

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

**Brüche am MLL-Gen durch apoptotische Vorgänge im
Zuge von Probenalterungen im Vergleich zu Brüchen
im MLL-Gen bei t-AML**

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

vorgelegt von
Kamran Karim
aus
Wuppertal

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med, F. Griesinger

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

INHALTVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 ABERRATIONEN DES MLL-GENS BEI AML	1
1.2 VORKOMMEN DER MLL-ABERRATION BEI DE-NOVO-AML UND T-AML	3
1.3 URSACHEN DES VORKOMMENS VON MLL-ABERRATIONEN BEI T-AML	4
1.4 ZIELSETZUNG	7
2. MATERIAL UND METHODEN	8
2.1 GEWINNUNG DER LEUKOZYTEN BEIM UNTERSUCHTEN PATIENTENKOLLEKTIV	8
2.1.1 Gewinnung des Untersuchungsmaterials	8
2.1.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus dem Untersuchungsbefund	8
2.2 ISOLIERUNG DER DNA AUS DER ZELLKONZENTRATION	9
2.3 PHOTOMETRISCHE MESSUNGEN	10
2.4. ENZYMATISCHE MODIFIKATION VON DNA	11
2.4.1. DNA-Restriktionverdau	11
2.4.2 DNA-Ligation	12
2.5 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	13
2.6 INVERSE GENOMISCHE POLYMERASEN-KETTENREAKTION (IPCR)	15
2.7 AGAROSEGEL-ELEKTROPHORESE	19
2.8 AUFREINIGUNG DES AMPLIFIKATIONSPRODUKTES	21
2.8.1 Überprüfung der Aufreinigung durch erneute Agarosegel- Elektrophorese	22
2.9 SEQUENZIERUNG NACH DER SANGER-METHODE	22
2.9.1 Reaktionsansatz für die zyklische Sequenzierung	23
2.9.2 Aufreinigung des Sequenzieransatzes	26
2.9.3 Ermittlung der Sequenz durch Kapillar-Elektrophorese	26
3. ERGEBNISSE	28
3.1 KONTROLLE DER INVERSEN PCR DES MLL-GENABSCHNITTS	28
3.2 PCR DER GESUNDEN UND MEGA-CHOEP-PROBEN	29
3.3 PERSONEN-ZEIT-VERLAUF	34
4. DISKUSSION	37
4.1. PROSPEKTIVER NACHWEIS VON MLL-BRÜCHEN	37
4.2. ABERRATIONEN BEI DER NEGATIVKONTROLLE	38

4.3 BRÜCHE IM MLL-GEN BEI APOPTOSE.....	39
4.4 NACHWEIS VON ABERRATIONEN IN PATIENTENPROBEN.....	40
4.5 KONSEQUENZEN	42
5. ZUSAMMENFASSUNG	45
6. LITERATURVERZEICHNIS	47

Abkürzungen

AML	Akute Myeloische Leukämie
AT	AT-Hook-Domäne
B	bromodomain
bcr-region	breakpoint cluster region
bp	Basenpaar(e)
CBP	CREB- <i>binding-protein</i>
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	desoxy-Cytosintriphosphat
dGTP	desoxy-Guanintriphosphat
ddNTP	didesoxy-Nukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
dTTP	desoxy-Thymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAB	French-American-British –Klassifikation
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
igPCR	inverse genomische Polymerase chain reaction
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MLL-Gen	<i>Mixed lineage leukemia</i> Gen
MLL-PTD	<i>Mixed lineage leukemia</i> partielle Tandem Duplikation
NHL	Non-Hodgkin-Lymphome
PBS	phosphat buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PHD	<i>plant homeodomain</i>
pREP4	Helferplasmid
RT	Raumtemperatur
SNL	nukleäres-Lokalisations-Signal
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAD	Transaktivitäts-Domäne
t-AML	Therapie-assoziierte Akute Myeloische Leukämie
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer

TNF- α

WHO

Tumornekrosefaktor α

World Health Organisation

1. Einleitung

1.1 Aberrationen des MLL-Gens bei AML

Die akute myeloische Leukämie (AML) stellt eine maligne Erkrankung der hämatopoetischen Zellen dar. Bei dieser Form der Leukämie ist der Anteil der myeloischen Blasten im Knochenmark auf mehr als 30 % (FAB-Klassifikation) bzw. mehr als 20 % (WHO-Definition) gestiegen. Die Klassifikation der AML wird nach Zellmorphologie und Zytochemie sowie Immunzytologie und Zytogenetik eingeteilt. Die French-American-British Cooperative Group unterteilt die AML 1985 aufgrund von morphologischen und zytogenetischen Kriterien in die FAB-Subtypen ein (Bennett et al. 1976).

Die AML tritt etwas häufiger beim männlichen Geschlecht auf und macht 80 % der Leukämien im Erwachsenenalter und 15-20 % der Leukämien im Kindesalter aus (Schaich et al. 2002). Die wahrscheinlich multifaktorielle Ätiologie ist unklar, obwohl einige prädisponierende Faktoren bestehen. Zu diesen zählen neben ionisierenden Strahlen, Chemikalien, hereditären Faktoren, bestimmten Viren und hämatologischen Erkrankungen auch Zytostatika, die vor allem bei sekundären Leukämien von Bedeutung sind.

Eine der häufigsten chromosomalen Aberrationen bei der AML betrifft das MLL-Gen, welches über 30 verschiedene Partnergene und über 50 verschiedene Bruchpunkte hat (Huret et al. 2001). Das MLL-Gen (*mixed lineage leukemia* Gen) ist auf dem Chromosom 11q23 lokalisiert und ist ein 430 kD großer Transkriptionsfaktor, der sehr homolog zu dem Trithorax (TRX) Gen der Drosophila-Fliege ist (Ziemin-van der Poel et al. 1991, Djabali et al. 1992, Tkachuk et al. 1992). Seine komplexe Struktur beinhaltet drei AT-Hook Domänen für DNA-Bindung, eine Methyltransferase-Domäne und eine SET-Domäne (siehe Abbildung 1), welche die höchste Übereinstimmung mit dem TRX-Gen hat (Ziemin van der Poel et al. 1991, Djabali et al. 1992, Tkachuk et al. 1992, DiMartino und Cleary 1999).

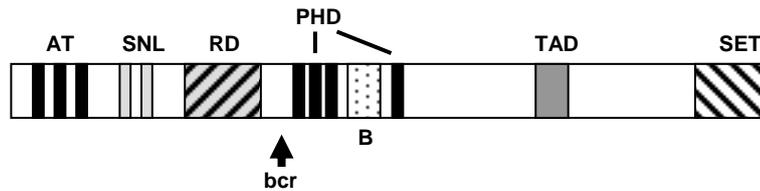
MLL WT

Abbildung 1: Struktureller Aufbau des MLL-Gens: Das MLL-WT-Protein ist 3936 Aminosäuren lang. Der N-Terminus beinhaltet eine dreifache AT-Hook-Domäne (AT), ein nukleäres-Lokalisations-Signal (SNL) und eine Methyltransferase-Domäne. bcr kennzeichnet in der Abbildung die breakpoint-cluster-region. Darauf folgt die *plant homeodomain* (PHD), die in die Chromatin-vermittelte Transkriptionsregulation eingreift, unterbrochen von der *bromodomain* (B) die bei der Protein-zu-Protein Interaktion involviert ist. Die Transaktivitäts-Domäne (TAD) bindet das CREB-binding protein (CBP). Die SET-Domäne am C-Terminus hat eine Methyltransferaseaktivität (Bäsecke et al. Br J Haematol. 2006; 135:438-49).

Eine der häufigeren Translokationen des MLL-Gens ist die Tandem-Duplikation des MLL-Gens (MLL-PTD) (Caligiuri et al. 1994). Dabei handelt es sich um eine partielle Duplikation der 5'-Region des MLL-Gens. Sie besteht aus einer *in-frame* Wiederholung eines MLL Exons in 5'-3' Richtung (Caligiuri et al. 1994, Schichmann et al. 1994). Die MLL-PTD tritt mit einer Häufigkeit von 5 bis 6,5 % bei AML-Patienten auf (Schnittger et al. 2000, Steudel et al. 2003, Shih et al. 2006, Bacher et al. 2005). Die Inzidenz einer MLL-PTD bei AML ist bei älteren Menschen 10 bis 18-fach gesteigert im Vergleich zu jüngeren Patienten (Bacher et al. 2005, Shih et al. 2006).

MLL – PTD (exons 3 – 9)

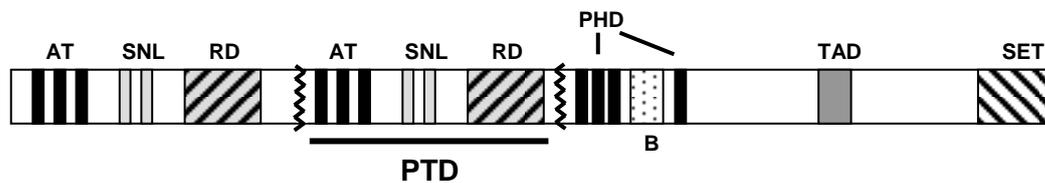


Abbildung 2: struktureller Aufbau des MLL-Gens nach einer partiellen Tandem-Duplikation. Die Abkürzungen sind dieselben wie in Abbildung 1. PTD ist die partielle Tandem-Duplikation. (Abbildung entnommen aus Bäsecke et al. Br J Haematol. 2006; 135:438-49)

Außer der MLL-PTD gibt es Translokationen des MLL-Gens bei AML. Die häufigsten sind die Translokationen mit den Chromosomen 9q11 sowie besonders bei der Therapie-assoziierten AML mit dem Chromosom 9p22 (Swansbury et al. 1998, Rubnitz et al. 2002, Bloomfield et al 2002). Weitere häufige Translokationen sind beispielsweise MLL-AF9, MLL-AF10, MLL-ELL und MLL-AF6 (Shih et al. 2006).

1.2 Vorkommen der MLL-Aberration bei de-novo-AML und t-AML

Die Translokationen des MLL-Gens kommen sowohl bei der neu aufgetretenen AML (de-novo-AML) sowie bei der Therapie-assoziierten AML (t-AML) vor. Die t-AML, die auch als sekundäre Leukämie bezeichnet wird, ist eine akute myeloische Leukämie, die nach Gabe von Chemotherapie auftreten kann. Ein Anstieg des Risikos für eine t-AML von 0,25% auf 1% pro Jahr 2 Jahre nach Beginn einer Chemotherapie wurde beobachtet (Pedersen-Bjergaard et al. 1987). Das erhöhte Risiko dauert 5-7 Jahre nach Beendigung der Chemotherapie an und das Risiko ist ebenfalls dosisabhängig und steigt ab einem Alter von über 40 Jahren exponentiell an (Pedersen-Bjergaard et al. 1987).

In einer 2003 von Schoch et al. veröffentlichten Studie mit 1897 Patienten, die an einer AML erkrankt waren, konnten zytogenetisch 54 (2.8%) Patienten entdeckt

werden, deren Leukämien eine 11q23/MLL-Abnormalität trugen. Die Inzidenz einer AML mit MLL-Aberration war deutlich höher bei der Therapie-assoziierten AML als bei de-novo-AML. Die Häufigkeit der MLL-Veränderungen bei der t-AML lag bei 9,4%. Im Gegensatz dazu trat eine MLL-Veränderung bei 2,6% der de-novo-AML auf (Schoch et al. 2003). Die Frequenz der MLL-Umlagerung ist signifikant höher bei Patienten, die jünger als 60 Jahre alt sind. Prozentual waren 5,4% der unter 60-Jährigen gegenüber 0,8% der über 60-Jährigen (Schoch et al. 2003) betroffen. Außerdem ist festgestellt worden, dass das Auftreten von MLL-Aberrationen bei den AML-Typen M4, M5a und M5b mit 4,7%, 33,3% und 15,9% sehr hoch lag, während die Inzidenz bei allen anderen FAB-Subtypen bei 0,9% lag (Schoch et al. 2003). In einer Studie aus dem Jahre 2005 von Ng et al., die sich ausschließlich mit den MLL-Aberrationen von Kindern befasste, die Chemotherapie erhielten, konnten in 7% (5 von 71) der Fälle MLL-Brüche nachgewiesen werden. Auch hier waren nach 2 bis 10 Monaten nach Beginn der Therapie die ersten Brüche auf dem Gen nachweisbar (Ng et al. 2005).

1.3 Ursachen des Vorkommens von MLL-Aberrationen bei t-AML

MLL-Aberrationen bei einer t-AML sind im Gegensatz zu MLL-Aberrationen bei einer neu auftretenden AML deshalb so häufig, weil die Chemotherapeutika wie Topoisomerasehemmer I und II zu Brüchen im MLL-Gen führen (Super et al. 1993, Felix 1998). Außer den Topoisomerasehemmern wie z.B. Etoposid führen auch Anthrazykline wie z.B. Doxorubicin zu Veränderungen am MLL-Gen bei einer t-AML (Pedersen-Bjergaard und Andersen 1998). Insgesamt 5-15 % der Patienten, die sich einer Chemotherapie mit den oben genannten Stoffen unterzogen haben, entwickeln eine t-AML mit den genannten MLL-Aberrationen (Super et al. 1993, Pedersen-Bjergaard et 1994). Patienten, die an einer Therapie-induzierten AML erkrankt sind und gleichzeitig MLL-Aberrationen aufweisen, haben im Gegensatz zu an t-AML erkrankten Patienten ohne MLL-Veränderungen eine kürzere Latenzphase bis zum Auftreten der Erkrankung und eine geringere Überlebensrate (Super et al. 1993).

In einer retrospektiven Studie von Megonigal et al. aus dem Jahre 2000 wurde das MLL-Gen eines primär an einem Neuroblastom erkrankten Kind über den gesamten Zeitraum der Erkrankung untersucht. In diesem Fall wurde der dreizehnjährige Junge mit einer modifizierten N6-Therapie, die unter anderem Doxorubicin (Anthrazyklin) und Etoposid (Topoisomerasehemmer) enthält, behandelt. Siebzehn Monate nach Therapiebeginn wurde im Knochenmark des Jungen eine Therapie-induzierte AML festgestellt. Dazu wurde die DNA, die aus dem Knochenmark zur Neuroblastom-Diagnostik verwendet worden war, und die DNA und RNA, die präleukämisch entnommen wurden, auf Translokationen am MLL-Gen untersucht. Bereits 1 ½ Monate nach Beginn der Chemotherapie zur Behandlung des Neuroblastoms konnte mittels Southern Blot die Translokation des MLL-Gens festgestellt werden. Damit ist gezeigt worden, dass MLL-Gen-Translokationen bereits frühzeitig nach Beginn der Chemotherapie mit Topoisomerasehemmern geringer kumulativer Dosis auftreten können und mit Hilfe der inversen PCR-Methode nachgewiesen werden können (Megonigal et al. 2000).

