Optimalisatie van metafase-cytogenetica en array comperatieve genomische hybridisatie op immuunfenotypische plasmacelpopulaties

Ellen Dirkx

promotor : Prof. dr. Pieter STINISSEN dr. B. MAES

co-promotor : Dr. S. FRANKE



hasselt

universiteit

INHOUDSOPGAVE

1. INLEIDING	1
1.2 Multiple myeloma (MM)	3
1.2.1 Epidemiologie	3
1.2.2 Diagnose	3
1.3 Cytogenetisch/moleculaire technieken in de diagnostiek van MM	9
1.4 Chromosomale afwijkingen bij multiple myeloma	10
2. DOFL VAN HET ONDERZOEK	13
3 MATERIALEN EN METHODEN	14
3.1 Patiënten	14
3.2 Callin	14
3 3 Immunofenotynering	14
3.4 Sorteren van cellen	15
3.4 1 Drincing	15
3 5 Hot kwokon van oon blood- of boonmorgstaal	15
3.5 Het kwekell van een bloed- of beelmergstaal	16
2.7 Elugregoption in situ hybridistio (EISH)	10
2.7 Thus escentie in situ hybridisatie (FISH)	10
2.7.2 Filicipe vali FISH	10
3.7.2 FISH met painting probe	10
3.8 Divid isolatile.	1/
3.9 Proteinase K benandeling	1/
3.10 controle op de kwaliteit van het DNA	1/
3.10.1 Principe van de controle PCR	18
3.10.2 Controle PCR protocol	18
3.11 Array-CGH	18
3.11.1 Amplificatie van DNA met de Genomiphi V2 DNA Amplificatie kit	19
3.11.2 Amplificatie van DNA met de Bioscore screening and amplification kit	
(Enzolifesciences)	19
3.11.3 DNA labeling	19
3.11.4 Voorbereiding probemix en blockingreagentia	20
3.11.5 Posthybridisatie	20
4. RESULTATEN	22
4.1 Resultaten van de LP-1 cellijn	22
4.1.1 Optimalisatie kweek van de LP-1 cellijn	22
4.1.2 Optimalisatie metafase chromosoom preparatie van de LP-1 cellijn	22
4.1.3 Optimalisatie kweek van gesorteerde CD38/CD138+ cellen afkomstig van de LP-1	
cellijn	23
4.1.4 Optimalisatie metafase chromosoom preparatie van gesorteerde CD38+/CD138+ ce	llen
van de LP-1 cellijn	24
4.1.5 Karyotypering van de LP-1 cellijn	24
4.1.6 Metafase-fluorescentie in situ hybridisatie (mFISH)	25
4.1.7 Optimalisatie van DNA isolatie en amplificatie van de gesorteerde cellen	26
4.1.8 Controle PCR	27
4.1.9 Optimalisatie Array-CGH op gesorteerde en geamplificeerde cellen	27
4.2 Resultaten bekomen met stalen afkomstig van MM patiënten	33
4.2.1 Optimalisatie van de kweek van bloed- en beenmergstaal	33
4.2.2 Optimalisatie van de kweek van CD19+ gesorteerde cellen	33
4.2.3 Optimalisatie van de kweek van CD38/CD138+ gesorteerde cellen	34
4.2.4 Fluorescentie in situ hybridisatie (FISH)	
$4.2.5$ Chromosomale afwijkingen gedetecteerd hij CD56/ λ + cellen afkomstig van een MM	
± 2.5 Chroniosonnale arwijkingen gedeletteerd bij CDS0/A \pm tehen arkonistig van een min	36
patiënt	36
patiënt	36
 5. DISCUSSIE	36 36 38 42
 5. DISCUSSIE 6. CONCLUSIE 7. REFERENTIES 	36 36 38 42 43

LIJST MET AFKORTINGEN

Array-CGH	Array Comparatieve genomische hybridisatie	
APC	allophycocyanine	
β2-Μ	beta-2 microglobuline	
CGH	Comparatieve genomische hybridisatie	
DAPI	4,6-diamidino-2-fenylindol	
Del	deletie	
DOP-PCR	degenerate oligonucleutide primer-polymerase chain reaction	
FACS	fluorescence-activated cell sorter	
FCS	foetal calfserum	
FISH	fluorescence in situ hybridisatie	
FITC	fluorescein isothiocyanate	
GC	germinale centers	
Ig	immunoglobuline	
IEF	immunoelectroforese	
iFISH	interface fluorescene in situ hybridisatie	
IL-1β	interleukine- 1beta	
IL-6	interleukine 6	
К	карра	
LDH	lactaat dehydrogenase	
λ	lambda	
Mb	megabase	
MGG	May-Grünwald Giemsa	
MGUS	monoclonal gammopathy of undetermined significance	
mFISH	metafase fluorescence in situ hybridisatie	
MM	multiple myeloma	
PB	plasmablasten	
PBS	phosphate buffered saline	
PCR	polymerase chain reaction	
PE	phycoerythrin	
PeCy7	phycoerythrin-CY7	
PerCP	peridinyl chlorofylline	
PHA	lectin from Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin	
PWM	Pokeweed mitogen	
RBC	rode bloedcellen	
ТРА	tissue plasminogen activator	
VDJ-fragmenten	variabele-, diversiteits- en joiningfragmenten	

LIJST MET FIGUREN EN TABELLEN

Figuur 1:	Schematische voorstelling van de verschillende fasen van de B-cel ontwikkeling 2
Figuur 2:	Het elektroforetisch patroon van de serumproteïnen 5
Figuur 3:	Beenmerg aspiratie van een gezonde persoon en een MM patiënt 6
Figuur 4:	array-CGH21
Figuur 5:	Cellen in kweek van de LP-1 cellijn22
Figuur 6:	metafase van niet-gesorteerde cellijn23
Figuur 7:	Cellkweek van CD38/CD138 gesorteerde LP-1 cellijn24
Figuur 8:	Metafase van een cel van de cellijn LP-1 na sorteren en kweek24
Figuur 9:	Karyogram van de LP-1 cellijn25
Figuur 10:	Metafase chromosoom preparatie van de LP-1 cellijn26
Figuur 11:	Controle van niet-geamplificeerd DNA. 28
Figuur 12:	Controle van geamplificeerd DNA28
Figuur 13:	negatieve controle van niet-geamplificeerd DNA29
Figuur 14:	negatieve controle van geamplificeerd DNA negatieve
Figuur 15:	ArrayCGH van niet geamplificeerd DNA van de LP-1 cellijn30
Figuur 16:	ArrayCGH van geamplificeerd DNA van de LP-1 cellijn30
Figuur 17:	Array CGH van in cellwash CD38/CD138 gesorteerde en geamplificeerde cellen van
	de LP-1 cellijn
Figuur 18:	Array CGH van in cellfix CD38/CD138 gesorteerde en geamplificeerde cellen van de
	LP-1 cellijn
Figuur 20:	De array-CGH analyse bevestigt het resultaat gevonden met metafase FISH32
Figuur 21:	metafase chromosoom preparatie van normaal perifeer bloed
Figuur 22:	CD19+ gesorteerde cellen x100
Figuur 23:	MGG kleuring van beenmerguitstrijkje van de MM patiënt met 50% plasmocyten34
Figuur 24:	CD38/CD138+ gesorteerde cellen van MM patiënt met 50% plasmocyten35
Figuur 25:	Trypaan blauw kleuring van CD38/CD138+ gesorteerde cellen. x20035
Figuur 26:	metafase FISH van gesorteerde CD38/138+ cellen uit het beenmerg van een MM
	patiënt
Figuur 27:	CGH resultaat
Figuur 28:	array-CGH resultaat van MM patiënt37

Tabel 1:	Diagnostische criteria voor MM volgens Durie en Salmon	7
Tabel 2:	Diagnostische criteria voor MGUS, asymptomatische myeloom en symptomatische	
	myeloom volgens de internationale myeloom werkingsgroep	7
Tabel 3:	Durie/ Salmon staging systeem versus ISS	8

DANKWOORD

Graag zou ik een woord van dank richten tot alle mensen die mij gesteund en geholpen hebben om deze thesis tot een goed einde te brengen.

Als eerste wil ik mijn promotor Dr. Brigitte Maes en co-promotor Dr. Sabine Franke bedanken voor de kans die ik heb gekregen om mijn stage in het Virga Jesseziekenhuis te kunnen doen. Hun inzet voor deze stage en dit eindwerk tot een goed einde te brengen zal ik nooit vergeten.

Ook wil ik mijn interne promotor Prof. Dr. Piet Stinissen bedanken. Hij heeft er voor gezorgd dat alles op administratief gebied altijd geregeld was zodat ik en mijn medestudenten ons helemaal konden concentreren op het onderzoek. Ook dank ik Prof. Dr. Iwona Krajewska en het Centrum voor menselijke erfelijkheid te Gasthuisberg in Leuven voor de begeleiding en het materiaal dat ik ginder mocht gebruiken.

Alle medewerkers van het klinisch laboratorium in het Virga Jesseziekenhuis wil ik ook bedanken. Ze stonden steeds met raad en daad oor me klaar als iets me niet duidelijk was. In het bijzonder wil ik iedereen van het labo experimentele hematologie en het centrum voor moleculaire diagnostiek bedanken. Bedankt Hanne, Karen en Remco voor de hulp bij het werken met de FACSAria® en me héél veel bij te brengen over flowcytometrie. Tevens wil ik Remco ook bedanken voor het aanleren van de celkweektechnieken. Ook Marijke, An, Rita, Lieve en Miet die eveneens altijd voor mij klaar stonden wil ik via deze weg bedanken.

Dit is ook een mooie gelegenheid om mensen te bedanken die me zeer nauw aan het hart liggen. Als eerste zijn er mijn ouders, broer en familie die ik niet genoeg kan bedanken omdat ze mij de kans hebben gegeven om deze opleiding 4 jaar geleden te kunnen starten en die me gedurende deze periode fantastisch gesteund hebben.

Ook Ben, mijn vriend, heeft me gedurende de tijd dat we elkaar kennen heel hard gesteund. Hij stond altijd voor me klaar en wist me te motiveren bij een tegenslag.

SAMENVATTING

Multipel myeloma (MM) is een kwaadaardige plasma cel aandoening gekarakteriseerd door de accumulatie van terminaal gedifferentieerde klonale plasmacellen in het beenmerg, met productie van een monokonaal immuunglobuline of M-component.

Tot nu toe is er naast de deletie van 13q, 17p t(4;14) en t(11;14) nog niet veel gekend over chromosomale afwijkingen bij het MM. De reden hiervoor zijn de lage proliferatie van de plasmacellen als ook het lage percentage plasmacellen in het beenmerg waardoor het kweken van plasmocyten een extra moeilijkheid met zich meebrengt. Moleculaire en genetische technieken hebben dan bij MM ook weinig succes. Een nieuwe detectiestrategie is nodig om dit probleem te voorkomen. Daarom werd er in dit project het protocol geoptimaliseerd voor flowcytometrie met behulp van de FACSAria®, cell sorting in combinatie met celkweek, metafase chromosoom preparatie, FISH en array-CGH.

Het protocol voor het sorteren van de plasmacellen vereist een strikte optimalisatie met steriele condities die niet letaal of schadelijk mogen zijn voor de cellen, zodat de sortering de kweek van plasmacellen toelaat en waarbij het DNA intact blijft voor het uitvoeren van andere technieken zoals array-CGH, en PCR. Door het aanrijken van de plasmacellen door 'cell sorting' worden de problemen die interfereren met andere moleculaire en genetische technieken in MM omzeild.

Met dit onderzoek werd aangetoond dat door het toepassen van cell sorting met behulp van de FACSAria® een zuivere plasmacelsuspensie bekomen wordt die kan gebruikt worden voor allerhande verdere (genetische) technieken zoals celkweek, FISH, PCR en array-CGH.

De kweekcondities en preparatie van metafase chromosomen voor de zuiver gesorteerde plasmocyten werd eerst geoptimaliseerd op basis van de morfologie en het aantal metafases verkregen na het prepareren van metafase chromosomen op de gekweekte bloed- en beenmergstalen van MM patiënten waarbij verschillende parameters werden uitgetest. Nadien werd de optimalisatie op gesorteerde CD38/CD138+ cellen van de LP-1 cellijn uitgevoerd vooraleer zuiver gesorteerde plasmocyten afkomstig uit het beenmerg van MM patiënten in kweek werden gebracht en waarvan metafase chromosoom preparaten bekomen werden.

Array CGH werd geoptimaliseerd door gebruik te maken van DNA van de LP-1 cellijn, waarvan het karyotype gekend was, en nadien ook toegepast op DNA afkomstig van MM patiënten.

Door de optimalisatie van deze technieken op gesorteerde cellen, is het mogelijk om zuiver monoklonale/aberrante plasmacel populaties op chromosomale afwijkingen te screenen (karyotypering, metafase-FISH en array-CGH), als ook specifieke afwijkingen te detecteren (interfase FISH, PCR).

Bovendien biedt deze unieke techniekencombinatie de mogelijkheid om nieuwe chromosomale afwijkingen te detecteren die voor een verbetering zullen zorgen bij het stellen van de diagnose en prognose en een beter inzicht geven in de pathogenese bij MM patiënten.

1. INLEIDING

Multiple myeloma (MM) is een kwaadaardige monoklonale proliferatie van plasmacellen in het beenmerg. Plasmacellen zijn terminaal gedifferentieerde B-cellen en staan in voor de productie van antistoffen of immunoglobulines (Ig's). Vandaar is MM ook voornamelijk gekarakteriseerd door de aanwezigheid van een monoklonaal immunoglobine (Ig) of Ig fragment in het serum of de urine. En overvloedige aanwezigheid van monotypische plasmacellen in het beenmerg verlaagt de normale serum Ig levels en multifocale beenmergaantastingen (1).

1.1 B cel differentiatie en de expressie van immunoglobuline ketens.

B cel ontwikkeling is afhankelijk van de nonlymfoïde stromale cellen van het beenmerg. De stroma is dus een nodige ondersteuning voor de ontwikkeling van B cellen. Allereerst vormen de stromale cellen specifiek adhesief contact met de B cellen door de interactie tussen celadhesiemoleculen en hun liganden. Daarna zullen de stromale cellen groeifactoren produceren die de differentiatie en proliferatie van de lymfocyten stimuleren.

Tijdens de maturatie zullen de B cellen migreren in het beenmerg terwijl ze in contact blijven met de stromale cellen. De vroegste stamcellen liggen in het subendosteum, tegen het binnenste beenoppervlak. Bij het vorderen van de maturatie zullen de B cellen meer naar de centrale axis van de beenmergholte bewegen. Latere stadia van de maturatie worden minder afhankelijk van het contact met stromale cellen. De finale fases van de ontwikkeling van immature naar mature B cellen gebeurt in de secundaire lymfoide organen zoals de milt en lymfeklieren. Daar ondergaan de rijpe B cellen een affiniteitsmaturatie na contact met een antigen, waarna ze verder uitgroeien tot enerzijds geheugen B cellen en anderzijds plasmacellen.

De fases in de primaire B cel ontwikkeling zijn bepaald door het sequentiële rearrangement en de expressie van zware en lichte keten immunoglobine genen. De classificatie van de B cellen in verschillende ontwikkelingsfases is gebaseerd op het feit of er expressie is van zowel de lichte ketens als de zware immunoglobuline ketens, de zware immunoglobuline keten alleen, of geen expressie van de immunoglobuline ketens. De B-celontwikkeling wordt dus gekenmerkt door de graduele assemblage van een functioneel Ig (figuur 1). Een Ig is opgebouwd uit twee zware ketens, waarvan vijf verschillende isotypes bestaan (A, G, D, M of E) en twee lichte ketens (kappa (κ) of lambda (λ)). De vroegste B cellen worden pro-B cellen genoemd en stammen af van pluripotente hematopoëtische stamcellen. Bij deze pro-B cellen gebeurt het rearrangement van de immunoglobuline zware keten locus. Het koppelen van D_{H} (diversiteitsfragment) aan J_{H} (joiningsfragment) in de vroege pro-B cel fase wordt gevolgd door de joining van V_{H} (variabele fragment) aan DJ_H in de late pro-B cel fase. Productieve VDJ_H koppeling leidt tot de expressie van een intacte μ zware keten, welk het kenmerk is van de volgende ontwikkelingsfase, de pre-B cel fase. De μ zware keten wordt samen met een lichte keten tot expressie gebracht. Wanneer een lichte keten gen wordt geassembleerd zodat er een compleet IgM molecule tot expressie komt op het celoppervlak, spreekt men van een immature B cel. De gehele ontwikkeling tot nu toe beschreven, gebeurt in het beenmerg en is onafhankelijk van antigenen. Hierna zullen immature B cellen een selectie voor zelftolerantie ondergaan voor het kunnen overleven in de perifere lymfoïde

weefsels. B cellen die kunnen overleven in de periferie ondergaan verdere differentiatie en worden rijpe B cellen die IgD tot expressie brengen in plaats van IgM. Vervolgens zullen deze naïeve B

cellen recirculeren door de perifere lymfoïde weefsels tot op het moment dat ze hun specifiek antigen tegenkomen en geactiveerd worden (2).



