

## Chromosomenstudien bei akuter und chronischer myeloischer Leukämie

K. E. HAMPEL, G. PALME

*Hämatologische Abteilung und Nuklearmedizinische Abteilung der I. Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin,*

Eingegangen am 30. November 1963

Während bei der akuten Leukose lediglich teilweise methodisch bedingte numerische Chromosomenanomalien gefunden wurden, wird über zwei Fälle von behandelter chronischer Myelose berichtet, bei denen numerische Aberrationen, Endoreduplikation, sowie zahlreiche Strukturanomalien der Chromosomen nachgewiesen wurden. Chromatid- und Chromosomenbrüche waren distal vom Zentromer am häufigsten. Es wird über eine neuartige, strahleninduzierte komplexe Chromosomenanomalie vom Typ der Sternfigur berichtet. Die DNS-Syntheserate des Ph<sup>1</sup>-Chromosoms scheint verglichen mit den Chromosomen der Gruppe 21 erniedrigt zu sein.

Die Chromosomenanalyse leukämischer Zellen hat in jüngster Zeit neue Einblicke in Wesen und Verlauf der Leukosen ermöglicht. Voraussetzung war die Entwicklung neuer Präparationstechniken. Für unsere Untersuchungen benutzten wir die von MOORHEAD [27] und ROTHFELS [38] angegebenen, gering modifizierten Methoden bei Kurzzeitkulturen peripherer Leukozyten.

Die Tabelle 1 zeigt die Befunde bei 4 akuten Paramyeloblastenleukosen. In einem Fall wurde Vinblastin-Sulfat als Mitoseblocker verwendet. In Übereinstimmung mit anderen Autoren [4, 19, 20, 31, 45] konnten konstante Strukturveränderungen der Chromosomen nicht nachgewiesen werden, lediglich eine Variabilität der Chromosomenzahl, die jedoch teilweise methodisch bedingt sein könnte [14]. Es ist anzunehmen, daß Chromosomenstreuung bei Paramyeloblasten unter osmotischer und mechanischer Beanspruchung bei der Präparation leichter eintritt.

Demgegenüber ließ sich bei der chronischen myeloischen Leukämie regelmäßig ein „minute“-Chromosom nachweisen [1–3, 13, 21, 30–33, 36, 39, 40, 45], welches der Gruppe 21 zuzuordnen ist und als Ph<sup>1</sup>-Chromosom bekannt wurde. Vereinzelt Beobachtungen eines entsprechenden „minute“-Chromosoms liegen bei Gesunden [46] und bei der akuten Leukose [25] vor, wobei hier allerdings die akute Verlaufsform einer primär chronischen Myelose nicht auszuschließen ist.

Im peripheren Blut von 3 behandelten und 2 unbehandelten chronischen myeloischen Leukämien fanden wir 9 bis 56% Ph<sup>1</sup>-positive Zellen, bei den unbehandelten 38, bzw. 44%.

Für eingehende Verlaufsstudien wird jedoch die direkte Knochenmarkstechnik neuerdings gefordert [39, 40]. Bei zwei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie ergaben Chromosomenanalysen ungewöhnliche Befunde, die uns einer eingehenderen Mitteilung wert erscheinen.

Einmal handelte es sich um eine Patientin mit seit Februar 1961 bestehender chronischer Myelose. Von April bis Mai 1961 und von Februar bis März 1963 erhielt sie insgesamt

Tabelle 1. Chromosomenzählung bei 4 akuten Paramyeloblastenleukosen

Nr.	Vorbehandlung		< 44	44	45	46	47	48	92	Total
20	2,5 mg Vincristin	VLB	4	3	3	9	—	—	1	20
37	11,5 mg Vincristin	COL	—	3	8	18	—	—	—	29
42	∅	COL	7	3	8	39	4	1	—	62
90	1,075 g Purinethol	COL	—	1	3	29	2	—	—	35
117	0,275 g Purinethol	COL	1	1	5	23	3	—	—	33

COL — Colchicin,  
VLB — Vincalcoloblastin.

