

Aus der Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie

(Prof. Dr. med. L. Trümper )

im Zentrum Innere Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Inzidenz von therapieinduzierten, AML-assoziierten  
genetischen Aberrationen am Beispiel der Translokationen  
t(8;21), t(9;22) und Inversion 16**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Ivonne Schwiertz, geb. Weinert  
aus  
Bad Salzungen

**Göttingen 2015**

**Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H.K. Kroemer**

**I. Berichterstatter: PD Dr. med. J. Bäsecke**

**II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Jochen Reiß**

**III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Rainer Mausberg**

**Tag der mündlichen Prüfung: 08. Mai 2017**

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.2 Leukämie.....	1
1.2.1 Akute Leukämien (AML, ALL) .....	1
1.2.2 Chronische myeloische Leukämie (CML) .....	3
1.3. Lymphome .....	4
1.3.1 Hodgkin-Lymphom.....	4
1.3.2 Non-Hodgkin-Lymphom.....	5
1.3.3 Therapie der Non-Hodgkin-Lymphome.....	5
1.3.4 Entstehung von Sekundärleukämien.....	6
1.4 Fragestellung dieser Dissertation .....	7
2. Material und Methoden.....	8
2.1 Geräte und Reagenzien .....	8
2.2 Probenmaterial .....	10
2.3 Aufbereitung der Proben .....	13
2.4 RNA-Extraktion.....	13
2.5 RNA-Konzentrationsbestimmung.....	14
2.6 c-DNA-Synthese aus RNA mittels Reverser Transkription.....	15
2.7 ABL-PCR.....	15
2.8 primäre und nested PCR .....	17
2.9 Gelelektrophorese und Fluoreszenz .....	19
3. Ergebnisse .....	21
3.1 Studienkollektiv .....	21
3.2 Kontrollgruppe .....	27
4. Diskussion.....	32
5. Zusammenfassung.....	37
6. Literaturverzeichnis .....	38
7. Abkürzungsverzeichnis .....	44
8. Abbildungsverzeichnis .....	46
9. Tabellenverzeichnis.....	47

# 1. Einleitung

## 1.2 Leukämie

An der Entstehung einer AML, ALL und CML sind bestimmte genetische Aberrationen beteiligt. Im Rahmen dieser Dissertation befaße ich mich speziell mit den Translokationen t(8;21) und t(9;22) sowie der Inversion inv(16) und den damit verknüpften Krankheitsbildern.

Aberration/Fusionsgen	Erkrankung
t(8;21)/ AML1-ETO	häufigste strukturelle Chromosomenaberration bei AML
t(9;22)/ BCR-ABL	sog. "Philadelphia-Chromosom", ursächlich für CML, AML, ALL
inv(16)/CBF $\beta$ -MYH11	M4Eo-AML (AML-Subtyp mit abnormen Eosinophilen im Blutausstrich)

*Tabelle 1: genetische Aberrationen als Ursache verschiedener Leukämien*

Die Ursachen der krankheitsauslösenden genetischen Aberrationen sind vielgestaltig. Die Exposition von ionisierender Strahlung, Medikamente (beispielsweise Zytostatika), langjähriger Kontakt mit Benzol oder auch Viruserkrankungen (HTLV-1 Virus) kommen als Auslöser in Betracht. Ein vermehrtes Auftreten in Kombination mit anderen genetischen Erkrankungen wie z.B. dem Down-Syndrom, Klinefelter-Syndrom oder der Fanconi-Anämie ist bekannt.

### 1.2.1 Akute Leukämien (AML, ALL)

Laut SEER-Studie (Howlader et al. 2011) erkranken pro Jahr auf 100.000 Einwohner 12,5 Menschen an Leukämie. Mehr als 50% aller Leukämien treten in der Altersgruppe der über 65jährigen auf. Obwohl die Inzidenzen für das männliche Geschlecht bei allen Leukämieformen deutlich höher sind als für das weibliche Geschlecht, bestehen bezüglich der Fallzahlen - besonders in höheren Altersklassen - nur noch geringe Differenzen. Grund dafür ist unter anderem die geringere Lebenserwartung der Männer.

Die AML-Inzidenz liegt bei 3,5/100.000 Einwohner und Jahr (Howlader et al. 2011), die Geschlechterverteilung betrifft die Frauen mit 42%, die Männer mit 58%. Die Inzidenz für ALL beträgt 1,7/100.000 Einwohner und Jahr (Howlader et al. 2011), davon 43% Frauen und 57% Männer.

Typische klinische Indikatoren einer AML sind Anämie, Neutropenie und Thrombozytopenie, gesteigerte Blutungsneigung und wiederholt auftretende opportunistische Infektionen wie z.B. *Candida albicans*. Häufig ist bei Patienten mit T-ALL ein Mediastinaltumor zu finden. Außerdem wird die ALL begleitet von Knochen- und Gelenksschmerzen, Erbrechen und Erregbarkeit durch die ZNS-Beteiligung.

Im Blutbild stellen sich je nach Ausmaß der Knochenmarkinfiltration eine Thrombozytopenie und Anämie dar, außerdem finden sich undifferenzierte Blasten im Ausstrich. Im Unterschied zur chronischen Leukämie finden sich nur selten extrem hohe Leukozytenzahlen größer als 100.000/ $\mu$ l. Bei AML treten Auerstäbchen in bis zu 25% der Fälle auf (Lowenberg et al. 1999). Durch spezielle zytochemische Untersuchungen (Peroxidase, Esterase, PAS-Reaktion) und besonders durchflusszytometrische Charakterisierung lässt sich die AML von der ALL abgrenzen und gemäß der FAB-Klassifikation einordnen. Der zytogenetische Nachweis genetischer Aberrationen und weiterer Parameter dient zur Differenzierung und zur Risikostratifikation akuter Leukämien.

Die AML wird mit intensiven Chemotherapieblöcken (Induktionsphase, Konsolidierungs- und Erhaltungphase) behandelt. Als Medikamente sind Cytarabin und die Anthracycline Daunorubicin bzw. Idarubicin zu nennen (Lowenberg et al. 1999). Gegebenenfalls wird zusätzlich Thioguanin gegeben. Die komplette Remission des Krankheitsbildes nach der Induktionsphase ist prognostisch relevant.

Bei Induktionstherapie gelingt eine komplette Remission bei etwa 70-80% der Patienten mit *de-novo*-AML. Patienten über 60 Jahre weisen eine generell schlechtere Remissionsrate von etwa 50% auf. Die altersbedingten Begleiterkrankungen sowie ungünstigere Ausgangssituationen (Sekundärleukämie, ungünstige Karyotypen) sind als Ursachen zu nennen (Lowenberg et al. 1999). Die 5-Jahres-Überlebensrate dieser Gruppe liegt bei unter 10% (Lowenberg et al. 1999).

Supportiv werden während der Therapie Blutbestandteile (Erythrozyten, Thrombozyten) substituiert und körpereigene Granulozyten mit Wachstumsfaktoren stimuliert. Desweiteren kommen Antibiotika und Antimykotika zum Einsatz.

Signifikante Unterschiede in der 4-Jahres-Überlebensrate ergeben sich zwischen den Gruppen der älteren (>60 Jahre) und jüngeren (<60 Jahre) Patienten. Laut einer Studie der Uni Münster (Büchner et al. 2006) ergeben sich für die ältere Gruppe Überlebensraten von 16%, während die jüngeren Patienten im Schnitt bei 37% liegen. Die Ergebnisse der Chemotherapie können mit anschließender

allogener Stammzelltransplantation signifikant verbessert werden (Burnett et al.1984).

Die Therapie der ALL ist international uneinheitlich. Als Risikofaktoren werden das BCR-ABL-Fusionsgen (Ribera et al. 2002), hohe periphere Leukozytenzahl bei Diagnosestellung, verzögerte Therapieantwort, genetischer Nachweis eines MLL-Fusionsgens, fortgeschrittenes Alter (Mörcke et al. 2005) und ZNS-Befall (Clarke 2003, te Loo 2006) angesehen. Die Chemotherapie gliedert sich auch hier in Induktionsphase, Konsolidierungs- und Erhaltungphase.

### **1.2.2 Chronische myeloische Leukämie (CML)**

Die CML ist eine Krankheit des Erwachsenenalters und tritt mit einer Inzidenz von 1,6 Neuerkrankungen pro 100.000 Erwachsener jährlich auf (Howlader et al. 2011). Ihr Anteil an allen Leukämien beträgt 20% (Howlader et al. 2011). Mit zunehmenden Alter tritt die CML häufiger auf, die Diagnose wird bei einem Altersmedian von 65 Jahren gestellt. Nur 2,6% der Patienten sind bei Diagnosestellung jünger als 20 Jahre, Männer sind 1,4-mal häufiger betroffen als Frauen (Howlader et al. 2011).

Die CML hat drei Krankheitsphasen: chronische Phase, Akzelerationsphase und Blastenschub bzw. Blastenkrise. Das Durchlaufen dieser Krankheitsstadien war die Regel, bevor neue Medikamente und die Stammzelltransplantationstechnik aufkamen. Die Blastenkrise stellte das Endstadium dar und verlief normalerweise tödlich.

Zytologisch findet sich eine starke Steigerung der Myelopoese, aber auch in den Zellreihen der Erythropoese und Megakaryopoese. Zytochemische Tests ergänzen die diagnostischen Möglichkeiten. Das BCR-ABL-Fusionsgen kann in über 90% der CML-Fälle nachgewiesen werden und hat als genetische Ursache den Bruchstücktausch zwischen Chromosom 9 und 22, wodurch ein verkürztes Chromosom 22 entsteht. Die synthetisierte Thyrosinkinase zeigt eine erhöhte Aktivität und induziert eine übersteigerte Leukozytenproduktion, einschließlich eines vermehrten Auftretens unreifer Leukozyten, die letztendlich zur CML führt.

Die Therapie erfolgt mit Thyrosinkinaseinhibitoren wie Imatinib oder Nilotinib, welche die ATP-Bindungsstelle von BCR-ABL hemmt und damit den pathologischen Proliferationsreiz unterdrückt. Die Therapie muß lebenslang durchgeführt werden, da die Rezidivneigung sehr hoch ist. Bei Versagen der Tyrosinkinaseinhibitoren ist die allogene Knochenmarktransplantation eine weitere Therapieoption. Dieses Verfahren birgt die Aussicht auf vollständige Heilung, bringt aber auch nicht

unerhebliche Risiken mit sich. In den letzten Jahren wurden bei der Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren die Überlebensraten deutlich gesteigert.

### **1.3. Lymphome**

Dieser Begriff umschreibt allgemein Lymphknotenschwellungen und Tumoren des Lymphgewebes. In dieser Dissertation befaße ich mich ausschließlich mit den malignen Formen, welche aus B- bzw. T-Lymphozyten hervorgehen.

#### **1.3.1 Hodgkin-Lymphom**

Die Inzidenz der Erkrankung liegt bei 2,8/100.000/Jahr (Howlader et al. 2011), wobei die Verteilung Männer/Frauen mit drei zu zwei angegeben wird. Im zweiten und siebten Lebensjahrzehnt finden sich zwei Krankheitsgipfel. Bis zum Alter von 14 Jahren beträgt die Häufigkeit 0,7 Fälle auf 100.000 Kinder in Deutschland, weltweit beträgt sie 0,6/100.000. Die Verteilung im Geschlechterverhältnis ist identisch mit der der Erwachsenen.

Ätiologisch sind die genauen Ursachen unklar. Vermutlich sind Viren (Epstein-Barr), immunsuppressive Therapien im Zusammenhang mit Transplantationen und fehdifferenzierte B-Lymphozyten für die Entstehung der Krankheit relevante Faktoren. Auffällig sind Lymphknotenschwellungen am Hals, axillär und in der Leistenregion sowie abdominal und mediastinal. Begleitend ist eine B-Symptomatik wie Fieber, Nachtschweiß, unerklärlicher Gewichtsverlust und Abgeschlagenheit. Im fortgeschrittenen Stadium können ZNS-Störungen, hormonelle Dysregulation und vermehrte Infektanfälligkeit dazukommen. Die Verdachtsdiagnose wird mit Zytologie und Immunhistochemie aus peripherem Blut, Knochenmark bzw. Lymphknoten bestätigt. Die Behandlung erfolgt mit Chemotherapie und Radiatio.

### **1.3.2 Non-Hodgkin-Lymphom**

Dieser Begriff umfasst die malignen lymphatischen Erkrankungen, welche kein Morbus Hodgkin sind. Daher handelt es sich um sehr verschiedene Ätiologien, Krankheitsbilder und Therapieansätze. Man kann die Erkrankungen in Abhängigkeit von der Ausgangszelle grob in eine B- (ca. 80 % aller NHL) und eine T-Klasse (ca. 20% aller NHL) unterteilen. Die Inzidenz beträgt etwa 20 Erkrankte auf 100.000 Einwohner pro Jahr (Howlader et al. 2011), Tendenz steigend. Männer sind 1,5-mal häufiger betroffen als Frauen. NHL treten in jedem Lebensalter auf, gehäuft jedoch im höheren Lebensalter. HIV-infizierte-Patienten sind besonders gefährdet. Die Pathogenese ist noch nicht komplett geklärt und aufgrund der Heterogenität der NHL vielgestaltig. Potentiell spielen Strahlungsexposition, externe Noxen (Pestizide) oder Zytostatikatherapie eine Rolle. Auch Autoimmun- oder Infektionserkrankungen werden ebenso wie onkogene Einflüsse durch Viren (Epstein-Barr, HTLV-1, HHV 8) oder Bakterien (*Helicobacter pylori*) diskutiert.