Im Jahre 2005 wurden weiterführend von Libura et al. die MLL-Aberrationen in vitro beobachtet. Es wurden humane Blutstammzellen (CD34⁺-Zellen), die einem Topoisomerase-2-Hemmer (Etoposid) ausgesetzt waren, mit Hilfe der inversen PCR-Methode (die inverse PCR-Methode wird noch in Abschnitt 2.5 genau erklärt) untersucht. Die zu untersuchenden Zellen waren in zwei Gruppen unterteilt worden. Die erste Gruppe wurde 2 bis 3 Stunden nach Etoposidgabe untersucht und in der zweiten Gruppe wurden die Zellen nach 10 bis 14 Tagen inkubiert und erst danach abgeerntet (Libura et al. 2005). Es wurden in beiden Gruppen MLL-Aberrationen gefunden. Der gravierende Unterschied in den Aberrationen des MLL-Gens war, dass in der Gruppe der *short recovery period*, also der Zellen, die nach 2 bis 3 Stunden abgeerntet und untersucht wurden, ca. die Hälfte der untersuchten MLL-Genveränderungen aus Fusionen mit neuen Sequenzen bestand (18 von 34; 53%). Die häufigsten darunter waren die chromosomalen Translokationen (15 von 18; 83,3%). Im Gegensatz dazu fand sich in der Gruppe der *long recovery period*, also der Zellen, die erst nach 10 bis 14 Tagen abgeerntet und untersucht wurden, fast ausschließlich interne MLL-Aberrationen.

Die häufigsten darunter waren die Tandem- Duplikationen des MLL-Gens (26 von 33; 78,8%), einige Inversionen (4 von 33; 12,1%) und dann noch eine einzelne Inversion. Diese unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Gruppen deuteten wahrscheinlich daraufhin, dass die Translokationen mit den neuen Sequenzen, die sich fast ausschließlich in der Gruppe der Zellen mit der *short recovery period* befanden, aufgrund ihrer nur kurzen Reparaturdauer sehr instabil waren und im weiteren Verlauf durch Apoptose oder verminderte Proliferation zugrunde gingen, wohingegen sich bei der Gruppe der Zellen mit der *long recovery period* die internen MLL-Aberrationen durchgesetzt haben (Libura et al. 2005). Somit wurde hier der in-vitro-Beweis geliefert, dass die Topoisomerase-2-Hemmer wie in diesem Fall Etoposid, in gesunden CD34⁺-Zellen MLL-Brüche hervorrufen können (Libura et al 2005).

1.4 Zielsetzung

Zentraler Gegenstand der Untersuchungen war es, die Patienten, die sich wegen eines Non-Hodgkin-Lymphoms (NHL) in Behandlung befanden, auf MLL-Aberrationen zu untersuchen, da die Patienten nach einem megaCHOEP-Schema behandelt wurden, in dem auch Topoisomerase-2-Hemmer und auch Anthrazykline enthalten sind. Das megaCHOEP-Protokoll beinhaltet zwei Behandlungsschemata. Der Behandlungsweg A enthält Cyclophosphamid $750\text{mg}/\text{m}^2$, Doxorubicin (ADR) $50\text{mg}/\text{m}^2$, Etoposid $300\text{mg}/\text{m}^2$, Vincristin $2\text{mg}/\text{m}^2$ und Prednisolon $500\text{mg}/\text{m}^2$, die in acht Zyklen gegeben werden. Der Behandlungsweg B besteht aus vier Zyklen, wo jedoch der erste Zyklus Cyclophosphamid $1500\text{mg}/\text{m}^2$, Doxorubicin $70\text{mg}/\text{m}^2$, Etoposid $600\text{mg}/\text{m}^2$, Vincristin $2\text{mg}/\text{m}^2$ und Prednisolon $500\text{mg}/\text{m}^2$ enthält und die weiteren Zyklen aus Cyclophosphamid $6000\text{mg}/\text{m}^2$, Doxorubicin $70\text{mg}/\text{m}^2$ und Etoposid $1480\text{mg}/\text{m}^2$ mit sequentieller Stammzelltransplantation bestehen.

Zielsetzung dieser Arbeit war somit der prospektive Nachweis von MLL-Aberrationen bei Patienten mit einem NHL unter Chemotherapie. Als Vergleichskollektiv untersuchten wir das MLL-Gen von gesunden Menschen, um aussagekräftige Schlüsse aus den Ergebnissen ziehen zu können. Die zentrale Untersuchungstechnik um an dieses Ziel zu kommen, war hauptsächlich die inverse MLL-PCR, mit deren Hilfe es möglich war, ungezielte Brüche im MLL-Gen nachzuweisen. Auf die technischen Einzelheiten der MLL-PCR Methode wird im Weiteren im Abschnitt 2.5 eingegangen.

2. Material und Methoden

2.1 Gewinnung der Leukozyten beim untersuchten Patientenkollektiv

Als Untersuchungsmaterial wurden bei den Patienten peripheres Blut und Stammzellapheresate verwendet. Bei dem gesunden Vergleichskollektiv wurde peripheres Blut verwendet.

2.1.1 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Die Blutentnahme an den Patienten und dem Vergleichskollektiv erfolgte mit einer Spritze, die 5000 I.E. Heparin pro 10 ml Blut enthielt, um eine vorzeitige Blutgerinnung zu verhindern.

2.1.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus dem Untersuchungsbefund

Nach der Probenentnahme wurden aus dem Untersuchungsmaterial die mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dazu wurden 15 ml der entnommenen Probe in ein steriles 50 ml-Zentrifugenröhrchen der Firma Sarstedt überführt und auf 30 ml mit sterilen PBS (phosphat buffer saline) aufgefüllt. Danach wurde das Gemisch mit 10 ml Ficoll-Lösung der Dichte $1,077 \text{ kg/m}^3$ unterschichtet, indem man die Pipette auf den Boden des Zentrifugenröhrchen setzte und die Ficoll-Lösung langsam und vorsichtig entleerte. Als nächstes wurde das Röhrchen für 20 Minuten bei 1700 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die von uns benutzte Zentrifuge RT 6000 B der Firma Sorvall wurde nach der Zentrifugation nicht gebremst, sondern lief langsam aus, um die durch die Zentrifugation entstandenen Phasen voneinander getrennt zu lassen.

Nach der Zentrifugation lagen folgende Phasen vor. Die obere Phase bestand aus Plasma und PBS, die Interphase aus mononukleären Zellen und die untere Phase

aus Ficoll und dem Erythrozytenpellet. Aus der entstandenen Interphase konnten die mononukleären Zellen entnommen werden. Anschließend wurden die entnommenen Zellen in ein neues 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und dann auf 50 ml mit PBS wieder aufgefüllt. Bei der anschließenden Zentrifugation von 10 Minuten bei 1700 Umdrehungen pro Minuten, bildete sich ein Pellet am Boden des Röhrchen, indem die Zellen enthalten waren. Als nächstes wurde die Flüssigkeit verworfen und dem Pellet werden 200 µl PBS hinzugefügt. Das Pellet wurde dadurch in den 200 µl aufgelöst und konnte dann weiter verarbeitet werden.

2.2 Isolierung der DNA aus der Zellkonzentration

Die DNA-Isolation wurde mit dem QIAmp DNA Mini Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Das Blood and Body Fluid Spin Protocol wurde angewendet.

Dazu wurden 20 µl der Proteinase K auf den Boden eines 1,5 ml Reaktionsgefäßes pipettiert. Als nächstes wurde die 200 µl Suspension hinzu gegeben. Daraufhin wurde 200 µl Puffer AL zur Probe gegeben und diese 15 s mittels Vortex durchgemischt. Danach wurde die Probe für 10 min im Wasserbad bei 56 ° C inkubiert. Nachdem die Proben aus dem Wasserbad entnommen wurden, zentrifugierte man sie ganz kurz, um Kreuzkontaminationen durch Verspritzen von Probenflüssigkeit im Deckelinneren beim Öffnen der Gefäße zu vermeiden. Danach gab man 200 µl Ethanol (96-100%) hinzu und mischte es wieder für 15 s. Dann wurde es wieder kurz abzentrifugiert, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Nachdem die Probe jetzt lysiert wurde, kann es jetzt mit der Bindung der DNA an die feste Phase des Spin Column weitergehen. Dazu wurde das Reaktionsgemisch vorsichtig in eine QIAamp Spinsäule gegeben, ohne den oberen Rand zu benetzen. Es wurde für eine Minute bei 6000 x g (8000 Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert und anschließend wurde die Säule in ein neues 2 ml Collection-Tube gesetzt. Der Deckel wurde vorsichtig geöffnet und 500 µl Buffer AW1 hinzu gegeben. Der Deckel wurde wieder verschlossen und man zentrifugierte erneut für eine Minute bei 6000 x g (8000 Umdrehungen pro Minute). Die Säule wurde wieder in ein neues 2 ml Collection-Tube gesetzt und das benutzte Gefäß samt Inhalt verworfen. Wieder öffnete man den Deckel und gab 500 µl Buffer AW2 hinzu und zentrifugierte das

Gemisch für drei Minuten bei 20000 x g (14000 Umdrehungen pro Minute). Anschließend wurde die QIAamp Spinsäule in ein sauberes 1,5-ml-Collection-Tube aufgesetzt und das benutzte Gefäß mitsamt Flüssigkeit verworfen. Man öffnete den Deckel der Spinsäule und es wurde 200 µl Buffer AE zur Elution auf die Säule gegeben. Der Puffer wurde bei Raumtemperatur für eine Minute inkubiert und danach für eine Minute bei 6000 x g (8000 Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert. Die Flüssigkeit, die sich im 2-ml-Collection-Tube befand, enthielt die DNA und konnte weiter bearbeitet werden.

2.3 Photometrische Messungen

Zur Überprüfung und Dokumentation der Reinheit wurde anschließend die DNA-Konzentration in der Lösung UV-spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Als Messgerät diente das BioPhotometer der Firma Eppendorf. Allgemein entspricht bei dieser Wellenlänge optische Dichte (OD) von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg DNA pro ml Lösung:

$$1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ µg DNA/ml}$$

Für die Messung wurde die Probe mit 1:20 verdünnt und ihre Konzentration photometrisch bestimmt. Die Konzentration c (µg/µl) einer DNA-Lösung lässt sich unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors F_v mit der gleich genannten Gleichung berechnen:

$$c = A_{260} \times 50 \times F_v$$

Zur Bestimmung der Reinheit der DNA wurde außerdem die Absorption bei 280 nm gemessen und der Quotient A_{260}/A_{280} gebildet, der zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Nachdem nun die DNA-Konzentration festgestellt wurde, konnte man die benötigte Menge DNA aus der Lösung entnehmen. Für die weitere Bearbeitung wurden jeweils 4 µg DNA benötigt. Dadurch wurde ein unterschiedliches Volumen aus der DNA-

Lösung in den Restriktionsprozess eingesetzt, so dass diese Differenz mit destilliertem Wasser ausgeglichen werden musste.

2.4. Enzymatische Modifikation von DNA

2.4.1. DNA-Restriktionverdau

Um die benötigten Fragmente der DNA zu erhalten, wurde die DNA mit der Restriktionendonuklease Xba1 der Firma Roche verdaut. Das Schneiden der DNA erfolgte mit 5 U Enzym pro μg DNA. Der Ansatz bestand aus:

DNA-Lösung (4 μg) + destilliertes Wasser

Xba1 Enzym 5 U pro μg DNA = 20 U

Xba1 Puffer 6 μl

Die Menge des Enzyms und des Puffers betragen 1/10 des gesamten Ansatzes. Der Ansatz wurde dann im Thermocycler der Firma Biometra für 8 h bei 37 ° C inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 15 min auf 65 ° C erhitzt, um das Enzym zu inaktivieren. Während dieses Vorgangs wurde das Fragment von Interesse herausgeschnitten, enthielt aber Puffer und Enzyme die entfernt werden mussten. Um diese zu entfernen, wurde die Lösung gewaschen und gefällt. Dies geschah mit Salz und Ethanol. Also wurde der Lösung 1/10 ihres Gesamtvolumens Natriumacetat (Endkonzentration: 0,3 molar) und das Dreifache ihres Gesamtvolumens an Ethanol (100%, auf -20 °C gekühlt) hinzu gegeben. Danach wurde das Lösungsgemisch in den Kühlschrank bei -80 °C für mindestens 30 min und höchstens 60 min hinein gestellt. Als nächstes wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße in der Zentrifuge Biofuge primo R der Firma Heraeus bei 14000 Umdrehungen pro Minute und 4 °C 30 min lang zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde die Flüssigkeit aus den Reaktionsgefäßen verworfen und in jedes Gefäß 1000 μl Ethanol (70%, auf -20° gekühlt) hinein pipettiert. Dann wurden die Eppendorf-Gefäße bei 14000 Umdrehungen pro Minute und 4 °C 15 min lang zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde die Flüssigkeit erneut verworfen und wieder wurde in jedes

Gefäß 1000µl Ethanol (70%, auf Raumtemperatur) hinein pipettiert. Danach wurden die Gefäße wieder bei 14000 Umdrehungen pro Minute und 4 °C 15 min lang zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde die Flüssigkeit erneut verworfen und die Reaktionsgefäße bis keine Ethanolreste mehr vorhanden waren. Dies war das Ende des Waschvorganges und die DNA lag als Pellet am Boden des Eppendorfgefäßes vor. Um die DNA weiter nutzen zu können, wurde in jedes Gefäß 50µl destilliertes Wasser hinzu gegeben und die Gefäße kamen für eine Stunde ins Wasserbad bei 50 °C. Dieser Schritt war wichtig, damit sich das DNA-Pellet, welches im gefällten, getrockneten Zustand vorlag, im Wasser löste und man es somit weiter verarbeiten konnte. Um zu überprüfen, ob sich wirklich DNA in dem Wasser gelöst hatte, wurden 3µl der Lösung entnommen und mit 57 µl destilliertem Wasser verdünnt, so dass eine 1:20 Verdünnung stattfand. Diese verdünnte Lösung wurde in Biophotometer gemessen, um die Konzentration der DNA zu bestimmen, bzw. überhaupt zu bestätigen, dass DNA vorhanden war. Nachdem nun alle Puffer und Enzyme von der DNA entfernt worden waren, konnte die Ligation der DNA beginnen.