Figuur 1: Schematische voorstelling van de verschillende fasen van de B-cel ontwikkeling. De hematopoiëtische stamcel differentieert in het beenmerg via verschillende tussenstappen tot een immature B-cel. De opeenvolgende fasen zijn gekenmerkt door verschillende stappen in de VDJ-recombinatie van Ig-zware keten en lichte keten genen. De immature B-cel brengt het membraangebonden immunoglobuline M (IgM) tot expressie. Door een proces van alternatieve mRNA splicing zal ook IgD tot expressie komen en ontstaat de rijpe B-cel. De rijpe B-cel migreert via de sinusoïden uit het beenmerg en komt via het bloed in de perifere, secundaire lymfoïde organen terecht (milt en lymfeklieren). Op dat moment is de rijpe B-cel nog niet in contact gekomen met een antigeen en wordt daarom een rijpe "naïve" B-cel genoemd. Ter hoogte van de perifere, secundaire lymfoïde organen grijpen er na contact met een antigen complexe processen plaats die leiden tot een affiniteitsmaturatie van de B-cel, selectie van de B-cellen met hoge specificiteit voor de betrokken antigenen en een veranderde effector functie. Deze processen betreffen vooral: somatische hypermutatie van de V genen, resulterend in een hypervariabiliteit, positieve selectie van hoog-gevoelige B-cellen, apoptose van niet functionele B-cellen en "isotype class switching" waardoor expressie van IgD en IgM wijzigt naar IgG, IgA of IgE. Uiteindelijk kan de geactiveerde B-cel verder differentiëren in ofwel een Ig-secreterende plasmacel ofwel een geheugencel (3).

De meeste B cel aandoeningen ontstaan uit germinale centers (GC) of post-GC B cellen die gemodificeerde Ig genen bevatten door sequentiële rondes van somatische hypermutaties, antigen selectie en soms ook IgH switch recombinatie. Deze twee B cel specifieke DNA modificatie processen, welke voornamelijk in de GC B cellen gebeuren veroorzaken hoofdzakelijk V(D)J en switch sequenties in Ig genen maar ze kunnen ook mutaties of dubbelstrengige DNA breuken veroorzaken in of nabij niet-Ig genen, zoals oncogenen. Post-GC B cellen kunnen plasmablasten (PB) genereren die somatische hypermutaties, antigen selectie en IgH switching succesvol beëindigd hebben. Deze PB's migreren naar het beenmerg (BM) waar de stromale cellen de terminale differentiatie in lang levende plasmacellen vergemakkelijken. Pre-GC B cellen kunnen

een exclusief monoklonale post-GC aandoening die fenotypische kenmerken vertoont van plasmoblasten en lang levende plasmacellen en is meestal verdeeld over verschillende plaatsen in het beenmerg. De variabele regio's van Ig genen in MM tumoren zijn extensief gemuteerd met een mutatiepatroon van herhalende rondes somatische hypermutaties en antigen selectie. Een klonale plasmacel moet al expanderen tot 10⁹ cellen voordat het genoeg Ig produceert voor de herkenning als monoklonaal Ig (M-Ig) door serum electroforesis of als monoklonaal Ig lichte keten (M-IgL) door urine electroforesis voor die 15% van de MM aandoeningen die enkel IgL tot expressie brengen.

Vele B cel aandoeningen hebben chromosomale translocaties waarbij de IgH locus (14q32) betrokken is of één van de IgL loci (kappa; 2p12 en lambda; 22q11). De consequentie van deze translocaties is disregulatie of verhoogde expressie van een oncogen dat gelegen is vlakbij één of meerdere Ig enhancers. Translocaties die een IgH switch regio bevatten, dissociëren de intronische en 3' IgH enhancers zodat een oncogen kan gejuxtaposeerd worden aan een IgH enhancer op elk van de derivaat chromosomen (4-5).

1.2 Multiple myeloma (MM)

Multiple myeloma is geassocieerd met een constellatie van ziekte verschijnselen, inclusief osteolytische lesies door het ontkoppelde metabolisme van de beenderen, anemie en immuunsuppressie door het verlies van normale hematopoëtische stamcel functies en schade van de organen door de secretie van monoklonaal immunoglobuline (Ig).

Vaak wordt MM voorafgegaan door een premaligne aandoening, 'monoclonal gammopathy of undertermined significance' (MGUS) genaamd. MGUS wordt gekenmerkt door een proportie van plasmocytenprecentage van minder dab 10% in het beenmerg. Het risico dat personen met MGUS progressie maken naar MM, amyloidose of een andere B-cel lymfoproliferatieve ziekte is 1% op jaarbasis. Echter zijn de genetische en moleculaire mechanismen geassocieerd met de transitie van MGUS naar MM nog steeds onbeken (6).

1.2.1 Epidemiologie

Multiple myeloma maakt voor 10% deel uit van alle hematologische kwaadaardigheden, met een incidentie van 5/100 000. Dat maakt MM de meest prevalente bloedkanker op Non-Hodgkin's lymfoma na. De gemiddelde leeftijd bij diagnose is 70 jaar en slechts 3,4% van de mensen krijgen de aandoening tussen 35 en 44 jaar. Patiënten waarbij MM is vastgesteld overleven van enkele maanden tot verschillende jaren, hoewel het laatste waar is voor slechts 5% van de gevallen (7-10). Zonder behandeling is de overlevingskans bij MM lager dan 2 jaar. Patiënten zullen uiteindelijk bezwijken door renaal falen, ernstige anemie, infecties of secundaire complicaties door neurologische problemen (11).

1.2.2 Diagnose

De diagnose van MM wordt gesteld op basis van de klinische symptomen en laboratoriumanalyses uitgevoerd op perifeer bloed, urine- en beenmergstalen en medische beeldvorming.

1.2.2.2 Klinische kenmerken

Eén van de meest voorkomende kenmerken bij MM zijn multifocale destructieve botlesies over het hele skelet. De focale lesies beginnen meestal in de medulaire holte, dit erodeert dan naar het poreuze bot en zal zo verder het corticale bot vernietigen. De botresorptie is het resultaat van de secretie van bepaalde cytokines (IL-1^β, TNF, IL-6) door myeloma cellen. Deze cytokines bevorderen de osteoclast formatie en activatie door de RANK ligand-RANK pathway. Plasmacel lesies veroorzaken meestal pathologische fracturen. Dit komt het meeste voor in de ruggenwervel, maar kan eender welk bot affecteren dat leidt aan erosie en afbraak van zijn corticale substanties. Wanneer de aandoening progressie maakt kunnen plasmacel infiltraties van zachte weefsels zich voordoen zoals van de milt, lever, nieren, longen, lymfeknopen. Ook botpijn resulterend van de infiltratie door neoplastische plasmacellen komt vaak voor. Pathologische fracturen en hypercalcemie komen voor bij focale botafbraak en diffusie resorptie. Hypercalcemie kan leiden tot neurologische manifestaties zoals verwardheid en lethargie, bovendien kan het ook renaal falen veroorzaken. Myeloma nefrosis is een ander kenmerk van MM. Interstitiële infiltraten van abnormale plasmacellen veroorzaken schade aan de nieren waardoor er proteïne in de urine komt. Ook metastatische calcificatie kan zich voordoen in de nieren omwille van de hypercalcemie die veroorzaakt wordt door de bot resorptie. Wanneer dit samengaat met amyloïdose zullen er glomulaire lesies gevormd worden (12).

Verdere progressie van MM is geassocieerd met stijgende ernstige secundaire kenmerken zoals lytische bot aandoeningen, anemie, immunodeficiëntie en renaal falen en bij sommige patiënten zal de tumor woekeren naar extramedullaire locaties. Extramedullaire MM is een meer agressieve tumor die primaire of secundaire plasma cel leukemie wordt genoemd (4).

1.2.2.3 Bloed en urine testen

Met een complete bloedtelling kan het aantal erytrocyten, leukocyten en bloedplaatjes in het bloed achterhaald worden. Tevens ook de relatieve proportie van de verschillende types witte bloedcellen, om te kunnen nagaan of de hoeveelheid van deze cellen buiten de normale waarden is.

Vervolgens kan er een chemisch profile worden gemaakt van verschillende bloedcomponenten zoals albumine, ureum, calcium, creatinine en lactaat dehydrogenase (LDH). Verhoogde levels van ureum en creatinine duiden op een verminderde nierfunctie, terwijl verhoogde LDH levels in het bloed wijzen op weefselschade en dient om de tumor massa te beoordelen.

Andere markers zijn:

Serum levels van beta-2 microglobuline (β 2-M) welke de tumormassa reflecteert,

C-reactief proteïne, wat geproduceerd wordt door de lever wanneer er inflammatie plaatsvindt in het lichaam, en welke hetzelfde patroon volgt van stijgende of dalende levels IL-6 (een groeifactor voor myeloma cellen),

Kwantitatieve immunoglobulines (QIGs) welke de levels van verschillende types antilichamen (IgG, IgA, IgM) meet.

Met behulp van electroforese kunnen de levels van verschillende proteïnen in het bloed of urine gemeten worden. Een serum of urine staal wordt op de electroforesegel gepipetteerd. Wanneer er een stroom op de gel wordt aangebracht, zullen de proteïnen beginnen te bewegen naar verschillende punten op de gel. Bij het kleuren en analyseren van de gel zullen de abnormale antilichaam proteïnen verschijnen als een piek, omdat de molecules van M proteïnen identiek in grootte zijn en vandaar dus allemaal verzameld zijn op de gel in hetzelfde punt (figuur 2). Myeloma wordt gekarakteriseerd door een grote stijging van het M proteïne, welke dus als een piek verschijnen met electroforese, terwijl bij normale individuen deze piek veel lager en breder is. Met behulp van urine electroforese kunnen Bence Jones proteïnen gedetecteerd worden (13-14)



Serum Protein Electrophoresis

Figuur 2: Het elektroforetisch patroon van de serumproteïnen. Patiënten met MM vertonen een piek in de a2, β of γ regio's bij toepassing van serum proteïne electroforese (14).

Een additionele test, de immunofixatie of immunoelectroforese (IEF), wordt uitgevoerd om meer specifieke informatie te bekomen over het type abnormaal antilichaam proteïne dat aanwezig is. Het bestuderen van veranderingen en proporties van verschillende proteïnen en vooral het M proteïne, helpt de progressie van myeloma en de respons op de behandeling te beoordelen.[5, 6] Wanneer er echter sprake is van een vorm van MM waarbij de cellen geen paraproteïne uitscheiden, is het cytologisch onderzoek de enige manier om de diagnose met zekerheid vast te stellen. Benadrukt dient te worden dat ook het immunocytologisch onderzoek tot nu toe niet voorziet in duidelijke criteria voor het onderscheid tussen MM en MGUS.

1.2.2.4 Cytologisch onderzoek van het beenmerg

Met behulp van beenmerg aspiratie of biopsie kan een stijging van het aantal plasmacellen in het beenmerg waargenomen worden. Cytologisch onderzoek met microscopie van een uitgestreken beenmergaspiraat (figuur 3) kan voldoende zijn om de diagnose te bevestigen. Dit is met name wanneer er meer dan 10% plasmocyten aanwezig zijn, veelal met aberrante cytologische kenmerken (13).



Figuur 3: Beenmerg aspiratie van een gezonde persoon en een MM patiënt: In het beenmerg van de gezonde persoon (a) is de plasmacel aangeduid door een pijl. Het beenmerg van de MM patiënt (b) is massief geïnvadeerd door (aberrante) plasmacellen.

1.2.2.5 Immunofenotypering in het beenmerg

Bij MM zijn er monoklonale plasmacellen aantoonbaar in het beenmerg. Alleen in het cytoplasma is er monoklonaal Ig aantoonbaar, meestal IgG of IgA. Voor de plasmacellen zijn de belangrijkste specifieke antigenen of markers CD138, CD38, de zware en lichte keten Ig, alsook CD56. De plasmacelmerker CD138 herkent het molecule CD138 op het membraan van zowel normale als kwaadaardige plasmacellen. Het CD38 antigeen komt voor op tal van hematopoëtische cellen, maar de CD38 intensiteit op plasmacellen is echter zo uniek hoog dat het in combinatie met CD138 de plasmocyten kan onderscheiden van de andere hematopoëtische cellen in het beenmerg. Hier zal gebruikmakend van de fluorescence-activated cell sorter (FACSAria®) flowcytometer de plasmocytenpopulatie geïdentificeerd en gesorteerd worden door de cellen te labelen met CD38 en CD138. Verder kan de expressie van CD56 ook nog worden nagegaan. CD56 is een specifieke marker voor maligne plasmacellen en komt dus niet tot expressie in normale plasmacellen. Indien CD56 niet tot expressie komt wijst dit meestal op een osteolysis, vandaar dat patiënten met CD56-MM minder osteolytische lesies hebben. CD56 is een adhesiemolecule dat instaat voor homotypische interacties tussen myeloma cellen zelf of met osteoblastische cellen. CD56- myeloma cellen lijken minder toxisch voor osteoblasten en is geassocieerd met het lambda isotype. CD56 komt zeer frequent tot overexpressie in het beenmerg maar veel minder in het extramedulaire bloed (15).

1.2.2.6 Medische beeldvorming: aantonen van osteolytische letsels

Met behulp van verschillende medische beeldvormingstechnieken (RX-radiografie, computer tomografie, botdensitometrie) kunnen botletsels, breuken en samengedrukte wervels gevisualiseerd worden, welke bij MM belangrijke diagnostische verschijnselen vormen. Verder kan ook de mate van botafbraak en de densiteit van de botten nagegaan worden.

Na het uitvoeren van klinisch onderzoek en laboratoriumtesten, kan de diagnose gesteld worden. Om de diagnose voor MM te kunnen stellen, dient een patiënt aan de volgende voorwaarden te voldoen. De patiënt moet minimaal 1 major en 1 minor criterium hebben of 3 minor criteria met tenminste 10% plasmacellen in het beenmerg en een M-component in het serum aanwezig (tabel 1) (18).

Tabel 1: Diagnostische	e criteria voor	MM volgens I	Durie en Salmon	(16,19)
------------------------	-----------------	--------------	-----------------	---------

Minor criterium	 Plasmacytose in beenmerg (10-30% kernhoudende cellen in beenmerg)* 				
	- M-component: in serum: IgG < 35g/l, IgA < 20g/l				
	in urine: > 1g/24h Bence-Jones eiwit (lichte keten				
	uitscheiding)				
- Gereduceerde serum concentratie van immunoglobulinen (<50					
	normaal): IgG < 6g/l, IgA < 1g/l en IgM < 0,5g/l				
	- Lytische botlesies				
Major criterium	- plasmocytoom in weefselbiopt				
	 plasmocytose in het beenmerg (>30%)* M-component: in serum: IgG > 35g/l, IgA > 20g/l 				
	in urine: > 1g/24h Bence-Jones eiwit (lichte keten				
	uitscheiding)				

*percentage vastgesteld op basis van cytomorfologisch beenmerg onderzoek

1.2.2.7 Classificatie

Na het stellen van de diagnose kunnen patiënten worden geclassificeerd in één van de drie myeloma categorieën: MGUS, asymptomatische en symptomatische MM (tabel 2). De scheiding tussen de verschillende vormen wordt gemaakt op basis van de concentratie van de serum M-component, het percentage plasmacellen dat in het beenmerg aanwezig is en de aan- of afwezigheid van tekenen van myeloom-gerelateerde orgaan- of weefselbeschadiging.

Tabel 2: Diagnostische criteria voor MGUS, asymptomatische myeloom en symptomatische myeloom volgens de internationale myeloom werkingsgroep, 2003 (20-23).

MGUS

- M-eiwit in serum <30g/l

- Klonale plasmacellen in beenmerg <10% en laag niveau van plasmacel infiltratie in een borboorbiopsie

(als deze uitgevoerd werd)

- Geen myeloom-gerelateerde orgaan of weefsel beschadigingen (inclusief botletstels) of symptomen

- Geen bewijs van andere B-cel proliferatieve aandoeningen of lichte keten geassocieerde amyloïdose of

andere lichte keten, zware keten of immunoglobuline geassocieerde weefsel beschadiging

Asymptomatische myeloom

- M-eiwit in serum >30g/l en/of
- Klonale plasmacellen in het beenmerg >10%

Geen myeloom-gerelateerde orgaan of weefsel beschadigingen (incusief botletsels) of symptomen

Plasmacel myeloom

- M-eiwit in serum en/of urine
- Klonale plasmacellen in beenmerg of aangetoonde plasmacytoma in beenmergbiopsie
- Myeloom-gerelateerde orgaan of weefsel beschadiging (inclusief botletsels)

1.2.2.8 Prognose van multiple myeloma

Omwille van de grote verscheidenheid in overlevingstijd voor patiënten met MM was het noodzakelijk om een stadia systeem te ontwikkelen met prognostische reliabiliteit. Ook is MM opdelen in stadia cruciaal voor een effectieve behandeling.