Tabelle 2. Numerische und strukturelle Chromosomenanalyse bei einer chronischen Myelose im Myeloblastenschub

< 44	44	45	46	47	48	50	54	56	58	92	> 92	Endoreduktion	Total
6	7	10	106	11	6	1	1	1	1	4	1	19	174
						Chromatidbrüche				Chromosomenbrüche			
						kurzer Arm		langer Arm		kurze Arme		lange Arme	
						2		5		1			
						2 1 (Nr. 1)		6		2		4	
						1 1 (Nr. 1)		9		3 Nr. (16-18)		12	
								4		—			
								1		1		1	
								1					
								—				16	
										6			
										1			
Ph <sup>1</sup> -Chromosom		dizentrisch		abnorm lange Satelliten (Nr. 13-15)		komplexe Chromosomenaberrationen							
16		8		3		1							
Metaphasen, gesamte										174			
Metaphasen, mit Chromosomenaberrationen										83 = 48 %			



Abb. 7. Endoreduplikation bei einem Leukozyten in vitro (chronische Myelose).

500 mg Myleran. Seit Beginn eines Myeloblastenschubs im April 1963 bis zum Beginn der ersten Leukozytenkultur wurden insgesamt 1,2 g Purinethol in einer Tagesdosis von 50 mg verabreicht. Die Leukozytenzahl betrug 4200, davon 35% Myeloblasten, 2% Promyelozyten und 21% Myelozyten. Die Tabelle 2 läßt eine erhebliche Streuung um die modale Chromosomenzahl [43] erkennen, wobei die Endoreduplikation bei ca. 11% der Metaphasen besonders auffällt. In einem höheren Prozentsatz ist dieses Phänomen bisher lediglich bei einer akuten Leukose [10] und bei einer chronischen Myelose [16], ganz vereinzelt auch bei normalen [22] und leukämischen [31] Zellen beschrieben worden. Die Endoreduplikation wird als maskierte Endomitose [37] angesehen, wobei in der Ruhephase eine zusätzliche Chromosomenduplikation stattfindet, so daß in der Metaphase Diplochrosomen entstehen [23, 24], welche anstelle von zwei Chromatide vier erkennen lassen (Abb. 1). Die Endoreduplikation war in allen 3 Kulturen (61, 81, 86) wie auch in den Kulturen 67 und 89 nachweisbar, während bei sämtlichen Chromosomenanalysen normaler und leukämischer Patienten dieses Phänomen nur äußerst selten auftrat. Eine Ausnahme bildeten lediglich unsere Versuche mit überdosiertem [8], tritiummarkiertem Thymidin, wie auch die Endoreduplikation nach Röntgenbestrahlung von Leukozyten in vitro [5, 6, 34] nicht ungewöhnlich ist.

Zusätzlich fanden wir Chromatid- und Chromosomenbrüche bei 48% der Metaphasen, die wir wie folgt klassifizierten (Abb. 2):

1. Chromatidbrüche proximal vom Zentromer,
2. intermediär,
3. distal,
4. mit Dislokation eines Chromatids,
5. mit Translokation und einer breiten achromatischen Lücke,

- 6 Chromatid- und Chromosomenbruch bei einem Diplochrosom,
- 7 Chromosomenbruch distal vom Zentromer,
8. intermediär,
9. intermediär mit Dislokation an den kurzen Armen,
10. distal mit Teilverlust eines Chromatids,
11. azentrisches Fragment nach Chromosomenbruch.

Zusätzlich traten dizentrische Chromosomen (12) auf, ferner wurde in fünf Zellen ein neuartiges fraglich dizentrisches Chromosom mit kurzem Abstand zwischen den beiden Zentromeren beobachtet (13).

Die nachgewiesenen Strukturanomalien der Chromosomen sind in der nächsten Abbildung (Tab. 2) zusammengefaßt. Dabei ist hervorzuheben, daß die Mehrzahl der Chromatid- und Chromosomenbrüche *distal an den langen Armen* auftreten [17]. Weitere Strukturanomalien ergaben sich aus der Idiogramm-Analyse. Das erste Beispiel (61/10/30) läßt einen Chromosomenbruch mit Bildung eines azentrischen Fragments in Nr. 3 und einen fraglichen Chromosomenbruch in Nr. 1 nahe dem Zentromer erkennen. Das nächste Idiogramm (61/15/18) zeigt eine Translokation zwischen Chromosom 2 und 3, wobei gleichzeitig ein Chromatidbruch entstanden ist. Ein kleines Fragment ist einem Chromosom der Gruppe 18 angelagert, Nr. 15 hat wahrscheinlich einen Teil seiner langen Arme verloren. Die nächste Abbildung (61/10/8) ergibt den Verdacht auf multiple Brüche und Translokationen innerhalb der Gruppe 1—3, sowie einen Chromosomenbruch mit Dislokation der kurzen Arme von 4. Das letzte Beispiel (61/10/42) läßt 4 abnorme Chromosomen erkennen: ein fraglich dizentrisches mit kurzem Abstand der beiden Zentromere, ein dizentrisches, eines mit fraglichem Zentromerbruch und zwei mit abnormen Armproportionen.

