

Genetische Diagnostik in der pädiatrischen Onkologie

Genetic diagnosis in pediatric oncology

Oskar A. Haas*

CCRI, Forschungsinstitut für krebskranke Kinder, Wien, Österreich

Zusammenfassung

Die Erforschung und Analyse der mit soliden Tumoren und hämatologischen Neoplasien einhergehenden genetischen Veränderungen spielen in der pädiatrischen Onkologie schon seit langem eine sehr wichtige Rolle. Die daraus resultierende Information ist nicht nur für diagnostische und differentialdiagnostische Belange sowie die Grundlagenforschung besonders wertvoll, sondern wird auch in zunehmendem Masse zur Therapiestratifizierung und Therapieüberwachung eingesetzt. In diesem Artikel gebe ich daher einen kurzen Überblick über ältere und neuere Methoden und beschreibe deren diagnostische Wertigkeit in den jeweiligen Zusammenhängen. Das Spektrum dieser Methoden reicht von der konventionellen Zytogenetik über eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und vielfältige RNA- und DNA-basierende qualitative und quantitative Polymerasekettenreaktionen (PCR) bis zu RNA- und DNA-basierenden Genom-Microarray-Methoden. Weiterhin präsentiere ich kurz die häufigsten und wichtigsten genetischen Subgruppen von hämatologischen Neoplasien und soliden Tumoren im Kindesalter, zusammen mit ihrer klinischen Bedeutung. Auf Grund ihres unterschiedlichen pathogenetischen Ursprungs unterscheiden sich sowohl die Art und Häufigkeit der im Kindesalter auftretenden Neoplasien als auch die damit assoziierten genetischen Merkmale grundlegend von jenen des späten Erwachsenenalters. Die ausführliche Analyse dieser genetischen Veränderung, speziell von Tumoren und Leukämien im Kindesalter, hilft uns daher nicht nur, die physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge, welche zur Tumorentwicklung und -progression beitragen, besser zu verstehen. Wie bereits viele eindrucksvolle Beispiele der letzten Jahre belegen, dient sie letztendlich auch dazu, völlig neue therapeutische Konzepte zu entwickeln, die eine

erfolgreiche individuelle und gleichzeitig nebenwirkungs-freiere Behandlung dieser Patienten ermöglichen.

Schlüsselwörter: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH); hämatologische Neoplasien; Pädiatrie; reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR); solide Tumoren; Zytogenetik.

Abstract

The investigation of genetic abnormalities that concur with hematological neoplasms and solid tumors play an important role in pediatric oncology. The retrieved information is not only extremely valuable for diagnostic, differential diagnostic and basic research purposes, but it is also increasingly used for treatment stratification and therapy surveillance. With that in mind, this article surveys the various older and newer diagnostic approaches and their special value in a particular context and provides examples for their practical applications. The vast spectrum of techniques ranges from conventional cytogenetics to a plethora of fluorescence in situ hybridization (FISH), various qualitative and quantitative DNA- and RNA-based polymerase chain reaction (PCR) as well as DNA- and RNA-based microarray methods. I will also briefly describe the most common and most important genetic subgroups of hematological neoplasms and solid tumors in childhood together with their biological and clinical significance. Owing to their diverse pathogenetic origin, the type, frequency as well as genetic make-up of the vast majority of tumors in children differ significantly from those encountered in late adulthood. The comprehensive analysis of these genetic alterations particularly in childhood tumors and leukemias not only improves our understanding of the physiological and pathophysiological processes leading to tumor manifestation and progression, but also adds significantly to the development of new improved therapeutic concepts which lead to a better, more individualized treatment with less adverse side effects, as many impressive examples have already illustrated within the last few years.

*Korrespondenz: Prof. Dr. Oskar A. Haas, CCRI, Forschungsinstitut für krebskranke Kinder, Kinderspitalgasse 6, 1090 Wien, Österreich
Tel.: +43-1-40170-480
Fax: +43-1-40170-437
E-mail: oskar.haas@ccri.at

Keywords: cytogenetics; fluorescence in situ hybridization (FISH); hematologic neoplasms; pediatric; reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR); solid tumors.

Einleitung

Hämatologische Neoplasien und solide Tumoren sind die Folge einer territorialen Expansion von Zellpopulationen, die sich der physiologischen Kontrolle des Ursprungsgewebes entzogen haben. Sie entstehen stufenweise in einem evolutionären Prozess aus einzelnen gewebe- oder organspezifischen Stammzellen, deren genetisch determiniertes Entwicklungsprogramm gestört wurde. Die entsprechenden Mutationen betreffen insbesondere Gene und Genklassen, deren Produkte eine wichtige aktivierende oder deaktivierende Rolle im Rahmen von verschiedenen zellulären Signalübertragungswegen und Regulationsmechanismen spielen, welche das Zellwachstum, die Zellteilung sowie die Zelldifferenzierung, aber auch DNA-Reparaturprozesse und damit in engem Zusammenhang stehend den kontrollierten Abbau von Zellen (Apoptose) steuern [1]. Insbesondere bei soliden Tumoren sind aber auch noch Gene involviert, deren gestörte Aktivität zu einer vermehrten Blutgefäßbildung, Gewebeinvasion und Metastasenabsiedlung beitragen [1]. Die mit der neoplastischen Transformation einhergehenden DNA-, Methylierungs- und Gendefekte sind immer auf das neoplastische Gewebe beschränkt und führen in den meisten Fällen auch zu mikroskopisch erkennbaren Umstrukturierungen des Genoms in Form von charakteristischen Chromosomenanomalien [2].

Die Art und Häufigkeit der meisten hämatologischen Neoplasien und soliden Tumoren, welche bei Kindern auftreten, sowie insbesondere auch deren spezifische genetische Merkmale unterscheiden sich beträchtlich von jenen, welche vor allem bei älteren Erwachsenen gefunden werden [3]. Dies ist vor allem auf die alters- und entwicklungsabhängigen inneren und äußeren Umstände zurückzuführen, welche zum Zeitpunkt des Auftretens der ersten auslösenden Mutation in dem betroffenen Gewebe und vor allem auch in der entsprechenden Ursprungszelle vorherrschen [3, 4]. Neoplasien bei Kindern und Jugendlichen sind daher überwiegend auf systeminhärente Fehler im Zusammenhang mit einer vermehrten Zellteilung während der physiologischen embryonalen Differenzierung und Entwicklung von Geweben und Organen zurückzuführen [3, 5–7]. Die daraus resultierenden Malignome weisen daher zum großen Teil relativ einfache, aber immer sehr spezifische DNA-, Chromosomen- und Genomrearrangements auf. Das primäre, Tumor-initiiierende Ereignis tritt dabei wahrscheinlich bereits in einem sehr frühen embryonalen Entwicklungsstadium auf [6–8]. Im Falle von akuten lymphatischen B-Zell Vorläufer Leukämien (B cell precursor; BCP-ALL) konnte zum Beispiel mittels eingehender Analyse der entwicklungsabhängigen spezifischen Muster von Immunglobulin- (IG) und T-Zellrezeptor- (TCR) Genrearrangements gezeigt werden, dass dieser erste "Hit" wahrscheinlich schon in der sechsten bis achten Schwangerschaftswoche stattfindet [7, 9, 10]. Im Gegensatz dazu gehen vor allem die epithelialen Tumoren des Erwachsenenalters aus jenen Stammzellen hervor, wel-

Tabelle 1 Bedeutung genetischer Marker für Diagnostik und Forschung.

Genetische Marker

- liefern klinisch relevante diagnostische und differentialdiagnostische Informationen
 - dienen als Prognoseindikator
 - ermöglichen die Überwachung des Therapieerfolges
 - erlauben den Nachweis der minimalen Resterkrankung
 - sind notwendig für die Erforschung der Pathogenese, der Entwicklung und der Biologie der heterogenen Krankheitsbilder
 - helfen bei der genomischen Grundlagenforschung
 - tragen zur Identifizierung, Lokalisierung und Erforschung der physiologischen und pathologischen Funktion von Genen und deren Produkten bei
 - steuern wesentlich zur Entwicklung von verbesserten und individualisierten Therapiestrategien bei.
-

che normalerweise für die Erneuerung der entsprechenden Gewebe zuständig sind. Die durch eine entsprechend lange Kanzerogen- oder Mutagenexposition zusammen mit fehlerhaften zellulären Differenzierungs-, Alterungs- und Eliminationsprozessen bedingten, laufend auftretenden Mutationen akkumulieren in einzelnen Stammzellen. Deren Immortalisierung und Transformation sind dann die ersten wesentlichen Schritte zur Tumorentwicklung [1, 3]. Vor allem epitheliale Tumoren, aber auch sekundäre Leukämien des Erwachsenenalters, weisen daher relativ komplexe DNA-, Chromosomen- und Genomrearrangements auf. Diese sehr unterschiedlichen Ursachen und genetischen Merkmale kombiniert mit der besseren Regenerationsfähigkeit von geschädigten Geweben sind wahrscheinlich auch die wesentlichen Gründe, warum Tumor- und Leukämieerkrankungen des Kindes- und Jugendalters wesentlich effizienter und erfolgreicher behandelt werden können als jene des Erwachsenenalters.

