Aus der Abteilung Hämatologie und Onkologie
(Prof. Dr. med. L. Trümper)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Mit AML assoziierte MLL-partielle Tandemduplikationen (MLL-PTD) sind in Stammzellen aus Nabelschnurblut lebenslang nachweisbar

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Robert Karl Josef Clemens
aus
Münster

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

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

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis **3**

Abkürzungsverzeichnis **5**

1. Einleitung **8**

1.1 Die akute myeloische Leukämie 8
1.2 Diagnose und Klassifikation der AML 9
1.3 Partielle Tandemduplikation des *mixed-lineage-leukemia*-Gens (MLL-PTD) 10
1.4 *Cluster-of-Differentiation*-Antigene 11
1.5 $CD3^+$-Zellen 12
1.6 $CD19^+$-Zellen 12
1.7 $CD33^+$-Zellen 12
1.8 $CD34^+$-Zellen 12
1.9 Zielsetzung 13

2. Material und Methoden **14**

2.1 Proben 14
2.2 Probenaufbereitung 15
2.3 Das Prinzip der Leukozytensubfraktionsisolierung mittels MACS 16
2.4 Die Technik der Zellseparation mittels MACS 17
2.5 Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) 18
2.6 RNA-Extraktion 19
2.7 Quantifizierung der RNA-Konzentration 20
2.8 DNA-Isolation 20
2.9 Quantifizierung der DNA-Konzentration 21
2.10 Reverse Transkription der RNA 22
2.11 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion 23
2.12 Interne abl-Kontrolle 24
2.13 MLL-PTD: Primäre und *semi-nested*-PCR 25
2.14 MLL-PTD: *Real-Time*-quantitative-PCR und genomische PCR 26
2.15 Agarosegel-Elektrophorese 27

3. Ergebnisse **28**

3.1 Probenanzahl 28
3.2 Zellausbeuten 28
3.3 Ergebnisse der internen abl-Kontrolle 29
3.4 Sensitivitäten der *semi-nested*-RT-PCR und der quantitativen PCR 30
3.5 Spezifität der PCR-Produkte 31
3.6 MLL-PTD in Gesamt-NSB 31
3.7 Genomische PCR in mononukleären NSB-Gesamtproben 33
3.8 MLL-PTD in NSB-Subfraktionen (Hämatopoetische Vorläuferzellen, myeloische B- und T-lymphatische Zellen) 35
3.9 Genomische PCR in NSB-Subfraktionen 36
3.10 Höhe der Transkriptionsrate der MLL-PTD bei AML-Proben und NSB-Proben 38

4. Diskussion **40**

5. Zusammenfassung **49**

6. Literatur **50**

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen	Auflösungen
A	Adenosin
Abs.	Absorption
AK	Antikörper
ALFA	*Acute Leukemia French Association*
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AML1	*acute myeloid leukemia 1 gene (Synonyme: RUNX1, CBFA2T1)*
bidest.	Bidestillatus
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
CD	*Cluster of Differentiation*
c-DNA	komplementäre DNA
D	Aspartat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Glutamat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fa.	Firma
FAB-Klassifikation	French-American-British-Cooperative-Group-Klassifikation
FACS	*Fluorescence Activated Cell Sorting*
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
G	Guanin
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor

g	Gramm
H	Histidin
HLA	*Human Leukocyte Antigene*
HOX	*homebox*
HPLC	*high pressure liquid chromatography*
Hrsg.	Herausgeber
ins	Insertion
inv	Inversion
ITD	interne Tandemduplikation
IU	*international units*
L	Leucin
M	Mol
MACS	*Magnetic Activated Cell Separation*
M-CSF	Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
MDS	myelodysplastisches Syndrom
µl	Mikroliter
min	Minute
MLL	*mixed-lineage-leukemia*-Gen
MLL-PTD	partielle Tandemduplikation des *mixed lineage-leukemia*-Gens
mM	milli-Mol
MW	Mittelwert
M0-M7	morphologische AML-Subtypen M0 bis M7 (FAB-Klassifikation)
ng	Nanogramm
NSB	Nabelschnurblut
o.g.	oben genannt
P	Prolin
PB	peripheres Blut
PBS	*Phosphate buffered saline*
PCR	*Polymerase chain reaction* (Polymerase-Ketten-reaktion)
PE	R-Phycoerythricin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein

pH	pondus Hydrogenii
PML	*Promyelocytic-leukemia-gene*
PTD	partielle Tandemduplikation
RAEB-T	*refractory anemia with excess of blasts in transformation*
RNA	Ribonukleinsäure
RNasen	Ribonukleasen
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SD	Standardabweichung
s.	siehe
s-AML	Leukämie, die nach einem myelodysplastischen Syndrom auftritt
t	Translokation
t-AML	Therapie assoziierte AML nach primärem Malignom
U	*unit*
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolette Strahlung
WBC	*white blood cell count*
WHO	*World Health Organization*
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Die akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine seltene Erkrankung des blutbildenden Systems, mit einer Inzidenz von ca. drei bis fünf Neuerkrankungen auf 100.000 Menschen im Jahr. Diese treten überwiegend im höheren Lebensalter auf und machen ca. 80% aller akuten Leukämien bei Erwachsenen aus. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 68 Jahren, wobei die altersadaptierte Inzidenz bei 17 auf 100.000 Patienten über dem 65. Lebensjahr liegt und „nur“ bei 1,8 Neuerkrankungen bei Patienten unter dem 65. Lebensjahr (Deschler und Lübbert 2006; NCI-SEERS Datenbank).

Die 5jahres Überlebensrate der an AML erkrankten Patienten, welche nicht älter als 65 Jahre sind, beträgt etwa 40% aller Erkrankten, wohingegen die Überlebensrate der über 65-jährigen Patienten unter 20% liegt (Redaelli et al. 2003). Damit hat die AML die niedrigste Überlebensrate aller Leukämien.

Risikofaktoren für die Entwicklung einer AML sind alle Vorgänge, die zu einer Erhöhung der Mutationsrate im hämatopoetischen System führen. Hierzu gehören unter anderem eine Exposition durch eine hohe Dosis ionisierender Strahlung sowie die Anwendung bestimmter Zytostatika, wie z.B. Alkylanzien und Etoposid. Letztere werden in der Behandlung anderer primär maligner Erkrankungen eingesetzt. Hierbei kann es auch noch nach einer Latenzzeit von mehreren Jahren zur Entwicklung einer Therapie assoziierten AML (t-AML) kommen (Estey und Döhner 2006). Weiterhin tritt eine AML gehäuft bei einigen genetischen Erkrankungen auf, wie z.B. der Trisomie 21 oder dem Klinefelter- und dem Pätau-Syndrom. Auch eine familiäre Belastung oder eine Belastung durch Pflanzengifte erhöht das Risiko der Erkrankung, genauso wie chronische Erkrankungen des blutbildenden Systems, wie z.B. das myelodysplastische Syndrom (Deschler und Lübbert 2006). Unterschieden werden eine de-novo-AML sowie sekundäre Leukämien, die z.B. auf Grund der oben genannten Auslöser auftreten und solche, die nach einem myelodysplastischem Syndrom (s-AML) auftreten.

Der aktuelle Stand der Forschung geht davon aus, dass am Anfang der Entstehung einer AML eine Veränderung in einer einzelnen hämatopoetischen Vorläuferzelle besteht, welche zu einer unkontrollierten klonalen Vermehrung unreifer Zellen führt.

In früheren Untersuchungen wurden zahlreiche chromosomale Aberrationen gefunden, die in der normalen Zellregulation eine wichtige Rolle spielen und auch bei einer AML auftreten. Bei dem „*Two-Hit*-Modell“, das in Experimenten an murinen- und humanen Modellen beschrieben wird (Dash and Gilliland 2001; Gilliland et al. 2004), wird davon ausgegangen, dass eine AML im Rahmen eines zweistufigen Mechanismus auftritt, bei dem Blastenschübe von Blasten ausgehen, die durch zwei kombinierte genetische Schäden (Klasse I und II) beeinflusst werden.

1.2 Diagnose und Klassifikation der AML

In den Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) wird zur Abklärung des Verdachts einer akuten Leukämie eine standardisierte Routinediagnostik empfohlen. Diese enthält neben der ausführlichen Anamnese und klinischen Untersuchung ein Standardlabor inklusive Gerinnung und Blutbild, sowie ein mikroskopisches Differentialblutbild und eine HLA-Typisierung (Gökbuget et al. 2005). Die Differenzierung wird morphologisch und zytochemisch nach Anfärbung unter dem Mikroskop vorgenommen.

Die Klassifikation der AML nach dem System der *French-American-British*-Klassifikation (FAB), bei der je nach Zelltyp und Differenzierungsgrad eine Einteilung in morphologische Subtypen (MO bis M7) vorgenommen wird (Bennett et al. 1985), ist durch die feineren Kriterien der WHO abgelöst worden, auch wenn die FAB-Klassifikation diese in einzelnen Fällen ergänzt (Harris et al. 1999; Vardiman et al. 2002).

Zwischen der FAB-Klassifikation und der WHO-Klassifikation sind zwei wesentliche Unterschiede festzustellen. Bei der WHO-Klassifikation ist ein Blastenanteil von 20% zur Diagnosestellung ausreichend gegenüber 30% bei der FAB-Klassifikation.

Die WHO-Klassifikation differenziert auch nach weiteren immunologischen und morpho-ogischen Kriterien, welche die AML je nach Karyo-, Genotyp und/oder Ätiologie den Typen I-III zuordnet und die Diagnosestellung zum Blutbild und den Knochenmarksbefunden ergänzen. Zu diesen molekularen Veränderungen oder Markern gehören: t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13;q22), t(16;16)(p13;q22) und t(15;17)(q22;q12). Falls keine der Bedingungen der Typen I bis III erfüllt werden, wird die Leukämie in Typ IV entsprechend der älteren FAB-Klassifikation klassifiziert.

Leukämien mit Blastenanteilen unter 30% gelten nach WHO-Richtlinien als *refractory anemia with excess of blasts in transformation* (RAEB-T).
Bei der AML wird unterschieden, ob ein unveränderter oder ein veränderter Karyotyp vorliegt. Bei ca. 45% der AML-Patienten können bei der konventionellen Chromosomenanalyse (chromosomale Bänderungsanalyse bzw. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) keine Aberrationen gefunden werden (Mrozek et al. 2001).
Die meisten Studien behandeln AMLs mit normalem Karyotyp als eine homogene Population, wobei in dieser ein großer Unterschied bezüglich der Prognose besteht. Mehrere Studien belegen, dass wichtige Aussagen zum Krankheitsverlauf durch den Karyotyp gewonnen werden (Bloomfield und de la Chapelle 1987; Bloomfield et al. 1989; Grimwade et al. 1998).
Einige der über 160 bekannten strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen werden dazu genutzt die Patienten in Risikogruppen einzuteilen.
Mit Hilfe molekulargenetischer Untersuchungen kann bei Patienten mit normaler Zytogenetik eine Differenzierung in prognostisch unterschiedliche Subgruppen erfolgen, welche die Therapieoptionen maßgeblich mitbestimmen.

1.3 Partielle Tandemduplikation des *mixed-lineage-leukemia*-Gens (MLL-PTD)

Die partielle Tandemduplikation des *mixed-lineage-leukemia*-Gens ist ein solcher molekularer Marker, welcher zur Differenzierung der AML genutzt wird (Dorshkind und Witte 2004; Ernst et al. 2004). Diese ist auf dem langen Arm des Chromosoms 11 lokalisiert und mit einer Vielzahl von chromosomalen und reziproken Translokationen und Duplikationen assoziiert. MLL-PTD können, wie auch andere Leukämie assoziierte Aberrationen (z.B. die Translokationen t(8/21), AML1/ETO sowie t(9;22), bcr-abl), bei gesunden Individuen auftreten und sind auch in Knochenmark und in peripherem Blut von gesunden Erwachsenen nachweisbar (Marcucci et al. 1998; Schnittger et al. 1998; Bäsecke et al. 2002a; Bäsecke et al. 2002b). Sie bestehen aus einer *in-frame*-Wiederholung von MLL-Exons in einer 5-3´-Richtung (Schichmann et al. 1994). MLL-Exon-Duplikationen sollen einen starken Einfluss auf bestimmte Mechanismen der Leukämogenese haben (Ross et al. 2004) und in vitro ein starkes Transaktivationspotential besitzen (Martin et al. 2003).

Der Nachweis von MLL-PTD bei einer neu aufgetretenen AML mit normalem Karyotyp wurde erstmalig 1994 erbracht (Schichmann et al. 1994). MLL-PTD treten bei ca. 6 bis 11% der AML-Patienten mit normalem Karyotyp auf (Caligiuri et al. 1998; Schnittger et al. 2000; Döhner et al. 2002). Caligiuri et al. (1998) verglichen diese mit AML-Patienten, die diese Veränderungen nicht zeigten. Hier zeigte sich, dass in der Gruppe der MLL-PTD positiven AML-Patienten die Dauer der erreichten kompletten Remission signifikant kürzer war (7,1 Monate), als die bei der Kontrollgruppe (23,2 Monate). Diese Resultate konnten auch von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt werden (Schnittger et al. 2000; Döhner et al. 2002; Shiah et al. 2002).
Vor allem bei Kindern ist der Nachweis von MLL-PTD mit einer signifikant kürzeren Überlebensdauer assoziiert (Kosaka et al. 2004; Pui et al. 2004; Hilden et al. 2006; Tomizawa et al. 2007).
Die Datenlage zeigt also, dass das Auftreten von MLL-PTD bei einer AML mit einer verkürzten mittleren Überlebensdauer einhergeht.
Auch konnte noch kein Nachweis von MLL-PTD in AMLs mit prognostisch günstigen Translokationen wie t(15,17), PML/RARalpha t(8;21) und AML1/ETO erbracht werden (Schnittger et al. 2000).

1.4 *Cluster-of-Differentiation*-Antigene

Hämatopoetische Stammzellen, die sich zum Großteil im ruhenden G0-Zustand befinden, bilden die Grundlage der Hämatopoese. Durch die nachfolgende Teilung und Differenzierung entstehen zunächst pluripotente und später liniendeterminierte Vorläuferzellen, welche weiter in ihren Linien reifen.
Unterscheidungsmöglichkeiten können lichtmikroskopisch-morphologisch gefunden werden. Weitere Kriterien bietet die Expression von spezifischen *Cluster-of-Differentiation*-Oberflächenantigenen (CD), die z.B. durch fluoreszenzaktiviertes Zellsortieren (FACS) unterschieden werden können. Die Bezeichnung der Antikörper richtet sich nach dem Antigen, an welches sie sich binden. Diese Antigene verändern sich im Laufe der Zellreifung. Die CD-Antigene selbst übernehmen Aufgaben bei der Zelladhäsion sowie bei der Signalrezeption und Transduktion (Terstappen et al. 1991). Die unten genannten CD-Expressionsmuster wurden in dieser Arbeit zur Aufreinigung der jeweiligen Subfraktionen mittels MACS-Technik genutzt.

1.5 $CD3^+$-Zellen

Die Expression von CD3 lässt sich zur Identifikation von T-Lymphozyten benutzen. T-Lymphozyten sind primär für die zellvermittelte Immunität verantwortlich, die auch die Hauptrolle bei der akuten Transplantabstoßung spielt. Die Funktion des Proteins ist die Signaltransduktion (Abbas et al. 2007).

1.6 $CD19^+$-Zellen

CD19 ist ein Molekül, welches nur von B-Lymphozyten im Stadium der Pro-B-Lymphozyten bis zur reifen B-Zelle und der B-Gedächtniszelle produziert wird. Die Entwicklung der B-Zellen endet in der B-Gedächtniszelle und den Antikörper-produzierenden Plasmazellen (Bradbury et al. 1992).

1.7 $CD33^+$-Zellen

Unreife myeloische Zellen exprimieren CD33 (Terstappen et al. 1991). Diese bilden sich unter dem Einfluss bestimmter Wachstumsfaktoren wie GM-CSF (Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) und M-CSF (Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) in Monoblasten aus, aus denen sich wiederum Monozyten differenzieren können, die dabei das Knochenmark verlassen und in den Blutkreislauf übergehen.