Het klinische stadia systeem van Durie en Salmon is het meest gebruikte stadia systeem dat wordt gebruikt om de overlevingskans te bepalen en correleert de voorkomende kenmerken van een MM patiënt met de bepaalde myeloma cel massa (16) (tabel 3). Dit systeem deelt MM op in drie tumor stadia: stadium I (laag), II (gemiddeld) en III (hoog). De klinische stadia van de ziekte zijn gebaseerd op levels van het M proteïne, het aantal lytische botlesies, de hemoblobine waardes en serum calcium levels. Subclassificaties A en B wijzen op relatief normale of abnormale renale functie (gedefinieerd als serum creatinine van minder dan 2 mg/dL) als een bijkomende prognostische factor (17).

Sinds enkele jaren is er een nieuw, meer kostendrukkend alternatief systeem, het international staging system (ISS). ISS is gebaseerd op de beoordeling van twee bloed test resultaten, beta 2-microglobuline en albumine (tabel 3). Het ISS is meer sensitief in het onderscheiden van de drie stadia van MM (13).

Durie-Salmon Criteria		ISS Criteria
All of the following: 1. Hemoglobin value >10	g/dL	β_2 -M < 3.5 mg/dL and albumin \geq 3.5 g/dL
 Serum calcium value no mg/dL 	ormal or ≤12	
 Bone x-ray, normal bor (scale 0) or solitary bor plasmacytoma only 	e structure e	
 Low M-component prod IgG value <5 g/dL; IgA 	uction rate — value <3 g/dL	
Bence Jones protein <4 g/24 h		
Neither stage I nor stage III		Neither stage I nor stage III
On or more of the following:		β_2 -M \geq 5.5 mg/dL
1. Hemoglobin value <8.5	g/dL	
2. Serum calcium value >	12 mg/dL	
3. Advanced lytic bone les	ions (scale 3)	
 High M-component prod IgG value >7 g/dL; IgA — Bence Jones protein 	luction rate — value >5 g/dL >12 g/24 h	
ub classifications (either A or B) atining value 22	0 mg/dl
nal function (serum creatinine)	value $\geq 2.0 \text{ mg/d}$	L
	 Durie-Salmon Crit All of the following: Hemoglobin value >10 Serum calcium value nomg/dL Bone x-ray, normal bon (scale 0) or solitary bor plasmacytoma only Low M-component prod IgG value <5 g/dL; IgA Bence Jones protein <4 g/24 h Neither stage I nor stage III On or more of the following: Hemoglobin value <8.5 Serum calcium value >: Advanced lytic bone les High M-component prod IgG value >7 g/dL; IgA by classifications (either A or B bornal renal function (serum creatinine value >: 	Durie-Salmon Criteria All of the following: 1. Hemoglobin value >10 g/dL 2. Serum calcium value normal or ≤12 mg/dL 3. Bone x-ray, normal bone structure (scale 0) or solitary bone plasmacytoma only 4. Low M-component production rate — IgG value <5 g/dL; IgA value <3 g/dL

Tabel 3: Durie/ Salmon staging systeem versus ISS (13)

1.3 Cytogenetisch/moleculaire technieken in de diagnostiek van MM

De pathogenese van MM is nog steeds onduidelijk. Dit kan deels verklaard worden door de moeilijkheden die er zijn om met conventionele cytogenetica en FISH chromosomale afwijkingen in de plasmocyten uit het beenmerg op te sporen. Zowel cytogenetica als FISH worden in de meeste onderzoeken uitgevoerd op alle witte bloedcellen, zonder onderscheid te maken tussen plasmacellen en andere witte bloedcellen. Dit zorgt ervoor dat de sensitiviteit van de genetische testen niet altijd hoog genoeg is om cellen met chromosomale afwijkingen in MM-patiënten te detecteren.

Over de genetische en moleculaire pathogenese van MM is nog maar weinig geweten. Dit omwille van het feit dat plasmocyten een zeer lage proliferatie kennen, waardoor de cytogenetische analyse enkel succesvol is in 30-50% van MM patiënten en slechts zelden bij MGUS patiënten door het lage percentage plasmocyten (42). In de meeste gevallen resulteert conventionele cytogenetica in het verkrijgen van een karyotype van normale cellen of zelfs geen metafasen. De techniek van conventionele cytogenetica is een screening waarbij er naar abnormaliteiten in het karyotype wordt gekeken. Hiervoor is celkweek nodig, wat voor MM een barrière vormt.

Grote translocaties kunnen gedetecteerd worden met CC maar kleine gebalanceerde translocaties zijn moeilijk op te sporen. Door detectie van chromosomale afwijkingen kunnen de patiënten geclassificeerd worden in specifieke ploïdie categorieën. Informatie over het karyotype is echter wel betrouwbaar voor het detecteren van chromosoom 13 abnormaliteiten zoals interstitiële deletie en monosomie (24-31).

Andere technieken hebben ook beperkingen bij het toepassen op beenmerg van MM patiënten. Comparatieve genomische hybridisatie (CGH) en array-CGH kan gebruikt worden voor de detectie van verliezen en winsten in DNA maar niet voor structurele abnormaliteiten. CGH en array-CGH vereisen ten opzicht van CC wel geen metafases en daarmee geen celkweek maar deze technieken kunnen alleen succesvol toegepast worden als minstens 50% van de cellen van het staal de afwijking hebben (32-35). Daarmee zijn deze technieken niet geschikt voor de detectie van chromosomale afwijkingen rechtstreeks op het beenmerg van MM patiënten. Het is dus niet evident om nieuwe chromosomale afwijkingen in het beenmerg te vinden bij MM met de tot nu toe bestaande technieken. Daarom zijn strategieën vereist die de plasmocyten populatie aanrijken.

Interfase FISH rechtstreeks op een vol beenmergstaal heeft ook Interfase FISH kan specifieke afwijkingen onderzoeken waarvoor geen delende cellen vereist zijn, maar het percentage van plasmacellen in een beenmergstaal bij MM is vaak te laag om eventuele afwijkingen in plasmocyten te detecteren tussen alle andere cellen van het beenmerg. Interfase FISH wordt toegepast voor het bestuderen van trisomieën, monosomieën en translocaties die betrekking hebben op de IgH locus. Bovendien speelt interfase FISH ook een belangrijke rol in het diagnostisch en therapeutisch beleid en wordt in de routine diagnostiek gebruikt voor het detecteren van tot nu toe bekende chromosomale afwijkingen. Bij het bestuderen van chromosomale afwijkingen wordt interfase FISH klassiek uitgevoerd door gebruik te maken van een plasmocyten membraankleuring. Dit is meestal een simultane fluorescente immunologische kleuring van de celmembraan van de plasmacellen met behulp van tegen Ig-lichte keten gerichte monoklonale antilichamen (FICTION). Plasmacelverrijkende technieken zoals de isolatie van plasmacellen met behulp van CD138microbeads of met flow-cytometrie en sorteren op de FACS Aria bieden de mogelijkheid om met interfase FISH enkel de plasmacellen te analyseren. Door de selectieve analyse van plasmocyten worden er bij respectievelijk 45% (simultane kleuring) en 92% (vooraf sortering van plasmocyten) van de MM patiënten een abnormaal karyotype gedetecteerd met behulp van interfase FISH.

Met behulp van *flowsorting* met de FACSAria® kunnen alle aberrante plasmacellen zeer selectief uit een beenmergstaal geïsoleerd worden. Sorteren met de FACSAria® geeft een meer zuivere populatie dan sorteren met magnetic beads.

Ondertussen speelt interfase FISH in combinatie met membraankleuring of cell sortering ook een belangrijke rol in het diagnostisch en therapeutisch beleid en wordt in routine gebruikt voor het detecteren van tot nu toe bekende chromosomale afwijkingen zoals deletie 13, t(4;14), t(11;14) en t(14;16) als ook het ploïdie-level van de cellen.

1.4 Chromosomale afwijkingen bij multiple myeloma

Omwille van het feit dat plasmocyten een lage proliferatiesnelheid kennen en moeilijk in cultuur te brengen zijn, is er nog maar weinig gekend over de chromosomale afwijkingen bij MM. De chromosomale afwijkingen die in de routine worden toegepast om een diagnose/prognose te stellen bij vermoedelijke MM patiënten zijn: del(13), t(4;14)(p16.3;q32), t(11;14)(q13;q32), t(14;16)(q32;q23) en ploïdie level. Er bestaat tot nu toe nog geen screeningstechniek om andere tot nu toe onbekende maar toch belangrijke afwijkingen te detecteren.

1.4.1 Afwijkingen in chromosoom 13

Eén van de karakteristieke numerieke abnormaliteiten voor MM is del(13). Del(13) komt bij gemiddeld 50% van de patiënten met een abnormaal karyotype voor en is detecteerbaar in 10-20% van het totale aantal patiënten met behulp van CC en in 50% van de patiënten met behulp van iFISH (43-44).

Verschillende bewijsstukken tonen aan dat del(13) niet enkel een marker is van een hypodiploïde variant op MM maar dat del(13) unieke biologische kenmerken verleend aan de cellen, wat hun klonale expansie bevordert.

Onafhankelijk van de behandeling of detectiemethode, wordt del(13) geassocieerd met een kortere overlevingskans en een kleinere respons op een behandeling. Het netto effect van del(13) op de prognose, wanneer del(13) exclusief wordt gezien als een prognostische factor, is echter groter wanneer del(13) gedetecteerd wordt met karyotypering dan wanneer het gedetecteerd wordt met iFISH (45-47). De retrospectieve vergelijking tussen de data gepubliceerd door The Eastern Cooperative Oncology Group en The Intergroupe Francophone du Myelome suggereert dat het netto benefit van een hoge dosis chemotherapie veel groter is voor patiënten die geen del(13) hebben (48).

1.4.2 Translocaties betrokken bij de immunoglobuline locus

Studies die gebruik maakten van de FISH techniek hebben kunnen aantonen dat IgH translocaties detectabel zijn in 55-70% van alle MM patiënten. Er is een grote diversiteit gekend in de chromosomale loci betrokken bij de immunoglobuline translocaties bij MM. Volgende loci

(oncogenen) zijn betrokken in MM tumoren: 4p16 (FGFR3 en MMSET), 6p21 (cycline D3), 8q24 (c-myc), 11q13 (cycline D1), ,16q23 (c-maf),. Andere betrokken loci zoals 20q11 (maf-B) en 6p25 (IRF-4/MUM-1) komen minder frequent voor en zijn nog niet optimaal gekarakteriseerd in grotere studies. Voor de detectie van t(4;14), t(11;14) en t(14;16) kunnen commerciële fusion FISH probes gebruikt worden. Bij deze methode worden probes voor bepaalde chromosomen gecohybridiseerd met andere probes die hechten aande locus 14q32 (35-41). De fusie van deze probes duidt op een translocatie.

<u>1.4.2.1 t(11;14)(q13;q32)</u>

De t(11;14)(q13;q32) is aanwezig in 15% tot 20% van de patiënten. Deze translocatie juxtaposeert CD1 bij de IgH enhancer, wat leidt tot de upregulatie van cycline D1. De t(11;14)(q13;q32) kan gedetecteerd worden met karyotypering, metafase- en iinterfase FISH (37,42). De biologische consequenties van t(11;14)(q13;q32) zijn nog niet gekend, hoewel wel werd aangetoond dat de kwaadaardige cellen van MM patiënten met deze translocatie minder proliferatief zijn dan andere. De t(11;14)(q13;q32) is geassocieerd met een betere overlevingskans, zeker bij patiënten behandeld met hoge dosis chemotherapie en stamcel ondersteuning (39, 49).

<u>1.4.2.2 t(4;14)(p16.3;q32)</u>

Onlangs is er ook een t(4;14)(p16.3;q32) beschreven, deze translocatie is karyotypisch cryptisch en werd het eerst ontdekt bij klonale experimenten in humane cellijnen. De t(4;14)(p16.3;q32) komt voor in 15-20% van primaire MM stalen Deze translocatie kan gedetecteerd worden met metafase- en iinterfase FISH of met RT-PCR detectie van het IgH-MMSET hybride transcript. Deze translocatie vooroorzaakt een bijkomende disregulatie van het fibroblastische groei factor receptor 3 gen (FGFR3) op der(14) en MMSET domain protein/ Wolf-Hirschorn syndroom kandidaat gen 1 (MMSET/WHSC1) op der(14) (50). Bij bijna alle patiënten met t(4;14)(p16.3;q32) is er een del(13), zowel in MM als in MGUS. De t(4;14)(p16.3;q32) is een negatieve prognostische factor voor MM patiënten behandeld met conventionele of hoge dosis chemotherapie. En er is geen verschil in overleving tussen t(4;14) patiënten met of zonder FGFR3 overexpressie (49).

<u>1.4.2.3 t(14;16)(q32;q23)</u>

Translocatie t(14;16)(q32;q23) komt voor bij 5 tot 10% van de MM patiënten. De 16q23 breekpunten zijn gelocaliseerd in een regio 550-1350 kb centromerisch aan het kandidaat oncogen c-maf. C-maf is een transcriptiefactor betrokken bij cellulaire differentiatie, proliferatie, de IL-6 respons en is in staat om te transformeren in een oncogen. Als resultaat van deze translocatie is Cis up-regulatie van c-maf transcriptioneel ge-upreguleerd. De t(14;16)(q32;q23) is moeilijk te detecteren met conventionele karyotypering. Interferon regulaire factor 4 (IRF4) is betrokken bij de B cel proliferatie en differentiatie en komt tot een veel hoger expressielevel in MM cellijnen die de t(14;16)(q32;q23) bevatten. De t(14;16)(q32;q23) is geassocieerd met kortere overleving bij patiënten behandeld met conventionele chemotherapie (37,42,51).

<u>1.4.4 Inactivatie van p53 (17p13)</u>

P53 inactivatie door deletie of mutaties, lijkt maar zelden voor te komen bij MM, en wordt meestal pas gezien in latere stadia van de ziekte progressie. Deleties van 17p13 worden gedetecteerd bij 10% van de patiënten en zijn geassocieerd met een kortere overlevingstijd. Mutatie van p53 komen in 5% van de patiënten voor bij het stellen van de diagnose en in 20-40% van de geavanceerde MM patiënten (53).

<u>1.4.5 Aneuploïdie</u>

Aneuploïdie wordt gedetecteerd in 67-90% van de MM gevallen. Patiënten kunnen in twee categorieën verdeeld worden: Als eerste de Hyperploïdie sub-groep, met als meest voorkomende winsten: +3, +5, +7, +9, +11, +15, +19, +21 En als tweede de hypodiploïde groep die gepaard gaat aan complexe structurele veranderingen zoals 14q32 translocaties, del(13q)/-13 en een meer agressieve evolutie.

De manier waarop elk van de gekende chromosomale afwijkingen bijdraagt tot de pathogenese van MM is nog onvoldoende opgehelderd. Veel is te wijten aan de beperkingen van de tot nu toe toegepaste technieken bij het opsporen van nieuwe chromosomale afwijkingen.

Om de sensitiviteit en specificiteit te verhogen, wordt in dit onderzoek gekozen voor een unieke combinatie van technieken om eerst de aberrante plasmacelpopulatie uit het beenmergstaal te sorteren en vervolgens verschillende technieken daarop toe te passen. Zo wordt het mogelijk om het volledige genoom te screenen en nieuwe, tot nu toe onbekende maar toch belangrijke chromosomale afwijkingen in MM te detecteren.

Enerzijds kan er dan naar specifieke afwijkingen worden gezocht door specifieke probes op de metafase preparaten te hybridisreren, en anderzijds kan ook het volledige genoom gescreend worden door gebruik te maken van multicolor metafase FISH, karyotypering, en CGH-array.

2. DOEL VAN HET ONDERZOEK

Om de sensitiviteit en specificiteit van de detectie van chromosomale afwijkingen in MM te verhogen, wordt in dit onderzoek gekozen voor een unieke combinatie van technieken om eerst de aberrante plasmacelpopulatie uit het beenmergstaal te sorteren en vervolgens verschillende technieken daarop toe te passen.

De techniekencombinatie van flowsorting en metafase FISH is tot nu toe nog niet toegepast op gesorteerde plasmacellen afkomstig van MM patiënten omdat het vereist is dat de cel mitose ondergaat. En vermits plasmocyten moeilijk in cultuur te houden zijn en slecht proliferen, is het zeer moeilijk om metafases te verkrijgen die afwijkingen vertonen. Maar mits het bepalen van de optimale sorteer-, kweek- en metafase chromosoom preparatie-condities, zou deze techniek wel een oplossing kunnen bieden bij het opsporen van chromosomale afwijkingen zoals translocaties in MM.