Methodische Aspekte

Die Erforschung und Analyse genetischer Veränderungen sind seit langem ein integraler Bestandteil der Diagnostik und Differenzialdiagnostik von Tumor- und Leukämieerkrankungen (Tabelle 1) [11]. Sie tragen zu einer Verfeinerung der klinisch relevanten Subklassifikation bei und verbessern dadurch zweifellos das klinische Management dieser bösartigen Erkrankungen. Die resultierenden spezifischen Kenntnisse bilden dabei eine wesentliche Voraussetzung für die Entwicklung und Anwendung von innovativen DNA- und RNA-basierenden Strategien zum Nachweis residueller Tumorzellpopulationen, die eine sehr sensitive Überwachung des Therapieerfolges und damit auch die Früherkennung von Rezidiven erlauben. Daneben hilft die Analyse von genetischen Veränderungen aber auch die Ursache, Entstehung und Entwicklung der jeweiligen Neoplasmen sowie nicht zuletzt auch die normale Funktion der entsprechenden Gene und Gen-

produkte besser zu verstehen. Dieses Verständnis wiederum bildet eine wichtige Grundlage für die Entwicklung von spezifischen und individualisierten Therapiekonzepten, welche nicht nur die Heilungsaussichten verbessern, sondern auch die Behandlung insgesamt komplikationsloser und nebenwirkungsfreier gestalten sollen.

Genetische Untersuchungen können auf mehreren Stufen durchgeführt werden, nämlich jener der DNA-, der Epigenetik- (überwiegend Methylierung [12–15]), der RNA- und der Proteinebene (Tabelle 2). Die zwei prinzipiell unterschiedlichen, jedoch komplementären Ansätze sind der morphologische Ansatz mittels mikroskopischer und der chemische Ansatz mittels molekular-genetischer Methoden. Die entsprechenden Technologien liefern methodenabhängig sehr spezifische Ergebnisse, welche zwar mehr oder weniger kongruent, untereinander jedoch oft nur bedingt vergleichbar sind. Die einzelnen Methoden haben auch eine sehr unterschiedliche Sensitivität und Wertigkeit und müssen je nach spezifischer klinischer und biologischer Fragestellung entsprechend eingesetzt und kontextspezifisch interpretiert werden.

Zu den morphologischen Verfahren zählen alle Varianten der konventionellen licht- und fluoreszenzmikroskopischen Zytogenetik [2, 16, 17] sowie alle molekularzytogenetischen Methoden der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) [18–21]. Ein wesentlicher Teil der Erkenntnisse, welche wir über die biologische, prognostische und klinische Relevanz von Tumor- und Leukämie-assoziierten genetischen Veränderungen bisher gesammelt haben, leitet sich primär von den Befunden und Ergebnissen zytogenetischer Untersuchungen ab [22–25]. Diese haben einerseits den Nachteil, dass von nur wenigen Beobachtungen auf einzelnen Metaphasen für den gesamten Tumor gültige Schlüsse gezogen werden, wobei es fraglich ist, ob diese Metaphasen reprä-

sentativ sind. Andererseits kann man aber mit keiner anderen Labormethode einen besseren primären globalen Überblick über die vielfältigen genetischen Störungen und Hinweise auf deren Ursache gewinnen (Abbildung 1) [2].

Die Verschmelzung von molekularen und zytogenetischen Techniken Mitte der 80er Jahre in Form innovativer FISH-Methoden bedeutete einen revolutionären Durchbruch in der morphologischen Analytik des Genoms [18–21]. Verglichen mit der konventionellen Zytogenetik haben FISH-Methoden ein wesentlich besseres Auflösungsvermögen. Ein Beispiel, wie 24-Farben-FISH mit Chromosomen-spezifischen “painting”-Sonden zur Aufklärung von Karyotypanomalien eingesetzt werden kann, welche mittels konventioneller Zytogenetik alleine nicht komplett entziffert werden konnten, ist in Abbildung 2 dargestellt. Mit den so gewonnenen Erkenntnissen können dann, wie angedeutet, wiederum die entsprechenden spezifischen Veränderungen auch in Interphasekernen nachgewiesen und so weitaus größere und repräsentative Zellpopulation auf Vorhandensein der identifizierten Veränderung hin untersucht werden. Wie in Abbildung 3 gezeigt, kann man aber in Interphasekernen auch schon mit zwei einfachen FISH-Sonden sehr heterogene Hybridisierungsmuster erhalten, für deren Interpretation umgekehrt die Kenntnis der diese Muster verursachenden Chromosomenumbauten auf Metaphasenpräparaten oft unumgänglich ist.

Das Auflösungsvermögen und die Sensitivität solcher FISH-Untersuchungen sind dabei natürlich wesentlich besser als jene der konventionellen Zytogenetik und erreichen unter Umständen jene von rein molekular-genetischen Verfahren, wobei im Gegensatz zu diesen jedoch in der Regel der wichtige topologische Kontext bei der Analyse erhalten bleibt. Die Möglichkeit, Hybridisierungen sogar auf isolierter DNA und RNA durchzu-

Tabelle 2 Vergleich der spezifischen diagnostischen Wertigkeit der wesentlichen genetischen Untersuchungsmethoden.

Methodische Aspekte	DNA-Index	Zyto-genetik	Metaphasen-FISH	Interphasen-FISH	CGH & SNP arrays	Gene expression profiling	IG & TCR PCR	DNA PCR	RT PCR
morphologisch	–	+	+	+	+	–	–	–	–
chemisch	–	–	+	+	+	+	+	+	+
DNA-basierend	+	+	+	+	+	–	+	+	–
RNA-basierend	–	–	–	–	–	+	–	–	–
globaler Überblick	–	+	+	–	+	+	–	–	–
topologische Information	–	+	+	±	±	–	–	–	–
abhängig von Zellteilung	–	+	+	–	–	–	–	–	–
Einzelzellanalyse	+	+	+	+	–	–	±	±	±
interpretativ	–	+	+	±	–	±	–	–	–
quantitativ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
qualitativ	–	+	+	+	–	–	+	+	+
selektiv	–	+	+	+	±	±	+	+	+
sensitiv	–	–	±	±	+	+	+	+	+
submikroskopisch	–	–	+	+	+	+	+	+	+
kurze definierte Sequenzbereiche	–	–	–	±	±	–	+	+	+
Screening	+	–	±	+	–	–	+	+	+

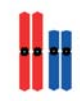
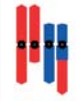
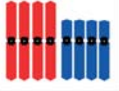
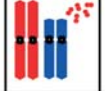
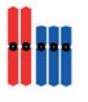
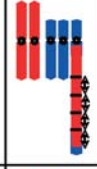
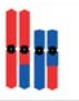

	Banding	SKY	CGH	LOH	RT-PCR		Banding	SKY	CGH	LOH	RT-PCR
							+	+	+	+	(+)
	+	+	-	-	-		+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-		+	+	+	+	-
	+	+	-	-	(+)		-	-	+	+	-

Abbildung 1 Schematische Darstellung der verschiedenen Formen von Chromosomenanomalien zusammen mit den für ihren Nachweis am besten geeigneten Untersuchungsmethoden (modifiziert nach [2]).

Links von oben nach unten: normal, polyploid, numerische Anomalien, balanzierte reziproke Translokation; rechts von oben nach unten: unbalanzierte reziproke Translokation, Amplifikation in Form von "double minutes" (DM), "homogeneously staining regions" (HSR) und verteilter Insertion. Banding: konventionelle Zytogenetik; SKY: "spectral karyotyping" und M-FISH (24-Farben-FISH), CGH: "comparative genomic hybridization", LOH: Loss of Heterozygosity, RT-PCR: Reverse Transkriptase PCR. Weitere Informationen dazu sind im Text zu finden.

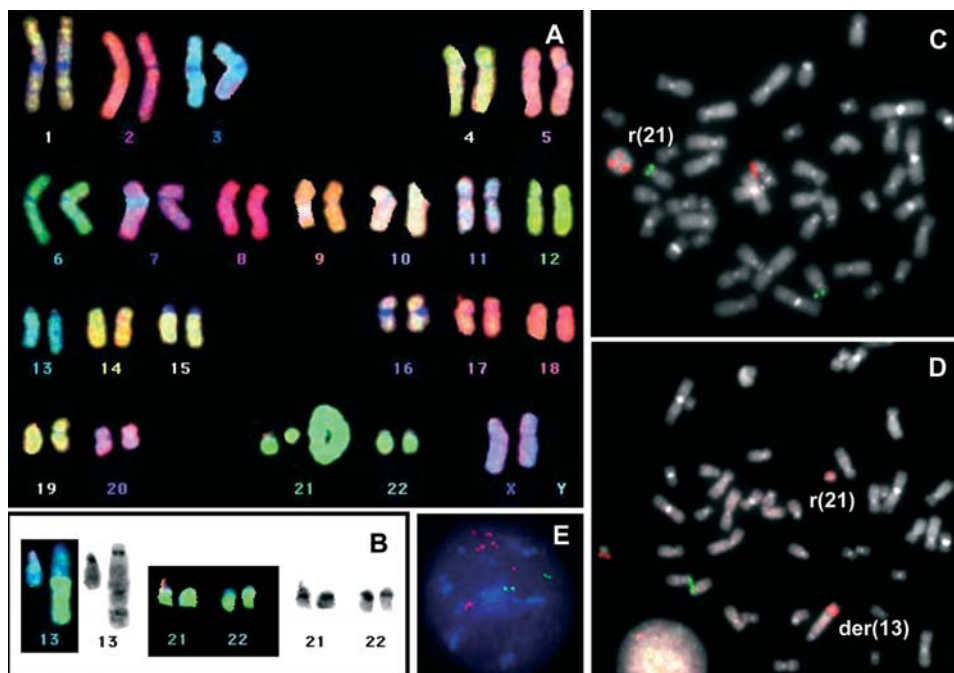


Abbildung 2 Beispiel einer kindlichen ALL, bei der in der konventionellen zytogenetischen Analyse komplexe Veränderungen der Chromosomen entdeckt wurden, welche dann mit mehreren unterschiedlichen FISH-Techniken weiter erfolgreich abgeklärt wurden. Neben einem Klon mit 47 Chromosomen und zwei unterschiedlich großen Ringchromosomen unbekannter Herkunft (A und C) gab es in einem zweiten Klon mit 46 Chromosomen neben einem Ringchromosom 21 auch noch ein verlängertes Chromosom 13 (B und D). Mittels 24-Farben-FISH wurde festgestellt, dass sowohl alle drei Ringchromosomen als auch das zusätzliche Material am Chromosom 13 ausschließlich Chromosom 21-Material enthielten (A und B). Dieser Befund bestätigt die enge Verwandtschaft beider Klone. Mittels genspezifischer Sonden (TEL auf 12p in Grün und AML1 auf 21q in Rot) konnte jeweils eine Amplifikation jenes Chromosom 21-Bereiches identifiziert werden, welcher das AML1-Gen enthält. Diese AML1-Amplifikation (rote Signale) konnte dann auch in Interphasekernen eindeutig nachgewiesen werden (E).

