

Aus der Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie  
(Prof. Dr. med. L. Trümper)  
Der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# **Analyse von Mikrosatelliteninstabilität und hMSH2-Expression bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Petra Kohaus**  
aus  
Kassel  
Göttingen 2016

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer  
Referent/in Prof. Dr. med. F. Alves  
Ko-Referent/in: .....  
Drittreferent/in: .....  
Tag der mündlichen Prüfung: .....

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1 Akute myeloische Leukämie .....	5
1.2 Genetische Instabilität .....	7
1.3 Mikrosatelliten .....	8
1.3.1 Mikrosatelliteninstabilität .....	9
1.3.2 Loss of Heterozygosity (LOH) .....	10
1.4 DNA-Mismatch-Repair-System .....	10
1.5 Aufgabenstellung .....	11
<b>2 Materialien und Methoden</b> .....	<b>12</b>
2.1 Bezugsquellennachweis .....	12
2.1.1 Reagenzien .....	12
2.1.2 Antikörper .....	13
2.1.3 Zelllinie .....	13
2.1.4 Kits .....	14
2.1.5 Verbrauchsmaterialien .....	14
2.1.6 Geräte .....	14
2.2 Lösungen und Puffer .....	15
2.3 Mikrosatellitenanalyse .....	18
2.3.1 Patienten .....	18
2.3.2 Zytogenetik .....	18
2.3.3 DNA-Isolation .....	18
2.3.4 Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA .....	19
2.3.5 Mikrosatellitenloci und Primer .....	19
2.3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	22
2.3.7 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) .....	22
2.3.8 Silberfärbung .....	23
2.4 Immunhistochemie .....	23
2.4.1 Patienten .....	23
2.4.2 Immunoperoxidase-Färbung .....	24
2.4.3 Hämalaun-Färbung und Konservierung .....	24
2.5 Western Blot .....	25

---

2.5.1 Patienten .....	25
2.5.2 Zelllyse .....	25
2.5.3 Proteinbestimmung nach Bradford .....	25
2.5.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) .....	25
2.5.5 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran .....	26
2.5.6 Immundetektion und Enhanced-Chemoluminescence-Verfahren (ECL) ..	26
2.6 Exakter Fisher-Test.....	27
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
3.1 Detektion von LOH bei der Mikrosatellitenanalyse.....	27
3.2 Zytogenetik .....	31
3.2.1 Zytogenetische Befunde.....	31
3.2.2 Zytogenetische Befunde in Korrelation zur Mikrosatellitenanalyse.....	31
3.3 hMSH2-Expression .....	31
3.3.1 Immunhistochemischer Nachweis der hMSH2-Expression .....	31
3.3.2 Nachweis von hMSH2 in AML-Blasten mittels Western Blot .....	34
3.3.3 hMSH2-Expression in Korrelation zur Mikrosatellitenanalyse.....	36
3.3.4 Vergleich von hMSH2-Expression mit Ergebnissen der Zytogenetik.....	36
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>37</b>
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>44</b>
<b>6 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>45</b>
<b>7 Anhang .....</b>	<b>53</b>
Abkürzungsverzeichnis .....	53
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	56

# 1 Einleitung

## 1.1 Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine heterogene hämatologische Erkrankung, welche durch die Ausbreitung von Blasten im peripheren Blut, Knochenmark und anderen Geweben gekennzeichnet ist (O'Donnell et al. 2012). Diese maligne entarteten frühen Vorläuferzellen der normalen Blutbildung verlieren ihre Fähigkeit zur Ausreifung zu funktionsfähigen Blutzellen und entziehen sich den Kontrollmechanismen von Zellwachstum und Differenzierung. Als Folge der Ausbreitung der leukämischen Zellpopulation mit Verdrängung der normalen Blutbildung im Knochenmark kommt es zu einer Verminderung von Erythrozyten, funktionsfähigen Granulozyten und Thrombozyten, was zu Anämie, Infektionen und Blutungen führen kann (Kern et al. 2003).

Die AML ist zudem die häufigste maligne hämatologische Erkrankung bei Erwachsenen. Die weltweite Inzidenz der Erkrankung wird auf drei bis vier Neuerkrankungen pro 100.000 Menschen geschätzt. Trotz intensiver Forschung und neuer Therapien sowie prognostischer Marker ist die Prognose sehr variabel und mit einer hohen Letalität verbunden. Weniger als 50% der erwachsenen Patienten haben eine Gesamtüberlebenszeit von 5 Jahren, bei älteren Patienten beträgt die 2-Jahresüberlebensrate nur 20% (Riva et al. 2012). Mit Ausnahme einiger weniger AML-Subtypen haben sich die Grundzüge der Therapie in den letzten 20 Jahren nicht signifikant verändert. Aus diesem Grund bleibt der Therapieerfolg für die Mehrheit der Patienten mit Langzeitüberlebensraten weiterhin schlecht (Gallipoli et al. 2015).

Zu den bekannten Risikofaktoren für die Entstehung einer AML gehören das Lebensalter, eine vorangegangene hämatologische Erkrankung und eine genetische Disposition ebenso wie eine Exposition gegenüber Viren, ionisierender Strahlung, Chemikalien wie z.B. Benzol sowie eine vorangegangene Behandlung mit Zytostatika. Die meisten Fälle von akuter myeloischer Leukämie entstehen *de novo*, ein kleinerer Teil tritt als sekundäre AML auf, d.h. nach myelodysplastischem Syndrom (MDS), nach einer myeloproliferativen Erkrankung oder therapieassoziiert (Deschler und Lübbert 2006).

Die Einteilung der AML erfolgt nach zytomorphologischer und zytochemischer Beurteilung entsprechend der FAB-(French-American-British-) Klassifikation in verschiedene Subgruppen (Bennett et al. 1985). Diese wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, da die

Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nach dieser Einteilung klassifiziert wurden. Die neuere WHO-Klassifikation berücksichtigt zusätzlich zytogenetische und immunologische Kriterien zur Einteilung. Hierbei genügt bereits ein Blastenanteil von 20% zur Diagnose einer AML (Vardiman et al. 2009). Die Einteilung der AML entsprechend der FAB-Klassifikation ist in Tabelle 1 dargestellt.

**Tab. 1:** Einteilung der AML entsprechend der FAB-Klassifikation (entnommen aus: Kern et al. 2003. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Zuckschwerdt Verlags München)

FAB-Subtyp	FAB-Kriterien			Immunologische Marker	Assoziation mit		Häufigkeit
	Granulozytose	Monozytose	Erythrozytose		zytogenetisch	molekulargenetisch	
M0	< 10% POX < 3%	< 20%	< 50%	myeloisch positiv lymphatisch negativ			
M1	< 10% POX > 3%	< 20%	< 50%		t(8;21)	AML1/ETO	1,7%
M2	> 10%	< 20%	< 50%		t(8;21)	AML1/ETO	12,5%
M3	hypergranulär Auer-Stäbchen	< 20%	< 50%	HLA-DR-negativ	t(15;17)	PML/RAR $\alpha$	98%
M3v	mikrogranulär monozytoide Kerne	< 20%	< 50%	HLA-DR-negativ	t(15;17)	PML/RAR $\alpha$	
M4	> 20%	> 20%	< 50%				
M4Eo	> 20% abnorme Eosinophile	> 20%	< 50%		inv(16)/t(16;16)	CBF $\beta$ /MYH11	100%
M5a	< 20%	> 80% unreif	< 50%		11q23 Aberr.	MLL-Aberr.	31%
M5b	< 20%	> 80% reif	< 50%		11q23 Aberr.	MLL-Aberr.	17%
M6	> 30% der NEZ sind Blasten	variabel	> 50%				
M7	> 30% Megakaryoblasten	variabel	< 50%	CD41/CD61-positiv			

Die Therapie orientiert sich an aktuellen Studienprotokollen. Dabei kommen Anthracycline und Cytarabin zum Einsatz. Nach Induktionschemotherapie mit Erreichen einer Remission besteht die Möglichkeit zur Stammzelltransplantation (Döhner et al. 2010). Trotz wesentlicher Fortschritte bezüglich Chemotherapieschemata und supportiver Maßnahmen ist nur bei etwa 30-40% der betroffenen Patienten eine dauerhafte Krankheitsfreiheit und endgültige Heilung zu erreichen. Neuere diagnostische Möglichkeiten der Zytogenetik, Molekulargenetik und funktionellen Zellanalytik erlauben jedoch tiefere Einblicke in Biologie und Pathogenese der akuten Leukämien, so dass Erfolgs- und Rückfallwahrscheinlichkeit in gewissem Umfang abschätzbar geworden sind und damit die Therapie risikoadaptiert ausgerichtet werden kann

(Kern et al. 2003). Das Risikoprofil der AML in Abhängigkeit von Zytogenetik und molekularen Veränderungen ist in Tabelle 2 dargestellt.

**Tab. 2:** Einteilung der AML in Prognosegruppen nach Zytogenetik und molekularen Mutationen (entnommen aus: Herold et al. 2015. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Dr. med. Gerd Herold)

Prognosegruppe	Genetische Subgruppe
Günstige Prognosegruppe (Niedrigrisiko)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• t(15;17)/PML-RARA (=APL-RAR<math>\alpha</math>)</li> <li>• t(18;21)/AML-ETO RUNX1-RUNX1T1 (<u>Core-binding-factor-[CBF] AML</u>)</li> <li>• inv(16)/t(16;16) CBFB-MYH11</li> <li>• Isolierte NPM1-Mutationen (normaler Karyotyp)</li> <li>• Isolierte CEBPA-Mutationen (normaler Karyotyp)</li> </ul>
Mittlere Prognosegruppe (Intermediäres Risiko)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Normaler Karyotyp; NPM1-Mutation und FLT3-Längenmutation (normaler Karyotyp); NPM1-Wildtyp ohne FLT3-Längenmutation (normaler Karyotyp); NPM1-Wildtyp ohne FLT3-Längenmutation (normaler Karyotyp)</li> <li>• Trisomie 8; T(9;11)/MLL3 MLL</li> </ul>
Ungünstige Prognosegruppe (Hochrisiko)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Komplexe Abberationen (<math>\geq 3</math> chrom. Anomalien)</li> <li>• Monosomie 7; t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214; t(v11)(v;q23); MLL-Rearrangement; del(5q); del(7)</li> <li>• Anomalien an Chromosom 3</li> <li>• FLT3-Längenmutationen (<u>FLT3-LM/FLT3-ITD</u>)</li> <li>• MLL-PTD</li> </ul>

## 1.2 Genetische Instabilität

Nach bisherigem Kenntnisstand wird für die Entstehung von Tumoren eine genetische Instabilität als ursächlich angenommen (Lengauer et al. 1998). Diese Instabilität kann auf verschiedenen Ebenen in Erscheinung treten:

- **Instabilitäten der Gen-Sequenz** (Basendeletionen, -insertionen und -tausch sowie Mikrosatelliteninstabilitäten), welche der zytogenetischen Analyse nicht zugänglich sind
- **Veränderungen der Chromosomenanzahl** (Zugewinn oder Verlust ganzer Chromosomen)
- **Chromosomale Translokationen** (Zugewinn oder Verlust von Chromosomanteilen)
- **Genamplifikation** (multiple Kopien von 0,5 bis 10 DNA-Megabasen)

Neoplasien myeloischer Zellen sind klonale Erkrankungen hämatopoetischer Stamm- oder Vorläuferzellen. Sie entstehen aus genetischen oder epigenetischen Veränderungen, welche zu einer Störung von Schlüsselprozessen wie Regeneration, Proliferation und Zelldifferenzierung führen (Murati et al. 2012).

Das Fortschreiten der Erkrankung resultiert aus einer Akkumulation von Mutationen in Genen, die Zellwachstum und –differenzierung kontrollieren (Sallmyr et al. 2008). Die genauen Mechanismen, die zu einer genetischen Instabilität führen, sind bislang jedoch noch unklar. Es mehren sich Hinweise, dass genetische Veränderungen myeloischer Neoplasien zu einer Anreicherung reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* – ROS) führen, welche dann DNA-Schäden zur Folge haben. Beispielsweise führen Fusionsgene wie etwa BCR-ABL bei der chronisch myeloischen Leukämie, FLT3/ITD bei der AML und auch RAS-Mutationen bei MDS zu einer ROS-Produktion. Weitere Theorien zur Entstehung von Leukämien weisen darauf hin, dass ein Teil der onkogenen Veränderungen der AML epigenetischer Natur ist (Figueroa et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit gilt das Hauptinteresse der Detektion genetischer Instabilitäten mittels Mikrosatellitenanalyse. Basierend auf der Theorie des *mutator phenotype* ist die hohe Anzahl von Mutationen in Tumorzellen nicht durch die geringe Mutationsrate zu erklären, die in normalen Zellen zu beobachten ist. Vielmehr manifestiert sich bereits früh in der Tumorgenese eine erhöhte Mutagenität, welche in Kombination mit klonaler Selektion zu einem Proliferationsvorteil der Tumorzellen führt. Die erhöhte Mutationsrate lässt sich so erklären, dass es initial zur Mutation von Genen kommt, die zur Aufrechterhaltung des *mismatch repair*-Systems erforderlich sind. Aufgrund der daraus resultierenden Ineffizienz dieses Systems können Fehler bei der DNA-Synthese nicht mehr erkannt bzw. repariert werden, was ein erhöhtes Auftreten von Mutationen zur Folge hat. Im Verlauf kommt es u. a. zur Aktivierung von Protoonkogenen bzw. Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen, was zur malignen Entartung führt (Loeb 1998).

Eine Möglichkeit zur Bestimmung der genetischen Instabilität bietet die Analyse von Mikrosatelliten, auf die im folgenden Kapitel näher eingegangen wird.

### **1.3 Mikrosatelliten**

Bei Mikrosatelliten handelt es sich um repetitive, nicht kodierende, einfache DNA-Sequenzen von 1 bis 6 Basenpaaren, die sowohl im eukaryotischen wie auch im prokaryotischen Genom weit verbreitet sind. Aufgrund der besonderen Eigenschaft, höhere Mutationsraten als das übrige Genom zu tolerieren, werden sie allgemein als genetische Marker benutzt. In den letzten Jahren zogen Mikrosatelliten aus verschiedenen Gründen die Aufmerksamkeit von Forschern auf sich. Zu erwähnen ist beispielsweise die ausgedehnte Nutzung zur Genkartierung, der Zusammenhang zwischen der Instabilität der Anzahl der Sequenzwiederholungen und genetischen Erkrankungen beim Menschen, die praktikable



---

und einfache Handhabung bei Untersuchungen der Populationsgenetik sowie für Genotypisierung und Vaterschaftsanalysen. Aufgrund der ausgeprägten Fähigkeit zur interindividuellen Differenzierung findet die Analyse von Mikrosatelliten auch in der Rechtsmedizin Anwendung (Oliveira et al. 2006).

### 1.3.1 Mikrosatelliteninstabilität

Um die hohe Mutationsrate in Mikrosatelliten zu erklären, wurden mehrere Mechanismen diskutiert, wie beispielsweise Fehler in der Rekombination, ungleiches Crossing-Over oder ein Gleiten der Polymerase während der Replikation oder Reparatur (Strand et al. 1993). So kann es während der DNA-Synthese gelegentlich vorkommen, dass sich die DNA-Stränge trennen und sich falsch wieder aneinander anlagern. Dies hat die Entstehung einer Heteroduplex-DNA zur Folge. Hierbei ist die Anzahl der Mikrosatellitenwiederholungen in Ursprungs-DNA und dem neu synthetisierten Strang unterschiedlich groß (Jiricny 2006). Befinden sich die ungepaarten Basen im Folgestrang, führt die weitere Synthese zu einer Verlängerung des Abschnitts, während ungepaarte Basen im Leitstrang zu einer Verkürzung führen (Strand et al. 1993). Die ungepaarten Nukleotide, die sich zum Teil extrahelical befinden, werden auch als *insertion/deletion loops* (IDLs) bezeichnet.