Klinisch imponieren schmerzlose Lymphknotenschwellungen, eventuelle B-Symptomatik, allgemein erhöhte Infektanfälligkeit sowie hämatologische Auffälligkeiten. Typisch sind Anämie, Leukopenie oder Leukozytose, Thrombopenie, erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit, häufig Antikörpermangelsyndrom und erhöhte Laktatdehydrogenase. Die Diagnose wird zytologisch, immunhistochemisch, durchflußzytometrisch und molekular-genetisch gestellt.

### **1.3.3 Therapie der Non-Hodgkin-Lymphome**

In Abhängigkeit vom Stadium, dem Patientenalter und vielen anderen Faktoren bestehen gute Behandlungsmöglichkeiten. Auch eine komplette Remission ist möglich. Mittel der Wahl sind Chemotherapie und Radiatio, entweder solitär oder in Kombination. Insbesondere das CHOP-Schema und Modifikationen hiervon kommen bei hochmalignen NHL in der Erstlinienherapie häufig zum Einsatz.

Dabei werden Cyclophosphamid (C), Doxorubicin (Hydroxydaunorubicin(H)), Vincristin (Onkovin® (O)) und Prednisolon (P) in Kombination eingesetzt. In Kombination mit Etoposid (E) (CHOEP-Schema) konnte bei jüngeren Patienten mit guter Prognose das ereignisfreie Überleben verlängert und die Komplettremissionsrate verbessert werden (Pfreundschuh et al. 2004). Die Gabe von monoklonalen Antikörpern (Rituximab) verbessert die Prognose bei R-CHOP bzw. R-CHOEP-Schema (Coiffier et al. 2002, Feugier et al. 2005). Um die körpereigene Granulozytose zu stimulieren,

werden GCSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) eingesetzt. Die Gefahr der Granulozytopenie und die Infektionsanfälligkeit können damit verringert werden, auch wenn die Komplettremissionsrate, die Dauer des ereignisfreien Überlebens und die Gesamtüberlebenszeit nicht signifikant beeinflusst werden (Ösby et al. 2003).

### 1.3.4 Entstehung von Sekundärleukämien

Bei mittel- und hochdosierter Chemotherapie werden Zytostatika angewandt, die ihrerseits alterierende Auswirkungen auf Zellteilung und -entwicklung haben können. Frühere Studien zeigen direkte Zusammenhänge zwischen der Anwendung von Chemotherapeutika (insbesondere Topoisomerase-II-Inhibitoren) und dem Auftreten von hämatologischen Sekundär malignomen auf (Haase et al. 2004). Diese Sekundärerkrankungen werden als therapieassoziierte Erkrankungen bezeichnet. Alkylantien verursachen typischerweise numerische Chromosomenaberrationen wie z.B. Deletionen der Chromosomen 5 und 7 und führen zu therapieassoziierten myelodysplastischen Syndromen (t-MDS). Topoisomerase-II-Hemmer und Anthrazykline sind mit molekulargenetischen Veränderungen, insbesondere Gentranslokationen wie beispielsweise Translokationen des MLL-Gens und den Translokationen t(8;21), t(9;22) und Inversion 16, assoziiert und führen zu therapieassoziierten akuten myeloischen Leukämien (t-AML) (Pedersen-Bjergaard et al. 2007).

Die t-AML- und t-MDS-induzierende Wirkung von Zytostatika wie Topoisomerasehemmern, Alkylantien und Anthrazyklinen beruht darauf, dass diese Wirkstoffe in den Zellzyklus eingreifen und spezifische genetische Schäden verursachen. Damit wirken sie potentiell onkogen (Pedersen-Bjergaard et al. 2007). Topoisomerase II ist im Rahmen der DNA-Replikation für reversible Doppelstrangbrüche verantwortlich. Topoisomerase-II-Inhibitoren und Anthrazykline verhindern die Reparatur und können so den Austausch von Bruchstücken und die Entstehung von Fusionsgenen wie BCR-ABL und AML1-ETO begünstigen. Auch Inversionen wie inv(16) können durch einen um 180° verdrehten Bruchstückeinbau entstehen und funktional veränderte Transkripte onkogen wirken lassen. Dabei können Bruchpunkte variieren (Dissing et al. 1998). Quesnel et al. konnten bei t-AML-Patienten feststellen, daß 16 von 21 (76%) eine t(8;21) und 12 von 14 (86%) eine inv(16) aufwiesen. In der Literatur finden sich folgende Inzidenzen für die hier beschriebenen Aberrationen im Zusammenhang mit t-AML/MDS: 9% für AML1-ETO und CBF $\beta$ -MYH11 sowie 2% für BCR-ABL (Huret 2003 (a,b,c); Leone et al. 1999). Da die Zahl von Krebspatienten, die mit einer potentiell t-AML-induzierenden Chemotherapie behandelt werden zunimmt, ist es wichtig, die Zusammenhänge zwischen der Art und Dosis der Chemotherapie und dem Auftreten zytogenetischer

Veränderungen aufzuzeigen, um Risiken für sekundäre t-AML abschätzen und Voraussagen treffen zu können.

#### **1.4 Fragestellung dieser Dissertation**

Im Rahmen der MegaCHOEP-Studie der Deutschen Studiengruppe Hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome (DSNHL) wurde untersucht, wie hoch die Inzidenz der durch Normal- und Hochdosis Chemotherapie induzierten genetischen Aberrationen ist, ob die Häufigkeit dieser Aberrationen zur Dosisintensität korreliert ist und ob die Häufigkeit eine Aussage über therapieassoziierte hämatologische Neoplasien, insbesondere t-AML, ermöglicht.

Im Rahmen dieser Studie wurde zu dieser Fragestellung erstmals ein größeres Kollektiv prospektiv untersucht. Hierzu wurden Patienten mit Hochdosistherapie und eine Kontrollgruppe mit konventionell dosierter Therapie auf die oben genannten t-MDS- und t-AML-auslösenden Genveränderungen getestet und miteinander verglichen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Geräte und Reagenzien**

#### **Geräte**

Accu Jet Pro Pipettierhilfe

BioPhotometer

Biofuge pico

Elektrophoresegerät

Kühlschränke -80 °C und -70 °C

Mikrowelle

PCR-Werkbank

Pipetten

RT6000B Kühlzentrifuge

UV-Tisch mit Kamera

Vortex Mischer

Waage

Robo-Cycler Gradient 96

Trio Thermoblock

#### **Verbrauchsartikel**

Biosphere Filter Tips 100µl

Collection Tubes (1.5ml)

Collection Tubes (2ml)

Eppendorfgefäße (2ml,1,5ml,0,5ml,0,2 ml)

Falcon, 50 ml

Filtertip 1000µl

Küvette Photometer

Peha soft Handschuhe

RNeasy Mini Spin Columns

Safe Seal Tips 10µl (*RNase/DNase free/Pyrogen free*)

Serological Pipette 10µl

Wägebapier

**Chemikalien/Reagenzien**

Agarose HEEO Ultra Qualität

Dimethylsulfoxid (DMSO)S

DNase

dNTP

Ethidiumbromid 1:20

EtOH 70%

Paraffinöl

Randomprimer

*RNase free* H<sub>2</sub>O

Taq DNA Polymerase

HPLC H<sub>2</sub>O

**Primer** (van Dongen et al. 1999)

inv(16)

CBFβ-A

MYH11-B1

CBFβ-C

MYH11-D1

t(9;22)

BCR-b1-A

ABL-a3-B

BCR-b2-C

ABL-a3-D

t(8;21)

AML1-A

ETO-B

AML1-C

ETO-D

## **Puffer**

Biocoll Separating Solution, Density 1,077g/ml

Buffer RDD RNase-Free DNase Set

Buffer RLT RNeasy Mini Kit

Buffer RLC RNeasy Mini Kit

Buffer RPE RNeasy Mini Kit

PBS pH 7,4 CaCl<sub>2</sub> MgCl<sub>2</sub>

RLT + 1%ME

TBE 70% EtOH

5x First -Strand Buffer

10x PCR Rxn Buffer (MgCl<sub>2</sub>) 1,25 ml

50mM MgCl<sub>2</sub> 1ml

## **Positivproben**

t (8; 21) nachweislicher Patient UKG

t(9;22 p210) K 562, Zelllinie, bzw. nachweislicher Patient UKG (Probeentnahme

inv(16) ME 1, Zelllinie, bzw. nachweislicher Patient UKG (Probeentnahme 17.05.2005)

## **Humanes Material**

Vollblut

Aphereseblut

Knochenmark

## **Software**

MS Office Access XP

## **2.2 Probenmaterial**

Es wurde Vollblut, Knochenmarkblut und Apheresepräparate von Non-Hodgkin Patienten der Kurzzeitonkologie verwendet. Die Proben wurden nicht nach Alter, Geschlecht oder jeweiligem Therapiezeitpunkt des Patienten unterschieden. Die Patientenklientel setzte sich zusammen aus Patienten in mittlerer Therapie im Dosierungsarm A sowie Patienten in Hochdosistherapie mit

MegaCHOEP im Dosierungsarm B sowie einer Kontrollgruppe mit Patienten in konventioneller Therapie (CHOP, R-CHOP). Beide Arme wurden in A 1 bzw. A 2 sowie B 1 bzw. B 2 untergliedert. Dosierungsarm A umfasste eine Therapie mit 8 Zyklen CHOEP-14 und GCSF (*granulocyte-colony-stimulating-factor*), davon die Untergruppe A 2 zusätzlich mit 6 Zyklen Rituximab. Dosierungsarm B der myeloablativen Hochdosistherapie entsprach 4 Zyklen MegaCHOEP-14 und GCSF, davon die Untergruppe B 2 wieder mit 6 zusätzlichen Zyklen Rituximab.

Dosierungsarm A	A 1	8x CHOEP -14 +GCSF	
	A 2	8x CHOEP -14 +GCSF	+ 6x Rituximab
Dosierungsarm B (myeloablativ)	B 1	4x MegaCHOEP -14 + GCSF	
	B 2	4x MegaCHOEP -14 + GCSF	+ 6x Rituximab