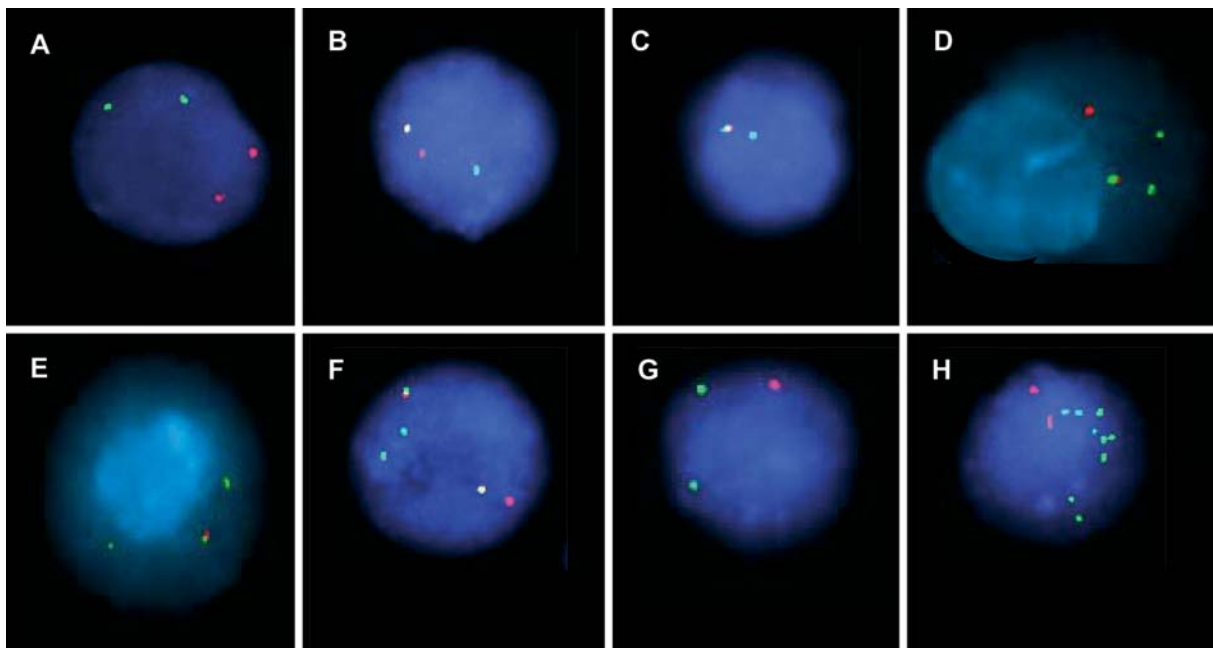


Abbildung 3 Genspezifische Sonden, wie z.B. TEL (ETV6) und AML1 (RUNX1), dienen normalerweise zum Nachweis von reziproken Chromosomentranslokationen, wie z.B. der $t(12;21)(p13;q22)$ und der damit assoziierten TEL/AML1-Genfusion. In vielen Fällen gewinnt man jedoch im Rahmen solcher FISH Screening-Untersuchungen noch zusätzliche und oft neue und unerwartete Informationen, welche in dieser Form mit keiner anderen genetischen Untersuchungsmethode gefunden werden können. Zum Beispiel kann man bei TEL/AML1-positiven Fällen gleichzeitig die Häufigkeit und Verteilung der wichtigsten sekundären Karyotypanomalien, $del(12)$, $+21$ und $+der(21)t(12;21)$, mit untersuchen [26]. Die hier gezeigten Bilder von einzelnen Interphasekernen geben einen repräsentativen Querschnitt der Vielfalt der unterschiedlichen Signalkonstellationen, welche man mit einer speziellen Sondenkombination, TEL (auf 12p, in diesem Fall rot) und AML1 (auf 21q, in diesem Fall grün), erhalten kann: (A) normal; (B) TEL/AML1 Genfusion, entspricht einer mit konventionellen zytogenetischen Methoden nur schwer identifizierbaren $t(12;21)$; (C) TEL/AML1-Genfusion und Verlust des zweiten TEL-Allels, entspricht zytogenetisch einer zusätzlichen Deletion 12p; (D) TEL/AML1-Genfusion und zusätzliches AML1-Signal, entspricht zytogenetisch einem zusätzlichen Chromosom 21; (E) TEL/AML1-Genfusion, Verlust des zweiten TEL-Allels und zusätzliches AML1-Signal, entspricht zytogenetisch einer zusätzlichen Deletion 12p sowie einem zusätzlichen Chromosom 21; (F) 2x TEL/AML1-Genfusion und zusätzliches AML1-Signal, entspricht zytogenetisch einem verdoppelten $der(21)t(12;21)$ und einem zusätzlichen Chromosom 21; (G) Verlust eines TEL-Allels, entspricht zytogenetisch einer Deletion 12p ohne Translokation bzw. Genfusion; (H) AML1-Amplifikation. Eine korrekte Interpretation und Zuordnung von solchen unterschiedlichen und komplexen Signalmustern in Interphasekernen kann in den meisten Fällen nur von zytogenetisch ausgebildeten Personen und auch dann nur korrekt erfolgen, wenn man die Karyotypanomalien und das zugehörige Hybridisierungsmuster auf Metaphasen kennt.

führen, hat zur Entwicklung von fein auflösenden Microarray-Techniken geführt, welche heute eine simultane, genomweite Analyse der genetischen Variabilität sowohl auf DNA- als auch auf RNA-Ebene ermöglichen [27, 28]. Diese spektakulären Technologien werden zur Zeit zwar noch überwiegend in der Grundlagenforschung verwendet und ihre potentielle Anwendbarkeit und Wertigkeit im diagnostischen Bereich erst intensiv erforscht, es existieren jedoch bereits jetzt viele Aufsehen erregende und eindrucksvolle Beispiele, die zeigen, welche Bedeutung sie zukünftig im klinischen Management von Kindern mit Tumor- und Leukämieerkrankungen erlangen werden [29–42].

Quantitative Karyotypanomalien

Das Ausmaß an Zugewinn oder Verlust eines Chromosoms oder mehrerer Chromosomen oder Chromosomen-

teile kann am besten am Metaphasepräparat beurteilt werden (Abbildung 1) [2, 17]. Grob aneuploide Zellpopulationen können aber auch relativ einfach mittels der durchflusszytometrischen Messung des DNA-Gehaltes detektiert werden, allerdings ohne dabei Aufschluss über die betroffenen spezifischen Karyotypanomalien zu geben. Diese Methode wird neben der Chromosomenuntersuchung auch häufig als Screening- bzw. Bestätigungsmethode zur Abgrenzung und Identifizierung der prognostisch relativ günstigen hyperdiploiden Form, welche zwischen 25 und 30% aller BCP-ALL ausmacht, sowie der eher sehr seltenen, aber prognostisch ungünstigen haploiden und hypodiploiden Formen eingesetzt [43–47] (Abbildung 4). Die pathogenetische Ursache und die spezifische Rolle solcher multiplen und nicht zufällig betroffenen numerischen Chromosomenanomalien sind noch völlig unklar. Allerdings weiß man bereits, dass bei hyperdiploiden Formen praktisch immer die Chromosomen 4, 6, 10, 14, 17, 18, 20 und X dreifach vorliegen und

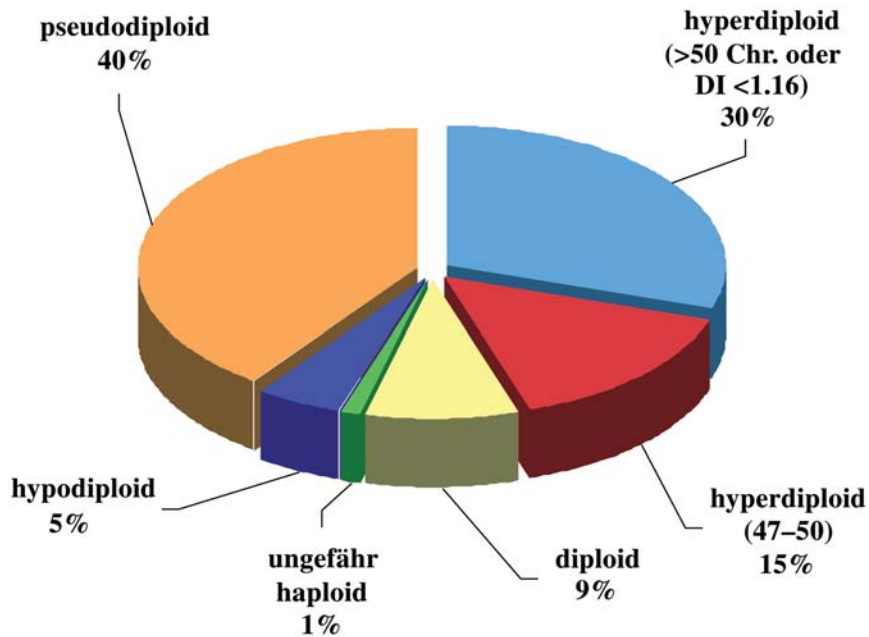


Abbildung 4 Ursprüngliche Einteilung der ALL im Kindesalter nach dem Ploidiegrad, eine Einteilung, welche auch heute noch eine gewisse klinische Bedeutung und Berechtigung hat [44–47] (modifiziert nach [49]).

das Chromosom 21 vierfach vorhanden ist und diese chromosomale Fehlverteilung nicht konsekutiv, sondern in einer einzigen pathologischen Zellteilung stattfindet [48].

