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

**Nachweis zytogenetischer Aberrationen nach Chemotherapie zur diagnostischen
Früherkennung therapieassoziiierter hämatologischer Neoplasien**

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

von
Claudia Riechel
aus
Osterode/Harz

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

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

II. Berichtstatter/in:

III. Berichtstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Akute Myeloische Leukämie (AML).....	1
1.2	Myelodysplastisches Syndrom (MDS).....	2
1.3	Häufige Translokationen bei AML/MDS	2
1.3.1	AML1/ETO	2
1.3.2	Inv(16).....	3
1.3.3	PML-RAR α	3
1.3.4	BCR-ABL	4
1.4	t-AML und t-MDS	5
1.5	Auslösende Faktoren und Agenzien	6
1.6	Fragestellung dieser Arbeit	7
2	Material und Methoden.....	8
2.1	Geräte und Reagenzien	8
2.2	Probenmaterial	9
2.3	Probenaufarbeitung	11
2.3.1	Aufarbeitung der HL-60-, K562- und Kasumi-1-Zellen.....	11
2.4	RNA-Extraktion	11
2.5	Bestimmung der Konzentration von RNA.....	12
2.6	Reverse Transkription/cDNA-Synthese.....	12
2.7	PCR mit Hilfe des Light Cyclers	13
2.8	Konventionelle Reverse-Transkriptase (RT)-PCR.....	14
2.9	Durchführung der primären und nested PCR	15
2.10	Primer	16
2.11	Agarosegelherstellung und Elektrophorese.....	16
2.12	Herstellung der Verdünnungsreihen für die RT-PCR und die Real-Time-PCR	17
3	Ergebnisse	18
3.1	Patientendaten.....	18
3.2	Sensitivitätsnachweis in der RT- und Real-Time-PCR	19
3.2.1	Verdünnungsreihen für t(8;21).....	19
3.2.2	Verdünnungsreihen für inv(16).....	20
3.2.3	Verdünnungsreihen für t(15;17).....	22
3.2.4	Verdünnungsreihen für t(9;22).....	23

3.3	Transkriptnachweis in der Real-Time-PCR	25
3.3.1	Nachweis der Translokation t(15;17) in der Real-Time-PCR	25
3.3.2	Real-Time-PCR von t(8;21)	29
3.3.3	Real-Time-PCR von inv(16)	29
3.3.4	Real-Time-PCR von t(9;22)	29
3.4	Primäre und nested RT-PCR der Proben mit positivem Transkriptnachweis in der Real-Time-PCR	29
4	Diskussion	33
5	Zusammenfassung	38
6	Literaturverzeichnis	39

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Patientencharakteristika.....	10
Tab. 2: Primer.....	16
Tab. 3: Zellzahl der Leukapheresate.....	18
Tab. 4: Übersicht der erreichten Sensitivitätslevel der verschiedenen Methoden.....	24
Tab. 5: Anzahl der positiven Proben in der Real-Time-PCR.....	27
Tab. 6: Zykluszahl der Real-Time-PCR bis zum Nachweis von Transkript oder Referenzgen.....	27
Tab. 7: Positive Ergebnisse von t(15;17) mit Diagnose.....	28
Tab. 8: Übersicht der Proben mit Transkriptnachweis von PML-RAR α in der Real-Time-PCR und RT-PCR.....	31
Tab. 9: Nachweis der Translokationen in der Real-Time-PCR unterteilt in Patient vs. Spender und Alter.....	32

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Verdünnungsreihe t(8;21) primäre und nested RT-PCR.....	19
Abb. 2: Verdünnungsreihe t(8;21) Real-Time-PCR.....	20
Abb. 3: Verdünnungsreihe inv(16) primäre und nested PCR.....	21
Abb. 4: Verdünnungsreihe inv(16) Real-Time-PCR.....	21
Abb. 5: Verdünnungsreihe t(15;17) primäre und nested RT-PCR.....	22
Abb. 6: Verdünnungsreihe t(15;17) Real-Time-PCR.....	23
Abb. 7: Verdünnungsreihe t(9;22) primäre und nested RT-PCR.....	24
Abb. 8: Nachweis von t(15;17) in Patientenprobe Nr. 5.....	25
Abb. 9: Nachweis von t(15;17) in Patientenprobe Nr. 9 und 10.....	26
Abb. 10: Nachweis von t(15;17) in Patientenprobe Nr. 13, 14 und 17.....	26
Abb. 11: Anzahl der Zyklen bis zum Transkriptnachweis.....	28
Abb. 12: abl-PCR der Patientenproben.....	29
Abb. 13: primäre und nested PCR für PML-RAR α der Patientenproben Nr. 5, 10 und 14....	30
Abb. 14: primäre und nested PCR für PML-RAR α der Patientenproben Nr. 13 und 17.....	30
Abb. 15: primäre und nested PCR für PML-RAR α der Patientenprobe Nr. 9.....	31

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABL	humanes Abelson-Protoonkogen
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APL	akute Promyelozyten-Leukämie
ATRA	All-Trans-Retinoid-Säure
BCR	breakpoint cluster region
bp	Basenpaare
bzw	beziehungsweise
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CML	chronisch myeloische Leukämie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ETO	Eight-twenty-one
G6PD	Glucose 6-Phosphat Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyten-colony stimulating factor
inv(16)	Inversion(16)
MDS	myelodysplastisches Syndrom
min	Minute
MM	Multiples Myelom
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PML	Promyelozyten-Leukämie
RAR α	Retinoid-Acid Receptor-alpha
RT	reverse Transkriptase
Tab	Tabelle
t-AML/MDS	therapieassoziierte akute myeloische Leukämie/myelodysplastisches Syndrom
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
s.	siehe