1.8 $CD34^+$-Zellen

Frühe hämatopoetische Vorläuferzellen sind durch die Expression von CD34 und die fehlende Expression von CD38 charakterisiert. Es handelt sich hierbei um eine heterogene Gruppe, zu denen auch die multipotenten Stammzellen gehören. Der Anteil von $CD34^+/CD38^-$-Vorläuferzellen in der mononukleären Zellfraktion von nor-

malen adulten Knochenmark beträgt etwa 0,1%. Die $CD34^+/CD38^-$-Fraktion ist in der Lage, in alle hämatopoetischen Linien zu differenzieren (Moehle et al. 1993).

1.9 Zielsetzung

Genetische Aberrationen, die mit der akuten myeloischen Leukämie assoziiert sind, werden in der Diagnostik und zur Klassifikation der Krankheit genutzt. In Blutproben von Patienten welche an AML erkrankten konnten Aberrationen festgestellt werden, die schon vor der Entwicklung der AML vorhanden waren. Diese präleukämischen Aberrationen könnten daher auch zum Screening von AML-Risikogruppen verwendet werden. Nachdem in vorhergegangenen Untersuchungen das Fusionsgen AML1/ ETO, t(8;21) in 40% von nicht-leukämischen Nabelschnurblutproben (NSB-Proben) (Bäsecke et al. 2002a) nachgewiesen wurde, wurden auch andere NSB-Proben auf die Existenz anderer Aberrationen untersucht, um deren Existenz in der nicht-leukämischen Hämatopoese gesunder Neugeborener nachzuweisen oder auszuschließen und deren pathogenetische Bedeutung weiter zu klären.
Die pathogenetische Relevanz der partiellen Tandemduplikationen des *mixed-lineage-leukemia*-Gens ist noch nicht vollständig geklärt, wie zwei Studien (Marcucci et al. 1998; Schnittger et al. 2000) belegen, bei denen die Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) und *Real-Time*-quantitative-PCR als Untersuchungsmethode benutzt wurden. Bei beiden Gruppen wurden in verschiedener Häufigkeit MLL-PTD in peripherem Blut und im Knochenmark gesunder Spender nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit sollte das Vorliegen von partiellen MLL-Tandemduplikationen im Nabelschnurblut gesunder Neugeborener in Gesamtfraktionen der mononukleären Zellen und in den oben genannten Subgruppen auf RNA- und auf genomischer Basis sowie quantitativ mittels *Real-Time*-quantitative-PCR nachgewiesen werden, um die leukämogenetische Bedeutung, die diesen Aberrationen zukommt, weiter zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Proben

Alle Proben stammen von gesunden Neugeborenen beiderlei Geschlechts, die nach der Geburt aus der noch mit der Plazenta verbundenen Nabelschnur der Neugeborenen unter sterilen Bedingungen mittels steriler Kanülen oder Abpressens, gewonnen wurden. Die Abnahme erfolgte entweder durch die beteiligten Hebammen oder durch den Autor. Das NSB (Nabelschnurblut) wurde nach Entnahme direkt in ein steriles Gefäß mit einer Kapazität von 50 ml (Sarstedt) gegeben, welches mit 5 ml 0,2 M EDTA Lösung gefüllt war. Die Probe wurde bis zur Abholung innerhalb von 12 bis 24 Stunden in einer Kühlbox gelagert. Die Proben stammen aus der Abteilung für Geburtshilfe des Krankenhauses Neu-Maria-Hilf, Göttingen. Die Mütter wurden schriftlich mittels eines Informationsblattes und mündlich über die Probenentnahme aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Zustimmung, welche den Konventionen des Helsinkier Abkommens entsprach und von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen geprüft wurde.
Die Probenmenge war von Fall zu Fall unterschiedlich, bewegte sich aber meist im Rahmen von 5 bis 10 ml Vollblut. Je nach Füllungszustand der Gefäße der Nabelschnur und einer Abnahmezeit kurz nach Entbindung konnte es aber auch eine wesentlich größere Menge (bis 30 ml) sein. Die Proben wurden innerhalb von maximal 24 Stunden aufgearbeitet.
Um einen Überblick über die Anzahl und Herkunft der Proben zu haben, wurden diese tabellarisch aufgeführt und mit dem Geburtsdatum, der Abnahmezeit, dem Geschlecht, der Aufarbeitungszeit und einer Identifizierungsnummer versehen.

Hier ein Beispiel für die Beschriftung einer solchen Probe:
Probe 7. Eingang: 14.05.02, 14:30 Uhr; Geschlecht: weiblich; verarbeitet 15.05.02, 12:00 Uhr.

Bei nicht allen Proben wurden das Geschlecht und die genau Uhrzeit notiert. Je nach weiteren Ergebnissen (z.B. positive abl-PCR) wurde der Eintrag ergänzt.

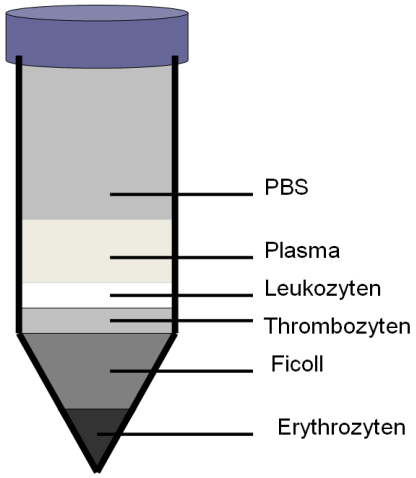
2.2 Probenaufarbeitung

Die Separation der einzelnen Blutbestandteile der Probe erfolgte mittels Ficoll. Das Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll beruht auf der unterschiedlichen Dichte von Zellen. Ficoll hat mit 1,077 eine größere Dichte als Lymphozyten und Monozyten. Die Dichte ist jedoch kleiner als die von Erythrozyten und Granulozyten. Bei der Zentrifugation werden also die Zellen mit der größeren Dichte pelletiert, während die Zellen mit der geringeren Dichte das Ficoll nicht passieren können und daher oben auf liegen.

Die gesamte Blutprobe wurde mit PBS (*Phosphate buffered saline*, Fa Sigma, München) mit Hilfe einer sterilen Pipette (10 ml serologische Pipette wattiert, Falcon, Sarstedt) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon, Sarstedt) auf 40 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und vorsichtig mit 10 ml der Dichtezentrifugationslösung (*Ficoll Separation Solution*, *isotonic density* 1,077, Seromed, Biochrom) unterschichtet. Hierbei war es wichtig, dass es zu keiner relevanten Vermischung kam. Das Unterschichten mit dem Ficoll musste langsam und vorsichtig vorgenommen werden. Es wurde ohne Bremse für 20 Minuten bei 4000U/min zentrifugiert (Kühlzentrifuge RT 6000 B, Dupont, Sorvall). Zuunterst lag die Phase der Erythrozyten, darüber die Phase der Thrombozyten. In der mittleren Zellgrenzschicht lagen anschließend die mononukleären Zellen der weißen Zellreihe als gut sichtbare Bande vor, welche vorsichtig mit einer sterilen Pipette entnommen werden konnten und in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben wurden. Diese Bande enthält in der Phase des Ficoll noch alle Leukozyten, so dass in den folgenden Schritten weiter separiert wurde, da z.B. nur die $CD34^+$ Zellen den gewünschten hämatopoetischen Stammzellen und Progenitoren entsprechen (Servida et al. 1996).

Abbildung 1:

Das Prinzip der Separation der mononukleären Zellen mittels Ficoll



Die Schicht der Leukozyten erscheint als weißliche Schicht, welche sich gut gegen die anderen Schichten absetzte.

Die gewonnenen Zellen wurden sodann zweimal in 50 ml PBS aufgenommen und bei 2000U/min eine Minute zum Waschen zentrifugiert.

Bei einem kleinen Probensatz wurde aufgrund von zu hoher Erythrozytenverunreinigung zu deren Lyse ein Ammoniumchlorid-Puffer (0,2 mM Na_2EDTA) benutzt.

Das Pellet wurde anschließend in 10 ml PBS aufgenommen und aus 10 µl eine Vitalzellzählung nach Färbung mit Tryptanblau (Fa. Sigma) in einer Neubauer-Zählkammer vorgenommen. Die verwendeten Proben wiesen alle eine Mindestzellzahl von $1x10^7$ auf. Nach der Zählung wurde das Pellet je nach Verwendungszweck entweder in 350 µl Lysispuffer RLT + 0,1% Mercapthoethanol lysiert oder mittels MACS (*Magnetic Activated Cell Sorting Of Human Leucocytes*) in Leukozytensubfraktionen sortiert.

2.3 Das Prinzip der Leukozytensubfraktionsisolierung mittels MACS

Zur Isolierung der Zellen wurde eine Leukozytensubfraktionsisolierung mittels MACS durchgeführt. Das MACS-Kit wird von der Firma Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach hergestellt. Es handelt sich hierbei um eine bewährte und verbreitete Methode (de Wynter et al. 1999), die zur Separation verschiedener Humanzellen aber auch zur

Seperation von Tier- und Pflanzenzellen genutzt werden kann (Dörr et al. 1994; Radbruch et al. 1994; Schmitz et al. 1994). Dieses Verfahren nennt man auch positive Separation.

Verbrauchte Lösungen oder Materialien wurden durch Originalartikel ersetzt. Die in der Lösung befindlichen Zellen wurden mit *MicroBeads* inkubiert. Bei diesen handelt es sich um ca. 50 Nanometer große Magnetpartikel an die Antikörper gebunden sind, welche spezifische Strukturen auf der Oberfläche der zu separierenden Zellen erkennen. Die *MicroBeads* selber bestehen aus Eisenoxid und einer Umhüllung aus Polysachariden, an welche die Antikörper gebunden sind.

Bei der MACS-Separation sind dies Zellen mit *Cluster-of-Differentiation (CD)-Microbeads,* an die monoklonale Maus CD-Anitgene (Isotyp: *mouse IgG1*) gebunden werden. Durch die erfolgte Bindung der *MicroBeads* an die gewünschte Zellpopulation können diese isoliert werden. Die Zellen werden auf die MACS-Säule aufgetragen und in ein starkes magnetisches Feld gestellt. Beim Durchfluss durch diese Säule werden die mit den *MicroBeads* markierten Zellen zurückgehalten. Auf diese Weise werden beim nachfolgenden Spülen der Säule die unmarkierten Zellen entfernt, so dass auf der Säule aus dem ursprünglichen Zellgemisch nur noch die markierte Zellpopulation enthalten ist. Diese kann nach dem Entfernen des Magnetfeldes durch Spülen aus der Säule gewonnen werden und steht damit für weitere Versuche zur Verfügung.

Die markierten Zellen, in diesem Fall die Zielzellen, wurden für die weiteren Versuche benutzt. Hierbei wurden in dieser Arbeit die Leukozytensubfraktionen $CD34^+$, $CD33^+$, $CD19^+$, $CD3^+$ isoliert. Aus den Proben wurde vor der Isolierung auch eine Gesamtzellprobe entnommen.

Exemplarisch für die anderen Zellreihen wird nachfolgend eine Isolation von $CD34^+$-Zellen beschrieben.

2.4 Die Technik der Zellseparation mittels MACS

Das o.g. Zellpellet wurde nach der Zellzählung zu dem unter einer sterilen Arbeitsbank stehenden *Magnetic-Activated-Cell-Separator* gebracht, wo die Verarbeitung vorgenommen wurde. Das Zellpellet wurde in 5 ml MACS-Puffer gegeben und bei 1600U/min in der Zentrifuge gewaschen. Danach wurden dem Pellet pro $1x10^7$

Zellen Mindestzellzahl je 300 µl MACS-Puffer und je 10 µl $CD34^+$-*Microbeads* hinzugeben. Dieses Aliquot wurde dann auf einem Rollmixer für 30 Minuten in einem Kühlschrank bei 8 °C inkubiert, damit sich die Microbeads an die entsprechende Subfraktion anlagern konnten. Die so gewonnenen Zellen wurden dann auf eine mit 500 µl MACS-Puffer durchgespülte *Magnetic-Activated-Cell-Separator*-Säule gegeben. Die $CD34^+$-Zellen befanden sich nun in der Säule und wurden mit 3x500 µl MACS-Puffer gewaschen. Zum Lösen der Zellen aus der Säule wurden diese mittels einer Stanze 3x mit 1 ml MACS-Puffer kräftig durchgespült und die Zellen dann anschließend bei 1600U/min zum Eluieren abzentrifugiert. Die Zellen wurden zur RNA-Gewinnung lysiert oder zur späteren Bearbeitung mit DMSO (Fa. Sigma, München) eingefroren. Bei 1 bis $2x10^7$ eingesetzter Gesamtzellzahl ergaben sich im Schnitt meist Zellzahlen zwischen $5x10^4$ bis $5x10^5$ $CD34^+$-Zellen. Die Reinheit der Zellen betrug mehr als 95%, wie bei FACS-Analysen festgestellt wurde.

2.5 Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)

FACS steht für *Fluorescence-Activated-Cell-Sorting*. Das Verfahren dient der Messung der Eigenschaften von Zellen und wird auch als Durchflusszytometrie bezeichnet. Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Hierbei werden in einer Lösung befindliche Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Die Zelle emittiert dabei Streulicht und zeigt in diesem Fall die mit den Antikörpern gebundenen Zellen durch Fluoreszenzimpulse an, aus denen sich unterschiedliche Eigenschaften der Zelle ableiten lassen. Das Streulicht wird durch Zellgröße, Struktur der Zellmembran sowie intrazelluläre Bestandteile beeinflusst. Die Zellen können damit in unterschiedliche Fraktionen sortiert und gezählt werden.

Zur Vorbereitung wurden die Zellen in *Falcon Tubes* (6 ml Polysterene, Becton Dickinson, New Jersey, USA) gegeben und dann jeweils 20 µl mit den Farbstoffen Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC), R-Phycoerythricin (PE) oder Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP) konjugierten monoklonalen Antikörper (Becton Dickinson *Immunocytometry System,* San José, USA und Immunotech, Marseille, Frankreich) gegen die linienspezifischen und assoziierten *Cluster-of-Differentiation* (CD)-Antigene

hinzugegeben. Anschließend erfolgte für eine Stunde die Inkubation bei Raumtemperatur. Dann wurden 4 ml FCS-RPMI dazu gegeben und das Sortieren mit dem FACS-Vantage (Becton Dickinson, New Jersey, USA) durchgeführt, das mit einem Laser mit einer Wellenlänge von 488 Nanometer arbeitet. Als *Sheat Fluid* wurde PBS-Puffer (Phosphate-Buffered-Saline, GIBCO BRL) ohne Natriumazid verwendet.

2.6 RNA-Extraktion

Die Aufarbeitungen der DNA und RNA wurden, um Verunreinigungen zu vermeiden, in separaten Laboren vorgenommen.
RNA ist sehr anfällig gegenüber äußeren Einflüssen wie z.B. hoher Temperatur und wird durch diese leicht degradiert. Insbesondere RNasen stellen eine große Gefahr dar, da sie stabil sind, überall vorkommen und meistens auch keine Kofaktoren benötigen (Blackburn und Moore 1982). Bei der RNA-Extraktion wurden ausschließlich Originalartikel der Firma Quiagen (RNEasy KIT) benutzt und diese nach Verbrauch durch Originalartikel ersetzt.
Das Lysat wurde auf die dem Kit beiliegende *QuiaShredder*-Säule gegeben und bei 14.000U/min zwei Minuten lang zentrifugiert. Dem Eluat wurden sodann 350 µl 70%-Ethanol beigegeben und durch Pipettieren gemischt. Dieses Eluat wurde dann auf eine *RNeasymini column* pipettiert und bei 10.000U/min 15 Sekunden lang abzentrifugiert. Anschließend wurde das Eluat mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen und mit 10 µl DNase (Quiagen) zusammen mit 70 µl DNase-Puffer gleichmäßig bedeckt. Diese Behandlung wurde vorgenommen um mögliche Verunreinigungen durch DNA zu verhindern. Der DNase-Puffer wirkte dann 15 Minuten bei Raumtemperatur ein. Danach wurde erneut mit 350 µl RW1-Puffer und 2x mit 500 µl RPE-Puffer, bei zuerst 8000U/min für 15 Sekunden und beim zweiten Mal mit 15.000U/min für zwei Minuten gewaschen.
Als abschließender Schritt folgte eine Eluierung der RNA mit 50 µl RNase-freiem H_2O, indem eine Minute mit 8000U/min zentrifugiert wurde. Die RNA wurde anschließend quantifiziert und bei -80 °C gelagert.