Auch bei den Neuroblastomen kann man zwischen klinisch relevanten nahe diploiden, nahe triploiden und nahe tetraploiden Subgruppen unterscheiden (Tabelle 3) [50]. In diesem Zusammenhang von besonderem Interesse ist die hyperdiploide/triploide Subgruppe, welche fast ausschließlich bei Säuglingen und sehr jungen Kindern vorkommt, wobei nach operativer Entfernung des Primärtumors auch die meist körperweit disseminierten Metastasen spontan verschwinden.

Amplifikationen spezifischer Chromosomenregionen können intrachromosomal in Form von so genannten "homogeneous staining regions" (HSR) oder extrachromosomal in Form von so genannten "double minutes"

(DM) vorliegen. Der Prototyp für diese Veränderungen bei kindlichen Tumoren ist ebenfalls die bei prognostisch ungünstigen Neuroblastomformen vorhandene Amplifikation des MYC-N Proto-Onkogens [50, 51]. Aber auch bei Leukämien wurden erst kürzlich zwei sehr interessante Genamplifikationen entdeckt. Eine Amplifikation des AML1- (RUNX1-) Gens scheint sehr spezifisch für seltene Fälle (1–2%) der BCP-ALL zu sein [52, 53] und wird vor allem bei älteren Kindern gefunden. Obwohl die diagnostischen Merkmale und der primäre klinische Verlauf der prognostisch relativ günstigen BCP-ALL mit einer t(12;21) bzw. TEL/AML1 ähneln, tritt bei den meisten der betroffenen Patienten nach mehreren Jahren ein Spätrezidiv auf [26, 52, 53]. Inwieweit die AML-Amplifikation selbst oder aber das eine oder andere in der amplifizierten Region gelegene Gen für die leukämische Transformation verantwortlich ist, ist zurzeit noch völlig unklar. Im

Tabelle 3 Die genetischen Subgruppen des Neuroblastoms und ihre klinische Relevanz [50].

Merkmal	Typ 1	Typ 2A	Typ 2B
MYCN	normal	normal	amplifiziert
Ploidiegrad	hyperdiploid oder nahe triploid	nahe diploid oder nahe tetraploid	nahe diploid oder nahe tetraploid
17q-Gewinn	selten	häufig	häufig
11q, 14q LOH	selten	häufig	selten
1p LOH	selten	selten	häufig
TrkA-Expression	hoch	niedrig oder fehlend	niedrig oder fehlend
TrkB-Expression	(verkürzte RNA)	niedrig oder fehlend	hoch (lange RNA)
TrkC-Expression	hoch	niedrig oder fehlend	niedrig oder fehlend
Alter	gewöhnlich <1 Jahr	gewöhnlich >1 Jahr	gewöhnlich 1–5 Jahre
INSS-Stadium	gewöhnlich 1, 2, 4S	gewöhnlich 3, 4	gewöhnlich 3, 4
5-Jahres-Überlebensrate	95%	40–50%	25%

LOH, Loss of Heterozygosity (Verlust der Heterozygotie); INSS, International Neuroblastoma Staging System.

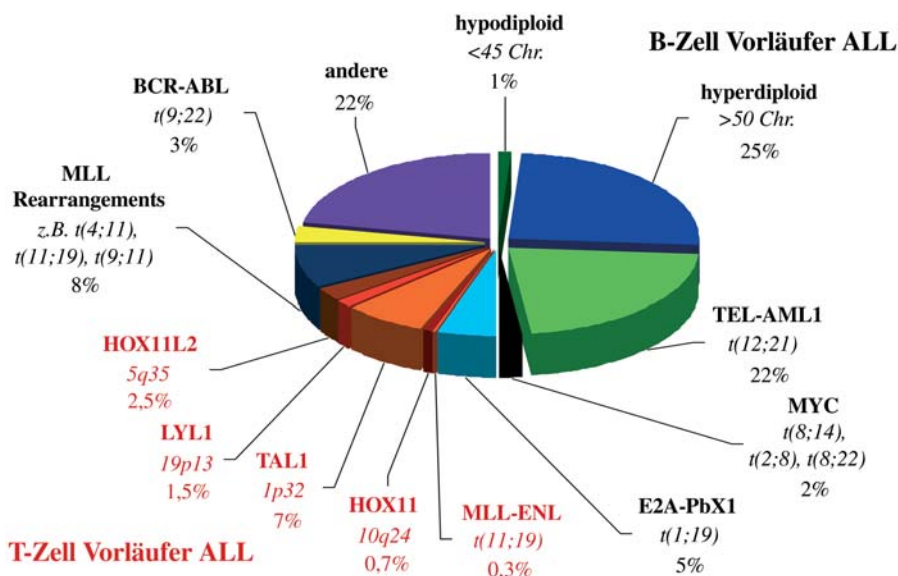


Abbildung 5 Art und Häufigkeit der wichtigsten Chromosomen- und Genrearrangements bei B- und T-Zell Vorläufer ALL im Kindesalter (modifiziert nach [68]).

Gegensatz dazu konnte der spezifische Pathomechanismus bei der ebenfalls erst vor kurzem erstmals beschriebenen Amplifikation des ABL-Proto-Onkogens, welche bei ungefähr 5% aller T-ALL gefunden wird, in Form einer NUP214-ABL-Genfusion rasch aufgeklärt werden [54, 55]. Während eine MYC-N-Amplifikation bereits mittels konventioneller Zytogenetik entdeckt werden kann, kann die AML1-Amplifikation derzeit nur mittels FISH identifiziert werden. Die ABL bzw. NUP214-ABL-Genfusion hingegen ist zytogenetisch auf Grund der Größe der episomal vorliegenden Amplifikate nicht nachzuweisen, kann jedoch sehr wohl mit FISH, aber auch mittels RT-PCR detektiert werden.

Reziproke Chromosomen- und Genrearrangements

Spezifische reziproke Chromosomen- und Genrearrangements kennzeichnen viele Formen von akuten lymphatischen sowie von akuten und chronischen myeloischen Leukämien, aber auch von diversen Lymphomen und nicht zuletzt auch von Sarkomen (Abbildungen 2, 5 und 6) [5, 22–25, 47, 56–68]. Mittels konventioneller Zytogenetik wurden im Laufe der Jahre bereits mehrere hundert solcher balanzierter reziproker Chromosomentranslokationen beschrieben. Sie sind zum Teil sehr häufig, zum Teil aber auch sehr selten, gehen jedoch immer

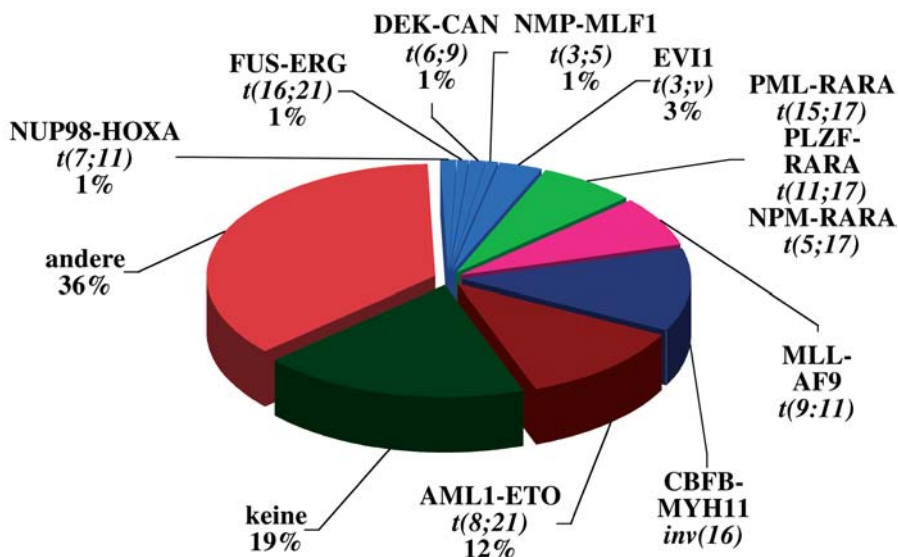


Abbildung 6 Art und Häufigkeit der wichtigsten Chromosomen- und Genrearrangements bei AML im Kindesalter (modifiziert nach Look [57]).