Bei Abwesenheit eines *mismatch-repair*-Systems bleiben die Basenfehlpaarungen und IDLs unkorrigiert, was zu einem *mutator phenotype* führt und mit einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI) einhergeht (Jiricny 2006). Diese durch Zugewinn oder Verlust von kleinen repetitiven Einheiten innerhalb der Mikrosatellitensequenzen entstandenen IDLs kennzeichnen die Mikrosatelliteninstabilität (Peltomäki 2003).

MSI ist ein Kennzeichen für ein defizientes *mismatch-repair*-System, da Mikrosatelliten besonders anfällig für Replikationsfehler sind. MSI spielt auch eine wichtige Rolle in der Diagnostik sowohl von sporadisch auftretendem als auch genetisch bedingten kolorektalen Karzinomen. Beim HNPCC (hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom) zeigt sich in mehr als 90% der Fälle eine MSI, im Gegensatz zu sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinomen, bei denen dies nur bei 10 – 15% zutrifft. Aus diesem Grund wird die Mikrosatellitenanalyse gewöhnlich als erstes diagnostisches Screening für HNPCC verwendet (Müller et al. 2004). Die Inzidenzen von MSI für Tumoren des Magens und des Endometriums sind mit 18% bzw. 22% vergleichsweise niedrig (Peltomäki et al. 1993). Die Mikrosatellitenanalyse eignet sich zur Identifikation von LOH (*loss of heterozygosity*) sowie zur Detektion einer Mikrosatelliteninstabilität als Ergebnis einer Defizienz des *mismatch-repair*-Systems. Auf die Bedeutung der LOH wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

### 1.3.2 *Loss of Heterozygosity (LOH)*

*Loss of heterozygosity (LOH)* bezeichnet den Verlust eines Allels bei ursprünglich heterozygoter Ausprägung (Weinberg 1991). Ein Tumorsuppressor-Gen verliert seine Tumor unterdrückende Funktion, wenn beide Allele der homologen Chromosomen beeinträchtigt sind. Ist eines der Allele intakt, kann das normale Genprodukt hergestellt werden, welches fähig ist, die Zellproliferation zu unterdrücken. Aus diesem Grund erfordert die Tumorgenese in Form eines Tumorsuppressor-Gen-Verlustes die Fehlfunktion beider Gene, was zu einer vollständigen Schädigung beider Allele führt (Senda 2005). Ist eine Kopie eines Tumorsuppressor-Gens bereits durch eine Mutation inaktiviert, führt der Verlust des zweiten, nicht mutierten (wild-typ) Allels zur Homozygotie. Die Chromosomenregion kann dann durch ein Duplikat der entsprechenden Chromosomenregion, die das mutierte Allel trägt, ersetzt werden. Diese Schritte, die zu einer homozygoten Ausprägung eines mutierten Tumorsuppressor-Gens führen, beziehen die umliegenden Chromosomenregionen üblicherweise mit ein. Dementsprechend können DNA-Marker in der Nähe dieser Regionen ebenfalls einen Verlust der Heterozygotie aufweisen.

Es liegt nahe, dass die wiederholte Beobachtung von LOH eines bestimmten chromosomalen Markers in Zellen eines speziellen Tumors Hinweise auf das Vorhandensein eines in der Nähe lokalisierten Tumorsuppressor-Gens geben kann, dessen Verlust in der Pathogenese dieses Tumors von Bedeutung sein kann (Weinberg 1991).

## 1.4 *DNA-mismatch-repair-System*

Das *DNA-mismatch-repair-System (MMR)* dient der Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität. Dabei hat es zwei Kriterien zu erfüllen: Erstens muss es Fehler bei der Basenpaarung erkennen und zweitens den Reparaturmechanismus einleiten (Jiricny 2006). Das Modell eines MMR wurde bereits 1964 postuliert und später intensiv bei Bakterien, wie *Escherichia coli (E. coli)* erforscht (Modrich 1991). Bei *E. coli* wurden die Proteinkomplexe *mutS*, *mutL*, *mutH* und *uvrD* nachgewiesen, welche gemeinsam die o.g. Aufgaben erfüllen. Die Situation bei Eukaryoten ist komplizierter als bei *E. coli*. In menschlichen Zellen konnten fünf Homologe für *mutS* identifiziert werden, von denen die Homologe MSH2, MSH3 und MSH6 am MMR als Heterodimere teilnehmen. So leitet das von MSH2 und MSH6 gebildete Heterodimer MutS $\alpha$  die Reparatur von Nukleotid-*mismatches* und IDLs (*insertion/deletion loops*) von ein oder zwei extrahelicalen Nukleotiden ein. Die Reparatur von größeren IDLs wird vom Heterodimer MutS $\beta$  initiiert, welches sich aus MSH2 und MSH3 zusammensetzt (Jiricny 2006). Die zugehörigen Gene zählen zu den DNA-Stabilitätsgenen bzw. *Caretaker-*

Genen. Sind diese inaktiviert, treten Mutationen in anderen Genen mit einer höheren Rate auf. Somit erhöht sich auch die Wahrscheinlichkeit einer Mutation in einem Onkogen oder Tumorsuppressor-Gen, wodurch die Tumorentstehung begünstigt wird (Vogelstein 2004).

Die Identifikation des Genortes von hMSH2, einem Homolog von mutS aus *E. coli*, gelang 1993 auf Chromosom 2 des Menschen (2p22-21). Aufgrund der Nähe zu einem am HNPCC-Syndrom beteiligten Genort wurde eine Assoziation zu HNPCC vermutet (Fishel 1993). So zeigt sich eine Anfälligkeit für das HNPCC-Syndrom bei Keimbahnmutationen von Genen des *DNA-mismatch-repair*-Systems (MMR). Hierbei ist MSH2 zu etwa 40% betroffen (Peltomäki 2001).

## 1.5 Aufgabenstellung

Die Bedeutung von Mikrosatellitenalterationen in malignen Tumoren, als auch Leukämien ist trotz intensiver Forschungstätigkeit bisher nicht ausreichend geklärt.

In der vorliegenden Arbeit soll mithilfe von 18 ausgewählten Markern untersucht werden, ob bei der AML Mikrosatelliteninstabilität nachzuweisen ist. Dabei werden Mikrosatellitenanalysen an Knochenmarkaspiraten von AML-Patienten im Vergleich zu deren Referenz-DNA aus Bukkalepithel durchgeführt. Zusätzlich soll die Frage geklärt werden, ob das Auftreten von Mikrosatelliteninstabilität mit einer stärkeren Ausprägung chromosomaler Anomalien einhergeht, als möglicher Hinweis auf eine genetische Instabilität. Desweiteren soll untersucht werden, ob eine verminderte Expression von hMSH2 bei der AML mit einem verstärkten Auftreten von Mikrosatelliteninstabilitäten bzw. chromosomalen Abberationen einhergeht.

Zur Validierung der Hypothese einer erhöhten Prävalenz von Mikrosatelliteninstabilität und chromosomalen Abberationen als Zeichen eines defekten *DNA-mismatch-repair*-Systems sollen die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse und der Zytogenetik mit dem Expressionsmuster des MMR-assoziierten hMSH2-Proteins in immunhistochemischen Untersuchungen von Knochenmarkausstrichen bzw. mittels Western Blot aus Knochenmarkaspiraten korreliert werden.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Bezugsquellennachweis

Nachfolgend sind die verwendeten Reagenzien, Antikörper, Verbrauchsmaterialien und Geräte mit Herstellernachweis in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt.

#### 2.1.1 Reagenzien

- AccuGel™ 29:1 (40% Acrylamide : Bisacrylamide)	National Diagnostics, Atlanta, USA
- Aceton	E. Merck, Darmstadt
- Ammoniumperoxodisulfat	E. Merck, Darmstadt
- Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
- BenchMark™ Protein Ladder	GIBCO BRL, Gaithersburg, USA
- Borsäure	E. Merck, Darmstadt
- Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
- Coomassie Brilliant-Blue G250	Sigma, Deisenhofen
- DAB (3,3'-Diaminobenzidin)	DAKO, Hamburg
- DNA-Leiter (pUC19 DNA/Mspl (HpaII) Marker)	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
- Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
- Dinukleotidtriphosphate (dNTP)	Boehringer, Mannheim
- Dithiothreiol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
- Essigsäure	E. Merck, Darmstadt
- Ethylenguanintetraessigsäure (EGTA)	Sigma, Deisenhofen
- Ethanol absolut (99,8%)	Baker, Deventer, Niederlande
- Formaldehyd 37%	E. Merck, Darmstadt
- Formamid	E. Merck, Darmstadt
- Gelatine	E. Merck, Darmstadt
- Glycin	E. Merck, Darmstadt
- Harnstoff	E. Merck, Darmstadt
- Isopropanol	E. Merck, Darmstadt
- Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
- Mayers Hämalaunlösung	E. Merck, Darmstadt
- Methanol	E. Merck, Darmstadt
- Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
- Natriumcarbonat	E. Merck, Darmstadt

---

- Natriumchlorid	Paesel + Lorei, Hanau
- Natriumduodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
- Natriumfluorid	Sigma, Deisenhofen
- Natriumhydroxid-Plätzchen	E. Merck, Darmstadt
- Natrium-Orthovanadat	Sigma, Deisenhofen
- Natronlauge (1 N und 5 N)	E. Merck, Darmstadt
- Nonidet P-40 (NP-40)	Fluka, Buchs, Schweiz
- Phosphate Buffered Saline (PBS) Tabletten	Sigma, Deisenhofen
- Pepstatin A	Sigma, Deisenhofen
- Phosphorsäure	E. Merck, Darmstadt
- Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
- Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
- Propanol	Fluka, Neu-Ulm
- Rothistol	E. Merck, Darmstadt
- Silbernitrat	Paesel + Lorei, Frankfurt a. M.
- SurfaSil™	Pierce, Rockford, USA
- Taq DNA Polymerase	GIBCO BRL, Gaithersburg, USA
- N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	E. Merck, Darmstadt
- Trichloressigsäure (TCA)	E. Merck, Darmstadt
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Paesel + Lorei, Frankfurt a. M.
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan-HCl (Tris HCl)	Paesel + Lorei, Frankfurt a. M.
- Triton X-100	Serva Feinbiochemica, Hamburg
- Tween 20	Serva Feinbiochemica, Hamburg
- Vitro-Clud	R. Langenbrinck, Emmendingen

### 2.1.2 Antikörper

- hMSH2 (Ab-2), muriner monoklonaler IgG <sub>1</sub> -Antikörper	Dianova/Oncogene Research Products, Hamburg
- biotinylierter Sekundärantikörper (Ziege)	Bio-Rad, Hercules, USA

### 2.1.3 Zelllinie

- KG-1 (humane AML-Zelllinie)	Deutsche Sammlung von Mikro- organismen und Zellkulturen GmbH, DSM ACC 14, Braunschweig
-------------------------------	---

### 2.1.4 Kits

- |  |                                  |
|--|----------------------------------|
| - QIAamp Blood Kit                                 | Qiagen GmbH, Hilden              |
| - DAKO Catalyzed Signal Amplification (CSA) System | DAKO, Hamburg                    |
| - Enhanced-Chemoluminescence-Reagenz (ECL)         | Amersham, Arlington Heights, USA |

### 2.1.5 Verbrauchsmaterialien

- |   |                                  |
|---|----------------------------------|
| - Blottingpapier                                    | Schleicher und Schüll, Göttingen |
| - Deckgläser  | Carl Roth, Karlsruhe             |
| - Einmal-Spritzen (2 ml)                            | B. Braun, Melsungen              |
| - Halbmikroküvetten                                 | Sarstedt, Sarstedt               |
| - Nitrozellulosemembranen                           | Amersham, Arlington Heights, USA |
| - Objektträger „Superfrost Plus“                    | Carl Roth, Karlsruhe             |
| - PCR-Reaktionsgefäße (0,5 ml)                      | Biozym, Hess. Oldendorf          |
| - Pipettenspitzen mit Filter (10, 20, 100, 1000 µl) | Biozym, Hess. Oldendorf          |
| - Reaktionsgefäße (1,5, 15, 50 ml)                  | Sarstedt, Nümbrecht              |
| - Reaktionsgefäße „Safe Lock“ (2 ml)                | Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg |
| - Röntgenfilme „ECL-Hyperfilm“                      | Amersham, Arlington Heights, USA |

### 2.1.6 Geräte

- |  |                                  |
|--|----------------------------------|
| - Blotgerät „Trans-blot SD“                              | Bio-Rad, München                 |
| - Elektrophoresekammer (PAGE)                            | BioTech, St. Leon-Rot            |
| - Elektrophoresekammer (SDS-PAGE) „Mini-Protean II Cell“ | Bio-Rad, München                 |
| - Elektrophorese-Netzgerät E734                          | Consort, Turnhout, Belgien       |
| - Feuchtkammer   | Krannich, Göttingen              |
| - Gel-Digital-Video-Dokumentation „Concept No. 2“        | INTAS, Göttingen                 |
| - Magnetrührer „IKA Cembimag RCO“                        | Janke & Kunkel, Staufen i. Brsg. |
| - Mikroliterpipette                                      | Hamilton, Bonaduz, Schweiz       |
| - Mikroskop „Axioskop 2“                                 | Zeiss, Göttingen                 |
| - Mikrowellenherd „MWS 2819“                             | Bauknecht, Schorndorf            |

---

- Thermocycler „TRIO Thermoblock™“	Biometra, Göttingen
- pH-Meter „CG 710“	Schott, Mainz
- Pipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
- Spacer	Krannich, Göttingen
- Spektralphotometer	Schütt, Göttingen
- Waage	Sartorius, Göttingen
- Wasserbad „Medax“	Ernst + Schütt jr., Göttingen
- Wasserschüttelbad beheizt	Ges. für Labortechnik, Hannover
- Vortexer „Vibrofix VF1 Electronic“	Janke & Kunkel, Staufen i. Brsg.
- Zentrifuge „Microfuge™ 11“	Beckman Coulter, Fullerton, USA

## 2.2 Lösungen und Puffer

Die aufgeführten Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur gelagert.

- **APS-Lösung (10%)**  
10 g Ammoniumperoxidisulfat ad 100 ml Aqua bidest. Lagerung bei 4 °C
- **Bradford-Lösung**  
50 mg Coomassie Brilliant-Blue G250, 50 ml Ethanol, 100 ml Phosphorsäure (85%) ad 1l Aqua bidest. Filtration.
- **DNA-Längenstandard**  
1 µl DNA-Leiter (pUC 19 DNA / MspI (HpaII) Marker) ad 100 µl DNA-Laufpuffer.  
Lagerung bei -20 °C.
- **DNA-Laufpuffer**  
9,5 ml Formamid, 10 mg Bromphenolblau, 4 mg NaOH, 100 µl 0,05 M EDTA ad 10 ml Aqua bidest, Sättigung der Lösung mit Succrose. Lagerung bei -20 °C.
- **Entwicklerlösung**  
7,5 g NaOH, 2 ml Formaldehyd (37%) ad 500 ml Aqua bidest. Ansetzen der Lösung unmittelbar vor Gebrauch.
- **10 x Elektrophoresepuffer (DNA)**

---

108 g Tris, 55 g Borsäure, 4 ml 0,05 M EDTA pH 8,0 ad 1 l Aqua bidest.