DNA array's daarentegen kunnen worden gebruikt voor het bestuderen van chromosomale abnormaliteiten waarbij als referentie het DNA van een gezonde persoon gebruikt wordt. Dit is echter nog niet van toepassing op DNA van MM patiënten omdat deze techniek niet werkt indien er minder dan 50% aberrante plasmocyten aanwezig zijn, en daarom een grote uitdaging om dit op gesorteerde zuivere plasmacelpopulaties te verwezenlijken. Door gebruik te maken van array-CGH op DNA van MM patiënten kan het volledige genoom gescreend worden op tot nu toe onbekende afwijkingen en bovendien kunnen er met deze techniek veel kleinere afwijkingen gedetecteerd worden, die niet opgespoord kunnen worden met FISH op metafase chromosoom preparaten van plasmocyten afkomstig van MM patiënten. Translocaties kunnen echter niet opgespoord worden met array-CGH, en vandaar zou door de combinatie van metafase FISH, karytypering en array-CGH op gesorteerde plasmocyten veel meer duidelijkheid kunnen geschept worden omtrent de black box van de chromosomale afwijkingen en translocaties bij MM.

Het eerste doel is om optimale condities te vinden voor het kweken van door de FACSAria® gesorteerde langzaam prolifererende CD38+/CD138+ celpopulaties afkomstig van het beenmerg van MM patiënten.

Een tweede doelstelling is het optimaliseren van metafase chromosoom preparatie. Door het toepassen van FISH op deze metafase chromosoom preparaten kunnen tot nu toe onbekende chromosomale afwijkingen gedetecteerd worden.

Een derde doel is de optimalisatie van array-CGH op gesorteerde plasmocyten. Met deze techniek kan in een experiment het volledige genoom gedetailleerd onderzocht worden op chromosomale winsten en verliezen.

3. MATERIALEN EN METHODEN

3.1 Patiënten

Beenmergstalen van MM patiënten en bloedstalen van vrijwilligers op heparine werden afgenomen voor de optimalisatie van de kweek en metafase chromosoom preparatie. Het percentage plasmacellen in de beenmergaspiraten werd bepaald met May-Grünwald-Giemsa (MGG) cytologie en varieert tussen 1% en 55%. Alle beenmergstalen vertoonden met immuunfenotypering (zie verder) de aanwezigheid van een monoklonale plasmacel populatie.

<u>3.2 Cellijn</u>

De humane multiple myeloma cellijn, LP-1 genaamd, wordt gebruikt voor de optimalisatie en controle van de kweek na celsorting en van de array-CGH en bevat een humaan aneuploïde hypertriploïde karyotype - 79(72-79)<3n>XX.

3.3 Immunofenotypering

Bloed- of beenmergstalen op heparine worden verdeeld over steriele Falcon buisjes van 5ml (1ml per buisje). Hierop wordt een lyse gedaan door toevoeging van \pm 4.5ml RBC-lysis buffer (Qiagen, Hilden, Duitsland). Na goed opmengen en 5 minuten incubatie op kamertemperatuur centrifugeren de stalen gedurende 10 minuten bij 1800 rpm in een Jouen B311 centrifuge. RBC-lysis buffer wordt toegevoegd en afgecentrifugeerd tot een wit pellet te zien is. Daarna wordt er \pm 4.5ml steriele Phosphate Buffered Saline (PBS) toegevoegd. Vervolgens zal het staal weer 10 minuten bij 1800rpm centrifugeren. Na de telling wordt het staal gecentrifugeerd en voor het sorteren van B-cellen wordt het pellet opgelost in 1 ml steriele PBS. Na het tellen van de cellen met behulp van een trypan blue kleuring, worden de B-cellen opgelost in 1 ml PBS met CD19 peridinyl chlorofylline (PerCP) (10µl/ 10⁶ cellen) (Becton&Dickenson, San José, VS) en 30 minuten in het donker geïncubeerd.

Bij het sorteren van plasmocyten zullen de cellen opgelost worden in 1ml PBS met 50 µl CD138peridinyl chlorofylline (PerCP) en 12.5 µl CD38-allophycocyanine (APC) (Becton&Dickenson, San José, VS).

Voor de optimalisatie van CGH-array worden ook IgK-fluorescein isothiocyanate (FITC), IgLphycoerythrin (PE) en CD56-phycoerythrin-CY7 (PeCy7) toegevoegd aan het staal en wordt er een 5-kleuren analyse uitgevoerd.

Vervolgens wordt er ±4.5ml steriele PBS toegevoegd en opgemengd. Na centrifugatie van 10minuten bij 1800rpm, wordt het supernatant afgenomen en het pellet in 0,5ml PBS opgelost. Indien het staal niet helder is, zal er meer PBS worden toegevoegd Hierna kan het staal gesorteerd en de cellen geteld worden met de FACSAria®.

3.4 Sorteren van cellen

Het sorteren van cellen is de fysische scheiding van een targetcel uit een heterogene populatie. Door gebruik te maken van een flowcytometer, kan met een sorteeroptie de gewenste celpopulatie worden opgevangen voor verder microscopische, biochemische of functionele analyse.

Om de cellen te kunnen sorteren moet er eerst een doelwitpopulatie worden gedefinieerd. Hiervoor kan dezelfde data-analyse als bij flowcytometrie gebruikt worden. Indien de gewenste populatie geïdentificeerd is, wordt een "sorteer-gate" rond deze populatie getrokken.

Ook is het mogelijk om met de FACSAria® de druk van de "sheat-fluid" aan te passen. Er kan gewerkt worden onder hoge druk, hoofdzakelijk gebruikt voor "high-speed" en "high-throughput" sorting aangezien veel meer cellen per seconde gemeten kunnen worden. Er kan ook onder medium of lage druk gewerkt worden. Deze instellingen worden vooral gebruikt voor het sorteren van cellijnen, grote of kwetsbare cellen of als er aan "single-cell sorting" wordt gedaan.

3.4.1 Principe

De sorteeroptie laat toe om de gewenste populatie selectief op te vangen in epjes of op glaasjes voor verdere analyse. De identificatie van de doelwitpopulatie gebeurt op basis van de lichtverstrooiingsparameters en de immuunfenotypering en het toepassen van een welbepaalde gating strategie.

De FACSAria® laat toe 4 verschillende populaties gelijktijdig te sorteren dankzij het feit dat er verschillende ladingen kunnen toegekend worden.

3.5 Het kweken van een bloed- of beenmergstaal

Bij stalen die rechtstreeks in cultuur gebracht worden, wordt, na de lyse, het pellet opgelost in 1ml RPMI medium 20% foetal calfserum (FCS), 2% streptavidine-peniciline, en toevoeging van lectin from *Phaseolus vulgaris* Leucoagglutinin (PHA), pokeweed mitogen (PWM) of tissue plasminogen activator (TPA). Vervolgens wordt er een telling en viabiliteitsbepaling uitgevoerd met behulp van een trypaan blauw kleuring op een Fuchs-Rosenthal telkamer. Het patron van de Fuchs-Rosenthal telkamer bestaat uit 16 grote vierkanten omgeven door 3 lijnen en elk vierkant is nog eens opgedeeld in 16 kleinere vierkanten. De berekening van het aantal cellen gebeurd op basis de getelde cellen per oppervlak, rekeninghoudend met de verdunning in Trypaan blauw.

Daarna wordt het staal uitgeplaat in een 24-well-plaat (10⁶ cellen/ml medium) en gedurende 72 uren in kweek gehouden. Iedere dag worden de cellen geëvalueerd.

De gesorteerde CD38/CD138+ cellen worden in FACS-flow buffer opgevangen in 1ml RPMI 1640 met L-glutamine medium, 20% FCS en 2% streptomycine-penicilline. Het falconbuisje wordt gecentrifugeerd gedurende 10 minuten bij 1800 rpm. Het pellet wordt dan opgelost in 1ml RPMI 1640 met L-glutamine medium, 20% FCS, 2% streptomycine-penicilline. Vervolgens wordt het staal in cultuur gebracht in een 24-well-plaat (10⁶ cellen/1ml medium/well) mits toevoeging van 2µl IL-6 (1ng/ml).

3.6 Metafase chromosoom preparatie

Na 24-96 uren kweek op 37°C in een 5% CO atmosfeer wordt er 1-10 µl Colcemid (10 µg/ml) oplossing per well worden toegevoegd om de celcyclus stil te zetten in de metafase. Dit incubeert voor 1-2 uur in de broedstoof bij 37°C in een 5% CO atmosfeer. Na de cultuur over te brengen in 1.5 ml epje volgt een centrifugatie. Het supernatant wordt verwijderd en het pellet geresuspendeerd. Daarna wordt 0,1-1 ml KCL (0.075M) druppelsgewijs toegevoegd terwijl het buisje geschud wordt. De incubatie tijd wordt getest voor 10 en 20 minuten in een waterbad van 37°C. Na de incubatie worden de tubes terug gecentrifugeerd. Vervolgens wordt het supernatant verwijderd en het pellet terug geresuspendeerd in 0,1-1 ml ijskoud methanol/azijnzuur (fixatief). Daarna zal dit worden gecentrifugeerd. Het toevoegen van het fixatief en de centrifugatie wordt nog 2 tot 4 maal herhaald alvorens het pellet te resuspenderen in volume van 0,1 tot 1ml fixatief. De cellen in fixatief worden op glaasjes gedruppeld en op de verwarmplaat gelegd voor enkele seconden om een ideale spreiding van de chromosomen te bekomen.

3.7 Fluorescentie in situ hybridisatie (FISH)

De metafase chromosoom preparaten worden gebruikt voor FISH om chromosomale afwijkingen te bepalen.

3.7.1 Principe van FISH

De FISH techniek maakt gebruik van fluorescent gelabelde DNA probes om chromosomale en gen afwijkingen te detecteren. De fluorescent gelabelde probe wordt toegevoegd en hybridiseerd met het target DNA op het glaasje. Door afkoeling gaat de probe zich aan het complementaire DNA op het glaasje binden. En vervolgens worden de probe signalen onder de microscoop zichtbaar gemaakt met behulp van betreffende filters (FITC-, SpectrumOrange-, Aqua- filter).

3.7.2 FISH met painting probe

De glaasjes met metafasen fixeren gedurende 10 minuten in ijskoud azijnzuur/methanol mengsel. Daarna worden de glaasjes 1 minuut gewassen in 2x SSC buffer (2x saline-natrium-citraat buffer, 3.0 mM NaCl, 3.0 mM natriumcitraat, pH 7.0; Invitrogen, Merelbeke, België) en gedroogd. Vervolgens zullen de glaasjes een pepsine behandeling ondergaan. In 90 μ l 37% HCL wordt toegevoegd aan 1ml pepsine stockoplossing (2g, DAKO) en aangelengd tot 100 ml met RO water. Dan de glaasjes laten incuberen in een 37°C kuvette met pepsineoplossing gedurende 5 minuten. Daarna worden de glaasjes voor 2 minuten in 2x SSC geplaatst. Vervolgens dehydrateren de glaasjes bij kamertemperatuur gedurende telkens 2 minuten in een ethanolreeks van 70%, 85% en 96%. De probemix bestaat uit 7 μ l LSI-WCP hybridisatie buffer (Vysis, Downers Grove, IL, VS), 0.5 μ l WCP 14q (Abbott Molecular Inc.), 1 μ l LSI BCR/ABL (22q11/9q34) (Vysis, Downers Grove, IL, VS), 1 µl Cep 4 (Vysis, Downers Grove, IL, VS), 0,5 µl DNase/RNase vrij water. Deze mix wordt kort gevortext en vervolgens wordt het DNA gedenatureerd bij 73°C gedurende 5 minuten. Na de denaturatiestap wordt onmiddellijk 5 µl (voor 18x18mm) probemix op de plaatsjes toegevoegd, een dekglaasje aangebracht en wordt het glaasje afgesloten met rubbercement. Dit incubeert overnacht bij 37°C in een microprocessor gecontroleerde verwarmingsplaat (Hybrid) (DAKO).Vervolgens worden de dekglaasjes verwijderd en de draagglaasjes onmiddellijk ondergedompeld in 73°C warme 0.4x SSC/0.3% NP-40 oplossing gedurende 2 minuten. Dan worden de glaasjes in de 2x SSC/0.1% NP-40-oplossing gedompeld en geïncubeerd voor 10 minuten. Na het drogen van de glaasjes aan de lucht wordt als tegenkleuring 4,6-diamidino-2-fenylindol (DAPI) aangebracht om de kernen voor interfase FISH en de chromosomen voor metafase FISH te kunnen detecteren onder de microscoop (54).

3.8 DNA isolatie

Het DNA wordt geïsoleerd met behulp van de QIAmp DNA Mini kit. Het pellet van 1000 tot 5000 cellen wordt geresuspendeerd in PBS tot een totaal volume van 200 µl. Hier wordt 20 µl QIAGEN Proteïnase K en 200 µl lysis buffer (AL) aan toegevoegd. Na vortexen gedurende 15 seconden wordt de mix geïncubeeerd bij 56°C gedurende 10 minuten. Vervolgens wordt 200µl ethanol (96%). Na goed opmengen en korte centrifugate wordt de mix in een QIAmp spin kolom gedaan en gecentrifugeerd gedurende 1 minuut op 14 000 rpm. Daarna wordt de spin kolom in een propere collectie tube gezet en wordt er 500µl wash buffer (AW1) toegediend. Dit wordt weer gecentrifugeerd gedurende 1 minuut op 14 000 rpm en in een propere collectie tube gezet. Vervolgens wordt 500µl wash buffer (AW2) toegevoegd en afgecentrifugeerd gedurende 3 minuten op 14 000 rpm en wordt de kolom in een proper epje gezet voor de toevoeging van 200 µl AE buffer. Indien de concentratie van het DNA gebruikt voor het toepassen van een amplificatie te laag is na DNA meting met de NanoDrop 3.0.0., volgt er nog een precipitatiestap en wordt het DNA opnieuw gemeten.

3.9 Proteïnase K behandeling

Er wordt telkens minstens 10ng/µl van ieder patiëntenstaal genomen. Hier zal dan 1 µl proteïnase K oplossing (>600 mAU/ml) (QIAGEN) worden toegevoegd, en dit staal incubeert dan gedurende 1 uur op 56°C zodat het DNA blootgelegd wordt.

3.10 controle op de kwaliteit van het DNA

Controle PCR wordt uitgevoerd om de kwaliteit van het DNA te beoordelen na DNA isolatie. Met behulp van de Nanodrop 3.0.0 wordt de kwaliteit en de hoeveelheid DNA gemeten na DNA isolatie, amplificatie ben labeling van het DNA.

3.10.1 Principe van de controle PCR

De integriditeit van geëxtraheerd DNA kan beoordeeld worden door amplificatie van controlefragmenten. Door nucleotidefragmenten van 100, 200, 300, 400 en 600 bp met primers AF4, PLZF, RAG1 en TBXAS1 voor verschillende controlefragmenten te amplificeren in een PCR-reactie en te visualiseren met gelelectroforese, kan de fragmentatie van het geëxtraheerd DNA tussen 100 en 600 bp beoordeeld worden. Hoe groter de lengte van de nog detecteerbare amplicons, hoe beter de kwaliteit van het geëxtraheerde DNA (minder fragmentatie).

3.10.2 Controle PCR protocol

Per staal worden twee PCR-mixen gemaakt (één waaraan 2,5µl DNA wordt toegevoegd en één waaraan 5µl DNA wordt toegevoegd. Hiervoor zijn de volgende componenten en concentraties: 0,4 µl Taq DNA polymerase (2 U), 4 µl MgCl₂ (2 mM), 5 µl buffer (1x), 4 µl dNTP-mix (0,2 mM), 0,5 µl AF4 exon 3 primer (2,5 pmol), 0,25µl AF4 exon 11 primer (2,5 pmol), 0,25µl PLZF exon 1 primer (2,5 pmol), 0,25µl RAG1 exon 2 primer (2,5 pmol), 0,25µl TBXAS1 exon 9 primer (2,5 pmol), 31,1µl RNase/DNase vrij water (voor reactiemix 1) of 28,6µl RNase/DNase vrij water (voor reactiemix 2).

Het mengsel wordt gevortext en aan reactie mix 1 wordt 2,5 µl DNA toegevoegd en aan reactie mix 2 5,0 µl DNA. Daarna worden de mixen terug gevortext en kort gecentrifugeerd en worden de stalen in de blok van het PCR-toestel (PTC-200 Programmable Thermal Controller 96 well format, MJ Research, Inc) geplaatst. Het programma op het PCR-toestel start met een "hot start" bij 95°C gedurende 7 minuten. Stap 2 is de denaturatie op 95°C gedurende 30 seconden. Daarna volgt de annealingstap op 60°C gedurende 30° seconden en de extentiestap op 72°C gedurende 30 seconden. Dit wordt dan vanaf stap 2 nog eens 34 keer herhaald. Vervolgens worden de stalen op 72°C gebracht gedurende 10 minuten. En als laatste stap worden de stalen afgekoeld tot 10°C. Als het programma beëindigd is, volgt de electroforese waarbij de stalen met ladingbuffer op een 1,5% agarosegel of acrylamidegel worden gebracht.