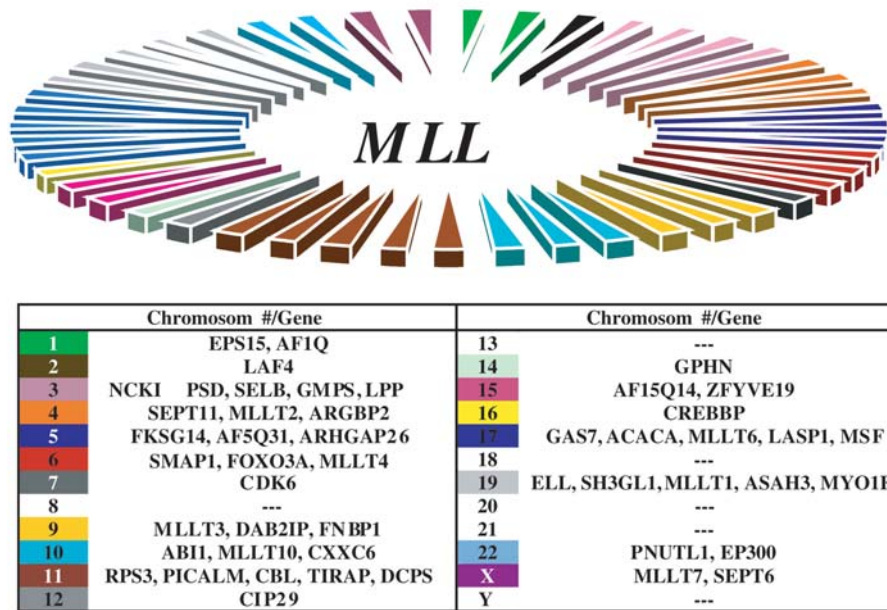


Abbildung 7 Das MLL-Gen mit der chromosomalen Verteilung seiner bisher molekulargenetisch identifizierten 46 Fusionspartner. Zusätzlich gibt es bei akuten myeloischen Leukämien eine partielle Duplikation des MLL-Gens. Auf sechs Chromosomen (#8, 13, 18, 20, 21 und Y) wurden bisher keine Fusionspartner gefunden, hingegen sind auf bisher vier Chromosomen (#5, 11, 17 und 19) vier oder mehr solche Partnergene lokalisiert.

mit histologisch und morphologisch sehr typischen Krankheitsbildern einher.

Auf molekulargenetischer Ebene haben balancierte reziproke Chromosomenrearrangements, wie Translokationen und Inversionen, zwei verschiedene Auswirkungen. Sie können zu einer echten Fusion der betroffenen Gene oder aber auch nur zu einer Deregulation eines der beiden Partnergene führen.

Im Falle einer Genfusion kommt es zur Produktion einer hybriden RNA und in der Folge in der Mehrzahl der Fälle auch zur Produktion eines chimären Proteins, das gegenüber den physiologischen Ausgangsprodukten veränderte Eigenschaften aufweist und ursächlich zur neoplastischen Transformation beiträgt. Die typischen und bekanntesten Beispiele für diese Art von Translokationen bei kindlichen Leukämien sind die t(9;22), t(4;11), t(12;21) und die t(1;19), die mit einer BCR/ABL-, MLL/AF4-, TEL/AML1- bzw. E2A/PBX-Genfusion einhergehen (Abbildungen 4 und 5). Solche Fusionsprodukte sind sowohl auf DNA-Ebene mit FISH als auch auf mRNA-Niveau mittels RT-PCR nachzuweisen. Neben den in den Abbildungen dargestellten Subgruppen gibt es aber speziell bei Kindern noch sehr seltene, jedoch sehr spezifische Leukämieformen mit solchen Genfusionen. Zum Beispiel tritt die t(1;22)(p13;q13) mit einer RBM15/MKL1 bzw. OTT/MAL [69–71] ausschließlich bei Megakaryozytenleukämien des Säuglingsalters, die t(7;12)(q36;p13) mit einer Involvierung der TEL- und HLXB9-Gene [72, 73] ausschließlich bei Säuglingsleukämien und die t(5;11)(q35;p15) mit einer NUP98/NSD1-Genfusion [74] ausschließlich bei AML im Kindesalter auf.

Bei der zweiten Art von Translokation hingegen wird das Proto-Onkogen in die Nähe regulatorischer Einheiten eines anderen Gens verlagert und verursacht dadurch dessen dauernde unphysiologische Aktivierung. Der Prototyp für diese überwiegend mit IG- und TCR-Genen assoziierten Translokationen ist die t(8;14) des Burkitt-Lymphoms [63]. Dabei wird das MYC-C Proto-Onkogen vom Chromosom 8 auf das Chromosom 14 vor das IGH-Gen verlagert und durch IGH-spezifische Verstärkersequenzen hochreguliert. Diese Art von Translokationen ist in der Regel mit FISH, aber kaum mit PCR detektierbar.

Bei weit mehr als 200 verschiedenen Translokationen wurde bereits auch der Bruchpunkt kloniert und die an der Fusion beteiligten Gene wurden auf molekulargenetischer Ebene identifiziert und näher charakterisiert [67]. Interessanterweise hat sich dabei herausgestellt, dass es nur relativ wenige Gene, so genannte "hub"-Gene, gibt, welche aber mit einer Vielzahl von verschiedenen Partnergenen jeweils individuelle Genfusionen bilden können. Das Gen mit den derzeit meisten bekannten Fusionspartnern, nämlich 46 Partnern sowie einer partiellen Genduplikation, ist das MLL-Gen (Abbildung 7) [75]. Weitere solche "hub"-Gene sind unter anderen bei Leukämien das TEL- (ETV6-) Gen [76] und das NUP98-Gen [77], bei Lymphomen das IGH-Gen [63] und bei soliden Tumoren z.B. das EWS-Gen bei Ewing Sarkomen [56, 66] und das RET-Gen bei papillären Schilddrüsenkarzinomen [62]. Die Tatsache, dass jeweils ein Gen mit vielen verschiedenen Partnergenen fusioniert, kann nun für eine sehr effiziente Zwei-Schritt-FISH Screening-Strategie ausgenutzt werden (Abbildung 8), bei der zuerst die Involvierung des "hub"-Gens überprüft bzw. nachgewiesen und erst dann

im zweiten Schritt mittels Zytogenetik, FISH oder molekulargenetischer Methoden versucht wird, das involvierte Partnergen, welches bekannt oder auch neu sein kann, zu identifizieren [21, 75].

Klonalitätsuntersuchungen

Klonalitätsuntersuchungen dienen einerseits zur Differenzierung zwischen monoklonalen (meist, aber nicht immer bösartigen) und polyklonalen (meist, aber nicht immer gutartigen) Gewebe- und Zellhyperplasien bei hämatologischen Systemerkrankungen, Lymphomen und Tumoren sowie dem vor allem im Zusammenhang mit einer (minimalen) Resterkrankung wichtigen Nachweis eines residuellen neoplastischen Klon [87–90].

Je nach Fragestellung und technischer Möglichkeit können für solche Untersuchungen ebenfalls genetische Marker auf verschiedenen Ebenen herangezogen werden, nämlich Chromosomen, DNA und deren Methylierung sowie RNA. Die unterschiedlichsten Karyotypanomalien können dabei mit den entsprechenden Sonden in Interphasekernen mittels FISH detektiert werden, wie oben bereits ausgeführt. Im epigenetischen Bereich werden vor allem die differentielle Methylierung bestimmter Genbereiche in Tumor- und Normalgewebe sowie die differentiell inaktivierten methylierten Bereiche der X-Chromosomen ausgenutzt. Auf der DNA-Ebene kann man Mutations-induzierte Sequenzvarianten benutzen. Dazu zählen vor allem Punktmutationen, Mikrosatellitenpolymorphismen, die Produkte der physiologischen IG- und TCR-Genumlagerungen sowie die Fusionsbereiche von Neoplasiespezifischen Genrearrangements. Auf der RNA-Ebene können aberrant exprimierte Genprodukte verwendet werden, insbesondere die Hybrid-RNA von Fusionsgenen. Vor allem im Zusammenhang mit dem Nachweis einer minimalen Resterkrankung ist jedoch zu beachten, dass die Sensitivität dieser Nachweismethoden sehr unterschiedlich sein kann, von vielen technischen und System-immanenten Faktoren abhängt und daher auch von Untersuchung zu Untersuchung schwanken kann. Zusätzlich können im Rahmen der kontinuierlichen klonalen Evolution heterogene Subpopulationen entstehen, deren ursprünglich vorhandenen klonalen Merkmale verloren gehen oder sich so verändern, dass sie nicht mehr detektierbar sind. Nicht zuletzt ist auch zu beachten, dass die exprimierte RNA-Menge nicht unbedingt mit der Zellzahl und damit den DNA-basierenden Ergebnissen korrelieren muss.