2.7 Quantifizierung der RNA-Konzentration

Zur photometrischen Bestimmung der RNA-Konzentration wurde eine einheitliche Verdünnung gebildet und unter dem Photometer eine Absorptionsmessung durch Messen der optischen Dichte bei 260 und 280 Nanometer vorgenommen. Der RNA-Reinheitsgrad wird über den Quotienten (260/280) bestimmt. Aus diesen Werten lässt sich auch unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Konzentration der RNA-Lösung errechnen. Dadurch kann weiterhin eine Aussage über die Qualität der RNA gemacht werden. Die Verdünnung wurde wie folgt vorgenommen: 5 µl RNA wurden mit 95 µl H_2O verdünnt, was einer Verdünnung von 1:20 entsprach.

Hier ein Beispiel für ein Resultat:
-2,081, Probe 11, Abs. 1: 0,154, Ratio: -0,2207, Abs. 2: -0,074

Der erhobene Wert (Abs. 1) wurde mit dem Faktor 40 und dem Verdünnungsfaktor 20 multipliziert. Hieraus ergab sich der RNA-Gehalt der Lösung in ng/µl. Der erhobene Wert (Abs. 1) wurde mit dem Multiplikationsfaktor Faktor 40 und dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert. Hieraus ergab sich der RNA-Gehalt der Lösung in ng/µl. Der Wert 40 ist wie folgt zu erklären: Dieser Wert entspricht dem Absorptions-spektrum von RNA und ist der Mittelwert aus dem Absorptionssektrum aller ge-paarten und ungepaarten Basen. RNA neigt sehr viel stärker zur Bildung von internen Basenpaaren als DNA. Daher ist der Wert niedriger als bei der DNA.
Ein Beispiel für die Berechnung der Konzentration : 0,154x40x20 = 132,2 ng/µl.

Die RNA wurde dann weiter mittels reverser Transkription zu c-DNA transkribiert.

2.8 DNA-Isolation

Bei der DNA-Isolation wurden ausschließlich Originalartikel der Firma Quiagen (Quiamp *DNA Bloodmini kit*) benutzt und nach Verbrauch durch Originalartikel ersetzt.
Die in 200 µl PBS vorhandenen Zellen wurden mit 10 µl Protein-Kinase K in einem Reaktionsgefäß unterlagert und dann vorsichtig 200 µl AL-Puffer auf die Zellen

gegeben, wobei eine direkte Vermischung der Proteinkinase K mit dem AL-Puffer vermieden werden musste. Anschließend wurde zur gründlichen Durchmischung ein Vortex-Schüttler benutzt (Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, USA) und das Aliquot 15 Minuten lang bei 56 °C in einem Wasserbad inkubiert (Thermocycler 60, MWB, Biotech, Deutschland). Dann erfolgte eine kurze Zentrifugation und die Hinzugabe von 200 µl 96%-Ethanol. Dieses Aliquot wurde auf die im Set vorhandene Quiaspin-Säule gegeben, bei 8000U/min für eine Minute zentrifugiert und dann die Säule in ein neues *Collection-Tube* getan. Nachfolgend wurde das auf der Säule befindliche Aliquot zweimal mit den beiden im Set vorhandenen verschiedenen Waschpuffern erst bei 8000U/min und dann bei 14000U/min jeweils eine Minute gewaschen, um dann die in der Säule befindliche DNA mit 200 µl AE-Puffer zu überschichten und bei Raumtemperatur eine Minute inkubieren zu lassen.
Abschließend wurde die DNA mittels Zentrifugation bei 8000U/min aus der Säule eluiert und konnte im Kühlschrank gelagert werden.

2.9 Quantifizierung der DNA-Konzentration

Zur photometrischen Bestimmung der DNA-Konzentration wurde eine einheitliche Verdünnung gebildet und unter dem Photometer eine Absorptionsmessung durch Messen der optischen Dichte bei 260 und 280 Nanometer vorgenommen. Hierzu wurde die DNA (45 µl DNA mit 45 µl H_2O) verdünnt, damit eine 1:2 Verdünnung entstand.

Hier ein Beispiel für ein Resultat:
2,070, Probe 17, Abs. 1: 0,282, Ratio: 2,070, Abs. 2: 0,426

Der erhobene Wert (Abs. 1) wurde mit dem Multiplikationsfaktor Faktor 50 und dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert. Hieraus ergab sich der DNA-Gehalt der Lösung in ng/µl. Der 50 ist wie folgt zu erklären. Dieser Wert entspricht dem Absorption-sspektrum der DNA und ist der Mittelwert aus dem Absorptionssektrum aller gepaarten und ungepaarten Basen.
Ein Beispiel für eine Berechung der Konzentrarion: 0,282x50x2 = 88,2 ng/µl.

2.10 Reverse Transkription der RNA

Bei der reversen Transkription werden die Eigenschaften von Retroviren genutzt, die mittels der reversen Transkriptase ihre genetische Information, welche als RNA vorliegt, in einen komplementären DNA-Strang (c-DNA) umwandeln. Diese c-DNA lässt sich dann als Vorlage bei der Reversen-Transkiptase-Polymerase-Kettenreaktion einsetzen. Zur Herstellung von c-DNA aus der Gesamt-RNA wurde das *Superscript Kit*, *Preamplification System for First Strand c-DNA Synthesis*, der Firma Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein verwendet. Es wurde nach dem Anwenderprotokoll verfahren.

Im Kit verwendete Lösungen:

- Oligo(dT)-Primer (0,5 µg/µl)
- Random-Hexamer-Primer (50 ng/µl)
- 5fach PCR-Puffer (200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl)
- 25 mM $MgCl_2$
- 0,1M Dithiothreitol (DTT)
- 10 mM dNTP-Mix (jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Superscript II-Reverse Transkriptase (200 Einheiten/µl)
- Escherichia coli RNaseH (2 Einheiten/µl)
- HPLC-Grade-Wasser
- Kontroll RNA (Chloramphenicol Aminotransferase, 50 ng/µl)
- Kontrollprimer A (10 µM), Kontrollprimer B (10 µM).

Alle aufgeführten Lösungen und Enzyme waren im Kit vorhanden. Bei Verbrauch wurden sie durch Originallösungen beziehungsweise -enzyme der Firma Gibco BRL ersetzt.
10 µl der RNA wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) für 10 Minuten im Thermocycler (Thermocycler 60 MWB, Biotech, Deutschland) bei 65 °C denaturiert, um die spätere Primerbindung zu ermöglichen. Anschließend wur-

den sie für eine Minute auf Eis abgekühlt. Der nachfolgende Annealingschritt ermöglicht die Bindung der Primer und bereitet die anschließende reverse Transkription vor. Dann wurden der abzentrifugierten RNA 20 µl eines vorbereiteten Mastermixes hinzugegeben, der aus folgenden Reagenzien bestand:

- 8 µl (5fach) Reaktionspuffer (Invitrogen)
- 4 µl 0,1M Dithiothreitol (DTT)
- 3,5 µl dNTP (10 mM)
- 2 µl Randomhexamer (50 ng\µl)
- 1,5 µl Superskript II (300 IU)
- 1 µl RNaseout 40 U

Der Mastermix wurde für die Probenanzahl plus die Positivkontrolle plus eine Probe berechnet.
Die reverse Transkription fand bei einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei 37 °C statt, welcher sich zur Beendigung der Reaktion und Denaturierung eine zehnminütige Phase bei 65 °C anschloss.
Die hierbei gewonnene c-DNA wurde mittels interner abl-PCR überprüft, gleich weiter verwendet oder konnte bei –20 °C eingefroren werden.

2.11 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase-chain-reaction*, PCR) ist eine etablierte in-vitro Technik zur Vervielfältigung eines spezifischen Genfragments aus DNA (Mullis und Faloona 1987; Saiki et al. 1988). Dieses wird durch die zyklische Wiederholung von drei Reaktionsschritten erreicht. Zuerst erfolgt eine Hitzedenaturierung der DNA-Doppelhelix, bei der sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden Strängen auftrennen und dadurch eine einzelsträngige DNA entsteht. An diese lagern sich beim Annealing zwei synthetisch hergestellte Startermoleküle (Primer) an. Dies sind Oligonukleotide die komplementär zu dem Ende des Zielstrangs gewählt werden und den zu vermehrenden DNA-Abschnitt begrenzen. Dann

werden die zugegebenen Desoxynukleosidtriphosphate mit Hilfe der Taq-Polymerase an die Primer gebunden. Durch ein erneutes Erhitzen trennen sie sich wieder und stehen erneut als Matrizen bereit. Dieser Zyklus wiederholt sich meistens zwischen 30 bis 40 Mal. Durch die PCR kann eine vielfach gesteigerte Sensitivität für das Vorliegen des Gens erreicht werden. Hierbei wird zum Nachweis des genetischen Rearrangements die RNA des isolierten Probenmaterials in sogenannte c-DNA umgeschrieben und abl-selektiv durch spezifische Primer vervielfältigt. Das Resultat wird anschließend bildgebend dargestellt. Da die PCR gegenüber Verunreinigungen sehr empfindlich ist und so fälschlicherweise positive Ergebnisse entstehen können, müssen sorgfältige Vorkehrungen getroffen werden. Die Reaktionsprodukte müssen von den Ausgangsmaterialien räumlich getrennt sein, um eine Kontamination zu verhindern. Bei jeder PCR muss eine Negativkontrolle durchgeführt werden.
In dieser Arbeit wird RT-PCR als Abkürzung für die Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion benutzt. In anderen Arbeiten wird mit dieser Abkürzung eine *Real-Time*-quantitative-PCR bezeichnet. Dieser Begriff (*Real-Time*-quantitative-PCR) wird im Folgenden um Verwechselungen zu vermeiden immer ausgeschrieben.

2.12 Interne abl-Kontrolle

Zur internen Kontrolle des Vorliegens von c-DNA wurde eine Polymerase-Kettenreaktion für das abl-Gen durchgeführt. Hierbei wurden 49 µl des Mastermixes mit 2 Tropfen Mineralöl (Sigma, München) überschichtet und anschließend 2 µl des *Templates* hinzugegeben. Dann wurde die Amplifikationssequenz im Thermocycler durchgeführt, die sich wie folgt ergibt:
Denaturierung bei 95 °C für fünf Minuten, anschließend Inkubation bei der spezifischen Annealingtemperatur von 60 °C, mit einer 35maligen Wiederholung des Zyklus. Die Reaktion wurde mit einer zehnminütigen Temperatur von 72 °C beendet.

Pipettierschema:
Mastermix je eine Probe:
- 5 µl 10fach PCR-Puffer (Bestandteile des Puffers: 200 mM Tris-HCl (pH 8,4),

500 mM KCl)
- 1 µl 10 mM dNTP-Mix (jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 2 µl 50 mM $MgCl_2$
- je 1 µl Primer (10 µMolar)
- 0,25 µl Taq-Polymerase
- 38,75 µl HPLC-Grade-Wasser

Hieraus ergab sich ein Endvolumen von 49 µl.

Der 10fach PCR-Puffer, die 50 mM $MgCl_2$-Lösung und die Taq-Polymerase sind Bestandteil der Taq-Polymerase-Lieferung von GibcoBRL Life Technologies. Der 10 mM dNTP-Mix stammt ebenfalls von Gibco BRL.

Tabelle 1:
Zeitschemata der PCR:

Interne abl-Kontrolle	Primär- und *semi-nested* PCR
95 °C 5 min x1	95 °C 5 min x1
95 °C 1 min x35	95 °C 5 min x35
60 °C 1 min x35	63 °C 1 min x35
72 °C 1 min x35	72 °C 1 min x35
72 °C 10 min x1	72 °C 10 min x1

Bei der abl-PCR wurden folgende Primer benutzt:
5´-AAAACCTTCTCGCTGGAC-3´ und 5´-CTGTTGACTGGCGTGATG-3´.

2.13 MLL-PTD: Primäre und *semi-nested*-PCR

Für die primäre PCR der Positivkontrollen sowie der sortierten Proben wurden 2 µl der c-DNA eingesetzt. Für die *semi-nested*-PCR (*nested* = verschachtelt) wurde 1 µl des primären PCR-Produkts eingesetzt. In einer *semi-nested* PCR wird in der

zweiten PCR das Produkt der ersten PCR eingesetzt und als Matrize verwendet. Hierdurch kommt es zu einer wesentlich höheren Empfindlichkeit und Spezifität.
Der Mastermix für die primäre PCR, wie auch für die *semi-nested*-PCR, setzte sich aus den gleichen Reagenzien wie oben genannt zusammen. Die verschiedenen Primer werden unten aufgeführt.
Nach Zugabe der c-DNA, bzw. des primären PCR-Produktes zu dem mit Mineralöl beschichteten Mastermix wurde die PCR bei 95 °C denaturiert und nach 35 Zyklen mit 10 Minuten bei 72 °C beendet.
Die PCR-Produkte wurden anschließend bei -50 °C eingefroren oder zur Produktkontrolle auf ein 1,5% Agarosegel aufgetragen.

2.14 MLL-PTD: *Real-Time*-quantitative-PCR und genomische PCR

Die *Real-Time*-quantitative-PCR ist eine PCR, die auf der Basis der herkömmlichen PCR basiert, aber im Gegensatz zu dieser die Möglichkeit der Quantifizierung des Produktes erlaubt. Dies geschieht mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen, die schon während der laufenden PCR (daher *Real-Time)* durchgeführt werden. Die Fluoreszenz nimmt in dem Maße zu, in dem die Menge des Produktes zunimmt.

Die MLL-PTD-RT-PCR Primer waren folgende (Gen Bank NM005933):
Primär: 3.1C 5´-AGGAGAGAGTTTACCTGCTC-3´ (bp 863-844)
MLLint: 5´-CTTCC AGGAAGTCAAGCAAGCAGGT-3´ (bp 3892-3916)
Nested: 6.1 5´- GTCCAGAGCAGAGCAA ACAG-3´ (bp 4036-4055)
E3AS: 5´-ACACAGATGGATCTGAGAGG-3´ (bp 609-590).

Für die genomische MLL-PCR wurden folgende Primer benutzt (Gen Bank AY373585):
Primär: i6 5´-GCTGAGATAGAAGGATTGTCTTG-3` (bp 48301-48323)
i1.20 5´-TGCTCTGAGATTGCTAAG-3´(bp 32950-32933)
Nested: i8 5´-GTCCCAATAATTCCTTTATGGC-3´ (bp 53261-53282)
i1n 5´-CTCCTCTTCAAAGACATCTG-3` (bp 32895-32876).

2.15 Agarosegel-Elektrophorese

Nukleinsäuremoleküle sind bei ph 7 auf Grund des Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen und wandern deshalb in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit im Agarosegel ist abhängig von der Größe und Konformation der Moleküle. Dadurch lassen sich unterschiedlich große oder lange Amplifikationsprodukte gut trennen und darstellen.

Zur Agarosegel-Elelektrophorese von PCR-Proben wurde ein 1,5%iges Gel verwendet. Dabei wurden 1,5 g Agarose (*Electrophoresis Grade* GIBCO BRL*, Life Technology,* Paisley Scotland) zu 100 ml TBE-Puffer gegeben, die Lösung im Mikrowellenofen bis zum vollständigen Auflösen der Agarose erhitzt, ein Tropfen einer Ethidiumbromidlösung (Les Ullis Cedex B, France) zugegeben und die Lösung anschließend in einen Gelschlitten mit Kämmen zur Fächerbildung gegossen. Hierbei sollten zum Eigenschutz hitzebeständige Handschuhe getragen werden. Die Kämme wurden nach dem Erkalten des Gels vorsichtig entfernt. Es wurden 10 µl der PCR-Probe, die mit 2 µl Loading-Puffer (0,1%iges Bromphenolblau in bidestilliertem Wasser) vermischt wurden, pro Geltasche aufgetragen. Zur Größenkontrolle wurden 2 µl Marker MVI (Boehringer Mannheim), die mit 2 µl Loading-Puffer vermischt waren, aufgetragen. Für präparative Gele wurden pro Tasche 50 µl PCR-Probe, vermischt mit 10 µl Loading-Puffer aufgetragen.