- **10 x Elektrophoresepuffer (Protein)**

248 mM Tris, 1918 mM Glycin, 35 mM SDS

- **Fixierlösung (Immunhistochemie)**

17,5 ml Aceton, 17,5 ml Methanol, 15 ml Formaldehyd (37%). Lagerung bis zum Gebrauch auf Eis.

- **Fixier- und Waschlösung**

100 ml Ethanol, 5 ml Eisessig, ad 1 l Aqua bidest.

- **dNTP-Lösung (2,5 mM)**

2,5 mM dATP, 2,5 mM dCTP, 2,5 mM dGTP, 2,5 mM dTTP. Lagerung bei -20 °C.

- **G-NETT**

0,25% (w/v) Gelatine, 10% (v/v) 10 x NETT-Puffer.

- **4 x Lämmli-Puffer**

10 mg EDTA in 1,3 ml Aqua bidest (pH 8,45), 0,8 g DTT, 0,5 g Tris, 0,8 g SDS, 10 g Glycerin, 1 Spatelspitze Bromphenolblau ad 20 ml Aqua bidest.

- **Natriumcarbonatlösung**

7,5 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ad 1 l Aqua bidest.

- **10 x NETT-Puffer**

1,5 M NaCl, 0,05 M EDTA (pH 8), 0,5 M Tris (pH 7,5), 0,5% (v/v) Triton X-100.

- **PCR-Ansatz (20 µl)**

7,2 µl Aqua bidest, 1,0 µl 10 x PCR Buffer (1 x) \*, 0,5 µl W-1 1% (0,05%) \*, 0,5 µl DMSO (2,5%), 0,4 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub> (1 mM), 0,4 µl 2,5 mM dNTP-Lösung (0,2 mM), 2,0 µl 7,5 µM Primer-Lösung (0,75 µM), 3,0 µl Template-DNA (ca. 2,5 ng/µl), 1 Tropfen Mineralöl (Verdunstungsschutz), 5,0 µl 0,05 U/µl Taq DNA-Polymerase bei 94 °C zu Beginn des PCR-Programms.

Herstellung des PCR-Ansatzes auf Eis unmittelbar vor Gebrauch. Die Angaben in Klammern entsprechen den jeweiligen Endkonzentrationen.

\* = wurde zusammen mit der Taq DNA-Polymerase geliefert



- **Peroxidase-Blocklösung**  
10 ml 1 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ad 50 ml Methanol, unmittelbar vor Gebrauch angesetzt.
- **Polyacrylamidgel (10 %)**  
10 ml AccuGel™, 4 ml 10 x Elektrophoresepuffer (DNA), 19 g Harnstoff ad 40 ml Aqua bidest. Lösen des Harnstoffs bei 50 °C im Wasserbad.
- **Ponceau S-Lösung**  
2 g/l Ponceau S, 2% (v/v) TCA. Lagerung lichtgeschützt.
- **Primer-Lösung**  
7,5 µM Primer (sense), 7,5 µM Primer (antisense). Lagerung bei -20 °C.
- **Mod. RIPA-Puffer**  
50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1% (v/v) NP-40, 0,25% (w/v) Na-Deoxycholat, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin A, 1 mM NaF, 1 mM Na-Orthovanadat.
- **Sammelgelpuffer**  
1,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 2% (w/v) SDS.
- **Silbernitratlösung**  
0,5 g AgNO<sub>3</sub> ad 500 ml Aqua bidest. Lagerung unter Lichtabschluß bei 4 °C.
- **Taq DNA-Polymerase (0,05 U/µl)**  
20 µl 10 x PCR Buffer \*, 1 µl Taq DNA-Polymerase (5 U/µl) ad 100 µl Aqua bidest.  
Ansetzen auf Eis unmittelbar vor Gebrauch.  
\* = wurde mit der Taq DNA-Polymerase geliefert.
- **TBS-Puffer**  
0,3 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl, 0,1% (v/v) Tween 20. Einstellen des pH-Wertes mit NaOH (1N) auf 7,6.
- **Template-DNA (ca. 17 ng/µl)**  
Einstellen mithilfe des Spektralphotometers.

- **Transblot-Puffer**

48 mM Tris, 0,13 mM SDS, 39 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol.

- **Trenngelpuffer**

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 2% (w/v) SDS.

## **2.3 Mikrosatellitenanalyse**

### **2.3.1 Patienten**

Die Mikrosatellitenuntersuchungen wurden an insgesamt 40 Knochenmarkaspiraten durchgeführt, die Patienten mit AML im Rahmen der hämatologischen Diagnostik entnommen worden waren. Als Quelle für Referenz-DNA wurden bukkale Schleimhautzellen verwendet, die mithilfe eines sterilen Watteträgers von den jeweiligen Patienten gewonnen wurden. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei -20 °C. Ein hereditäres chromosomales Instabilitätssyndrom (Ataxia teleangiectatica, Fanconi-Anämie, Bloom-Syndrom, Xeroderma pigmentosum) wurde bei allen Patienten anamnestisch ausgeschlossen.

### **2.3.2 Zytogenetik**

Die Chromosomenanalysen erfolgten durch Mitarbeiter des zytogenetischen Labors der Abteilung Hämatologie und Onkologie der Universität Göttingen. Es wurde dabei eine modifizierte GAG-Banden-Technik nach Kurzzeitkultur von Knochenmarkaspiraten verwendet (Stollmann et al. 1985). Die Chromosomentaxonomie erfolgte in Übereinstimmung mit dem International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 1995, 1995).

### **2.3.3 DNA-Isolation**

Zur Isolation der DNA aus Knochenmarkaspiraten und Bukkalschleimhautzellen wurde das QIAmp Blood Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Nach Entfernung von Proteinbeimengungen mittels Proteinase K wurde die DNA mit Ethanol ausgefällt und durch Zentrifugation auf einem feinporigen Siliziumfilter adsorbiert. Anschließend wurde die DNA mehrfach mit den enthaltenen Pufferlösungen gewaschen und zentrifugiert. Nach Eluierung erfolgte die Aufbewahrung der DNA bei -20 °C.

### 2.3.4 Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA

Im Spektrofotometer wurden die Extinktionen der 1:100 verdünnten DNA-haltigen Filtrate bei den Wellenlängen 260 und 280 nm gemessen. Gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz ergaben sich die DNA-Konzentrationen durch Multiplikation der gemessenen Extinktionen mit einem Faktor, der über die Erstellung einer Standarddeichkurve mittels verschiedener Nukleinsäure-Konzentrationen ermittelt wurde.

### 2.3.5 Mikrosatellitenloci und Primer

Es wurden 18 Mikrosatelliten auf 15 verschiedenen Chromosomenarmen untersucht, um einen repräsentativen Eindruck der Häufigkeit von LOH und MSI bei AML zu erhalten. Diese sind im Einzelnen:

- BAT-26, BAT-40 (Papadopoulos 1995, Samowitz et al. 1999, Liu et al. 1996),
- CACNL1A3 (Gregg et al. 1993),
- D4S171 (Weber und May 1990),
- APC (Spirio et al. 1991, Senda et al. 2005),
- IRF1 (Maeck et al. 2000),
- D7S522 (Weissenbach et al. 1992, Zenklusen et al. 1994),
- WT1 (Haber et al. 1990, Coppes et al. 1993),
- D12S89 (Weissenbach et al. 1992, Stegmaier et al. 1995),
- RB1 (Yandell und Dryja 1989),
- NF1 (Lazaro et al. 1993),
- NM23-H1 (Hall et al. 1992, Tee et al. 2006),
- TP53 (Jones und Nakamura 1992),
- DCC (Fearon et al. 1990),
- PLCpr (Rothschild et al. 1992),
- D8S87 (Trapman et al. 1994, Weber et al. 1990),
- LPL (Bova et al. 1993) und
- D10S197 (Risio et al. 1996).

Die Marker wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt:

- Enge chromosomale Beziehung zu einem Tumorsuppressor-Gen (D4S171, APC, IRF1, D7S522, D8S87, LPL, D10S197, WT1, D12S89, RB1, NF1, NM23-H1, TP53, DCC),
- hoher Heterogenitätsgrad (Ausnahme: BAT-26),
- Lokalisation auf häufig (1q, 5q, 7q, 12p, 13q, 17p, 18q, 20q)

- bzw. selten (4q, 8p, 10p, 11p, 17q) in klonale Aberrationen involvierten Chromosomensegmenten bei MDS (HAASE et al. 1995).

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma NAPS (Göttingen) auf dem DNA/RNA-Synthesizer „Expedite 8009“ (Perceptive Biosystems, Wiesbaden) synthetisiert.

Die Primersequenzen und Loci der untersuchten Mikrosatelliten sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3 Loci und Primer.

MARKER	LOKALISATION	BASENLÄNGE	REPEAT - MOTIF	PRIMER - SEQUENZEN
BAT-40	1p13.1	~ 80 - 100	TTTT.TT. (T) <sub>7</sub> .....TTTT. (T) <sub>40</sub>	5>ATTAACCTTCACACCAAC<3' 5>GTAGAGCAAGACCACCTTG<3'
CACNL1A3	1q31/32	141-157	keine Angaben	5>GCTGAGCTAGCGAGGGGAGGGT<3' 5>CCCAGCAAAAACCTGAGTGTGGATG<3'
BAT-26	2p	~ 80 - 100	(T) <sub>5</sub> .... (A) <sub>26</sub>	5>TGACTACTTTTGACTTCAGCC<3' 5>AACCATTC AACATTTTTAACCC<3'
D4S171	4q33/35	43-161	(AC) <sub>20</sub> AG(AGAC) <sub>5</sub> AGA	5>TGGGTAAGAGTAGGGCTG<3' 5>GGTCCAGTAAGAGGACAGT<3'
APC	5q21/22	96-122	(CA) <sub>n</sub>	5>ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG<3' 5>AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT<3'
IRF1	5q31	~ 243	(CA) <sub>n</sub>	5>CTGGAATCTCTATGCCAGATAGGTC<3' 5>GTGCCCAGGTAGGAAGGGCTTTAC<3'
D7S522	7q31	217-229	(CA) <sub>n</sub>	5>GCCAACTGCCACTTCTC<3' 5>ACGTGTTATGCCACTCCC<3'
D8S87	8p12	145-157	keine Angaben	5>GGTGTGTTGTAATAATAAAC<3' 5>TGTCAAATCTTAAGCACAG<3'
LPL	8p22	106-134	keine Angaben	5>TAGAGCACACTATCCAGGTGA<3' 5>CAGTGGTTATTTGGGGATA<3'
D10S197	10qter	161-173	CACCAGA(CA) <sub>7</sub> .A.A(CA) <sub>12</sub> (AGAAA) <sub>2</sub>	5>ACCACTGCACCTCAGGTGAC<3' 5>GTGATACTGCTCCTCAGGCTCC<3'
WT1	11p13	40-148	(CA) <sub>n</sub>	5>AATGAGACTTACTGGGTGAGG<3' 5>TTACACAGTAATTTCAAGCAACGG<3'
D12S89	12p13.2	254-288	(CA) <sub>n</sub>	5>ATTTGAGAGCAGCGTGTCT<3' 5>CCATTATGGGAGTAGGGT<3'
RB1	13q14.3	266-306	(CTTTT) <sub>n</sub>	5>CTCCTCCCTACTTACTTGT<3' 5>AATTAACAAGGTGTGGGTACACG<3'
NF1	17q11.2	171-187	(CA) <sub>n</sub>	5>CAGAGCAAGACCCCTGTCT<3' 5>CTCCTAACATTTTAAACCTTA<3'
NM23-H1	17q22	94-104	(CA) <sub>n</sub>	5>TTGACCGGGTAGAGAACTC<3' 5>TCTCAGTACTCCCGTAGCC<3'
TP53	17p13.1	103-135	(A) <sub>14</sub> GAAAAAGAAAAAGAAAGAA A(.) <sub>51</sub> (CA) <sub>24</sub>	5>AGGGACTATTACAGCCCCAGGTG<3' 5>ACTGCCACTCCTTGCCCCATTC<3'
DCC	18q21	~ 215	keine Angaben	5>GATGACATTTCCCTCTAGA<3' 5>TTTTAGTGGTATTGCCCTTGAA<3'
PLCpr	20q12/13.1	150-184	(CA) <sub>n</sub>	5>AACCACTGCTCTCCGGGTG<3' 5>CTGCCTCAACTGATCTCAATGG<3'

### 2.3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur gezielten exponentiellen Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde sie nach einem modifizierten Originalprotokoll von Saiki et al. durchgeführt (1985). Hierbei werden zyklisch drei Reaktionsschritte durchlaufen, die sich in Dauer und Temperatur unterscheiden. Zunächst wird durch Erhitzung die DNA in ihre Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Anschließend erfolgt bei niedriger, primerspezifischer Temperatur eine Anlagerung der Primer an die DNA (Annealing). Im dritten Schritt wird durch die DNA-Polymerase der komplementäre Strang durch Anlagerung von Nukleotiden ausgehend vom Primer in Richtung 5`-Ende des Ursprungsstrangs gebildet (Elongation). Im Verlauf der weiteren PCR-Zyklen steigt die Anzahl der Ziel-DNA exponentiell an, da sie selbst für die weitere Amplifikation als Matrize dient. Im Gegensatz dazu vermehren sich die langen PCR-Produkte nur linear, so dass die Ziel-DNA nach Reaktionsende in weitaus höherer Konzentration vorliegt.

Es wurden 36 PCR-Ansätze pro Patient durchgeführt (18 mit DNA aus Knochenmark und 18 mit DNA aus Bukkalschleimhautzellen). Als Negativkontrolle diente Aqua bidest anstelle von DNA. Die anschließende Lagerung der PCR-Produkte erfolgte bei 4 °C. Nachfolgend sind Dauer und Temperaturen der einzelnen Reaktionsschritte aufgeführt (PCR-Programm):

- Denaturierung: 45 s (3 Min. während des ersten Zyklus) bei 94 °C
- Annealing: 30 s
  1. bei 53 °C (BAT-40, D7S522, NF1, DCC) bzw.
  2. bei 62 °C (BAT-26, D4S171, APC, IRF1, D8S87, LPL, D10S197, WT1, D12S89, NM23-H1, TP53, PLCpr) bzw.
  3. bei 69 °C (CACNL1A3)
- Elongation: 25 s (10 Min. während des letzten Zyklus) bei 72 °C
- Anzahl der Zyklen: 31

### 2.3.7 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

Die PAGE dient zur Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Basenlänge. Unter Zugabe von Harnstoff ist durch Ausschaltung der Sekundärstruktur bei ausreichenden Polyacrylamid-Konzentrationen eine sehr genaue Trennung möglich, weshalb dieses Verfahren zum Erkennen von MSI besonders gut geeignet ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden 10-%ige Polyacrylamidgele der Maße 20 cm x 20 cm x 0,1 cm verwendet, deren Polymerisation nach Zugabe von 500 µl APS-Lösung und 50 µl

TEMED eingeleitet wurde. Das Gel wurde zügig blasenfrei gegossen und zur Aussparung von 24 Probestaschen ein entsprechender Kamm eingesetzt. Nach 60-minütiger Polymerisation bei horizontaler Lagerung wurde das Gel in die mit einfach konzentriertem Elektrophoresepuffer gefüllte Elektrophoresekammer gestellt und der Taschenkamm vorsichtig entfernt.