Nach Aufklärung und Einwilligung der Patienten wurden unter Beachtung der Vereinbarung von Helsinki und gemäß der Genehmigung des Ethikrates der Universität Göttingen 20 ml Vollblut entnommen. Als Gerinnungshemmer diente Ethylendiamintetraacetat (EDTA). Insgesamt konnten 124 Proben gewonnen werden, davon 4 Knochenmarksproben, 10 Apheresepräparate und 51 Vollblutproben. Jedem Patienten wurde eine eigene Nummer in der Probandenkartei zugeordnet und die erfolgten Probenabnahmen wurden mit fortlaufenden Nummern codiert. Alle Informationen zu den Proben (Therapiezeitpunkt, Datum der Probe, Stand der Bearbeitung) wurden zusammen mit den Code-Nummern und der Kühlschrankscoordinate im Laborrechner gespeichert.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	SNr.	Hnr.	Nachname	Therapiezeitpunkt	Material	Eingangsdatum	Lysat LP	Extraktion	c(RNA)	260/280	cDNA	ABL	Erg.ABL
65	016	016-7			PBL	20-05-2005	5/H4	22.07.05	20,8	2,11	22.07.05	25.07.05	pos
66	078	078-4			PBL	20-05-2005	5/H5	22.07.05	7,0	3,07	22.07.05	25.07.05	pos
67	095	095-5			PBL	20-05-2005	5/H8	22.07.05	8,2	2,72	22.07.05	25.07.05	pos
68	105	105-4			PBL	11-05-2005	5/G3	22.07.05	5,4	1,77	22.07.05	25.07.05	pos
69	064	064-4			PBL	13-05-2005	5/H1	22.07.05	33,6	1,79	22.07.05	25.07.05	pos
70	030	030-10			PBL	08-04-2005	5/E2						
71	076	076-7			PBL	16-03-2005	5/D4	21.07.05	10,1	3,33	21.07.05	25.07.05	pos
72	024	024-7			PBL	26-01-2005	5/A3	19.07.05	56,9	1,48	20.07.05	21.07.05	pos
73	027	027-9			PBL	18-03-2005	5/D5	21.07.05	48,3	2,15	21.07.05	25.07.05	pos
74	001	001-9			PBL	11-05-2005	5/G5	20.07.05	148,3	1,88	20.07.05	21.07.05	pos
75	030	030-9			PBL	06-07-2005	6/B7	21.07.05	31,6	2,60	21.07.05	25.07.05	pos
76	100	100-7			PBL	12-05-2005	5/G7	21.07.05	37,7	1,90	21.07.05	25.07.05	pos
77	031	031-3			PBL	03-05-2005	5/F8	20.07.05	22,2	1,57	20.07.05	21.07.05	pos
78	043	043-5KM			KM	03-02-2005	KM 5/B1	19.07.05	284,5	1,31	20.07.05	21.07.05	pos
79	041	041-5			PBL	24-05-2005	5/F9	22.07.05	8,5	2,24	22.07.05	25.07.05	pos
80	028	028-6			PBL	12-07-2005	6/C2	20.07.05	90,3	1,93	22.07.05	25.07.05	pos
81	083	083-4			KM	04-03-2005	5/D1	21.07.05	241,1	1,89	21.07.05	25.07.05	pos
82	012	012-4			PBL	03-05-2005	5/F9	20.07.05	21,3	1,53	20.07.05	21.07.05	pos
83	106	106-5			PBL	30-06-2005	6/A7	20.07.05	32,4	2,01	22.07.05	25.07.05	pos
84	076	076-8			PBL	17-06-2005	6/A3	20.07.05	12,3	1,35	22.07.05	25.07.05	pos
85	096	096-3			PBL	30-03-2005	5/D10	21.07.05	102,6	1,89	21.07.05	25.07.05	pos
86	036	036-2			PBL	02-03-2005	5/C7	21.07.05	25,3	3,73	21.07.05	25.07.05	pos
87	131	131-3PB			PBL	14-06-2005	PBL 6/A1	26.07.05	315,8	1,93	08.08.05	08.08.05	pos
88	121	121-3Aph			Stammzellen	21-04-2005	Aph 5/E9	26.07.05	162,6	1,32	08.08.05	08.08.05	pos
89	131	131-3Aph			Stammzellen	14-06-2005	Aph 6/A2	26.07.05	149,2	1,83	08.08.05	08.08.05	pos
90	129	129-1			PBL	31-05-2005	5/H4	26.07.05	194,6	1,32	08.08.05	08.08.05	pos
91	121	121-3PB			PBL	21-04-2005	PBL 5/E8	26.07.05	79,7	1,31	08.08.05	08.08.05	pos
92	121	121-2PB			PBL	21-03-2005	PBL 5/D7	26.07.05	36,0	1,31	08.08.05	08.08.05	pos
93	131	131-2			PBL	20-05-2005	5/H7	26.07.05	24,9	1,61	08.08.05	08.08.05	pos
94	118	118-2			PBL	18-05-2005	5/H2	25.07.05	71,0	1,81	26.07.05	03.05.08	pos
95	112	112-1			Stammzellen	21-02-2005	5/C3	25.07.05	535,8	1,84	26.07.05	29.07.05	pos
96	121	121-2Aph			Stammzellen	21-03-2005	Aph 5/D8	26.07.05	146,5	1,31	08.08.05	08.08.05	pos
97	120	120-1			PBL	31-05-2005	5/H5	26.07.05	98,9	1,31	04.08.05	04.08.05	pos
98	121	121-4PAph			Stammzellen	02-05-2005	Aph 5/F7	26.07.05	55,0	1,36	08.08.05	08.08.05	pos
99	124	124-2			PBL	03-05-2005	5/F10	26.07.05	174,5	1,30	08.08.05	08.08.05	pos
100	126	126-1			PBL	07-07-2005	6/B8	20.07.05	61,4	1,80	22.07.05	26.07.05	pos
101	131	131-4Aph			Stammzellen	04-07-2005	Aph 6/B1	26.07.05	65,3	1,68	08.08.05	08.08.05	pos
102	112	112-2			Stammzellen	05-04-2005	5/E1	25.07.05	824,3	1,74	26.07.05	29.07.05	pos
103	129	129-2			Stammzellen	20-06-2005	6/A4	20.07.05	255,5	1,93	22.07.05	26.07.05	pos
104	108	108-2			PBL	07-03-2005	5/D2	25.07.05	26,4	1,66	26.07.05	29.07.05	pos
105	132	132-2			PBL	06-07-2005	6/B6	20.07.05	13,2	1,37	22.07.05	26.07.05	pos
106	113	113-2			PBL	23-03-2005	5/D9	25.07.05	75,6	1,68	26.07.05	03.08.05	pos
107	097	097-3KM			KM	09-02-2005	KM 5/B3	19.07.05	103,9	1,35	20.07.05	21.07.05	pos
108	107	107-2			PBL	09-06-2005	5/H9	25.07.05	10,0	1,87	26.07.05	29.07.05	pos
109	106	106-4			PBL	14-04-2005	5/E7	25.07.05	34,9	1,71	26.07.05	03.08.05	pos
110	113	113-3			PBL	02-06-2005	5/H7	25.07.05	24,4	1,64	26.07.05	03.08.05	pos
111	097	097-3PB			PBL	09-02-2005	PBL 5/B2	19.07.05	162,9	1,32	20.07.05	21.07.05	pos
112	086	086-5			PBL	22-02-2005	5/C5	21.07.05	56,2	2,23	21.07.05	25.07.05	pos
113	108	108-3			PBL	27-05-2005	5/H2	25.07.05	29,4	1,71	26.07.05	03.08.05	pos
114	094	094-3			PBL	27-04-2005	5/F4	20.07.05	184,8	1,70	20.07.05	21.07.05	pos
115	096	096-2			PBL	02-03-2005	5/C9	21.07.05	119,8	2,03	21.07.05	25.07.05	pos
116	127	127-2PB			PBL	27-04-2005	PBL 5/F3	26.07.05	273,3	1,31	04.08.05	04.08.05	pos
117	138	138-2Aph			Stammzellen	20-07-2005	Aph 6/D8	28.07.05	22,7	1,30	28.07.05	03.08.05	pos
118	135	135-2			PBL	14-07-2005	6/C3	20.07.05	88,3	1,89	22.07.05	26.07.05	pos
119	138	138-2PB			PBL	20-07-2005	PBL 6/D7	28.07.05	32,6	1,30	28.07.05	03.08.05	pos
120	130	130-2			PBL	24-05-2005	5/H10	26.07.05	104,0	1,73	04.08.05	04.08.05	pos
121	127	127-2Aph			Stammzellen	27-04-2005	Aph 5/F4	26.07.05	763,7	1,30	04.08.05	04.08.05	pos
122	095	095-3KM			KM	18-02-2005	KM 5/C1	22.07.05	9,6	2,28	22.07.05	25.07.05	pos
123	095	095-4			PBL	02-05-2005	5/F5	20.07.05	23,7	1,49	20.07.05	21.07.05	pos
124	095	095-3PB			PBL	18-02-2005	PBL 5/C2	22.07.05	27,6	1,76	22.07.05	25.07.05	pos
125	117	117-2			PBL	26-05-2005	5/H10	25.07.05	77,2	1,84	26.07.05	03.08.05	pos

Abbildung 1: Ausschnitt aus der Excel-Tabelle der Studiengruppe, Namen unkenntlich gemacht  
 Erläuterung: SNr: Studiennummer; Hnr=laufende Nummer ; Material: PBL= peripheres Blut, KM= Knochenmark; Eingangsdatum: Tag der Probenabnahme; Lysat LP: Lysatlagerungsplatz in Kühlschranksbox, verschlüsselt durch Koordinaten; Extraktion: Datum der RNA-Extraktion; c(RNA): errechnete RNA-Konzentration in der extrahierten Probe; 260/280: gemessener Extinktionskoeffizient; cDNA: Datum der cDNA-Synthese; ABL: Tag der ABL-Kontrolle; Erg.ABL: Ergebnis der ABL-Kontrolle, pos=positiv, neg=negativ

## 2.3 Aufbereitung der Proben

- Abtrennung der Lymphozyten mittels Ficoll
- Umfüllen in 50 ml Falcon (Sarstedt) und Verdünnen auf 20 ml (bei wenig Probe) bzw. das Doppelte (bei viel Probe)
- Unterschichten von 10 ml Biocoll Separating Solution (Dichte 1,077g/ml) mittels Pipette
- Zentrifugieren bei 4000 Umdrehungen/min und 20 °C (Bremse aus) für 10 Minuten
- Abpipettieren des Lymphozytenringes mittels Pipette in neues Falcon (nicht mehr als 20 ml)
- Auffüllen mit PBS (pH 7,4)
- Zentrifugieren bei 2500 Umdrehungen/min (Bremse ein) für 10 Minuten
- Verwerfen des Überstandes und Lösen des Pellets mit 600µl RLT – Puffer (mit 1 % ME)
- Abpipettieren in ein Eppendorfgefäß und Lagerung bei -70 °C oder
- zügige Weiterverarbeitung

## 2.4 RNA-Extraktion

Mit dem RNeasy Mini Kit® von Qiagen erfolgt gemäß Herstellerprotokoll die Trennung der übrigen Zellbestandteile von der RNA sowie die Reinigung des gewonnenen Erbmaterials von genetischen oder nichtgenetischen Molekülen durch verschiedene Waschvorgänge.

- Auftauen der Zelllysate im Wasserbad bei 37 °C 15 – 20 Minuten
- Pipettieren des gesamten Lysates auf die (violette) Shredder-Säule
- Zentrifugation für 2 Minuten bei 14000 Umdrehungen
- Auffüllen des gewonnenen Eluats auf ein Volumen von ca. 1 ml mit 70 % Ethanol (350 bis 600 µl)
- Pipettieren des Gemisches (Ethanol-Eluat) auf die (rosa) RNeasy-Säule
- Zentrifugation bei 10000 Umdrehungen für 15 Sekunden, Eluat wird verworfen
- Pipettieren von 350 µl RW1-Puffer auf die RNeasy-Säule
- Zentrifugation bei 10000 Umdrehungen/min für 15 Sekunden, Eluat wird verworfen
- Mischen von 10 µl Aliquot *RNase free* DNase mit 70 µl RDD-Puffer und zügiges Pipettieren auf die Säule
- 15 Minuten DNA-Verdau bei Raumtemperatur
- Pipettieren von 350 µl RW1-Puffer auf die Säule

- Zentrifugation bei 10000 Umdrehungen/min für 15 Sekunden, Eluat wird verworfen
- Pipettieren von 500 µl RPE-Puffer, anschließend Zentrifugation bei 10000 Umdrehungen/min für 15 Sekunden
- Pipettieren von 500 µl RPE-Puffer, anschließend Zentrifugation bei 14000 Umdrehungen/min für 2 Minuten
- ggf. optionale Zentrifugation bei 14000 Umdrehungen/min für 1 Minute falls die Säule nicht flüssigkeitsfrei ist
- Umstellen der Säule in ein 1,5-ml-*safe-lock-tube*
- Pipettieren von 30 µl *RNase free* H<sub>2</sub>O mittig auf die Säule
- Zentrifugation bei 8000 Umdrehungen/min für 1 Minute
- Wiederholung der letzten beiden Schritte und Auffangen des Eluats im gleichen Gefäß
- Einfrieren bei -80 °C oder Weiterverarbeiten der gewonnenen RNA

Die verwendete DNase wird folgendermaßen hergestellt:

- DNase in HPLC-H<sub>2</sub>O vollständig auflösen und durchmischen; jeweils 10 µl in 0,2 ml
- Eppendorfgefäße füllen und anschließend einfrieren bei -80 °C.

## 2.5 RNA-Konzentrationsbestimmung

Mittels Extinktion wird der Gehalt an RNA in der Probe photometrisch bestimmt. Es wird mit einer Wellenlänge von 260 bis 280 nm gemessen. Vor Messbeginn wird das Gerät mit *RNase free* H<sub>2</sub>O auf Null geeicht, indem man das Wasser in eine 1-cm-Quarzküvette gibt und die Konzentration bestimmt. Das erste Wasser/Probe-Gemisch wird in den geleerten und getrockneten Messzylinder gegeben und die Konzentration an RNA in µg/µl gemessen. Dazu gibt man 55 µl *RNase free* H<sub>2</sub>O und 3 µl Probe in ein Eppendorfgefäß und mischt mittels Pipette 2-3 Mal durch Aufziehen der Lösung. Konnte keine RNA-Konzentration gemessen werden, wurde die Probe aus der Studie ausgeschlossen. Um in jedem Ansatz exakt 1 µg RNA zu haben, wird mit folgender Rechnung die Menge an Probe ermittelt, die eingesetzt werden musste:

- $1000 \mu\text{g} / \text{Konzentration der Probe } \mu\text{g}/\mu\text{l} = \text{Menge der einzusetzenden Probe in } \mu\text{l}$
- Anschließend wird die Probenmenge mit *RNase free* H<sub>2</sub>O auf 40 µl aufgefüllt

## 2.6 c-DNA-Synthese aus RNA mittels Reverser Transkription

Transkription (Superscript III, Invitrogen)

- Pipettieren von je 1 µg RNA (entsprechend der photometrischen Messung) in ein *tube*
- Auffüllen mit *RNase free* H<sub>2</sub>O auf 40 µl wie bereits beschrieben
- Denaturieren bei 65 °C und anschließende Lagerung auf Eis
- Herstellen des Mastermix aus
  - 16 µl 5x First-Strand Buffer
  - 8 µl DTT (0,1 M)
  - 7 µl dNTP (10 µM)
  - 4 µl Randomprimer (50 ng/µl)
  - 3 µl Superskript (300 u)
  - 2 µl *RNaseout* (40 u)
- Pipettieren von je 40 µl des Mastermix zum RNA-*RNase free* H<sub>2</sub>O-Gemisch
- c-DNA Synthese bei 42 °C (1 Stunde) und dann 60 °C (10 Minuten)
- Lagerung bei -80 °C oder Weiterverarbeitung

Die Herstellung der verwendeten dNTP wird folgendermaßen durchgeführt: je 10 µl ATP, CTP, TTP, GTP werden mit 60µl HPLC-H<sub>2</sub>O vermischt und bei -80 °C gelagert. Zur Herstellung der Randomprimer wird 1:10 verdünnt (90 µl HPLC-H<sub>2</sub>O und 10 µl Primer) angesetzt und anschließend ebenfalls bei -80 °C gelagert.