Für die Interpretation und den Vergleich von Klonalitätsuntersuchungen mit verschiedenen Methoden ist die richtige Beurteilung der Wertigkeit der entsprechenden Marker daher sehr wichtig. Im Gegensatz zu den echten Neoplasie-spezifischen Markern, wie den Chromosomenaberrationen, Mutationen und Fusionsgenprodukten, kommt den reinen Klonalitätsmarkern, wie der X-Inaktivierung und den bei lymphopoetischen Systemerkrankungen eingesetzten IG- und TCR-Genrearrangements,

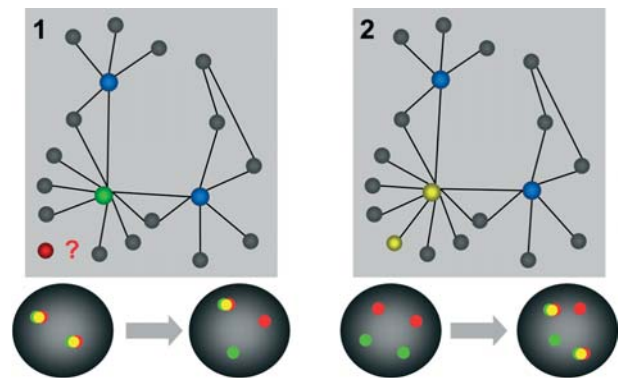


Abbildung 8 Eine "Zwei-Schritt"-FISH-Strategie ist zurzeit die effizienteste Methode, um alle bekannten Translokationen rasch identifizieren zu können [21]. Sie ermöglicht aber gleichzeitig als einzige Technik sehr einfach die Entdeckung potentieller neuer Fusionspartner. Zum Nachweis, ob ein bestimmtes Gen mit multiplen Fusionspartnern (ein so genanntes "hub"-Gen, wie z.B. MLL) an einem Genrearrangement überhaupt beteiligt ist, genügt eine Hybridisierung mit zwei so genannten "split apart"-Sonden, welche jeweils das 3'- und das 5'-Ende des entsprechenden Gens abdecken und mit zwei verschiedenen Farben markiert sind (linker Teil der Abbildung). Jede Fusion mit einem anderen Gen separiert die Sonden und kann daher anhand des Signalmusters (normal: zwei grün/rote Kolokalisationen, Separierung: eine Kolokalisation und ein rotes und ein grünes Signal) sowohl in Meta- als auch Interphasekernen leicht erkannt werden. Der jeweilige potentielle Fusionspartner kann dann je nach Wahrscheinlichkeit, Häufigkeit und Wichtigkeit entweder mittels PCR oder FISH-Screening gesucht und identifiziert werden. Im Falle von FISH verwendet man dazu zwei farblich unterschiedlich markierte Sonden, welche einerseits spezifisch für das jeweilige "hub"-Gen und andererseits für die in Frage kommenden Partner-Gene sind und die potentiellen Bruchpunkte auf beiden Genen überspannen (rechter Teil der Abbildung). Auf PCR-Ebene gibt es verschiedene kommerzielle (HemaVision®, www.dnatechnology.dk [78–81]; MLLFusionChip®, www.ipsogen.com [82]) und nicht-kommerzielle Möglichkeiten sowohl auf DNA- als auch RNA-Ebene, um die entsprechenden bekannten Fusionsgene zu identifizieren. Sowohl diese als auch unbekannte Partnergene kann man ebenfalls mit verschiedenen DNA- und RNA-basierenden PCR-Methoden, wie z.B. RACE (rapid amplification of cDNA ends) [83] und, insbesondere im Falle des MLL-Gens, mittels Long-Distance Inverse-PCR (LDI-PCR) [75] und "panhandle"-PCR [84–86] rasch und einfach identifizieren. Die entsprechenden RNA- und DNA-Fusionssequenzen dienen dann mittels verschiedener "real-time"-PCR- (RQ-PCR) Methoden als Grundlage zur Quantifizierung der leukämischen Zellen bzw. der entsprechenden Fusionsprodukte, zur sensitiven Überwachung des Therapieerfolges und zum Nachweis einer potentiellen minimalen Resterkrankung (MRD).

ja per se keine spezifische Krankheitsbedeutung zu. Der Nachweis einer klonalen Proliferation mittels reiner Klonalitätsmarker erlaubt keinen direkten Rückschluss auf die benigne oder maligne Ursache oder Natur des entsprechenden Klon. Es verwundert daher nicht, dass es bei der gleichzeitigen Anwendung verschiedener Nachweissysteme unter Umständen zu diskrepanten, verwirrenden und auch widersprüchlichen Ergebnissen kommen kann.

IG- und TCR-Genrearrangements werden bei ALL zum Nachweis des spezifischen neoplastischen Klon im Rahmen der Diagnostik und zur Therapieüberwachung sehr erfolgreich eingesetzt [87–90]. Solche nicht funktionellen Genrearrangements spiegeln primär das Entwicklungsstadium wider, in dem die leukämische Ursprungszelle immortalisiert bzw. transformiert und die physiologischerweise im Rahmen der B- oder T-Zellreifung stattfindende Genumlagerung blockiert und damit fixiert wurde. Ihr wesentlicher Vorteil ist, dass sie in der weitaus überwiegenden Mehrzahl der ALL-Fälle unabhängig von Neoplasie-spezifischen Markern existieren, als DNA-Marker mehr oder weniger stabil sind und auch in relativ gut standardisierbarer Form eingesetzt werden können.

Varia

Naturgemäß gibt es neben den bisher erwähnten Leukämien und Tumoren auch noch viele andere sporadische, aber auch hereditäre Formen, welche in Übersichtsarbeiten wie dieser aus verschiedensten Gründen immer ein wenig zu kurz kommen, obwohl es auch bei diesen Krankheitsformen sehr interessante diagnostische Entwicklungen und genetische Aspekte gibt. Einige davon seien hier nur am Rande exemplarisch aufgezählt. Eine wichtige Rolle im Kindesalter spielen natürlich Retinoblastome [91, 92] und Wilms-Tumoren [38, 93–95], Hepatoblastome [96], Osteosarkome [23, 97], Hirntumoren [98–106] sowie Teratome und Keimzelltumoren [107]. Insbesondere die Erforschung und Analyse der genetischen Veränderungen bei sporadischen und familiären Formen von Retinoblastomen und Wilms-Tumoren bildeten ja die Grundlage für das von Knudson konzipierte, sehr erfolgreiche und auch heute im Großen und Ganzen noch gültige Two-Hit-Modell der Funktion von Tumorsuppressor-Genen [108, 109].

Auch die zunehmend wichtiger werdenden genetischen Prädispositionsformen können hier aus Platzgründen nicht ausführlich beschrieben werden. Ich will jedoch noch die zwei vielleicht bekanntesten und für das Kindesalter konzeptionell wichtigsten kurz erwähnen. Das Beckwith-Wiedemann-Syndrom ist auf verschiedene konstitutionelle genetische und epigenetische Defekte der Region 11p zurückzuführen und prädisponiert vor allem zur Entwicklung von Wilms-Tumoren, Hepatoblastomen, adrenocorticalen Karzinomen und Rhabdomyosarkomen [110, 111]. Das entsprechende Tumorrisiko hängt dabei sehr stark von der jeweiligen Kombination genetischer und epigenetischer Modifikationen der Gene *KCNQ1OT1*, *H19* und *IGF2* ab [110, 111]. Die Fanconi-Anämie hingegen ist ein heterozygot vererbtes, polygenetisches Fehlbildungs- und DNA-Reparaturdefizienzsyndrom, welches zur Entwicklung von Leukämien und im späteren Leben auch von soliden Tumoren veranlagt [112–114]. Die Erkennung betroffener Fanconi-Patienten mit myelodysplastischen Syndromen und Leu-

kämien ist ausserordentlich wichtig, da eine Therapie mit Bestrahlung und alkylierenden Substanzen sie besonders gefährden würde und man daher die Therapie entsprechend adaptieren muss. Da die Fanconi-Anämie durch kombinierte Mutationen in zumindest 11 verschiedenen Genen verursacht werden kann, ist eine entsprechende molekulargenetische Abklärung und Diagnostik schwierig und aufwändig [115]. Man behilft sich daher mit zwei relativ einfachen und doch verlässlichen indirekten Diagnoseverfahren, nämlich einem zytogenetischen Test und einer durchflußzytometrischen Analyse der Zellzyklusverteilung, mit der die bei Fanconi-Zellen auftretende spontane Arretierung in der späten S- bzw. G2-Phase nachgewiesen werden kann [112]. Bi- und polyfunktionelle Alkylanzien (wie z.B. Mitomycin C und Diepoxybutan) verursachen DNA-Interstrangvernetzungen, welche die betroffenen Zellen nicht mehr reparieren können und daher zu den charakteristischen und diagnostisch wichtigen Chromosomenbrüchen und Austauschfiguren führen [112–114].

Abschließend möchte ich es nicht versäumen, den interessierten Leser auf die drei wichtigsten Webadressen zu der Thematik dieses Übersichtsartikels hinzuweisen:

“Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology”

<http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/index.html>

“Mitelman database of Chromosome Aberrations in Cancer”

<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>

“Online Mendelian Inheritance in Man”

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>

Danksagung

Frau Mag. Nicole Reisinger hat mir in dankenswerter Weise mit viel Elan und Einsatz bei der Erstellung der Abbildungen geholfen. Meine Forschungsarbeit wird von der Österreichischen Kinderkrebshilfe und dem “Genome Research for Health of the Austrian Ministry of Education, Science and Culture” (GEN-AU Child, GZ 200.071/3-VI/2a/2002) finanziell unterstützt sowie von der “EU COST B19 Action on Molecular Cytogenetics of Solid Tumors” gefördert.

Literatur

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57–70.
2. Albertson DG, Collins C, McCormick F, Gray JW. Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* 2003; 34:369–76.