Es wurde jeweils 4 µl der zu analysierenden PCR-Produkte mit je 1 µl DNA-Laufpuffer versetzt, anschließend kurz zentrifugiert, 5 Minuten im Thermocycler auf 95 °C erhitzt und auf Eis gelagert. Die Geltaschen wurden unter Verwendung einer Einmal-Spritze (2 ml) zur Entfernung von Polyacrylamidresten mit Elektrophoresepuffer ausgespritzt. Anschließend erfolgte die Auftragung der PCR-Proben in die Taschen, so dass die jeweils einem Patienten zugehörigen DNA-Proben aus Knochenmarks- und Bukkal-DNA unter Verwendung desselben Primers nebeneinander aufgetrennt wurden. Zur Längenidentifizierung wurden in die erste Tasche 5 µl eines DNA-Längenstandards gegeben. Die letzte Tasche wurde mit der Negativkontrolle befüllt. Die Elektrophorese wurde bei 100 V über 12 Stunden durchgeführt.

### **2.3.8 Silberfärbung**

In der vorliegenden Arbeit wurde eine leicht modifizierte Methode nach Budowle et al. (1991) angewendet. Das Gel wurde nach Beendigung der Elektrophorese im Wasserschüttelbad zweimal 3 Minuten in Fixier- und Waschlösung bewegt. Anschließend wurde das Gel für 10 Minuten in der zugegebenen Silbernitratlösung belassen. Zur Entfernung von überschüssiger Silbernitratlösung wurde das Gel in zwei 10-sekündigen Schritten mit Aqua bidest. gewaschen und anschließend für 20 – 30 Minuten in die Entwicklerlösung getaucht. Zur Fixierung der Färbeergebnisse erfolgte eine 5-minütige Inkubation in Natriumcarbonatlösung.

Die Untersuchung auf das Vorliegen von LOH und MSI erfolgte durch den Vergleich der Banden aus Knochenmarks- und Bukkal-DNA. Zur Dokumentation wurde das Gel-Digital-Video-Dokumentationssystem verwandt mit anschließender Abspeicherung auf 3,5"-Disketten.

## **2.4 Immunhistochemie**

### **2.4.1 Patienten**

Bei 15 Patienten wurden immunhistochemische Untersuchungen zur Beurteilung des Expressionsgrades des hMSH2-Proteins in den hämatopoetischen Zellen durchgeführt

(Maeck et al. 2000). Diese erfolgten an Bröckelausstrichen von Knochenmarkaspiraten, die Patienten mit AML im Rahmen der hämato-onkologischen Diagnostik entnommen worden waren und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt wurden.

### **2.4.2 Immunoperoxidase-Färbung**

Durch 15-sekündige Inkubation in eisgekühlter Fixierlösung erfolgte die Fixierung und Zellmembranlyse der Bröckelausstrich-Präparate von Knochenmarkaspiraten. Anschließend wurde die in Teilen der hämatopoetischen Zellen enthaltene endogene Peroxidase geblockt, um falsch-positive Ergebnisse zu unterbinden, da zur Antikörperdetektion ein Immunoperoxidase-Verfahren verwendet werden sollte. Die Präparate wurden 10 Minuten lang in Peroxidase-Blocklösung bei 4 °C inkubiert. Anhand der fehlenden zytoplasmatischen Anfärbung reifer, normalerweise stark peroxidasehaltiger Granulozyten konnte der Erfolg des Verfahrens kontrolliert werden.

Das hMSH2-Protein wurde unter Verwendung des Catalyzed Signal Amplification (CSA) System (DAKO, Hamburg) nach Angaben des Herstellers detektiert. Die Nachweisreaktion basiert auf einer Amplifikationsreaktion durch peroxidasekatalysierte Ausfällung von Biotin. Zunächst wird dabei der gebundene hMSH2-Primärantikörper (Maus) von einem biotinylierten Sekundärantikörper (Ziege) detektiert, an den wiederum ein Streptavidin-Biotin-Peroxidasekomplex bindet. An der Antigenbindungsstelle wird in Gegenwart von Wasserstoffperoxid die Bindung einer biotinylierten Phenolgruppe (Tyramid) katalysiert, was zu einer starken Zunahme der zur Verfügung stehenden Biotinmoleküle führt. Diese vermitteln im folgenden Schritt die Bindung von Streptavidin-Peroxidase-Konjugaten, welche bei Zugabe von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und Wasserstoffperoxid zur Bildung eines braunen Präzipitates als eigentliche Nachweisreaktion führen.

### **2.4.3 Hämalaun-Färbung und Konservierung**

Anschließend wurden die Präparate 10 Sekunden lang in ein Hämalaunbad (Mayers Hämalaunlösung) getaucht und dann unter fließendem Wasser gespült, bis kein Farbstoff mehr in Lösung ging. Die Entwässerung der Ausstriche erfolgte anschließend durch jeweils 30-sekündiges Inkubieren in Ethanol (60%), Ethanol (75%), Ethanol (90%), Isopropanol und Rothistol. Nach vollständiger Verdunstung des Rothistols wurden die Präparate unter Verwendung jeweils eines Tropfens Vitro-Clud eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch.



## **2.5 Western Blot**

### **2.5.1 Patienten**

Bei 12 Patienten wurde ergänzend die Expression des hMSH2-Proteins mittels Western Blot untersucht. Dies erfolgte an Blasten von Knochenmarkaspiraten, die Patienten mit AML im Rahmen der hämato-onkologischen Diagnostik entnommen worden waren und bis zur Verwendung bei  $-20^{\circ}$  aufbewahrt wurden.

### **2.5.2 Zellyse**

Es wurden Blasten aus Knochenmarkaspiraten von AML-Patienten in Suspension sowie Zellen aus Kulturen (KG1) entnommen und bei 2000 Upm über 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellpellets wurden in  $4^{\circ}\text{C}$  kaltes PBS überführt und erneut bei 2000 Upm über 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 1 ml mod. RIPA-Puffer /  $1 \times 10^7$  Zellen resuspendiert. Es folgte eine 20-minütige Inkubationszeit bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf einem Drehrad, danach wurde erneut zentrifugiert (15000 Upm über 20 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$ ), um nicht lysierte Zellbestandteile zu entfernen. Das Lysat wurde zur Proteinbestimmung eingesetzt.

### **2.5.3 Proteinbestimmung nach Bradford**

Entsprechend dem Originalprotokoll von Bradford (1976) wurden die Proteinkonzentrationen bestimmt. Jeweils  $50\ \mu\text{l}$  einer mit Aqua bidest. hergestellten 1:10-Verdünnung der Lysate wurden mit 1 ml Bradford-Lösung versetzt und über 20 Minuten in Halbmikroküvetten inkubiert. Die Extinktionen wurden anschließend bei 578 nm photometrisch gemessen. Die gefundenen Werte wurden zur Errechnung der Proteingehalte mit dem Faktor 4,2 multipliziert, entsprechend der über eine mit verschiedenen BSA-Konzentrationen ermittelten Standarddeichkurve.

### **2.5.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE ist ein elektrophoretisches Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach dem Molekulargewicht. Hierbei werden durch die Reagenzien SDS und DTT sowohl Sekundär- als auch Tertiärstrukturen ausgeschaltet. Zum Einsatz kamen in der vorliegenden Arbeit  $0,075\ \text{cm}$  durchmessende Gele mit einer Trenngellaufstärke von  $6\ \text{cm}$ . Das 7,5-%ige Trenngel setzte sich aus 10 ml Aqua bidest, 5 ml Trenngelpuffer und 5 ml AccuGel™ zusammen. Nach Zugabe von  $150\ \mu\text{l}$  APS-Lösung und  $40\ \mu\text{l}$  TEMED wurde das Gel

gegossen und mit Aqua bidest überschichtet. Dieses wurde nach Erstarren des Gels mit Filterpapier wieder abgenommen. Das 3,7-%ige Sammelgel bestand aus 4,7 ml Aqua bidest, 1,75 ml Sammelgelpuffer sowie 0,9 ml AccuGel™ und wurde nach Zugabe von 80 µl APS-Lösung und 20 µl TEMED auf das Trenngel gegossen. Vor Erstarren des Sammelgels wurde ein 12-Taschenkamm bis kurz oberhalb der Trenn-/Sammelgel-Grenze eingesetzt. Nach 4:1-Verdünnung mit 4 x Lämmli-Puffer und anschließendem 5-minütigem Erhitzen bei einer Temperatur von 95 °C wurden die zu analysierenden Proben (Proteingehalt von jeweils 35 µg) in die Geltaschen des auspolymerisierten Gels pipettiert. Zusätzlich zu den Zelllysaten wurde ein Molekulargewichtsmarker (Benchmark Protein Ladder) mit dem Bereich von 10 bis 220 kD aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 90 V über 2,5 Stunden durchgeführt.

### **2.5.5 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran**

Das Gel wurde auf einer Nitrocellulosemembran zwischen zwei Lagen von jeweils einem dicken und drei dünnen in Transferpuffer getränkten und auf die Größe des Trenngels verkleinerten Blottingpapieren plaziert. Die untere Papierschicht kam auf die Anode, die obere auf die Kathode des Blotgerätes. Der Proteintransfer vom Gel auf die Membran erfolgte bei unbegrenzter Spannung und  $1,4 \text{ mA/cm}^2$  für die Dauer von 1,5 Stunden. Die Membran wurde anschließend zur reversiblen Anfärbung der Proteine 1 Minute lang in Ponceau S inkubiert. Die Molekulargewichtsmarker wurden mit einem Stift gekennzeichnet. Anschließend wurde die Ponceau S-Lösung durch dreimaliges jeweils 20-minütiges Waschen in G-NETT entfernt.

### **2.5.6 Immundetektion und Enhanced-Chemoluminescence-Verfahren (ECL)**

Alle Inkubationsschritte erfolgten auf einem Kippschüttler. Die Nitrocellulosemembran wurde 1 Stunde lang in G-NETT geschwenkt zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Anschließend wurde der hMSH2-Antikörper im Verhältnis 1:1000 mit G-NETT verdünnt und zusammen mit der Membran bei 4° C über Nacht inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen in G-NETT für insgesamt 30 Minuten wurde als Sekundärantikörper ein Meerrettich-Peroxidase-markierter Ziege-anti-Maus-Antikörper im Verhältnis 1:20000 in G-NETT für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Anschließend erfolgte eine erneute fünfmalige Waschung mit G-NETT für 30 Minuten. Unter Zuhilfenahme eines ECL-Kits, dessen Hauptkomponenten Luminol und Wasserstoffperoxid waren, wurde die Antikörperdetektion durchgeführt. Hierbei führte eine peroxidaseinitiierte Reaktionskette zu einer Lumineszenz, die zur Belichtung des Films genutzt werden konnte. Beide ECL-

Komponenten wurden in einer Dunkelkammer zu gleichen Teilen gemischt, zusammen mit der Membran für 1 Minute inkubiert und dann auf einen Röntgenfilm gelegt. Die Filmentwicklung wurde in einem Automaten durchgeführt.

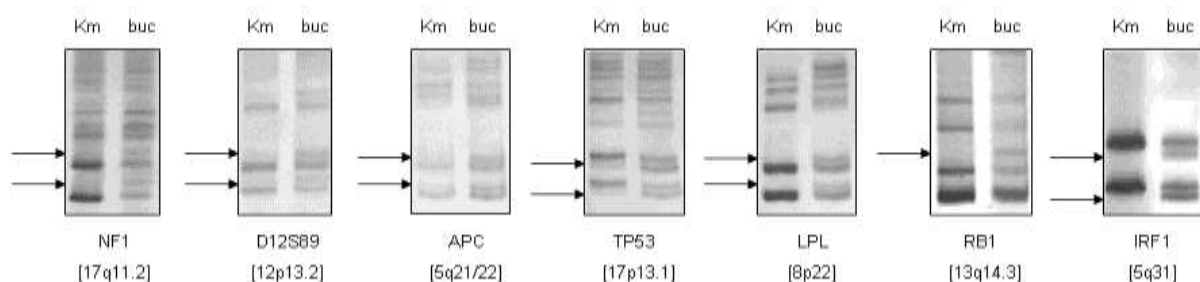
## 2.6 Exakter Fisher-Test

Zur Auswertung der Ergebnisse und Prüfung eines statistischen Zusammenhangs zwischen dem Auftreten von LOH, MSI, Chromosomenaberrationen und der hMSH2-Expression wurde der exakte Fisher-Test für kleine Stichproben verwandt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Detektion von LOH bei der Mikrosatellitenanalyse

Es wurden insgesamt 40 Patienten mit AML untersucht, darunter 18 Frauen und 22 Männer mit einem Durchschnittsalter von 59 Jahren zum Zeitpunkt der Probenentnahme (Spannweite: 17 - 79 Jahre). Entsprechend der FAB-Klassifikation konnten die Patienten den Subtypen wie folgt zugeordnet werden: Drei Patienten mit AML M0, 11 Patienten mit AML M1, fünf mit M2, vier mit M3, 11 mit M4, drei mit M5, kein Patient mit M6 und drei Patienten mit AML M7. In Tabelle 4 sind die untersuchten Patienten aufgelistet. Die Analyse der Mikrosatelliten konzentrierte sich auf 18 Loci, die jeweils vergleichend in der DNA von Blasten sowie in der von abgeschilferten bukkalem Schleimhautepithel desselben Patienten untersucht wurden. So ergaben sich 720 untersuchte Mikrosatellitenpaare, von denen 663 (= 92%) verwertbare Ergebnisse erbrachten. Typische Befunde der LOH sind exemplarisch in Abbildung 1 dargestellt.



**Abbildung 1:** LOH an sieben verschiedenen Loci. Die untersuchten Mikrosatelliten und ihre chromosomale Lokalisation sind unter den jeweiligen Bandenpaaren angegeben. Allelverlust der Knochenmark-DNA wird durch Pfeile demonstriert. Abkürzungen: Km = Knochenmark-DNA; buc = korrespondierende DNA aus Bukkal epithelzellen

Insgesamt konnten bei zehn Patienten LOH nachgewiesen werden (25%), bei zwei dieser Patienten sogar zweifach. Jedoch zeigte keiner der Patienten MSI. Die Verteilung der LOH auf die Subtypen ist in Tabelle 5 dargestellt. Der Marker NF1 (17q11.2) war bei fünf Patienten und somit am weitesten häufigsten betroffen. Bei einem Patienten mit AML M1, bei einem mit sekundärer AML M1 aus MDS, einem anderen mit M2, wieder einem anderen mit sekundärer AML M4 aus MDS und beim fünften Patienten mit einer therapieinduzierten AML M5 wurde bei NF1 ein LOH nachgewiesen.

Die beiden Patienten, die jeweils zwei LOH zeigten, hatten je einen davon beim Marker APC (5q21/22), wie in Tabelle 4 aufgeführt. Zusätzlich betroffen waren TP53 (17p13.1) und LPL (8p22), wie Abbildung 1 zeigt. Weiterhin konnten Allelverluste für Marker D12S89 (12p13.2) bei einem Patienten mit einer sekundären AML M1 aus MDS, für Marker RB1 (13q14.3) bei einem Patienten mit AML M2 sowie für Marker IRF1 (5q31) bei einem Patienten mit AML M4 nachgewiesen werden. In der vorliegenden Untersuchung wurden weder beim Subtyp M3 noch beim Subtyp M7 Allelverluste detektiert.