2.4.2 DNA-Ligation

Zur Ligation wurde die T4 DNA Ligase der Firma Roche benutzt. Die Ligation ist notwendig, um eine ringförmige DNA entstehen zu lassen, die man später mit Hilfe der Polymerasenkettenreaktion vermehren kann. Der Ansatz für die Ligation enthält insgesamt 100 µl Flüssigkeit und besteht aus folgenden Inhalten:

DNA: 47 µl

Wasser: 39 µl

Puffer: 10 µl

T4 DNA Ligase: 4 µl.

Der Ansatz wurde dann im Thermocycler der Firma Biometra für 18 h bei 15 ° C inkubiert. Dies ist die effektivste Temperatur für die T4 DNA Ligase. Nach diesen 18 h wurde der Thermocycler für 15 min bei 65 ° C erwärmt, um die Ligase wieder zu inaktivieren. Nun konnte man die Proben aus dem

Cycler entnehmen und musste die Proben von dem Puffer und der Ligase aufreinigen. Dies geschah mit dem Micropure EZ Remover von der Firma QIAEX. Dieser bestand aus zwei Teilen, einem 1.5 ml Reaktionsgefäß und einem Filtrationsaufsatz, dem man in das Reaktionsgefäß aufsetzen konnte. Dies tat man auch als erstes und gab dann die aus dem Cycler entnommene Probe in diesen Filtrationsaufsatz. Danach wurde das Reaktionsgefäß mitsamt dem Aufsatz in die Zentrifuge gestellt und für eine Minute bei 12000 Umdrehung pro Minute zentrifugiert. Als nächstes pipettierte man 20 µl destilliertes Wasser in den Aufsatz und zentrifugierte das Gefäß für 30 Sekunden bei 12000 Umdrehungen pro Minute. Dann konnte der Filtrationsaufsatz verworfen werden und das Reaktionsgefäß enthielt die ligierte DNA. Diese konnte nun im nächsten Schritt weiter vermehrt werden.

2.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bevor die ligierte DNA weiter benutzt werden konnte, wurde erneut eine photometrische Konzentrationsmessung durchgeführt, um erneut zu überprüfen ob eine ausreichende Menge DNA vorhanden war. Nachdem dies erfolgreich getan wurde, konnte man mit dem Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion fortfahren. Die Polymerasekettenreaktion stellt ein Verfahren dar, mit dem es möglich ist bestimmte DNA-Abschnitte mit einer hohen Spezifität in vitro enzymatisch zu vervielfältigen (Mullis et al. 1986).

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde in mehreren Zyklen in einem programmierbaren Thermocycler der Firma Biometra durchgeführt. Zunächst wurde die doppelsträngige DNA denaturiert, wodurch sie sich in zwei DNA-Einzelstränge zerlegte. Die Denaturierung fand in der Regel bei 93-95° C statt.

Im nächsten Schritt wird die Temperatur wieder soweit gesenkt, dass sich die Oligonukleotidprimer spezifisch an die ihnen komplementären Sequenzen auf dem Matrizen-Strang anlagern können. Neben der DNA beinhaltet dieser Reaktionsansatz zwei Oligonukleotidprimer, hitzestabile DNA-Polymerase sowie als Basen die vier Desoxy-Nukleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP, die zusammen als dNTPs (desoxy-Nukleosidtriphosphate) bezeichnet werden. Die Reaktion erfolgt in

einem dafür geeigneten Milieu, welches aus PCR-Puffer, Magnesiumchlorid und destilliertem Wasser besteht. Die Oligonukleotidprimer sind für die zu untersuchenden DNA-Sequenzen speziell hergestellt, für die sie bei einer Länge von 15 -30 Nukleotiden ausreichende Spezifität aufweisen. Um eine erneute Renaturierung der ursprünglichen DNA zu verhindern, werden die Primer im Überschuss eingesetzt und die Annealing-Temperatur und Annealing-Zeit so gewählt das sich die chromosomale DNA nicht wieder aneinander lagert. Als Standardenzym wird heute die hitzestabile Taq-Polymerase benutzt. Diese wird aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen, welches in der Umgebung heißer Quellen vorkommt. Bei diesem Schritt handelt es sich um das Annealing, bei dem die Temperatur etwa 50° C beträgt.

Im dritten Schritt erfolgt die Kettenverlängerung, die mit Hilfe der DNA-Polymerase von den Primern ausgeht. Die Elongation findet bei etwa 70-75° C statt. Im Anschluss an die Kettenverlängerung liegt die DNA wieder als Doppelstrang vor, deshalb wird die Temperatur am dieses Schrittes wieder auf 94 °C erhöht, um den neu synthetisierten Strang vom Matrizenstrang zu trennen. Somit können nun der ursprüngliche Matrizenstrang und der neu gebildete DNA-Strang als Matrizen für die weiteren Zyklen dienen. Ein Zyklus dauert zwischen drei und sechs Minuten. Insgesamt sollte dieser Zyklus dreißig Mal durchlaufen werden, so dass eine ausreichende Menge an DNA vorhanden ist, um in der Agarosegelelektrophorese eine sichtbare Bande zu erzeugen. Eine schematische Darstellung der PCR-Methode wurde in Abbildung 3 beigefügt.

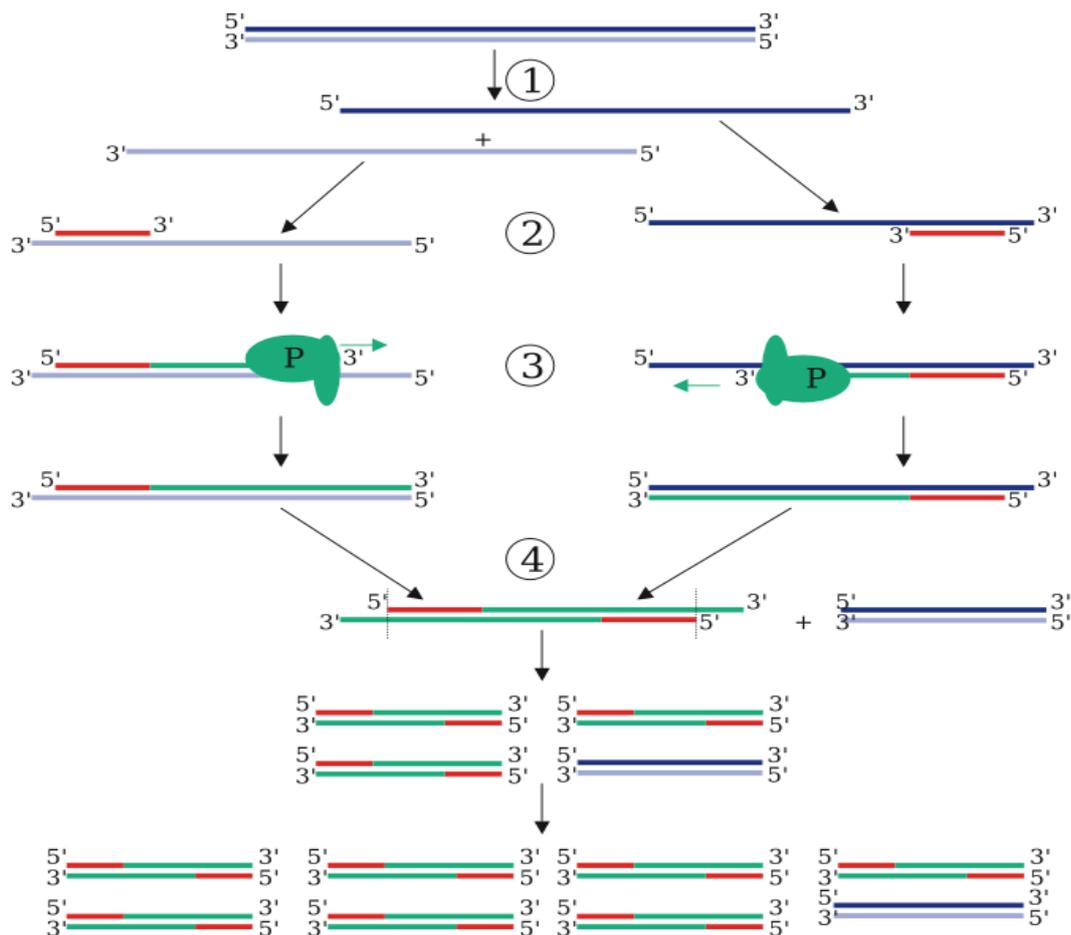


Abbildung 3: Schematische Darstellung des PCR-Zyklus

1 Denaturierung bei 94 °C

2 Annealing bei 50 °C

3 Elongation bei 75 °C

4 Zyklusende

Dies ist die Beschreibung des Ablaufes der herkömmlichen PCR. In diesem Fall jedoch wurde eine PCR-Methode genutzt, die von der herkömmlichen abweicht.

2.6 Inverse genomische Polymerasen-Kettenreaktion (iPCR)

Die inverse PCR erlaubt den Nachweis von Bruchpunkten in einem Gen und von Translokationen mit unbekanntem Partnergenen. Wir untersuchten das MLL-Gen mittels inverser genomischer MLL-PCR (MLL-igPCR), bei der DNA verwendet wird. Zur Durchführung der inversen PCR wurde zunächst der Teil des MLL-Gens durch

Nukleaseverdau isoliert, in dem t-AML typische Veränderungen lokalisiert sind (Blanco et al. 2004). Dazu diente die Nuklease Xba I, die ein Fragment im 3' terminalen Teil der MLL-BCR liefert. Nach Verdau wurden die entstehenden Fragmente ligiert und damit zirkularisiert und anschließend einer nested PCR mit MLL spezifischen Primern unterzogen. Bei unrearrangierten MLL trat bei dieser PCR eine Wildtypbande bei 1.8 kb auf. Dieses Auftreten der Wildtypbande, welches sich später im Agarosegel gut sichtbar zeigt, ist als Nachweis für die Funktionsfähigkeit der inversen genomischen PCR ausreichend, so dass das Mitführen einer Positivkontrolle nicht notwendig ist und auch nicht praktiziert wird (Libura et al. 2005). Bei Rearrangements können die entstehenden Fragmente größer oder kleiner als die Wildtypbande sein. Die inverse PCR ist bedeutsam zum Nachweis von MLL-Aberrationen, da sie sehr sensitiv ist und zusätzlich eine Charakterisierung der Aberrationen durch Sequenzierung ermöglicht. Sie ist daher für die Zielgruppe der Patienten, bei denen postchemotherapeutische DNA-Schäden postuliert werden, die noch nicht zur therapieassoziierten Leukämie geführt haben, d.h. vermutlich in nur wenigen Zellen vorhanden sind, eine besonders wichtige Methode (Felix 1998). Typische MLL-Tandemduplikationen, die bei nahezu allen gesunden Erwachsenen und im Nabelschnurblut nachweisbar sind, werden bei dieser inversen PCR nicht erfasst da die weiter in der 5'-Richtung liegen (Schnittger et al. 1998). Eine schematische Darstellung der inversen PCR-Methode wurde in der Abbildung 4 beigefügt. Wie durch die vorausgegangenen Teile beschrieben (2.4.1 und 2.4.2), liegt nun der von uns zu untersuchende DNA-Abschnitt ringförmig da.

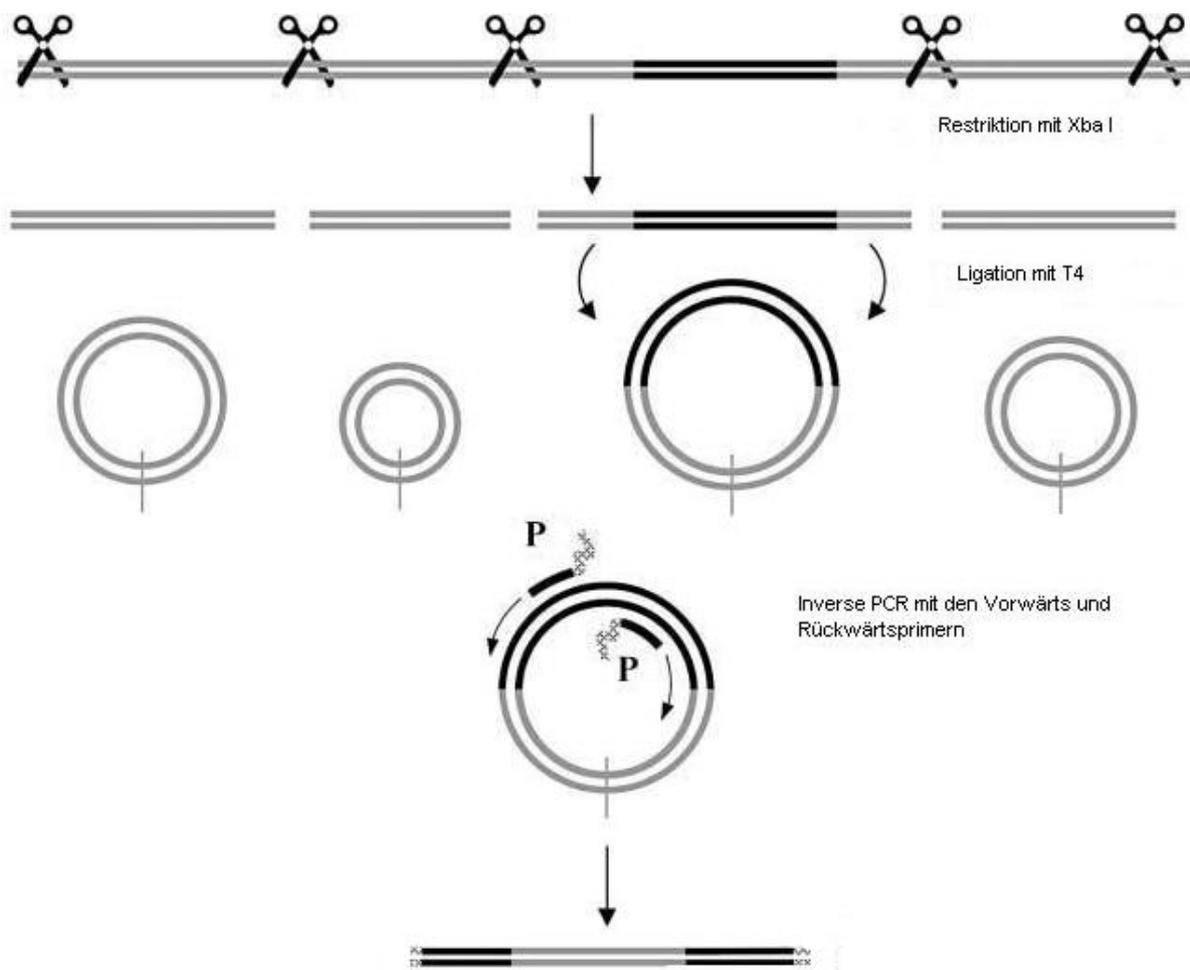


Abbildung 4: Schematische Darstellung der DNA-Modifikation (Abbildung entnommen aus Shams-Eldin et al. „J Mol Microbiol Biotechnol 2003;6:1-5)

Da ein Teil dieses DNA-Ringes bekannt ist, kann man von diesem bekannten Abschnitt auf der DNA anfangen die ringförmige DNA zu amplifizieren bis man wieder an der Startstelle angekommen ist. Dazu werden spezielle *forward* und *reverse* Primer benötigt, die im Gegensatz zu den herkömmlichen PCR-Primern genau entgegengesetzt verlaufen. Vor der Durchführung der PCR wurde zunächst jedes Eppendorf-Reaktionsgefäß sinnvoll beschriftet und anschließend wurde der Mastermix hinein pipettiert. Das Volumen musste die Probenanzahl plus einer Negativkontrolle beinhalten.