1 Einleitung

1.1 Akute Myeloische Leukämie (AML)

Akute myeloische Leukämien sind eine heterogene Gruppe an Erkrankungen, die durch die Infiltration des Knochenmarkes und anderer Gewebe durch blastäre myeloische Zellen charakterisiert sind. Die gesunde Hämatopoese kann nicht mehr suffizient erfolgen, die Folgen sind Granulozytopenie, Thrombozytopenie und Anämie. Die Inzidenz der akuten myeloischen Leukämie beträgt etwa 2,4 - 4 Erkrankungen auf 100.000 Einwohner. Die Inzidenz der AML steigt mit dem Alter, unter 65 Jahren beträgt sie 1,3 auf 100.000 Einwohner, über 65 Jahren beträgt sie 12,6 auf 100.000 Einwohner (Bishop 1997, Löwenberg et al. 1999). Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 65 bis 70 Jahren (Hiddemann et al. 1999). In der Therapie der AML wurden in den letzten zwei Jahrzehnten aufgrund besserer supportiver Maßnahmen und der Therapieintensivierung inklusive der allogenen Knochenmarkstransplantation große Fortschritte erzielt. Durch die Standardinduktionstherapie erreichen zwischen 52-72% der Patienten eine komplette Remission (Bishop JF 1997, Preisler et al. 1987). Dennoch entwickelt ein erheblicher Anteil der Patienten ein Rezidiv und die Dauer der kompletten Remission liegt im Mittel bei 12 Monaten (Bishop 1996). Die Zeit bis zum Erreichen einer Remission und die Dauer der kompletten Remissionen stellen wichtige prognostischen Faktoren in Bezug auf ein verlängertes Überleben dar. Patienten, jünger als 60 Jahre, sprechen zu 75% auf eine Induktionstherapie an, die 5 Jahres-Überlebensrate liegt bei 35-50% (Wiernik et al. 1992, Cassileth et al. 1998). Ältere Patienten > 60 Jahre sprechen nur noch zu 45-55% auf eine Induktionstherapie an, und ihre 5 Jahres-Überlebensrate liegt bei 10% (Löwenberg et al. 1998, Hiddemann et al. 1999). Das liegt unter anderem am verminderten Allgemeinzustand der Patienten sowie am vermehrten Auftreten ungünstiger Karyotypen und sekundärer Leukämien, beispielsweise nach vorangegangenem myelodysplastischen Syndrom (MDS). Als einer der wichtigsten Prognoseparameter in der AML gilt die Typisierung des Karyotyps. Chromosomale Veränderungen in den malignen Blasten lassen sich bei circa 60% aller AML nachweisen (Keating et al. 1988, Mrozék et al. 1997). Die drei häufigsten balancierten/strukturellen Chromosomenaberrationen bei AML sind die Translokationen t(8;21)(q22;q22) und t(15;17)(q22;q11) und die Inversion(16) (inv(16))(p13;q22) (Bacher et al. 2005). Das Auftreten von t(8;21), t(15;17) oder inv(16) ist mit einer günstigen Prognose verbunden (Fröhling et al. 2006).

1.2 Myelodysplastisches Syndrom (MDS)

MDS gehören zu einer Gruppe heterogener Stammzellerkrankungen des blutbildenden Systems, die durch eine ineffektive, dysplastische Hämatopoese charakterisiert sind. Leitsymptom des MDS ist die Anämie, die oft therapierefraktär auf übliche Therapiemaßnahmen wie die Gabe von Eisen, Vitamin B12 oder Folsäure ist. MDS treten häufiger im höheren Lebensalter auf, in Studien ist ein Altersmedian zwischen 65 und 71 Jahren beschrieben (Morel et al. 1993, White et al. 1994, Solé et al. 2000). Die Inzidenz wird mit 3-5 Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr angegeben, jedoch findet sich auch hier bei den über 70-Jährigen eine höhere Inzidenz von 20 Fällen pro 100.000 Einwohner (Aul et al. 2001). Als wichtigster Prognosefaktor gilt auch bei den MDS der Karyotyp, der zwischen zytogenetisch günstigen, intermediären und ungünstigen Aberrationen differenziert. Bei Patienten mit Niedrig-Risiko-MDS kann eine supportive Therapie mit antiinfektiöser Prophylaxe, frühzeitiger Infektbehandlung, Bluttransfusionen und eventuellem Einsatz von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren durchgeführt werden. Ein kurativ verfolgter Therapieansatz beim MDS ist die allogene Knochenmarktransplantation. In der Literatur wird in etwa der Hälfte aller Patienten mit MDS das Auftreten chromosomaler Aberrationen beschrieben, hierunter finden sich sowohl einzeln auftretende Chromosomenveränderungen sowie komplexe Aberrationen.

1.3 Häufige Translokationen bei AML/MDS

1.3.1 AML1/ETO

Die Translokation t(8;21) mit ihrem Fusionstranskript AML1/ETO ist eine der häufigsten chromosomalen Aberrationen bei den AML, sie tritt in etwa 5-10% aller de novo AML auf (Wattjes et al. 2000). Des Weiteren kann sie in etwa 12-15% aller Leukämien sowie in 40% des AML-M2-Subtyps nachgewiesen werden. Bäsecke et al. (2002a) zeigten in ihrer Arbeit den Nachweis von AML1/ETO in 4 von 20 Knochenmarkaspiraten (20%) gesunder Erwachsener. Ebenso konnte der AML1/ETO-Nachweis in 63 von 156 Nabelschnurblutproben (40%) erbracht werden. Die Translokation t(8;21) beruht molekulargenetisch auf einer Fusion des ETO (Eight-Twenty-One)-Gens auf der chromosomalen Bande 8q22 mit dem AML1-Gen auf der chromosomalen Bande 21q22. AML1 kodiert für eine Untereinheit des core-binding-factors (CBF), einen heterodimeren Transkriptionsfaktor. Der CBF spielt eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von „Master-Genen“ der hämatologischen Entwicklung (Asou 2003). Das ursprüngliche AML1-Gen verliert durch die Fusion die Aktivität als Transkriptionsfaktor in der Ausreifung der hämatopoetischen Zellen. AML1/ETO übt seine leukämogene Funktion am ehesten durch

eine dominant negative Hemmung der Funktion des Wildtyp Gens AML1 aus (Lutterbach und Hiebert 2000, Higuchi et al. 2000). In vivo und in vitro Modelle lassen vermuten, dass das Fusionsprotein AML1/ETO zu einer verstärkten Ausreifung und Selbsterneuerung von Stammzellen führt. Dieser eine Schritt der Onkogenese reicht aber vermutlich nicht zur Ausbildung einer Leukämie aus (Downing 1999), sondern ist abhängig von weiteren genetischen Veränderungen. Bei der de novo AML bei Erwachsenen ist das Vorkommen der Translokation t(8;21) mit einer relativ guten Prognose verbunden. So findet sich hier eine hohe komplette Remissionsrate von etwa 90% und die höchste Wahrscheinlichkeit (50-70%), sich nach fünf Jahren noch in kompletter Remission zu befinden.