<u>3.11 Array-CGH</u>

Array's werden geconstrueerd in het Centrum voor Menselijke Erfelijkheid te Gasthuisberg in Leuven, gebruikmakend van een 1 Mb Clone Set welke 3527 BAC klonen, waarvan 3275 een gekende en gefixeerde genomische positie hebben, welke in tweevoud gespot worden. Ook spots voor tyrosine kinase zijn aanwezig, dit omdat tyrosine kinase vaak ge-upreguleerd of gedownreguleerd wordt bij tumoren. Het BAC DNA werd geamplificeerd met behulp van DOP-PCR en deze DOP-PCR producten werden op CodeLink Bioarray System glaasjes (Amersham Biosciences) gespot. Met deze array's kunnen imbalansen om de 1 Mb of meer worden gedetecteerd bij een resolutie van 6kb.

Voor array-CGH (figuur 4) op DNA van cellijnen of gesorteerde, zuivere celpopulaties worden achtereenvolgens volgende technieken toegepast:

3.11.1 Amplificatie van DNA met de Genomiphi V2 DNA Amplificatie kit

Het DNA wordt geamplificeerd met behulp van de Genomiphi V2 DNA Amplification kit (GE Healthcare UK Limited). Eerst wordt een hitte denaturatie van het DNA gedaan door 9µl sample buffer toe te voegen aan 1µl (dat minstens 10 ng DNA bevat), en te verwarmen gedurende 3 minuten tot 95°C. Direct hierna wordt alles afgekoeld op ijs tot 4°C terwijl de amplificatie reactie wordt voorbereid door 9µl reactiebuffer te mixen met 1µl enzyme mix. Het staal incubeert dan samen met de mix gedurende 90 minuten bij 30°C. Vervolgens vindt er een post-amplificatie inactivatie plaats door het sample gedurende 10 minuten te verhitten bij 65°C. Dit wordt dan weer afgekoeld tot 4°C waarna het DNA gepurificeerd wordt (DNA purification kit, Roche). De kwaliteit van het DNA wordt op basis van zuiverheid en hoeveelheid beoordeeld met behulp van de Nanodrop 3.0.0.

3.11.2 Amplificatie van DNA met de Bioscore screening and amplification kit (Enzolifesciences)

100 ng (max 19 μ I) genomisch DNA wordt gemengd met 20 μ I primers, waarna het mengsel wordt gebracht op een volume van 39 μ I door toediening van nucleasevrij water en gecentrifugeerd. Na deze reactiemix te verhitten tot 99°C gedurende 10 minuten wordt het epje onmiddellijk op ijs geplaatst voor 5 minuten. Op het ijs wordt dan 10 μ I nucleotide mix en 1 μ I enzyme toegevoegd en opgemengd. Dit incubeert gedurende 1 uur op 37°C. Als laatse stap wordt 5 μ I stopbuffer toegediend en gemengd. Hierna volgt een purificatie van het geamplificeerde DNA gebruikmakend van de QIAquick PCR purification kit. De kwaliteit van het DNA wordt op basis van zuiverheid en hoeveelheid beoordeeld met behulp van de Nanodrop 3.0.0. Indien de totale opbrengst tussen 3 μ g en 10 μ g ligt, is de kwaliteit van het DNA goed.

3.11.3 DNA labeling

Als eerste wordt het DNA gelabeld (Bioprime ArrayCGH Genomic Labeling Module, Invitrogen). Driehonderd nanogram gDNA wordt aangelengd met steriel water tot een finaal volume van 21 μ l. Na het toevoegen van 20 μ l 2.5 x randon primers wordt het staal gedenatureerd op 95°C gedurende 10 minuten. Daarna worden de stalen onmiddellijk gedurende 2 minuten op ijs afgekoeld waarbij vervolgens 5 μ l 10 x dCTP's en 3 μ l dCTP-Cy3 of Cy5 (1 mM) (Amersham Pharmacia) wordt toegevoegd. Vanaf dit punt worden de stalen van het licht afgeschermd . Als volgende stap wordt er 1 μ l Exoklenow fragment toegevoegd waarna de stalen kort gevortext en gespind worden en overnacht worden geïncubeerd bij 37°C. Als laatste stap wordt er 5 μ l stopbuffer toegevoegd om de reactie te stoppen.

Na het labelen van de stalen volgt er een purificatiestap (Bioprime ArrayCGH purification kit, Invitrogen). Het gelabelde DNA wordt opgelost in 45µl TE buffer (10mM Tris/HCL; 1 mM EDTA; pH 8.0) waar 400µl purificatiebuffer A wordt toegevoegd, kort gevortext, en het staal naar een kolom wordt overgeplaatst. Na 1 minuut centrifugatie bij 13 000 rpm zal de flow-through worden afgegoten en 600µl purificatiebuffer B worden toegevoegd. Dit wordt herhaald met 200µl purificatiebuffer B. Vervolgens wordt de kolom op een nieuw epje geplaatst en 50µl steriel water toegevoegd en op kamertemperatuur gedurende 1 minuut geïncubeerd. Daarna wordt dit gecentrifugeerd op 13 000 rpm gedurende 1 minuut en is de flow-through het gezuiverde DNA waarmee verder wordt gewerkt. Vervolgens wordt de labeling incorporatie en concentratie van het gezuiverde DNA gemeten op de NanoDrop 3.0.0.

3.11.4 Voorbereiding probemix en blockingreagentia

Voor de preparatie van de probemix wordt 2.1 µg Cy-5 en 4.9 µg Cy-3 gelabeld DNA gemengd met 100µl Cot-1 DNA (Invitrogen). Vervolgens wordt 1/10 volume 3M NaAc (pH 5.6) en 2.5x volume 100% EtOH (ijskoud) samengevoegd, gemengd en voor 20 minuten bij –70 °C geplaatst. Daarna wordt dit gecentrifugeerd gedurende 15 minuten op 13 000 rpm bij 4°C. Het supernatant wordt afgenomen en het pellet droogt dan aan de lucht gedurende 1 minuut. Vervolgens wordt er 40 µl hybridisatiebuffer (50% formamide, 2x SSC, 10% dextran sulfaat, 0.1% Tween20, 10 mM Tris HCL pH 7.5) voorverwarmd op 75°C en toegevoegd aan de probemix. Dit incubeert dan gedurende 10 minuten bij 37°C en gevortext.

Voor de preparatie van de blocking reagentia wordt er 30µl Salmon sperm DNA), 50µl Cot-1 DNA; 1/10 V 3M NaAc (pH 5.6) en 2.5 x V 100% EtOH (ijskoud) samengevoegd en gedurende 20 minuten in -70°C vriezer geplaatst. Dit wordt dan gedurende 15 minuten gecentrifugeerd op 13 000rpm bij 4°C , waarna het supernatant wordt afgenomen en het pellet aan de lucht wordt gedroogd. Vervolgens wordt ook hier de hybridisatiebuffer voorverwarmd bij 75°C en hiervan wordt er 60µl toegevoegd en laat men het geheel gedurende 10 minuten incuberen bij 37°C.

Vervolgens zullen de probe mix en de blocking reagentia voor 10 minuten denaturen in een waterbad van 75°C. Dan wordt mix en reagentia gevortext, 2 minuten op ijs geplaatst en gespind. Daarna prehybridiseert de probe mix bij 37°C gedurende minimum 1 uur. Ondertussen zullen de microarray glaasjes voorverwarmd worden op een verwarmplaat van 37°C. Vervolgens zal er 60µl blocking reagent worden gedruppeld op ieder glaasje en een 24x60 mm dekglaasje worden aangebracht. Dit wordt dan gedurende 1 uur in een vochtige kamer geplaatst bij 37°C. Daarna zullen de dekglaasjes verwijderd worden en zal er aan iedere slide 40µl probe mix aangebracht worden. Na het aanbrengen van nieuwe dekglaasjes worden de slides in een vochtige kamer (20% formamide in 2x SSC) geplaatst voor twee nachten bij 37°C.

3.11.5 Posthybridisatie

De volgende stap is de posthybridisatie. De glaasjes worden gewassen in 1x PBS/ 0.05% Tween20 gedurende 5 minuten bij kamertemperatuur (KT). Daarna worden de glaasjes nog eens gewassen in nieuwe 1x PBS/0.05% Tween20 gedurende 10 minuten bij KT. Vervolgend worden de slides gedurende 30 minuten in 50% formamide/2x SSC geplaatst bij 42°C en dan weer gewassen in

verse 1x PBS/0.05% Tween20 voor 10 minuten (bij KT). Als laatste stap worden de glaasjes gecentrifugeerd bij 1200 rpm gedurende 1 minuut.

De array's worden gescand met de Genepix 4000B Axxon scanner en verder analyse wordt gedaan met GenPix, "Microsoft Exel".



Figuur 4: array-CGH: Genomisch DNA van een patiënt wordt gelabeld met een fluorescentie kleur (Cy5). Dit gelabelde DNA van de patiënt wordt samen met een gelijke hoeveelheid gelabeld controle DNA (Cy3) gecohybridiseerd aan een geselecteerd set van gespotte genomische fragmenten op de array. De intensiteiten van de spots worden gemeten bij 532nm (Cy3) en 635nm (Cy5). Wanneer de hoeveelheid Cy3 en Cy5 gelijk is in een spot, wordt dit regio van het patiënten DNA gezien als gebalanceerd of normaal. Indien er meer Cy3 gedetecteerd wordt, doet er zich een deletie voor in het patiënten DNA en indien er meer Cy5 aanwezig is in een bepaalde spot, dan wordt er een duplicatie verwacht in dat regio van het patiënten DNA.

4. RESULTATEN

4.1 Resultaten van de LP-1 cellijn

Voor de optimalisatie van metafase chromosoom preparatie werd de LP-1 cellijn gebruikt. Omdat hiervan voldoende materiaal beschikbaar .

4.1.1 Optimalisatie kweek van de LP-1 cellijn

De cellen worden uitgeplaat in een 24-well plaat (10^6 cellen/ml) (figuur 5). Elke dag wordt er lichtjes met de plaat geschud en om de 2 dagen worden de cellen doorgezet (1:2).



Figuur 5: Cellen in kweek van de LP-1 cellijn ×200

4.1.2 Optimalisatie metafase chromosoom preparatie van de LP-1 cellijn

Vertrekkende van een standaard protocol, is er een optimaal protocol voor metafase chromosoom preparatie van beenmerg opgesteld in het laboratorium van het Virga Jesseziekenhuis. Op basis van een aantal criteria zoals het aantal metafases, de morfologie van de chromosomen en de spreiding zijn verschillende condities uitgetest. Zo werd de inwerktijd van colcemid getest bij 30 minuten, 1 uur en 2 uren en de inwerktijd voor KCL werd getest bij 8 minuten, 15 minuten en 20 minuten. Ook werd de hoeveelheid KCL en methanol/azijnzuur getest bij 10ml, 5ml en 4 ml. Tevens werden de glaasjes behandeld met methanol/azijnzuur, beademd of voor 2 minuten gekoeld in de diepvries bij -20°C alvorens de geprepareerde cellen en chromosomen erop gedruppeld werden.

Het optimale protocol is als volgt:

Na 72 uren kweek op 37°C in een 5% CO atmosfeer wordt er 10 μ l Colcemid (10 μ g/ml) oplossing per well toegevoegd om de celcyclus stil te zetten in de metafase. Dit incubeert voor 2 uur in de broedstoof bij 37°C in een 5% CO atmosfeer. Na de cultuur over te brengen in een falconbuisje van 15ml volgt een centrifugatie van 12000 rpm gedurende 5 minuten. Het supernatant wordt verwijderd tot ongeveer 50 μ l en het pellet geresuspendeerd. Daarna wordt 4ml KCL druppelsgewijs

toegevoegd terwijl het buisje geschud wordt. Dit incubeert gedurende 20 minuten in een waterbad van 37°C. Na de incubatie worden de tubes terug gecentrifugeerd voor 5 minuten bij 1200rpm. Vervolgens wordt het supernatant verwijderd tot 50 µl overblijft, en het pellet terug geresuspendeerd in 4ml ijskoud methanol/azijnzuur (fixatief). Daarna zal dit worden gecentrifugeerd gedurende 5 minuten op 1200rpm Het toevoegen van het fixatief en de centrifugatie wordt nog 2 maal herhaald alvorens het pellet te resuspenderen in volume van ongeveer 200µl fixatief. De cellen in fixatief worden op beademde glaasjes gedruppeld. Hieruit werden morfologisch goede metafasen verkregen zoals aangetoond in figuur 6.



Figuur 6: metafase van niet-gesorteerde cellijn

4.1.3 Optimalisatie kweek van gesorteerde CD38/CD138+ cellen afkomstig van de LP-1 cellijn

Het protocol hieronder beschrijft het verkrijgen van metafase chromosoom preparaten van gesorteerde CD38/CD138+ cellen afkomstig van MM patiënten . De optimale condities voor het bekomen van metafase preparaten uit de plasmocytenkweek waren:

Na het sorteren worden de cellen opgevangen in puur Foetaal Calf Serum (FCS) en gecentrifugeerd gedurende 5 minuten op 1200 rpm. Na het tellen van de cellen worden ze uitgeplaat in een 24-well plaat (10⁶ cellen/ml) (figuur 7). Elke dag wordt er lichtjes met de plaat geschud en om de 2 dagen worden de cellen doorgezet (1:2).



Figuur 7: Cellkweek van CD38/CD138 gesorteerde LP-1 cellijn x200

4.1.4 Optimalisatie metafase chromosoom preparatie van gesorteerde CD38+/CD138+ cellen van de LP-1 cellijn

Dezelfde condities als voor de ongesorteerde LP-1 cellijn worden toegepast voor het verkrijgen van morfologisch goede metafasen (figuur 8).



Figuur 8: Metafase van een cel van de cellijn LP-1 na sorteren en kweek

4.1.5 Karyotypering van de LP-1 cellijn

Karyotypering van de LP-1 cellijn afkomstig van een vrouwelijke MM patiënt werd uitgevoerd volgens een standaard protocol in het Centrum voor Menselijke Erfelijkheid te Gasthuisberg in Leuven (figuur 9). Omdat de cellijn LP-1 een zeer complex karyotype heeft konden enkel de chromosomale afwijkingen "add(1)(p11-21)" en "del(6)(q15) x1-2" met behulp van deze techniek als structurele afwijkingen geïdentificeerd worden (figuur 9). Verder toont het karyotype aan dat het om een triploïde cel gaat.



Figuur 9: Karyogram van de LP-1 cellijn. Zeer complexe afwijkingen. Alle chromosomen die onder marker (mar) staan, waren niet te identificeren. Add (1)(p11-21) en del(6)(q15) zijn met de rode ring aangeduid.

4.1.6 Metafase-fluorescentie in situ hybridisatie (mFISH)

De metafase preparaten van de gesorteerde CD38/CD138+ cellen van de LP-1 cellijn werden getest met FISH. Zowel centromeer, locus specifieke als ook painting (voor een geheel chromosoom) probes werden gebruikt: een painting probe voor 14, locus specifieke probes voor 22q11 en9q34 en een centromeer 4 (figuur 10).



Figuur 10: Metafase chromosoom preparatie van de LP-1 cellijn. DAPI-geïnverteerd beeld van metafase chromosoom preparaat van de LP-1 cellijn (a) Corresponderend FISH beeld met probes voor 14, 22q11,9q34 en centromeer 4 getest op metafase chromosoom preparaat van de LP-1 cellijn (b) x1000

22q11

9a34

De metafase FISH resultaten tonen aan dat chromosoom 4, 9, en 22 drie keer per cel aanwezig zijn. Deze resultaten komen overeen met het triploïde karyotype. Door gebruik van de chromosoom 14 painting probe konden met FISH op de metafase twee normale chromosomen 14 aangetoond worden en een deel van chromosoom 14 geïnserteerd in een marker chromosoom. Dit wijst op een partiële deletie van chromosoom 14 bij een triploïde cel.

De resultaten bekomen met FISH op de metafase chromosoom preparaten worden later nog vergeleken met de resultaten van array-CGH op de gesorteerde CD38/CD138+ cellen van de LP-1 cellijn (Figuur 20).