Bei dem anderen, 38 Jahre alt gewordenen Patienten wurde die Diagnose einer chronischen Myelose 1957 gestellt. Wegen Osteochondrose erhielt er 1954 insgesamt 1350 r Röntgenbestrahlung der Lumbosakralregion und 1958—1960 insgesamt 3025 r auf Milz und verschiedene Knochenmarkabschnitte. Von Juni 1961 bis Januar 1963 wurde er zytostatisch mit insgesamt 42 g Mannit-Myleran, 4,87 g Azetepa, 95 mg Vincal leukoblastin und 598 mg Myleran behandelt. In den 4 bzw. 6 Monaten vor dem Ansatz der Leukozytenkulturen (67 und 89) erhielt er lediglich 8 mg Methylprednisolon täglich. Zur Zeit der Kultur 89 wurde eine beginnende Entdifferenzierung gesichert.

Die numerische und strukturelle Chromosomenanalyse (Tab. 3) ergab ähnliche Befunde wie in dem bereits geschilderten Fall. Die Endoreduplikation war in ca. 8% der Zellen nachweisbar. Dabei ließ sich in 2 Metaphasen erstmals auch ein Diplo-Ph<sup>1</sup>-Chromosom nachweisen [17a]. Strukturelle Chromosomenanomalien waren in 45% der Metaphasen nachweisbar. Distale Chromosomen- und Chromatidbrüche der langen Arme waren auch hier am häufigsten. Komplexe Bruch-Reunions-Anomalien waren nicht selten. Eine Metaphase zeigte ein Ringchromosom. Bei drei anderen Zellen waren Gebilde entstanden, die einem dreiarmigen Stern ähneln. Bei dem ersten Idiogramm (67 B/6/59) (Abb. 3) konnte nicht sicher entschieden werden, ob es sich um eine komplexe Chromosomenanomalie mit Bildung einer Sternfigur handelt, bei der 6 Chromatide von einem Zentromer ausgehen, ob zwei Zentromere verklebt sind, oder ob es sich um eine zufällige Position zweier Chromosomen handelt, eins der Gruppe Nr. 3 und das andere als trisomales der Gruppe 13—15. Das nächste Beispiel (67 B/6/75) (Abb. 4) zeigt die Sternfigur aus einem akrozentrischen Chromosom vermutlich der Gruppe 15, dem sich Chromatid- bzw. Chromosomenfragmente angelagert haben, ferner zwei überzählige Chromosomen, einen distalen Chromosomenbruch der Nr. 3 und ein fehlendes Nr. 6. Ein anderes Idiogramm (67B/3/81) zeigt eine Sternfigur mit einem Zentromer vermutlich der Nr. 12 und einer

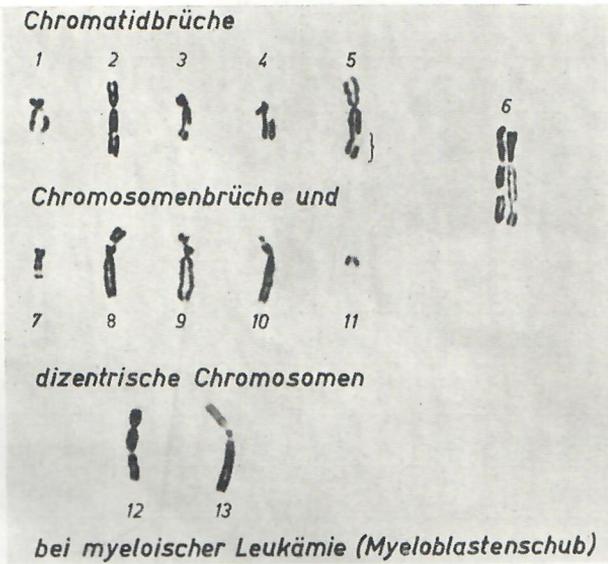


Abb. 2. Beispiele für strukturelle Chromosomenanomalien (siehe Text).