Die Gelkammer (Horizon 11-14, Gibco-Brl, Eggenstein) wurde mit TBE-Puffer (54 g Tris, 27,5 g Borsäure, 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 5 Liter bidest. Wasser) gefüllt. Der Lauf erfolgte bei 100 Volt (Spannungsgerät PPS 200/400, Pharmacia) für eine Stunde. Die Nukleinsäuren wurden durch den fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid unter der UV-Strahlung sichtbar gemacht und unter UV-Licht von 254 Nanometer mit einer Videokamera aufgenommen und mit dem angeschlossenen Printer gedruckt (Intas, Göttingen).

3. Ergebnisse

3.1 Probenanzahl

Für den Nachweis von MLL-PTD in Gesamtfraktionen und den oben genannten Subfraktionen aus Nabelschnurblutproben auf RNA-Ebene wurden insgesamt 65 Proben gesammelt. Hierbei waren 14 Proben von Neugeborenen weiblichen Geschlechts; 16 Proben waren von Neugeborenen männlichen Geschlechts. Bei den weiteren 35 Proben konnte die Geschlechtszugehörigkeit aufgrund fehlender Angaben bei der Abnahme nicht eruiert werden.
Für den Nachweis von MLL-PTD in Gesamtfraktionen und den oben genannten Subfraktionen aus Nabelschnurblutproben auf DNA-Ebene wurden insgesamt 47 Proben gesammelt. Hierbei waren fünf Proben von Neugeborenen weiblichen Geschlechts, 20 Proben waren von Neugeborenen männlichen Geschlechts. Bei den weiteren 22 Proben konnte die Geschlechtszugehörigkeit aufgrund fehlender Angaben bei der Abnahme nicht eruiert werden.

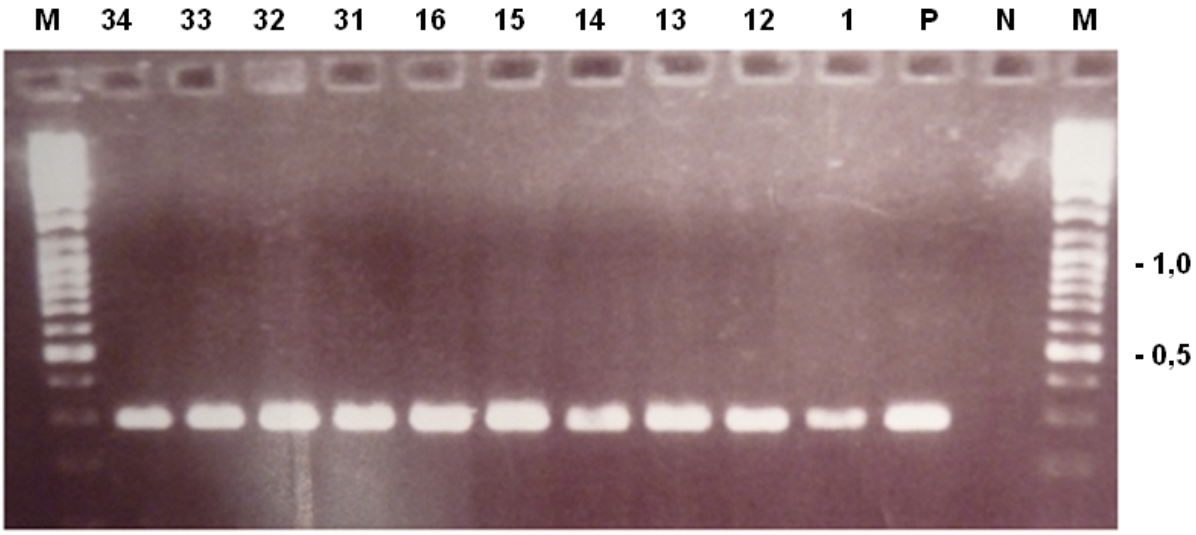
3.2 Zellausbeuten

Die Zellausbeuten konnten unterschiedlich ausfallen. Dies konnte auf Grund unterschiedlichen Alters der Proben, welche aber immer innerhalb von 24 Stunden aufgearbeitet wurden sowie der eingesetzten Menge Vollblut oder aber in Folge verschiedener Abnahmepersonen der Fall sein. Nach der Zellzählung in einer Neubauerzählkammer wurden die Zellen mittels MACS in Subfraktionen sortiert. Die Mindestzellzahl welche eingesetzt wurde war $1x10^7$. Die Zellzahlen, die sich nach der MACS-Aufreinigung bei 1 bis $2x10^7$ Zellen ergaben, betrugen meistens zwischen $5x10^4$ bis $5x10^5$. Die Zellreinheit der Subfraktionen betrug über 95%. Die Reinheit der Zellen wurde durch FACS-Analysen bestätigt. Falls die Proben eine geringere isolierte Zellreinheit aufwiesen, wurden sie einer erneuten MACS-Aufreinigung unterzogen. Nach erfolgter Isolation der RNA wurde diese zu c-DNA transkribiert.

3.3 Ergebnisse der internen abl-Kontrolle

Um das Vorliegen von c-DNA nachzuweisen, wurde eine Polymerase-Kettenreaktion für das abl-Gen durchgeführt. In Abbildung 2 (s. unten) ist das Ergebnis einer solchen abl-PCR von c-DNA dargestellt. Alle in diesem Gel aufgetragenen Proben sind abl-positiv. Abbildung 3 (s. Seite 30) zeigt eine abl-PCR von DNA. Hier sieht man, dass nicht alle Proben als Zeichen einer gelungenen DNA-Isolation abl-positiv waren. War eine Probe negativ wurde von dieser eine erneute abl-PCR vorgenommen. Lag dann ein positives Ergebnis vor wurde die Probe weiterverwendet. Lag erneut ein negatives Ergebnis vor, wurde die Probe von der weiteren Verarbeitung ausgeschlossen. Dies wurde bei den entsprechenden Proben vermerkt. Nur abl-positive Proben wurden weiterverwendet.

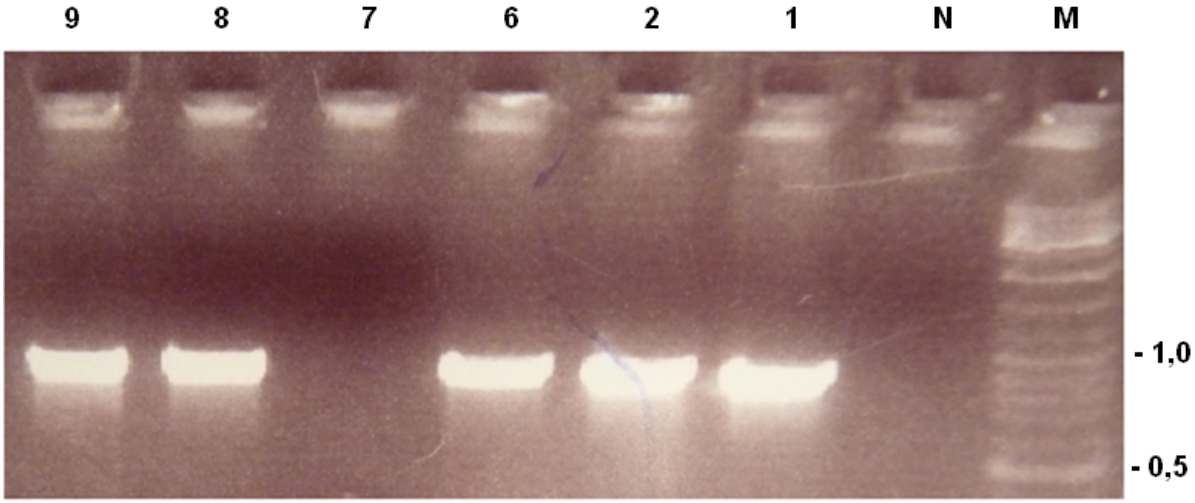
Abbildung 2:
Abl-PCR zum Nachweis von c-DNA



Alle aufgetragenen Proben sind abl-positiv.
Abgebildet sind die Proben 34 (Gesamtpopulation), 33 (Gesamtpopulation), 32 (Gesamtpopulation), 31 ($CD3^+$), 16 ($CD33^+$), 15 ($CD19^+$), 14 ($CD3^+$), 13 (Gesamtpopulation), 12 ($CD34^+$) und 1 ($CD34^+$). Die Größe der Bahnmarker ist in Kilobasen angegeben. M kennzeichnet die Markerbande; N ist die Negativkontrolle (Wasser); P kennzeichnet die Positivkontrolle (MLL-positive AML).

Abbildung 3:

Abl-PCR zum Nachweis von DNA



Diese Abbildung zeigt ein Beispiel für eine abl-PCR bei der nicht alle Proben positiv waren. Abgebildet sind die Proben 9 ($CD34^+$), 8 ($CD33^+$), 7($CD19^+$), 6 ($CD3^+$), 2 ($CD3^+$) und 1 (Gesamtpopulation).
Die Größe der Bahnmarker ist in Kilobasen angegeben. M kennzeichnet die Markerbande; N ist die Negativkontrolle (Wasser).

3.4 Sensitivitäten der *semi-nested*-RT-PCR und der quantitativen PCR

Ein Mikrogramm RNA wurde aus ungefähr 100.000 Zellen gewonnen und mittels reverser Transkription in c-DNA umgewandelt. Von dieser c-DNA wurden zwei Mikroliter weiter in der *nested*-PCR amplifiziert und aus dieser ein Mikroliter als Template für die *semi-nested*-RT-PCR eingesetzt, so dass die eingesetzte Menge ungefähr 25.000 Zellen pro angesetzter PCR entsprach (Schnittger et al. 1998). Die Menge an eingesetzter DNA bei der genomischen PCR entsprach ungefähr 10.000 mononukleären Zellen.

Jede PCR wurde mindestens zweimal wiederholt. Beim Auftreten einer MLL-PTD wurde sie als positiv angesehen. Die Negativkontrolle enthielt Wasser und wurde simultan mit der DNA/RNA-Isolation begonnen. Eine MLL-PTD-positive AML wurde als Positivkontrolle benutzt.

Die Sensitivität war 10^{-5} Zellen, was durch Bestimmung von c-DNA in einer Verdünnungsreihe festgestellt wurde.

Die *Real-Time*-quantitative-PCR wurde mit dem *Lightcyclersystem* (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) durchgeführt. Die Sensivität war 10^{-2} bis 10^{-4} Zellen (c-DNA in c-DNA Verdünnung).

3.5 Spezifität der PCR-Produkte

Die Spezifität der PCR-Produkte wurde durch Sequenzierungen der Produkte bestätigt. Die PTD sind gleich mit denen, welche in primären PCRs von MLL-PTD-positiven akuten myeloischen Leukämien gefunden wurden. Des Weiteren wurden auch zusätzliche PTD amplifiziert. Diese kommen auch in peripheren mononukleären Zellen gesunder Erwachsener vor. Beide Merkmale, zahlreiche MLL-PTD in einer Probe und das Auftreten der MLL-PTD mit einer Häufigkeit von fast 100% aller NSB-Proben, sind mit dem vergleichbar, was in der Hämatopoese gesunder Erwachsener gefunden wurde.
Um unspezifische Amplifikationen auszuschließen, welche MLL-PTD nachahmen könnten, wurden 15 NSB-Proben ausgesucht, einer RT-PCR unterzogen und anschließend sequenziert. Die Inzidenz der positiven Proben war mit der vergleichbar, welche sich bei den RT-PCRs fand. MLL-PTD im Nabelschnurblut entstammen also einem genomischen Rearrangement und sind keine unspezifischen RNA-Amplifikationen.

3.6 MLL-PTD in Gesamt-NSB

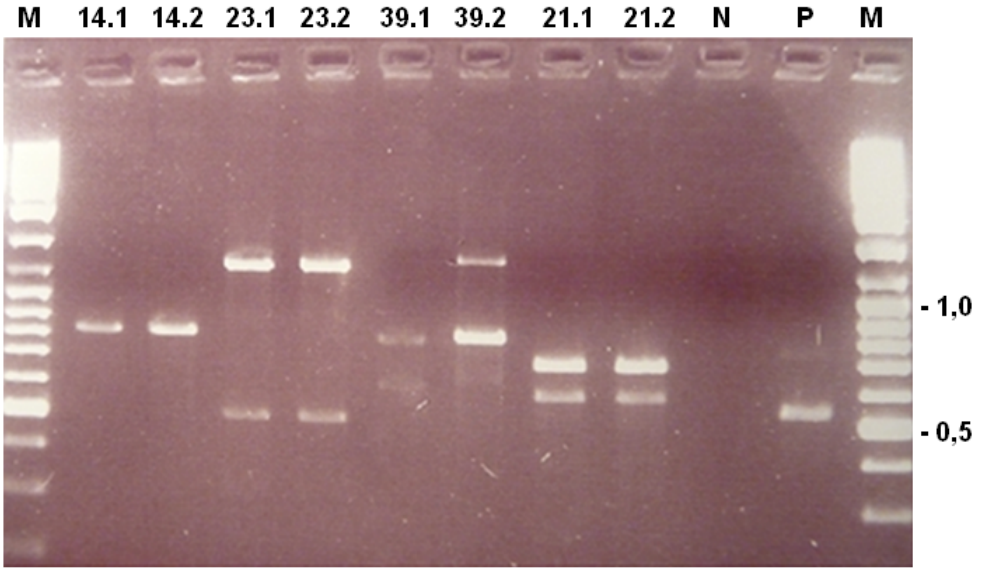
Eine Gesamtfraktion der mononukleären Zellen, die aus dem Nabelschnurblut gesunder Neugeborener gewonnen wurden, wurde nach einer RNA-Qualitätskontrolle mittels abl-PCR zuerst in eine *nested*-PCR und das hieraus resultierende Produkt erneut in eine *semi-nested*-PCR eingesetzt. Nur abl-positive Proben wurden hierfür ausgewählt.
Eine Menge DNA, welche ungefähr 25 Nanogramm revers-transkribierter c-DNA entspricht, wurde für 35 Zyklen amplifiziert. Aus diesem Aliquot wurde ein Mikroliter in eine *semi-nested*-PCR eingesetzt und ebenfalls für 35 Zyklen amplifiziert.
Abbildung 4 (s. unten) zeigt MLL-PTD in mononukleären Zellen, die bei wiederholten *semi-nested*-PCRs aufgetreten sind. Das Gel in Abbildung 5 (s. Seite 33) zeigt ebenfalls MLL-PTD in mononukleären Zellen, die bei wiederholten *semi-nested*-PCRs auftreten. Bei den Gesamtpopulationen fanden sich wesentlich mehr Banden als bei den Subpopulationen. Die PTD e9/e3 und e11/e3 (die Nummern beschreiben

die MLL-PTD-Exon-Fusionsstellen), die auch bei der AML auftreten, sind bei Abbildung 5 am Rand gekennzeichnet.

Der Großteil der Proben war wie erwartet erst in der zweiten, der *semi-nested*-RT-PCR, MLL-PTD positiv. Insgesamt waren 56 von 60 Proben MLL-PTD positiv, was einer Quote von 93% entspricht. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 2 (s. Seite 38). In fast jeder positiven Probe fand sich sowohl in der initialen, als auch in der repetitiven PCR-Durchführung mehr als eine MLL-PTD. Proben mit einer Bande waren selten. In den meisten Proben fanden sich drei oder mehrere PTD. Die in den verschiedenen Proben festgestellten Banden waren nicht einheitlich und zeigten auch in den Wiederholungen der PCRs verschiedene Bandenmuster. Dies weist darauf hin, dass in den meisten Proben mehr MLL-PTD sind, als bei den einzeln durchgeführten PCRs zu sehen war, was wahrscheinlich auf stochastische Effekte während des PCR-Replikationsvorgangs zurückzuführen ist.

