

Uysal, A. (1990)

Genotypisierung des humanen *abl*-Onkogens bei verschiedenen Patientengruppen und Nachweis von *bcr*-Rearrangements bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie.

Hannover, Tierärztl.Hochsch., Diss.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Dissertation behandelt 1) den Vergleich dreier DNA-Gewinnungsmethoden hinsichtlich der Ausbeute aus unterschiedlich ungerinnbar gemachten Vollblutproben, 2) die Durchführung und Auswertung molekularbiologischer Untersuchungen zur Genotypisierung des *abl*-Onkogenortes bei drei humanen Versuchsgruppen (immunsupprimierte Herztransplantatempfänger, Onkologie- und Hämatologiepatienten sowie Kontrollpersonen) und 3) die Untersuchung von immunsupprimierten Herztransplantatempfängern sowie Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) auf CML-spezifische Genrearrangements.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1) Es wurden drei DNA-Gewinnungsmethoden unter den Aspekten Ausgangsblutmenge und Art der Ungerinnbarmachung miteinander verglichen. Es stellte sich heraus, daß größere Blutmengen die Ausbeute positiv beeinflussen, aber keinen Einfluß auf die Reinheit der DNA-Präparationen haben. Methode III (Anwendung von Natriumperchlorat) war nicht an heparinisierten Vollblutproben durchführbar, lieferte aber bei mit EDTA versetzten Proben gute Reinheitsgrade (die Ausbeute betrug hier $55,2 \pm 30,5$ µg/ml, die OD_{260}/OD_{280} lag bei $1,84 \pm 0,10$).

Die Methode II (Phenolextraktion) erwies sich als die Methode der Wahl bei heparinisierten Blutproben (die Ausbeute betrug hier $54,6 \pm 41,1$ µg/ml, die OD_{260}/OD_{280} lag bei $1,67 \pm 0,13$).

2) Durch Restriktionsspaltung mit *Pst*I und Hybridisierung mit einer *v-abl*-Sonde konnten die drei für *abl* bekannten Genotypen nachgewiesen werden (67 x A; zehn x AB und ein x BB). Dabei traten Unterschiede zu Angaben bezüglich Fragmentlänge und Fragmentanzahl in der einzigen direkt vergleichbaren Literaturstelle auf, wobei wahrscheinlich für die unterschiedlichen Fragmentlängen methodische Gegebenheiten und für die unterschiedliche Fragmentanzahl die Verwendung verschiedener Sonden verantwortlich sind.

Die Genotypbestimmung wurde durch diese Befunde nicht gestört. Hinsichtlich der Gruppen der Herztransplantierten und der Kontrollpersonen konnten weder zwischen diesen beiden noch im Vergleich jeweils einer dieser Gruppen mit in der Literatur beschriebenen Gruppen von Normalpersonen signifikante Unterschiede in der Genotyphäufigkeit gefunden

werden. Die Allelfrequenz lag in der Gruppe der Herztransplantatempfänger und der Kontrollgruppe bei 0,95 für das A-Allel und 0,05 für das B-Allel.

Die Gruppe der Onkologie- und Hämatologiepatienten hatte Allelfrequenzen von 0,81 und 0,19 für das A- bzw. das B-Allel. Dieser Wert erwies sich als signifikant unterschiedlich zu den Herztransplantierten ($p \leq 0,05$) und zur Kontrollgruppe ($p \leq 0,10$). Auch zu den bei klinisch gesunden Personen erhobenen Befunden in der Literatur ergaben sich signifikante Unterschiede. Obgleich auch hier bei einem der Vergleiche die Signifikanz nur auf dem Niveau von $p \leq 0,10$ festgestellt werden konnte, erscheint der Unterschied doch bemerkenswert und wird im Zusammenhang mit dem Phänomen der individuellen endogenen Tumorprädisposition diskutiert.

3) Unter Verwendung einer käuflichen *bcr*-Sonde konnten methodische Bedingungen für ein Screeningverfahren auf CML-spezifische *bcr*-Rearrangements erarbeitet werden. Die ersten 24 untersuchten Herztransplantatempfänger wiesen kein solches Rearrangement auf. Bei sechs von sieben untersuchten CML-Patienten konnten *bcr*-Rearrangements mit unterschiedlichen Größen der rearrangierten Banden festgestellt werden. Einer der CML-Patienten wies kein solches Rearrangement auf.

Uysal, A. (1990):

Genotyping of the human *abl* onkogene in different groups of patients and demonstration of *bcr* rearrangements in patients with chronic myelogenous leukemia.

Hannover, Tierärztl.Hochsch., Diss.

VII SUMMARY

The present thesis deals with i) comparison of three DNA isolation methods from differently anticoagulated whole blood specimens concerning yield and purity, ii) performance and evaluation of molecular biological examinations in genotyping the *c-abl* gene locus in three human groups (immunosuppressed heart transplant recipients, patients with oncological and hematological disorders, and a normal control group), and iii) examination of immunosuppressed heart transplant recipients and patients with chronic myelogenous leukemia (CML) for CML specific gene rearrangements.

1) Three DNA isolation methods have been compared with regard to the initial amount of blood and the way of anticoagulation.

It appeared that larger initial amounts of blood have a positive influence on the relative DNA yield but do not influence the purity of isolated DNA (EDTA anticoagulated blood, method III). Method III proved to be not applicable to heparin anticoagulated blood specimens, but it yielded good quality preparations, especially as for the purity, when EDTA anticoagulated blood was used (here the yield was 55.2 ± 30.5 $\mu\text{g/ml}$, and the $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ratio was at 1.84 ± 0.10). Method II proved to be the method of choice for DNA isolation from heparinised blood (here the yield was 54.6 ± 41.1 $\mu\text{g/ml}$, and the $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ratio was at 1.67 ± 0.13).

ii) Digestion with the restriction endonuclease *Pst*I and hybridization with a *v-abl* probe demonstrated the three known human *abl* genotypes (AA: 67 cases, AB: 10 cases, BB: 1 case). There appeared differences in the number and size of detectable fragments with respect to number and size of fragments described in the literature. These differences may be explained partly (size) by methodical parameters, partly (number) by the use of different probes.

However, this discrepancy did not disturb the estimation of genotypes, neither between the group of heart transplant recipients and control persons nor between one of these groups and control groups described in the literature any significant difference between the frequencies of genotypes could be found. The allele frequencies in these two groups are 0.95 for the A allele and 0.05 for the B allele.

The group of patients with oncological and hematological disorders showed allele frequencies of 0.81 for the A allele and 0.19 for the B allele. This is significantly different from the allele frequencies in heart transplant recipients ($p \leq 0,05$) and in control persons ($p \leq 0,10$). In comparison with the control groups described in literature, too, there are significant differences. In one of these comparisons the level of significance was likewise only at $p \leq 0,10$. However, the difference appears to be noteworthy and is discussed in relation to the phenomenon of individual endogenous predisposition for neoplastic disorders.

iii) By the use of a commercial *bcr* probe it was possible to provide methodical conditions for a screening procedure with regard to CML specific *bcr* rearrangements. None of 24 examined heart transplant recipients showed such a rearrangement. In 6 of 7 CML patients it was possible to demonstrate *bcr* rearrangements with differentially sized rearranged bands. In one of the CML patients there was no additional rearranged band after hybridization with the *bcr* probe used.