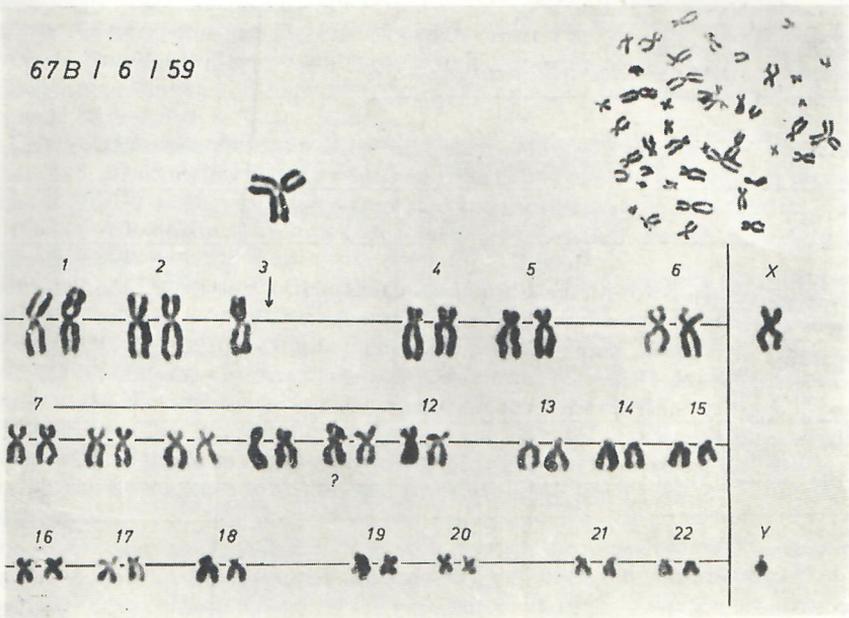


Abb. 3. Komplexe Chromosomenanomalie vom Typ der Sternfigur.

Tabelle 3. Numerische und strukturelle Chromosomenanomalien bei einer chronischen myeloischen Leukämie

< 44	44	45	46	47	48	52	60	66	78	84	86	92	Endereplika- tion	Total
5	3	9	60	6	2	1	1	1	1	1	1	3	8	102
						Chromatidbrüche			Chromosomenbrüche					
						kurzer Arm		langer Arm		kurze Arme		lange Arme		
Proximal						2				3				
Intermediär						1		3		2		2		
Distal						4				10				
Mit breiter achromat. Lücke						2				—				
Azentrische Fragmente						—				11				
Isolierte Fragmente						7								
Ringchromosom						1								
Ph <sup>1</sup> -Chromosom			dizentrische			komplexe Chromosomenaberrationen								
17			5			4								
Metaphasen, gesamte												102		
Metaphasen, mit Chromosomenaberrationen												45 = 45%		

Tabelle 4. <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau in kleine akrozentrische Chromosomen bei einer chronischen Myelose (Autoradiographie)

H. 11., 38 ♂ (89, 2 µC/ml, 30 Min. 24h vor Bearbeitung)					
Auswertbare Metaphasen		123			
davon markiert		49			
auswertbar		36			
Ph <sup>1</sup> -positive		20			
davon markiert		9			
		Mittlere Silberkornzahl pro Chromosom			
		Nr. 21	Nr. 22	Y	Ph <sup>1</sup>
Ph <sup>1</sup> negative N = 27		2,0	1,7	2,8	—
Ph <sup>1</sup> positive N = 9		2,0	1,9	2,7	1,7