Auffällig war ein Anteil von über 44% (4 von 9 Patienten) von positiven Befunden beim Auftreten von LOH bei Patienten mit sekundärer bzw. therapieassoziierter AML im Vergleich zu 19,4% (6 von 31) bei Patienten mit de-novo-AML. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4** Karyotypen der untersuchten Patienten und Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse

Patient	Geschlecht	Alter	FAB	Karyotyp	LOH / MSI
1	m	58	M0	46,XY [25]	
2	m	58	M0	46,XY [3]/ 35-39,XY,der(3),del(5)(q13q31),-6,-7,-9,-10,add(11)(p15),der(12),-12,-16,-17,-18,-F,-G [cp11]	LOH bei APC + TP53
3	w	77	M0*	45,XX,+dic(3;11)(q27;q21),del(5)(q22q35),-11,add(11)(q21),-14,dic(20;22)(q11.2;p11.2) [6]/ 61-64,XXX,+1,+1,+2,+3,+4,+5,dic(3;11)(q27;q21)x2,del(5)(q22q35)+6,+8,+10,+12,+13,+14,+15,+16,+17,+18,+dic(20;22)(q11.2;p11.2) [cp2]/46,XX [13]	
4	m	72	M1	46,XY [25]	
5	m	62	M1	46,XY [21]	
6	w	65	M1	47,XX,+8 [20]	LOH bei NF1
7	w	36	M1	46,XX [7]/ 45,XX,del(5)(q11.2),-7 [10]/44,XX,-5,-7 [3]/45,XX,del(5)(q11.2),-7, add(8)(p21) [6]/ 44,XX,+der(5)t(5;8)(q11.2;q11.2),-5,-7,-8 [5]	LOH bei APC + LPL
8	m	31	M1	46,XY,t(6;9)(p23;q34) [17]	
9	w	61	M1	46,XX [13]/92,XXXX [4]	
10	w	68	M1	46,XX [25]	
11	m	65	sM1	43-44,XY,t(3;5)(p12;q13),dic(4;11)(p16;q23),-5,+der(5)t(3;5)(p12;q13),-7,-12,add(17)(p13), del(20)(q11.2),-Y,+mar [cp15]/46,XY, multiple Chromosomenbrüche [10]	LOH bei D12S89
12	m	69	sM1	45,XY,del(5)(q15q31),-7,-10,-11,add(12)(q24),-12,-17,+4mar [cp18]	LOH bei NF1
13	w	76	sM1	46,XX [12]	
14	m	70	sM1	46,XY [19]/92,XXYY [1]	
15	m	55	M2	46,XY [23]	LOH bei NF1
16	w	41	M2	46,XX [17]	
17	m	66	M2	56-57,XY,+1,+2,dic(5;17)(q12;p11),+6,+8,+9,+10,+11(q10)+13,+15,+16,+20,+21,+mar [15]	
18	m	42	M2	46,XY [20]	LOH bei RB1
19	m	70	sM2	46,XY [17]	
20	w	39	M3	46,XX,t(15;17)(q22;q21) [20]	
21	m	17	M3	46,XY [3]/ 46,XY,t(15;17)(q22;q21) [17]	
22	m	68	M3	46,XY [12]/ 46,XY,t(15;17)(q22;q21) [5]/46,XY, idem,-18,+20,+Mar [13]/ in 4 Metaphasen Chromosomenbrüche und -fehlstellungen	
23	w	51	M3	46,XX,t(15;17)(q22;q21) [7]/46,XX,der(15)t(15;17)(q22;q21),ider(17)(q10)t(15;17)(q22;q21) [13]	
24	m	69	M4	46,XY [17]	
25	m	59	M4	46,XY [17]	
26	w	38	M4	46,XX [21]	
27	m	70	M4	46,XY [11]/ 47,XY,+8 [11]	

Patient	Geschlecht	Alter	FAB	Karyotyp	LOH / MSI
29	w	51	M4	46,XX [22]	
30	w	73	M4	46,XX [1]/ 46,XX,t(10;11)(p13;p11.2) [19]	
31	w	66	M4	46,XX;t(4;1)(q21;p14),del(5)(q31,q35) [24]	LOH bei IRF1
32	w	77	M4	nicht untersucht	
33	w	74	sM4 M4 2.	46,XX [1]/ 46,XX,del(7)(q11q33) [19]	LOH bei NF1
34	m	55	Rezidiv	46,XY [25]	
35	m	64	M5	nicht untersucht	
36	w	66	M5a	46,XX [1]/ 47,XX,+8 [10]	
37	m	77	t-AML M5	nicht untersucht	LOH bei NF1
38	m	79	M7	46,XY [20]	
39	m	60	M7	46,XY [2]/ 42,XY,dic(4;9)(p16;q34),del(5)(q13q33),-7,-13,-14,-17,-18,add(19?),+3mar [1]/ 95,XXYY,-7,-X,+13,+14,+14,-18,der(17?),+20,+22 [1]	
40	w	44	sM7	46,XX [2]/ 46,XX,inv(3)(q21q26) [1]/46,XX,inv(3)(q21q26),del(7)(q21) [3]/45,XX,inv(3)(q21q26),-7 [25]	

## 3.2 Zytogenetik

### 3.2.1 Zytogenetische Befunde

Bei 37 der 40 Patienten konnten zytogenetische Daten erhoben werden. Dabei zeigten zwei Patienten eine Tetrasomie ohne strukturelle Veränderungen in einem kleinen Anteil der untersuchten Metaphasen. Komplexe Anomalien traten bei 7 Patienten auf (19%), t (15;17) bei vier Patienten (alle mit AML M3), Trisomie 8 bei drei Patienten, -7/7q- bei zwei Patienten, t (6;9) und inv 3 jeweils bei einem Patienten. Zwei weitere Patienten hatten verschiedenste chromosomale Alterationen.

### 3.2.2 Zytogenetische Befunde in Korrelation zur Mikrosatellitenanalyse

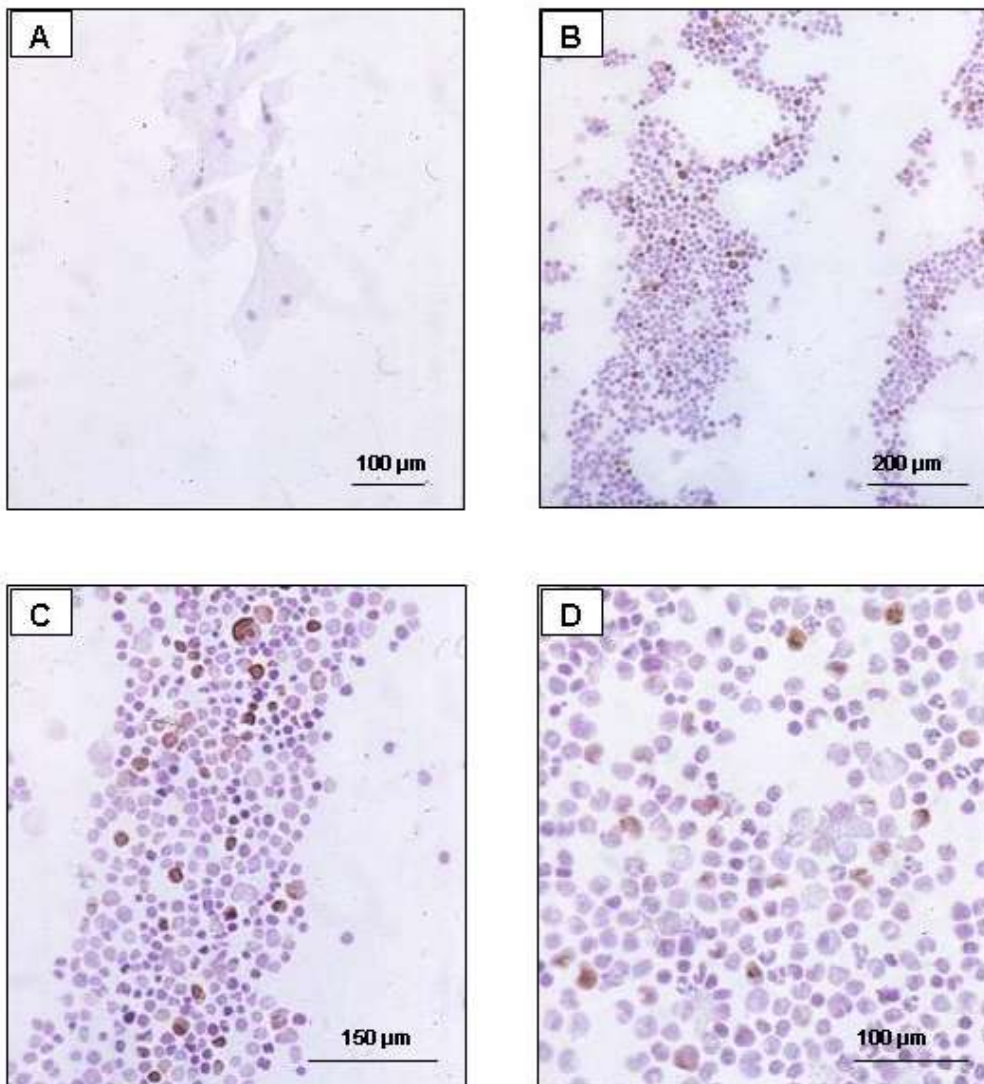
Von den 37 zytogenetisch untersuchten Patienten wiesen 21 (57%) chromosomale Anomalien auf. Von den zehn Patienten, die LOH zeigten, hatten sieben einen abnormen und zwei einen normalen Karyotyp; ein Patient war nicht zytogenetisch untersucht worden. Eine Übereinstimmung der Loci, die von zytogenetischen Veränderungen betroffen waren, und solcher, an denen ein Allelverlust detektiert werden konnte, zeigte sich bei den Patienten 3,7,11,12 und 31. In diesen Fällen fehlte entweder das entsprechende gesamte Chromosom, wie z.B. bei Patient 11 (Chromosom 12 / Marker D12S89) und Patient 12 (Chromosom 17 / Marker NF1), oder nur die jeweilige Region, z.B. bei Patient 7 (del(5)(q11.2) / Marker APC (5q21/22)), bei Patient 3 (del(5)(q22q35) / Marker APC (5q21/22)) und Patient 31 (del(5)(q31,q35) / Marker IRF1 (5q31)). Die Anwendung des exakten Fisher-Tests für kleine Stichproben erbrachte keine signifikant positive Korrelation zwischen chromosomalen Anomalien und der Ausbildung von LOH ( $p=0,141$ ).

## 3.3 hMSH2-Expression

### 3.3.1 Immunhistochemischer Nachweis der hMSH2-Expression

Mithilfe immunhistochemischer Färbung wurde die hMSH2-Expression in den Blasten von 15 Patienten mit AML mit einem murinen, monoklonalen Antikörper gegen hMSH2 untersucht. Entsprechend dem prozentualen Anteil der für hMSH2 positiv gefärbten Zellen wurden die Ergebnisse in sechs Gruppen eingeteilt (Tabelle 5). Neun von 15 Patienten (60%) zeigten weniger als 10% positiv gefärbte Zellen (Score 1). Bei vier Patienten (27%) wurde in 11 bis 30% der Zellen eine Färbung festgestellt (Score 2). Die Zellen von einem weiteren Patienten

konnten als Score 3 klassifiziert werden (31-50% positiv gefärbte Zellen). Nur ein Patient entsprach dem Score 5 (71-90% positiv gefärbte Zellen) und zeigte damit einen hohen Anteil von Blasten mit Expression von hMSH2. Den Scores 4 (51-70%) und 6 (91-100%) konnten keine Patienten zugeordnet werden. Insgesamt zeigten 86,7% der immunhistochemisch untersuchten Patienten weniger als 30% positiv gefärbte Blasten. Sechs der 15 Patienten zeigten weniger als 5% gefärbte Blasten entsprechend einer nur geringen hMSH2-Expression.



**Abbildung 2:** Immunhistochemische Untersuchung unter Verwendung eines Primärantikörpers gegen hMSH2.

- (A) Bei Buccalepithelzellen ist keine nukleäre Braunfärbung erkennbar.
- (B) + (C) KM-Ausstrich eines Patienten mit sekundärer AML M1, komplex aberrantem Karyotyp und LOH bei NF1. Es zeigt sich bei einem Blastenanteil von insgesamt etwa 45% ein immunhistochemischer Nachweis des hMSH2-Proteins in circa 15% der Blasten (Score 2).
- (D) KM-Ausstrich einer Patientin mit AML M2, normalem Karyotyp ohne LOH-Nachweis. Bei einem Blastenanteil über 80% zeigte sich bei weniger als 10% der Blasten eine immunhistochemisch positive Reaktion für hMSH2.

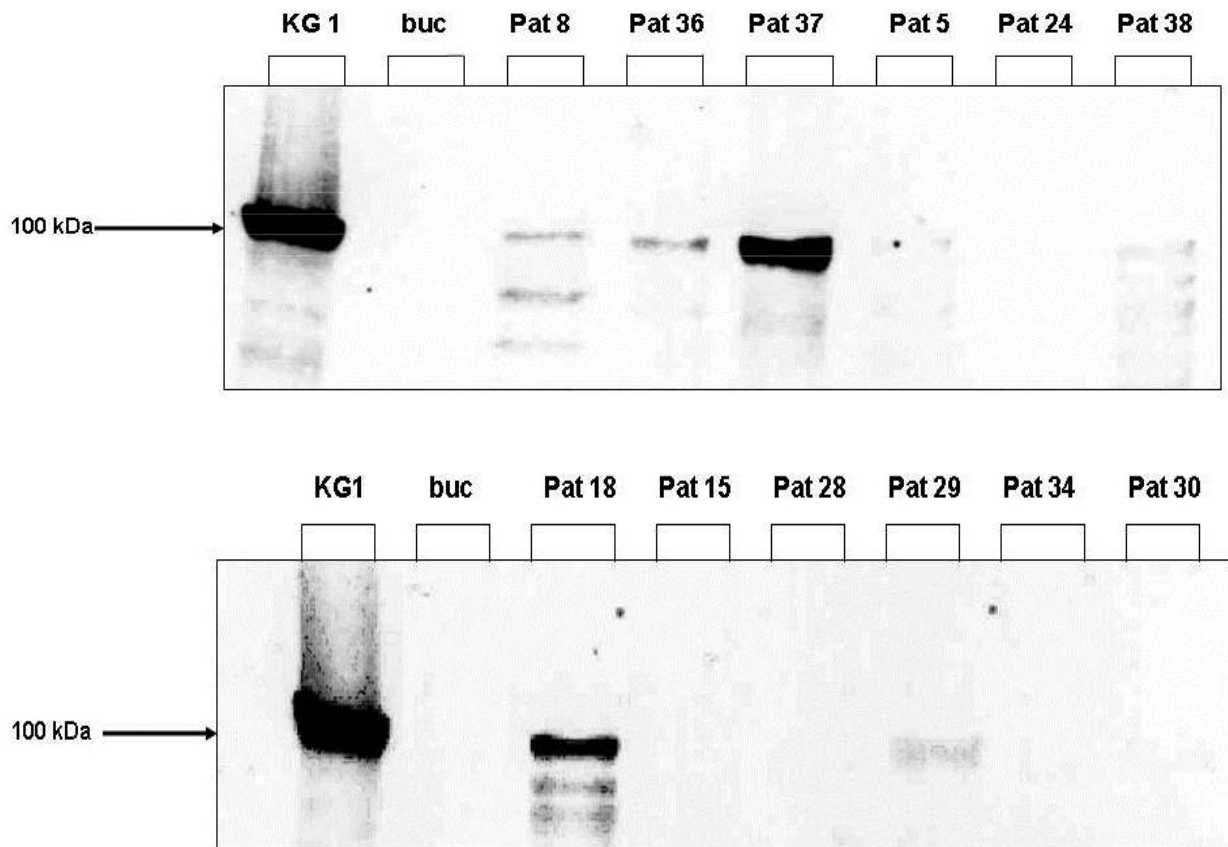


**Tabelle 5** Karyotyp, hMSH2-Expression und LOH-Nachweis bei 15 AML-Patienten.

Patient	FAB	Karyotyp	Blasten (%)	hMSH2-positive Blasten (%)	Score	LOH
4	M1	46,XY [25]	90 - 95	< 5	1	
8	M1	46,XY,t(6;9)(p23;q34) [17]	90 - 95	≈ 90	5	
11	sM1	43-44,XY,t(3;5)(p12;q13),dic(4;11)(p16;q23),-5,+der(5)t(3;5)(p12;q13),-7,-12,add(17)(p13),del(20)(q11.2),-Y,+mar [cp15]/46,XY, multiple Chromosomenbrüche [10]	> 95	≈ 25	3	D12S89
12	sM1	45,XY,del(5)(q15q31),-7,-10,-11,add(12)(q24),-12,-17,+4mar [cp18]	45 - 50	15 - 20	2	NF1
13	sM1	46,XX [12]	50 - 55	25 - 30	3	
14	sM1	46,XY [19]/92,XXYY [1]	≈ 80	5 - 10	2	
15	M2	46,XY [23]	> 95	< 5	1	NF1
16	M2	46,XX [17]	85 - 90	5 - 10	2	
19	sM2	46,XY [17]	75 - 80	5 - 10	2	
20	M3	46,XX,t(15;17)(q22;q21) [20]	> 95	< 5	1	
26	M4	46,XX [21]	70 - 75	< 5	1	
32	M4	nicht untersucht	≈ 70	25 - 30	3	
33	sM4	46,XX [1]/ 46,XX,del(7)(q11q33) [19]	> 95	35 - 40	3	NF1
36	M5a	46,XX [1]/ 47,XX,+8 [10]	> 95	< 5	1	
39	M7	46,XY [2]/ 42,XY,dic(4;9)(p16;q34),del(5)(q13q33),-7,-13,-14,-17,-18,add(19?),+3mar [1]/95,XXYY,-7,-X,+13,+14,+14,-18,der(17?),+20,+22 [1]	> 95	< 5	1	