## 2.7 ABL-PCR

Ein positiver Nachweis von ABL dient innerhalb dieses Versuchsaufbaus als Nachweis der erfolgreichen cDNA-Synthese. Der eingesetzte Primer kondensiert bei 60 °C optimal am komplementären Genstrang, womit sich die Temperatureinstellung während der Kondensationsphase erklärt. Es wird ein Standard-PCR-Protokoll mit 36 Zyklen verwendet.

ABL-Primer	GGCCAGTAGCATCTGACTTTG ATGGTACCAGGAGTGTTTCTCC
------------	---

Tabelle 2: Sequenz des ABL-Primers

Jede Probe (2 µl) wird mit 48 µl Mastermix per Pipettenaufzug vermischt, mit 2 Tropfen Paraffinöl überschichtet (wenn die ABL-PCR mit TRIO-Thermoblock erfolgt) und für die PCR in den Thermoblock gestellt. Bei der Verwendung eines Robocyclers entfällt das Überschichten mit Paraffin aufgrund der Deckelheizung.

Zusammensetzung des Mastermix:

- 5 µl 10x PCR Rxn Buffer
- 2 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>
- 1 µl dNTP
- 1 µl 5`Primer
- 1 µl 3`Primer
- 0,25 µl Taq-Polymerase
- 37,75 µl HPLC H<sub>2</sub>O aliquot 50 µl

	Temperatur	Dauer
1. Zyklus	95 °C	5 min
	60 °C	3 min
	72 °C	3 min
35 Zyklen	95 °C	1 min
	60 °C	1 min
	72 °C	1 min
Verbrauchszyklus	72 °C	10 min
Kühlzyklus	4 °C	Unendlich

*Tabelle 3: Programmeinstellung des Cyclers für ABL-PCR*

Im Anschluss erfolgt der Nachweis mittels Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.9)

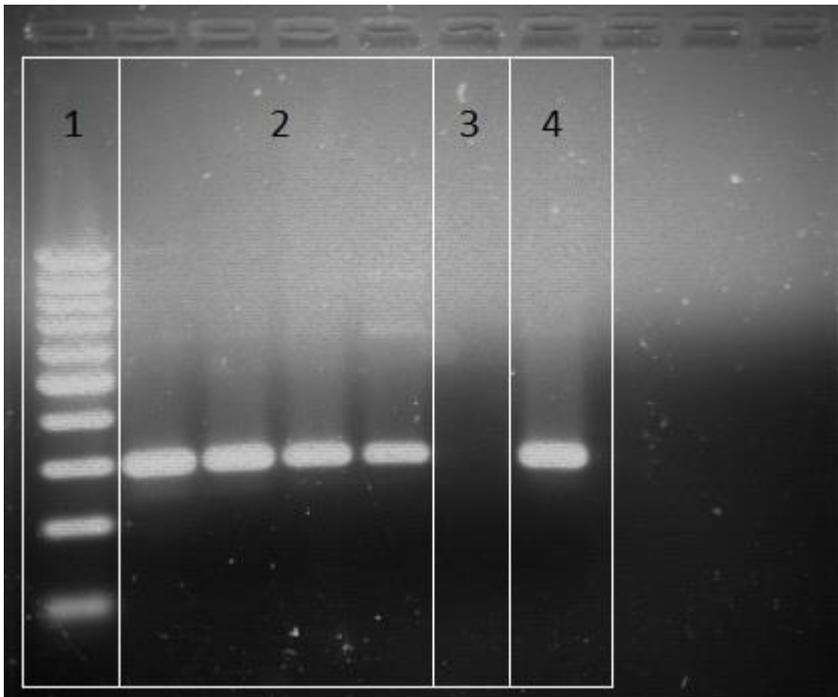


Abbildung 2: Beispiel für erfolgreich durchgeführte ABL-PCR 1: DNA-Leiter 1000-100 BP, 2: 4 Patientenproben, 3: Negativkontrolle, 4: Positivkontrolle

## 2.8 primäre und *nested* PCR

Die RT-PCR dient der Vervielfältigung einer ganz bestimmten DNA-Sequenz, in der die gesuchte Aberration vermutet wird. Das Optimum zur Kondensation der spezifischen Primer für die drei genetischen Aberrationen liegt für diesen Versuchsaufbau bei 65 °C. Die anschließende *nested* PCR erfolgt mit den Produkten der primären PCR und führt bei hoher Sensitivität zu einer nochmaligen exponentiellen Vervielfältigung des gesuchten Genabschnitts, der innerhalb der bereits vervielfältigten Abschnitte des ersten RT-PCR Durchganges liegt. Auch hier wird ein Standard-PCR-Protokoll mit 36 Zyklen angewendet und im Doppelansatz gearbeitet. Jede Probe wird auf jede der drei genetischen Aberrationen untersucht.

Folgende Primer und Positivkontrollen kommen dabei zum Einsatz:

	primär	<i>nested</i>
t(8;21)	AML1-A; ETO-B	AML1-C; ETO-D
t(9;22)	BCR-b1-A; ABL-a3-B	BCR-b2-C; ABL-a3-D
inv(16)	CBFβ-A; MYH11-B2	CBFβ-C; MYH11-D2

Tabelle 4: verwendete Primer

t(8; 21)	Patient UKG
t(9;22 p210)	K562 ; Zelllinie bzw. Patient UKG (Probenentnahme am 02.05.05)
inv(16)	ME 1; Zelllinie bzw. Patient UKG (Probenentnahme am 17.05.05)

*Tabelle 5: verwendete Positivkontrollen*

Jede Probe (2 µl) wird mit 48 µl Mastermix per Pipettenaufzug vermischt, je nach verwendetem Cycler mit 2 Tropfen Paraffinöl überschichtet und für die PCR in den Cycler gestellt.

Zusammensetzung des Mastermix:

5 µl	10x PCR Rxn Buffer
2 µl	50 M MgCl <sub>2</sub>
1 µl	dNTP
1 µl	5`Primer
1 µl	3`Primer
0,25 µl	Taq-Polymerase

Programmeinstellung:

	Temperatur	Dauer
1. Zyklus	95 °C	5 min
	65 °C	3 min
	72 °C	3 min
35 Zyklen	95 °C	1 min
	65 °C	1 min
	72 °C	1 min
Verbrauchszyklus	72 °C	10 min
Kühlzyklus	4 °C	unendlich

*Tabelle 6: Programmeinstellung des Cyclers für RT-PCR*

## 2.9 Gelelektrophorese und Fluoreszenz

Das verwendete Gel besteht aus 1,5%iger Agaroselösung versetzt mit Ethidiumbromid im Verhältnis 1000:1. Zur Herstellung des verwendeten TBE-Puffers werden 10,78 g (89 mM) Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, 5,50 g (89 mM) Borsäure und 0,58 g (2 mM) Ethylendiamintetraessigsäure vermischt und mit *aqua destillata* auf 1000 ml aufgefüllt.

Zur Gelherstellung werden 100 ml TBE-Puffer mit 1,5-1,7 g Agarose vermischt und in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose aufgelöst ist. Nach dem Abkühlen auf etwa 60 °C werden 100µl Ethidiumbromid zugegeben und durch Schwenken des Glaskolbens untergemischt. Die Lösung wird in eine Gelkammer gefüllt und mit Gelkämmen entsprechend der notwendigen Anzahl Geltaschen versehen. Nach dem Erkalten und Entfernen der Gelkämme wird das Gel in ein Elektrophoresebad aus Tris-Borat-EDTA mit dem pH 8 gelegt.

In die erste Geltasche wird die DNA-Leiter (Marker) mit dem Farbstoff Bromphenolblau versetzt eingebracht. In die weiteren Taschen werden die PCR-Produkte ebenso wie Positiv- und Negativkontrolle im Verhältnis von 1:10 (20-25 µl Reaktionsprodukt mit ca. 2 µl Farbstoff) mit Bromphenolblau gemischt in die Gelkammern pipettiert. Die Kammer wird geschlossen und Spannung im Bereich von 50-110 Volt angelegt. Nach dem Erreichen des niedermolekularen Farbstoffs an der Anode wird das elektrische Feld abgeschaltet, das Gel aus der Kammer entfernt und auf einer mit UV-Licht ausgeleuchteten Platte ausgewertet. Bei 302 nm fluoresziert das beigegebene Ethidiumbromid und macht die entstandenen Banden im Gel deutlich sichtbar, da die Fluoreszenz sich bei der Einlagerung im DNA-Strang um den Faktor 50-100 verstärkt.

Untersuchte Aberration	Größe des Produktes
inv(16)	271 BP
t(8,21)	260 BP
t(9,22)	variiert zwischen 285 – 360 BP (Bruchpunkt auf Chromosom 22 variabel)
ABL-Gen	296 BP

*Tabelle 7: Größe der amplifizierten Genprodukte*

Die Gele werden fotografiert und anschließend ausgewertet. Bild und Ergebnis werden im Laborrechner gespeichert.

Die Sequenzierung aller positiven Testungen erfolgte zur Absicherung der Ergebnisse.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Studienkollektiv

Insgesamt wurden 124 Patientenproben von 52 Patienten für das Studienkollektiv im Zeitraum von 11/2003 bis 07/2005 gesammelt. Oft wurden mehrere Proben desselben Patienten zu verschiedenen Therapiezeitpunkten gewonnen. 65 Patientenproben konnten gesammelt und untersucht werden, 59 Proben wurden ausgeschlossen.

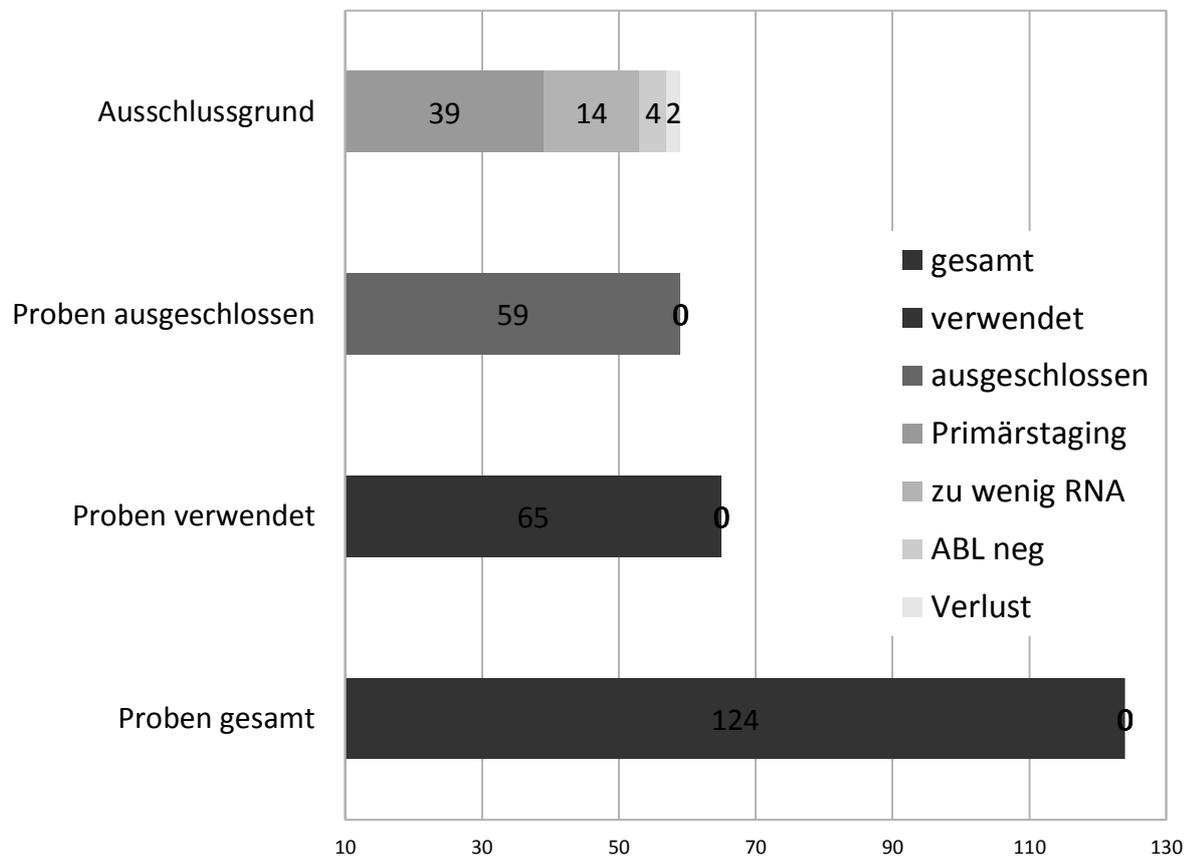


Abbildung 3: Probenübersicht und Ausschlussgründe

Aus den 59 Proben waren 39 zum Zeitpunkt des Primärstaging gewonnen worden und daher für die Studie bedeutungslos. 14 Proben enthielten zu wenig verwertbare RNA, 4 Proben reagierten ABL negativ und konnten daher nicht verwendet werden. 2 Patientenproben gingen während der Studie verloren und waren nicht mehr auffindbar. Die RNA-Konzentration in den Proben betrug 03- 824  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , der Mittelwert lag bei 95,7  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Von den 65 Proben wurde insgesamt 1 Probe im Doppelansatz positiv befundet. 7 Proben waren im Doppelansatz einfach positiv. Somit ergeben sich für alle drei Mutationen insgesamt 8 positive Proben. Die Verteilung auf die jeweiligen Mutationen zeigt die folgende Tabelle:

	t(9;22)	t(8;21)	inv(16)
negativ	63	65	59
positiv im Doppelansatz	0	0	1
positiv 1 von 2	2	0	5
positiv gesamt	2	0	6
In %	3,1	0	9,2

*Tabelle 8: Aufschlüsselung der positiv getesteten Proben des Studienkollektivs*

Keiner der untersuchten Patienten wies mehr als eine Translokation auf.