Abbildung 4:

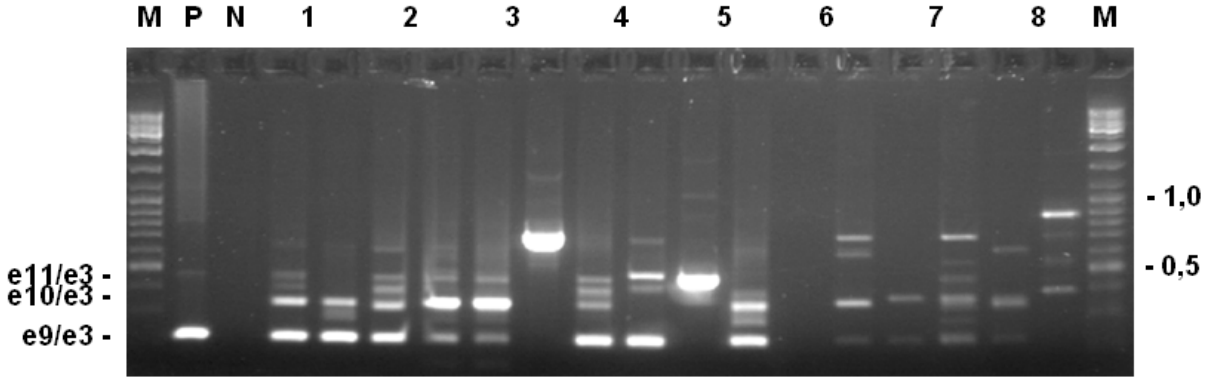
Semi-nested-PCR der mononukleären Zellen aus Nebelschnurblut



Dieses Gel zeigt MLL-PTD in mononukleären Zellen aus Nabelschnurblutproben, wie sie bei wiederholten *semi-nested*-RT-PCRs aufgetreten sind. Jede Probe wurde mindestens zweimal in der PCR amplifiziert. Abgebildet sind die Proben 14 ($CD3^+$), 23 ($CD3^+$), 39 ($CD3^+$) und 21 (Gesamtpopulation). Die Größe der Bahnmarker ist in Kilobasen angegeben. M kennzeichnet die Markerbande; N ist die Negativkontrolle (Wasser); P kennzeichnet die Positivkontrolle (MLL-positive AML).

Abbildung 5:

Mononukleäre Zellen von Gesamtpopulationen aus Nabelschnurblut



Dieses Gel zeigt MLL-PTD in mononukleären Zellen aus Gesamtpopulationen von Nabelschnurblutproben, wie sie bei wiederholten *semi-nested*-RT-PCRs aufgetreten sind. Die PTD e9/e3 und e11/e3, die auch bei der AML auftreten, sind gekennzeichnet. Auch konnten bei wiederholten PCRs der gleichen Probe verschiedene Banden auftreten.

Die Größe der Bahnmarker ist in Kilobasen angegeben. M kennzeichnet die Markerbande; N ist die Negativkontrolle (Wasser); P kennzeichnet die Positivkontrolle (MLL-positive AML).

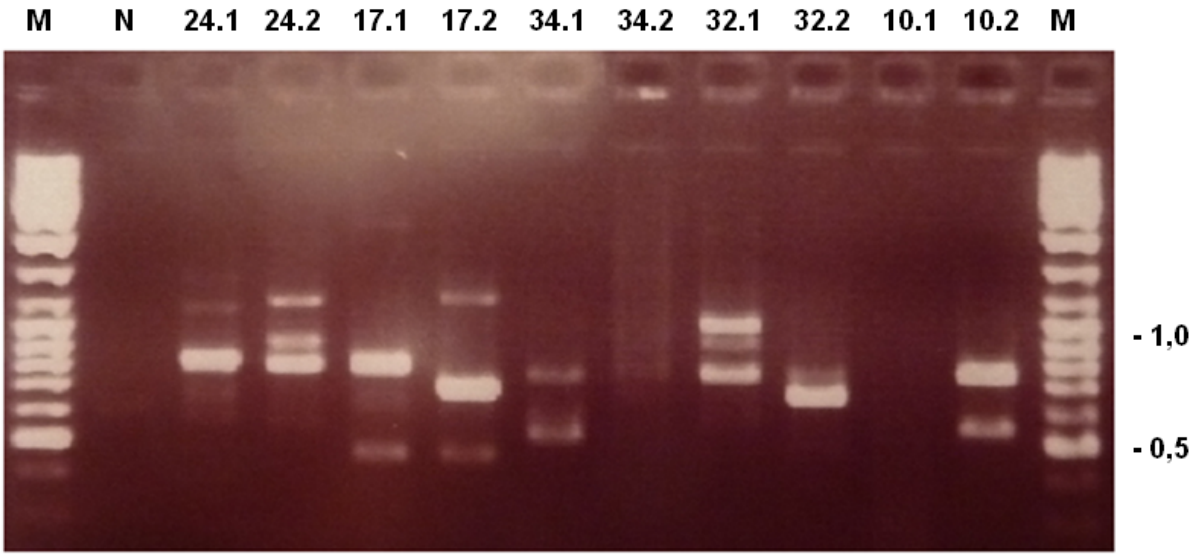
3.7 Genomische PCR in mononukleären NSB-Gesamtproben

Die genomische PCR wurde unter den gleichen Bedingungen wie bei der RT-PCR durchgeführt. Es wurden ca. 100 ng genomischer DNA eingesetzt und für 35 Zyklen amplifiziert. Aus diesem Aliquot wurde ebenfalls ein Mikroliter in eine *semi-nested*-PCR eingesetzt und ebenfalls für 35 Zyklen amplifiziert.

Die Abbildungen 6 und 7 (s. Seite 34) bilden Teile der erhobenen Ergebnisse ab. In Abbildung 7 zeigt sich auch die MLL-PTD e11/e2, die vor allem amplifiziert ist. Hier ist zu sehen, dass in allen Proben (15\15) MLL-PTD vorhanden waren. Dies wiederum zeigt, dass MLL-PTD auch auf dem genomischen Level vorkommen und die Duplikationen schon auf dem DNA-Level vorhanden sind und nicht erst auf dem Level der Transkription entstehen. Damit wurden auch *Splicing*-Artefakte größtenteils ausgeschlossen.

Abbildung 6:

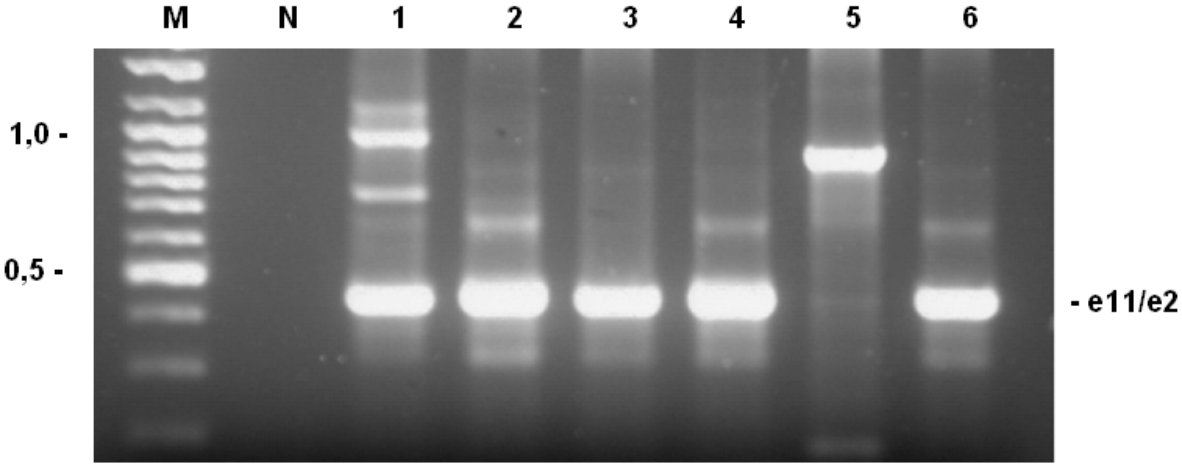
Genomische *semi-nested*-PCR der mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut



Dieses Gel zeigt ebenfalls MLL-PTD in mononukleären Zellen aus Nabelschnurblutproben. Abgebildet sind die Proben 24 ($CD3^+$), 17 ($CD19^+$), 34 (Gesamtpopulation), 32 ($CD19^+$) und 10 (Gesamtpopulation). Die Größe der Bahnmarker ist in Kilobasen angegeben. M (kennzeichnet die Markerbande; N ist die Negativkontrolle (Wasser).

Abbildung 7:

Genomische *semi-nested*-PCR der mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut

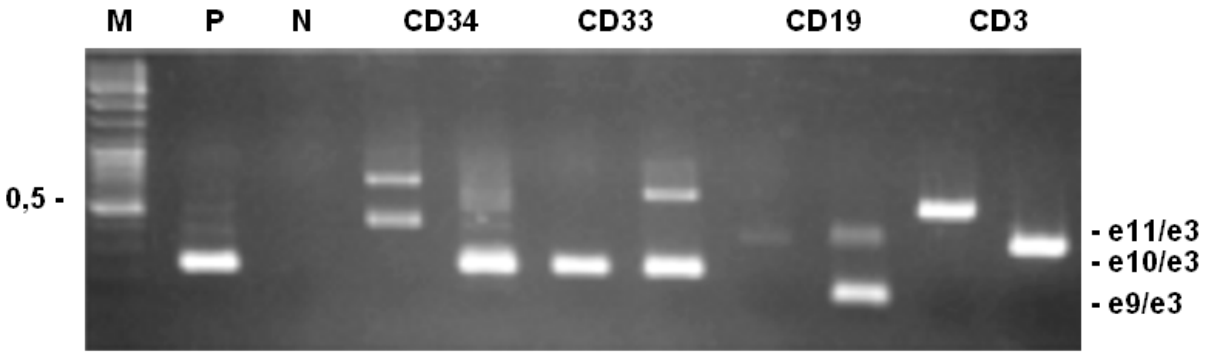


Dieses Gel zeigt die MLL-PTD e11/e2, welche vor allem amplifiziert ist. Die Größe der Bahnmarker ist in Kilobasen angegeben. M kennzeichnet die Markerbande; N ist die Negativkontrolle (Wasser).

3.8 MLL-PTD in NSB-Subfraktionen (Hämatopoetische Vorläuferzellen, myeloische B- und T-lymphatische Zellen)

Mononukleäre Zellen der NSB-Subfraktionen, die aus dem Nabelschnurblut gesunder Neugeborener gewonnen wurden, wurden mittels MACS in Subfraktionen sortiert und diese nach einer RNA-Qualitätskontrolle durch eine abl-PCR zuerst in eine *nested*-RT-PCR und das hieraus resultierende Produkt erneut in eine *semi-nested*-RT-PCR eingesetzt. Nur abl-positive Proben wurden hierfür ausgewählt. Abbildung 8 (s. unten) zeigt einen Teil der erhobenen Ergebnisse, die in Tabelle 3 (s. Seite 38) aufgelistet werden. Hier kann man sehen, dass bei den Subpopulationen wesentlich weniger MLL-PTD-Banden auftreten, als bei den Gesamtproben. Die Größe der Banden differierte bei wiederholten PCRs als Hinweis auf mehrere gleichzeitig vorhandene MLL-PTD, die stochastisch amplifiziert werden.
Abbildung 9 (s. Seite 36) zeigt die Ergebnisse zweier $CD34^+$-Subfraktionen aus zwei verschiedenen PCRs, bei denen sowohl die primäre als auch die *semi-nested*-RT-PCR wiederholt wurden. In der hier dargestellten Probe 34.1 konnte die PTD e9/e3 und die PTD e11/e3 gefunden werden. In allen vier Subfraktionen konnten MLL-PTD nachgewiesen werden. Vier von sechs Proben der $CD34^+$-Subfraktion waren positiv, was einer Quote von 67% entspricht. Fünf von sieben $CD33^+$-Proben waren ebenfalls positiv. Eine von drei $CD19^+$-Proben war positiv und eine von vier Proben der $CD3^+$-Subfraktion war positiv.

Abbildung 8:
Dieses Gel zeigt die Subfraktionen $CD34^+$, $CD33^+$, $CD19^+$, $CD3^+$ in der *semi-nested*-RT-PCR

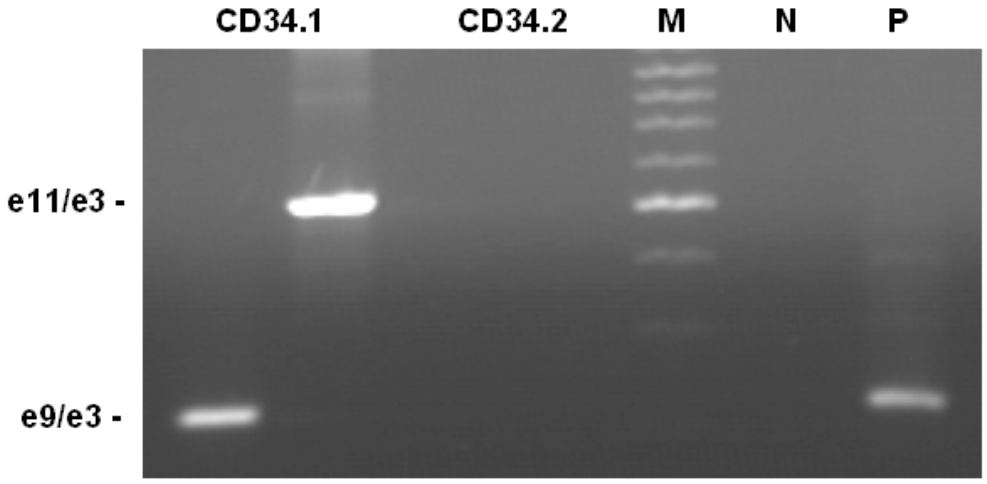


In diesem Gel kann man sehen, dass wesentlich weniger MLL-PTD-Banden auftreten als bei den Gesamtproben. Die Größe der Banden differiert bei wiederholten Polymerase-Kettenreaktionen als Hinweis auf mehrere, gleichzeitig vorhandene MLL-PTD, die stochastisch amplifiziert werden.

AML assoziierte MLL-PTD sind angegeben. Die Größe der Bahnmarker ist in Kilobasen angegeben. M (kennzeichnet die Markerbande; N ist die Negativkontrolle (Wasser); P ist die Positivkontrolle (MLL-positive AML).

Abbildung 9:

Semi-nested-RT-PCR zweier CD34^{+}-Stammzellsubfraktionen



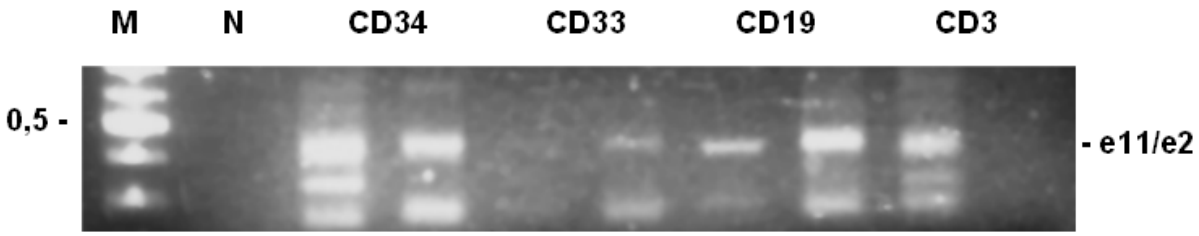
Dieses Gel zeigt die Banden zweier CD34^{+}-Subfraktionen, aus zwei verschiedenen PCRs, bei denen sowohl die primäre als auch die *semi-nested*-PCR wiederholt wurden. In der Probe CD34.1 konnten die PTD e9/e3 und e11/e3 gefunden werden, wohin gegen die Probe CD34.2 zweimal negativ war.
Die Größe der Bahnmarker ist in Kilobasen angegeben. M (kennzeichnet die Markerbande; N ist die Negativkontrolle (Wasser); P ist die Positivkontrolle (MLL-positive AML).