### 3.3.2 Nachweis von hMSH2 in AML-Blasten mittels Western Blot

Die Expression des hMSH2-Proteins in AML-Blasten von 12 Patienten wurde zusätzlich durch Western Blot untersucht. Dabei zeigten 2 der zwölf Patienten (17%) eine singuläre Protein-Bande bei 100 kDa (Abbildung 3), was dem Molekulargewicht des hMSH2-Proteins entspricht. Es handelte sich um einen Patienten mit AML M2 und normalem Karyotyp sowie einen mit therapieinduzierter AML M5, bei dem der Karyotyp nicht bestimmt worden war. Bei beiden Patienten wurde je ein LOH festgestellt (RB1, NF1). Diese Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.



**Abbildung 3:** hMSH2-Expressionsanalyse mittels Western Blot-Analyse von Zelllysaten aus AML-Blasten von zwölf verschiedenen Patienten. KG1-Zellen repräsentieren die Positiv-, Bukkalepithelzellen die Negativkontrolle. Das Molekulargewicht des hMSH2-Proteins von 100 kDa ist durch Pfeile dargestellt.

KG1 = Protein der AML-Zelllinie KG1; buc = Protein aus Bukkalepithelzellen

**Tabelle 6** Karyotyp, hMSH2-Expression in Immunhistochemie und Western Blot sowie LOH-Nachweis.

Patient	FAB	Karyotyp	hMSH2-positive		Western		LOH / MSI
			Blasten (%)	Blasten (%)	Blot	Blot	
5	M1	46,XY [21]	> 90	x	0	0	
8	M1	46,XY,t(6;9)(p23;q34) [17]	> 90	90	0	0	
15	M2	46,XY [23]	> 90	< 5	0	0	LOH bei NF1
18	M2	46,XY [20]	x	x	1	1	LOH bei RB1
24	M4	46,XY [17]	x	x	0	0	
28	M4	46,XX [25]	x	x	0	0	
29	M4	46,XX [22]	x	x	0	0	
30	M4	46,XX [1]/ 46,XX,t(10;11)(p13;p11.2) [19]	x	x	0	0	
34	M4 2. Rezidiv	46,XY [25]	x	x	0	0	
36	M5a	46,XX [1]/ 47,XX,+8 [10]	> 90	< 5	0	0	
37	t-AML M5	nicht untersucht	x	x	1	1	LOH bei NF1
38	M7	46,XY [20]	x	x	0	0	

---

### 3.3.3 hMSH2-Expression in Korrelation zur Mikrosatellitenanalyse

Von den 15 Patienten mit AML, deren Knochenmark-Ausstriche immunhistochemisch untersucht wurden, waren vier von einem Allelverlust betroffen (Tabelle 3). Drei Patienten zeigten diesen beim Marker NF1. Es handelte sich dabei um einen Patienten 1.) mit sekundärer AML M1 klassifiziert als Score 2, 2.) mit AML M2 und einem Score von 1 sowie 3.) mit sekundärer AML M4 (Score 3). Ein LOH bei D12S89 wurde bei einem Patienten mit sekundärer AML M1 und einem Score von 2 detektiert. Alle diese Patienten mit Allelverlust zeigten weniger als 40% positiv gefärbte Zellen. Umgekehrt ließ sich bei den Patienten mit über 40% für hMSH2 positiv gefärbten Zellen kein LOH nachweisen. Diese Ergebnisse waren jedoch statistisch nicht signifikant. Bei zwei von zwölf Patienten, deren hMSH2-Expression durch Western Blot untersucht wurde, war eine singuläre Protein-Bande bei 100 kD, entsprechend dem Molekulargewicht des hMSH2-Proteins zu verzeichnen. Beide konnten auch einen Allelverlust aufweisen (Marker RB1 und NF1). Umgekehrt war bei den zehn restlichen Patienten ohne Protein-Bande im Western Blot nur einer von LOH betroffen. Es kam also bei den hier untersuchten Patienten, bei denen auch eine geringere hMSH2-Expression im Western Blot nachgewiesen wurde, nicht zu vermehrtem Auftreten von LOH.

### 3.3.4 Vergleich von hMSH2-Expression mit Ergebnissen der Zytogenetik

Drei der 15 Patienten mit AML, deren Knochenmark-Ausstriche immunhistochemisch untersucht wurden, zeigten komplexe chromosomale Anomalien. Diese Patienten wurden entsprechend des prozentualen Anteils der positiv gefärbten Zellen, entsprechend einem immunhistochemischen Nachweis des hMSH2-Proteins, als Score 2, 2 und 1 klassifiziert, hatten also weniger als 30% hMSH2 positiv gefärbte Blasten. Andererseits konnten sechs Patienten mit normalem Karyotyp wie folgt auf die Scores verteilt werden: 1, 2, 1, 1, 1, 1. Insgesamt zeigte sich keine positive Korrelation einer verminderten hMSH2-Expression mit dem Auftreten chromosomaler Abberationen.

---

## 4 Diskussion

Die akute myeloische Leukämie (AML) als häufigste akute Leukämie bei Erwachsenen ist eine maligne hämatologische Erkrankung, die in hämatologischen Stamm- und Vorläuferzellen entsteht. Mit Ausnahme einiger weniger AML-Subtypen haben sich die Grundzüge der Therapie in den letzten 20 Jahren nicht signifikant verändert. Aus diesem Grund bleibt der Therapieerfolg für die Mehrheit der Patienten mit Langzeitüberlebensraten von ca. 20 bis 30% weiterhin schlecht (Gallipoli et al. 2015). Aus der genetischen Heterogenität ergeben sich mehrere bedeutende klinische Aspekte, da bestimmte chromosomale und molekulargenetische Veränderungen zu den wichtigsten prognostischen Markern zählen und zur Risikostratifizierung bei Therapieentscheidungen herangezogen werden können. Die identifizierten Marker können zur Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien genutzt werden (Marcucci et al. 2011).

Zum Zweck der Identifikation des Einflusses zellzyklusregulierender Gene sowie DNA-*mismatch-repair* assoziierter Proteine bei der Entstehung der AML wurden in der vorliegenden Arbeit 40 Patienten mit AML 1.) auf Mikrosatelliteninstabilität sowie 2.) auf die Expression des DNA-*mismatch-repair*-assoziierten Proteins hMSH2 untersucht. Hierzu wurden 18 Mikrosatelliten-Marker verwendet, welche auf 15 Chromosomenarmen lokalisiert sind.

Dabei konnte LOH bei 10 Patienten (25%) nachgewiesen werden. Interessanterweise war bei keinem der untersuchten Patienten MSI nachweisbar. Dieses Ergebnis zeigt einen deutlichen Unterschied in der Prävalenz für Mikrosatellitenalterationen im Vergleich zu Patienten mit HNPCC-Syndrom, bei denen mehr als 90% der Tumore MSI aufweisen können. Aufgrund dieser hohen Rate ist die Mikrosatellitenanalyse bei der Diagnostik des HNPCC-Syndroms ein bereits gebräuchlicher Screening-Test. Sporadische kolorektale Karzinome zeigen andererseits nur in 10-15% der Fälle MSI (Müller et al. 2004). Da der Nachweis von Mikrosatelliteninstabilität als Hinweis auf ein defizientes DNA-*mismatch-repair*-System im Sinne eines *mutator phenotype* gewertet werden kann, lässt dieses Ergebnis den Schluss zu, dass ein defizientes DNA-*mismatch-repair*-System nicht der einzige Pathomechanismus in der Genese der AML sein kann. Hierfür spricht ebenfalls die ausgeprägte genetische Heterogenität der Erkrankung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen im Gegensatz zu den Analysen von Nakanishi et al. (2001), welche über den Nachweis von MSI bei über 84% bei Patienten mit AML berichteten, die der Strahlung einer Atombombe ausgesetzt waren, im Gegensatz zu einer Rate von 8,3% MSI bei nicht der Strahlung exponierten an AML Erkrankten. Diese

extrem hohe Rate bezog sich auf Patienten, die ihre Erkrankung 41 – 49 Jahre nach Strahlenexposition entwickelten. Die höchste Inzidenz bestand sieben Jahre nach Exposition. Hierzu gab es keine Mikrosatellitenanalysen. Der fehlende Nachweis von MSI bei den Patienten der vorliegenden Arbeit könnte auf eine genetische Schädigung von geringerer zeitlicher Latenz bis zum Krankheitsbeginn hindeuten.

Unter der Annahme der genetischen Instabilität bei AML im Sinne eines *mutator phenotype*, käme es nach Inaktivierung von Genen, die für die genomische Stabilität einer Zelle verantwortlich sind, zu einer Akkumulation von Mutationen, von denen eine enorme Anzahl in repetitiven Gensequenzen zu finden ist (Loeb 1998). Es ist zu vermuten, dass zumindest bei einem Teil der Patienten eine Akkumulation von Mutationen dieser Art erst über einen längeren Zeitraum entsteht bzw. weitere Einflussfaktoren erforderlich sind.

Diese These wird unterstützt durch die Ergebnisse von Das-Gupta et al. (2001), bei denen von 71 untersuchten Patienten mit AML neun (13%) MSI aufwiesen. Diese neun Patienten hatten entweder eine therapieassoziierte AML oder waren älter als 60 Jahre. Umgekehrt war bei keinem Patienten unter 60 Jahre mit de novo-AML MSI zu detektieren. In einer Untersuchung von Tasaka (1997) konnte gezeigt werden, dass die Detektionsrate von MSI bei Patienten mit AML während des Krankheitsprogresses zunimmt. Die höchste Rate von 35% zeigte sich zum Zeitpunkt des Rezidivs. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Auftreten von MSI bei AML möglicherweise ein spätes Ereignis im Krankheitsverlauf ist. Die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit die Mikrosatellitenanalyse bei fast allen Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung erfolgte, könnte eine Ursache für den fehlenden Nachweis von MSI sein.

So berichten Rimsza et al. (2000) ebenfalls von einem fehlenden Nachweis von MSI bei AML, passend zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Jedoch unterscheidet sich das dort untersuchte Patientenkollektiv durch einen höheren Anteil an sekundären Leukämien und Rezidiven, bei dem vermehrt MSI zu erwarten gewesen wären. Hier könnte sich die geringe Anzahl der dort untersuchten Mikrosatelliten von nur drei Loci ausgewirkt haben.

Das in der gegenwärtigen Literatur insgesamt doch sehr heterogene Bild bezüglich des Nachweises von MSI bei AML spiegelt wohl am ehesten die Wahl der verwendeten Primer wider, mit denen die Patientengruppen untersucht wurden. Um ein passendes Panel an Primern von diagnostischem Wert und aussagekräftiger Risikoabschätzung zur Verfügung zu haben, werden zukünftig weitere Untersuchungen von Mikrosatellitenloci notwendig sein.

---

Bei 10 Patienten (25%) konnte in dieser Arbeit LOH nachgewiesen werden. Dies ist insofern interessant, als eine aktuelle Studie die signifikante prognostische Relevanz von LOH bei AML-Patienten belegen konnte (Gronseth et al. 2015). Patienten mit copyneutralen LOH zeigten nicht nur eine kürzere Dauer der kompletten Remission und ein schlechteres Gesamtüberleben, sondern der Nachweis von LOH erwies sich auch als unabhängiger prädiktiver Marker für ein früheres Rezidiv.

Die hohe Detektionsrate von LOH im Vergleich zu MSI in der vorliegenden Arbeit korreliert mit den Ergebnissen von Pabst et al. (1996). Hier konnte gezeigt werden, dass von 114 erwachsenen Patienten mit akuter Leukämie 81 LOH aufweisen, bezüglich der AML 25 von 32 (78,1%), jedoch nur 10 der insgesamt 114 Patienten Mikrosatelliteninstabilität zeigte. Zu ähnlichen Resultaten kamen auch Maeck et al. (2000) bei der Untersuchung von Patienten mit MDS. Auch hier zeigte sich ein deutlich häufigeres Vorkommen von LOH mit 23% im Vergleich zu MSI, welche nur in 8% der Fälle detektiert werden konnte.

Überraschenderweise konnte in der vorliegenden Arbeit unter Anwendung des exakten Fisher-Tests für kleine Stichproben keine signifikant positive Korrelation zwischen chromosomalen Anomalien und der Ausbildung von LOH gezeigt werden. Dies zeigt Ähnlichkeiten zu den Ergebnissen von Serrano et al. (2008) bei denen 22 AML-Patienten mit normalem Karyotyp untersucht wurden. Hier zeigte sich eine Quote von 22,7% für das Auffinden von LOH. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei LOH bei Patienten mit AML um eine erworbene uniparentale Disomie handeln könnte (Gorletta et al. 2005, Serrano et al. 2008).

Andererseits wies die überwiegende Zahl der Patienten, bei denen LOH nachgewiesen werden konnten, Karyotypveränderungen auf, auch wenn dies statistisch nicht signifikant war. Bei zwei der Patienten konnten jeweils zwei LOHs nachgewiesen werden. Diese zeigten ebenfalls jeweils einen sehr komplex aberranten Karyotyp. Bei jedem dieser beiden Patienten war auch der Marker APC betroffen. Das APC-Gen ist bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis sowie auch bei sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinomen mutiert. Sein Genprodukt ist ein zytoplasmatisches Protein, das zellzyklusregulierende Funktionen erfüllt. APC als Tumorsuppressor-Gen konnte auch bei Patienten mit Tumoren in Magen und Pankreas mutiert gefunden werden (Senda et al. 2005).