Im Folgenden sind die Gele der Studiengruppe mit positiv getesteten Proben dargestellt.

## Translokation (9;22)

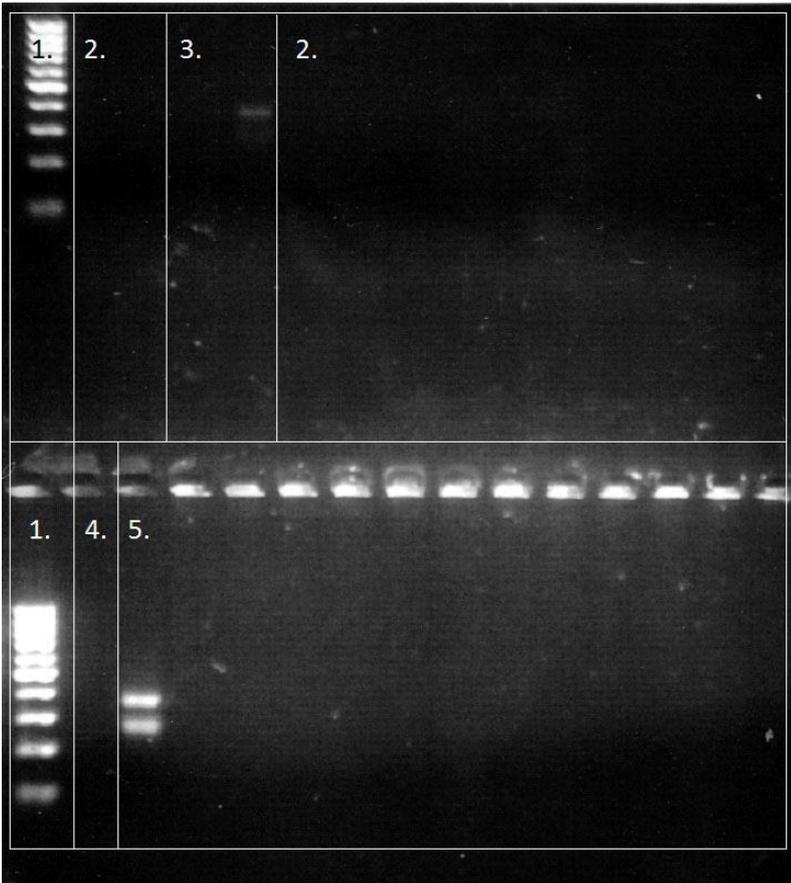
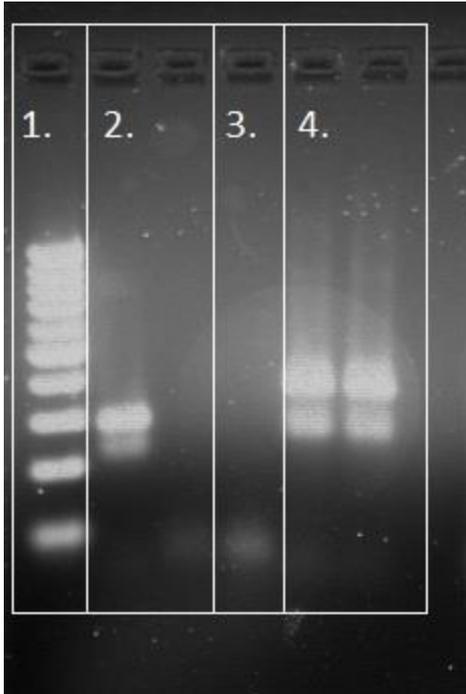


Abbildung 4: Positivgel 1 - 1: DNA-Leiter ; 2: negativ getestete Patientenproben, 3: Im Doppelansatz einfach positiv getestete Probe 094-3; 4: Negativkontrolle, 5: Positivkontrolle



*Abbildung 5: Positivgel 2 - 1: DNA-Leiter, 2: im Doppelansatz einfach positiv getestete Probe 096-3; 3: Negativ-kontrolle, 4: Positivkontrolle*

### **Translokation (8;21)**

Keine positiven Testungen vorhanden.

## Inversion 16

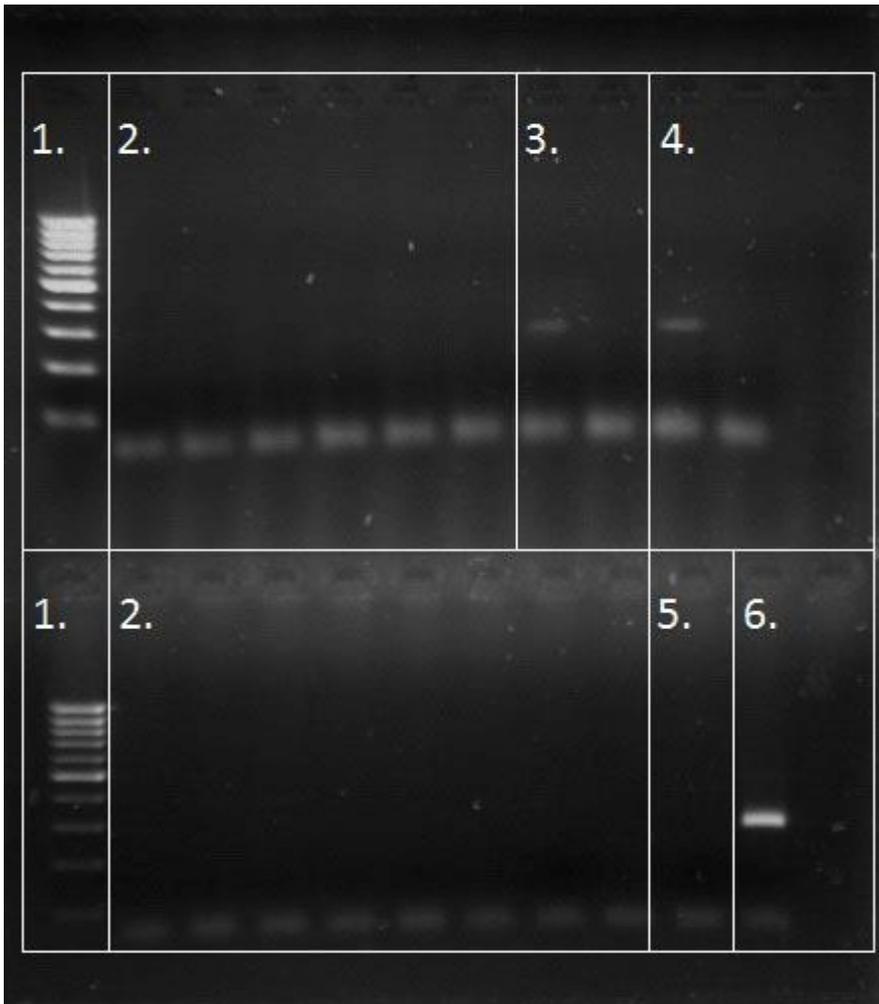


Abbildung 6: Positivgel 3 - 1: DNA-Leiter; 2: negativ getestete Patientenproben; 3: im Doppelansatz einfach positiv getestete Probe 044-4; 4: im Doppelansatz einfach positiv getestete Probe 064-4; 5: Negativkontrolle; 6: Positivkontrolle

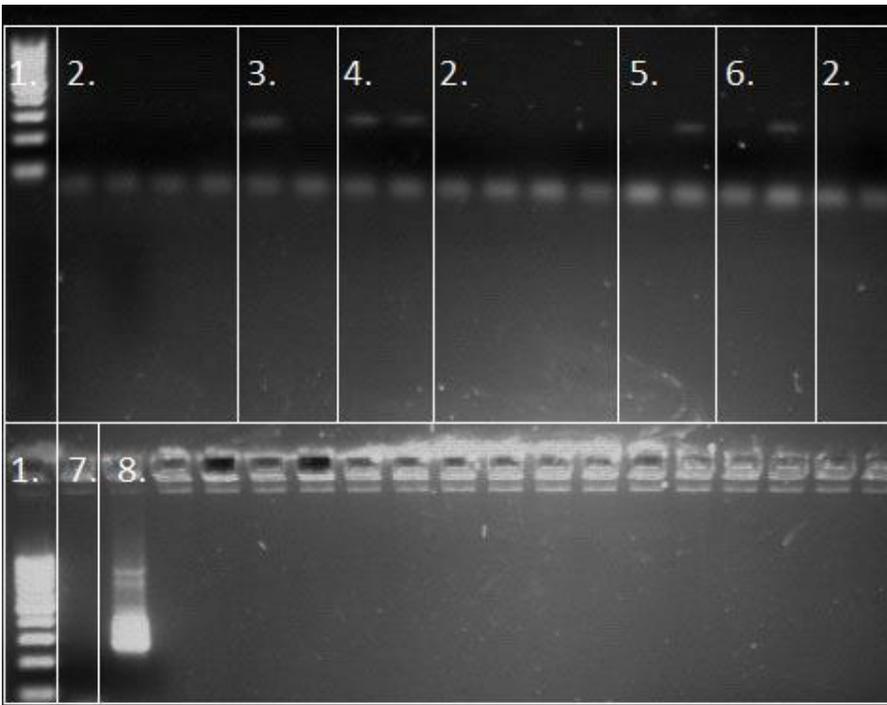


Abbildung 7: Positivgel 4 - 1: DNA-Leiter; 2: negativ getestete Patientenproben, 3: im Doppelansatz einfach positiv getestete Probe 121-4Aph; 4: im Doppelansatz zweifach positiv getestete Probe 124-2; 5: im Doppelansatz einfach positiv getestete Probe 127-2Pb 6: im Doppelansatz einfach positiv getestete Probe 129-1 7: Negativkontrolle; 8: Positivkontrolle

Alle positiv getesteten Patienten finden sich in nachfolgender Tabelle mit der Zuordnung zum jeweiligen Dosierungsarm der Chemotherapie.

Patient	096-3	094-3	044-4	064-4	121-4 Aph	124-2	127-2 PB	129-1
<b>A</b>			X					
<b>B</b>	X	X		X	X	X	X	X
<b>t(9;22)</b>	X (Restaging)	X (vor MC IV)						
<b>t(8;21)</b>								
<b>inv(16)</b>			X (Restaging)	X (Restaging)	X (vor MC IV)	X (vor MC IV)	X (vor MC II)	X (vor MC III)

*Tabelle 9: Positiv getestete Studienpatienten und Zuordnung zum Studienarm. Die Angaben in Klammern beziehen sich auf den Zeitpunkt der Probeentnahme z.B. „vor MC IV“; Probe wurde vor dem vierten Zyklus MegaCHOEP gewonnen. „Restaging“; Probe wurde in der Nachsorge gewonnen.*

26 Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Probengewinnung in der Nachsorge (bis 24 Monate), 14 im Restaging und 10 vor dem 2. Behandlungszyklus. 9 Proben stammen von Patienten vor Therapiezyklus 4, 5 Proben von Patienten vor Zyklus 3 und 1 Probe von einem Patienten vor Zyklus 7. Von den Therapiezeitpunkten vor Zyklus 1, 5, 6 und 8 liegen keine Proben vor.

### 3.2 Kontrollgruppe

58 Patienten befanden sich in unserer Kontrollgruppe. Davon waren 2 Patienten Normalpersonen ohne Chemotherapie und wurden ausgeschlossen. Es konnten 75 Proben gewonnen werden, wovon sich 2 Proben als ABL negativ erwiesen und daher ausgeschlossen wurden. 73 Proben bildeten die Kontrollgruppe und wurden auf die drei Aberrationen untersucht.