3. Maris JM, Denny CT. Focus on embryonal malignancies. *Cancer Cell* 2002;2:447–50.
4. Perera FP. Environment and cancer: who are [sic] susceptible? *Science* 1997;278:1068–73.
5. Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2003;3:639–49.
6. Greaves MF. Biological models for leukaemia and lymphoma. *IARC Sci Publ* 2004:351–72.
7. Greaves M. In utero origins of childhood leukaemia. *Early Hum Dev* 2005;81:123–9.
8. Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM. Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood* 2003;102:2321–33.
9. Wasserman R, Galili N, Ito Y, Reichard BA, Shane S, Rovera G. Predominance of fetal type DJH joining in young children with B precursor lymphoblastic leukemia as evidence for an in utero transforming event. *J Exp Med* 1992;176:1577–81.
10. Fasching K, Panzer S, Haas OA, Marschalek R, Gadner H, Panzer-Grümayer ER. Presence of clone-specific antigen receptor gene rearrangements at birth indicates an in utero origin of diverse types of early childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;95:2722–4.
11. Haas OA. Genetik und Genetische Prädisposition. In: Gadner G, Niemeyer C, Ritter J, ed. *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Heidelberg: Springer 2005.
12. Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood* 1999;93:4059–70.
13. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415–28.
14. Plass C, Soloway PD. DNA methylation, imprinting and cancer. *Eur J Hum Genet* 2002;10:6–16.
15. Feinberg AP. The epigenetics of cancer etiology. *Semin Cancer Biol* 2004;14:427–32.
16. Harrison CJ. The management of patients with leukaemia: the role of cytogenetics in this molecular era. *Br J Haematol* 2000;108:19–30.
17. Trask BJ. Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nat Rev Genet* 2002;3:769–78.
18. Kearney L, Tosi S, Jaju RJ. Detection of chromosome abnormalities in leukemia using fluorescence in situ hybridization. *Methods Mol Med* 2002;68:7–27.
19. Tönnies H. Modern molecular cytogenetic techniques in genetic diagnostics. *Trends Mol Med* 2002;8:246–50.
20. Harrison CJ, Kempski H, Hammond DW, Kearney L. Molecular cytogenetics in childhood leukemia. *Methods Mol Med* 2004;91:123–37.
21. van der Burg M, Poulsen TS, Hunger SP, Beverloo HB, Smit EM, Vang-Nielsen K, et al. Split-signal FISH for detection of chromosome aberrations in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004;18:895–908.
22. Dal Cin P, Van den Berghe H. Ten years of the cytogenetics of soft tissue tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;95:59–66.
23. Mertens F, Mandahl N, Mitelman F, Heim S. Cytogenetic analysis in the examination of solid tumors in children. *Pediatr Hematol Oncol* 1994;11:361–77.
24. Mitelman F, Johansson B, Mandahl N, Mertens F. Clinical significance of cytogenetic findings in solid tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;95:1–8.
25. Mitelman F, Mertens F, Johansson B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet* 1997;15:417–74.
26. Attarbaschi A, Mann G, König M, Dworzak MN, Trebo MM, Mühlegger N, et al. Incidence and relevance of secondary chromosome abnormalities in childhood TEL/AML1+ acute lymphoblastic leukemia: an interphase FISH analysis. *Leukemia* 2004;18:1611–6.
27. Albertson DG, Pinkel D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum Mol Genet* 2003;12 Spec No 2:R145–52.
28. Klein HG, Gorinevski D, Hörmann J, Marschall C, Mayer K, Vanetti M. Gesamt-Genom-Microarray-Analyse und Target-Validierung mittels qPCR. Whole genome microarray analysis and target validation by using qPCR. *J Lab Med* 2004;28:215–24.
29. Ferrando AA, Neubergh DS, Staunton J, Loh ML, Huard C, Raimondi SC, et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2002;1:75–87.
30. Pomeroy SL, Tamayo P, Gaasenbeek M, Sturla LM, Angelo M, McLaughlin ME, et al. Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature* 2002;415:436–42.
31. Sardi I, Tintori V, Marchi C, Veltroni M, Lippi A, Tucci F, et al. Molecular profiling of high-risk neuroblastoma by cDNA array. *Int J Mol Med* 2002;9:541–5.
32. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002;1:133–43.
33. Hampton GM, Frierson HF. Classifying human cancer by analysis of gene expression. *Trends Mol Med* 2003;9:5–10.
34. Bruchova H, Kalinova M, Brdicka R. Array-based analysis of gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2004;28:1–7.
35. Chen QR, Bilke S, Wei JS, Whiteford CC, Cenacchi N, Krasnoselsky AL, et al. cDNA array-CGH profiling identifies genomic alterations specific to stage and MYCN-amplification in neuroblastoma. *BMC Genomics* 2004;5:70.
36. Lacayo NJ, Meshinchi S, Kinnunen P, Yu R, Wang Y, Stuber CM, et al. Gene expression profiles at diagnosis in de novo childhood AML patients identify FLT3 mutations with good clinical outcomes. *Blood* 2004;104:2646–54.
37. Staeger MS, Hutter C, Neumann I, Foja S, Hattenhorst UE, Hansen G, et al. DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. *Cancer Res* 2004;64:8213–21.
38. Sugimura J, Yang XJ, Tretiakova MS, Takahashi M, Kort EJ, Fulton B, et al. Gene expression profiling of mesoblastic nephroma and Wilms tumors – comparison and clinical implications. *Urology* 2004;64:362–8; discussion 368.
39. Lagergren A, Manetopoulos C, Axelson H, Sigvardsson M. Neuroblastoma and pre-B lymphoma cells share expression of key transcription factors but display tissue restricted target gene expression. *BMC Cancer* 2004;4:80.
40. Ross ME, Mahfouz R, Onciu M, Liu HC, Zhou X, Song G, et al. Gene expression profiling of pediatric acute myelogenous leukemia. *Blood* 2004;104:3679–87.
41. Teuffel O, Dettling M, Cario G, Stanulla M, Schrappe M, Buhmann P, et al. Gene expression profiles and risk

- stratification in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2004;89:801–8.
42. Valk PJ, Verhaak RG, Beijen MA, Erpelinck CA, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Boer JM, et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2004;350:1617–28.
 43. Harrison CJ. The genetics of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 2000;13:427–39.
 44. Moorman AV, Richards SM, Martineau M, Cheung KL, Robinson HM, Jalali GR, et al. Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2003;102:2756–62.
 45. Haas OA. Biological and clinical significance of nonrandom aneuploidy patterns in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cellular Oncol* 2004;26:212–5.
 46. Harrison CJ, Moorman AV, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harris RL, Reza Jalali G, et al. Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2004;125:552–9.
 47. Sutcliffe MJ, Shuster JJ, Sather HN, Camitta BM, Pullen J, Schultz KR, et al. High concordance from independent studies by the Children's Cancer Group (CCG) and Pediatric Oncology Group (POG) associating favorable prognosis with combined trisomies 4, 10, and 17 in children with NCI Standard-Risk B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: a Children's Oncology Group (COG) initiative. *Leukemia* 2005 (in print).
 48. Paulsson K, Panagopoulos I, Knuutila S, Jee KJ, Garwicz S, Fioretos T, et al. Formation of trisomies and their parental origin in hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2003;102:3010–5.
 49. Ferrando AA, Look AT. Clinical implications of recurring chromosomal and associated molecular abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* 2000;37:381–95.
 50. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003;3:203–16.
 51. Schwab M. Amplification of oncogenes in human cancer cells. *Bioessays* 1998;20:473–9.
 52. Harewood L, Robinson H, Harris R, Al-Obaidi MJ, Jalali GR, Martineau M, et al. Amplification of AML1 on a duplicated chromosome 21 in acute lymphoblastic leukemia: a study of 20 cases. *Leukemia* 2003;17:547–53.
 53. Robinson HM, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harewood L, Harris RL, Jalali GR, et al. Amplification of AML1 in acute lymphoblastic leukemia is associated with a poor outcome. *Leukemia* 2003;17:2249–50.
 54. Barber KE, Martineau M, Harewood L, Stewart M, Cameron E, Strefford JC, et al. Amplification of the ABL gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004;18:1153–6.
 55. Graux C, Cools J, Melotte C, Quentmeier H, Ferrando A, Levine R, et al. Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 2004;36:1084–9.
 56. Delattre O, Zucman J, Melot T, Garau XS, Zucker JM, Lenoir GM, et al. The Ewing family of tumors – a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med* 1994;331:294–9.
 57. Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 1997;278:1059–64.
 58. Pappo AS, Shapiro DN, Crist WM. Rhabdomyosarcoma. Biology and treatment. *Pediatr Clin North Am* 1997;44:953–72.
 59. Rabbitts TH. The clinical significance of fusion oncogenes in cancer [editorial; comment]. *N Engl J Med* 1998;338:192–4.
 60. Bannicelli JL, Barr FG. Genetics and the biologic basis of sarcomas. *Curr Opin Oncol* 1999;11:267–74.
 61. Arico M, Valsecchi MG, Camitta B, Schrappe M, Chessells J, Baruchel A, et al. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2000;342:998–1006.
 62. Rabes HM, Demidchik EP, Sidorow JD, Lengfelder E, Beimfohr C, Hoelzel D, et al. Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-cholesterol papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications. *Clin Cancer Res* 2000;6:1093–103.
 63. Willis TG, Dyer MJ. The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood* 2000;96:808–22.
 64. Tomescu O, Barr FG. Chromosomal translocations in sarcomas: prospects for therapy. *Trends Mol Med* 2001;7:554–9.
 65. Xia SJ, Pressey JG, Barr FG. Molecular pathogenesis of rhabdomyosarcoma. *Cancer Biol Ther* 2002;1:97–104.
 66. Kovar H. Ewing tumor biology: perspectives for innovative treatment approaches. *Adv Exp Med Biol* 2003;532:27–37.
 67. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. Fusion genes and rearranged genes as a linear function of chromosome aberrations in cancer. *Nat Genet* 2004;36:331–4.
 68. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004;350:1535–48.
 69. Bernstein J, Dastugue N, Haas OA, Harbott J, Heerema NA, Huret JL, et al. Nineteen cases of the t(1;22)(p13;q13) acute megakaryoblastic leukaemia of infants/children and a review of 39 cases: report from a t(1;22) study group. *Leukemia* 2000;14:216–8.
 70. Ma Z, Morris SW, Valentine V, Li M, Herbrick JA, Cui X, et al. Fusion of two novel genes, RBM15 and MKL1, in the t(1;22)(p13;q13) of acute megakaryoblastic leukemia. *Nat Genet* 2001;28:220–1.
 71. Mercher T, Coniat MB, Monni R, Mauchauffe M, Khac FN, Gressin L, et al. Involvement of a human gene related to the *Drosophila* spen gene in the recurrent t(1;22) translocation of acute megakaryocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:5776–9.
 72. Beverloo HB, Panagopoulos I, Isaksson M, van Wering E, van Drunen E, de Klein A, et al. Fusion of the homeobox gene HLXB9 and the ETV6 gene in infant acute myeloid leukemias with the t(7;12)(q36;p13). *Cancer Res* 2001;61:5374–7.
 73. Tosi S, Hughes J, Scherer SW, Nakabayashi K, Harbott J, Haas OA, et al. Heterogeneity of the 7q36 breakpoints in the t(7;12) involving ETV6 in infant leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;38:191–200.
 74. Jaju RJ, Fidler C, Haas OA, Strickson AJ, Watkins F, Clark K, et al. A novel gene, NSD1, is fused to NUP98 in the t(5;11)(q35;p15.5) in de novo childhood acute myeloid leukemia. *Blood* 2001;98:1264–7.
 75. Meyer C, Schneider B, Reichel M, Angermueller S, Strehl S, Schnittger S, et al. Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:449–54.
 76. Penas EM, Cools J, Algenstaedt P, Hinz K, Seeger D, Schafhausen P, et al. A novel cryptic translocation t(12;17)(p13;p12-p13) in a secondary acute myeloid leu-