1.3.2 Inv(16)

Die perizentrische Inversion des Chromosoms 16 ist in etwa 10% aller AML nachweisbar (Langabeer et al. 1997). 1982 wurde erstmals eine Veränderung des Chromosoms 16 (del(16)(22)) bei fünf Patienten mit AML beschrieben, alle fünf Patienten zeigten außerdem eine Eosinophilie des Knochenmarks, eine inv(16) tritt hiernach bei AML M4 mit abnormen Eosinophilen auf. In seltenen Fällen ist die inv(16) auch bei chronischen myeloischen Leukämien (CML), bei MDS und bei t-AML nachweisbar (van Dongen et al. 1999, Monahan et al 1996), bei Gesunden konnte diese Translokation bislang nicht nachgewiesen werden. Molekulargenetisch resultiert die inv(16) aus einer Fusion zwischen dem CBF β -Gen der chromosomalen Bande 16q22 und dem MYH11 (myosin heavy chain)-Gen der chromosomalen Bande 16p13. Es kommt hierbei zu einem Fusionsgen, dem CBF β /MYH11. Das Fusionsprotein trägt zu einem komplexen Transformationsgeschehen in hämatopoetischen Stammzellen bei. Es ist jedoch noch nicht bekannt, ob und gegebenenfalls wie das CBF β /MYH11 in die maligne Transformation in hämatopoetischen Stammzellen eingreift. Leukämien mit Nachweis von inv(16) sind mit einer guten Prognose assoziiert, komplette Remissionen werden in 70-80% der Fälle erreicht. Die mediane Dauer der kompletten Remission liegt zwischen 17 und mehr als 54 Monaten (Stock und Estrov 2000).

1.3.3 PML-RAR α

Bei der Translokation t(15;17) kommt es zu einer Fusion des PML (Promyelozyten Leukämie)-Gens auf Chromosom 15 mit dem Retinoid Acid Receptor α (RAR α)-Gen auf Chromosom 17 (de Thé et al. 1990). Die Translokation ist in bis zu 90% aller akuten Promyelozytenleukämien (APL) nachweisbar. PML-RAR α konnte bisher erst einmal in gesunden Zellen nachgewiesen werden (Quina et al. 2000). Das RAR α -Gen kodiert für einen

Retinolsäurerezeptor (Alcalay et al. 1991). PML stellt einen Tumorsuppressor dar, RAR α fördert die Differenzierung der Zellen und unterdrückt durch Interaktionen mit Retinolsäurederivaten das Wachstum der normalen Hämatopoese. Das aberrante Fusionsprotein inhibiert durch Bildung von Heterodimeren die Funktion von nicht verändertem PML und RAR α und verhindert so die Ausdifferenzierung der Zellen, damit kommt es zur Akkumulation unvollständig ausgereifter promyelozytärer Vorläuferzellen. Die APL ist mit einer guten Prognose assoziiert und zeichnet sich durch ein deutliches Ansprechen auf eine Therapie mit all-trans Retinolsäure, z.B. in Kombination mit Cytosinarabinosid, aus. Eine solche Therapie führt im Gegensatz zu anderen zytostatischen Therapien nicht zu einer gesteigerten Apoptose, sondern zu einer Differenzierung der leukämischen Zellen. Unter der Behandlung kann in 70-85% der Fälle eine komplette Remission erreicht werden (Lengfelder et al. 2009). Ein in Langzeitremission persistierender oder neu aufgetretener Nachweis von PML-RAR α deutet auf ein drohendes Rezidiv hin.

1.3.4 BCR-ABL

Das Philadelphia-Chromosom ist charakteristisch für die chronische myeloische Leukämie (CML) und tritt bei dieser in über 90% der Fälle auf. Daneben kommt es in ungefähr 5% der Fälle von akuten lymphatischen Leukämien (ALL) bei Kindern und in 20-50% der Fälle von ALL bei Erwachsenen vor. Bei AML kann es in etwa 2% der Fälle nachgewiesen werden (Kurzrock et al. 1987), die dann einer Gruppe mit schlechter Prognose zugeordnet werden (Fröhling et al. 2006). Daneben wurde auch bei 30% gesunder Erwachsener in PCR (Polymerase-Kettenreaktion)-Untersuchungen mit hoher Sensitivität (10^{-8}) BCR-ABL-Transkripte nachgewiesen (Biernaux et al. 1995, Bose et al 1998). Da BCR-ABL in Nabelschnurblut nicht nachgewiesen werden konnte und die Transkriptzahl mit dem Alter ansteigt, scheint BCR-ABL erworben und nicht vererbt zu werden (Biernaux et al. 1995). Molekulargenetische Analysen haben ergeben, dass die Translokation mit einer Fusion von 3' Sequenzen des Tyrosinkinase-c-ABL-proto-Onkogens auf Chromosom 9 mit den 5' Sequenzen des BCR Gens auf Chromosom 22 einhergeht (Groffen et al. 1984). Das BCR-ABL-Fusionsgen zeigt eine zum ursprünglichen ABL-Protein gesteigerte Tyrosinkinase-Aktivität, die an der Regulation von Signaltransduktionswegen, Zelltod und Zellproliferation sowie an Zell-Zell-Adhäsionen beteiligt ist (van Dongen et al. 1999). Die maligne Transformation durch BCR-ABL scheint auf drei grundsätzlichen Mechanismen zu beruhen, auf einer veränderten Adhäsion an das Knochenmarkstroma, an einer verminderten Apoptose sowie an einer gesteigerten Proliferation (Deiniger et al. 2000). Der Nachweis des BCR-ABL-Fusionstranskriptes mit Hilfe der RT-PCR wird in der Nachsorge zum Nachweis

einer MRD herangezogen. In Beobachtungen bei Patienten mit AML nach Knochenmarktransplantation war ein erneuter Nachweis des Fusionsgens mit einem Rezidiv gleichzusetzen (van Dongen et al. 1999).

1.4 t-AML und t-MDS

Mit dem Begriff sekundäre Leukämien werden zwei Formen der AML bezeichnet. Zum einen Leukämien, die aus einem de novo oder therapieassoziierten MDS (t-MDS) hervorgeht, zum anderen Leukämien, die als Folge einer Exposition gegenüber äußeren Faktoren, wie beispielsweise nach Chemo- oder Strahlentherapie auftreten. Letztere werden als t-AML bezeichnet. 10-30% aller Leukämien sind therapieassoziierte Leukämien (Leone et al. 1999 und 2007). Gerade für Patienten mit Hodgkin (HL)- und Non-Hodgkin-Erkrankungen (NHL) und soliden Neoplasien wie Brust-, Ovar- oder Hodenkarzinomen spielt das Vorkommen von therapieassoziierten Leukämien eine immer größere Rolle, da die Primärtherapie deutlich verbessert ist. Es werden heute Langzeitremissionen erreicht und es treten klonale Zweitereignisse und damit Zweit- und Drittmalignome bei diesen Patienten auf, die die Patienten früher aufgrund der schlechteren Prognose der Primärerkrankung nicht erlebt haben (Leone et al. 1999). Patienten nach Behandlung eines NHL haben ein 2-15fach erhöhtes Risiko eine t-AML zu entwickeln (Kollmannsberger et al. 1998).