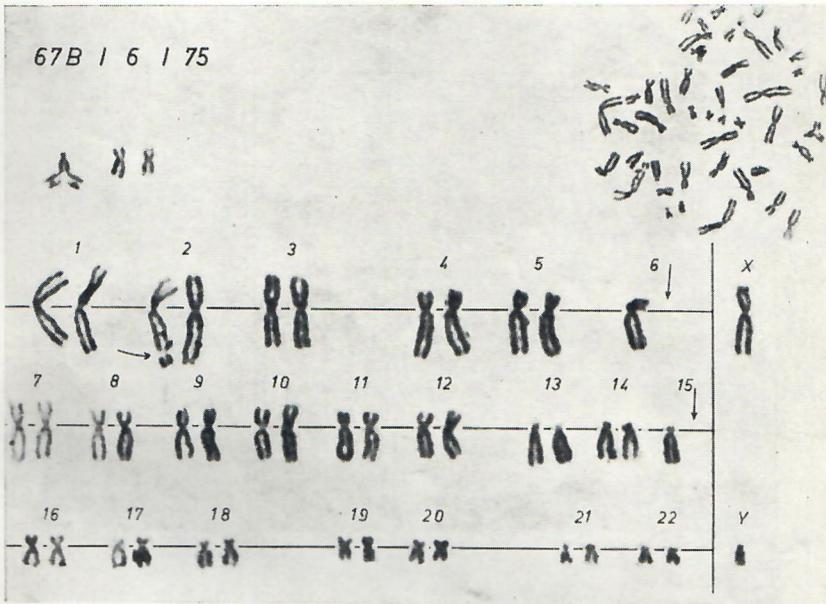


Abb. 4. Komplexe Chromosomenanomalie vom Typ der Sternfigur.

Anlagerung bzw. Verschmelzung von Chromosomenbruchstücken, sowie ein überzähliges Chromosom. Diese komplexen Chromosomenanomalien vom *Typ der Sternfigur* könnten durch vorangegangene Röntgenbestrahlung bedingt sein. Diese Ansicht konnten wir durch die Beobachtung ähnlicher Sternfiguren bei Einwirkung tritiummarkierten Thymidins auf normale Leukozyten *in vitro* stützen.

Die Chromosomenanalyse der beiden Patienten ergibt somit, daß eine Vielzahl numerischer und struktureller Chromosomenanomalien bei der behandelten myeloischen Leukämie auftreten können. Dabei müssen Veränderung durch die Bestrahlung [9, 11, 26, 35, 41, 44], Zytostatika [10], u. a. [28] ebenso berücksichtigt werden wie Präparation und Kulturbedingungen.

Neuerdings sind quantitative Untersuchungen über die DNS-Synthese in den einzelnen Chromosomen möglich durch den autoradiographischen Nachweis tritiummarkierten Thymidins [7, 15, 28, 42]. Die Abbildung 5 zeigt eine markierte Metaphase, wobei in der nächsten Abbildung die Chromosomen entsprechend der DENVER Nomenklatur [12] geordnet wurden. Wir möchten über erste Ergebnisse der DNS-Syntheserate des Ph<sup>1</sup>-Chromosoms berichten. Wie die Tabelle 4 erkennen läßt, ist die mittlere Silberkornzahl des Ph<sup>1</sup>-Chromosoms gegenüber der Gruppe 21 erniedrigt, was auf Grund der Deletion zu erwarten war. Eine eingehende statistische Auswertung an einer größeren Zellpopulation ist notwendig.

Wenn auch mit den derzeitigen Methoden nur grobe Chromosomenveränderungen nachzuweisen sind, so können doch Untersuchungen über die DNS-Synthese in den Chromosomen weitere Aufschlüsse über Wesen und Verlauf der Leukose bringen.

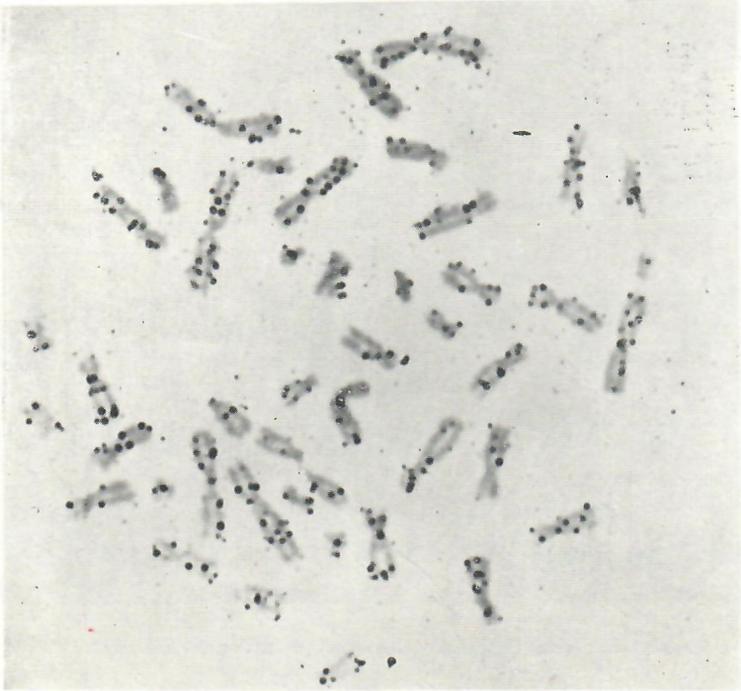


Abb. 5.  $^3\text{H}$ -Thymidin-markierte Chromosomen eines Leukozyten.