3.9 Genomische PCR in NSB-Subfraktionen

Auch bei den vier untersuchten Subfraktionen wurde eine genomische PCR der Gesamtfraktionen unter den gleichen Bedingungen (mit den o.g. Primern wie bei der RT-PCR) durchgeführt. Es wurden ca. 100 ng genomischer DNA eingesetzt und für 35 Zyklen amplifiziert. Aus diesem Aliquot wurde ebenfalls ein Mikroliter in eine *semi-nested*-RT-PCR ein-gesetzt und für 35 Zyklen amplifiziert.
Es zeigte sich, dass MLL-PTD ebenfalls in allen vier Subfraktionen vorhanden waren. Dies wird in den Abbildungen 6 (s. Seite 34) und 10 (s. unten) veranschaulicht und in Tabelle 3 (s. Seite 38) aufgezeigt.
Von der CD34^{+}-Subfraktion waren zwei von zwei Proben positiv. Von der CD33^{+}-Subfraktion war eine von zwei Proben positiv. Von der CD19^{+}-Subfraktion waren zwei von zwei Proben positiv und von der CD3^{+}-Subfraktion eine Probe.

Dies zeigt, dass MLL-PTD auch im genomischen Level der vier untersuchten Subfraktionen vorkommen.
Somit sind die Duplikationen schon auf dem DNA-Ebene vorhanden und entstehen nicht erst auf dem Level der Transkription.

Abbildung 10:
Genomische PCR der Subfraktionen der Zellen aus Nabelschnurblut



Dieses Gel zeigt eine genomische PCR der Subfraktionen $CD34^+$, $CD33^+$, $CD19^+$ und $CD3^+$. Die PTD e11/e2 ist markiert. Die Größe der Bahnmarker ist in Kilobasen angegeben. M kennzeichnet die Markerbande; N ist die Negativkontrolle (Wasser).

Tabelle 2:
MLL-PTD in den mononukleären Zellen der NSB-Gesamtpopulationen

Gesamtpopulationen			
Probenzahl (positiv/total)	% positiv	RT-PCR n (positiv/total)	Genomische PCR n (positiv/total)
56/60	93%	41/45	15/15

Gesamtpopulationen der mononukleären Zellen wurden aus Nabelschnurblut isoliert und mittels PCR auf das Vorliegen von MLL-PTD untersucht. In der vorliegenden Tabelle wird der Anteil MLL-PTD-positiver Proben auf RNA und DNA-Ebene aufgezeigt.

Tabelle 3:

MLL-PTD in den NSB-Subfraktionen

Subfraktionen				
	Probenzahl (positiv/total)	% positiv	RT-PCR n (positiv/total)	Genomische PCR n (positiv/total)
$CD34^+$	4/6	67%	2/4	2/2
$CD33^+$	4/7	57%	3/5	1/2
$CD19^+$	3/5	60%	1/3	2/2
$CD3^+$	2/6	33%	1/4	1/2

Die o.g. Subfraktionen wurden isoliert und mittels PCR auf das Vorliegen von MLL-PTD untersucht. In der vorliegenden Tabelle werden die einzelnen Subgruppen und der prozentuale Anteil der MLL-PTD-positiven Proben aufgezeigt.

3.10 Höhe der Transkriptionsrate der MLL-PTD bei AML-Proben und NSB-Proben

Um die Transkriptionsrate der MLL-PTD näher zu beschreiben, wurden *eine Real-Time*-quantitative-PCR von 8 MLL-PTD-positiven NSB-Proben und von vier MLL-PTD-positiven AML-Proben durchgeführt, die keine anderen genetischen Aberrationen zeigten. Bei der *Real-Time*-quantitativen-PCR wird am Ende eines Durchlaufs anhand der Fluoreszenzsignale eine quantitative Messung der Menge des PCR-Produkts durchgeführt. Hier zeigte sich, dass die MLL-PTD-Transkriptionsrate bei den AML-Proben wesentlich höher war als in den Nabelschnurblutproben gesunder Neugeborener. Die Höhe der Transkriptionsrate im NSB ist damit mit der Höhe der Transkriptionsrate im Blut und Knochenmark gesunder Erwachsener vergleichbar. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 (s. Seite 39) abgebildet.

Tabelle 4:

MLL-PTD-Transkriptionsraten in mononukleären Zellen MLL-PTD positiver AML- und NSB-Proben

Mononukleäre Zellen MLL-PTD-positiver AML		MLL-PTD-positive mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblutproben	
Probe	Normalized Ratio	Probe	Normalized Ratio
1	112,32	1	0,07
2	134,78	2	0,02
3	60,47	3	0,02
4	455,99	4	0,06
		5	0,04
		6	0,05
		7	0,04
		8	0,07
MW	190,89		0,05
SD	179,45		0,02

Die MLL-PTD-Transkriptionen in den mononukleären Zellen und die in PTD-positiver AML wurden mittels RT-PCR amplifiziert und verglichen. MW bezeichnet den Mittelwert. SD bezeichnet die Standardabweichung.

4. Diskussion

Auf dem Gebiet der akuten myeloischen Leukämie (AML) wurden in den vergangenen Jahrzehnten viele neue und bedeutende Erkenntnisse gewonnen. Trotzdem sind viele Fragen, die vor allem die Entstehung der AML betreffen, offen geblieben. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit partiellen Tandemduplikationen des *mixed-lineage-leukemia*-Gens (MLL-PTD), deren Vorkommen bei gesunden Individuen, insbesondere gesunden Neugeborenen, und deren Bedeutung bei der Entstehung einer AML.

Die AML ist die Erkrankung mit der geringsten Überlebensrate aller Leukämien. Sie macht in etwa 80 bis 90% aller akuten Leukämien im Erwachsenen- und etwa 15 bis 20% im Kindesalter aus. Insgesamt ist die AML aber, da das Durchschnittsalter bei Erkrankung 67 Jahre beträgt, eher eine Erkrankung des älteren Menschen. Männer sind mit 4,4 Neuerkrankungen auf 100.000 Personen häufiger betroffen als Frauen mit einer Inzidenz von 2,8 Erkrankungen auf 100.000 (Bhatia et al. 1995).

Als Ursache für eine akute myeloische Leukämie sind verschiedene Mutationen in der Hämatopoese bekannt. Die AML kann ohne eine erkennbare Ursache wie z.B. eine assoziierte Vorerkrankung (de-novo AML), auf Grund einer bereits bestehenden Störung der Hämatopoese, sowie nach einer vorhergegangenen Chemotherapie (sekundäre oder t-AML) entstehen.

Eine AML entsteht aus einer malignen Veränderung in der Regel im Stadium der myeloiden Stammzellen. Ein besonders häufiger Grund für eine maligne Transformation sind Mutationen in Genen, die das zelluläre Wachstum und die Differenzierung steuern. Diese einzeln oder kombiniert auftretenden Mutationen führen zu unkontrolliertem Wachstum und gestörter Differenzierung und letztlich zur klonalen Vermehrung unreifer myeloischer Zellen.

Die AML wird initial durch den Nachweis von unreifen leukämischen Zellen im Blut bzw. dem Knochenmark nachgewiesen. Klassifiziert wurde die AML nach dem System der *French-American-British*-Klassifikation (FAB). Diese sind durch die feineren Kriterien der WHO abgelöst worden, auch wenn sie teils ergänzend zu diesen weiter genutzt werden (Harris et al. 2000; Vardiman et al. 2002). In dieser wurden im Gegensatz zur FAB-Klassifikation auch zytogenetische und molekulargenetische Faktoren zur Einteilung benutzt. Die Einteilung wird nach immunologischen und

morphologischen Kriterien vorgenommen, welche die AML je nach Karyo- oder Genotyp und/oder Ätiologie zuordnet und die Diagnosestellung ergänzt.
Die zunehmende Zahl der neuen Erkenntnisse führt dazu, dass die rein morphologische Klassifikation weniger angewandt wird, auch wenn der wichtigste Schritt in der Primärdiagnostik immer noch die lichtmikroskopische Untersuchung des Blutausstrichs ist.
Die Diagnosestellung und Einteilung in einen Typ sind maßgeblich für den Therapieentscheid. Trotz umfassender Bemühungen können aber ca. 20% der AML nicht sicher typisiert werden.
Der Begriff der *mixed-lineage-leukemia* (MLL) wurde vor mehr als 30 Jahren geprägt (Mirro et al. 1985; Mirro et al. 1986). Damals wurde beobachtet, dass gewisse Untergruppen an einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) oder AML erkrankter Patienten eine signifikant kürze Lebensdauer hatten. Mit Hilfe von FACS-Analysen wurde festgestellt, dass die besonders aggressiven Leukämien Oberflächenmarker exprimierten, welche sowohl bei der ALL als auch bei der AML auftraten. Es wurde sogar beobachtet, dass es während der Behandlung einer ALL zu einem kompletten Linienwechsel hin zu einer AML kam (Stass et al. 1984). In der WHO-Klassifikation findet sich auch eine akute Leukämie, die weder eindeutig der lymphatischen noch der myeloischen Linie zugewiesen werden kann und als „bilineäre und biphänotypische akute Leukämie“ bezeichnet wird (Harris et al. 2000; Vardiman et al. 2002). Das MLL-Gen ist ein Regulator der HOX-Genexpression und besitzt darüber hinaus eine Histonmethyltransferaseaktivität. Es spielt sowohl eine wichtige Rolle für die in der Leber stattfindende Hämatopoese, als auch für die Bildung hämatopoetischer Stammzellen (Dorshkind und Witte 2004; Ernst et al. 2004). Es ist auf dem langen Arm des Chromosoms 11 (11q23) lokalisiert und in einer Vielzahl von chromosomalen und reziproken Translokationen und Duplikationen involviert.
Diese korrelieren mit den Phänotypen akuter myeloischer, lymphatischer oder gemischter Leukämien sowie mit dem myelodysplastischem Syndrom (Ziemin-van der Poel et al. 1991; Rowley 1993; Harrison et al. 1998; Schnittger et al. 1998; So and Cleary 2004).
Nur ein Teil dieser genetischen Veränderungen konnte bis jetzt komplett molekular entschlüsselt werden (Meyer et al. 2006). Veränderungen dieses Gens finden sich neben der akuten myeloischen Leukämie auch bei der akuten lymphatischen Leukämie vor allem bei Kindern.

Jude et al. (2007) konnten nachweisen, dass das MLL-Gen in der Hämatopoese adulter Stammzellen und Progenitoren eine entscheidende Rolle spielt. In einem Mäusemodell bewiesen sie, dass nach einem *knock-out* des MLL-Gens alle Versuchstiere innerhalb von drei Wochen starben.

Das MLL-Gen ist weiterhin mit für die Differenzierung der Zellen in der Hämatopoese verantwortlich. Ernst et al. (2004) konnten zeigen, dass sich Vorläuferzellen beim Fehlen des MLL-Gens in vitro nicht weiter in B-Lymphozyten differenzieren konnten.

Wie bereits gesagt ist es sehr wichtig eine genaue Typisierung der AML vorzunehmen, auch wenn sich dies trotz aller neuen Erkenntnisse weiterhin schwierig gestaltet. Rubnitz et al. (2009) berichten zusammenfassend über ihre Erfahrungen der letzten 20 Jahre bei der Behandlung 35 pädiatrischer Patienten mit einer *mixed-lineage-leukemia*. Die Vorhersage, ob die Behandlung mit einer Therapie nach ALL-Schema oder AML-Schema begonnen werden sollte, konnte aufgrund der schwierigen Zuordnung und Klassifizierung oft nur schlecht abgeschätzt werden, so dass teils ein Wechsel des Behandlungsschemas notwendig wurde.

Ein molekularer Marker zur Klassifizierung der AML ist die partielle Tandemduplikation des *mixed-lineage-leukemia*-Gens (Dorshkind und Witte 2004; Ernst et al. 2004). MLL-PTD sind auch im Knochenmark und im peripherem Blut von gesunden Erwachsenen nachweisbar (Marcucci et al. 1998; Schnittger et al. 1998). MLL-PTD können, wie auch andere Leukämie assoziierte Aberrationen (z.B. die Translokationen t(8;21), AML1/ETO sowie t(9;22), bcr-abl), bei gesunden Individuen auftreten (Bäsecke et al. 2002a, Bäsecke et al. 2002b).

Sie bestehen aus einer *in-frame*-Wiederholung von MLL-Exons in einer 5´-3´-Richtung (Schichmann et al. 1994). Durch die Duplikationen von großen Teilstücken mehrerer 100 Kilobasenpaaren kommt es zu aberranten Fusionen. Diese bestehen aus Exons des MLL-Gens die zu einer translatierbaren messanger-RNA führen. Es sind viele PTD bei der AML nachweisbar, von denen aber nur wenige wie z. B. e9/e3, e10/e3 und e11/e3 einen hohen Transkriptionslevel erreichen (Steudel et al. 2003).

Array-Analysen weisen darauf hin, dass MLL-Exon-Duplikationen einen starken Einfluss auf bestimmte Mechanismen der Leukämogenese haben (Ross et al. 2004) und in vitro ein starkes Transaktivationspotential besitzen (Martin et al. 2003).

Whitman et al. (2001) bewiesen, dass das Fehlen des MLL-Wildtyp mit einer schlechteren Prognose einhergeht. Whitmann et al. (2005) demonstrierten auch,

dass die zugrunde liegende Ursache die Suppression der MLL-Wildtyp-Aktivität durch die MLL-PTD ist. Konsequenterweise kann durch die Rekonstitution der MLL-wildtyp-Aktivität das leukämische Wachstum unterdrückt und die Apoptose gefördert werden. Das wildtyp-MLL-Gen ist daher für die gesunde Hämatopoese essentiell.

MLL-PTD wurden erstmalig 1994 bei einer neu aufgetretenen AML mit normalem Karyotyp nachgewiesen (Schichmann et al. 1994). Sie treten bei ca. 6 bis 11% der AML-Patienten mit normalem Karyotyp auf (Caligiuri et al. 1998; Schnittger et al. 2000; Döhner et al. 2002).

Es gibt mehrere Studien, die eine Aussage über die prognostische Relevanz von MLL-PTD positiven AMLs erlauben. Caligiuri et al. (1998) untersuchten 98 Patienten, die einen normalen Karyotyp hatten und an einer neu aufgetretenen AML erkrankt waren, auf MLL-PTD mittels *Southern-Blot*-Analyse und PCR und stellten fest, dass 11 (11%) von 98 Patienten eine MLL-PTD aufwiesen. Diese Patienten wurden mit anderen Patienten verglichen, welche diese genetische Aberration nicht hatten. Als Maßstab dienten hierbei Alter, Geschlecht, FAB-Subtyp, WBC und die Anzahl an Blastenschüben. Alle diese Kriterien unterschieden sich nicht wesentlich bei den verschiedenen Patienten. Ein wesentlicher Unterschied aber war, dass bei den Patienten die MLL-PTD-positiv waren die Dauer der erreichten kompletten Remission signifikant kürzer war (7,1 Monate), als die bei der Kontrollgruppe (23,2 Monate). Diese Resultate konnten auch von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt werden (Schnittger et al. 2000; Döhner et al. 2002; Shiah et al. 2002).

In einer anderen Studie, bei der acht Patienten mit Trisomie 21 und 387 unselektierte Patienten untersucht wurden, die an einer neu aufgetretenen AML litten, zeigte sich ebenfalls, dass das gehäufte Auftreten von partiellen Tandemduplikationen des *mixed-lineage-leukemia*-Gens mit einer schlechteren Prognose einherging (Schnittger et al. 2000).

In 6,4% aller Fälle (63/988) konnten in einer weiteren Studie MLL-PTD bei AMLs gefunden werden. Hierbei konnte wieder gezeigt werden, dass diese Aberrationen, wie oben erwähnt, vor allem im höheren Lebensalter auftreten. Bei Kindern trat diese Aberration mit 0,8% auf, bei Erwachsenen in 7,2% der Fälle (Shih et al. 2005).

Diese Ergebnisse konnten ebenfalls von Bacher et al. (2005) bestätigt werden. Hier erfolgte auch eine Korrelation des Auftretens der MLL-PTD mit dem Alter. Es fand sich ein 18fach höheres Auftreten in der Gruppe der ältesten untersuchten Patienten (61 bis 70 Jahre) im Vergleich zur Gruppe der jüngsten Patienten (21 bis 30 Jahre).

