

6. Zusammenfassung

Fabian Kausche

Molekulargenetische Bestimmung des Rearrangements von *bcr-abl* bei Patienten mit histopathologisch definierten chronisch myeloproliferativen Erkrankungen

* * *

Das *bcr-abl*-Rearrangement ist das molekulare Äquivalent einer Neoplasie-assoziierten Chromosomen-Translokation beim Menschen, dem sogenannten Philadelphia-Chromosom. Dieses Markerchromosom kann in 90 - 95% der Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) gefunden werden.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 114 Patienten molekulargenetisch auf das Vorliegen des *bcr-abl*-Rearrangements untersucht. 74 Patienten hatten eine nach der Hannover-Klassifikation diagnostizierte CMPE. Weiterhin wurden sechs Patienten mit akuten Leukämien, sieben Patienten mit reaktiven Hyperplasien der Granulopoese und 14 Patienten mit der histologischen Diagnose eines myelodysplastischen Syndroms (MDS) untersucht.

Die DNS zur molekulargenetischen Untersuchung wurde dabei aus Leukozyten peripheren Venenblutes, Kurzzeitkulturen oder mit Methanol-Eisessig fixierten cytogenetischen Präparationen isoliert. Es kamen zwei verschiedene Verfahren zur Anwendung, die entweder die gleichzeitige Isolierung von DNS und RNS, oder die Isolierung von DNS alleine ermöglichten. Die isolierte DNS wurde mit den Restriktionsendonukleasen Bgl II und Hind III verdaut und in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Ein Transfer auf eine Nylon-Membran mittels eines Kapillarblots schloß sich an. Die auf der Membran immobilisierte DNS wurde sodann simultan gegen zwei radioaktiv markierte Sonden, die 5'- und 3'-Bereichen der

breakpoint cluster region (*bcr*) homolog waren, hybridisiert. Nach einer Autoradiographie von 2 bis 14 Tagen wurden die belichteten Filme ausgewertet.

In der Gruppe der CMPE wurde das *bcr-abl*-Rearrangement nur bei Patienten mit der histologischen Diagnose einer CML gefunden. Keiner der Patienten mit anderen CMPE außer CML, wie chronisch megakaryozytärer granulozytärer Myelose (CMGM), Polycythaemia vera (P. vera), primärer Thrombozythämie (PTH) oder unklassifizierbaren CMPE wies ein *bcr-abl*-Rearrangement auf. Die Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchung unterstützten die histologischen Diagnosen nach der Hannover-Klassifikation in allen untersuchten Fällen.

Keiner der Patienten mit anderen neoplastischen oder nicht neoplastischen Knochenmarkserkrankungen, außer einer akuten Leukämie, wies ein *bcr-abl*-Rearrangement auf. Ein Patient mit einer akuten lymphatischen Leukämie hatte ein molekulargenetisch nachweisbares Gen-Rearrangement. Bei vier Patienten konnte mit Hilfe der molekulargenetischen Untersuchung der histologisch geäußerte Verdacht einer CML gesichert werden.

Zusätzlich wurden 13 Patienten untersucht, von denen kein histologischer Befund vorlag. Klinische Verdachtsdiagnosen einer CML und molekulargenetische Ergebnisse stimmten in sechs von neun untersuchten Patienten überein.

Von 92 der 114 untersuchten Patienten lag ein cytogenetischer Befund vor. In keinem Fall wurde ein abweichendes Ergebnis in der cytogenetischen und molekulargenetischen Untersuchung erzielt. Es gelang jedoch in vier Fällen, in denen wegen Mangel an teilungsfähigen Zellen im zur Cytogenetik eingesandten Knochenmarksaspirat eine cytogenetische Präparation erfolglos verlaufen war, ein molekulargenetisches Ergebnis zu erzielen.