### Schrifttum

- [1] ADAMS, A., FITZGERALD, P. H., GUNZ, F. W.: Brit. Med. J. 2, 1961, 1474.
- [2] ATKIN, N. B., TAYLOR, M. C.: Cytogenetics 1, 1962, 97.
- [3] BAIKIE, A. G., COURT BROWN, W. M., BUCKTON, K. E., HARDEN, D. G., JACOBS, P. A., TOUGH, I. M.: Nature, Lond. 188, 1960, 1165.
- [4] BAIKIE, A. G., JACOBS, P. A., MC BRIDGE, J. A., TOUGH, I. M.: Brit med. J. 2, 1961, 1564.
- [5] BELL, A. G., BAKER, D. G.: Canad. J. Genet. Cytol. 4, 1962, 340.
- [6] BENDER, M. A., GOOCH, P. C.: Genetics 46, 1961, 851.
- [7] BENDER, M. A., PRESCOTT, D. M.: Exp. Cell Res. 27, 1962, 221.
- [8] BENDER, M. A., GOOCH, P. C., PRESCOTT, D. M.: Cytogenetics 1, 1962, 2.
- [9] BENDER, M. A., GOOCH, P. C.: Radiat. Res. 16, 1962, 44.
- [10] BOTTURA, C., FERRARI, I.: Blood 21, 1963, 207.
- [11] CONEN, P. E., BELL, A. G., ASPIN, N.: Pediatr. 31, 1963, 72.
- [12] DENVER STUDY GROUP: J. A. M. A. 174, 1959, 159.
- [13] FITZGERALD, P. H., ADAMS, A., GUNZ, F. W.: Blood 21, 1963, 183.
- [14] FORD, C. E., JACOBS, P. A., LAJTHA, L. G.: Nature, Lond. 181, 1958, 1565.
- [15] GERMAN, J. L.: New York Acad. Sci. 24, 1962, 395.
- [16] HAMPEL, K. E.: Naturwiss. 50, 1963, 619.
- [17] HAMPEL, K. E., PALME, G.: Chromosome studies in acute and chronic myeloid leukaemia. Proc. IXth Congr. Europ. Soc. Haematol., Lissabon 1963 (im Druck).
- [17a] HAMPEL, K. E.: Diplo- $\text{Ph}^1$ -Chromosom bei der myeloischen Leukämie. Klin. Wschr. (im Druck).
- [18] HUNGERFORD, D. A., DONNELLY, A. J., NOWELL, P. C., BECK, S.: Amer. J. hum. Genet. 11, 1959, 215.
- [19] HUNGERFORD, D. A.: J. nat. Cancer Inst. 27, 1961, 983.
- [20] HUNGERFORD, D. A., NOWELL, P. C.: J. nat. Cancer Inst. 29, 1962, 545.