4.1.7 Optimalisatie van DNA isolatie en amplificatie van de gesorteerde cellen

De ideale hoeveelheid cellen voor de isolatie van het DNA van de gesorteerde cellen werd bepaald. Hiervoor werden 100, 500, 1000, 10 000 en 20 000 cellen getest als startmateriaal voor de DNA isolatie met de QIAmp DNA Mini Kit van QIAGEN. Het gevolgde protocol was DNA isolatie voor cultuurcellen van QIAGEN. Na de isolatie van het DNA werd de hoeveelheid DNA gemeten met de NanoDrop 3.0.0. Voor het amplificeren van het DNA werden de 'Bioscore Screening and Amplification Kit' (Enzo Lifesciences) en 'Genomiphi V2 DNA Amplification kit' (GE Healthcare UK Limited) uitgetest en vergeleken. Omwille van het feit dat de hoeveelheid start DNA voor het 'Bioscore Screening and Amplification Kit' 100ng per maximum 19µl moest zijn, was de optimale hoeveelheid cellen te gebruiken voor de isolatie van het DNA (om zo min mogelijk DNA te verspillen) gelijk aan 20 000. Echter kon ook nog gebruik gemaakt worden van 10 000 cellen om te starten op voorwaarde dat er na de isolatie nog een precipitatiestap werd uitgevoerd. Indien gebruik gemaakt werd van de 'Genomiphi V2 DNA Amplification kit' is de vereiste DNA concentratie gelijk aan 10ng/µl. De optimale hoeveelheid cellen te gebruiken voor de isolatie van het DNA voor het toepassen van de 'Genomiphi V2 DNA Amplification kit' was 5000 cellen. Indien er een precipitatie werd uitgevoerd na de isolatie van het DNA kon er ook vertrokken worden van 1000 cellen. Wanneer de hoeveelheid cellen als startmateriaal gelimiteerd is kan bij voorkeur het 'Genomiphi V2 DNA Amplification kit' gebruikt worden omdat hier 1000 cellen al voldoende DNA verschaft als startmateriaal voor een labeling reactie voor een CGH-array. Indien er wel voldoende start materiaal beschikbaar is wordt er beter voor het de 'Bioscore Screening and Amplification Kit' gekozen omdat hiermee kwalitatief betere DNA verkregen wordt . De opbrengst van het geamplificeerde DNA was bij beide kits voldoende voor één labeling voor arrayCGH. Ratio tussen 1.7 en 2.0 = goede kwaliteit

4.1.8 Controle PCR

Om de kwaliteit te achterhalen van het geïsoleerde en geamplificeerde DNA alvorens er een array wordt op toegepast, werd er een controle PCR uitgevoerd. Het geïsoleerde DNA afkomstig van de met de FACSAria® gesorteerde cellen gaf met de controle PCR een amplificatie product van 100 en 200 bp.

4.1.9 Optimalisatie Array-CGH op gesorteerde en geamplificeerde cellen

De optimalisatie van gesorteerde en geamplificeerde cellen voor CGH-array wordt uitgevoerd door gebruik te maken van de LP-1 cellijn. Voor de optimalisatie op geamplificeerd DNA van gesorteerde cellen was het labelen van het DNA de cruciale stap. De rest van het labeling protocol werd aangehouden zoals beschreven staat in 'Bioprime ArrayCGH Genomic Labeling Module' op de site van Invitrogen (zie ook materiaal en methoden.) Omwille van het feit dat de incorporatie (pmol/µl) van het gelabelde DNA na 2 uur veel te laag was, werd de incubatietijd voor de labeling verhoogd naar een incubatie overnacht. Hierdoor werd er een aanvaardbare incorporatie verkregen tussen 8 en 15pmol/µl.

Door het uitvoeren van een positieve en negatieve controle konden de resultaten bekomen met arrayCGH gevalideerd worden. De positieve en negatieve controles werden uitgevoerd op zowel niet-geamplificeerd als geamplificeerd DNA van een normale man en vrouw. Resultaten worden voorgesteld op plots zoals in figuur 11. Deze plots geven de klonen geordend vanaf het telomeer van de p arm tot het telomeer van de q arm voor een specifiek chromosoom weer op de x-as. De y-as geeft de log₂ getransformeerde intensiteit ratio's weer voor elke locus. Deze log₂ waardes van de intensiteit ratio's gedragen zich lineair omdat de relatie van de intensiteiten van zowel Cy3 als Cy5 de waarde van de intensiteit ratio's zullen rond nul liggen. De hybridisatie efficiëntie is een indicatie voor de sterkte van de probe hybridisatie aan de array.

4.1.9.1 Postitieve controles

Voor de positieve controle op niet-geamplificeerd DNA werd er DNA afkomstig van een gezonde vrouw (2 X chromosomen) als test DNA gehybridiseerd ten opzichte van het DNA afkomstig van een gezonde man (een X en een Y chromosoom) als controle DNA (Figuur 11). De geslachtschromosomen dienen hier als interne controle. De resultaten wijzen erop dat alle waarden

op de grafiek tussen 0,5 en -0,5 normaal zijn. Alles wat boven 0,5 ligt wordt beschouwd als een duplicatie en alles onder -0,5 wordt beschouwd als een deletie.

Het resultaat toont aan dat alle autosome chromosomen normaal zijn zoals bij chromosoom 14 als voorbeeld weergegeven in figuur 11 en dat chromosoom x gedupliceerd is en chromosoom y gedeleteerd (figuur 11). Hiermee kon aangetoond worden dat er geen afwijkingen geïnduceerd worden en verlies (chromosoom Y) en winst (chromosoom X) gedecteerd kan worden.



Figuur 11: Controle van niet-geamplificeerd DNA. Chromosoom X is gedupliceerd. Chromosoom Y is gedeleteerd en chromosoom 14 is normaal. De spots in het paars verwijzen naar tyrosine kinase. De rode lijnen geven de grens voor een winst of verlies weer.

Voor de positieve controle van geamplificeerd DNA werd geamplificeerd DNA afkomstig van een gezonde vrouw gehybridiseerd ten opzichte van het geamplificeerde DNA afkomstig van een gezonde man (Figuur 12). Hier werden dezelfde resultaten bekomen als eerder met de positieve controle op niet-geamplificeerd DNA. Daardoor wordt getoond dat de amplificatie stap geen veranderingen induceert. Chromosoom 14 (normaal) wordt hier weergegeven als chromosoom zonder afwijkingen.



Figuur 12: Grafiek van geanalyseerde klonen (ratio test;controle) Controle van geamplificeerd DNA. Chromosoom X is gedupliceerd. Chromosoom Y is gedeleteerd en chromosoom 14 is normaal. De spots in het paars verwijzen naar tyrosine kinase.

Enkele punten die buiten de rode lijnen vallen blijken klonen te zijn die minder goed hybridiseren zoals in de verdere controtels duidelijk wordt.

4.1.9.2 Negatieve controles op niet-geamplificeerd en geamplificeerd DNA

Voor de negatieve controle werd er DNA van een normale vrouw gehybridiseerd ten opzichte van het zelfde DNA (figuur 13). Hier worden geen deleties of duplicaties gevonden, wat aantoont dat array-CGH geen vals positieve resultaten kan weergeven. Ook hier wordt chromosoom 14 weergegeven als extra controle.



Figuur 13: negatieve controle van niet-geamplificeerd DNA.

Zowel chromosoom X, Y als 14 zijn normaal en vertonen geen afwijkingen. De spots in het paars verwijzen naar tyrosine kinase

Voor de negatieve controle op geamplificeerd DNA werd er geamplificeerd DNA van een normale vrouw gehybridiseerd ten opzichte van het zelfde geamplificeerde DNA (figuur 14). Deze resultaten tonen ook hier aan dat array-CGH op geamplificeerd DNA geen vals positieve resultaten weergeeft., doch de spreiding van de dots lijkt groter dan in het resultaat op niet-geamplificeerd DNA wat de interpretatie bemoeilijkt. Ook hier wordt chromosoom 14 weergegeven als extra controle.



Figuur 14: negatieve controle van geamplificeerd DNA negatieve. Zowel chromosoom X, Y als 14 zijn normaal en vertonen geen afwijkingen. De spots in het paars verwijzen naar tyrosine kinase

Nadat op basis van de resultaten van de positieve en negatieve controles de opzet voor de array-CGH condities bepaald was, werd array-CGH uitgetest op de LP-1 cellijn.

4.1.9.3 Array-CGH resultaten van de LP-1 cellijn

Hier volgt een globaal overzicht van alle chromosomen geanalyseerd met behulp van array-CGH op het geïsoleerde DNA van de LP-1 cellijn (figuur 15). Hier representeert de x-as alle klonen geordend van chromosoom 1 tot chromosoom Y. De y-as geeft de log₂ getransformeerde intensiteit ratio's weer voor elke locus.



Figuur 15: ArrayCGH van niet geamplificeerd DNA van de LP-1 cellijn. Hybridisatie efficiëntie: 88,49%

Daarna werd array-CGH toegepast op geïsoleerd en geamplificeerd DNA van de LP-1 cellijn ter vergelijking met het resultaat op niet-geamplificeerd DNA, als controle op de DNA amplificatiestap (figuur 16).



Figuur 16: ArrayCGH van geamplificeerd DNA van de LP-1 cellijn. Hybridisatie efficiëntie: 88,52%

Hierbij werd hetzelfde patroon verkregen. Dit toont aan dat de amplificatie geen invloed heeft op de array-CGH analyse.

Hierna werd er getest of array-CGH op gesorteerde cellen van de LP-1 cellijn waarvan het DNA geïsoleerd en geamplificeerd werd invloed heeft op het DNA voor de toepassing van amplificatie en array-CGH. mogelijk was. Hiervoor werden gesorteerde cellen opgevangen in cellwash buffer (figuur 17) vergeleken met gesorteerde cellen in cellfix.



Figuur 17: Array CGH van in cellwash CD38/CD138 gesorteerde en geamplificeerde cellen van de LP-1 cellijn Hybridisatie efficiëntie: 86,27%

Echter bleek de hybridisatie efficiëntie met 10% gedaald te zijn wanneer er array-CGH werd uitgevoerd op CD38/CD138+ gesorteerde cellen in cellfix (figuur 18). Bovendien toont de plot een duidelijk grotere spreiding van de signalen.



Figuur 18: Array CGH van in cellfix CD38/CD138 gesorteerde en geamplificeerde cellen van de LP-1 cellijn Hybridisatie efficiëntie: 73,86%

4.1.9.4 Chromosomale afwijkingen gedetecteerd bij de LP-1 cellijn

De resultaten bekomen met array-CGH (figuur 19-20) worden vergeleken met de resultaten bekomen met metafase FISH en karyotypering .



Figuur 19: Grafiek van chromosoom 1 en 6 met array-CGH en karyotype van de cellijn. De resultaten bekomen met de array-CGH analyse komen overeen met de afwijkingen gevonden met karyotypering, namelijk add(1) (p11-21) en del(6) (q15).



Figuur 20: Grafiek van array-CGH resultaten vergeleken met metafase FISH. De array-CGH analyse bevestigt het resultaat gevonden met metafase FISH, wat aantoont dat de resultaten reproduceerbaar zijn. De gevonden afwijkingen zijn: del(14), trisomie 4,9 en 22. Omdat de LP-1 cellijn een tryploïd karyotype heeft, wordt dit genormaliseerd met array-CGH analyse, maar is wel zichtbaar door gebruik te maken van metafase FISH.

Afgeleid uit de resultaten van array-CGH en karyotypering, zijn volgende afwijkingen aangetoond: add(1) (p11-21), del(6) (q15) Met array-CGH en metafase FISH wordt de partiële deletie van 14q aangetoond. Metafase FISH toont het ploïdie level van de cellen.

4.2 Resultaten bekomen met stalen afkomstig van MM patiënten

4.2.1 Optimalisatie van de kweek van bloed- en beenmergstaal

De eerste stap voor de optimalisatie van de kweek, was het in kweek brengen van ongesorteerd bloed- en beenmergstaal op heparine. Hier werden verschillende condities uitgetest zoals het optimale volume van het medium, aantal cellen, en welke groeifactoren geschikt waren. Ook bij het maken van metafase chromosoom preparaten werd de inwerktijd van colcemid, de hoeveelheid KCL en hoeveelheid fixatief in acht genomen. De optimale condities van de kweek voor het verkrijgen van morfologisch goede metafasen zijn: 10^6 cellen/ ml medium/well (24 well plaat) met toevoeging van 20 µl PHA. Er wordt gesproken van morfologisch goede chromosomen indien de breedte/lengte verhouding van de chromosomen goed is en ook met het DAPI geïnverteerde beeld structurele afwijkingen te herkennen zijn. (figuur 21). Voor de preparatie van metafase chromosomen werden in combinatie met de optimale kweekcondities de optimale inwerktijden en hoeveelheden colcemid, KCL en fixatief getest.



Figuur 21:metafase chromosoom preparatie van normaal perifeer bloed

4.2.2 Optimalisatie van de kweek van CD19+ gesorteerde cellen

CD19+ gesorteerde cellen werden uitgeplaat in een 96 well plaat (30 000/100µl) met toevoeging van 2µl PHA. De keuze om van een 24-well plaat naar een 96-well plaat over te schakelen is onder andere gebaseerd op de veronderstelling dat indien op CD38/CD138 zou gesorteerd worden van een MM patiënt met een laag percentage plasmocyten, er minder dan 100 000 cellen in kweek zouden kunnen gebracht worden. De keuze van de gesorteerde cellen uit te platen in een 24-well plaat of een 96-well plaat is dus afhankelijk van het aantal geïsoleerde cellen. Foto werd genomen na 3 dagen kweek (figuur 22).



Figuur 22: CD19+ gesorteerde cellen ×100

Na de optimalisatie van het kweken van CD38/CD138+ cellen van de cellijn en CD19+ cellen werd er een stap verder gegaan en werden CD38/CD138+ gesorteerde cellen van MM patiënten.

4.2.3 Optimalisatie van de kweek van CD38/CD138+ gesorteerde cellen

De condities voor de kweek van CD38+/CD138+ cellen zijn niet in de literatuur beschreven. Vandaar dat de optimale condities voor het kweken van gesorteerde CD38/CD138+ cellen van MM patiënten zijn gebaseerd op de volledige optimalisatie die vooraf gegaan is, namelijk op bloed- en beenmergstaal, gesorteerde CD38+/CD138+ cellen van de LP-1 cellijn. Verder worden verschillende tijden van kweek uitgetest (3, 4, 6 dagen). Bovendien worden verschillende IL-6 concentraties voor de kweek uitgetest.

Het beste resultaat werd verkregen van CD38/CD138+ gesorteerde cellen van een MM patiënt met een plasmocytenpercentage van 50% (figuur 23)



Figuur 23: MGG kleuring van beenmerguitstrijkje van de MM patiënt met 50% plasmocyten x500

Omdat met behulp van de FACSAria® er 1 800 000 CD38/CD138+ cellen konden gesorteerde worden werden deze cellen uitgeplaat in een 24-well plaat met 900 000 cellen/ well/ ml mits toevoeging van 2 μ IL-6 per well. Foto werd genomen na 3 dagen in kweek (figuur 24).



Figuur 24: CD38/CD138+ gesorteerde cellen van MM patiënt met 50% plasmocyten. X400

Na 6 dagen cultuur werd er een trypaan blauw kleuring uitgevoerd om de viabiliteit en aanwezigheid van proliferatie te bepalen (figuur 25). Er werden 1 200 000 cellen geteld (startcultuur: 900 000 cellen) per well waarvan 82% blijken vitaal te zijn.



Figuur 25: Trypaan blauw kleuring van CD38/CD138+ gesorteerde cellen. De blauw gekleurde cellen zijn dood. De wit gekleurde cellen zijn vitaal. x200

4.2.4 Metafase fluorescentie in situ hybridisatie (FISH)

De metafase preparaten van de gesorteerde CD38/CD138+ cellen uit beenmerg van een MM patiënt werden getest met FISH. De probes 4p16, 14q32 en paint 14 werden hiervoor gebruikt.



Figuur 26: metafase FISH van gesorteerde CD38/138+ cellen uit het beenmerg van een MM patiënt

<u>4.2.5 Chromosomale afwijkingen gedetecteerd bij CD56/ λ + cellen afkomstig van een MM patiënt</u> Om de resultaten van array-CGH op beenmergstaal van deze patiënt (figuur 28) te verifiëren, worden dit vergeleken met de resulaten bekomen met CGH van dezelfde patiënt (figuur 27).



Figuur 27: CGH resultaat: Lijnen rechts van het ideogram wijzen op chromosomale winsten. Lijnen die links van het ideogram gelegen zijn, zijn chromosomale verliezen. Er is een winst van chromsoom 4 gedetecteerd, verlies van chromosoom 6p, 10, 18q en 20.



Figuur 28: array-CGH resultaat van MM patiënt

Omwille van de reden dat er eerst gebruik werd gemaakt van gestockeerd beschikbaar staal voor de optimalisatie van array-CGH van gesorteerde cellen werd het resultaat van de array-CGH vergeleken met eerder bekomen CGH resultaten van dezelfde patiënt.

