Variabilität in den klinischen Verläufen. Während Patienten mit 5q-Syndrom oft über mehrere Jahre stabil sind, zeigt sich bei Patienten mit komplexen Veränderungen meist binnen kurzem eine Transformation in eine akute myeloische Leukämie. Die therapeutischen Möglichkeiten haben sich in den letzten Jahren erweitert, beispielsweise um das Thalidomidderivat Lenalidomid oder demethylierende Substanzen wie Azacytidin; allogene Stammzelltransplantationen können nun auch bei älteren Patienten aufgrund neuer Konditionierungskonzepte und verbesserter supportiver Therapiemöglichkeiten durchgeführt werden.

Diese Breite möglicher therapeutischer Maßnahmen bringt hohe Anforderungen an Klassifikation, Stadienbeurteilung und Prognoseabschätzung für jeden einzelnen Patienten mit sich. Nur das Zusammenspiel von Zytomorphologie, Histologie und genetischen Methoden wird den Anforderungen an eine präzise Risikostratifizierung gerecht. Zytogenetische Anomalien lassen sich bei >50% aller Patienten mit MDS mit Chromosomenbänderungsanalysen nachweisen. Aufgrund ihrer prognostischen Bedeutung bildet die Zytogenetik einen Grundpfeiler im IPSS („international prognostic scoring system“) des MDS, welches für klinische Fragestellungen eingesetzt wird [8].

So sind isolierte 5q-Deletionen – welche meist die Region 5q13–33 betreffen – mit einer günstigen Prognose assoziiert. Auch ein normaler Karyotyp ist prognos-

tisch eher günstig. Auch isolierte 20q-Deletionen sowie ein alleiniger Y-Verlust sind mit einer günstigen Prognose assoziiert. Im Gegensatz dazu sind Veränderungen des Chromosoms 7 oder komplex aberrante Karyotypen (3 und mehr klonale Chromosomenaberrationen) prognostisch als ungünstig zu bewerten. Falls eine Chromosomenanalyse aus dem Knochenmark technisch nicht möglich sein, kann eine Interphase-FISH zum Screening der genannten Veränderungen durchgeführt werden [21]. In einzelnen Studien wurde gezeigt, dass bei Patienten mit unauffälligem Befund in der Chromosomenanalyse in 15% der Fälle Aberrationen mittels Interphase-FISH-Analysen beobachtet wurden [4, 14].

Darüber hinaus sollte eine Interphase-FISH-Untersuchung bei allen Fällen veranlasst werden, in denen nach dem klinischen Profil oder aufgrund der charakteristischen Morphologie im Knochenmark mit charakteristischen Dysplasien in der Megakaryopoese ein 5q-Syndrom vermutet wird (◻ **Abb. 3**). Dies hat seit Einführung der Therapie mit dem Thalidomidderivat Lenalidomid für das 5q-Syndrom eine besondere Bedeutung erhalten.

Komplexe Veränderungen können durch 24-Farben-FISH weiter aufgeklärt werden [1]. Mittels dieser Methode wurde auch gezeigt, dass 5q-Deletionen oftmals keine „reinen Deletionen“ darstellen, sondern unbalancierten Translokationen entsprechen [13, 17].

## Schlussfolgerungen

**Die erhebliche Heterogenität der klinischen Verläufe innerhalb distinkter hämatologischer Neoplasien erfordert eine differenzierte Abstimmung der Therapieintensität auf das jeweilige Risiko-**

profil. Bei sämtlichen Entitäten spielt dabei die Zytogenetik eine zentrale Rolle. In Abstimmung mit den Ergebnissen der Chromosomenanalyse kommen verschiedene Techniken der FISH-Analytik ergänzend zum Einsatz: Sie dienen nicht nur der Validierung bzw. weiteren Aufklärung der Befunde der Chromosomenanalysen, sondern vermögen in vielen Fällen den jeweiligen Subtyp zu definieren, beispielsweise bei den niedrigmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen. Darüber sind die Befunde in der Interphase-FISH-Analytik oft richtungsweisend für den Beginn der Therapie, wie dies am Beispiel der akuten Promyelozytenleukämie mit der t(15;17) und All-trans-Retinsäure bzw. für das 5q-Syndrom mit Lenalidomid beschrieben wurde. Auch in der Verlaufsdagnostik kommt der Interphase-FISH bei hämatologischen Neoplasien eine wichtige Rolle zu.

Somit ist die FISH-Analytik aus der Diagnostik hämatologischer Neoplasien nicht mehr wegzudenken. Der vermehrte Einsatz gezielter Therapiekonzepte („targeted therapy“) dank der Einführung neuer Substanzen und dank verbesserter Risikostratifizierung kann nur in Verbindung mit einer optimierten genetischen Charakterisierung der verschiedenen Entitäten gelingen. Der weitere Ausbau bzw. die Erweiterung der FISH-Analytik in der hämatologischen Diagnostik werden hier Wesentliches beitragen. Aufgrund der Wichtigkeit für die Diagnostik im klinischen Alltag wurden bereits internationale Empfehlungen für die häufigsten Entitäten veröffentlicht [10].