- kemia results in a fusion of the ETV6 gene and the antisense strand of the PER1 gene. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;37:79–83.
77. Slape C, Aplan PD. The role of NUP98 gene fusions in hematologic malignancy. *Leuk Lymphoma* 2004;45:1341–50.
78. Pallisgaard N, Hokland P, Riishoj DC, Pedersen B, Jorgensen P. Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukemia. *Blood* 1998;92:574–88.
79. Strehl S, König M, Mann G, Haas OA. Multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction screening in childhood acute myeloblastic leukemia. *Blood* 2001;97:805–8.
80. Elia L, Mancini M, Moleti L, Meloni G, Buffolino S, Krampira M, et al. A multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction strategy for the diagnostic molecular screening of chimeric genes: a clinical evaluation on 170 patients with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2003;88:275–9.
81. Olesen LH, Clausen N, Dimitrijevic A, Kerndrup G, Kjeldsen E, Hokland P. Prospective application of a multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the detection of balanced translocations in leukaemia: a single-laboratory study of 390 paediatric and adult patients. *Br J Haematol* 2004;127:59–66.
82. Maroc N, Morel A, Beillard E, De La Chapelle AL, Fund X, Mozziconacci MJ, et al. A diagnostic biochip for the comprehensive analysis of MLL translocations in acute leukemia. *Leukemia* 2004;18:1522–30.
83. Wang X, Young WS 3rd. Rapid amplification of cDNA ends. *Methods Mol Biol* 2003;226:105–16.
84. Megonigal MD, Rappaport EF, Jones DH, Kim CS, Nowell PC, Lange BJ, et al. Panhandle PCR strategy to amplify MLL genomic breakpoints in treatment-related leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:11583–8.
85. Megonigal MD, Rappaport EF, Wilson RB, Jones DH, Whitlock JA, Ortega JA, et al. Panhandle PCR for cDNA: a rapid method for isolation of MLL fusion transcripts involving unknown partner genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:9597–602.
86. Raffini LJ, Slater DJ, Rappaport EF, Lo Nigro L, Cheung NK, Biegel JA, et al. Panhandle and reverse-panhandle PCR enable cloning of der(11) and der(other) genomic breakpoint junctions of MLL translocations and identify complex translocation of MLL, AF-4, and CDK6. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:4568–73.
87. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, Pongers-Willems MJ, Corral L, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998;352:1731–8.
88. Biondi A, Valsecchi MG, Seriu T, D'Aniello E, Willems MJ, Fasching K, et al. Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features. A case control study of the International BFM study group. *Leukemia* 2000;14:1939–43.
89. Konrad M, Metzler M, Panzer S, Oestreicher I, Peham M, Repp R, et al. Late relapses evolve from slow-responding subclones in t(12;21)-positive acute lymphoblastic leukemia: evidence for the persistence of a preleukemic clone. *Blood* 2003;101:3635–40.
90. Willems MJ, Seriu T, Hettinger K, d'Aniello E, Hop WC, Panzer-Grümayer ER, et al. Detection of minimal residual disease identifies differences in treatment response between T-ALL and precursor B-ALL. *Blood* 2002;99:4386–93.
91. Lohmann DR, Brandt B, Oehlschlager U, Gottmann E, Hopping W, Passarge E, et al. Molecular analysis and predictive testing in retinoblastoma. *Ophthalmic Genet* 1995;16:135–42.
92. Lohmann DR, Brandt B, Hopping W, Passarge E, Horsthemke B. The spectrum of RB1 germ-line mutations in hereditary retinoblastoma. *Am J Hum Genet* 1996;58:940–9.
93. Petruzzi MJ, Green DM. Wilms' tumor. *Pediatr Clin North Am* 1997;44:939–52.
94. Lee SB, Haber DA. Wilms tumor and the WT1 gene. *Exp Cell Res* 2001;264:74–99.
95. Dome JS, Coppes MJ. Recent advances in Wilms tumor genetics. *Curr Opin Pediatr* 2002;14:5–11.
96. Stocker JT. Hepatoblastoma. *Semin Diagn Pathol* 1994;11:136–43.
97. Stock C, Kager L, Fink FM, Gadner H, Ambros PF. Chromosomal regions involved in the pathogenesis of osteosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;28:329–36.
98. Biegel JA. Genetics of pediatric central nervous system tumors. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997;19:492–501.
99. Kramer DL, Parmiter AH, Rorke LB, Sutton LN, Biegel JA. Molecular cytogenetic studies of pediatric ependymomas. *J Neurooncol* 1998;37:25–33.
100. Biegel JA. Cytogenetics and molecular genetics of childhood brain tumors. *Neurooncol* 1999;1:139–51.
101. Wechsler-Reya R, Scott MP. The developmental biology of brain tumors. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:385–428.
102. Pollack IF, Biegel J, Yates A, Hamilton R, Finkelstein S. Risk assignment in childhood brain tumors: the emerging role of molecular and biologic classification. *Curr Oncol Rep* 2002;4:114–22.
103. MacDonald TJ, Rood BR, Santi MR, Vezina G, Bingaman K, Cogen PH, et al. Advances in the diagnosis, molecular genetics, and treatment of pediatric embryonal CNS tumors. *Oncologist* 2003;8:174–86.
104. Rashidi M, DaSilva VR, Minagar A, Rutka JT. Nonmalignant pediatric brain tumors. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2003;3:200–5.
105. Biegel JA, Pollack AI. Molecular Analysis of pediatric brain tumors. *Curr Oncol Rep* 2004;6:445–52.
106. Rickert CH. Prognosis-related molecular markers in pediatric central nervous system tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:1211–24.
107. Stock C, Ambros IM, Lion T, Haas OA, Zoubek A, Gadner H, et al. Detection of numerical and structural chromosome abnormalities in pediatric germ cell tumors by means of interphase cytogenetics. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;11:40–50.
108. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:157–62.
109. Tucker T, Friedman JM. Pathogenesis of hereditary tumors: beyond the 'two-hit' hypothesis. *Clin Genet* 2002;62:345–57.
110. Bliok J, Maas SM, Ruijter JM, Hennekam RC, Alders M, Westerveld A, et al. Increased tumour risk for BWS patients correlates with aberrant H19 and not KCNQ10T1 methylation: occurrence of KCNQ10T1 hypomethylation in familial cases of BWS. *Hum Mol Genet* 2001;10:467–76.
111. Weksberg R, Nishikawa J, Caluseriu O, Fei YL, Shuman C, Wei C, et al. Tumor development in the Beckwith-Wiedemann syndrome is associated with a variety of

- constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of KCNQ1OT1. *Hum Mol Genet* 2001;10:2989–3000.
112. Schindler D, Höhn H. *Fanconi Anämie*. München: Verlag medizinische genetik, 2003.
 113. Wong JC, Buchwald M. Disease model: Fanconi anemia. *Trends Mol Med* 2002;8:139–42.
 114. Joenje H, Patel KJ. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nat Rev Genet* 2001; 2:446–57.
 115. Shimamura A, de Oca RM, Svenson JL, Haining N, Moreau LA, Nathan DG, et al. A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway. *Blood* 2002;100:4649–54.