Uit deze array-CGH resultaten is zijn de chromosomale afwijkingen gevonden met conventionele CGH niet af te leiden. De oorzaak hiervan is een te lage hybridisatie efficiëntie (52%), wat ook geïllustreerd wordt op de figuur. Dit wijst erop dat voor gestockeerde stalen verdere optimalisatie nodig is.

5. DISCUSSIE

In dit onderzoek werden methode-combinaties op punt gesteld voor de detectie van chromosomale afwijkingen in zuiver monoclonale/aberrante plasmacel populaties. De methode bestaat uit een unieke combinatie van *cell sorting* (op basis van 5-kleuren flowcytometrie) met metafase chromosoom preparatie, FISH of arrayCGH. Deze methodologie werd vervolgens gebruikt voor de detectie van chromosomale afwijkingen in de LP-1 cellijn en in plasmacel populaties van patiënten met MM.

Chromosomale veranderingen worden bij MM vaak niet gevonden. Enkele afwijkingen zoals de deletie van chromosoom 13 of een translocatie in het IgH gen op 14q32 zijn wel beschreven maar de translocatiepartner hiervan blijft vaak ongekend. Bij veel MM gevallen kan helemaal geen afwijking bepaald worden. De detectie van chromosomale afwijkingen met standaard technieken wordt bemoeilijkt door tal van factoren. Vooreerst is de informatie die met behulp van conventionele cytogenetica (CC) met karyotypering kan worden verkregen, beperkt. Dit heeft voornamelijk te maken met het feit dat plasmacellen moeilijk in deling te brengen zijn, omwille van het feit dat het percentage plasmacellen in het beenmerg heel klein is. Studies op basis van CC detecteren slechts bij 30%-50% van de PCM patiënten een abnormaal karyotype in het beenmerg aan de hand van verkregen metafases. In de andere gevallen wordt er geen metafase of metafases van normale cellen verkregen (35, 55) Bovendien is de detectie van kleine gebalanceerde translocaties tussen telomeren of microdeleties met CC moeilijk of niet te zien.

FISH-studies, welke gebruik maken van interfase cellen vereisen geen celkweek maar er moet wel vooraf bepaald worden welke specifieke afwijkingen onderzocht worden. Interfase-FISH (iFISH) laat daarmee helemaal geen screening van het genoom toe.

Bovendien worden zowel iFISH als CC veelal gehinderd door het feit dat in MM en zeker in de voorloper stadia zoals MGUS de plasmacellen maar een kleine fractie van de cellen in het beenmerg uitmaken (22-23). Studies met CC en FISH uitgevoerd op alle leukocyten, zonder een onderscheid te maken tussen de plasmacellen en de andere leukocyten, tonen dan ook een lage sensitiviteit voor de detectie van chromosomale afwijkingen in de aberrante plasmacellen. Om een hogere sensitiviteit te verkrijgen, moeten de plasmacellen te onderscheiden zijn van andere leukocyten voor verder onderzoek. Bestaande selectieve technieken die in combinatie met IFISH op plasmacellen uitgevoerd kunnen worden, zijn het kleuren van een beenmerguitstrijkje met een May Grünwald Giemsa (MGG)-kleuring of met fluorescente immunfenotypering (FICTION) (38). Een vaak toegepaste manier om plasmacellen te isoleren voor analyse met iFISH is het gebruik van CD138+ magnetische beads. De belangrijkste nadelen van deze techniek is dat ze erg tijdrovend ,slechts beperkt selectief is en een minimum aan PC en staalvolumen vereist. Met al deze technieken wordt er immers geen onderscheid gemaakt tussen de aberrante en gezonde plasmacelpopulaties die in het patiëntenstaal aanwezig zijn. De analyses met behulp van deze methodes gebeuren dus steeds op met normale plasmacellen bijgemengde, niet-zuiver aberrante plasmacelpopulaties.

Naast technische problemen unnen met deze technieken ook slechts een beperkt aantal plasmacellen geanalyseerd worden. MGG-FISH en FICTION beperken zich tot FISH analyse en zijn niet combineerbaar met andere moleculair/cytogenetische technieken. Het is dus zeer moeilijk om met de bestaande technieken chromosomale afwijkingen te kunnen detecteren in MM patiënten. Nochtans is dit van groot belang voor het stellen van een diagnose en prognose en meer inzicht te krijgen in de pathogenese van MM en MGUS. Daarom werd er in dit onderzoek gebruik gemaakt van een nieuwe technieken-combinatie van *flowsorting* met de FACSAria® en: metafase chromosoom preparatie, metafase-FISH en array-CGH.

Met behulp van *flowsorting* met de FACSAria® kunnen alle aberrante plasmacellen zeer selectief uit een beenmergstaal geïsoleerd worden. De high-throughput methodologie van de FACSAria® laat ook bij zeer lage plasmocytenpercentage (1%-10%) adequate plasmacel isolatie toe. Afhankelijk van de gebruikte markers kunnen verschillende subpopulaties gelijktijdig gesorteerd worden. Het protocol voor het sorteren van plasmocyten voor celkweek vereiste een strikte optimalisatie onder steriele condities die niet letaal of schadelijk mogen zijn voor de cellen, zodat de gesorteerde cellen in kweek kunnen prolifereren . Ook moet de kwaliteit van het DNA van de gesorteerde cellen geschikt zijn voor het uitvoeren van andere technieken zoals array-CGH en PCR.

Om het mogelijk te maken dat zowel structurele als numerische afwijkingen specifiek voor maligne plasmocyten kunnen worden gedetecteerd, zal de gesorteerde zuivere plasmocytenpopulatie in kweek worden gebracht met als doel metafase chromosoom preparaten te bekomen. Indien er bij deze plasmocyten metafasen kunnen worden verkregen, kan er karyotypering en metafaseFISH op worden toegepast om chromosomale afwijkingen te detecteren. Uit een grondige literatuurstudie blijkt dat er tot nu toe enkel publicaties over kweek na sorteren van PC uit cellijnen bij MM gevonden kunnen worden, wathet probleem van deze procedure van patiëntenmateriaal nog een benadrukt. Cellijnen kennen een hoge proliferatie en zijn dan ook makkelijk in cultuur te houden. Vandaar werd de LP-1 cellijn in dit onderzoek ook gebruikt voor de optimalisatie van het kweken van gesorteerde plasmocyten en het prepararen van metafase chromosomen.

In de beginfase van het optimalisatieproces werden de optimale kweekcondities vastgelegd voor ongesorteerde bloed- en beenmergstalen. Dit gebeurde op basis van de morfologie en het aantal metafases verkregen op rechtstreeks gekweekte bloed- en beenmergstalen van MM patiënten waarbij verschillende parameters werden uitgetest. Criteria zoals de incubatie van colcemid en KCL en het gebruik van verschillende groeifactoren werden in acht genomen. De uitgeteste groeifactoren PWM, PHA, TPA en IL-6, werden gekozen op basis van bevindingen uit de literatuur (56-59). Door verschillende aanpassingen kon het bekomen van metafasen van volbloed- en beenmergstalen op punt getseld worden.

Nadien was het doel om metafase chromosoom preparaten te verkrijgen uit gesorteerde en gekweekte plasmocyten. Dit werd eerst geoptimaliseerd door de LP-1 cellijn te sorteren op CD38/CD138+ en deze plasmocyten dan in kweek te brengen. Na optimalisatie werden er metafase chromosoom preparaten verkregen van deze cellijn. FISH op de metafasen chromosoom preparaten toont aan dat de resultaten overeen komen met het karyotype van de LP-1 cellijn. Blijkbaar worden geen afwijkingen door in de PC geinduceerd na 6 dagen kweek .

Om zuivere plasmocytenpopulaties uit het beenmerg van MM patiënten te sorteren en in kweek te brengen, werden alle condities uitgevoerd met de LP-1 cellijn aangehouden. Omdat in geval van patiëntenstalen veel minder cellen na het sorteren op de FACS Aria beschikkbaar zijn dan van een goed groeiende cellijn waren aanpassingen voor de patientenstalen vereist. De groeifactoren werden aangepast omwille van het lage percentage plasmacellen en lage proliferatieindex bij patiëntenstalen van MM. IL-6 wordt verkozen als optimaler groeifactor voor het kweken van gesorteerde zuivere plasmocytenpopulaties uit het beenmerg van MM patiënten.

Maar het was zeer moeilijk om de kweek van de gesorteerde cellen op te starten en te laten prolifereren. Verschillende keren werden de condities aangepast om de plasmocyten vitaal te houden. Zo werd er in de loop van het optimalisatieproces uitgetest wat het ideale aantal cellen per oppervlakte was om een kweek te starten en voor optimale groei van de cellen te bekomen. Indien er te weinig cellen per oppervlakte in kweek gebracht werden, overleefden de plasmocyten niet. Hieruit bleek dat 1 miljoen cellen per ml medium als startmateriaal optimaal zijn. In geval van beenmergstalen met weinig PC kan het behalen van 1 miljoen cellen na het sorteren een probleem vormen. Voor kleine percentagen PC moeten nog kleinere kweekvolumen uitgetest worden. Steriel werken bij het labelen met antilichamen en bij het gebruiken van de FACSAria® was ook van uiterst belang.

Uiteindelijk was het kweken van zuivere plasmocyten populaties afkomstig van een MM patiënt met 50% PC geslaagd. Dit werd aangetoond door het uitvoeren van een Trypaan blauw kleuring voor het bepalen van de vitaliteit en het aantal cellen. De cellen waren met 50% toegenomen na 6 dagen in kweek. Bovendien waren 82% van de plasmocyten vitaal.

Omdat een standaard kweek van beenmerg na 3 dagen afgewerkt werd voor metafases, werd de kweek van een patiënt ook na 3 dagen afgewerkt, maar dit zonder resultaat. De kweektijden werden dus verlengt omwille van de lage proliferatieindex van PC. Een kweek na 4 dagen leverde ook geen resultaten op maar een kweek van 6 dagen was wel successvol. Het afwerken van stalen na exact 6 dagen is in de praktijk niet altijd haalbaar. Het inzetten,sorteren en in kweek brengen van het staal zijn niet altijd mogelijk. Deze procedure vraagt enkele uren werk na beenmergpuntie, waarbij het tijstip van staalafname niet bepaald kan worden. Verder moeten de stalen verwerkt worden nadat de resultaten van de cytologie gekend zijn.

Op de metafase chromosoom preparaten werd FISH voor verschillende chromosomale loci toegepast. De resultaten van de metafase-FISH kwamen overeen met de resultaten behaald met hetzelfde FISH-panel met IFISH rechtstreeks op de plasmacellen na sorteren.

De metafase chromosoom preparaten kunnen voor verschillende toepassingen gebruikt worden. Er kan op de metafases van PC een G-bandering uitgevoerd en een karyotype gemaakt worden waarmee chromosomale imbalansen en translocaties groter dan ongeveer 1 Mb bij alle chromosomen gezien kunnen worden. Verder kan een metafase-FISH met verschillende FISHprobes uitgevoerd worden om een beperkte aantaal afwijkingen te onderzoeken. Multi-color FISH uiteindelijk kleurt alle chromosomen na analyse in verschillende kleuren en geeft een overzicht van chromosomale imbalansen en translocaties op basis van de verschillende kleuren. Dit betekent dus dat metafasen van gesorterde gekweekte pc gebruikt kunnen worden voor het screenen van het genoom, waardoor er meer duidelijkheid kan gebracht worden over chromosomale afwijkingen en translocaties bij MM patiënten en vooral nieuwe chromosomale afwijkingen ontdekt kunnen worden.

Naast metafase-FISH werd in dit onderzoek ook array-CGH op gesorteerde plasmacellen geoptimaliseerd. De techniek van array-CGH werd recent ontwikkeld en kan genomische

veranderingen in een experiment screenen zonder het gebruik van delende cellen. Om chromosomale veranderingen te kunnen detecteren is het wel vereist dat de helft van de cellen de afwijking draagt. Daarom kan deze techniek niet rechtstreeks op beenmerg van MM patiënten uitgevoerd worden. In dit project worden 1 Mb arrays gebruikt die ~3500 verschillende klonen bevatten verdeelt over het hele genoom op afstand van 1 Mb.

Voor het toepassen van array-CGH is er ongeveer 1 µg DNA nodig die in het geval van MM in de meeste gevallen niet uit de gesorteerde cellen van beenmerg geisoleerd kan worden. Daarom is voor het uitvoeren van CGH-array op gesorteerde PC een amplificatiestap van het DNA vereist. Twee manieren om DNA te isoleren werden uitgetest, namelijk proteïnase K behandeling en de QIAmp DNA Mini kit. Er werd hier geopteerd voor het gebruik van de QIAmp DNA Mini kit omwille van de betere amplificatie producten die daarmee bereikt werden. Voor het amplificeren van het DNA werden twee kits, namelijk 'Bioscore Screening and Amplification Kit' (Enzo LifeSciences) en 'Genomiphi V2 DNA Amplification kit' (GE Healthcare UK Limited), uitgetest ten opzichte van mekaar. Met het 'Bioscore Screening and Amplification Kit (Enzo LifeSciences) werd, na het uitvoeren van een controle-PCR, kwalitatief het beste DNA bekomen, en vandaar werd er dan ook voor deze amplificatie-kit geopteerd. Bovendien is het voordeel van deze techniek dat er minder startmateriaal nodig is. Door de tussenschakeling van een amplificatie stap is het mogelijk om een CGH-array uit te voeren vertrekkend van 10 000 cellen.

Array CGH werd geoptimaliseerd door gebruik te maken van DNA van bloed van gezonde personen en van de LP-1 cellijn. Eerst werden er een positieve en negatieve controle uitgevoerd van DNA afkomstig van een normale man en vrouw om de techniek van array-CGH te verifiëren. De resultaten bekomen door analyse van de gesorteerde LP-1 cellijn met array-CGH werden vergeleken met de resultaten bekomen met karyotypering, en FISH op de metafase chromosoom preparaten van gesorteerde cellen van de LP-1 cellijn. Doordat beide technieken dezelfde afwijkingen vertoonden, kan hierdoor aangetoond worden dat de array-CGH techniek op niet geamplificeerd DNA van de LP-1 cellijn accurate resultaten oplevert. Vervolgens werd array-CGH ook toegepast op geamplificeerd en uiteindelijk ook op gesorteerd/geamplificeerd DNA van de LP-1 cellijn. De CGH-array resultaten van de verschillende procedures kwamen overeen en bewijzen dat het sorteren en het amplificeren geen invloed op de gedetecteerde chromosomale afwijkingen heeft. Een verdere controle van de resultaten behaalt met array-CGH CGH-arrays gebeurde op gesorteerde PC van een MM staal waarvan de resultaten met conventionele CGH gekend waren.

De resultaten bekomen met deze unieke combinatie van sorteren met behulp van de FACSAria® en kweken van plasmocyten, metafase chromosoom preparatie, metafase-FISH en array-CGH kunnen elkaar aanvullen en een omvattend beeld van chromosomale afwijkingen in een MM patiënt geven. Door onze combinatie van technieken zullen er nieuwe translocaties en chromosomale afwijkingen gevonden worden bij plasmocyten, die meer inzicht kunnen geven in de pathogenese met betrekking op MM patiënten. Vaak is met IFISH op gesorteerde PC een translocatie in het IgH gen in 14q32 gerapporteerd worden. Het is op basis van deze resultaten gekend dat in de helft van deze gevallen de translocatiepartner 4, 11 of 16 is. Met behulp van de metafasen na sorteren kunnen de translocatiepartners met karyotypering, metafase-FISH of multicolour-FISH bepaald worden. Een nieuwe translocatiepartner kan grootschalig met IFISH op gesorteerde cellen onderzocht worden en met klinische gegevens vergeleken worden. Dit zou kunnen lijden tot een nieuwe prognosemarker in MM.

Screening met behulp van array-CGH kan kleinere chromosomale afwijkingen detecteren dan met karyotyping of multicolor-FISH mogelijk is. Daardoor kunnen er dus kleinere afwijkingen zoals microdeleties en –winsten gedetecteerd worden met array-CGH die van belang kunnen zijn in de pathogenese van MM, wat niet mogelijk was bij MM tot nu toe met behulp van andere bestaande technieken. Daarom is array-CGH een ideale aanvulling van multicolor-FISH op de metafase chromosoom preparaten en karyotypering op gesorteerde cellen, voor het opsporen van alle mogelijke chromosomale aberraties

Op deze manier zullen er nieuwe markers gevonden worden die kunnen dienen voor het stellen de diagnose en de prognose bij MM patiënten.

In de toekomst bestaat ook de mogelijkheid om het isoleren van RNA na het sorteren van PC uit te testen om de genexpressie bij MM te onderzoeken. Aan de hand van deze aanpak kan de pathogenese van MM opgehelderd worden als tevens ook gebruikt worden als diagnostische en prognostische methode. Bovendien kan dan ook worden bepaald welke genen een belangrijk therapeutisch doelwit kunnen vormen.