## Korrespondenzadresse

**PD Dr. C. Haferlach**

MLL, Münchner Leukämie Labor,  
Max-Lebsche-Platz 31, 81377 München  
claudia.haferlach@mll-online.com

**Interessenkonflikt.** Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

## Literatur

1. Babicka L, Ransdorfova S, Brezinova J et al. (2007) Analysis of complex chromosomal rearrangements in adult patients with MDS and AML by multicolor FISH. *Leuk Res* 31: 39–47

2. Bacarani M, Saglio G, Goldman J et al. (2006) Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European Leukemia Net. *Blood* 108: 1809–1820
3. Bacher U, Kern W, Schoch C et al. (2006) Evaluation of complete disease remission in acute myeloid leukemia: a prospective study based on cytomorphology, interphase fluorescence in situ hybridization and immunophenotyping during follow-up in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer* 106: 839–847
4. Bernasconi P, Cavigliano PM, Boni M et al. (2003) Is FISH a relevant prognostic tool in myelodysplastic syndromes with a normal chromosome pattern on conventional cytogenetics? A study on 57 patients. *Leukemia* 17: 2107–2112
5. Bloomfield CD, Shuma C, Regal L et al. (1997) Long-term survival of patients with acute myeloid leukemia: a third follow-up of the Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia. *Cancer* 80: 2191–2198
6. Chng WJ, Santana-Davila R, Van Wier SA et al. (2006) Prognostic factors for hyperdiploid-myeloma: effects of chromosome 13 deletions and IgH translocations. *Leukemia* 20: 807–813
7. Facon T, vet-Loiseau H, Guillelm G et al. (2001) Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum beta2-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood* 97: 1566–1571
8. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM et al. (1997) International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 89: 2079–2088
9. Gutierrez NC, Castellanos MV, Martin ML et al. (2007) Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. *Leukemia* 21: 143–150
10. Haferlach C, Rieder H, Lillington DM et al. (2007) Proposals for standardized protocols for cytogenetic analyses of acute leukemias, chronic lymphocytic leukemia, chronic myeloid leukemia, chronic myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Genes Chromosomes Cancer* 46: 494–499
11. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D et al. (2008) Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) updating the National Cancer Institute-Working Group (NCI-WG) 1996 guidelines. *Blood* 111: 5446–5456
12. Jaffe ES, Harris NL, Stein H et al. (2001) World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press, Lyon
13. Lindvall C, Nordenskjold M, Porwit A et al. (2001) Molecular cytogenetic characterization of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes with multiple chromosome rearrangements. *Haematologica* 86: 1158–1164
14. Rigolin GM, Bigoni R, Milani R et al. (2001) Clinical importance of interphase cytogenetics detecting occult chromosome lesions in myelodysplastic syndromes with normal karyotype. *Leukemia* 15: 1841–1847
15. Schoch C, Schnittger S, Bursch S et al. (2002) Comparison of chromosome banding analysis, interphase- and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases. *Leukemia* 16: 53–59
16. Schoch C, Kern W, Schnittger S et al. (2004) Karyotype is an independent prognostic parameter in therapy-related acute myeloid leukemia (t-AML): an analysis of 93 patients with t-AML in comparison to 1091 patients with de novo AML. *Leukemia* 18: 120–125
17. Shali W, Helias C, Fohrer C et al. (2006) Cytogenetic studies of a series of 43 consecutive secondary myelodysplastic syndromes/acute myeloid leukemias: conventional cytogenetics, FISH and multiplex FISH. *Cancer Genet Cytogenet* 168: 133–145
18. Swansbury GJ, Lawler SD, Alimena G et al. (1994) Long-term survival in acute myelogenous leukemia: a second follow-up of the Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 73: 1–7
19. Zenz T, Dohner H, Stilgenbauer S (2007) Genetics and risk-stratified approach to therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 20: 439–453
20. Zojer N, Konigsberg R, Ackermann J et al. (2000) Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization. *Blood* 95: 1925–1930
21. Zou YS, Fink SR, Stockero KJ et al. (2007) Efficacy of conventional cytogenetics and FISH for EGR1 to detect deletion 5q in hematological disorders and to assess response to treatment with lenalidomide. *Leuk Res* 31: 1185–1189

## Ärzte- und Betroffenenworkshop „Intrauterine Wachstumsretardierung und Silver-Russell-Syndrom“

in der Reihe „Diagnostik und Betreuung von spezifischen Kleinwuchsformen“

6. - 7.2. 2009

im Deutschen Zentrum für Kleinwuchsfragen in Bremen

Wiss. Leitung: Prof. Dr. Michael Ranke, Tübingen

Information und Anmeldung unter:  
 Dr. Nora Vaupel, – Projekt Skelnet –,  
 BKMF – Bundesverband Kleinwüchsige  
 Menschen und ihre Familien e.V.,  
 Deutsches Zentrum für Kleinwuchs-  
 fragen,  
 Leinestr.2, 28199 Bremen  
 Tel. 0421/336169-0  
 Durchwahl: 336169-21  
 Fax: 0421/336169-29  
 E-Mail: nora.vaupel@bkmf.de  
 www.bkmf.de