Pro Probe wurden folgende Mengen an Reagenzien in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben:

- 5µl PCR-Puffer (10x)
- 2µl MgCl₂ (50mM)
- 1µl dNTP-Lösung (10mM), bestehend aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP
- 1µl *forward* Primer I
- 1µl *reverse* Primer I
- 0,25µl Taq-DNA-Polymerase 5U/µl
- 38,75µl H₂O (HPLC gerade).

Dieser pro Probe 49 µl Volumen enthaltender Mastermix wurde im nächsten Schritt gut gemischt und an einer Tischzentrifuge für 10-15s zentrifugiert. Anschließend wurde jeweils 49 µl des Mastermixes in ein 0,5 ml großes Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und mit Mineralöl überschichtet um ein Verdampfen der Flüssigkeit und somit eine Konzentrationsänderung im Thermocycler zu verhindern. Danach wurden den jeweiligen Versuchansätzen 2µl Proben-DNA hinzu gegeben. Als Negativkontrolle wurde neben den 49µl aus dem Mastermix noch 2µl H₂O (HPLC gerade) hinzu pipettiert. Die für die PCR benutzten Primer hatten folgende Sequenzen:

Forward primer 1: 5' TCT ACA AGT GCC AGG GGT CT 3'

Reverse primer 1: 5' CCC GAC GTG GAT TTT CTT TA 3'

Die Proben wurden dann in den Thermocycler T3000 der Firma Biometra gestellt, in dem die Vervielfältigung in den folgenden Schritten verläuft:

Inkubation:	95° C	5min
Denaturierung:	94° C	30sec
Annealing:	54° C	45sec
Elongation:	68° C	3 min +20sec mit jedem Zyklus nach dem 10 Zyklus.

Synthesezeit:

Dieser Zyklus lief insgesamt fünfunddreißigmal ab.

Nach dieser PCR erfolgte die nested-PCR, bei der das Produkt der ersten PCR als Template für eine weitere PCR benutzt wurde. Die nested-PCR wird in der Regel dann durchgeführt, wenn nur sehr wenig DNA bzw. RNA vorhanden ist und in der primären PCR daher keine im Gel sichtbare Amplifikation zu erwarten ist. Für die nested-PCR wurde der gleiche Mastermix angefertigt wie schon für die erste PCR, außer dass andere Primer verwendet wurden. Die Primer hatten folgende Sequenzen:

Forward primer 2: 5' AAT AGC ATG CTG CCT GCA CTG CAC TCC TAA 3'

Reverse primer 2: 5' TGT AGG ATA TGT CCC TTA TAA ATG ACA AAC TAC
TGC TTC C 3'

Die Proben wurden dann in ebenfalls in den Thermocycler T3000 der Firma Biometra gestellt, in dem dann folgendes Programm durchgeführt wurde:

Inkubation:	94° C	5min
Denaturierung:	94° C	30sec
Annealing:	56° C	45sec
Elongation:	68° C	3 min+20sec mit jedem Zyklus nach dem 10 Zyklus.

Synthesezeit:

Der Zyklus lief insgesamt fünfunddreißigmal ab.

2.7 Agarosegel-Elektrophorese

Für die anschließende Agarosegel-Elektrophorese wurde ein 2%iges Agarosegel benötigt. Zur Herstellung des Agarosegels wurden 20 ml eines 5fach konzentrierten TBE-Puffers in einem 250 ml Erlmeyerkolben der Firma Schott Duran mit 80 ml destilliertem Wasser vermischt. Mit der Waage MC 1 Analytic AC 210 p der Firma Sartorius wurden daraufhin 2 g Molecular Biology Grade Agarosepulver abgewogen

und ebenfalls in den Erlenmeyerkolben hinzu gegeben. Durch leichtes Schwenken des Kolbens wurde eine gleichmäßige Verteilung der Agarose erreicht.

Der TBE-Puffer setzte sich dabei wie folgt zusammen:

- 270 g TRIS
- 137,5 g Borsäure
- 100 ml 0,5 M EDTA ph 8
- 5 l destilliertes Wasser

In einer Mikrowelle der Firma AEG wurde das Gemisch bei 500 W zum Kochen gebracht, bis das Pulver vollständig aufgelöst und eine klare Lösung entstanden war. Der Kolben wurde anschließend kurzzeitig unter fließendem Wasser abgekühlt und danach mit 70 µl Ethidiumbromid versetzt. Dann wurde der Kolben geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung des Ethidiumbromids zu erreichen. Im noch immer warmen Zustand wurde das Gel in eine mit Gelkämmen versehene Gelkammer gegeben. Nach einer Zeit von 30 bis 40 Minuten war das Gel vollständig erstarrt. Zur Elektrophorese wurde das Gel mitsamt der Gelkammer in das Elektrophoresegerät Gibco BRL Model H5 der Firma Life Technologies gestellt. Das Elektrophoresegerät wurde mit TBE-Puffer einfacher Konzentration aufgefüllt bis das Agarosegel vollständig mit Pufferflüssigkeit bedeckt war. Die Gelkämme wurden entfernt.

Nach Beendigung der PCR wurden 15 µl des PCR-Produktes aus den 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen entnommen. Dabei wurde die Pipettenspitze vorsichtig durch die Mineralölschicht hindurchgeführt, um das PCR-Produkt aufzunehmen. In

einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde es mit 7 µl Ladepuffer versetzt und beim Pipettieren kurz mit diesem vermischt. Dabei wurden am Rand des Gels als Längenstandard eine DNA-Leiter der Firma Roche sowie die Negativkontrolle aufgetragen. Der Längenstandard enthielt dabei unterschiedlich große DNA-Fragmente bekannter Größe. Anschließend wurde das Elektrophoresegerät geschlossen und für zwei Stunden mit einer Spannung von 80 Volt versorgt. Durch die angelegte Spannung wanderte die DNA im Gel. Die dabei entstandenen Banden waren unter UV-Licht der Wellenlänge 312 nm sichtbar. Zur Dokumentation wurde das Agarosegel unter UV-Licht mit dem UV-Gerät der Firma Intas abgelichtet.

Anhand des Längenstandards konnte eine Aussage über die Größe des entstandenen PCR-Produktes getroffen werden. Bei den Proben die Banden in dem zu untersuchenden Bereich aufwiesen, wurden die Banden ausgeschnitten und sequenziert.

2.8 Aufreinigung des Amplifikationsproduktes

Die Aufreinigung des Amplifikationsproduktes erfolgte durch nach dem „ QIAEX II Agaose Gel Extraction Protocol“ der Firma Qiagen. Das Amplifikationsprodukt, die aufgetretenen Banden, wurden mit einem scharfen, sterilen Skalpell der Firma Aesculap aus dem Gel ausgeschnitten, um es von den Nebenprodukten der PCR zu trennen. Das ausgeschnittene Stück des Gels wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Dieses war zuvor im leeren Zustand gewogen worden, damit im Anschluss die für die Aufreinigung eingesetzte Menge des Gels durch erneutes Wiegen exakt bestimmt werden konnte.

Pro mg Gel wurden dem Reaktionsgefäß 3 µl Puffer QX1 der Firma Qiagen zugegeben, zum Beispiel 300 µl Puffer QX1 zu einer Menge von 100 mg Gel. Anschließend wurden 30 µl QIAEX II-Lösung dem Reaktionsgefäß hinzu gegeben, nachdem die Lösung durch Rütteln auf dem Vortex-Genie 2 der Firma Scientific Industries für 30 Sekunden verflüssigt worden war. Danach wurde das Gemisch für 10 min im Wasserbad der Firma Bio-med bei 50° C inkubiert. Dabei wurde das Gemisch alle 2 min kräftig auf dem Vortex-Genie 2 geschüttelt, um QIAEX II in Lösung zu halten.

Nach der Inkubation wurde das Reaktionsgefäß für 30 Sekunden in der Tischzentrifuge der Firma Heraeus zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig entfernt. Dem im Reaktionsgefäß zurückgebliebene Pellet wurde im folgenden Schritt zuerst einmal 500 µl Puffer QX1 hinein gegeben. Dann wurde das Gemisch auf dem Vortex-Genie 2 kräftig geschüttelt, um das Pellet in dem Puffer aufzulösen. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand entfernt. Dieser Vorgang wurde noch zweimal mit dem Puffer PE durchgeführt. Durch diese Waschvorgänge wurden zunächst Agarosegel- und schließlich Salzurückstände entfernt. Nach dem Entfernen des letzten Überstandes ließ man das Pellet an der Luft trocknen, bis es deutlich weiß zu werden begann.

Nun wurden 38 µl Wasser in das Reaktionsgefäß hinein gegeben und es wurde auf dem Vortex-Genie 2 kräftig geschüttelt, um wiederum das Pellet zu suspendieren. Danach wurde das Reaktionsgemisch für 5 im Wasserbad bei 50° C inkubiert. Nach der Inkubation zentrifugierte man das Reaktionsgefäß für 30 Sekunden und konnte im Anschluss daran den Überstand in ein sauberes 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen. In diesem befand sich nun das aufgereinigte Amplifikationsprodukt zur weiteren Verwendung.

2.8.1 Überprüfung der Aufreinigung durch erneute Agarosegel-Elektrophorese

Die Aufreinigung des Amplifikationsproduktes wurde durch erneute Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Dabei wurde von jeder Probe eine Kontrollmenge von jeweils 2µl mit 7µl Ladepuffer auf einer 96-Loch-Mikrotiterplatte vermischt und die Vertiefungen des Agarosegels pipettiert. Hier wurde ebenfalls der Längenstandard mit aufgetragen. Nach Schließen des Elektrophoresegeräts wurde für eine Stunde eine Spannung von 100 V angelegt.

Bei der anschließenden Betrachtung des Agarosegels unter UV-Licht der Wellenlänge 312 nm wurde kontrolliert, ob eine Bande im zu erwartenden Größenbereich zu sehen war. In diesem Fall konnte man davon ausgehen, dass die Isolation des Amplifikationproduktes erfolgreich war. Aufgrund der geringen eingesetzten Kontrollmenge erschienen die Banden schwächer als diejenigen des Amplifikationsproduktes nach der PCR.

2.9 Sequenzierung nach der Sanger-Methode

Das in der vorliegenden Arbeit angewandte Verfahren der zyklischen Sequenzierung basierte auf der Sanger-Methode. Hier konnte man die Sequenz des aufgereinigten Amplifikationsprodukts untersuchen. Im Gegensatz zu klassischen Sequenzierverfahren die nur einen Zyklus aus Denaturierung, Primeranlagerung (Annealing) und Kettenverlängerung (Elongation) vorsehen, bestand die zyklische

Sequenzierung aus 20 bis 30 Wiederholungen dieser Reaktionsfolge, wodurch eine höhere Effizienz erzielt wurde (Kretz et al.1994).

Die notwendigen Kopien wurden durch zyklische Temperaturänderungen, wie bei einer PCR im Thermocycler, hergestellt. Daher musste auch eine thermostabile Polymerase verwendet werden.

Der Reaktionsansatz bestand neben der thermostabilen Polymerase auch noch aus dNTPs (desoxy-Nukleotriphosphate) sowie fluoreszenzmarkierte ddNTPs (Didesoxy-Nukleosidtriphosphate). Die Methode ist auf der basenspezifische Termination der DNA-Synthese durch die Didesoxy-Nukleotide begründet. In vier gleichen Ansätzen wird je eine der vier Basen zum Teil als Didesoxy-Nukleotid hinzu gegeben. Durch den Einbau eines Didesoxy-Nukletides anstatt eines entsprechenden Desoxy-Nukleotides wird die Synthese beendet, da für die weitere Synthese keine 3'OH Gruppe vorhanden ist

Da die einzelnen ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) zusätzlich mit charakteristischen Fluoreszenzen ausgestattet sind, können die einzelnen Ketten von einander unterschieden werden, da die Ketten unterschiedlicher Länge jeweils einer bestimmten Fluoreszenz zugeordnet werden.

Die Unterscheidung der einzelnen Ketten erfolgte mittels der Kapillar-Elektrophorese. Die Ketten wanderten aufgrund ihrer verschiedenen Größen unterschiedlich schnell in der mit Gel gefüllten Kapillare. Anhand der Fluoreszenz wurde an einem Messpunkt bestimmt welche Base am Ende der Kette liegt. Nachdem alle entstandenen Produkte durch die Kapillare gewandert und gezählt worden waren, konnte die vollständige Sequenz grafisch dargestellt werden. Durch die Automatisierung solcher Sequenzierverfahren anhand fluoreszenzmarkierter DNA wurde die Effektivität die Sequenzanalyse wesentlich erhöht.

2.9.1 Reaktionsansatz für die zyklische Sequenzierung

Für den Reaktionsansatz der zyklischen Sequenzierung wurden 50- μ l-Reaktionsröhrchen benutzt. Es wurden für jede Patientenprobe jeweils zwei Ansätze vorbereitet, einer mit dem Forward-Primer und einer mit dem Reverse-Primer. Es

wurden die gleichen Primer benutzt, die auch schon bei der nested-PCR eingesetzt wurden, da mit diesen Primern das Amplifikationsprodukt hergestellt worden war.

Forward-Primer: 5' AAT AGC ATG CTG CCT GCA CTG CAC TCC TAA 3'

Reverse-Primer: 5' TGT AGG ATA TGT CCC TTA TAA ATG ACA AAC TAC
TGC TTC C 3'

Die Konzentration des Primers wurde allerdings für diesen Reaktionsansatz 1:3 verdünnt, so dass sich der Reaktionsansatz aus den folgenden Reagenzien zusammensetzt.