Naderhand kan dit ook bij MGUS patiënten worden toegepast om ook daar meer helderheid te scheppen in de pathogenese en verbetering te creëren bij het stellen van de diagnose en prognose.

6. CONCLUSIE

Als eerste is met dit onderzoek aangetoond dat door het toepassen van cell sorting met behulp van de FACSAria® een zuivere plasmacelsuspensie bekomen wordt die kan gebruikt worden voor allerhande verdere (genetische) technieken zoals celkweek, FISH, PCR en array-CGH. Verder werd ook aangetoond dat het geoptimaliseerde protocol kan toegepast worden om gesorteerde plasmocyten afkomstig uit het beenmerg van MM patiënten te laten prolifereren en metafase chromosoom preparaten te verkrijgen. Vervolgens werden deze metafase chromosoom preparaten gebruikt voor het toepassen van FISH om aan te tonen dat op deze manier het volledige genoom van de MM patiënten gescreend kan worden op chromosomale afwijkingen en translocaties.

Array-CGH werd geoptimaliseerd en toonde aan dat met deze methode submicroscopische microdeleties- en winsten gedetecteerd kunnen worden bij MM patiënten.

Door de combinatie van deze technieken zullen er in verder onderzoek nieuwe chromosomale afwijkingen gedetecteerd kunnen worden die voor een verbetering zullen zorgen bij het stellen van de diagnose en prognose en een beter inzicht geven in de pathogenese bij MM patiënten.

7. REFERENTIES

- 1. Bataille, R. and J.L. Harousseau, multiple myeloma. N Engl J Med, 1997. 336(23) : p. 1677-64
- Charles Janeway, P.T., Merk Walpot, Mark Shlomchik, Chap 7: The Development and survival of Lymphocytes in The immune System in Health an Disease, immunobiology 6th ed. 2004
- 3. URL:http://imgt.cines.fr/textes.IMGTeducation/Turorials/IGandBcells/_UK/MolecularGenetics/a ngfig5.html.
- 4. Kuehl, W.M. and P.L. Bergsagel, Early genetic events provide the basis for a clinical classification of multiple myeloma. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2005: p. 346-352.
- 5. Kaufmann, H., et al., Both IGH translocations and chromosome 13q deletions are early events in monoclonal gammoopathy of undeterminded significance and do not evolve during transition to multiple myeloma. Leukemia, 2004. 18(11): p. 1879-82
- Cohen, H.J., Prevalence of monoclonal gammopathy of undeterminded significance. N EngL J Med, 2006 356(26): p. 2832; author reply 2832
- 7. San Miguel, J.F., J. Sanchez, and M. Gonzalez, Prognostic factors and classification in multiple myeloma. Br J Cancer, 1989. 59(1): p. 113-8.
- 8. Jagannath, S., et al., Autologous bone marrow transplantation in multiple myeloma: identification of prognostic factors. Blood, 1990. 76(9): p. 1860-6
- 9. Alexanian, R. and M. Dimopoulos, The treatment of multiple myeloma. N EngL J Med, 1994. 330(7): p.484-489.
- 10. Greipp. P.R., Prognosis in mueloma. Mayo Clin Proc, 1994.69(9): p.895-902.
- 11. Fassas, A. and G. Tricot, Results of high-dose treatment with autologous stem cell support on patients with multiple myeloma. Semin Hematol,2001. 38(3): p.231-242.
- 12. Kumar, C., Robbins, The hematopoetic and lyphoid systems, in basic pathology. 2003. p. 430-431
- 13. URL:http://www.multiplemyeloma.org/about<-myeloma/2.05.php
- 14. O'conell, T.X.,T.J. Horita, and B. Kasravi, Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. Am Fam Physician, 2005. 71(1): p. 105-112.
- 15. van Lochem EG, Wind HK, van Lom K, Westerdaal NAC, Wu KL, Hooijkaas H, van Dongen JJM. Nieuwe diagnostische toepassingen van flowcytometrie. Rotterdam: afdeling Immunologie, Erasmus iniversitair Medisch Centrum Rotterdam; 2003. p. 87-99.
- 16. Salmon SE, C.J., Cancer: principles and practice of oncology 4th ed. Plasma cell neoplasms, p 1984-2025. 1993, Lippincott Philadelphia.
- 17. Henon, P.R., Blood stem cell autografts in malignant blood disease: the French experience with a special focus on myeloma. The France Autogreffe Group (FAG). Haematologica, 1990. 75 Suppl 1: p. 53-9.
- 18. Smith A, Wisloff F and Samson D. Goudelines on the diagnosis and management of multiple myeloma 2005. Br J Heamatology 2005; 132: 410-451.
- 19. Durie BG, Salmon SE. Multiple myeloma, macroglubulinemia, and monoclonal gammopathies. In Hoffbrand AV, Brain MC, Hirsch J, eds. Recent Advances in Heamatology. Edinburgh: Churchill-Livingstone; 1977. P. 243.
- 20. Alexanian R. Localized and indolent myeloma. Blood 1980; 56:521-525.
- 21. Kyle RA, Greipp PR. Smoldering multiple myeloma. N Eng J Med 1980; 302:1347-1349.
- 22. Kyle RA. Monoclonal gammopathy of undeterminded significance. Natural history in 241 cases. Am J Med 1978;64:814-826.
- 23. Kyle RA. "Benign" monoclonal gammopathy –after 20 to 35 years of follow-up. Mayo Clin Proc 1993;68:26-36.
- 24. Dewald, G.W.,Kyle, R.A., Hicks, G.A., and Greipp, P.R. The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma. Plasma cell leukaemia, or amyloidosis. Blood, 66: p380-390, 1985
- 25. Smadja, N.V., Fruchart, C., Isnard, F., Louvet, C., Dutel, J.L., Cheron, N., Grange, M.J., Monconduit, M., and Bastard, C. Chromosomal analysis in multiple myeloma; cytogenetic evidence of two different diseases. Leukemia (Baltimore), 12:p. 960-969, 1998
- 26. Raijkumar, S.V., Fonseca, R., Dewald, G.W., Therneau, T.M., Lacy, M.Q., Kyle R.A., Greipp, P.R., and Gertz, M.A. Cytogenetic abnormalities correlate with the plasma cell labelling index and extent of bone marrow involvement in myeloma. Cancer Genet Cytogenet., 113: p. 73-77, 1999.
- Lai, J.L., Zandecki, M., Mary, J.Y., Bernardi, F., Izydorczyk, V., Flactif, M., Morel, P., Jouet, J.P., Bauters, F., and Facon, T. Improved cytogenetics in multiple myeloma: a study of 151 patients including 117 patients at diagnosis. Blood, 85: p. 2490-2497, 1995.
- 28. Gould, J., Alexanian, R., Goodacre, A., Pathak, S., Hecht, B., and Barlogie, B. Plasma cell karyotype in multiple myeloma. Blood, 71: p. 453-456, 1988.

- 29. Zandecki, M. Multiple myeloma-almost all patients are cytogenetically abnormal. Br. J. Heamtol., 94: p.217-227, 1996
- 30. Sawyer, J.R., Waldron, J.A., Jgannath, S.,a,d Barlogie, B. Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma. Cancer Genet Cytogenet., 82: p.41-49, 1995.
- Debes-Marun, C., Dewald, G., Bryant, S., Picken, E., Santana-Davila, S., Gonzalez-Paz, N., Winkler, J.M., Kyle, R., Gertz, M., Witzig, T., Dispenzieri, A., Lacy, M., Raijkumar, S., Lust, J., Greipp, P., and Fonseca, R. Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma. Leukomia (Baltimore), 17: p. 427-236, 2003.
- 32. Avet-Loiseau, H., and Bataille, R. Detection of nonrandom chromosomal changes in multiple myeloma by comparative genomic hybridization. Blood, 92: p.2997–2998, 1998.
- Cigudosa, J. C., Rao, P. H., Calasanz, M. J., Odero, M. D., Michaeli, J., Jhanwar, S. C., and Chaganti, R. S. Characterization of nonrandom chromosomal gains and losses in multiple myeloma by comparative genomic hybridization. Blood, 91: p.3007–3010, 1998.
- Gutierrez, N. C., Hernandez, J. M., Garcia, J. L., Canizo, M. C., Gonzalez, M., Hernandez, J., Gonzalez, M. B., Garcia-Marcos, M. A., and San Miguel, J. F. Differences in genetic changes between multiple myeloma and plasma cell leukaemia demonstrated by comparative genomic hybridization. Leukemia (Baltimore), 15: p. 840–845, 2001.
- Avet-Loiseau, H., Andree-Ashley, L. E., Moore, D., II, Mellerin, M. P., Feusner, J., Bataille, R., and Pallavicini, M. G. Molecular cytogenetic abnormalities in multiple myeloma and plasma cell leukemia measured using comparative genomic hybridization. Genes Chromosomes Cancer, 19: p.124–133, 1997.
- 36. Avet-Loiseau, H., Facon, T., Grosbois, B., Magrangeas, F., Rapp, M. J., Harousseau, J. L., Minvielle, S., Bataille, R., and Intergroupe Francophone du Myelome. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. Blood, 99: p.2185–2191, 2002.
- 37. Fonseca, R., Bailey, R. J., Ahmann, G. J., Rajkumar, S. V., Hoyer, J. D., Lust, J. A., Kyle, R. A., Gertz, M. A., Greipp, P. R., and Dewald, G. W. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. Blood, 100: p.1417–1424, 2002.
- 38. Ahmann, G. J., Jalal, S. M., Juneau, A. L., Christensen, E. R., Hanson, C. A., Dewald, G. W., and Greipp, P. R. A novel three-color, clone-specific fluorescence in situ hybridization procedure for monoclonal gammopathies. Cancer Genet Cytogenet., 101: p.7–11, 1998.
- 39. Fonseca, R., Harrington, D., Oken, M., Kyle, R., Dewald, G., Bailey, R., Van Wier, S., Henderson, K., Hoyer, J., Blood, E., Kay, N., Van Ness, B., and Greipp, P. Myeloma and the t(11;14)(q13;q32) represents a uniquely defined biological subset of patients. Blood, 99: p.3735–3741, 2002.
- 40. Fonseca, R., Harrington, D., Oken, M., Dewald, G., Bailey, R., Van Wier, S., Henderson, K., Blood, E., Rajkumar, S., Kay, N., Van Ness, B., and Greipp, P. Biologic and prognostic significance of interphase FISH detection of chromosome 13 abnormalities (□13) in multiple myeloma: an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Study. Cancer Res., 62: p.715–720, 2002.
- 41. Fonseca, R., Blood, E., Rue, M., Harrington, D., Oken, M. M., Kyle, R. A., Dewald, G. W., Van Ness, B., Van Wier, S. A., Henderson, K. J., Bailey, R. J., and Greipp, P. R. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. Blood, 101: p.4569–4575, 2003.
- 42. Avet-Loiseau, H., Facon, T., Daviet, A., Godon, C., Rapp, M. J., Harousseau, J. L., Grosbois, B., and Bataille, R. 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. Intergroupe Francophone du Myelome. Cancer Res., 59: p.4546–4550, 1999.
- 43. Sawyer, J. R., Lukacs, J. L., Munshi, N., Desikan, K. R., Singhal, S., Mehta, J., Siegel, D., Shaughnessy, J., and Barlogie, B. Identification of new non-random translocations in multiple myeloma with multicolor spectral karyotyping. Blood, 92: p.4269–4278, 1998.
- 44. Sawyer, J. R., Lukacs, J. L., Thomas, E. L., Swanson, C. M., Goosen, L. S., Sammartino, G., Gilliland, J. C., Munshi, N. C., Tricot, G., Shaughnessy, J. D., Jr., and Barlogie, B. Multicolour spectral karyotyping identifies new translocations and a recurring pathway for chromosome loss in multiple myeloma. Br. J. Haematol., 112: p.167–174, 2001.
- 45. Tricot, G., Barlogie, B., Jagannath, S., Bracy, D., Mattox, S., Vesole, D. H., Naucke, S., and Sawyer, J. R. Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of chromosome 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities. Blood, 86: p.4250–4256, 1995.
- 46. Munshi, N. C., Anaissie, E., Spoon, D., Siegel, D., Jagannath, S., Vesole, D., Epstein, J., Shaughnessy, J., Fassas, A., Lim, S., Roberson, P., and Crowley, J. Results of high-dose therapy for 1000 patients with multiple myeloma: durable complete remissions and superior survival in the absence of chromosome 13 abnormalities. Blood, 95: p.4008–4010, 2000.

- 47. Tricot, G., Sawyer, J. R., Jagannath, S., Desikan, K. R., Siegel, D., Naucke, S., Mattox, S., Bracy, D., Munshi, N., and Barlogie, B. Unique role of cytogenetics in the prognosis of patients
- 48. Fonseca, R., Harrington, D., Oken, M., Dewald, G., Bailey, R., Van Wier, S., Henderson, K., Blood, E., Rajkumar, S., Kay, N., Van Ness, B., and Greipp, P. Biologic and prognostic significance of interphase FISH detection of chromosome 13 abnormalities (□13) in multiple myeloma: an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Study. Cancer Res., 62: 715–720, 2002.with myeloma receiving high-dose therapy and autotransplants. J. Clin. Oncol., 15: p.2659–2666, 1997.
- 49. Moreau, P., Facon, T., Leleu, X., Morineau, N., Huyghe, P., Harousseau, J. L., Bataille, R., and Avet-Loiseau, H. Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. Blood, 100: 1579–1583, 2002.
- 50. Chesi, M., Nardini, E., Lim, R., Smith, K., Kuehl, W., and Bergsagel, P. The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. Blood, 92: 3025–3034, 1998.
- 51. Sawyer, J. R., Lukacs, J. L., Thomas, E. L., Swanson, C. M., Goosen, L. S., Sammartino, G., Gilliland, J. C., Munshi, N. C., Tricot, G., Shaughnessy, J. D., Jr., and Barlogie, B. Multicolour spectral karyotyping identifies new translocations and a recurring pathway for chromosome loss in multiple myeloma. Br. J. Haematol., 12: 167–174, 2001.
- 52. Liu, P., Leong, T., Quam, L., Billadeau, D., Kay, N. E., Greipp, P., Kyle, R. A., Oken, M. M., and Van Ness, B. Activating mutations of N- and K-ras in multiple myeloma show different clinical associations: analysis of the Eastern Cooperative Oncology Group Phase III Trial. Blood, 88: 2699–2706, 1996.
- Drach, J., Ackermann, J., Fritz, E., Kromer, E., Schuster, R., Gisslinger, H., DeSantis, M., Zojer, N., Fiegl, M., Roka, S., Schuster, J., Heinz, R., Ludwig, H., and Huber, H. Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventionaldose chemotherapy. Blood, 92: 802– 809, 1998.
- 54. URL: http://www.pathweb.nl/Pages/reeds/jaargang%20vap%203/0304degraaf/Her2neu.htm
- 55. Tchnida J, volpert S, Kropff M, Berdel WE, Kienast J, Meinhardt F, Horst J. Frequent gains of the short arm of chromosome 9 in multiple myeloma with normal G-banded karyotype detected by comperatiev genomic hybridisation. Am, J, Clin. Pathol 2004; 122:p. 875-882
- 56. Perez Losada, A;, et al., chromosomal and in vitro culture studies in a case op primary plasma cell leukaemia. Cancer Genet Cytogenet. 1994. 76(1):p 36-38.
- 57. Steiblen G, et al., Comparison of the relative sensitivity of human lymphocytes and mouse splenocytes to two spindle poisons. Mutat Res, 2005. 588(2):p 143-151.
- 58. Sole, F, et al., A new translocation t(11;13)(q13;q14) in a mature B-cell neoplasm. Heamatologica, 2002. 87(7): p. 777-778.
- 59. Fliss-Jaber, L., et al., Cytokine and immunoglobulin production by PWM-stimulated peripheral and tumor-infiltrating lymphocytes of undifferentiated nasopharyngeal carcinoma (NCP) patients. BMC Cancer, 2004. 4:p68.

Auteursrechterlijke overeenkomst

Opdat de Universiteit Hasselt uw eindverhandeling wereldwijd kan reproduceren, vertalen en distribueren is uw akkoord voor deze overeenkomst noodzakelijk. Gelieve de tijd te nemen om deze overeenkomst door te nemen, de gevraagde informatie in te vullen (en de overeenkomst te ondertekenen en af te geven).

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling: **Optimalisatie van metafase-cytogenetica en array comperatieve genomische hybridisatie op immuunfenotypische plasmacelpopulaties** Richting: **Master in de biomedische wetenschappen** Jaar: 2007 in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Ik ga akkoord,

Ellen Dirkx

Datum: 19.06.2007