Dies ist insofern interessant, als Stoddart et al. (2014) zeigen konnten, dass bei Verlust von TP53 in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, eine Haploinsuffizienz für Egr1 und APC bei Mäusen in 17% der Fälle zur Entwicklung einer AML führt. Bei einem der Patienten

der vorliegenden Arbeit mit jeweils zwei nachgewiesenen LOH war der Marker TP53 ebenfalls betroffen. Weitere Untersuchungen sind jedoch erforderlich, um zu klären, ob dieser Zusammenhang beim Menschen ebenfalls von pathogenetischer Relevanz ist.

Auffällig war außerdem, dass der Marker NF1 bei fünf der zehn von LOH betroffenen Patienten und damit bei 50% der LOH beteiligten war. Auf die Gesamtzahl der untersuchten Patienten bezogen war der Marker NF1 somit bei immerhin 12,5% aller 40 AML-Patienten auffällig. Bekannt ist, dass Keimbahnalterationen des Tumorsuppressor-Gens NF1 zur Neurofibromatose Typ 1 führen. Hierbei ist das Risiko für die Entwicklung einer myelomonozytären Leukämie bzw. AML deutlich erhöht (Boudry-Labis et al. 2013).

Der Nachweis von Deletionen beim Marker NF1 bei Patienten mit AML, welche nicht an Neurofibromatose erkrankt sind, korreliert mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die Anteile von 3,5 bis 7,3% (Boudry-Labis et al. 2013, Haferlach et al. 2012, Parkin et al. 2010) nachweisen konnten. Jedoch zeigt sich der Anteil von Deletionen beim Marker NF1 in der vorliegenden Arbeit deutlich höher.

In einer aktuellen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass eine NF1-Suppression bei Haploinsuffizienz von MLL3 auf Chromosom 7 und Defizienz von P53 zur Entwicklung einer AML führt (Will et al. 2014). In der vorliegenden Arbeit standen bei vier der fünf Patienten mit LOH am Marker NF1 Analysen der Zytogenetik zur Verfügung, in der zwei Patienten ebenfalls eine Deletion auf Chromosom 7 zeigten. Bezüglich der beiden anderen Patienten ist eine Alteration auf submikroskopischer Ebene möglich, was den diagnostischen Stellenwert molekulargenetischer Untersuchungen unterstreicht.

2013 zeigten Boudry-Labis et al. eine signifikante Assoziation zwischen einer NF1-Deletion und einer prognostisch ungünstigen Zytogenetik sowie einem monosomalen Karyotyp. Dahingegen korrelierten diese Daten nicht mit Geschlecht, Alter oder der Verteilung auf die FAB-Subtypen. Eine signifikante Korrelation zu den genannten Faktoren ließ sich in der vorliegenden Arbeit jedoch weder ableiten noch ausschließen, da die Anzahl der betroffenen Patienten für eine Auswertung zu gering war. Auffällig war jedoch, dass drei dieser fünf Patienten mit einem LOH bei NF1 an einer sekundären AML erkrankt waren. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei NF1-Deletionen auch um erworbene sekundäre Ereignisse handeln könnte, wie Boudry-Labis et al. (2013) ebenfalls schlussfolgerten.

Die Rolle von NF1 bei malignen myeloischen Erkrankungen ist bisher noch wenig untersucht. Bekannt ist, dass das Genprodukt von NF1 als negativer Regulator von RAS



---

fungiert (Haferlach et al. 2012, Parkin et al. 2010). Ein Funktionsverlust von NF1 entspricht funktionell einer aktivierenden Mutation von RAS. Alterationen von RAS führen zu Veränderungen von RAS abhängigen Signalwegen wie beispielsweise FLT3, KIT oder CBL. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Häufigkeit von NF1-Deletionen bei Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp mit 30,6% deutlich höher lag als bei Patienten mit normalem Karyotyp (1,2%) und dass akute myeloische Leukämien mit RUNX1-RUNX1T1-Veränderungen, also mit Mutationen eines Transskriptionsfaktors, der die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzelle reguliert, mit einer niedrigen NF1-Expression assoziiert sind. Daten, die mithilfe von zellbasierten In-vitro-Assays erhoben wurden, legten die Vermutung nahe, dass eine NF1-Defizienz zur Resistenz für eine Therapie mit AraC führt (Haferlach et al. 2012).

Andererseits vermuteten Parkin et al. (2010) aufgrund der negativ regulierenden Wirkung von NF1 auf mTOR, dass AML-Blasten mit NF1-Defizienz eine größere Abhängigkeit von der Signaltransduktion durch mTOR aufweisen als NF1-Wildtyp-Blasten. So konnten sie durch Messung der Induktion von Apoptose nachweisen, dass AML-Blasten ohne funktionsfähiges NF1 signifikant empfindlicher auf eine Behandlung mit Rapamycin reagierten als NF1-Wildtyp-Blasten.

Insgesamt weist die in der vorliegenden Arbeit relativ hohe Rate von NF1-Deletionen bei AML auch im Kontext mit den o.g. Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen auf die noch ungeklärte pathogenetische Relevanz dieser Alteration hin. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um auch die klinischen Möglichkeiten zielgenauerer Therapieoptionen entsprechend dem NF1-Status zu eruieren.

Zur Klärung der Frage, inwieweit genetische Instabilität bei der AML als Folge eines defekten DNA-*mismatch-repair*-Systems auftritt, wurden ergänzend die Expressionsmuster des MMR-assoziierten hMSH2-Proteins untersucht und mit den Ergebnissen der Mikrosatellitenanalyse verglichen. Hierzu wurden bei 15 der 40 Patienten immunhistochemische Färbungen an Knochenmarkausstrichen durchgeführt und zusätzlich bei 12 Patienten mittels Western Blot die Expression von hMSH2 getestet.

Insgesamt zeigte sich bei den jeweils untersuchten Patienten eine geringgradige Expression von hMSH2. So war bei den 12 mittels Western Blot untersuchten Patienten bei nur zwei Patienten (17%) eine Expression des hMSH2-Proteins nachweisbar. In der immunhistochemischen Färbung war lediglich bei einem Patienten eine starke hMSH2-Expression (90% positive Blasten) zu verzeichnen. Sechs der 15 Patienten (40%) zeigten

weniger als 5% gefärbte Zellen. Wenngleich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit aufgrund der begrenzten Anzahl untersuchter Patienten keine endgültige Schlussfolgerung zulassen, liegt doch die Vermutung nahe, dass eine verminderte Expression von hMSH2 zumindest bei einem Teil der Patienten mit AML pathogenetische Relevanz hat.

Das DNA-*mismatch-repair*-System dient der Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität. Eine Defizienz dieses Systems führt zum Auftreten des *mutator phenotype* mit Akkumulation von Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressor-Genen. MSH2 ist eins der dem MMR-System angehörenden Gene. Beim HNPCC-Syndrom sowie auch anderen menschlichen Tumoren ist hMSH2 direkt an der Entstehung von Mikrosatelliteninstabilität und der Tumorgenese beteiligt (Zhu et al. 1999).

Die Tatsache, dass sich in der vorliegenden Arbeit statistisch kein Zusammenhang zwischen MSH2-Expression und Karyotyp-Alterationen nachweisen ließ, könnte daraufhin hindeuten, dass der Expressionsverlust von hMSH2 ein eher spätes genetisches Ereignis sein könnte. So konnten Mao et al. 2008 nachweisen, dass eine Defizienz des *mismatch-repair*-Systems (MMR) zwar in allen Stadien der AML auftreten kann, der prozentuale Anteil bei Patienten bei Therapieresistenz oder Rezidiv jedoch deutlich höher liegt. Dies lässt den Schluss zu, dass ein Funktionsverlust des MMR-Systems das Auftreten von Resistenzen bzw. Rezidiven begünstigen kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass eine verminderte Expression von hMSH2 nicht mit einem vermehrten Auftreten von Mikrosatelliteninstabilität einhergehen muss. Es liegt die Vermutung nahe, dass sich eine Mikrosatelliteninstabilität bei MMR-Defizienz häufig erst im weiteren Krankheitsverlauf manifestiert. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Beobachtung von Sheikhha et al. (2002), dass die Rate von Replikationsfehlern bei Patienten mit Therapie assoziierter bzw. sekundärer AML mit über 40% signifikant höher lag als ihr Anteil bei neu diagnostizierter AML von nur 20,5%. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der vorliegenden Arbeit, so zeigt sich in letzterer ebenfalls ein Anteil von über 44% (4 von 9 Patienten) für das Auftreten von LOH bei sekundärer bzw. Therapie assoziierter AML im Vergleich zu 19,4% (6 von 31) bei Patienten mit de-novo-AML.

Dennoch ist die Kenntnis einer MMR-Defizienz von nicht zu unterschätzender Bedeutung. So berichten Clodfelter et al. (2005) von einer Therapie-Resistenz MMR defizienter Zellen auf Cisplatin unabhängig vom Auftreten eines *mutator phenotype*. Im Verlauf entwickelte sich dann eine medikamenteninduzierte genetische Instabilität. So konnte eine einzige

Punktmutation zur genetischen Instabilität einerseits oder zu einer erhöhten Überlebensrate andererseits nach Cisplatin-Exposition beitragen. Diese erworbene Chemotoleranz bei MSH2-Mutation verdeutlicht die noch nicht abschätzbare Relevanz solcher Defekte unter therapeutischen Aspekten.

Auch wenn ein Defekt des hMSH2 bei der AML möglicherweise nicht die gleiche direkte pathogenetische Relevanz aufweist wie beim HNPCC-Syndrom, so unterstreicht die Beobachtung von Mao et al. (2008), dass MMR-Defekte bei Rezidiven signifikant häufiger nachzuweisen sind als bei frisch diagnostizierten AML-Erkrankungen, den Stellenwert weiterer Untersuchungen des MMR-Systems im Hinblick auf eine Mitbeteiligung an der Rezidiventstehung.

Abschließend kann gesagt werden, dass die Mikrosatellitenanalyse eine gute Möglichkeit bietet, AML-Patienten auf das Vorhandensein von MSI und LOH zu untersuchen, da es die Detektion kleinerer chromosomaler Deletionen erlaubt, die einer konventionellen zytogenetischen Diagnostik entgehen würden. Weitere Untersuchungen sind jedoch erforderlich, um ein standardisiertes Primer-Panel zusammen zu stellen, welches in der Routinediagnostik zur weiteren Klassifizierung, Risikostratifizierung und Rezidiverkennung eingesetzt werden kann. Schließlich könnten in Kenntnis spezifischer Marker zielgerichtete Therapien zum Einsatz kommen, die die Prognose in Zukunft verbessern könnten.

## 5 Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie als häufigste akute Leukämie bei Erwachsenen ist eine maligne, hämatologische, genetisch heterogene, klonale Erkrankung, die ihren Ursprung in hämatologischen Stamm- und Vorläuferzellen hat, in denen durch Anhäufung erworbener genetischer Veränderungen die Mechanismen von Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung gestört werden. Chromosomale und molekulargenetische Veränderungen zählen zu den wichtigsten prognostischen Markern und könnten zur Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien genutzt werden. Zum Zweck der Identifikation des Einflusses zellzyklusregulierender Gene sowie *DNA-mismatch-repair*-assoziierter Proteine bei der Entstehung der AML wurden in der vorliegenden Arbeit Knochenmarkaspirate von 40 Patienten mit AML auf Mikrosatelliteninstabilität sowie die Expression des *DNA-mismatch-repair*-assozierten Proteins hMSH2 untersucht.

Interessanterweise konnte bei keinem der 40 Patienten MSI nachgewiesen werden. LOH war bei 25% der Patienten nachweisbar. Hierbei war ein Anteil von über 44% für das Auftreten von LOH bei sekundärer bzw. therapieassoziierter AML im Vergleich zu 19,4% bei Patienten mit *de-novo*-AML nachweisbar. Auffallend hoch war dabei der Anteil des Markers NF1 mit 50% der nachgewiesenen LOH. Beim überwiegenden Teil der Patienten zeigte sich eine niedrige Expression von hMSH2. Eine Korrelation von verminderter hMSH2-Expression mit Karyotypveränderungen oder Mikrosatelliteninstabilität war nicht nachzuweisen.

Der fehlende Nachweis von MSI im untersuchten Patientenkollektiv deutet daraufhin, dass Mikrosatelliteninstabilität nicht der einzige Pathomechanismus in der Genese der AML ist. Auch die verminderte Expression des hMSH2-Proteins, welche sich sowohl im Knochenmark-Bröckelausstrich immunhistochemisch als auch im Western Blot zeigte, ist aufgrund mangelnder Korrelation mit Karyotypveränderungen oder LOH nur als Teilaspekt in der Pathogenese der AML zu deuten. Das vermehrte Auftreten von LOH bei der sekundären AML im Vergleich zur *de-novo*-AML legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um ein eher spätes bzw. therapieinduziertes genetisches Ereignis handelt. Der auffallend hohe Anteil von LOH beim Marker NF1 dürfte ein lohnenswertes Ziel weiterer Untersuchungen darstellen.

## 6 Literaturverzeichnis

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C (1985): Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103, 620–625

Boudry-Labis E, Roche-Lestienne C, Nibourel O, Boissel N, Terre C, Perot C, Eclache V, Gachard N, Tigaud I, Plessis G et al. (2013): Neurofibromatosis-1 gene deletions and mutations in de novo adult acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 88, 306-311

Bova GS, Carter BS, Bussemakers MJG, Emi M, Fujiwara Y, Kyprianou N, Jacobs SC, Robinson JC, Epstein JI, Walsh PC et al. (1993): Homozygous deletion and frequent allelic loss of chromosome 8p22 loci in human prostate cancer. *Cancer Res* 53, 3869-3873

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dry banding. *Anal Biochem* 72, 246-254

Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC (1991): Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 48, 137-144

Clodfelter JE, Gentry MB, Drotschmann K (2005): MSH2 missense mutations alter cisplatin cytotoxicity and promote cisplatin-induced genome instability. *Nucleic Acids Res* 33, 3323-3330

Coppes MJ, Campbell CE, Williams BRG (1993): The role of WT1 in Wilms tumorigenesis. *FASEB J* 7, 886-895

Das-Gupta EP, Seedhouse CH, Russell NH (2001): Microsatellite instability occurs in defined subsets of patients with acute myeloblastic leukaemia. *Br J Haematol* 114, 307-312

Deschler B, Lübbert M (2006): Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer* 107, 2099-2107

Döhner H, Estey E, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA (2010): Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European

LeukemiaNet, Blood 115, 453-474

Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW (1990): Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247, 49-56

Figueroa ME, Lugthart S, Li Y, Erpelinck-Verschueren C, Deng X, Christos PJ, Schifano E, Booth J, Putten W, Skrabanek L et al. (2010): DNA Methylation Signatures Identify Biologically Distinct Subtypes in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* 17(1), 13–27

Fishel, R., Lescoe, M. K., Rao, M. R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Garber, J., Kane, M., Kolodner, R. (1993): The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75, 1027-1038

Gallipoli P, Giotopoulos G, Huntly BJ (2015) Epigenetic regulators as promising therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Ther Adv Hematol* 6, 103-119

Gorletta TA, Gasparini P, D'Elis MM, Trubia M, Pelicci PG, Di Fiore PP (2005): Frequent loss of heterozygosity without loss of genetic material in acute myeloid leukemia with a normal karyotype. *Genes Chromosomes Cancer* 44, 334-337

Gregg RG, Couch F, Hogan K, Powers PA (1993): Assignment of the human gene for the alpha 1 subunit of the skeletal muscle DHP-sensitive Ca<sup>2+</sup> channel (CACNL1A3) to chromosome 1q31-q32. *Genomics* 15, 107-112