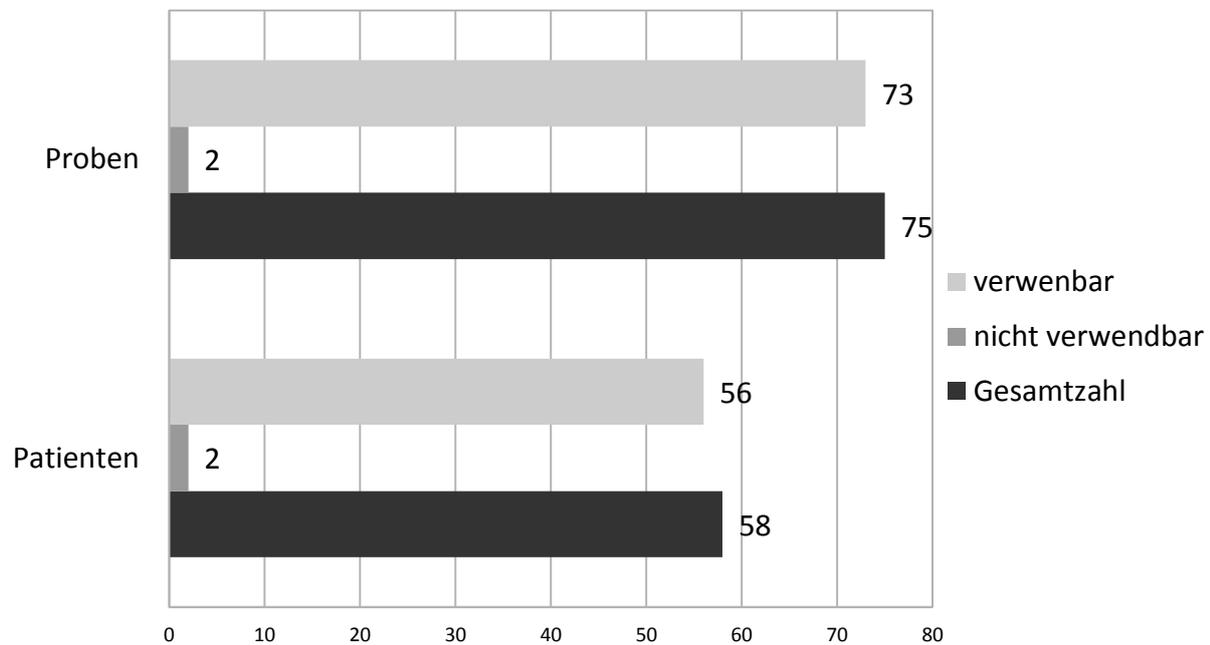


Abbildung 8: Aufschlüsselung der gesammelten, ausgeschlossenen und verwendeten Proben und Patienten der Kontrollgruppe

Bei allen Patienten der Kontrollgruppe wurde ein Non-Hodgkin-Lymphom diagnostiziert. Sie erhielten konventionelle Normaldosis- bzw. Niedrigdosistherapie; davon erhielt 1 Patient zusätzlich Radiotherapie.

Die RNA-Konzentration in den Proben betrug 8- 633  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , der Mittelwert lag bei 149,8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Auftreten und Verteilung der Mutationen sind im Folgenden veranschaulicht:

	t(9;22)	t(8;21)	inv(16)
negativ	71	73	72
positiv im Doppelansatz	0	0	0
positiv 1 von 2	2	0	1
positiv gesamt	2	0	1
Anteil an der Gesamtprobenzahl in %	2,7	0	1,4

Tabelle 10: Anteil und Verteilung positiver Proben des Kontrollkollektivs

Keine der Proben war im Doppelansatz positiv. Es bleiben insgesamt 3 eindeutig positiv getestete Proben mit Banden in der erwarteten Höhe.

Im Folgenden sind die Gele der Kontrollgruppe mit positiv getesteten Proben dargestellt.

### Translokation t(9;22)

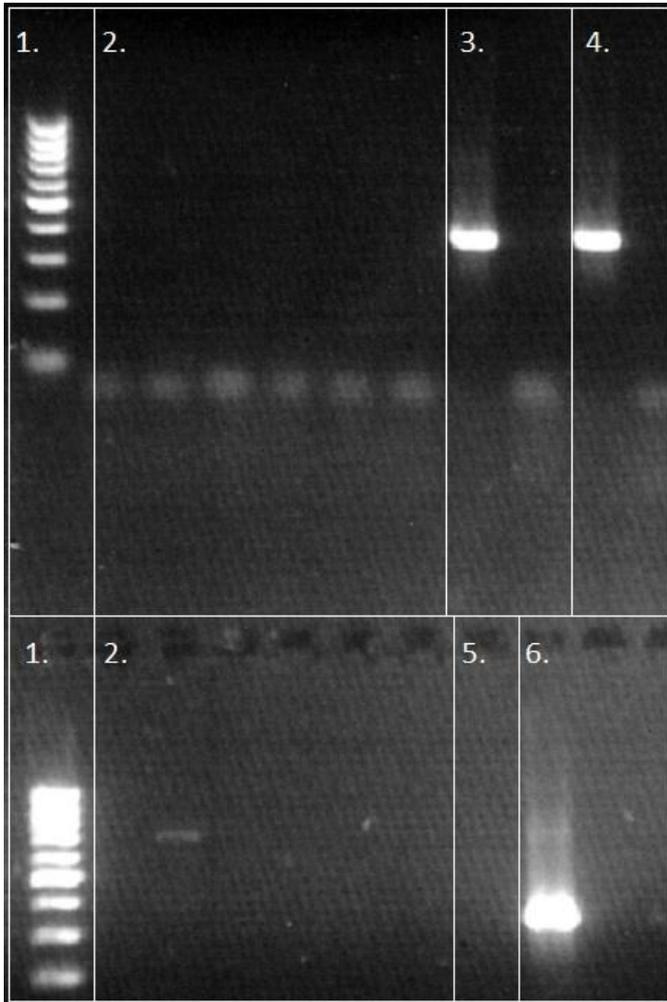


Abbildung 9: Positivgel 5 - 31: DNA-Leiter; 2: negativ getestete Patientenproben; 3: im Doppelansatz einfach positiv getestete Probe k043-1; 4: im Doppelansatz einfach positiv getestete Probe k044-1; 5: Negativkontrolle; 6: Positivkontrolle

## Translokation t(8;21)

Keine positiven Testungen vorhanden.

## Inversion 16



Abbildung 10: Positivgel 6 - 1: DNA-Leiter; 2: negativ getestete Patientenproben; 3: im Doppelansatz einfach positiv getestete Probe 076-1; 4: Negativkontrolle; 5: Positivkontrolle

Mit folgender Tabelle werden die positiv getesteten Patienten von Studien- und Kontrollkollektiv gegenübergestellt und den einzelnen Aberrationen zugeordnet :

	t(9;22)	t(8;21)	inv(16)	total
Studiengruppe	096-3 094-3	0	044-4 064-4 121-4Aph 124-2 127-2PB 129-1	8
Kontrollgruppe	k043-1 k044-1	0	k076-1	3
total	4	0	7	11

Tabelle 11: Gegenüberstellung der positiven Testungen von Studien- und Kontrollkollektiv

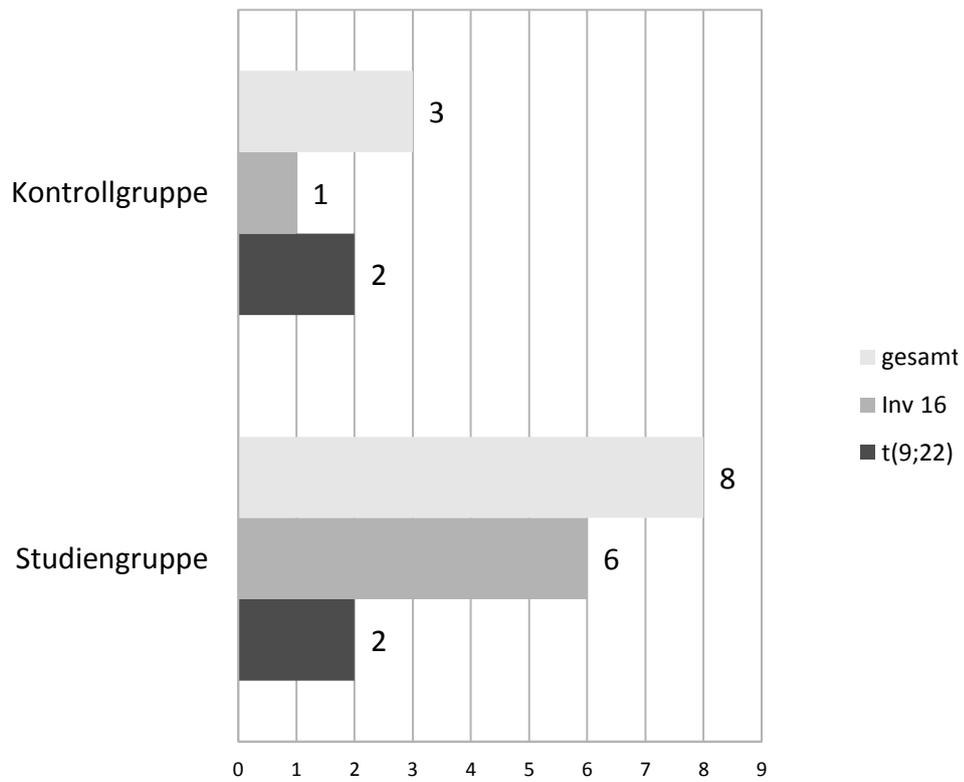


Abbildung 11: Gegenüberstellung der positiven Testungen von Studien - und Kontrollkollektiv ( $t(8;21)$  ohne positive Testung)

Die Sensitivität der quantitativen PCR betrug für alle Aberrationen  $10^{-5}$ , für die *nested* PCR  $10^{-4}$ .

## 4. Diskussion

Sekundärleukämien als Folge von Hochdosischemotherapien für hämatologische und solide Neoplasien sind ein bekanntes Problem in der Onkologie und daher Gegenstand umfangreicher klinischer Forschung (Pedersen-Bjergaard et al. 2000). In mehreren Studien mit NHL-Patienten wurde retrospektiv ein klarer Zusammenhang zwischen der Anwendung von Chemotherapeutika und dem Auftreten von Sekundärleukämien aufgezeigt (Hosing et al. 2002, Armitage et al. 2003).

Anthrazykline wie Idarubicin, Daunorubicin und Doxorubicin hemmen die Zellteilung indem sie auf die DNA interkalierend wirken und freie Radikale entstehen lassen, welche die Zellmembran schädigen. Alkylantien (z.B. Cyclophosphamid) führen durch den Einbau von Alkylgruppen in die DNA zu Doppelstrangbrüchen und damit ebenfalls zum Abbruch der Replikation und zur Apoptose. Eine ähnliche Wirkung hat Etoposid – neben Einzel- und Doppelstrangbrüchen wird außerdem die Topoisomerase II gehemmt und damit eine erfolgreiche Zytokinese verhindert.

Das Alkaloid Vincristin unterbricht durch seine Bindung an Tubulin die Ausbildung von Mikrotubuli bei der Mitose und induziert damit ebenfalls den programmierten Zelltod. Die hier angeführten Medikamente können sowohl einzeln als auch kumulativ genetische Aberrationen generieren und haben damit ein hohes leukämogenes Potenzial. So traten bei mit Topoisomerase-II-Inhibitoren behandelten Patienten häufig Translokationen an den Chromosomen 11q23 und 21q22 auf (Anderson et al. 1998). Alkylierende Substanzen stehen im Zusammenhang mit unbalancierten Translokationen und Chromosomenverlusten an Chromosom 5 und 7, und führen zu einem myelodysplastischem Verlauf (Thirman et al. 1996), während Translokationen an 21q22, inv(16), t(15,17) und t(9,22) häufiger bei mit Anthrazyklinen vorbehandelten Patienten auftreten und eine t-AML induzieren (Anderson et al. 1998).

Dabei sind bestimmte genetische Mutationen für die Induktion einer Leukämie kausal und prognostisch relevant und darüber hinaus auch indikativ für einzelne Subtypen. So ist die Translokation t(8;21), AML1-ETO die häufigste chromosomale Aberration bei AML. Der AML-FAB-Subtyp M4Eo korreliert mit der Inversion 16 (Fusionsgen CBF $\beta$ -MYH11) und die Translokation t(9;22) (Fusionsgen BCR-ABL) kann sowohl bei CML, AML als auch der ALL auftreten.

Der Großteil der bisherigen Studien betrachtet die auftretenden Mutationen bzw. die Entwicklung von therapieassoziierten Leukämien retrospektiv. Damit ist nicht eindeutig ableitbar, wann die

Translokationen entstehen, wie lange sie einer therapieassoziierten Leukämie vorausgehen und ob sie in jedem Falle indikativ für die Entstehung einer solchen sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde prospektiv das Auftreten von therapieassoziierten Genveränderungen während und nach einer hochdosierten Chemotherapie bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom untersucht. Im Vergleich dazu wurde eine Patientengruppe unter konventioneller Therapie untersucht. Beide Kollektive wurden mittels quantitativer und *nested* RT-PCR auf das Vorliegen von leukämieassoziierten Aberrationen getestet. Die Sensitivitäten für die quantitative PCR betragen für alle drei Aberrationen  $10^{-5}$ , für die *nested* PCR  $10^{-4}$ . Da unsere Untersuchungen zu verschiedenen Therapiezeitpunkten vorgenommen wurden, konnte auch aufgezeigt werden, wann es zum Auftreten aberranter Klone kam. Bei 6 von 8 positiv getesteten Patienten traten die Aberrationen vor dem letzten Therapiezyklus und im Restaging, also nach Abschluß der Chemotherapie (je 3 Patienten) auf. Hieraus kann ein Zusammenhang zwischen der Therapiedauer und dem Auftreten der jeweiligen Mutationen hergestellt werden. Die Beobachtung, dass Aberrationen nicht sofort zu Beginn sondern im Verlauf oder nach Abschluß einer Therapie auftreten spricht für einen kumulativen Dosisseffekt, der auch von Organtoxizitäten wie beispielsweise der Kardiotoxizität von Anthrazyklinen bekannt ist.