Forward-Ansatz

- 1,25 µl Big Dye Terminator 5x Sequencing Buffer der Firma Applied Biosystems
- 1,5 µl Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems
- 1 µl Forward-Primer MF 1 (3,3 pmol/µl)
- 5 µl aufgereinigtes Amplifikationsprodukt
- 1,25 µl destilliertes H₂O

10 µl

Reverse-Ansatz

- 1,25 μ l Big Dye Terminator 5x Sequencing Buffer der Firma Applied Biosystems
- 1,5 μ l Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems
- 1 μ l Reverse-Primer MR 1 (3,3 pmol/ μ l)
- 5 μ l aufgereinigtes Amplifikationsprodukt
- 1,25 μ l destilliertes H₂O

10 μ l

Für den Einbau der Basen enthielt das Big Dye Terminator Kit der Firma Applied Biosystems ein definiertes Gemisch der dNTPs, ddNTPs und des Puffers. Die ddNTPs wiesen eine für jede der vier Basen charakteristische Fluoreszenzmarkierung auf, mit deren Hilfe später die Sequenz der Nukleotide ermittelt werden konnte.

Danach wurden die Proben in den Thermocycler T3000 der Firma Biometra eingesetzt und sie durchliefen folgenden Zyklus fünfundzwanzigmal.

Denaturierung: 96 ° C 30 Sek.

Annealing: 50 ° C 15 Sek.

Elongation: 60 ° C 4 Min.

Nach der Reaktion im Thermocycler wurden die hergestellten Kopien der DNA-Stränge aus dem Ansatz isoliert.

2.9.2 Aufreinigung des Sequenzieransatzes

Die Aufreinigung der Sequenzieransatzes fand nach dem DyeEx 2.0 Spin Protocol der Firma Qiagen statt. Das Prinzip dieser Aufreinigung ist die Gelfiltrationschromatographie, bei der die DNA-Fragmente aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes von dem Sequenzierfarbstoff und vereinzelt Nukleotiden getrennt werden.

Das Kit besteht aus drei Teilen, einem 2-ml-Sammelgefäß, einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß und einem Filtrationsaufsatz der das Granulat für die Filtration beinhaltet. Als erstes rüttelte man den Filtrationsaufsatz vorsichtig damit das Granulat resuspendiert wurde. Dann wurde der Boden des Aufsatzes abgeknickt und in das Sammelgefäß plziert. Danach wurde das Gefäß für 3 min bei 2800 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Als nächstes wurde der Filtrationsaufsatz vom Sammelgefäß entfernt und auf das Reaktionsgefäß gesetzt. Nun wurde der Sequenzieransatz vorsichtig auf das Gelbett pipettiert. Es wurde erneut bei 2800 rpm für 3 min zentrifugiert und danach konnte der Aufsatz entfernt werden. Als letztes musste die Probe noch getrocknet werden und konnte danach für den weiteren Vorgang benutzt werden.

2.9.3 Ermittlung der Sequenz durch Kapillar-Elektrophorese

Die Kapillar-Elektrophorese fand im 3130 Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems statt. Der getrockneten aufgereinigten DNA wurde jeweils 10µl H₂O hinzugegeben und dann wurden die Reaktionsgefäße mit einem Gummipfropfen verschlossen. Im Genetic Analyzer wurden durch die Gummipfropfen die sequenzierte DNA-Probe elektrokinetisch in eine mit Polymer gefüllte Glaskapillare injiziert. Die Injektionszeit betrug dabei 20 Sekunden bei einer Injektionsspannung von 2,4 kV. Durch die in der Glaskapillare angelegte Spannung von 9,4 kV erfolgte eine Trennung der einzelnen DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgrund ihrer unterschiedlichen schnellen Wanderung in der Kapillare. Die Fragmente geringer DNA-Größe wanderten schneller als die größerer. Die Proben blieben für 102 Minuten bei 42 ° C in der Glaskapillare der angelegten Spannung ausgesetzt. Im

Verlauf konnte für jedes Fragment die charakteristische Fluoreszenz gemessen werden und somit das entsprechende, an dieser Stelle eingebaute Nukleotid ermittelt werden

3. Ergebnisse

3.1 Kontrolle der inversen PCR des MLL-Genabschnitts

Bevor es zu den hauptsächlichen Experimenten kam, mussten Kontrollexperimente für die inverse PCR etabliert sein. Bei der Positivkontrolle verwendete man statt der DNA von Patientenproben die cDNA aus der MV 4-11 Zelllinie. Die MV 4-11 Zelllinie entstammt einer AML und weist die Translokation t(4; 11) unter Beteiligung des MLL-Gens auf. Nun erfolgte nach der in Abschnitt 2.5. erläuterten Methode die Amplifikation der DNA aus der MV 4-11 Zelllinie. Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden, wie in Abschnitt 2.6. beschrieben, in einem Agarosegel aufgetrennt.

Bei einer erfolgreichen Aufarbeitung der Proben entstand nach der Amplifikation die erwartete Wildtypbande von 1,8 kb im Agarosegel. Die Wildtypbande ist auch in der Abbildung 6 unter MLL wt gut sichtbar auf dem Agarosegel dargestellt. Die Sequenzanalyse einer Wildtypbande wird in Abbildung 5 dargestellt. Als nächstes konnte wie in den Abschnitten 2.7. und 2.8. beschrieben die Bande aufgereinigt und sequenziert werden. Bei der Sequenzierung konnte dann die Amplifikation des MLL-Gens bestätigt werden. Banden, die ober- oder unterhalb der Wildtypbande liegen sind potentielle Aberrationen des MLL-Gens, beispielweise Deletionen oder Translokationen (mit im Gegensatz zum Wildtyp MLL-Gen weiter 5' liegender Schnittstelle).

↓**5793**

```
GCTTGATAAACTCTCCTCCATGCGAATTTTTTAACTTTTTATGTTGACATGATTTTCAGACTTACAA
AAAACTATGAGTTGTACAGAGAATTCTAAGTACCCCTCACCCAAATTCCTAAGTGTTAATATGTT
TCTCTGTGTGTATATATTTTACAAAATAACAAATAAAATACATATACACATTTTACCTGTAGATACAC
ATGTATCTAAAAATTTGAGAACAAGTTGCAGACATAAACCATTTTACCTCTAAATATTTTAGTGTAT
ATTTTTAAAAATCAAGGACGTTCTCGTATTTAACCATGGTATAATTACCAAATCAGGAAATTAACAC
ACTGGTACACTACTATTATCTGATCTATAGGCCTTATTTAGGTTTGACCAATTGTCCCAATAATTCC
TTTATGGCAAAGAAATTCTGGATTATCCTAGTTAGTATTTTTGAAAATCCTATATCAATATGAAAA
TAACTTATTTCTAAAATTAGAAATGGAGGCTGGGCGTGGTGGCTCACGCCTATAATCCCAGCACT
TTGGGAGGCCGAGGCAGGCAGATCACAAGGTCAGGAGATTGAGACCATCCTCGCCTAACACAGT
GAAACCCCATCTCTACTAAAAATACAAAAATTAGCCAGGCGTGGGTGGCAGCGCCTGTGATCC
CAGCTACTCAGGAGACTGAGGCCGGAGAATCGCTTGAACCC ↑6498
```

Abbildung 5: Die Abbildung zeigt die Analyse der Sequenzierung der Wildtypbande des MLL-Genabschnittes

3.2 PCR der gesunden und mega-CHOEP-Proben

Als nächstes wurden die Proben des gesunden Vergleichskollektivs und der nach dem mega-CHOEP Schema behandelte Gruppe miteinander verglichen. Das gesunde Vergleichskollektiv wurde dann nochmals in zwei Gruppen unterteilt. Es bestand zu einem Teil aus peripheren Blutproben (NB) von gesunden Menschen und zum anderen Teil aus Nabelschnurblut (Cord blood). Die Proben der Patienten die sich nach dem mega-CHOEP Schema haben behandeln lassen, waren als Stammzellapheresate vorhanden. Die Stammzellapheresate wurden während der Chemotherapie in behandlungsfreien Intervallen den Patienten entnommen. Die Leukozyten bzw. später die DNA wurde wie in den Abschnitten 2.1. und 2.2. beschrieben gewonnen. Danach konnte die DNA-Restriktion und DNA-Ligation wie in den Abschnitten 2.3. und 2.4. beschrieben ablaufen. Daraufhin konnten erst die PCR und dann das Auftragen auf dem Agarosegel wie in 2.5. und 2.6. erläutert durchgeführt werden.

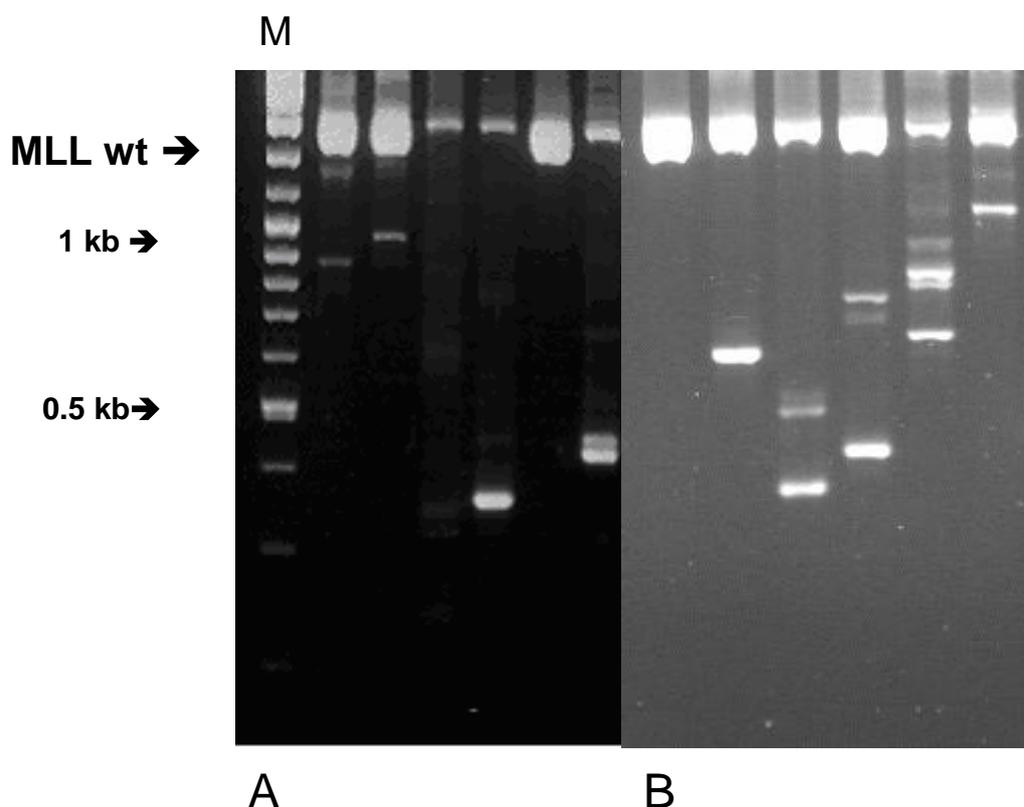


Abbildung 6: MLL inverse PCR von **A)** sechs Mega-CHOEP DNA Proben und **B)** sechs DNA-Proben aus dem Vergleichskollektiv (peripheres Blut) mit Banden in beiden Probenarten. M kennzeichnet den DNA-Größenmarker

Nachdem alle Proben amplifiziert und auf dem Agarosegel aufgetragen wurden, zeigte sich dass sowohl bei den Proben des Vergleichskollektivs als auch bei den Proben der Patienten Aberrationen vorhanden sind, die nicht der Wildtypbande bei 1,8 kb entsprechen. Insgesamt bestand das Vergleichskollektiv aus 23 Proben die aus dem peripheren Blut von 11 gesunden Erwachsenen (Gruppe A1) stammen und aus 12 Proben die aus Nabelschnurblut (Gruppe A2) stammen. In der Gruppe A1 zeigten sich in 45,45 % (5 von 11 Proben) der Fälle Aberrationen in Form von Banden im Agarosegel, wie beispielhaft in der Abbildung 4 B) dargestellt worden ist. Die Gruppe enthielt 54 % männliche und 46% weibliche Probanden. Weitere Einzelheiten sind in der Tabelle 1 dargestellt. In der Gruppe A2 zeigten sich in 75 % (9/12) der Fälle Aberrationen auf dem Gel. Die Gruppe A2 bestand zu 58,3 % aus männlichen Neugeborenen und zu 41,7 % aus weiblichem Neugeborenen. In der Tabelle 2 finden sich weitere Details zu der Gruppe A2.

Pro.Nr.	Geburtsdatum	Geschlecht	Aberration
NB 1	22.05.1962	m	nein
NB 2	27.05.1955	m	nein
NB 3	13.01.1977	w	ja
NB 4	01.09.1981	m	nein
NB 5	22.06.1976	w	ja
NB 6	22.03.1983	w	ja
NB 7	25.06.1980	w	nein
NB 8	07.04.1978	m	ja
NB 9	27.04.1981	m	nein
NB 10	18.11.1980	m	nein
NB 11	12.10.1965	w	ja

Tabelle 1: Die Tabelle zeigt alle Einzelheiten der Gruppe A1 die das gesunde Vergleichskollektiv der gesunden Erwachsenen darstellt. Pro. Nr. Probennummer, m männlich, w weiblich

Pro.Nr.	Geburtsdatum	Geschlecht	Aberration
CB 1	27.08.2003	m	ja
CB 2	02.07.2003	m	ja
CB 3	03.07.2003	m	ja
CB 4	11.06.2003	m	ja
CB 5	01.07.2003	w	nein
CB 6	18.02.2004	m	ja
CB 7	25.06.2003	w	ja
CB 8	01.12.2004	m	ja
CB 9	15.12.2003	m	nein
CB 10	01.07.2003	w	ja
CB 11	01.07.2004	w	nein
CB 12	01.10.2004	w	ja

Tabelle 2: Die Tabelle zeigt alle Einzelheiten der Gruppe A2 die das gesunde Vergleichskollektiv des Nabelschnurblutes darstellt. Pro. Nr. Probennummer, m männlich, w weiblich

Aus den sich von der Wildtypbande unterscheidenden Banden der Nabelschnurblutproben wurden exemplarisch, die auf dem Agarosegel am deutlichsten dargestellten Banden, nach dem unter den Abschnitten 2.7 und 2.8. beschriebenen Methoden erst aufgereinigt und dann nach der Sanger-Methode sequenziert. Auf die Ergebnisse wird weiter unter eingegangen.

Als nächstes wurden die Proben der Patienten, die nach dem mega-CHOEP Schema behandeln wurden, weiter untersucht. Das mega-CHOEP Schema beinhaltet eine Hochdosistherapie mit den Chemotherapeutika Doxorubicin, Cyclophosphamid, Vincristin, Prednisolon und Etoposid, welche bei der Therapie der Non-Hodgkin-Lymphome verwendet werden. Die Zellen für die Untersuchung wurden in den Intervallen zwischen den Zyklen entnommen.