Obwohl also zumeist ein Auftreten bei älteren Patienten beobachtet wird, ist vor allem auch bei Kindern der Nachweis von MLL-PTD mit einer signifikant kürzeren Überlebensdauer assoziiert. Bei fehlendem Auftreten von MLL-PTD ist die 5-Jahres-Überlebensrate fast 90%, bei Nachweis von MLL-PTD hingegen nur knapp 40% (Kosaka et al. 2004; Pui et al. 2004; Hilden et al. 2006; Tomizawa et al. 2007).
Ross et al. (2004) untersuchten 130 pädiatrische Patienten und 20 erwachsene Patienten mit AML. Hier zeigte sich wiederum die Unfähigkeit immer eine präzise Typisierung vorzunehmen und eine Korrelation dieser AMLs mit anderen MLL-PTD-positiven-AMLs mit solchen Aberrationen herzustellen. Diese Resultate bekräftigten erneut die Wichtigkeit der genauen Typisierung einer AML. Die bis jetzt erhobenen Daten, welche auf die prognostische Relevanz eingehen, zeigen also, dass der Nachweis von MLL-PTD bei einer AML mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. MLL-PTD konnten bisher auch nicht in AMLs mit prognostisch günstigen Translokationen wie t(15;17), PML/RARalpha t(8;21) und AML1/ETO nachgewiesen werden (Schnittger et al. 2000).
MLL-PTD werden, wie auch andere mit AML assoziierte genetische Aberrationen, bei gesunden Personen gefunden (Schnittger et al. 1998). Diese Diskrepanz bedeutet, dass die Existenz einer Leukämie-assoziierten genetischen Aberration als solche noch nicht ausreichend leukämogen ist, sondern weitere Faktoren wie beispielsweise die Transkriptionsrate und die betroffene hämatopoetische Subfraktion eine Rolle spielen. Auch könnte dies bedeuten, dass einige PTD mehr leukämogen sind als andere und bisher nicht bekannte strukturelle Unterschiede dafür verantwortlich sein könnten.

Vor dem Hintergrund, dass einerseits die pathogenetische Relevanz der partiellen Tandemduplikationen des *mixed-lineage-leukemia*-Gens noch nicht vollständig geklärt ist und andererseits eine klinische Diskrepanz hinsichtlich der Verschlechterung der Prognose bei MLL-PTD positiven AML und dem Auftreten von MLL-PTD bei gesunden Adulten besteht, sollte das Auftreten von MLL-PTD im Nabelschnurblut gesunder Neugeborener untersucht werden. Hierzu sollte das Vorliegen von MLL-PTD in Gesamtfraktionen der mononukleären Zellen und in den oben genannten Subgruppen auf RNA und auf genomischer Basis untersucht und quantifiziert werden, um zu klären, in welchem Lebensalter und in welchen hämatopoetischen Subfraktionen die MLL-PTD auftreten. Der Nachweis auf genomischer Basis sollte durchgeführt werden, um Transkriptionsartefakte auszuschließen das heißt, zu

zeigen, dass MLL-PTD nicht erst auf dem Level der Transkription entstehen. Hierzu wurden aus Nabelschnurblutproben mittels Ficoll die mononukleären Zellen gewonnen. Nach Isolierung der RNA aus diesen, wurde die RNA dann weiter mittels reverser Transkription zu c-DNA transkribiert. Der Nachweis von MLL-PTD erfolgte mit einer konventionellen RT-PCR. Zur Quantifizierung der Transkriptionshöhe der MLL-PTD verwendeten wir eine *Real-Time*-quantitative-PCR.

Der Großteil der Proben aus NSB-Gesamtpopulationen (56 von 60 Proben) war wie erwartet erst in der *semi-nested*-RT-PCR MLL-PTD-positiv, was einer Quote von 93% entspricht. Das Auftreten der MLL-PTD mit einer Häufigkeit von fast 100% aller NSB-Proben ist mit dem vergleichbar, was in der Hämatopoese gesunder Erwachsener gefunden wurde. In fast jeder positiven Probe fanden sich drei oder mehrere MLL-PTD. Außerdem fanden sich hier auch Exonfusionen, welche charakteristischerweise bei MLL-PTD-positiven AML auftreten. Diese Beobachtungen konnten auch schon bei Untersuchungen, welche MLL-PTD im peripheren Blut und Knochenmark bei gesunden Erwachsenen untersuchten, festgestellt werden (Schnittger et al.1998). Bei der genomischen PCR zeigte sich, dass in allen Proben (15/15) MLL-PTD vorhanden waren. Dies wiederum beweist, dass MLL-PTD auch auf dem genomischen Level vorhanden sind und nicht erst auf dem Level der Transkription entstehen bzw. *Splicing*-Artefakte sind.

Für die akute myeloische Leukämie ist das Auftreten von genetischen Aberrationen in der Subfraktion der hämatopoetischen Stammzelle als von besonderer Bedeutung diskutiert (Hope et al. 2004). Es gibt Hinweise, dass die leukämische Transformation in diesen genetisch aberranten Stammzellen stattfindet. Weiterhin können leukämisch transformierte Stammzellen Chemotherapien widerstehen und zu Rezidiven führen. Die Theorie der Krebsstammzellen wurde erstmals von Bonnet und Dick (1997) beschrieben, ist aber auch kritisch hinterfragt worden (Yoo und Hatfield 2008). Um zu klären, ob MLL-PTD auch bei Gesunden in hämatopoetischen Stammzellen und anderen linienspezifischen Fraktionen nachweisbar sind, untersuchten wir das Vorkommen von MLL-PTD in den Subfraktionen aus Nabelschnurblut. Die Proben wurden nach entsprechender Aufreinigung durch eine Leukozytensubfraktionsisolierung mittels MACS isoliert. Hierbei wurden die Leukozytensubfraktionen mit den Markern $CD34^+$ (Hämatopoetische Progenitorzellen), $CD33^+$ (Myeloische Zellen), $CD19^+$ (B-lymphatische Zellen), und $CD3^+$ (T-lymphatische Zellen) isoliert. In der $CD34^+$-Subfraktion waren zwei von vier Proben positiv. In der

$CD33^+$-Subfraktion waren drei von fünf Proben positiv. Von der $CD19^+$-Subfraktion war eine von drei Proben positiv und von der $CD3^+$-Subfraktion eine von vier Proben positiv. Somit fanden wir MLL-PTD in allen untersuchten Subfraktionen, inklusive der $CD34^+$-Stammzellfraktion.

In allen Subfraktionen wurde eine genomische PCR durchgeführt. Auch hier konnten die MLL-PTD auf genomischer Ebene nachgewiesen werden. Von der $CD34^+$-Subfraktion waren zwei von zwei Proben positiv. Von der $CD33^+$-Subfraktion war eine von drei Proben positiv. Von der $CD19^+$-Subfraktion waren zwei von zwei Proben positiv und von der $CD3^+$-Subfraktion eine von zwei Proben positiv.

Das MLL-PTD-Muster konnte bei repetitiven PCRs unterschiedlich ausfallen. Dies ist wahrscheinlich auf stochastische Effekte während der Primeranbindung und der Amplifizierung zurückzuführen, da mehr als eine MLL-PTD-Zielsequenz besteht.

Dass es sich hierbei um so genannte *Splicing*-Artefakte handelte, wurde mit der Durchführung der genomischen MLL-PTD-PCR ausgeschlossen. Die von uns gefundene Anzahl von MLL-PTD in den Subfraktionen war wesentlich geringer als die in den Gesamtproben mononukleärer Zellen. Dies weist daraufhin, dass je homogener eine Zellpopulation ist, desto weniger MLL-PTD werden transkribiert.

Die von uns gefundenen Ergebnisse zeigen somit, dass die MLL-PTD vermutlich vom Zeitpunkt der Geburt an vorhanden sind und möglicherweise während der fetalen Entwicklung entstehen oder vererbt sind und nicht erst im Verlauf des Lebens auftreten. Dies bedeutet zunächst, dass die lebenslange Exposition gegenüber MLL-PTD keine wesentliche leukämogenetische Bedeutung hat. Auch die Tatsache, dass MLL-PTD bei gesunden Neugeborenen in Subfraktionen auftreten, die sensibel für eine leukämische Transformation sind, weist darauf hin, dass das leukämische Potential der MLL-PTD als gering anzusehen ist.

Auch wenn wir den Ursprung der MLL-PTD Subfraktion nicht weiter zurückverfolgen konnten, beispielsweise zu den multipotenten Stammzellen, weist die Existenz von MLL-PTD in einer proliferierenden und zur Differenzierung fähigen Subfraktion darauf hin, dass PTD bei gesunden Individuen von Stammzellen abstammen könnten und nicht spontan in Zellen entstehen, welche sich bereits in den linienspezifischen, weiter differenzierteren Subfraktionen befinden. Ähnlich Befunde sind auch für das AML-assoziierte Fusionsgen AML1/Eto bekannt, welches ebenfalls bei nicht-leukämischen Progenitoren nachgewiesen werden kann (Schnittger et al. 1998, Bäsecke et al. 2002 a/b, Weisser et al. 2005).

Hinsichtlich der Quantität der MLL-PTD-Transkription unterscheiden sich MLL-PTD-positive AMLs von gesunden MLL-PTD positiven Adulten dadurch, dass bei den AML MLL-PTD aufgrund der höheren Transkriptionsrate in der Regel in der primären PCR gefunden werden (Schnittger et al. 2000).

Um die Transkriptionsrate der MLL-PTD näher zu beschreiben, wurden eine *Real-Time*-quantitative-PCR von acht MLL-PTD-positiven NSB-Proben und von vier MLL-PTD-positiven AML-Proben durchgeführt. Die Transkriptionsrate der MLL-PTD in den NSB-Proben war um vier log-Stufen geringer als bei MLL-PTD-positiven AMLs und damit mit der Transkriptionsrate von MLL-PTD bei gesunden Erwachsenen vergleichbar (Weisser et al. 2005). Wie in Blutproben von Patienten mit AML gezeigt wurde, scheint eine hohe MLL-PTD Transkriptionsrate das MLL-Wildtypgen zu supprimieren (Whitmann et al. 2005).

Eine geringere Transkription des MLL-Wildtypgens, welches Einfluss auf die Entwicklung von Stammzellen und die Hämatopoese zu nehmen scheint, spielt auch eine Rolle in der Entstehung der AML. Dies konnte aufgrund des ausgeprägten Transaktivationspotentials der MLL-PTD in vitro gezeigt werden (Martin et al. 2003) und mag daher ein entscheidender Faktor in dem Mechanismus sein, welcher zu einer malignen Transformation in der Hämatopoese führt.

Als Schlussfolgerung kann angenommen werden, dass die lebenslange Exposition des hämatopoetischen Systems gegenüber MLL-PTD, welche auch in den Subfraktionen der Stammzellen nachgewiesen wurden, keine Schlüsseldeterminante für die Entstehung einer AML ist. Werden sie aber auf einem hohen Level transkribiert, können sie, wie in Experimenten mit Mäusen gezeigt wurde, proleukämische Veränderungen bewirken (Dorrance et al. 2006). MLL-PTD scheinen also von Anfang an nur ein gering vorhandenes leukämisches Potential zu haben. Ihre Rolle in der Leukämogenese scheint von der Höhe der Transkriptionsrate und/oder anderen Veränderungen abzuhängen. Dies könnte darauf hinweisen, dass entweder PTD-positive Zellen in der normalen Hämatopoese weniger oft auftreten als in Zellen bei der AML, aber gleich hohe Transkriptionslevel haben. Auf der anderen Seite könnte es auch bedeuten, dass der Transkriptionslevel in Blasten höher ist. Dies könnte mit zusätzlichen Aberrationen in leukämischen Zellen zusammenhängen.

Hier findet sich auch ein weiterer Ansatz zur Verwendung des Nachweises von MLL-PTD. Obwohl diese wie gezeigt wurde in gesunden Individuen vorhanden sind, könnte ihr Nachweis und die Höhe des Transkriptionslevels zum Screening auf ein

Rezidiv bzw. dem Nachweis einer „minimal residual disease“ benutzt werden, wie Weiser et al. (2005) bewiesen. Das Tumorsuppressorgen WT 1, das bei einer AML überexprimiert wird, wird in dieser Form verwendet (Ogawa et al. 2003; Lapillone et al. 2006). Auch das BAALC-Gen (*Brain and acute leukemia cytoplamatic*-Gen) wird in dieser Form als molekularer Verlaufsmarker bei bestimmten Formen der AML genutzt (Tanner et al. 2003; Baldus et al. 2006).

Um die Funktion zu untersuchen, welche die MLL-PTD in der Leukämogenese haben, werden In-vivo-Untersuchungen hilfreich sein.

5. Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie ist eine seltene Erkrankung, welche überwiegend im höheren Lebensalter, aber auch nach Exposition gegenüber einer hohen Dosis ionisierender Strahlung oder gegenüber bestimmten Zytostatika, welche in der Behandlung anderer primär maligner Erkrankungen eingesetzt werden, auftritt. AMLs sind mit dem Auftreten genetischer Aberrationen assoziiert. Wie auch andere genetische Veränderungen, welche mit AMLs assoziiert sind, treten diese Veränderungen auch bei gesunden Individuen auf.

AML, welche eine MLL-PTD aufweisen, haben eine schlechtere Prognose. Um die Bedeutung der MLL-PTD in der Leukämogenese zu erklären, untersuchten wir Nabelschnurblutproben von gesunden Individuen. Hierzu wählten wir die Methode der Reversen-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion, um den Nachweis von MLL-PTD zu erbringen. In 56 von 60 Proben (93%) fanden wir MLL-PTD. Die Subgruppen der $CD34^+$-Stammzellen, der $CD33^+$-myeloiden, der $CD19^+$-B-lymphoiden und der $CD3^+$-T-lymphoiden Zellen waren ebenfalls positiv. Dass es sich hierbei um so genannte „Splicing-Artefakte“ handelte, wurde durch die Durchführung einer genomischen MLL-PTD-PCR ausgeschlossen. Hier konnte auch gezeigt werden, dass die MLL-PTD schon auf DNA-Ebene besteht. Das MLL-PTD-Muster konnte bei repetitiven PCRs unterschiedlich ausfallen. Um die Transkriptionsrate der MLL-PTD näher zu beschreiben, wählten wir das Mittel der *Real-Time*-quantitativen-PCR und führten diese bei MLL-PTD-positiven NSB-Proben und MLL-PTD-positiven AML-Proben durch. Im Gegensatz zur AML war die Transkriptionshöhe vier log-Stufen geringer in den NSB-Proben und damit mit der Transkriptionsrate von MLL-PTD bei gesunden Erwachsenen vergleichbar. Die allgegenwärtige Präsenz von MLL-PTD in den Nabelschnurblutproben weist daraufhin, dass die MLL-PTD lebenslang vorhanden sind und nicht erst während der Lebenszeit auftreten und akkumulieren. Sie kommen ebenfalls in hämatopoetischen Stammzellen vor. Die lebenslange Präsenz und das Vorkommen in hämatopoetischen Vorläuferzellen scheinen keine ausschlaggebenden Faktoren bei der leukämogenetischen Bedeutung der MLL-PTD zu sein.

6. Literaturverzeichnis

Abbas AK, Lichtmann AH, Pillai S: Cellular and Molecular Immunology (6th Ed.), Editor: Saunders, Elsevier Health Sciences, Philadelphia (2007), 237-52.

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

Bäsecke J, Feuring-Buske M, Brittinger G, Schaefer UW, Hiddemann W, Griesinger F (2002b): Transcription of AML1 in heamatopoetic subfractions of normal daults. Ann Hematol 81 (5), 254-257.

Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS, Whitmann SP, Archer KJ, Marcucci G, Caligiuri MA, Carroll AJ, Vardimann JW, Bloomfield CD et al. (2003): BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal caryotype: a Cancer and leukemia Group B study. Blood 102, 1613-1618.

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

Bhatia S, Neglia JP (1995): Epidemiology of childhood acute myelogenous leukemia. J Pediatr Hematol Oncol 17 (2), 94–100.

Biernaux C, Sels A, Huez G, Stryckmans P (1996): Very low level of major BCR-ABL expression in blood of some healthy individuals. Bone Marrow Transplant 17 (3), 45-47.

Blackburn P, Moore S (1982): Pancreatic ribonuclease. In: P.D. Boyer (Hrsg.):
The Enzymes. Verlag Academic press, New York, S. 317-433.

Bloomfield CD, de la Chapelle A (1987): Chromosome abnormalities in acute nonlymphatic leukemia: Clinical and biological significance. Semin Oncol 14, 372-378.