Die Inzidenz chromosomaler Veränderungen ist in t-AML mit >85% höher als bei de novo AML mit 50-55%. Für die t-AML sind balancierte Translokationen, die in 10-40% der Fälle auftreten, typisch. Überdurchschnittlich häufig sind an diesen Translokationen bestimmte Gene beteiligt, insbesondere die des AML1 Gens (21q22) und des MLL-Gens (11q23), zudem liegen häufig die Translokationen t(15;17) (PML-RAR α) und die inv(16) (CBF β /MYH11) vor (Andersen et al. 1998, Pedersen-Bjergaard et al. 1990, Pedersen-Bjergaard und Philip 1991, Pedersen-Bjergaard et al. 1995, Quesnel et al. 1993, Schnittger et al. 2000). Insgesamt weisen t-AML einen ungünstigeren Krankheitsverlauf und eine schlechtere Prognose als de novo AML auf (Micallef et al. 2000, Schoch et al. 2004). Eine Ausnahme scheint die t-APL zu sein. Vorherige Untersuchungen weisen auf eine vergleichbar günstige Prognose hin wie bei der de novo APL, sofern ATRA (All-Trans-Retinoid-Säure)-haltige Therapieprotokolle verwendet werden (Pulsoni et al. 2002).

t-MDS entstehen typischerweise nach einer Latenzzeit von fünf bis sieben Jahren nach Therapie einer primären Neoplasie, t-MDS gehen häufig in eine t-AML über (Felix 1998, Friedberg et al. 1999, van Leeuwen 1996). Bei Untersuchungen wurden in 94 Fällen von t-MDS in 6% der Fälle ein normaler Karyotyp gefunden, 33% der Fälle wiesen eine Aberration, 61% der Fälle multiple chromosomale Aberrationen auf (Pedersen-Bjergaard et al. 1995).

Am häufigsten traten bei t-MDS der Verlust des Chromosoms 7 (-7) oder die Deletion dessen langen Arms (7q-) auf. Der Verlust des Chromosoms 5 konnte in t-AML/MDS gleichhäufig nachgewiesen werden. Seltener kommt es bei t-MDS zu einer Deletion des Chromosoms 13, inklusive der Banden q13q14. Außer bei -7 und der del(13q) konnten meistens zusätzliche Aberrationen nachgewiesen werden. t-MDS bzw. die daraus hervorgehenden t-AML haben eine schlechte Prognose, die mediane Überlebenszeit beträgt etwa sechs Monate. Bei einem Teil der Patienten kann eine allogene Knochenmarktransplantation als Therapieansatz in Erwägung gezogen werden (Carella et al. 1996, Pedersen-Bjergaard et al. 1990).

1.5 Auslösende Faktoren und Agenzien

Allgemein ist in der Genese von Neoplasien das Zusammentreffen mehrerer Faktoren und genetischer Veränderungen notwendig. Protoonkogene (z.B. ras) werden aktiviert, dadurch kommt es unter anderem zu einer vermehrten Produktion von Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren oder Proteinkinasen, die in die Signalübertragungswege eingreifen. Dagegen werden Tumorsuppressorgene (z.B. p13, APC) inaktiviert, können dadurch ihre Funktion der Zellzykluskontrolle nicht mehr regelhaft ausführen und es kommt zu irregulären Proliferationen (Bishop JM 1991, Cline 1994, Mitani 1997, Vogelstein et al. 1988, Vogelstein et al. 1989). Als therapieassoziierte Faktoren werden neben der Ganzkörperbestrahlung (TBI) auch viele Chemotherapeutika als Auslöser für das Auftreten genetischer Aberrationen angesehen. Hinsichtlich ihrer Häufigkeit und des Vorkommens der molekular- und zytogenetischen Aberrationen stehen therapieassoziierte hämatologische Neoplasien eng mit spezifischen chemotherapeutischen Stoffklassen und deren jeweiligen kumulativen Dosen in Zusammenhang. Ein Großteil der therapieassoziierten Leukämien kann abhängig von der Vortherapie in zwei Gruppen eingeteilt werden, in eine Gruppe von t-AML nach Therapie mit Alkylanzien oder in eine Gruppe nach Therapie mit Topoisomerase II-Hemmern. Nach Therapie mit Alkylanzien zeigen sich oft eine präleukämische Phase in Form eines MDS, Dysplasien in allen drei Zellreihen sowie eine sehr ungünstige Prognose, ein Auftreten wird im Mittel 5-7 Jahre nach Therapieende beobachtet. Zytogenetisch finden sich meist Veränderungen am Chromosom 5 und/oder 7, meist innerhalb eines komplex aberranten Karyotyps. Hingegen weisen AML nach Therapie mit Topoisomerase-II-Hemmern oft balancierte Chromosomenveränderungen wie t(15;17) und t(8;21) und Aberrationen mit Involvierung der Chromosomenbande 11q auf (Estey und Döhner 2006). Sie zeigen meist keine myelodysplastische Vorphase und scheinen im Vergleich zur erstgenannten Gruppe eine etwas günstigere Prognose zu haben (Ellis et al. 1993). Im Mittel kommt es nach 2,5 Jahren zu einem Auftreten der t-AML, wobei eine Latenzzeit von 1-8 Jahre angegeben wird (Beaumont et al. 2003; Pui and Relling 2000). Das Risiko für das Auftreten von t-AML wird

nach dem Einsatz von Topoisomerase-II-Inhibitoren, dabei allerdings oft in Kombination mit anderen Chemotherapeutika und/oder Strahlentherapie, auf zwei Prozent bis zwölf Prozent geschätzt (Felix 1998). Insbesondere werden therapieassoziierte Neoplasien bei hochdosierten, myeloablativen Therapien mit einer Inzidenz von bis zu 25 % beobachtet. Diese Neoplasien verringern das Langzeitüberleben primär therapierter Patienten signifikant (Pedersen-Bjergaard et al. 1997b).

1.6 Fragestellung dieser Arbeit

Bei t-AML treten häufig die Translokationen t(8;21), t(15;17) und inv(16) auf. Es gibt Hinweise darauf, dass möglicherweise t-AML-assoziierte Translokationen vor der Manifestation einer t-AML auftreten und nachgewiesen werden können (Megonigal et al. 2000). Im Rahmen dieses Projektes sollte untersucht werden, inwiefern daher diese Translokationen in Stammzellapheresaten gesunder Personen und von Patienten nach konventioneller Chemotherapie, bei denen hämatopoetische Stammzellen für eine folgende Hochdosistherapie gewonnen wurden, nachweisbar sind. Eine weitere Frage, die im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden sollte, war, ob sich durch die Untersuchung der t-AML-assoziierten Translokationen t(8;21), inv(16) und t(15;17) eine Möglichkeit zur molekulargenetischen Früherkennung einer t-AML ergibt. Neben den t-AML assoziierten Translokationen wurde auch die Translokation t(9;22) untersucht, die im Rahmen einer, allerdings seltenen, t-CML auftreten kann (Pedersen-Bjergaard et al. 1997a).