Insgesamt wurden von 20 Patienten, die sich in der high dose Mega-CHOEP Therapie befanden, Proben entnommen und dann wie in Abschnitt 2.1. bis 2.6. beschrieben weiterverarbeitet wurden (Gruppe B). Auf dem Agarosegel konnte dann gesehen werden, dass von den 20 Proben in 12 Proben Aberrationen in Form von

Banden zu erkennen waren, wie in Abbildung 4 exemplarisch an 6 Fällen dargestellt wurde. Es konnte gezeigt werden dass 60 % (12/20) der Proben aus der Gruppe B Aberrationen enthalten, die in Form von Banden von unterschiedlicher Größe auf dem Gel zu erkennen waren. Die Gruppe enthielt 60% männliche und 40 % weibliche Patienten. In der Tabelle 3 finden sich weitere Einzelheiten zur Gruppe B.

Pro.Nr.	Geburtsdatum	Therapiezeitpunkt	Geschlecht	Aberration
HD 1	27.03.1961	Nach 3.Zyklus	w	Ja
HD 2	01.06.1963	Nach 3.Zyklus	m	Ja
HD 3	21.09.1949	Nach 1.Zyklus	m	Ja
HD 4	24.03.1962	Nach 1.Zyklus	m	Ja
HD 5	18.03.1959	Nach 1.Zyklus	m	Nein
HD 6	05.12.1964	Nach 2.Zyklus	w	Ja
HD 7	16.05.1972	Nach 3.Zyklus	m	Nein
HD 8	25.05.1947	Nach 3.Zyklus	m	Nein
HD 9	29.05.1947	Nach 3.Zyklus	m	Ja
HD 10	09.05.1949	Nach 2.Zyklus	m	Nein
HD 11	14.09.1956	Nach 2.Zyklus	w	Ja
HD 12	01.07.1971	Nach 2.Zyklus	w	Nein
HD 13	10.12.1962	Nach 2.Zyklus	w	Ja
HD 14	09.02.1965	Nach 3.Zyklus	m	Ja
HD 15	04.04.1956	Nach 2.Zyklus	w	Ja
HD 16	17.11.1959	Nach 3.Zyklus	m	Ja
HD 17	19.07.1950	Nach 2.Zyklus	w	Nein
HD 18	10.11.1958	Nach 5.Zyklus	w	Nein
HD 19	22.11.1952	Nach 3.Zyklus	m	Ja
HD 20	17.12.1973	Nach 3.Zyklus	m	Nein

Tabelle 3: Die Tabelle zeigt alle relevanten Einzelheiten zu der Gruppe B, in der sich die in Therapie befindenden Patienten zusammengefasst worden sind. Pro.Nr. Probennummer, m männlich, w weiblich. Der Therapiezeitpunkt gibt an, zwischen welchen Zyklen sich der Patient zur Zeit der Probennahme befand.

Auch hier wurde exemplarisch, die am deutlichsten dargestellten Banden, aus dem Patientenkollektiv aberrante Banden nach den in Abschnitten 2.7 und 2.8 beschriebenen Methoden aufgereinigt und nach der Sanger-Methode sequenziert.

Bei den Sequenzierungen der in den Agarosegelen gezeigten Banden konnten Aberrationen festgestellt werden. Bei der hier dargestellten Sequenzierung einer Bande aus der Nabelschnurblutprobe der Gruppe A2 konnte beispielsweise eine Insertion zwischen den Basen 1223 und 1224 entdeckt werden, die in Abbildung 7 gezeigt wird.

```

CATGACCAGTGCTTGATAAACTCTCCTCCTGCGAATTTTTTAACTTTTTATGTTGACATGATTTCA
GACTTACAAAAAACTATGAGTTGTACAGAGAATTCTAAGTACCCCTCNCCNGAANGCCCCANNN
GTNAATATGTTNNNNGGGGTGGGTATATNNNACACAATAACAATGTATCACACGGTATACNCATTT
                                     1223↓
TACCTGTNGATANCACNTGTGNCTAAANNTTNGANAACANGTT_____GGGGACANTGNAACCAG
                               ↓ 1224
AAACNATCTGGTN___AGGATTNCCACCAAATATTANGAGTGTGGTNGGGNNANGGNTGACC

```

Abbildung 7: Sequenzanalyse der Bande aus der Nabelschnurblutprobe. Der in Rot gekennzeichnete Teil der Nukleotidbasen zeigt eine Insertion zwischen den Basen 1223 und 1224.

Bei der Sequenzierung der aberranten Bande aus den Proben der mega-CHOEP-Patienten konnten ebenfalls Aberrationen festgestellt werden. Es konnten wiederum Inversion in MLL-BCR nachgewiesen werden. Bei der Sequenzanalyse zeigte sich dass es eine Inversion von Basenpaar (bp) 5992 zum Basenpaar 4690 gibt, die in der Abbildung 8 dargestellt wird. Bei unseren Sequenzierungen wurden immer Inversionen nachgewiesen, aber keine Translokationen oder Tandemduplikationen.

```

                                     5892                               ↓                               4690
...CTATGAGTTGTACAGAGAATTCTAAGTA--AAAACAATCTGGAAGGATTACACCAAATAT...

```

Abbildung 8: Sequenzanalyse der Bande aus den Proben der mega-CHOEP-Patienten. Der Pfeil kennzeichnet die Stelle der Inversion zwischen den Basenpaaren 5892 und 4690

3.3 Personen-Zeit-Verlauf

Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die DNA-Brüche im MLL-BCR durch unterschiedliche Verarbeitungszeitpunkte zustande kamen, wurde eine Zeitverlaufsreihe untersucht. Dazu wurden Proben einer Gruppe nicht erkrankten Personen (Gruppe C) untersucht. Diese wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgearbeitet und untersucht. Es wurden den Probanden eine ausreichende Menge Blut entnommen, um aus dem peripheren Blut nach 0 Stunden, nach 24 Stunden und nach 48 Stunden die Leukozyten bzw. später die DNA zu isolieren, wie in Abschnitt 2.2. schon beschrieben. Das periphere Blut das zu den unterschiedlichen Zeitpunkten aufgearbeitet wurde, lagerte bei Raumtemperatur. Danach konnten die DNA-Restriktion und dann die DNA-Ligation wie in den Abschnitten 2.3. und 2.4. beschrieben stattfinden. Als nächstes wurde dann die PCR und das Auftragen auf das Agarosegel, wie in den Abschnitten 2.5. und 2.6. erläutert, durchgeführt. In der Abbildung 9 ist ein Agarosegel mit 6 von 10 Probanden über die untersuchten Zeitpunkte zu sehen.

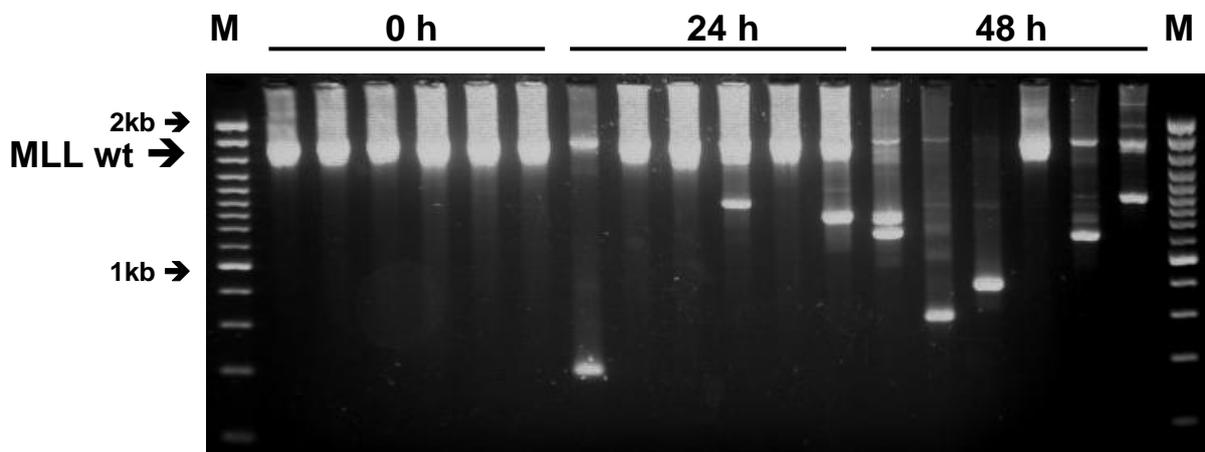


Abbildung 9: Die Abbildung zeigt die MLL inverse PCR von 6 Probanden aus einer Gruppe von insgesamt 10 gesunden Personen, die nach 0 h, 24 h und 48 h untersucht worden sind. M kennzeichnet den DNA-Leitermarker. MLL wt kennzeichnet die MLL Wildtypbande bei 1.8 kb

Insgesamt bestand die Gruppe C aus 10 Proben von gesunden Probanden. Die Gruppe C enthielt 70 % männliche und 30 % weibliche Probanden. Nach dem Auftragen auf dem Agarosegel konnte gezeigt werden, dass nach 0 h, also bei Weiterverarbeitung der Proben direkt im Anschluss an die Probenentnahme, keine Aberrationen zu sehen waren (0 von 10 Proben). Nach 24 h waren in 50 % (5/10) der Proben Aberrationen zu finden. Bei der Weiterverarbeitung nach 48 h fanden sich in 70 % (7/10) der Proben Aberrationen. Die Ergebnisse der Versuchsreihe sind auch in der Tabelle 4 und in der Abbildung 6 graphisch dargestellt worden.

Pro.Nr	Geburtsdatum	Geschlecht	Aberration nach 0h	Aberration nach 24h	Aberration nach 48h
VP 1	18.11.1980	M	nein	ja	ja
VP 2	07.03.1981	M	nein	nein	ja
VP 3	22.05.1962	M	nein	nein	ja
VP 4	25.09.1979	M	nein	ja	ja
VP 5	25.06.1980	W	nein	ja	ja
VP 6	21.03.1975	W	nein	ja	ja
VP 7	12.03.1971	M	nein	nein	nein
VP 8	19.11.1979	W	nein	ja	ja
VP 9	02.09.1981	M	nein	nein	nein
VP 10	07.04.1978	M	nein	nein	nein

Tabelle 4: Die Tabelle zeigt alle Einzelheiten der Gruppe C, die aus 10 gesunden Probanden besteht und an unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht wurden. Pro.Nr. Probennummer, m männlich, w weiblich,

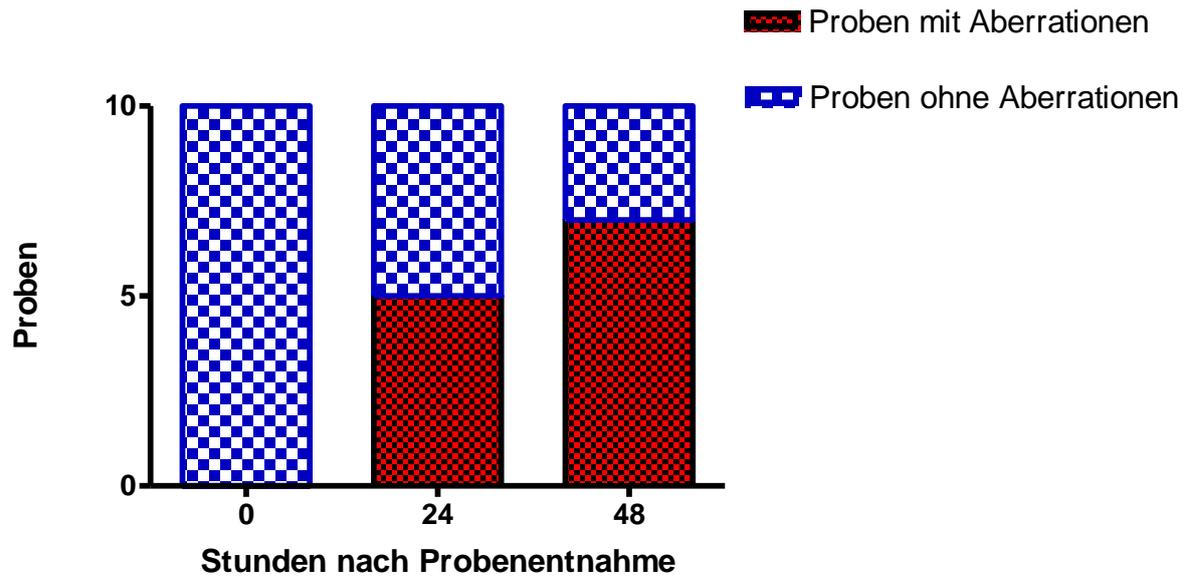


Abbildung 10: In der Abbildung ist der Zeitverlauf der Proben nach 0 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden aufgezeichnet.

4. Diskussion

4.1. Prospektiver Nachweis von MLL-Brüchen

Unser Ziel war es, Chemotherapie assoziierte Brüche am MLL-Gen von Patientenmaterial nachzuweisen, das primär von Patienten stammte die an einem Non-Hodgkin-Lymphom litten und nach dem mega-CHOEP Protokoll behandelt wurden. Es wurde schon gezeigt das Chemotherapie, im speziellen Topoisomerasehemmer wie z.B. Etoposid und auch Anthrazykline wie z. B. Doxorubicin, Brüche im MLL-Gen auf dem Chromosom 11q23 bei einer Therapie assoziierten AML (t-AML) induzieren kann (Super et al. 1993; Pedersen-Bjergaard et al. 1994; Megonigal et al. 2000; Felix et al. 1998).

Da in dem mega-CHOEP Behandlungsprotokoll sowohl Topoisomerasehemmer wie auch Anthrazykline enthalten sind, entsprach es unserer Vermutung, dass es wahrscheinlich zu MLL-Brüchen bei den Proben der Patienten kommen würde. Um diese Brüche am MLL-Gen nachzuweisen, wurde die inverse-PCR angewendet, die schon mehrfach benutzt wurde, um die MLL-Brüche bei Proben von t-AML Patienten aufzuzeigen (Felix et al. 1998; Meyer et al. 2005; Shams-Eldin et al. 2003). Die Brüche im MLL-Gen durch Topoisomerasehemmer konnten bereits retrospektiv mit Hilfe der inversen-PCR an konservierten Patientenproben nachgewiesen werden (Megonigal et al. 2000; Libura et al. 2005).

