

Ulrike Rita Mathieu-Strauß  
Dr. sc. hum.

## **Validierung molekular-zytogenetischer Methoden zum Nachweis chromosomaler Veränderungen in akut lymphatischer Leukämie (ALL)**

Geboren am 04.04.65 in Heidelberg  
Reifeprüfung am 23.06.1984 am Überwald-Gymnasium Wald-Michelbach  
Studiengang der Fachrichtung Diplom-Biologie vom WS 1985/86 bis WS 1991/92  
Vordiplom am 23.11.87 an der Universität Heidelberg  
Diplom am 24.03.92 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Humangenetik  
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Peter Lichter

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Validierung molekular-zytogenetischer Methoden für den Nachweis chromosomaler Veränderungen bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL). Im Vordergrund standen dabei zwei methodische Ansätze, die Interphase-Zytogenetik und die vergleichende genomische Hybridisierung (CGH).

Die Fluoreszenz- in situ Hybridisierung (FISH) mit selektierten DNA-Sonden erlaubt den Nachweis genomischer DNA auf Metaphasechromosomen und in Interphasekernen von ALL.

Im Zuge dieser Arbeit wurde für die Interphase-Zytogenetik eine Serie von DNA-Sonden etabliert und validiert.

Für zwei strukturelle chromosomale Veränderungen, die die chromosomalen Regionen 19p13 (TCF-3-Lokus) und 9p21 (CDKN2-Gen) betrafen, wurden verschiedene DNA-Sondensätze zusammengestellt. Während das diagnostische Potential der Translokation t(1;19)(q23;p13) auf einer Zelllinie etabliert wurde, wurde eine spezifische Sonde (cosp16) auf Chromosom 9p21 erfolgreich an Patientenmaterial angewendet. Im Zuge dieser Arbeit wurde gefunden, daß eine Deletion des CDKN2-Gens auf 9p21 in T-ALL sehr häufig (6/7 Fällen, 86%), in B-ALL dagegen selten (1/23 Fällen, 4%) ist.

Der Nachweis der bei der ALL auftretenden Hyperdiploidien wurde in 40 ALL-Fällen mit einem ausgewählten DNA-Sondensatz in einer quantitativen Studie durchgeführt. Die DNA-Sonden wurden nach der Häufigkeit der numerisch-veränderten Chromosomen selektiert. Sechs alhoide Sonden, spezifisch für die Chromosomen 4, 10, 17, 18, 22 und X und zwei Cosmide, spezifisch für die Chromosomen 14 und 21 wurden für diesen Ansatz zusammengestellt. Es zeigte sich, daß mit den gegenwärtigen Analysetechniken der Aufwand einer Interphase-Zytogenetik, bei der mehr als 200 Kerne ausgewertet werden, für einen Vielfarbenansatz mit mehr als drei verschiedenen DNA-Sonden zu groß ist. Die weiteren Untersuchungen wurden in Zwei- bis Drei-Farbenexperimenten mit verschiedenen Kombinationen der DNA-Sonden durchgeführt.

Die Ergebnisse der Interphase-Studie wurden mit den Daten der Bänderungsanalyse in einer „Blindstudie“ verglichen. Von 15 mit der Bänderungsanalyse nachgewiesenen hyperdiploiden Fälle wurden 11 mit der Interphase-Zytogenetik ebenfalls als Hyperdiploid diagnostiziert. Diese Resultate zeigen, daß der Sondensatz deutlich erhöht werden müßte, um alle Aberrationen zu erkennen. Dieser Aufwand scheint in der Zukunft nur bei

Einführung automatischer Zählverfahren gerecht zu sein, deren Anwendung dann alternativ zu der bisherigen Bänderungsanalyse erfolgen könnte.

Obwohl in 29 Fällen weitere numerische Veränderungen, beispielsweise tetrasome Chromosomen, nachgewiesen wurden, konnten keine zusätzlichen Fälle mit über 50 Chromosomen gefunden werden.

Für die CGH-Analyse, mit der in einem Experiment Unter- und Überrepräsentationen chromosomalen Materials nachgewiesen werden können, standen zwei Auswertssysteme zur Verfügung, die miteinander verglichen wurden. Die Detektion von mehr als 46 Chromosomen war in 13 von 16 Fällen möglich, in drei Fällen mit tetraploidem Chromosomensatz konnte aufgrund der Limitierung dieser Technik kein Nachweis hyperdiploider Chromosomensätze erbracht werden.

Um die chromosomalen Veränderungen bei ALL möglichst genau zu erfassen, ist eine Kombination der beschriebenen Techniken erforderlich. Unter der Perspektive der zu erwartenden Entwicklung automatisierter FISH-Diagnosen, die die Verwendung einer großen Anzahl von DNA-Sonden erlauben, scheint eine Fokussierung auf die Interphase-Diagnostik realistisch.