- [21] JACOBS, P. A., TOUGH, I. M.: Chromosome studies in chronic myeloid leukaemia. Symposium Bethesda, Maryland 1961.
- [22] KOSENOW, W., PFEIFFER, R. A.: Blut 7, 1961, 500.
- [23] LEVAN, A., HAUSCHKA, T. S.: J. nat. Cancer Inst. 14, 1953, 1.
- [24] LEVAN, A., HSU, T. C.: Hereditas 47, 1961, 69.
- [25] LÜERS, T., STRUCK, E., ALBRECHT, M.: Med. Welt 1, 1963, 948.
- [26] LINDGREN, M., NORRYD, C.: Hereditas 48, 1962, 688.
- [27] MOORHEAD, P. S., NOWELL, P. S., MELLMAN, W. J., BATTIPS, D. M., HUNGERFORD, D. A.: Exp. Cell Res. 20, 1960, 613.
- [28] MULDAL, S., GILBERT, C. W., LAJTHA, L. G., LINDSTEN, J., ROWLEY, J., FRACCARO, M.: Lancet 1963, 861.
- [29] NICHOLS, W. W., LEVAN, A., HALL, B., ÖSTERGREN, G.: Hereditas 48, 1962, 367.
- [30] NOWELL, P. C., HUNGERFORD, D. A.: Science 132, 1960, 1497.
- [31] NOWELL, P. C., HUNGERFORD, D. A.: J. nat. Cancer Inst. 25, 1960, 85.
- [32] NOWELL, P. C., HUNGERFORD, D. A.: J. nat. Cancer Inst. 27, 1961, 1013.
- [33] NOWELL, P. C., HUNGERFORD, D. A.: J. nat. Cancer Inst. 29, 1962, 911.
- [34] OHNUKI, Y., AWA, A., POMERAT, C. M.: Ann. New York Acad. Sci. 95, 1961, 882.
- [35] OSGOOD, E. E.: Ann. New York Acad. Sci. 95, 1961, 828.
- [36] REISMAN, L. E., TRUJILLO, J. M.: J. Pediatr. 62, 1963, 710.
- [37] RESCH, A.: Chromosoma 5, 1952, 296.
- [38] ROTHFELS, K. H., SIMINOVITCH, L.: Stain Technol. 33, 1958, 73.
- [39] SANDBERG, A. A., ISHIHARA, T., MIWA, T., HAUSCHKA, T. S.: Cancer Res. 21, 1961, 678.
- [40] SANDBERG, A. A., ISHIHARA, T., CROSSWHITE, L. H., HAUSCHKA, T. S.: Blood 20, 1962, 393.
- [41] STEWART, J. S. S., SANDERSON, A. R.: Lancet 1961, 978.
- [42] STUBBLEFIELD, E., MUELLER, G. C.: Cancer Res. 22, 1962, 1091.
- [43] ТЮ, J. H., PUCK, T. T.: Proc. nat. Acad. Sci. 44, 1958, 1229.
- [44] TOUGH, I. M., BUCKTON, K. E., BAIKIE, A. G., COURT BROWN, W. M.: Lancet 1960, 849.
- [45] TOUGH, I. M., COURT BROWN, W. M., BAIKIE, A. G., BUCKTON, K., HARNDEN, D. G., JACOBS, P., KING, M., Mc BRIDGE, J. A.: Lancet 1961, 411.
- [46] TRUJILLO, J., STENIUS, C., WEILER, C., KAPLAN, W. D., OHNO, S., KINOSHITA, R.: Proc. Am. Ass. Cancer Res. 3, 1961, 274.

Adresse des Verfassers: DR. K. E. HAMPEL, Berlin 19, Spandauer Damm 130.

K. E. HAMPEL, G. PALME

### Хромозомовые исследования при острых и хронических миелотических лейкозах

В то время как при острых лейкозах были обнаружены хромозомные аномалии, заключающиеся в изменении общего числа хромозом, при хроническом миелозе авторы отмечают хромозомные aberrации в виде изменений не только числа хромозом, но и их структуры. Авторы сообщают о новой хромозомной аномалии звездчатого типа, обусловленной ионизирующей радиацией. При этом установлено, что степень синтеза ДНК при хроническом миелозе в Филадельфийской хромозоме (Ph<sup>1</sup>-хромозоме) по сравнению с хромозомой группы 21 несколько снижено.

### Chromosome Studies in Acute and Chronic Myeloid Leukaemia

While in acute leucosis only numerical chromosome abnormalities have been found, partially due to factors involved in the method, we can also report on two cases of treated chronic myeloid leukaemia with numerous numerical aberrations, endoreduplication as well as structural abnormalities of chromosomes. Chromatid and chromosome breaks were found most frequently distal to the centromere. A new, radiation-induced complex chromosome abnormality of star pattern type is described. The rate of the DNA synthesis of the Ph<sup>1</sup>-chromosome appears to be reduced as compared with the group 21 chromosomes.

### Les études sur les chromosomes dans les leucémies myéloïde aiguë et chronique

Pendant que, dans la leucose aiguë on n'a trouvé que des anomalies numériques de chromosomes, dues partiellement à la méthode employée, on rapporte deux cas de myélomes chroniques traitées où l'on

a pu démontrer des aberrations numériques, l'endoréduplication, de même que de nombreuses anomalies structurales de chromosomes. Des fragmentations de chromatides et de chromosomes étaient les plus fréquentes distalement du centromère. On signale une nouvelle anomalie complexe de chromosomes, type d'étoile, produite par irradiation. Comparé aux chromosomes du groupe 21, le taux de synthèse d'ADN du chromosome Ph<sup>1</sup> serait réduit.