Gronseth CM, McElhone SE, Storer BE, Kroeger KA, Sandhu V, Fero ML, Appelbaum FR, Estey EH, Fang M (2015): Prognostic significance of acquired copy-neutral loss of heterozygosity in acute myeloid leukemia. *Cancer* 121, 2900-2908

Haase D, Fonatsch C, Freund M, Wörmann B, Bodenstein H, Bartels H, Stollmann-Gibbels B, Lengfelder E (1995): Cytogenetic findings in 179 patients with myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* 70, 171-187

Haber DA, Buckler AJ, Glaser T, Call KM, Pelletier J, Sohn RL, Douglass EC, Housman DE (1990): An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor. *Cell* 61, 1257-1269

Haferlach C, Grossmann V, Kohlmann A, Schindela S, Kern W, Schnittger S, Haferlach T (2012): Deletion of the tumor-suppressor gene NF1 occurs in 5% of myeloid malignancies and is accompanied by a mutation in the remaining allele in half of the cases. *Leukemia* 26, 834-839

Hall JM, Friedman L, Guenther C, Lee MK, Weber JL, Black DM, King MC (1992): Closing in on a breast cancer gene on chromosome 17q. *Am J Hum Genet* 50, 1235-1242

Herold G: Innere Medizin. Gerd Herold (Verlag), Köln 2015

ISCN 1995: An international system for human cytogenetic nomenclature. S. Karger, Basel 1995

Jiricny J (2006): The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 335-346

Jones MH, Nakamura Y (1992): Detection of loss of heterozygosity at the human TP53 locus using a dinucleotide repeat polymorphism. *Genes Chromosomes Cancer* 5, 89-90

Kern W, Behre G, Schilling C, Haferlach T, Adorf D, Jehn U, Waterhouse C, Brack N, Schnittger S, Petrides PE, Hiddemann W: Akute myeloische Leukämie (AML) beim Erwachsenen. In: Hiddemann W, Haferlach T (Hrsg.): *Manual Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome*. 2. Auflage; Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag, München 2003, 17-48

Knudson AG (1993): Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci* 90, 10914-10921

Lazaro C, Gaona A, Xu G, Weiss R, Estivill X (1993): A highly informative CA/GT repeat polymorphism in intron 38 of the human neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Hum Genet* 92, 429-430.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998): Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649

Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HAT, Watson P, Jass, JR, Dunlop M, Wyllie A, Peltomazi P et al. (1996): Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 2, 169-174

Loeb LA (1998): Cancer cells exhibit a mutator phenotype. *Adv Cancer Res* 72, 25-56

Maeck L, Haase D, Schoch C, Hiddemann W, Alves F (2000a): Genetic instability in myelodysplastic syndrome: detection of microsatellite instability and loss of heterozygosity in bone marrow samples with karyotype alterations. *Br J Haematol* 109, 842-846

Maeck L, Kohaus P, Haase D, Hiddemann W, Alves F (2000b): Differential cellular expression of the human MSH2 protein in normal and myelodysplastic haematopoiesis. *Br J Haematol* 111, 650-655

Mao G, Yuan F, Absher K, Jennings CD, Howard DS, Jordan CT, Gu L (2008): Preferential loss of mismatch repair function in refractory and relapsed acute myeloid leukemia: potential contribution to AML progression. *Cell Res* 18, 281-289

Marcucci G, Haferlach T, Döhner H (2011): Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: Prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 29(5), 475-486

Modrich P, Lahue R (1996): Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* 65, 101-133

Müller A, Edmonston TB, Dietmaier W, Büttner R, Fishel R, Rüschoff J (2004): MSI-testing in hereditary non-polyposis colorectal carcinoma (HNPCC). *Dis Markers* 20, 225-236

Murati A, Brecqueville M, Devillier, Mozziconacci M-J, Gelsi-Boyer V, Birnbaum D (2012): Myeloid malignancies: mutations, models and management. *BMC Cancer* 12, 304

Nakanishi M, Tanaka K, Takahashi T, Kyo T, Dohy H, Fujiwara M, Kamada N: Microsatellite instability in acute myelocytic leukaemia developed from A-bomb survivors. *Int J Radiat Biol* 77, 687-694

O'Donnell MR, Abboud CN, Altman J, Appelbaum FR, Arber DA, Attar E, Borate U, Coutre SE, Damon LE, Goorha S (2012): Acute Myeloid Leukemia. *J Natl Compr Canc Netw* 2012;10, 984-1021

Oliveira EJ, Padua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet Mol Biol* 29, 294-307



Pabst T, Schwaller J, Bellomo MJ, Oestreicher M, Mühlematter D, Tichelli A, Tobler A, Fey MF: Frequent clonal loss of heterozygosity but scarcity of microsatellite instability at chromosomal breakpoint cluster regions in adult leukemias. *Blood* 88, 1026-1034

Papadopoulos N (1995): Mutations of GTBP in genetically unstable cells. *Science* 268, 1915-1917

Parkin B, Ouillette P, Wang Y, Liu Y, Wright W, Roulston D, Purkayastha A, Dressel A, Karp J, Bockenstedt P et al. (2010): NF1 inactivation in adult acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 16, 4135-4147

Peltomäki P (2001): Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet* 10, 735-740

Peltomäki P (2003): Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol.* 21(6), 1174-1179

Peltomäki P, Lothe RA, Aaltonen LA, Pylkkänen L, Nyström-Lahti M, Seruca R, David L, Holm R, Ryberg D, Haugen A (1993): Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 53, 5853-5855

Rimsza LM, Kopecky KJ, Ruschulte J, Chen IM, Slovak ML, Karanes C, Godwin J, List A, Willman CL (2000): Microsatellite instability is not a defining genetic feature of acute myeloid leukemogenesis in adults: results of a retrospective study of 132 patients and review of the literature. *Leukemia* 14, 1044-1051

Risio M, Reato G, Francia di Celle P, Fizzotti M, Rossini FP and Foa R (1996): Microsatellite instability is associated with the histological features of the tumor in nonfamilial colorectal cancer. *Cancer research* 56, 5470-5474

Riva L, Luzi L, Pelicci PG (2012): Genomics of acute myeloid leukemia: the next generation. *Front Oncol.* 2012; 2,40

Rothschild CB, Akots G, Fajans SS, Bowden DW (1992): A microsatellite polymorphism associated with the PLC1 (phospholipase C) locus: identification, mapping, and linkage to the MODY locus on chromosome 20. *Genomics* 13, 560-564.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.

Sallmyr A, Fan J, Virgilia R (2008): Genomic instability in myeloid malignancies: Increased reactive oxygen species (ROS), DNA double strand breaks (DSBs) and error-prone repair. *Cancer Lett* 270, 1-9

Samowitz WS, Slattery ML, Potter JD, Leppert MF (1999): BAT-26 and BAT-40 instability in colorectal adenomas and carcinomas and germline polymorphisms. *Am J Pathol* 154, 1637-1641

Senda T, Shimomura A, Iizuka-Kogo A (2005): Adenomatous polyposis coli (Apc) tumor suppressor gene as a multifunctional gene. *Anat Sci Int* 80, 121-131

Serrano E, Carnicer MJ, Orantes V, Estivill C, Lasa A, Brunet S, Aventin AM, Sierra J, Nomdedeu JF (2008): Uniparental disomy may be associated with microsatellite instability in acute myeloid leukemia (AML) with normal karyotype. *Leuk Lymphoma* 49, 1178-1183

Sheikhha MH, Tobal K, Liu Yin JA (2002): High level of microsatellite instability but not hypermethylation of mismatch repair genes in therapy-related and secondary acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 117, 359-365

Spirio L, Joslyn G, Nelson L, Leppert M, White R (1991): A CA repeat 30-70 KB downstream from the adenomatous polyposis coli (APC) gene. *Nucleic Acids Res* 19, 6348

Stegmaier K, Pendse S, Barker GF, Bray-Ward P, Ward DC, Montgomery KT, Krauter KS, Reynolds C, Sklar J, Donnelly M, Bohlander SK, Rowley JD, Sallan SE, Gilliland DG, Golub TR (1995): Frequent loss of heterozygosity at the TEL gene locus in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Blood* 1995 86, 38-44

Stoddart A, Fernald AA, Wang J, Davis EM, Karrison T, Anastasi J, Le Beau MM (2014): Haploinsufficiency of del(5q) genes, Egr1 and Apc, cooperate with Tp53 loss to induce acute myeloid leukemia in mice. *Blood* 123, 1069-1078

Stollmann B, Fonatsch C, Havers W (1985): Persistent Epstein-Barr virus infection associated with monosomy 7 or chromosome 3 abnormality in childhood myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 60, 183-196

Tasaka T, Lee S, Spira S, Takeuchi S, Nagai M, Takahara J, Koeffler HP (1997): Microsatellite instability during the progression of acute myelocytic leukaemia. *Br J Haematol* 98, 219-221

Tee Y-T, Chen G-D, Lin L-Y, Ko J-L, Wang P-H (2006): Nm23-H1: A metastasis-associated Gene. *Taiwan J Obstet Gynecol* 45, 107-113

Tischfield JA (1997): Loss of heterozygosity or: How I learned to stop worrying and love mitotic recombination. *Am J Hum Genet* 61, 995-999

Trapman J, Sleddens HFBM, van der Weiden MM, Dinjens WNM, Konig JJ, Schroder FH, Faber PW, Bosman FT (1994): Loss of heterozygosity of chromosome 8 microsatellite loci implicates a candidate tumor suppressor gene between the loci D8S87 and D8S133 in human prostata cancer. *Cancer Res* 54, 6061-6064

Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD (2009): The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114, 937-51

Vogelstein B, Kinzler KW (2004): Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10: 789-799

Weber JL, May PE (1990): Dinucleotide repeat polymorphism at the D4S171 locus. *Nucleic Acids Res* 18, 2202

Weber JL, Kwitek AE, May PE, Patterson D and Drabkin H (1990): Dinucleotide repeat polymorphisms at the D8S85, D8S87 and D8S88 loci. *Nucleic Acids Res* 18, 4038

Weinberg RA (1991): Tumor Suppressor Genes. *Science* 254, 1138-1146

Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, Vignal A, Morissette J, Millasseau P, Vaysseix G, Lathrop M (1992): A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 359, 794-801

Will B, Steidl U (2014): Combinatorial haplo-deficient tumor suppression in 7q-deficient myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 25, 555-557

Yandell DW, Dryja TP (1989): Detection of DNA sequence polymorphisms by enzymatic amplification and direct genomic sequencing. *Am J Hum Genet* 45, 547-555

Zenklusen JC, Bieche I, Lidereau R, Conti CJ (1994): (C-A)<sub>n</sub> microsatellite repeat D7S522 is the most commonly deleted region in human primary breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 12155-12158

Zhu YM, Das-Gupta EP, Russell NH (1999): Microsatellite instability and p53 mutations are associated with abnormal expression of the MSH2 gene in adult acute leukemia. *Blood* 94, 733-740

## 7 Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AraC	Cytarabin
BCR-ABL	<i>breakpoint cluster region – Abelson murine leukemia viral oncogene homolog</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
BUC	Bukkalepithel
C	Cytidin
CBL	Casitas <i>B-lineage lymphoma</i> (Proto-Onkogen)
CEBPA	<i>CCAAT/enhancer-binding protein alpha</i>
C-FMS	<i>Colony stimulating factor 1 receptor</i>
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMML	Chronisch myelomonozytäre Leukämie
CSA	<i>Catalyzed Signal Amplification System</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Dinukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylendiamin tetraacetic acid</i>
Egr1	<i>Early growth response protein 1</i>
EGTA	<i>Ethylenguanin tetraacetic acid</i>
FAB	French American British Collaborative Group
FCS	Fetales Kälberserum
FLT3	<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
G	Guanin
GDP	Guanosindiphosphat
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
G-NETT	Gelatine in NETT
GTBP	<i>G/T binding protein</i>

---

GTP	Guanosintriphosphat
hMLH1	<i>Human MutL homologue 1</i>
hMLH $\alpha$	<i>Human MutL homologue <math>\alpha</math></i>
HNPCC	<i>Hereditary non-polyposis colorectal cancer</i>
hPMS1, -2	<i>Human postmeiotic segregation increased 1, -2</i>
hMSH2, -3, -6	<i>Human MutS homologue 2, -3, -6</i>
IDL	<i>Insertion/deletion loop</i>
IL	Interleukin
IRF1	<i>Interferon regulatory factor 1</i>
ISCN	<i>International system for human cytogenetic nomenclature</i>
ITD	<i>Internal tandem duplications</i>
KIT	Tyrosinkinase
KM	Knochenmark
LDH	Laktatdehydrogenase
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MGMT	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MLL3	<i>mixed lineage leukemia 3</i>
MMR	DNA-Mismatch-Repair-System
NPM1	Nucleophosmin 1
MRP1	<i>Multiple drug resistance protein 1</i>
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
NER	<i>Nucleotide-excision-repair</i>
NETT	NaCL, EDTA, Tris, Triton X-100
NEZ	nicht erythroide Zellen
NP-40	Nonidet P-40
OFD	<i>Octamer-frequency-disparity-Methode</i>
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PML	<i>Promyelocytic leukemia protein</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTD	<i>partial tandem duplication</i>
RARA	<i>Retinoic acid acceptor alpha</i>
RER <sup>+</sup>	<i>Replication error positive</i>

RIPA	<i>Radio-immuno-precipitation-assay</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RAS	Rat sarcoma (Proto-Onkogen)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RUNX	<i>Runt-related transcription factor</i>
SDS	<i>Sodium dodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
T	Thymin
TBS	Tris, Borsäure, NaCl
TCA	Trichloroacetic acid (Trichloressigsäure)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
t-MDS	Therapieinduziertes MDS
t-RAEB	Therapieinduzierte RAEB
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
WHO	World Health Organization
WS	Werner-Syndrom

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b>	LOH an sieben verschiedenen Loci	Seite 27
<b>Abb. 2:</b>	Immunhistochemische Untersuchung unter Verwendung eines Primärantikörpers gegen hMSH2	Seite 32
<b>Abb. 3:</b>	hMSH2-Expressionsanalyse mittels Western Blot-Analyse von Zelllysaten aus AML-Blasten von zwölf verschiedenen Patienten	Seite 34

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b>	Einteilung der AML entsprechend der FAB-Klassifikation	Seite 6
<b>Tab. 2:</b>	Einteilung der AML in Prognosegruppen nach Zytogenetik und molekularen Mutationen	Seite 7
<b>Tab. 3:</b>	Loci und Primer	Seite 21
<b>Tab. 4:</b>	Karyotypen der untersuchten Patienten und Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse	Seite 29/30
<b>Tab. 5:</b>	Immunhistochemische Untersuchung unter Verwendung eines Primärantikörpers gegen hMSH2	Seite 33
<b>Tab. 6:</b>	Karyotyp, hMSH2-Expression in Immunhistochemie und Western Blot sowie LOH-Nachweis	Seite 35



## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. F. Alves für die Überlassung des Themas und die jederzeit konstruktive und engagierte Betreuung.

Ebenso danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. D. Haase für die wertvollen Tipps und Anregungen.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. med. Lienhard Maeck, der mich in die Methoden eingearbeitet hat und mich mit seinem Rat unterstützte.

Außerdem danke ich Herrn Marco Ledwon für die Durchführung des Western Blots.

Ferner danke ich meinen Mitdoktoranden und den MTAs im Labor für die gute Zusammenarbeit sowie allen, die mir bei der Beschaffung der Patientenproben geholfen haben, insbesondere Frau U. Schmidt-Martens, Frau U. Bußmann und Herrn R. Steffens.