Zusammengefasst soll in dieser Arbeit, nach Ermittlung der Sensitivität der Nachweisverfahren mittels primärer und nested Reverse Transkriptase (RT)-PCR und Real-Time-PCR für Translokationen t(8;21), inv(16), t(15;17) und t(9;22), die therapieassoziierte Inzidenz dieser Translokationen vor dem Hintergrund einer möglichen klinischen Verwendung für die Früherkennung therapieassoziiierter Leukämien untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Reagenzien

Geräte

Sepatech Biofuge 13	Heraeus instruments (Hanau)
Biofuge primo R	Heraeus instruments (Hanau)
Biofuge pico	Heraeus instruments (Hanau)
RT 6000B Kühlzentrifuge	Sorvall (Langensellbold)
Thermocyclerm Trio-Thermoblock	Biometra (Göttingen)
UV-Tisch TI3	Biometra (Göttingen)
Gelkammer (Gelelektrophorese)	Angewandte Gentechnologische Systeme (Heidelberg) (AGS)
PCR-Bank OMNI	Astec (Andover, UK)
Sterilbank LaminAir HB244	Heraeus instruments (Hanau)
Mikroskop	Zeiss (Göttingen)
Objekträger/Deckgläser	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Vortex	Heidolph (Kelheim)
Waage	Sartorius (Göttingen)
Pipetten	Gilson (Middleton, USA)
Pipettenspitzen Rnase und Dnase frei	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Blue-cap-Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
Eppendorfgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Light Cycler	Roche Diagnostics (Mannheim)
Kapillaren für Light-Cycler	Roche Diagnostics (Mannheim)

Verbrauchsmaterialien

Reverse Transkriptase Superscript II RNase	Invitrogen (Karlsruhe)
Light-Cycler-Quantification Kits für t(8;21), inv(16), t(15;17), t(9;22)	Roche Diagnostics (Mannheim)
RNA-Extraktions-Kit (RNeasy-Kit)	Qiagen (Hilden)
RW1 Puffer Mat. No 1014567	Qiagen (Hilden)
Taq-DNA-Polymerase	Gibco (Karlsruhe)
dNTP	Invitrogen (Karlsruhe)
Random Primers	Invitrogen (Karlsruhe)
DNA Leiter 100bp	PEQLab (Erlangen)
RDD Buffer, DNA Digest Buffer	Qiagen (Hilden)
RPE-Puffer	Qiagen (Hilden)

RLT Puffer	Qiagen (Hilden)
PCR-Puffer 10fach	Qiagen (Hilden)
PBS (phosphate buffered saline)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
TBE (Tris-Borat-EDTA)	Biometra (Göttingen)
Ethidiumbromidlösung	Roth (Karlsruhe)
H ₂ O HPLC grade	J.T. Baker (Deventer, NL)
MgCl ₂	Merck (Darmstadt)
DSMO	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Agarose	Biozym (Hess. Oldendorf)
Phenolblau	Merck (Darmstadt)
Paraffin	Merck (Darmstadt)
Ethanol	J.T. Baker (Deventer, NL)

2.2 Probenmaterial

Als Probenmaterial wurden 42 Stammzellapheresate untersucht. Die Proben wurden alle nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung der Patienten nach Genehmigung der Untersuchungen durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Göttingen verarbeitet. 33 dieser Proben stammen von Patienten, die im Rahmen eines autologen Transplantkonzeptes eine Stammzellmobilisierung erhielten, vorwiegend lag bei diesen Patienten ein Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) vor. Neun Proben stammen von allogenen Stammzellspendern, deren Proben als Kontrollen von gesunden Personen gelten. Das Alter von Patienten und allogenen Stammzellspendern lag im Mittelwert bei 42 (22-77) Jahren, bei den Patienten bei 39,5 (22-67) Jahren und bei den Spendern bei 51,2 (38-77) Jahren. 19 der 42 (45,2%) untersuchten Leukapheresaten stammen von weiblichen Personen, 23 der 42 (53,3%) Leukapheresate sind von männlichen Personen. Bei den Spenderproben sind 7 der 9 (77,8%) von weiblichen, 2 der 9 (22,2%) von männlichen Personen (s. Tab. 1).

Als Positivkontrollen wurde für die Translokation t(8;21) die AML1-ETO-positive Zelllinie Kasumi-1 eingesetzt, für die Translokation t(9;22) die bcr-abl-positive Zelllinie K562. Für die Translokation inv(16) und t(15;17) wurden Patientenproben verwendet, die für die jeweilige Translokation als positiv bekannt waren. Als Hintergrundzellen wurden HL60-Zellen eingesetzt, die von einer humanen Promyelozytenleukämie stammen und als inv(16)- und t(15;17)-negative Zelllinie bekannt sind.

#	m/w	Alter bei Untersuchung (Jahre)	Diagnose
1	w	22	NHL
3	m	64	NHL (MM)
4	w	59	NHL (MM)
5	m	47	NHL
6	m	25	NHL
7	m	66	NHL (MM)
8	w	46	Spender
9	w	62	Spender
10	w	24	NHL
12	w	61	Spender
13	m	55	NHL
14	m	38	Spender
17	m	67	NHL (MM)
18	w	77	Spender
19	m	58	NHL
20	m	42	NHL
21	w	63	NHL (MM)
22	w	67	NHL (MM)
23	w	43	Spender
24	w	46	Spender
25	m	61	NHL
26	m	64	NHL
27	m	58	NHL (MM)
28	m	52	NHL
29	m	57	NHL
30	w	40	Spender
31	w	33	NHL
33	m	48	Spender
34	w	52	NHL (MM)
35	w	39	NHL
36	m	33	NHL
37	m	33	NHL
38	w	31	NHL
39	m	63	NHL
40	w	49	NHL
41	m	52	NHL (MM)
42	w	38	NHL
43	w	50	NHL
45	m	42	NHL
46	m	48	NHL
47	m	41	NHL (MM)
48	m	55	NHL (MM)

Tab. 1: Patientencharakteristika, #- Probennummer

Probe Nr. 2, 11, 15, 16, 32, 44 nicht in Auswertung einbezogen, da kein NHL vorlag

2.3 Probenaufarbeitung

10µl des Stammzellapheresats wurden unter einer Sterilbank (Heraeus instruments, LaminAir, HB2448) mit 900µl PBS (phosphate buffered saline) auf 1:100 verdünnt. 25µl des verdünnten Apheresats wurden zur Erythrozytenlyse mit 25µl 3% Essigsäure versetzt (weitere Verdünnung um 1:2) und nach drei Minuten wurden die vitalen Zellen mittels einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Anschließend wurde die Zellzahl des Apheresats berechnet und wiederum unter der Sterilbank mit PBS auf eine Endkonzentration von 10^7 Zellen/100µl verdünnt. 100µl der verdünnten Zellsuspension wurden zur späteren RNA-Extraktion mit 600µl Lysispuffer (RLT mit 0,1% Mercaptoethanol) versetzt und kurz auf dem Vortex gemischt.