Im Hochdosiskollektiv der Studiengruppe wurden folgende Häufigkeiten der untersuchten Aberrationen nachgewiesen: t(9;22): 3,1%, inv(16): 9,2% und t(8;21): 0% der Proben. Eine wahrscheinliche Ursache des deutlich erhöhten Anteils von Patienten mit therapieassoziierten Aberrationen in der Studiengruppe ist die erhöhte Genotoxizität des dosisintensiven MegaCHOEP-Therapieschemas, denn die Kontrollgruppe mit konventioneller Therapie zeigt bei inv(16) mit 1,4 % (1 von 73 Proben) einen deutlich niedrigeren Wert. Die Häufigkeit der Transkripte für t(9;22) liegt bei 2,7% und T(8; 21) bei 0 %. Besonders die Inzidenz der Inversion 16 in der Studiengruppe ist gegenüber dem Kontrollkollektiv erhöht. Für die Translokation t(9;22) und t(8;21) ergibt sich hingegen kein klarer Unterschied zwischen der Studiengruppe und der Kontrolle. Möglicherweise wird daher die Inversion 16 besonders häufig durch eine dosisintensive Therapie induziert. Allerdings sind valide Aussagen erst durch die Untersuchung größerer Probenmengen möglich. Festzuhalten bleibt jedoch, dass offensichtlich die dosisintensive Therapie mit MegaCHOEP zu einer erhöhten Inzidenz von therapieassoziierten genetischen Veränderungen führt. Retrospektive Studien bestätigen einen Zusammenhang zwischen der Anwendung von Topoisomerase-II-Hemmern, die auch in dem MegaCHOEP-Schema eskaliert eingesetzt werden und dem Auftreten von t-AML mit inv(16) und t(8;21).

Die Studiengruppe um Schnittger et. al. (2007) fand bei t-AML mit inv(16) ein signifikant kürzeres ereignisfreies Überleben im Vergleich zu *de-novo* AML. Darüber hinaus wiesen diese Patienten

häufig weitere Mutationen auf (Paschka et al. 2013, Goemans et al. 2005, Haferlach et al. 2010). Ein Zusammenhang von t-ALL mit dem vorherigen Einsatz alkylierender Substanzen oder Topoisomerase-II-Hemmern wurde von diversen anderen Autoren ebenfalls beobachtet. In einer aktuellen Studie (Tang et al. 2012) gibt es Hinweise auf das Auftreten von t-ALL nach der Anwendung von Topoisomerase -II- Inhibitoren und/ oder alkylierenden Substanzen. Die Translokationen bzw. Deletionen betrafen hier jedoch Chromosom 11q23. Der prognostische Nutzen dieser Erkenntnisse ist bisher unklar.

Obwohl die Verwendung von Alkylanzien und Topoisomerasehemmer eindeutige Risikoparameter für die Entstehung von t-AML/MDS sind, spielen möglicherweise weitere Faktoren eine Rolle.

Für weitere Studien wäre es von Interesse, auch die Lebensweise und prädisponierende Faktoren wie Rauchen, Komorbiditäten, Ernährungsweise und Lebensgestaltung der Patienten vor, während und nach Chemotherapie zu dokumentieren. Auch eine familiäre Prädisposition kann eine Rolle spielen. In der Studie von Braun und Fenaux (2013) wird ein Zusammenhang von Autoimmunerkrankungen und der Entstehung myelodysplastischer Syndrome diskutiert. Es gibt in neueren Untersuchungen (Anderson et al. 2009, Bernatsky et al. 2008) Hinweise auf ein signifikant erhöhtes Risiko für Patienten mit Autoimmunerkrankungen unter Chemotherapiebehandlung eine AML/MDS zu entwickeln. Als Ursache werden die autoreaktive Immunreaktion als Ganzes und speziell im Knochenmark sowie die Behandlung mit Immunsuppressiva (insbesondere Cyclophosphamid) angenommen. Diese zusätzlichen Faktoren wurden in unserem Kollektiv nicht untersucht. Weiterführende Studien unter Berücksichtigung ergänzender Risikofaktoren, wie den genannten, könnten zukünftig dazu dienen, Patienten mit besonders hohem Risiko therapieassoziierter AML/MDS zu identifizieren.

Die in der Studie prospektiv ermittelte Häufigkeit leukämieassoziierter Aberrationen ist klinisch bisher nicht relevant, da bisher kein untersuchter Patient eine feststellbare t-AML/MDS entwickelt hat. Weder aus dieser noch aus den bislang vorliegenden retrospektiven Studien ist ableitbar, ob der Nachweis der genetischen Aberrationen indikativ für eine sich entwickelnde therapieassoziierte Leukämie ist. Die genetischen Aberrationen, welche mit der Entwicklung von t-AML/MDS, t-ALL und t-CML korrelieren sind zahlreich. Diese Heterogenität konnte in dieser Dissertation nicht abgebildet werden. Eine weitere wesentliche Aussage dieser prospektiven Untersuchung ist daher, dass ein prospektives Screening auf therapieassoziierte genetische Aberrationen bei Patienten mit Chemotherapie nicht sinnvoll erscheint. Die wesentliche Beobachtung, die zu dieser klinisch relevanten Folgerung führt, ist die erwähnte Tatsache, daß trotz nachgewiesener therapieassoziierter Aberrationen die betreffenden Patienten bislang nicht erkrankten. Darüber hinaus stärken weitere Beobachtungen bzw. Schlußfolgerungen diese These. So lassen sich typische AML-assoziierte

Aberrationen auch bei Gesunden nachweisen, z.T. auch bei Neugeborenen. Biernaux et al. (1995) untersuchten ein Kollektiv von 117 gesunden Patienten, zusammengesetzt aus 73 Erwachsenen, 22 Kindern und 22 Nabelschnurblutproben auf t(9;22). Bei einem Kind und 22 Erwachsenen konnte positiv auf das Vorliegen des BCR-ABL-Fusionsgens getestet werden, die Proben aus Nabelschnurblut waren negativ. Für diese Studie ergibt sich damit ein wahrscheinliches Auftreten positiver Testungen von 19,7%. Die Sensitivität der PCR lag bei  $10^{-8}$ . Die Korrelation von steigendem Lebensalter und häufigeren positiven Testungen spricht gegen falsch positive Messergebnisse bei hohen PCR-Sensitivitäten und stützt die These der steigenden AML-Inzidenz mit fortschreitendem Lebensalter. Bäsecke et al. (2002) untersuchten ebenfalls Proben von 22 gesunden Erwachsenen, davon 4 Patienten mit Neoplasie (NHL, MDS) sowie 156 Proben aus Nabelschnurblut auf das Vorhandensein aberranter Klone von t(8;21). Positive Testungen auf AML1/ETO lagen bei 27% bei den Erwachsenen und 40% bei den Nabelschnurblutproben. Die Studiengruppe um Song et al. (2011) untersuchte gesunde Individuen von 0 bis <55 Jahren auf t(9;22), t(8;21) und inv(16) sowie 50 Nabelschnurblutproben auf t(9;22). Die Inzidenz bei den Nabelschnurblutproben lag bei 58%. Die Inzidenz für t(9;22) betrug bei Fusionstranskript BCR-ABLp190 74%, für BCR-ABLp210 42%. Für AML1-ETO lag die Inzidenz bei 18%, für CBF $\beta$ -MYH11 lag sie bei 3%. Die Sensitivität der *nested* PCR wurde mit  $10^{-4}$  angegeben. Die Autoren stimmen in der Schlußfolgerung überein, daß das Vorhandensein aberranter Klone nicht per se zur Entstehung einer Leukämie führt.

Andere Ursachen für die ermittelten Häufigkeiten müssen ebenfalls in Betracht gezogen werden. Obwohl die RT-PCR ein hochempfindliches Verfahren ist, ermöglicht sie doch keine Aussage über die Vitalität der Zellen mit den genetischen Aberrationen. Da mehrere repetitive PCR-Zyklen durchlaufen werden, ist auch von einer eher kleinen Anzahl aberranter Zellen auszugehen. Es besteht die Möglichkeit einer positiven Testung von Zellen, bei denen interne Regulationsmechanismen bereits zum programmierten Zelltod (Apoptose) geführt haben und die avital sind, mithin also nicht Ursprung einer Leukämie sein können. Außerdem kann es sich bei den therapieassoziierten Aberrationen möglicherweise um ein zelluläres Geschehen mit transientem Charakter handeln, das durch zelluläre Reparaturmechanismen behoben wird und daher nicht zur Etablierung einer neoplastisch veränderten Zelle und zur Entwicklung einer Leukämie führt.

In der Studie von Imrie et al. (1998) entwickelten 11% der untersuchten Patienten nach autologer Knochenmarkstransplantation und Behandlung mit Chemotherapeutika und Radiatio zytogenetische Auffälligkeiten, woraus sich während des 70monatigen *follow-ups* ebenfalls bei keinem eine t-

AML/MDS nachweisen ließ. Auch in dieser Studie entwickelte bisher keiner der untersuchten Patienten eine klinisch feststellbare t-AML/MDS.

Zusammenfassend sind therapieassoziierte Leukämien und myelodysplastische Syndrome eine wichtige Komplikation nach chemotherapeutischer Behandlung, insbesondere nach Hochdosistherapien. Es ist wünschenswert, im Vorfeld oder im Verlauf Patienten zu identifizieren, die ein hohes Risiko für die Entwicklung dieser therapieassoziierten Erkrankungen haben. Das Problem ist, daß diese Erkrankungen bislang überwiegend retrospektiv untersucht worden sind. Wir versuchten daher prospektiv Risikopatienten, die noch unter Chemotherapie standen, zu identifizieren. Hierzu untersuchten wir das Auftreten typischer t-AML-assoziiierter genetischer Aberrationen. Obwohl wir eine erhöhte Inzidenz dieser Aberrationen, insbesondere unter hochdosierter Therapie fanden, entwickelte keiner dieser Patienten eine therapieassoziierte Erkrankung. Daher schienen therapieassoziierte genetische Veränderungen unter diesen Bedingungen nicht indikativ für die Entwicklung solcher Folgeerkrankungen zu sein und lediglich eine vorübergehende genetische Schädigung anzuzeigen. Bis zu diesem Zeitpunkt besteht daher keine klinische Konsequenz und daher auch keine zwingende klinische Notwendigkeit eines posttherapeutischen Screenings auf therapieassoziierte genetische Aberrationen.

## 5. Zusammenfassung

Sekundärleukämien nach Hochdosischemotherapien sind ein bekanntes Problem. Bisher ließ sich nicht eindeutig klären, wann leukämogene Klone entstehen und wie lange sie einer klinisch erfassbaren t-AML/MDS vorausgehen. Diese Studie sollte die Frage beantworten, ob ein prospektives Screening mittels PCR während und nach Chemotherapie sinnvoll ist, um eine sich entwickelnde Leukämie frühzeitig zu identifizieren und ob ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten aberranter Zelle mit der Dosisintensität der Chemotherapie besteht.

Im Hinblick auf diese Fragestellung wurden Non-Hodgkin-Patienten in mittlerer und hochdosierter Chemotherapie nach dem MegaCHOEP-Schema mit einer Kontrollgruppe in konventioneller CHOP-Therapie auf t-AML/MDS-assoziierte genetische Aberrationen t(9;22), t(8;21) und inv(16) mittels RT-PCR untersucht und miteinander verglichen.

Bei den 65 Patientenproben der Studiengruppe wurden für Fusionstranskript BCR-ABL 3,1%, für AML1/ETO 0% und für CBF $\beta$ -MYH11 9,2% der Proben positiv getestet. Dem gegenüber steht die Kontrollgruppe mit 73 Proben; davon für t(9;22) 2,7%, für inv(16) 1,4% und t(8;21) 0%.

Der vergleichsweise hohe Anteil der positiv auf inv(16) getesteten Proben hängt sehr wahrscheinlich mit der höheren Genotoxizität des CHOEP- bzw. MegaCHOEP-Therapieschemas gegenüber dem konventionellen CHOP-Protokoll zusammen.

Die Häufigkeit therapieassoziiierter Aberrationen ist viel größer als die der klinisch entstehenden therapieassoziierten Leukämien. Daher erscheint die prospektive molekulargenetische Diagnostik keine sinnvolle Maßnahme zur t-AML/MDS-Früherkennung zu sein.

## 6. Literaturverzeichnis

Anderson LA, Pfeiffer RM, Landgren O, Gadalla S, Berndt SI, Engels EA (2009): Risks of myeloid malignancies in patients with autoimmune conditions. *BR J Cancer* 100, 822-828

Armitage JO, Carbone PP, Connors JM, Levine A, Bennett JM, Kroll S (2003): Treatment-Related Myelodysplasia and Acute Leukemia in Hodgkin's Lymphoma Patients. *J Clin Oncol* 21, 897-906.

Bäsecke J, Cepek L, Mannhalter C, Krauter J, Hildenhausen S, Brittinger G, Trumper L, Griesinger F (2002): Transcription of AML1/ETO in bone marrow and cord blood of individuals without acute myelogenous leukemia. *Blood* 100, 2267-2268.