Uns gelang es während unserer Experimente diese Bruchpunkte am MLL-Gen bei Patienten, die aktuell eine Chemotherapie erhalten haben, darzustellen. Mit Hilfe der inversen-PCR untersuchten wir die Proben der an Non-Hodgkin-Lymphomen erkrankten Patienten. Die meisten Patienten hatten zum Zeitpunkt der Untersuchung den zweiten bzw. dritten Zyklus des Mega-Choep Behandlungsschema bereits erhalten, aber es gab auch Proben von Patienten die sich erst dem ersten Zyklus unterzogen haben (siehe Tabelle 3). Wir konnten bei 12 Proben von insgesamt 20 Proben aberrante Banden feststellen. Mittels Sequenzierung ließ sich unter anderem eine Inversion im MLL-Gen nachweisen. Die aberranten Banden wurden unter anderem auch bei Proben von Patienten festgestellt, die erst den ersten Zyklus des

Schemas erhalten hatten und somit noch Beginn ihrer Behandlung standen (siehe Tabelle 3). Somit konnten wir den Beweis liefern, dass bei Patienten die an einem Non-Hodgkin-Lymphom erkrankt waren und sich nach dem mega-CHOEP Schema behandeln ließen, bereits im Verlauf und am Beginn der Chemotherapie mit Topoisomerasehemmern schon Brüche im MLL-Gen entstehen können.

4.2. Aberrationen bei der Negativkontrolle

Nachdem wir in den ersten Experimenten in unseren Erwartungen bestätigt wurden, fanden sich erstaunlicherweise in der Negativkontrolle, die aus gesunden Erwachsenen und Neugeborenen bestand, ebenfalls aberrante Banden, also Brüche in der Chemotherapie-sensitiven Bruchpunktregion. Die Negativkontrollgruppe A1, die ausschließlich Proben von gesunden, nicht chemotherapierten Menschen enthielt, bestand aus 11 Probanden. Von den elf untersuchten Proben wurden bei fünf Proben aberrante Banden gefunden (siehe Tabelle 1). Bei den Proben der Neugeborenen waren sogar bei neun von zwölf Proben Aberrationen zu finden (siehe Tabelle 2). Da die Proben unterschiedliche Lagerungszeiten ex vivo aufwiesen, wurde ein Probenalterungsreihe gestartet, bei der wir wieder von zehn gesunden Erwachsenen eine ausreichende Menge an peripherem Blut entnahmen, dies zu verschiedenen Zeitpunkten aufarbeiten und dann weiter mit Hilfe der inversen PCR untersuchten. Es wurde zunächst direkt nach der Blutentnahme aufgearbeitet und dann wieder nachdem es 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert war und zuletzt nach 48 Stunden Lagerung bei Raumtemperatur (siehe Tabelle 4 und Abbildung 10). Durch die Versuchsreihe stellten wir fest, dass mit zunehmender Probenalterung auch die Aberrationen zunahm. Bei der direkten Aufarbeitung direkt nach der Blutentnahme wurden keine aberranten Banden entdeckt. Jedoch schon nach 24 Stunden Lagerung bei Raumtemperatur traten bei der Hälfte der Probe Aberrationen, also Brüche im MLL-Gen, auf. Dies steigerte sich noch bei den Proben die nach 48 Stunden Lagerung aufgearbeitet wurden. Dort fanden sich in sieben von zehn Proben Aberrationen des MLL-Gen, d.h. Brüche in der Chemotherapie sensitive Bruchpunktregion (siehe Tabelle 4, Abbildung 9 und Abbildung 10).

Durch diese neuen Erkenntnisse konnten wir annehmen, dass die Brüche in der bcr-region im MLL-Gen nicht ausschließlich durch Chemotherapeutika entstehen, sondern auch andere Ursachen haben können. Da prinzipiell der Bruch des MLL-Gens durch Apoptose beschrieben ist (Stanulla et al. 1997), bestand der Verdacht, dass die bei unseren Experimenten entstandenen Abberationen bei der inversen PCR, auch ebenfalls durch Apoptose entstanden sind.

4.3 Brüche im MLL-Gen bei Apoptose

Die Bruchpunkte die bei einer t-AML in der 8,3 kb großen breakpoint cluster region (bcr, Bruchpunktregion) vorkommen, liegen zumeist in der telomeren Hälfte dieser Region im Gegensatz zu den Brüchen die bei einer de novo AML vorkommen (Broeker et al. 1997).

Als die Bruchpunktregion des MLL-Gens in eine telomere und zentromere Hälfte geteilt wurden, konnte festgestellt werden, dass in der telomeren Hälfte eine „high-affinity scaffold attachment region“ (SAR) für Chemotherapie-assoziierte MLL-Brüche vorliegt (75% der t-AML Brüche), im Gegensatz zum „weak affinity scaffold attachment region“, welche in der centromeren Hälfte der Bruchpunktregion des MLL-Gens lokalisiert wurde und häufiger bei der de novo AML Bruchpunkte aufweist (75 % der Brüche bei de novo AML). Somit lag die Vermutung nahe, dass MLL-Brüche bei t-AML Patienten durch andere Ereignisse entstanden als die Brüche bei Patienten mit neu entstandener AML (Broeker et al. 1996).

Daraufhin wurde in der Bruchpunktregion des MLL-Gens ein Mutationsort entdeckt, der sehr sensitiv auf Topoisomerase-2-Hemmer reagiert (Aplan et al. 1997). Dieses Ergebnis ließ schon damals darauf schließen, dass diese durch Topoisomerase-2-Hemmer eingeleiteten Brüche des MLL-Gens, ein früher Schritt in Richtung MLL-Translokation und damit einer t-AML war (Aplan et al. 1997).

Im Verlauf konnte festgestellt werden, dass MLL-Brüche auch durch andere Faktoren ausser Chemotherapie wie z.B. TNF- α oder durch Wachstumsfaktorentzug, die auch als auslösende Apoptosefaktoren bekannt sind, verursacht werden konnte (Stanulla et al. 1997). Insofern lag nahe, dass Brüche im MLL Gen Teile einer generalisierenden Antwort der Zelle auf diese Apoptosestimulanzen war. Es wurde

außerdem gezeigt, dass die Brüche innerhalb des MLL-Gens mit der *higher order chromatin fragmentation*, also mit der Aufteilung des Chromatins, in Verbindung gebracht werden kann (Stanulla et al. 1997). Es wurde in vorherigen Untersuchungen schon gezeigt, dass die Fragmentierung des Chromatins zu Anfang einer Apoptose beobachtet wird und entsteht wahrscheinlich durch die Zellteilung der DNA-Schleife an ihrer Verankerungsseite mit der Kernmatrix (Bortner et al. 1995; Oberhammer et al. 1993). Diese Fragmentierung gilt als ein wichtiges Kriterium zur Identifikation der Apoptose und zur Unterscheidung vom nekrotischen Zelltod (Wyllie et al. 1980, White et al. 1993).

Mit Hilfe dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Chromatinfragmentierung, welche aufgrund von Apoptosestimulanzen bzw. der Einleitung der zellulären Apoptose, auftritt, zur chromosomalen Tranlokation am MLL-Gen führen kann (Stanulla et al. 1997).

Dahingehend darf diese Möglichkeit auch bei unseren Ergebnissen nicht vernachlässigt werden, da unsere Proben erst unabsichtlich und dann absichtlich zu späteren Zeitpunkten aufgearbeitet wurden. Die spontane Apoptose bei gelagerten Proben war daher als Ursache der Brüche im MLL Gen anzunehmen. Diese Beobachtung war neu und hat wesentliche Konsequenzen für die Aufarbeitung klinischer Proben.

4.4 Nachweis von Aberrationen in Patientenproben

Obwohl bekannt war, dass MLL-Fragmentation durch Apoptose-Induktoren auftreten kann, konnten wir hier erstmals zeigen, dass solche Aberrationen auch bei spontaner Apoptose in klinischen Patientenproben auftreten können. Es konnten mittels der inversen PCR Aberrationen im MLL-Gen von sowohl gesunden Erwachsenen und Neugeborenen als auch bei Patienten, die unter einem Non-Hodgkin-Lymphom litten und mit Chemotherapie behandelt wurden, nachgewiesen werden. Mit Bezug auf die unter dem Abschnitt 4.3 erläuterten Punkte ist daher die Interpretation der Ursache der MLL-Aberrationen nicht einfach. Da die meisten anderen Autoren diese Aberrationen bisher nur bei t-AML Patientenmaterial nachgewiesen haben, wurde diese im Wesentlichen als Anzeichen einer chemotherapiebedingten Schädigung

des Gens angesehen (Felix et al. 1998; Libura et al. 2005; Megonigal et al. 2000; Ng et al 2005; Pedersen-Bjergaard et al. 2005).

Von diesen Autoren wurde die inverse PCR Methode benutzt, um diese Aberrationen bei Proben von therapieassoziierten AML-Patienten nachzuweisen. Wir konnten jedoch zeigen, dass mit der inversen PCR nicht nur Topoisomerase-2-Hemmer induzierte MLL-Aberrationen nachgewiesen werden, sondern auch solche, die ohne Anwendung von Chemotherapeutika auftreten können.

Demzufolge bleibt offen, ob die ursprünglich als strikt Chemotherapie-assoziiert angesehenen Aberrationen im MLL-Gen, die mit Hilfe der inversen PCR entdeckt worden, durch Probenalterung, Apoptose oder Chemotherapie zu Stande gekommen ist.

Einschränkend müssen wir sagen, dass wir bei unseren Experimenten Insertionen und Inversionen nachweisen konnten, aber keine Translokationen und Tandemduplikationen. Im Gegensatz dazu wurden bei den vorhergehenden Experimenten unter Anwendung von Topoisomerase-2-Hemmern MLL-Tandem-Duplikationen, Translokationen und Deletionen nachgewiesen (Libura et al. 2005; Megonigal et al. 2000).

Beim Nachweis von Insertionen und Deletionen in der Xba1-Region kann daher grundsätzlich nie ausgeschlossen werden, dass es sich um apoptotisch bedingte Aberrationen handelt. Die auch ohne den Einfluss von t-AML-induzierenden chemotherapeutischen Wirkstoffen entstehen. Andererseits könnte man den Nachweis von Translokationen und Tandemduplikationen, die wir bei der Probenalterung nicht nachgewiesen haben, als Hinweis auf therapieassoziierte MLL-Aberrationen sehen, die durch solche Therapeutika hervorgerufen werden.

4.5 Konsequenzen

Für die weiteren Arbeiten die sich mit diesem Themengebiet beschäftigen, sollten weitergehende Aspekte berücksichtigt werden. Aufgrund unserer Beobachtungen vermuten wir, dass die Aufarbeitungszeit der Proben eine wichtige Rolle spielt, um die therapieassoziierten-MLL-Brüche von den Brüchen andere Ursache mit Hilfe der inversen PCR zu unterscheiden. Deshalb ist es auch für weitere Untersuchung essenziell, dass die Aufarbeitung innerhalb der ersten 12 Stunden nach Probenentnahme geschehen muss. Dies gilt besonders bei der Untersuchung von Patientenproben, bei denen man Chemotherapie assoziierte Schäden am MLL-Gen vermutet und diese mit Hilfe der inversen-PCR nachweisen möchte. Es ist besonders wichtig, diese Proben innerhalb der ersten 12 Stunden nach Probenentnahme zu bearbeiten, um durch Probenalterung verursachte Aberrationen am MLL-Gen auszuschließen.

Für zukünftige Untersuchungen ist es wichtig, die genaue Wirkweise der Topoisomerase-2-Hemmer am MLL-Gen zu untersuchen, da sie möglicherweise nicht direkt an der Entstehung der Brüche beteiligt sind sondern diese durch die Einleitung der zellulären Apoptose hervorrufen (Betti et al. 2005). Vor diesem Hintergrund stehen zwei Erklärungsmodelle zur Diskussion, die den Zusammenhang zwischen den Topoisomerase-2-Hemmern und der Entstehung der MLL-Brüche erklären.

Zum einen gibt es das „topoisomerase 2 mediation“ Modell. In diesem ist das Enzym direkt in der Erzeugung der Translokationen beteiligt ist (Super et al. 1993; Felix et al. 1998). Dieses wurde jedoch schon durch eine vitro Studie, in welcher die Beobachtungen drauf schließen ließen, dass die Zellteilung nicht nur direkt durch Topoisomerase-2-Hemmern initiiert wird, sondern auch durch verschiedene andere Chemotherapeutika aktiviert werden kann, in Frage gestellt (Sim et al. 2001).

Die andere Hypothese wird am besten als „apoptotic nuclease“ Modell bezeichnet. Nach diesem Modell entstehen die Fragmentierungen innerhalb des MLL-Gens in erster Linie durch Aktivierung von apoptotischen Nukleasen, welche dann zu Translokationen am Gen führen (Betti et al. 2001; Betti et al. 2003). Es konnte nämlich wiederum mit Hilfe eines in vitro Systems gezeigt werden, dass Translokationen durch die Exposition gegenüber Apoptoseaktivatoren erzeugt werden, die nicht mit Topoisomerasen-2-Hemmern in Verbindung stehen (Betti et al. 2001; Sim et al. 2001).

Um die Verbindung der Topoisomerase 2 mit den MLL-Brüchen noch genauer zu betrachten, musste man sich der Topoisomerase annehmen. Die Funktion der Topoisomerase 2 wurde mit Hilfe von Merbarone, welches ein katalytischer Inhibitor der Topoisomerase 2 ist, unterdrückt. Im Gegensatz zum Etoposid, welches direkt an der Topoisomerase bindet und diese anschließend an ihrer Arbeit hemmt sowie in der Folge Brüchen entstehen lässt, interagiert und bindet Merbarone nicht direkt an die Topoisomerase, sondern hemmt die enzymatische Aktivität bevor es überhaupt zur Zellteilung kommt. Dann entstehende DNA-Brüche sind daher nicht als Konsequenz der Interaktion mit der Topoisomerase 2 aufzufassen (Fortune et al. 1998).