Die molekulargenetische Untersuchung stellt also eine sinnvolle Ergänzung der morphologischen und cytogenetischen Untersuchung bei Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen dar. Mit der hier beschriebenen Methodik kann ein *bcr-abl*-Rearrangement auch in den Fällen nachgewiesen werden, in denen kein

Knochenmark zur cytogenetischen Präparation zur Verfügung steht, oder in denen nicht genügend teilungsfähige Zellen für eine cytogenetische Präparation zur Verfügung stehen.

7. Summary

Fabian Kausche

Detection of *bcr-abl*-Rearrangement Using Molecular Genetic Methods in Patients With Histologically Classified Chronic Myeloproliferative Diseases

* * *

The rearrangement of the oncogenes *bcr-abl* is the molecular equivalent of a neoplasia-associated chromosomal translocation in humans, the Philadelphia-chromosome (Ph¹). The Ph¹ is present in 90 - 95% of humans with chronic myelogenous leukemia (CML), one entity in the group of chronic myeloproliferative diseases (CMPD).

In this work, a total of 114 patients were examined for the presence of the *bcr-abl*-rearrangement. Seventy-four patients were diagnosed as having CMPD, according to the Hannover-Classification of CMPD. Additionally, 6 patients with acute leukemias, 7 patients with reactive hyperplasia of granulopoiesis, and 14 patients with the histologic diagnosis of myelodysplastic syndromes (MDS) were examined.

The DNA was isolated either from leukocytes of peripheral blood samples, short time cultures of bone marrow aspirate or blood, or from cytogenetic preparations which were fixed in methanol-glacial acetic acid. The DNA was isolated by two different methods. One of the methods applied allowed the simultaneous isolation of DNA and RNA, the other method yielded only DNA. The DNA obtained was digested by the restriction enzymes Bgl II and Hind III and was separated by electrophoresis in an agarose gel. Electrophoresis was followed by a Southern transfer via capillary blot onto a nylon membrane. The DNA immobilized on the nylon membrane was then simultaneously hybridized with two radioactive gene probes which were homologous to 3' and 5' regions of the breakpoint cluster region (*bcr*). The Southern blots were then autoradiographed and the exposed films were processed and evaluated.

In the group of CMPD the rearrangement of *bcr-abl* was exclusively present in patients with the histologic diagnosis of CML. None of the patients with other CMPD except CML, that is chronic megakaryocytic granulocytic myelosis (CMGM), Polycythemia vera (P. vera), primary thrombocythemia (PTH), or unclassifiable CMPD (CMPD.UC), had a detectable rearrangement of *bcr-abl*. The results of the molecular genetic examination supported the histologic diagnosis made according to the Hannover classification in all cases. None of the patients with other neoplastic or non-neoplastic diseases of the bone marrow, except for one acute leukemia, had a *bcr-abl*-rearrangement. The *bcr-abl*-rearrangement was detected in one patient with the histologic diagnosis of acute lymphatic leukemia. In four patients, the histologically suspected CML could be confirmed by molecular genetic detection of the *bcr-abl*-rearrangement.

Additionally, 13 patients with clinical and without histologic diagnosis at time of examination were tested for the presence of the *bcr-abl*-rearrangement. Clinical diagnosis and molecular genetic results agreed in 6 of 9 patients with the clinical diagnosis of CML.

A cytogenetic evaluation was available in 92 of 114 patients examined. In all cases examined the results of classical cytogenetics and molecular genetics did not differ considering the presence of the Ph¹-translocation. However, four cases that could not be evaluated cytogenetically due to the absence of sufficient dividing cells in the sample, could be examined by molecular genetic analysis.

Molecular genetic examination, therefore, was shown to be a useful addition to the morphological and cytogenetic examination in patients with CMPD. The method described in this dissertation can be used for the detection of the *bcr-abl*-rearrangement in cases where no bone marrow is available for the cytogenetic preparation or where a cytogenetic preparation is unsuccessful due to the absence of dividing cells.