Bäsecke J, Podleschny M, Becker A, Seiffert E, Schwiers I, Schwiers R, Haase D, Glass B, Schmitz N, Trumper L, Griesinger F (2008): Therapy-associated genetic aberrations in patients treated for non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 141, 52-59

Bernatsky S, Clarke AE, Suissa S (2008): Hematologic malignant neoplasms after drug exposure in rheumatoid arthritis. *Arch Intern Med* 168, 378-381

Biernaux C, Loos M, Sels A, Huez G, Stryckmans P (1995): Detection of major bcr-abl gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals. *Blood* 86, 3118-3122

Braun T, Fenaux P (2013): Myelodysplastic Syndromes (MDS) and autoimmune disorders (AD): cause or consequence? *Best Pract Res Clin Haematol* 26, 327-336

Büchner T, Berdel WE, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S, Müller-Tidow C, Braess J, Spiekermann K, Kienast J, Staib P (2009): Age-related risk profile and chemotherapy dose response in acute myeloid leukemia: a study by the German Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group. *J Clin Oncol* 27(1), 61-69

Burnett AK, Tansey P, Watkins R, Alcorn M, Maharaj D, Singer CR, McKinnon S, McDonald GA, Robertson AG (1984): Transplantation of unurged autologous bone-marrow in acute myeloid leukaemia in first remission. *Lancet* 2(8441), 1068-1070.

Clarke M, Gaynon P, Hann I, Harrison G, Masera G, Peto R, Richards S (2003): CNS-directed therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: Childhood ALL Collaborative Group over-view of 43 randomized trials. *J Clin Oncol* 21(9), 1798–1809.

Coiffier B, Lepage E, Brière J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, Morel P, Van Den Neste E, Salles G, Gaulard P (2002): CHOP Chemotherapy plus Rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse Large-B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 346, 235-242

Dissing M, Le Beau MM, Pedersen-Bjergaard J (1998): Inversion of chromosome 16 and un-common rearrangements of the CBFβ and MYH11 genes in therapy-related acute myeloid leukemia: rare events related to DNA-topoisomerase II inhibitors? *J Clin Oncol* 16(5), 1890-1896.

Fagioli F, Cuneo A, Piva N, Carli MG, Previati R, Balboni M, Tomasi P, Cariani D, Scapoli G, Castoldi G (1992): Distinct cytogenetic and clinicopathologic features in acute myeloid leukemia after occupational exposure to pesticides and organic solvents. *Cancer* 70, 77-85

Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, Solal-Celigny P, Bouabdallah R, Fermé C, Christian B, Lepage E, Tilly H, Morschhauser F, (2005): Long-Term Results of the R-CHOP Study in the Treatment of Elderly Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 23(18), 4117-4126

Giebel S, Thomas X, Hallbook H, Geissler K, Boiron JM, Huguet F, Koller E, Jaeger U, Smedmyr B, Hellmann A et al. (2012): The prophylactic use of granulocyte-colony stimulating factor during remission induction is associated with increased leukaemia-free survival of adults with acute lymphoblastic leukaemia: a joint analysis of five randomised trials on behalf of the EWALL. *Eur J Cancer* 48(3), 360-367

Goemans BF, Zwaan CM, Miller M, Zimmermann M, Harlow A, Meshinchi S, Loonen AH, Hahlen K, Reinhardt D, Creutzig U (2005): Mutations in KIT and RAS are frequent events in pediatric core-binding factor acute myeloid leukemia. *Leukemia* 19, 1536-1542

Gruber M, Fleiss K, Porpaczy E, Skrabs C, Hauswirth AW, Gaiger A, Vanura K, Heintel D, Shehata M, Einberger C (2011): Prolonged progression-free survival in patients with chronic lymphocytic leukemia receiving granulocyte colony-stimulating factor during treatment with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab. *Ann Hematol* 90(10), 1131-1136

Haase D, Hanf V, Schulz T (2004): Therapieinduzierte hämatologische Neoplasien nach Mamma-karzinomen. *Med Klin* 9, 506-517

Haferlach C; Dicker F, Kohlmann A, Schindela S, Weiss T, Kern W, Schnittger S, Haferlach T (2010): AML with CFBF-MYH11 rearrangements demonstrate RAS pathway alterations in 92% of all cases including high frequency of NF1 deletions. *Leukemia* 24, 1065-1069

Hosing C, Munsell M, Yazji S, Andersson B, Couriel D, de Lima M, Donato M, Gajewski J, Giralt S, Körbling M (2002): Risk of therapy-related myelodysplastic syndrome/acute leukemia following high-dose therapy and autologous bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 13(3), 450-459

Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z et al. (2011): SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008, National Cancer Institute. Bethesda, MD, Online: [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2008/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/)

Huret JL (a): t(8;21)(q22;q22) in treatment related leukemia. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* October 2003, [Online im Internet:] <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/t0821q22q22TreatRelID1293.html> [Stand 09.05.2013, 19:09 Uhr]

Huret JL (b): t(9;22)(q34;q11) in treatment related leukemia. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* October 2003, [Online im Internet:] <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/t0922q34q11TreatRelID1300.html> [Stand 09.05.2013, 19:09 Uhr]

Huret JL (c): inv(16)(p13q22) in treatment related leukemia. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* October 2003. [Online im Internet:] <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/inv16p13q22TreatRelID1297.html> [Stand 09.05.2013, 19:09 Uhr]

Imrie KR, Dube' I, Prince HM, Girouard C, Crump M, Keating A (1998): New clonal karyotypic abnormalities acquired following autologous bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia do not appear to confer an adverse prognosis. *Bone Marrow Transplant* 21, 395.

Krishnan A, Bhatia S, Slovak ML, Arber DA, Niland JC, Nademanee A, Fung H, Bhatia R, Kashyap A, Molina A (1999): Predictors of therapy-related leukemia and myelodysplasia following autologous transplantation for lymphoma: an assessment of risk factors. *Blood* 95 (5) 1588-1593

Leone G, Mele L, Pulsoni A, Equitani F, Pagano L (1999): The incidence of secondary leukemias. *Haematologica* 84(10), 37-45.

Lowenberg B, Downing JR, Burnett A (1999): Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 341, 1051-1062

Möricke A, Zimmermann M, Reiter A, Gadner H, Odenwald E, Harbott J, Ludwig WD, Riehm H, Schrappe M (2005): Prognostic impact of age in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia: data from the trials ALL-BFM 86, 90 and 95. *Klin Padiatr* 217 (6), 310–320

Ösby E, Hagberg H, Kvaløy S, Teerenhovi L, Anderson H, Cavallin-Ståhl E, Holte H, Myhre J, Pertovaara H, Björkholm M for the Nordic Lymphoma Group (NLG) (2003): CHOP is superior to CNOP in elderly patients with aggressive lymphoma while outcome is unaffected by filgrastim treatment: results of a Nordic Lymphoma Group randomized trial. *Blood* 101(10), 3840-3848

Paschka P, Du J, Schlenk RF, Gaidzik VI, Bullinger L, Corbacioglu A, Spath D, Kayser S, Schlegelberger B, Krauter J (2013): Secondary genetic lesions in acute myeloid leukemia with inv(16) or t(16;16): a study of the German-Austrian AML Study Group. *Blood* 212, 170-177

Pedersen-Bjergaard J, Klarskov Andersen M, Christiansen DH (2000): Therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplasia after high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. *Blood* 95/11, 3273-3279

Pedersen-Bjergaard J, Andersen MT, Andersen MK (2007): Genetic pathways in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 392-397

Pfreundschuh M, Trümper L, Kloess M, Schmits R, Feller AC, Rudolph C, Reiser M, Hossfeld DK, Metzner B and the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL),(2004): Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of young patients with good-prognosis (normal LDH) aggressive lymphomas: results of the NHL-B1 trial of the DSHNHL. *Blood* 104, 626-633

Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, Izumi S, Ron E, Kuramoto A, Kamada N, Dohy H, Matsui T, Nonaka H (1994): Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res* 137, 68-97

Quesnel B, Kantarjian H, Bjergaard JP, Brault P, Estey E, Lai JL, Tilly H, Stoppa AM, Archimbaud E, Harousseau JL et al. (1993): Therapy-related acute myeloid leukemia with t(8;21), inv(16), and t(8;16): a report on 25 cases and review of the literature. *J Clin Oncol* 11, 2370-2379.

Ribera JM, Ortega JJ, Oriol A, Granada I, Hernandez-Rivaz JM, Parody R, Bethencourt C, Rivas C, Bastida P, del Potro E et al. (2002): Prognostic value of karyotypic analysis in children and adults with high-risk acute lymphoblastic leukemia included in the PETHEMA ALL-93 trial. *Haematologica* 87(2), 154–166

Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, (2007): Rare CFBF-MYH11 fusion transcripts in AML with inv(16)/t(16;16) are associated with therapy-related AML M4Eo, atypical cytomorphology, atypical immunophenotype, atypical additional chromosomal rearrangements and low white blood cell count: a study on 162 patients. *Leukemia* 21 725-731

Smith MT, Zhang L, Wang Y, Hayes RB, Li G, Wiemels J, Dosemeci M, Titenko-Holland N, Xi L, Kolachana P (1998): Increased translocations and aneusomy in chromosomes 8 and 21 among workers exposed to benzene. *Cancer Res* 58, 2176-2181

Song J, Mercer D, Hu X, Liu H, Li MM (2011): Common leukemia- and lymphoma-associated genetic aberrations in healthy individuals. *J Mol Diagn* 13(2), 213-219.

Tang G, Zou Z, Thomas DA, Lin P, Liu D, Hu Y, Kantarjian HM, Bueso-Ramos C, Medeiros LJ, Wang SA (2012): Precursor B-acute lymphoblastic leukemia occurring in patients with a history of prior malignancies: is it therapy-related? *Haematologica* 97, 919-925

te Loo DM, Kamps WA, van der Does-van den Berg A, van Wering ER, de Graaf SS (2006): Prog-

nostic significance of blasts in the cerebrospinal fluid without pleiocytosis or a traumatic lumbar puncture in children with acute lymphoblastic leukemia: experience of the Dutch Childhood Oncology Group. *J Clin Oncol* 24(15), 2332–2336.

Thirman MJ, Larson RA (1996): Therapy-related myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 10, 293-320

van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F (1999): Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 13, 1901–1928

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABL	humanes Abelson-Protoonkogen
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AML1	auch CBF $\alpha$ 2: <i>core binding factor alpha subunit 2</i>
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
BP	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CBF $\beta$	<i>core-binding factor; subunit beta</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHOEP	Chemotherapieschema, verwendete Substanzen: Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin (Oncovin®), Ethoposid, Prednisolon
CHOP	Chemotherapieschema, verwendete Substanzen: Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin (Oncovin®), Prednisolon
CML	chronisch myeloische Leukämie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ETO	Gen <i>eight-twenty-one</i>
EtOH 70%	Ethylalkohol
GCSF	<i>granulocyte-colony-stimulating-factor</i>
HHV8	Humanes Herpesvirus 8
HTLV-1	Humanes T-lymphotropes Virus 1
HPLC- H <sub>2</sub> O	hochreines Wasser für <i>high performance liquid chromatography</i>
inv(16)	Inversion 16
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MegaCHOEP	Hochdosischemotherapieschema, verwendete Substanzen: siehe CHOEP
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MYH11	<i>myosin heavy chain 11</i>
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom

PAS-Reaktion	<i>Periodic acid-Schiff-reaction</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> – dt. Polymerase-Kettenreaktion
RLT + 1% ME	RLT-Puffer und Mercaptoethanol
RNA	<i>ribonucleic acid</i> – dt. Ribonucleinsäure (RNS)
RT-PCR	<i>real time polymerase chain reaction</i>
t(8;21)	Translokation (8;21)
t(9;22)	Translokation (9;22)
T-ALL	akute lymphatische Leukämie ausgehend von T-Zellen
t-AML	therapieinduzierte akute myeloische Leukämie
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
UKG	Universitätsklinikum Göttingen

## 8. Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. Titel</b>	<b>Seite</b>
1 Ausschnitt aus der Excel-Tabelle der Studiengruppe	12
2 Beispiel für erfolgreich durchgeführte ABL-PCR 1	17
3 Probenübersicht und Ausschlussgründe	21
4 Positivgel 1 (t (9;22))	23
5 Positivgel 2 (t (9;22))	24
6 Positivgel 3 (inv(16))	25
7 Positivgel 4 (inv(16))	26
8 Aufschlüsselung der gesammelten, ausgeschlossenen und verwendeten Proben und Patienten der Kontrollgruppe	28
9 Positivgel 5 (t (9;22))	29
10 Positivgel 6 (inv(16))	30
11 Gegenüberstellung der positiven Testungen von Studien - und Kontrollkollektiv ( t(8;21) ohne positive Testung)	31

## 9. Tabellenverzeichnis

<b>Tab.</b>	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
1	genetische Aberrationen als Ursache verschiedener Leukämien	1
2	Sequenz des ABL-Primers	15
3	Programmeinstellung des Cyclers für ABL-PCR	16
4	verwendete Primer	17
5	verwendete Positivkontrollen	18
6	Programmeinstellung des Cyclers für RT-PCR	18
7	Größe der amplifizierten Genprodukte	20
8	Aufschlüsselung der positiv getesteten Proben des Studienkollektivs	22
9	Positiv getestete Studienpatienten und Zuordnung zum Studienarm	27
10	Anteil und Verteilung positiver Proben des Kontrollkollektivs	28
11	Gegenüberstellung der positiven Testungen von Studien- und Kontrollkollektiv	30

## **Danksagung**

Ich danke

Prof. Dr Griesinger und dem Institut für Hämatologie und Onkologie der Universität Göttingen für die Überlassung des Themas. Privatdozent Dr. Jörg Bäsecke für die Übernahme der Betreuung und die fachliche Unterstützung sowie den Mitarbeitern im Labor, die mir bei der Durchführung der Untersuchungen zur Seite standen.