Bloomfield CD, Secker-Walker LM, Goldmann AI, Van den Berghe H, de la Chapelle T, Ruutu T, Alimena G, Garson OM, Golomb M, Mitelmann F et al. (1989): Six-year follow-up of the clinical significance of karyotyp in acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genet Cytogenet 40, 171-185.

Bonnet D, Dick JE (1997): Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med 3 (7), 730-7.

Bose S, Deininger M, Gora-Tybor J, Goldman JM, Melo JV (1998): The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. Blood 92, 3362-3367.

Bradbury LE, Kansas GS, Levy S, Evans RL, Tedder TF (1992): The CD19/CD21 signal transducing complex of human B lymphocytes includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules. J. Immunol. 149 (9), 2841–50.

Caligiuri MA, Strout MP, Lawrence D, Arthur DC, Baer MR, Yu F, Knuutila S, Mrozek K, Oberkircher AR, Bloomfield CD et al. (1998): Rearrangement of ALL1 (MLL) in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. Cancer Res 58, 55-59.

Confer DL (1997): Unrelated marrow donor registries. Current Opinion in Hematology 4, 408-412.

Dash A, Gilliland DG (2001): "Molecular genetics of acute myeloid leukaemia"
Best Pract Res Clin Haematol 14, 49-64.

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

de Wynter EA, Ryder D, Lanza F, Nadali G, Johnsen H, Denning-Kendall P, Thing-Mortensen B, Silvestri F, Testa NG (1999): Multicentre European study comparing selection techniques for the isolation of CD34 cells. Bone Marrow Transplant 23, 1191-1196.

Dörr I, Miltenyi S, Salamini F, Uhrig H (1994): Selecting Somatic Hybrid Plants Using Magnetic Protoplast Sorting. BIO/TECHNOLOGY 12, 511-515.

Döhner K, Tobis K, Ulrich R, Frohling S, Benner A, Schlenk RF, Döhner H (2002): Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. J Clin Oncol 20, 3254-3261.

Dorrance AM, Liu S, Yuan W, Becknell B, Arnoczky KJ, Guimond M, Strout MP, Feng L, Nakamura T, Caligiuri MA et al. (2006): Mll partial tandem duplication induces aberrant hox expression in vivo via specific epignetic alterations. J Clin Invest 116 (10), 2707-16.

Dorshkind K, Witte O (2004): Got MLL? Definitive hematopoiesis requires MLL gene expression. Mol Cell 13, 765-766.

Ernst P, Fisher JK, Avery W, Wade S, Foy D, Korsmeyer SJ (2004): Definitive hematopoiesis requires the mixed-lineage leukemia gene. Dev Cell 6, 437-443.

Estey E, Döhner H (2006): Acute myeloid leukaemia, Lancet 368, 1894-1907.

Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA (2004): The molecular basis of leukemia. Hematology, Am Soc Hematol Educ Program, 80-97.

Grimwade D, Walker F, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hahn I, Steven RF, Burnett AK, Goldstone A (1998): The importance of diagnostic cytogenesis on outcome in AML: Analysis of 1,612 patients entered into MRC AML 10 trial. On behalf of the medical Research council Adult and Children's Working Party. Blood 92, 2322-2333.

Gökbuget N, Ganser A, Schlenk RF (2005): Akute Leukämien, Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie.

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD (1999): The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. J Clin Oncol 17 (12): 3835-49.

Harrison CJ, Cuneo A, Clark R, Johansson B, Lafage-Pochitaloff M, Mugneret F, Moorman AV, Secker-Walker LM (1998): Ten novel 11q23 chromosomal partner sites. European 11q23 Workshop participants. Leukemia 12, 811-822.

Hilden JM, Dinndorf PA, Meerbaum SO, Sather H, Villaluna D, Heerma NA (2006): Analysis of prognotic factors in infants: report on CCG 1953 from the Childrens Oncology Group. Blood 108, 5441-51.

Hope KJ, Jin L, Dick JE (2004): Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. Nat Immunol 5, 738-743.

Jude CD, Climer L, Xu D, Artinger E, Fishler JK, Ernst P (2007): Unique and independent roles for MLL in adult hematopoietic stem cells and progenitors. Cell Stem Cell 1 (3), 324-37.

Kosaka Y, Koh K, Kinuwaka N, Wakzono Y, Isoyamo K, Oda T (2004): Infant acute leukemia with MLL gene rearrangements: outcome folowing intensive chemotherapy and hematopoetic stem cell transplantation. Blood 104, 3527-34.

Lapillonne H, Renneville A, Auvrignon A, Flamant C, Blaise A, Perot C, Lai JL, Ballerini P, Mazingue F, Landman-Parker J et al. (2006): High WT1 expression after induction therapy predicts high risk of relapse and death in pediatric acute myeloid leukemia. J Clin Oncol 24 (10), 1507-15.

Lowenberg B (2001): Prognostic factors in acute myeloid leukaemia. Best Pract Res Clin Haematol 14, 65-75.

Marcucci G, Strout MP, Bloomfield CD, Caligiuri MA (1998): Detection of unique ALL1 (MLL) fusion transcripts in normal human bone marrow and blood: distinct origin of normal versus leukemic ALL1 fusion transcripts. Cancer Res 58, 790-793.

Martin ME, Milne TA, Bloyer S, Galoian K, Shen W, Gibbs D, Brock HW, Slany R, Hess JL (2003): Dimerization of MLL fusion proteins immortalizes hematopoetic cells. Cancer Cell 4, 197-207.

Meyer C, Schneider B, Jakob S, Strehl S, Attarbaschi, A, Schnittger S, Schoch C, Jansen MW, van Dongen JJ, Pieters R et al. (2006): The MLL recombinome of acute leukemia. Leukemia 20 (5), 777-784.

Mirro J, Zipf TF, Pui CH, Kitchingman G, Williams D, Melvin S (1985): Acute mixed lineage leukemia: clinicpathological correlations and prognostic significance. Blood 66, 1115-23.

Mirro J, Kitchingman GR, Williams DL, Lauzon GJ, Lin CC, Callihan T (1986): Clinical and laboratory characteristics of acute leukemia with the 4;11 translocation. Blood 67, 689-7.

Moehle R, Haas R, Hunstein W (1993): Expression of adhesion molecules and c-kit on $CD34^+$ hematopoetic progenitor cells: comparison of cytokine-mobilized blood stem cells with normal bone marrow and peripheral blood. J Hematother 2, 483-489.

Mrozek K, Heinonen K, Bloomfield CD (2001): Clinical importance of cytogenesis in acute myeloid leukemia. Semin Omcol 24, 17-31.

Mullis KB, Faloona FA (1987): Specific Synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155, 335-350.

National Cancer Institute.Acute myeloid leukemia.
http://www.seer.cancer.gov/statistics/

Ogawa H, Tamaki H, Ikegame K, Soma T, Kawakami M, Tsuboi A, Kim EH, Hosen N, Murakami M, Sugiyama H et al. (2003): The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. Blood 101 (5), 1698-704.

Pui CH, Sandlund JT, Pei D, Campana D, Rivera GK, Ribeiro RC (2004): Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: Results of Total Therapy Study XIIIIB at St. Jude Children`s Research Hospital. Blood 104, 2690-6.

Radbruch A, Mechtold B, Thiel A, Miltenyi S und Pfluger E (1994): High-gradient magnetic cell sorting. Methods Cell Biol 42, Pt B, 387-403.

Redaelli A, Lee JM, Stephens JM, Pashos CL (2003): Epidemiology and clinical burden of acute myeloid leukemia. Expert Rev Anticancer Ther 3, 695-710.

Ross ME, Mahfouz R, Onciu M, Liu HC, Zhou X, Song G, Shurtleff SA, Pounds S, Cheng C, Downing JR et al. (2004): Gene Expression Profiling of Pediatric Acute Myelogenous Leukemia. Blood 104, 3679-3687.

Rowley JD (1993): Rearrangements involving chromosome band 11Q23 in acute leukaemia. Semin Cancer Biol 4, 377-385.

Rubnitz JE, Onciu M, Pounds S, Shurtleff S, Cao X, Raimondi SC, Behm FG, Campana D, Razzouk BI, Pui CH et al. (2009): Acute mixed lineage leukemia in children: the experience of St. Jude Childern`s Research Hospital. Blood 113, 50833-89.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239, 487-491.

Schichman SA, Caligiuri MA, Strout MP, Carter SL, Gu Y, Canaani E, Bloomfield CD, Croce CM (1994): ALL-1 tandem duplication in acute myeloid leukemia with a normal karyotype involves homologous recombination between Alu elements. Cancer Res 54, 4277-4280.

Schmitz B, Radbruch A, Kummel T, Wickenhauser C, Korb H, Hansmann ML, Thiele J, Fischer R (1994): Magnetic activated cell sorting (MACS) - a new immunomagnetic method for megakaryocytic cell isolation: comparison of different separation techniques. European Journal of Hematology 52, 267-275.

Schnittger S, Wormann B, Hiddemann W, Griesinger F (1998): Partial tandem duplications of the MLL gene are detectable in peripheral blood and bone marrow of nearly all healthy donors. Blood 92, 1728-1734.

Schnittger S, Kinkelin U, Schoch C, Heinecke A, Haase D, Haferlach T, Buchner T, Wormann B, Hiddemann W, Griesinger F (2000): Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML. Leukemia 14, 796-804.

Servida F, Soligo D, Caneva L, Bertolini F, de Harven E, Campiglio S, Corsini C, Deliliers GL (1996): Functional and morphological characterization of immuno-magnetically selected $CD34^+$ hematopoietic progenitor cells. Stem Cells 14, 430-438.

Shiah HS, Kuo YY, Tang JL, Huang SY, Yao M, Tsay W, Chen YC, Wang CH, Shen MC, Tien HF et al. (2002): Clinical and biological implications of partial tandem duplication of the MLL gene in acute myeloid leukemia without chromosomal ab-normalities at 11q23. Leukemia 16, 196-202.

Shih LY, Liang DC, Fu JF, Wu JH, Wang PN, Lin TL, Dunn P, Kuo MC, Tang TC, Lin TH, Lai CL (2005): Characterization of acute myeloid leukemia patients with co-duplication of FLT3 and MLL. European Journal of Hematology 75, 182-192.

So CW, Cleary ML (2004): Dimerization: A versatile switch for oncogenesis. Blood 104, 919-922.

So CW, Ma ZG, Price CM, Dong S, Chen SJ, Gu LJ, So CK, Wiedemann LM, Chan LC (1997): MLL self fusion mediated by Alu repeat homologous recombination and prognosis of AML-M4/M5 subtypes. Cancer Res 57, 117-122.

Stass S, Mirro J, Melvn S, Pui CH, Murphy SB, Wiliams D (1984): Lineage switch in acute leukemia. Blood 64, 701-6.

Steudel C, Wermke M, Schaich M, Schakel U, Illmer T, Ehninger G, Thiede C (2003): Comparative analysis of MLL partial tandem duplication and FLT3 internal tandem duplication mutations in 956 adult patients with acute myeloid leukemia. Genes Chromosomes Cancer 37, 237-251.

Strout MP, Marcucci G, Bloomfield CD, Caligiuri MA (1998): The partial tandem duplication of ALL1 (MLL) is consistently generated by Alu-mediated homologous recombination in acute myeloid leukemia. Proc Natl Acad Sci USA 95, 2390-2395.

Tanner SM, Austin JL, Leone G, Rush LJ, Plass C, Heinonen K, Mrozek K, Sill H, Knuutila S, de la Chapelle A et al. (2001): BAALC, the human member of a novel mammalian neuroectoderm gene lineage, is implicated in hematopoiesis and acute leukemia. Proc Natl Acad Sci USA 98 (24), 13901-13906.

Terstappen LW, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR (1991): Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed $CD34^{+}$ /CD 38^{-}- progenitor cells. Blood 77, 1218-1227.

Tomizawa D, Koh K, Sato T, Kinukawa N, Morimoto A, Isoyama K (2007): Outcome of rick-based therapy for infant acute lymphoblastic leukemia with or without an MLL gene rearrangement, with emphasis on late effects: a final report of two consecutive studies, MLL96 and MLL98, of the Japan Infant Leukemia Study Group. Leukemia 21, 2258-63.

Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD (2002): The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. Blood 100, 2292-2302.

Weisser M, Kern W, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Schnittger S (2005): RT-PCR based monitoring of MLL-PTD expression levels enables risk assessment in AML patients with normal karyotypes. Haematologica 90, 881-889.

Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, Carroll AJ, Mrozek K, Vardiman JW, Caligiuri MA et al. (2001): Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a; cancer and leukemia group B study. Cancer Res 61, 7233-7239.

Whitman SP, Liu S, Vukosavljevic T, Rush LJ, Yu L, Liu C, Klisovic MI, Maharry K, Guimond M, Caligiuri MA et al. (2005): The MLL partial tandem duplication: evidence for recessive gain-of-function in acute myeloid leukemia identifies a novel patient subgroup for molecular-targeted therapy. Blood 106, 345-352.

Yoo MH, Hatfield DL (2008): The cancer stem cell theory: Is it correct? Mol Cells 26 (5), 514–516.

Yu M, Honoki K, Andersen J, Paietta E, Nam DK, Yunis JJ (1996): MLL tandem duplication and multiple splicing in adult acute myeloid leukemia with normal karyotype. Leukemia 10, 774-780.

Ziemin-van der Poel S, McCabe NR, Gill HJ, Espinosa R, Patel Y, Harden A, Rubinelli P, Smith SD, Le BeaumM, Rowley JD (1991): Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. Proc Natl Acad Sci USA 88, 10735-10739.

Danksagung

Dank für die Unterstützung zur Fertigstellung dieser Arbeit gilt als aller erstem meinem Betreuer und Doktorvater Herrn PD Dr. med. Jörg Bäsecke und Herrn Prof. Dr. med. F. Griesinger.

Dank gilt Frau Martina Podleschny, welche viel Zeit in meine Einarbeitung investierte und für jede Frage zur Verfügung stand.

Dank dem damaligen Team um Jörg Bäsecke und den Mitarbeitern der anderen Arbeitsgruppen, welche die Laborräume teilten, für eine angenehme Atmosphäre sorgten und erhellende Ratsschläge gaben.

Dank meiner Familie, Freunden und meiner Verlobten Nicole, welche diese Arbeit durchsahen und bei der Korrektur halfen.

Lebenslauf

Ich wurde am 03.07.1976 als erstes von vier Kindern des Chirurgen Prof. Dr. med. Manfred Clemens und seiner Frau Regina geb. van Megen in Münster/Westfalen geboren. Nach meiner Schulzeit, die ich 1996 mit der allgemeinen Hochschulreife am Gymnasium Carolinum in Osnabrück abschloss, leistete ich von 1996-1998 Zivildienst im Marienhospital Osnabrück.

Zum Wintersemester 1997 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Universität Göttingen auf. Im Mai 2001 konnte ich den vorklinischen Abschnitt abschließen. Das erste Staatsexamen absolvierte ich im April 2002 und das zweite Staatsexamen im April 2004. Anschließend begann ich mit dem Praktischen Jahr an der Universität Göttingen mit dem Wahlfach Anästhesie, sowie der Inneren Medizin in Castlebar (Ireland) und dem Fach Chirurgie in Port Elizabeth (Südafrika).

Das Studium der Humanmedizin beendete ich mit dem Bestehen des dritten Abschnitts der ärztlichen Prüfung im Mai 2005.

Vom Oktober 2005 bis Mai 2008 arbeitete ich als Assistenzarzt in der Abteilung für Kardiologie an der Universität Leipzig Herzzentrum GmbH unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Schuler sowie im Rahmen einer Rotation im Parkkrankenhaus Leipzig bei Herrn Prof. Dr. D. Scheinert.
Vom Juni 2008 bis Mai 2009 war ich am Kantonsspital St. Gallen unter der Leitung von Herrn Dr. D. Holtz in der Abteilung für Angiologie tätig.
Seit Juni 2009 bin ich am Universitätsspital Zürich in der Klinik für Angiologie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. B. Amann-Vesti beschäftigt.

Meine Verlobte Nicole Taebi und ich sind seit dem 24.01.2009 Eltern unserer Tochter Hannah Regina Petra Taebi.