2.3.1 Aufarbeitung der HL-60-, K562- und Kasumi-1-Zellen

Zur Aufarbeitung der HL-60-, K562- und Kasumi-1-Zellen wurde das Nährmedium abgegossen und anschließend abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in Lysispuffer (RLT mit 0,1% Mercaptoethanol) gelöst und der RNA-Extraktion nach Protokoll zugeführt. Die extrahierte RNA wurde in 50µl H₂O RNase-frei gelöst. Anschließend wurde der RNA-Gehalt photometrisch bestimmt.

2.4 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion wurde mit dem RNeasy-Kit nach Qiagen-Protokoll durchgeführt. Hierbei wird die selektive Bindungseigenschaft einer auf Silika-Gel basierenden Membran genutzt, die durch Alkohol dehydrierte RNA bindet an die Membran, während DNA und Proteine diese Membran passieren können. Die an der Säule gebundene RNA kann dann mit RNase-freiem Wasser eluiert werden. Dazu wurde die Probe zur Homogenisierung auf die QIAshredder Spinsäule pipettiert und 2 Minuten bei 12000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Heraeus Biofuge primo R). Zu dem Lysat wurden anschließend 600µl 70% Ethanol (J.T.Baker) gegeben. Bis zu 700µl dieser Lösung wurde auf eine QIAamp-Spinsäule pipettiert und für 15 Sekunden bei 12000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Danach wurde dieser Schritt mit der restlichen Lösung wiederholt.

Die Spinsäule wurde nun auf ein neues Collection-Tube überführt. Anschließend wurden 350µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und erneut für 15 Sekunden mit 12000 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert. Danach wurden zu 10µl DNase 70µl RDD (DNA Digest Buffer, Qiagen) gegeben, dieses auf die Säule pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur zur Inkubation ruhen gelassen. Anschließend wurde noch einmal mit 350µl

RW1-Puffer für 15 Sekunden bei 12000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Nun wurde die Säule in ein neues Collection-Tube gestellt und mit 500µl RPE-Puffer für 15 Sekunden mit 12000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Der letzte Waschschrift wurde mit neuen 500µl RPE-Puffer (RNeasy-Kit, Qiagen) wiederholt und das Tube für eine Minute bei 12000 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert. Die Säule wurde auf ein 1,5-ml-Tube gesteckt und zum Lösen der RNA mit 50µl RNAse-freiem Wasser für eine Minute bei 12000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der letzte Schritt wurde nochmals mit 50µl RNAse-freiem Wasser wiederholt, um insgesamt eine Menge von 100µl RNA-Eluat zu erreichen.

2.5 Bestimmung der Konzentration von RNA

Die Konzentration von RNA wurde über eine photometrische Messung in 1cm Quarzküvetten bestimmt. Dazu wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260nm (OD_{260}) gemessen, wobei für die OD_{260} von 1,0 für Doppelstrang DNA eine Referenzkonzentration von 50µg/ml zugrunde gelegt wurde (Sambrook et al. 1989). Die Konzentration kann mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten berechnet werden.

Konzentration µg/ml = Extinktion x Verdünnungsfaktor x 50

2.6 Reverse Transkription/cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit den Reagenzien und nach dem Protokoll der Light-Cycler-Quantification Kits der Translokationen t(8;21), inv(16), t(15;17) und t(9;22) durchgeführt.

Dazu wurde in einem 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß ein Mastermix (20µl pro 10µl RNA) aus folgenden Reagenzien (Roche Diagnostics) angefertigt:

H ₂ O, PCR grade	8,9µl
Reverse Transkriptase Reaction Mix	6,0µl
Random Hexamers p(dN) ₆	1,5µl
dNTP (dATP, dCTP, dGTP,dTTP)	3,0µl
Reverse Transkriptase	0,6µl

Für jede cDNA-Herstellung wurden 20µl des Mastermix in ein Reaktionsgefäß pipettiert und 10µl der jeweiligen RNA (Probenmaterial, bzw. RNA der Positivkontrolle) dazugegeben, sodass sich ein Probenansatz von 30µl ergab. Die Gefäße wurden anschließend in einen Thermocycler überführt, um dort die Reverse Transkription durchzuführen. Es wurde mit einem Annealingschritt (10Minuten bei 25°C) begonnen, der die Primerbindung ermöglicht.

Anschließend folgte für 60 Minuten bei 42°C die Reverse Transkription, um dann für 5 Minuten bei 94°C die Transkription zu beenden. Die cDNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

2.7 PCR mit Hilfe des Light Cyclers

Die PCR ist eine enzymatische Methode zur Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte. An diese DNA-Abschnitte lagern sich synthetisch hergestellte Oligonukleotidprimer an, deren Sequenzen zu den beiden Enden der DNA-Zielsequenz komplementär sind. Es folgt eine enzymatische Verlängerung durch eine Polymerase (Taq-Polymerase), bei der die DNA-Stränge als Matrize dienen. Die PCR durchläuft 40-50 Replikationszyklen, durch die eine zunächst nur in geringen Mengen vorhandene Zielsequenz exponentiell vermehrt wird.

Zunächst bewirkt im ersten Schritt eine Temperaturerhöhung auf über 90°C die Denaturierung des DNA-Doppelstranges in seine Einzelstränge. Im folgenden Schritt (Annealing) kommt es zu einer Abkühlung auf 50-55°C, durch die erneut Primer an die Einzelstränge binden können. Hierbei weist jeder Primer eine optimale Annealingtemperatur auf, die zur Effizienzerhöhung der PCR gewählt werden sollte. Die Extension schließt jeden Zyklus ab. Hierbei repliziert die Taq-Polymerase, deren Temperaturoptimum bei 72°C liegt die Einzelstrang-DNA. Auf diese Weise resultiert aus jedem PCR-Zyklus eine Verdopplung und somit eine exponentielle Vervielfältigung der Zielsequenz.