Da mit Hilfe dieser Methode der Einfluss der Topoisomerase 2 und somit auch der Topoisomerase-2-Hemmer ausgeschlossen wurde, konnte man den Einfluß der Apoptoseaktivatoren weiter untersuchen. Deshalb wurden in weiteren in vitro Untersuchungen die Bruchpunktregion des MLL apoptotische Aktivatoren, wie z.B. anti-CD95 Antikörper ausgesetzt, um Brüchen am MLL-Gen hervorzurufen (Betti et al. 2005). Um den Mechanismus der Zellteilung und der Umlagerung der Basenpaare genauer zu betrachten, wurde die gesamte bcr des MLL-Gens in einen episomalen pREP4 Vektor transferiert und in eine menschliche Lymphoblastom TK 6 Zelle transfiziert (Betti et al. 2005). Plasmide, die entweder das MLL-Gen oder ein Deletions-Konstrukt desselben Gens von mindestens 367 Basenpaaren enthielten, waren an derselben Position fragmentiert wie auch das genomische MLL-Gen, nachdem es den apoptotischen Stimulanzen ausgesetzt war. Nach weiterer Betrachtung der fragmentierten Region des MLL-Gens zeigte sich einerseits eine Kernmatrix-Kontaktregion (nuclear matrix attachment region), welche hinweisend auf eine Beteiligung apoptotischer Nukleasen war und andererseits eine potentiell starke Bindungsstelle für Topoisomerasen II (Betti et al. 2005). Da man mit Hilfe des katalytischen Inhibitors Merbarone die Topoisomerase II inaktiviert hatte und es trotzdem zu einem Bruch des MLL-Gens kam, entwickelten die Autoren die These, dass der initiale Schritt bei MLL-Brüchen nicht durch die Topoisomerase 2 vermittelt wird (Betti et al. 2005).

Trotzdem spielt die Topoisomerase eine weiter wichtige Rolle bei der Entstehung dieser MLL-Brüche, da sich trotz allem am Bruchpunkt auch eine Bindungsstelle für die Topoisomerase gezeigt hat. Wahrscheinlich ist die Hypothese, dass die Topoisomerase initial und ausschließlich an der Entstehung dieser Brüchen beteiligt ist,

so nicht zutreffend. Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass die MLL-Brüche nicht nur durch Topoisomerase-2-Hemmer ausgelöst werden, sondern auch durch spontane Apoptose entstehen können, wie unserem Fall durch Probenalterung ausgelöst. Deshalb ist für zukünftige Untersuchungen sehr interessant, den genauen Mechanismus zu erforschen, wie Topoisomerase-2-Hemmer die Brüche am MLL-Gen genau verursachen und insbesondere wie es bei der dann erfolgten DNA-Reparatur zu MLL-Translokationen kommen kann, die als auslösend für eine t-AML angesehen werden. Unsere Untersuchungen weisen in jeden Fall darauf hin, dass bei der Untersuchung von Chemotherapie-assoziierten Veränderungen des MLL-Gens in Patientenproben mittels inverser-MLL-PCR auf ein rasches Prozessieren der Proben zu achten ist, um MLL-Aberrationen die durch spontane Apoptose bedingt sind, auszuschließen.

5. Zusammenfassung

Zentraler Gegenstand der Untersuchungen in dieser Arbeit war der prospektive Nachweis von MLL-Aberrationen bei Patienten die Chemotherapie erhalten. Als Kollektiv wurden Patienten gewählt, die an einem Non-Hodgkin-Lymphom erkrankt waren. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass solche MLL-Aberrationen typischerweise bei durch Chemotherapie induzierten sekundären akuten myeloischen Leukämien (t-AML) auftreten. Es sollte daher untersucht werden, inwiefern sich diese Aberrationen bereits unter Chemotherapie nachweisen lassen. Als Vergleichskollektiv diente peripheres Blut von gesunden Erwachsenen und Nabelschnurblut. Es stellte sich jedoch im Laufe der Untersuchungen heraus, dass MLL-Brüche nicht nur bei den an Non-Hodgkin-Lymphom Erkrankten nachweisbar waren, sondern sich auch im Vergleichskollektivs von gesunden Erwachsenen und im Nabelschnurblut nachweisen ließen.

Da die Proben nicht alle zeitgleich nach Entnahme bearbeitet wurden, hatten wir den Verdacht, dass die Aberrationen durch Probenalterungen entstanden sein konnten. Wir führten daher einen Probenalterungsversuch durch, indem wir das Patientenmaterial nach 0 Stunden, nach 24 Stunden und nach 48 Stunden Lagerung ex vivo bearbeiteten. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass nach 0 Stunden noch keine Aberrationen auftraten, wohingegen nach 24 Stunden in 50 % und nach 48 Stunden in 70 % der Proben, Aberrationen des MLL-Gens nachgewiesen werden konnten.

Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Brüche bei den länger gelagerten Proben durch apoptotische Vorgänge entstanden sind. Die Beobachtung, dass die spontane Apoptose von Patientenproben Ursache für die t-AML-assoziierten MLL-Aberrationen ist, ist neu und wichtig für die weitere Aufarbeitung von klinischen Proben. Daher sollte bei zukünftigen Untersuchungen auf therapieassoziierte Aberrationen des MLL-Gens auf rasches Prozessieren geachtet werden. Als weiteres Untersuchungsziel für die Zukunft ist es außerdem interessant, den genauen Mechanismus der Induktion von MLL-Aberrationen durch Topoisomerase-2-

Hemmer zu untersuchen (direkte Wirkung vs. indirekte Wirkung durch Auslösen der Apoptose).

6. Literaturverzeichnis

Aplan P D, Chervinsky D S, Stanulla M and Burhans W C (1996): Site-specific DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region induced by topoisomerase II inhibitors. *Blood* **87**:2649-58.

Bacher U, Kern W, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T and Schoch C (2005): Population-based age-specific incidences of cytogenetic subgroups of acute myeloid leukemia. *Haematologica* **90**:1502-10.

Basecke J, Whelan J T, Griesinger F and Bertrand F E (2006): The MLL partial tandem duplication in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* **135**:438-49.

Bennett J M, Catovsky D, Daniel M T, Flandrin G, Galton D A, Gralnick H R and Sultan C (1976): Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* **33**:451-8.

Betti C J, Villalobos M J, Diaz M O and Vaughan A T (2001): Apoptotic triggers initiate translocations within the MLL gene involving the nonhomologous end joining repair system. *Cancer Res* **61**:4550-5.

Betti C J, Villalobos M J, Diaz M O and Vaughan A T (2003): Apoptotic stimuli initiate MLL-AF9 translocations that are transcribed in cells capable of division. *Cancer Res* **63**:1377-81.

Betti C J, Villalobos M J, Jiang Q, Cline E, Diaz M O, Loredó G and Vaughan A T (2005): Cleavage of the MLL gene by activators of apoptosis is independent of topoisomerase II activity. *Leukemia* **19**:2289-95.

Blanco J G, Edick M J, Relling M V (2004): Etoposide induces chimeric Mll gene fusions. *FASEB J* **18**: 173-175

Bloomfield C D, Archer K J, Mrozek K, Lillington D M, Kaneko Y, Head, Dal Cin P and Raimondi S C (2002): 11q23 balanced chromosome aberrations in treatment-related myelodysplastic syndromes and acute leukemia: report from an international workshop. *Genes Chromosomes Cancer* **33**:362-78.

Bortner C D, Oldenburg N B and Cidlowski J A (1995): The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol* **5**:21-6.

Broeker P L, Super H G, Thirman M J, Pomykala H, Yonebayashi Y, Tanabe S, Zeleznik-Le N and Rowley J D (1996): Distribution of 11q23 breakpoints within the MLL breakpoint cluster region in de novo acute leukemia and in treatment-related acute myeloid leukemia: correlation with scaffold attachment regions and topoisomerase II consensus binding sites. *Blood* **87**:1912-22.

Caligiuri, M A, Schichman S A, Strout M P, Mrozek K, Baer M R, Frankel S R, Barcos M, Herzig G P, Croce C M and Bloomfield C D (1994): Molecular rearrangement of the ALL-1 gene in acute myeloid leukemia without cytogenetic evidence of 11q23 chromosomal translocations. *Cancer Res* **54**:370-3.

Dimartino J F and Cleary M L (1999): MLL rearrangements in haematological malignancies: lessons from clinical and biological studies. *Br J Haematol* **106**:614-26.

Djabali M, Selleri L, Parry P, Bower M, Young B D and Evans G A (1992): A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukaemias. *Nat Genet* **2**:113-8.

Felix C A (1998): Secondary leukemias induced by topoisomerase-targeted drugs. *Biochim Biophys Acta* **1400**:233-55.

Fortune J M and Osheroff N (1998): Merbarone inhibits the catalytic activity of human topoisomerase IIalpha by blocking DNA cleavage. *J Bio Chem.* **273**:17643-50.

Huret J L, Dessen P and Bernheim A (2001): An atlas of chromosomes in hematological malignancies. Example: 11q23 and MLL partners. *Leukemia* **15**:987-9.

Libura J, Slater D J, Felix C A and Richardson C (2005): Therapy-related acute myeloid leukemia-like MLL rearrangements are induced by etoposide in primary human CD34+ cells and remain stable after clonal expansion. *Blood* **105**:2124-31.

Megonigal M D, Cheung N K, Rappaport E F, Nowell P C, Wilson R B, Jones D H, Addya K, Leonard D G, Kushner B H, Williams T M, Lange B J and Felix C A (2000): Detection of leukemia-associated MLL-GAS7 translocation early during chemotherapy with DNA topoisomerase II inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:2814-9.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G and Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**:263-73.

Ng A, Taylor G M, Wynn R F and Eden O B (2005): Effects of topoisomerase 2 inhibitors on the MLL gene in children receiving chemotherapy: a prospective study. *Leukemia* **19**:253-9.

Oberhammer F, Wilson J W, Dive C, Morris I D, Hickman J A, Wakeling A E, Walker P R and Sikorska M (1993): Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J* **12**:3679-84.

Pedersen-Bjergaard J (2005): Insights into leukemogenesis from therapy-related leukemia. *N Engl J Med* **352**:1591-4.

Pedersen-Bjergaard J and Rowley J D (1994): The balanced and the unbalanced chromosome aberrations of acute myeloid leukemia may develop in different ways and may contribute differently to malignant transformation. *Blood* **83**:2780-6.

Pedersen-Bjergaard, J and Andersen M K (1998): Secondary or therapy-related MDS and AML and their chromosome aberrations: important to study but difficult to establish causality. *Haematologica* **83**:481-2.

Pedersen-Bjergaard J, Specht L, Larsen S O, Ersboll J, Struck J, Hansen M M, Hansen H H and Nissen N I (1987): Risk of therapy-related leukaemia and preleukaemia after Hodgkin's disease. Relation to age, cumulative dose of alkylating agents, and time from chemotherapy. *Lancet* 1987;**2**:83-8.

Pedersen-Bjergaard J, Johansson B and Philip P (1994): Translocation (3;21)(q26;q22) in therapy-related myelodysplasia following drugs targeting DNA-topoisomerase II combined with alkylating agents, and in myeloproliferative disorders undergoing spontaneous leukemic transformation. *Cancer Genet Cytogenet* **76**:50-5.

Quesnel B, Kantarjian H, Bjergaard J P, Brault P, Estey E, Lai J L, Tilly H, Stoppa A M, Archimbaud E, Harousseau J L and et al. (1993): Therapy-related acute myeloid leukemia with t(8;21), inv(16), and t(8;16): a report on 25 cases and review of the literature. *J Clin Oncol* **11**:2370-9.

Rubnitz J E, Raimondi S C, Tong X, Srivastava D K, Razzouk B I, Shurtleff S A, Downing J R, Pui C H, Ribeiro R C and Behm F G (2002): Favorable impact of the t(9;11) in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* **20**:2302-9.

Schaich M, Harbich-Brutscher E, Pascheberg U, Mohr B, Soucek S, Ehninger G and Illmer T (2002): Association of specific cytogenetic aberrations with *mdr1* gene expression in adult myeloid leukemia and its implication in treatment outcome. *Haematologica* **87**:455-64.

Schichman S A, Caligiuri M A, Gu Y, Strout M P, Canaani E, Bloomfield C D and Croce C M (1994): ALL-1 partial duplication in acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:6236-9.

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, Kinkel U, Schoch C, Heinecke A, Haase D, Haferlach T, Büchner T, Wörmann 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.

Schoch C, Schnittger S, Klaus M, Kern W Hiddemann W, and Haferlach T (2003): AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood* **102**:2395-402.

Shams-Eldin H, Debierre-Grockiego F and Schwarz R T (2003): Chased PCR: A modified inverse PCR technique to characterize flanking regions of AT-rich DNA fragments. *J Mol Microbiol Biotechnol* **6**:1-5.

Shih L Y, Liang D C, Fu J F, Wu J H, Wang P N, Lin T L, Dunn P, Kuo M C, Tang T C, Lin T H and Lai C L (2006): Characterization of fusion partner genes in 114 patients with de novo acute myeloid leukemia and MLL rearrangement. *Leukemia* **20**:218-23.

Sim S P, and Liu L F (2001): Nucleolytic cleavage of the mixed lineage leukemia breakpoint cluster region during apoptosis. *J Biol Chem* **276**:31590-5.

Stanulla M, Wang J, Chervinsky D S, Thandla S and Aplan P D (1997): DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region is a specific event which occurs as part of higher-order chromatin fragmentation during the initial stages of apoptosis. *Mol Cell Biol* **17**:4070-9.

Studel C, Wermke M, Schaich M, Schakel U, Illmer T, Ehninger G and 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**:237-51.

Super, H J, McCabe N R, Thirman M J, Larson R A, Le Beau M M, Pedersen-Bjergaard J, Philip P, Diaz M O and Rowley J D (1993): Rearrangements of the MLL gene in therapy-related acute myeloid leukemia in patients previously treated with agents targeting DNA-topoisomerase II. *Blood* **82**:3705-11.

Swansbury G J, Slater R, Bain B J, Moorman A V and Secker-Walker L M (1998): Hematological malignancies with t(9;11)(p21-22;q23)--a laboratory and clinical study of 125 cases. European 11q23 Workshop participants. *Leukemia* **12**:792-800.

Tkachuk T, Tkachuk D C, Kohler S and Cleary M L (1992): Involvement of a homolog of *Drosophila trithorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* **71**:691-700.

White E (1993): Death-defying acts: a meeting review on apoptosis. *Genes Dev* **7**:2277-84.

Wyllie A H, Kerr J F and Currie A R (1980): Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* **68**:251-306.

Ziemin-van-der Poel S, McCabe N R, Gill H J, Espinosa R III, Patel Y, Harden A, Rubinelli P, Smith S D, LeBeau M M and Rowley J D (1991): Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**:10735-10739.

Lebenslauf

Am 02.09.1981 wurde ich als Sohn von Dr. Mahmoud Karim, Kinderarzt und Mahin Karim, Hausfrau geboren. Ich besuchte die Grundschule Hüserstraße von 1988 bis 1992. Von 1992 bis 2001 war ich Schüler des Gymnasiums Langenberg, an welchem ich 2001 die Allgemeine Hochschulreife erlangte. Im Herbst 2001 begann ich mein Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen. Dieses beendete ich Sommer 2008 mit dem erfolgreichen Bestehen des Staatsexamens und dem Erlangen der Approbation.

Seit 01.01.2009 bin ich als Assistenzarzt in der Klinik für Urologie in Krefeld-Uerdingen tätig.