Im Unterschied zur herkömmlichen PCR, bei der erst nach Beendigung aller Zyklen über eine Gelelektrophorese das PCR-Produkt sichtbar gemacht wird und gemessen werden kann, misst der Light Cycler bei der Real-Time-PCR nach jedem Zyklus den DNA-Gehalt der Proben. Die Light Cycler Technik erlaubt somit eine quantitative Messung während der PCR. Zur Normierung der Werte dient hierbei ein Housekeeping-Gen (Referenzgen), das durch seinen konstanten Expressionsgrad eine Aussage über die tatsächliche Expressionsveränderungen des untersuchten Gens zulässt. Es unterliegt somit keinen, durch verschiedene Stimulationen ausgelösten Expressionsschwankungen. Die Messung erfolgt über die Farbstoffsonden Red 640, die zur Verhinderung einer Extension am 3'-Ende durch Phosphorylierung modifiziert worden ist und mit dem Farbstoff Fluorescein. Beide haben die Eigenschaft, an die Vorlagen DNA zu hybridisieren. Ausschließlich nach Hybridisierung kommen die Sonden in unmittelbare Nähe zueinander, was zu einem Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) führt. Bei fortgeschrittener PCR-Reaktion steigt somit das Fluoreszenzsignal an. Die Fluoreszenzmessung erlaubt eine graphische Darstellung der Zunahme des PCR-Produktes, die nach einem exponentiellen Wachstum in eine Plateauphase übergeht und so den Verlauf einer Sättigungskurve beschreibt. Ungenauigkeiten, die bei der Reversen Transkriptase oder der RNA-Extraktion aufgetreten

sein könnten, werden ebenfalls durch die Normierung der Proben mit einem Housekeeping-Gen beseitigt. Bei dieser Arbeit wurde hierzu das Gen der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) verwendet. Jeder Lauf der Light-Cycler Real-Time-PCR besteht aus einer Positivkontrolle (Calibrator-RNA) zur Kompensation der konstanten Fehler zwischen den PCR-Ergebnissen und der Referenz-Gene (G6PDH), sowie zur Erfolgskontrolle, einer variablen Anzahl von cDNA Proben (bis zu sechs pro Lauf) und einer Negativkontrolle, um Kontaminationen auszuschließen. Es wurden pro Probe vier Kapillarplätze benötigt, da jede Probe im Doppelansatz, also zweifach für die Detektion der Translokation und zweifach für das Referenzgen (G6PDH) angesetzt wurde.

Die Vorbereitung der PCR geschah an einem separaten Arbeitsplatz, um Kontaminationen zu vermeiden. Jeweils 15 µg des Mastermix wurden mit 5 µl cDNA in eine Light-Cycler-Kapillare gegeben, sodass das Endvolumen jeder Probe 20 µl betrug. In die Ansätze wurden dann entweder 10 µl des LightCycler Detection Mix für die entsprechende cDNA oder 10µl des LightCycler Reference Detection Mix für die Housekeeping-Gen-cDNA sowie jeweils 3 µl steriles H₂O (PCR-Grad) hinzugegeben. Diese Pipettierschritte wurden in einem Kühlblock durchgeführt, um verfrühte Reaktionen zu unterbinden. Zentrifugation der Kapillaren (30 Sekunden bei 1000 U/min) wurden diese in den Light Cycler gestellt und das Programm gestartet.

2.8 Konventionelle Reverse-Transkriptase (RT)-PCR

Bei der RT-PCR werden entsprechend der Real-Time-PCR definierte cDNA-Sequenzen durch thermostabile DNA-Polymerasen vermehrt. Die Spezifität des entstehenden Amplikons wird durch den Einsatz von Oligonukleotidprimern gewährleistet, welche zwei bestimmte, zu beiden Seiten der zu amplifizierenden Zielsequenz gelegene Regionen erkennen. Hierbei liegt jeweils eine dieser Primerbindungsstellen auf einem der komplementären DNA-Stränge, sodass jeder der beiden DNA-Stränge als Vorlage (Template) dient. Der neue DNA-Strang wird von der DNA-Polymerase von dem Primer ausgehend (Primerextension) synthetisiert. Die sequentielle Trennung des DNA-Doppelstrangs (Denaturierung), die Bindung der Primer (Annealing), die Synthese des neuen komplementären Stranges (Extension) und die erneute Auftrennung der Doppelstränge werden durch ein definiertes Temperaturprogramm in einem Thermocycler gesteuert. Die hohe Sensitivität der PCR resultiert aus der exponentiellen Zunahme der spezifischen DNA-Moleküle. Ein zweiter PCR-Zyklus, genannt nested PCR, erhöht sowohl die Sensitivität und führt zu einer nochmaligen exponentiellen Vervielfältigung. Bei der nested PCR wurde das PCR-Produkt mit Aqua dest. verdünnt in eine zweite PCR mit gleicher Durchführung eingesetzt und diente somit als Matrize für den nächsten Durchlauf.

Die verwendeten nested Primer amplifizieren innerhalb der Bindungsstellen, der von den ersten Primern synthetisierten DNA, wobei die Wahrscheinlichkeit sinkt, dass unerwünschte Sequenzen vervielfältigt werden.

2.9 Durchführung der primären und nested PCR

Zunächst wurde unter einer PCR-Bank (Astec P.C.R. OMNI) ein Mastermix aus folgenden Reagenzien pro Probe pipettiert, auf dem Vortex gemischt und für 10 Sekunden bei 13000 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert:

PCR-Puffer 10fach	5µl
DMSO (Sigma)	5µl
MgCl ₂ 50mM	2µl
dNTP`-Mix (jeweils 10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1µl
Primer 5` und 3` 20µM	1µl
Taq DNA-Polymerase 5U/µl	0,25µl
H ₂ O, HPLC grade (J.T.Baker)	33,75µl

Der jeweilige PCR-Ansatz wurde nun in den Tubes mit zwei Tropfen Paraffin (Merck) überschichtet. Anschließend wurde das Template (2µl cDNA, bzw. 2µl H₂O HPLC grade als Negativkontrolle bei primärer PCR, 1µl des Primärprodukts bei nested PCR) durch das Öl hindurch in den PCR-Ansatz pipettiert. Zur Amplifikation wurden die Proben in einen Thermocycler (Biometra Trio-Thermoblock) überführt, um dort die PCR mit den folgenden Schritten durchzuführen:

Denaturierung:	95°C für 5 Minuten	1x
Amplifikation	95°C für 1 Minute	} 35 Zyklen
Hybridisierung	65°C für 1 Minute	
Elongation/Extension	72°C für 1 Minute	
	72°C für 10 Minuten	1x
	4°C zum Beenden der Reaktion	

2.10 Primer

Translokation	primäre RT-PCR	nested RT-PCR
t(8;21)	AML1-A CTACCGCAGCCATGAAGAACC ETO-B AGAGGAAGGCCCATGCTGAA	AML1-C ATGACCTCAGGTTTGTGGTGG ETO-D TGAAGTGGTTCTGGAGCTCCT
inv(16)	CBFB-A GCAGGCAAGGTATATTTGAAGG MYH11-B1 TGAAGCAACTCCTGGGTGTC	CBFB-C GGGCTGTCTGGAGTTTGATG MYH11-D1 TCCCTGTGACGCTCTCAACT
t(15;17)	PML-A2 CTGCTGGAGGCTGTGGAC RARA-B GCTTGTAGATGCGGGGTAGA	PML-C2 AGCGCGACTACGAGGAGAT RARA-D CTGCTGCTCTGGGTCTCAAT
t(9;22)	BCR-A GAAGTGTTTTCAGAAGCTTCTCC ABL-B GTTTGGGCTTCACACCATTCC	BCR-C CAGATGCTGACCAACTCGTGT ABL-D TTCCCCATTGTGATTATAGCCTA
abl	GGCCAGTAGCATCTGACTTTG ATGGTACCAGGAGTGGTTCTCC	

Tab. 2: Primer (Biomed) für die konventionelle primäre und nested PCR (van Dongen et al. 1999).

2.11 Agarosegelherstellung und Elektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese (Sambrook et al. 1989) dient zum Auftrennen von Nukleinsäurefragmenten. Nukleinsäuren besitzen eine negative Gesamtladung, sodass im elektrischen Feld eine Auftrennung möglich ist. Zur Agarosegelelektrophorese wurde ein 1,5% Gel verwendet. Dazu wurden 20ml 5x TBE-Puffer mit 80ml destilliertem Wasser auf eine 1x TBE-Konzentration gebracht, 1,5g Agarose (Biozym) dazugegeben und dieses in einem Mikrowellenherd bis zur vollständigen Auflösung der Agarose erhitzt. Während des Abkühlens wurden 100µl Ethidiumbromidlösung dazugegeben und durch Umschwenken verteilt. Anschließend wurde die Lösung in einen Gelschlitten gegossen und je nach der zu bearbeitenden Probenanzahl mit entsprechenden Kämmen zur Herstellung der Geltaschen versehen. Nach der vollständigen Abkühlung wurde das erhärtete Gel in eine ebenfalls mit 1x TBE gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Anschließend wurden die Geltaschen für die Elektrophorese geladen. Dazu wurden 15µl des PCR-Produktes mit 7µl Phenolblau gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Als Längenstandard (1µl) lief ein 100bp DNA-Leiter (PEQLab) mit. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100V für 70-90 Minuten. Im Anschluss wurde das Bandenmuster auf einem UV-Tisch (Biometra TI3) sichtbar gemacht und photographiert.

2.12 Herstellung der Verdünnungsreihen für die RT-PCR und die Real-Time-PCR

Die photometrische Bestimmung des RNA-Gehalts und cDNA-Synthese wurden nach Protokoll durchgeführt. Die Konzentrationen der cDNA wurden anschließend nach photometrischer Messung durch Verdünnung mit H₂O HPLC grade angeglichen. Im Anschluss daran wurde die jeweilige Positivkontroll-cDNA mit H₂O HPLC grade von 10⁰ bis 10⁻⁶ verdünnt. Jeweils 2 µl dieser Ansätze wurden in die primäre PCR eingesetzt und diese nach Protokoll gestartet. 1 µl dieses Produktes wurde wiederum in die nested PCR eingesetzt und diese ebenfalls nach Protokoll durchgeführt. Die Proben wurden wie oben beschrieben auf ein 1,5% Agarosegel überführt und nach dem Lauf ebenfalls photographiert und dokumentiert. Für die Verdünnungsreihen mit Hilfe des Light Cyclers wurden jeweils 5 µl der Ansätze in den Verdünnungsstufen eingesetzt und dann nach Light Cycler Protokoll gestartet.

3 Ergebnisse

3.1 Patientendaten

Es wurden insgesamt 42 Leukapheresatproben auf die Translokationen t(8;21), inv(16), t(15;17) und t(9;22) untersucht. Davon stammen 33 Proben von Patienten mit NHL-Erkrankung (34 NHL, davon 11 mit Multiplem Myelom) und 9 Proben von gesunden Stammzellspendern. Das mittlere Alter der Personen aller 42 untersuchten Proben lag bei 42 (22-77) Jahren, das der 33 Patienten bei 39,5 (22-67) Jahren, das der Spender bei 51,2 (38-77) Jahren (s. Tab. 1). Die Probensammlung erfolgte über einen Zeitraum von 7 Monaten, die Aufarbeitung erfolgte in den meisten Fällen am gleichen Tag, jedoch immer innerhalb von 24 Stunden nach Probengewinnung. Je nach Erkrankung, Krankheitsstadium, Alter und Risikoeinteilung erhielten die Patienten im Vorfeld individuelle Chemotherapien, vor der Leukapherese wurde bei den Patienten zumindest ein Zyklus einer Mobilisierungstherapie und anschließend über mehrere Tage ein Granulozytenstimulierender Wachstumsfaktor (G-CSF) appliziert. Die Stammzellspender sind Personen ohne maligne Erkrankungen in der Anamnese, zur Stammzellgewinnung wurde ebenfalls G-CSF appliziert.

Das Leukaphereseergebnis lag bei $0,3 - 9 \times 10^8$ CD34-positiven Zellen/ml. Der Mittelwert aller Proben liegt damit bei $2,5 \times 10^8$ /ml (s. Tab. 3).

Zellzahl	min. $\times 10^8$ /ml	max. $\times 10^8$ /ml	Mittelwert $\times 10^8$ /ml
alle Proben	0,3	9	2,5
Patienten	0,3	6	2,4
Spender	0,5	9	2,7

Tab. 3: Zellzahl der Leukapheresate

Der photometrische RNA-Gehalt lag für die bestimmten Patientenproben bei 98-216 μ g/ml, der Mittelwert bei 143 μ g/ml. Der RNA-Gehalt der HL-60-Zellen lag bei 87,3 μ g/ml, der RNA-Gehalt der Kasumi-1-Zellen bei 46,8 μ g/ml, der RNA-Gehalt der K562-Zellen bei 84,4 μ g/ml.

3.2 Sensitivitätsnachweis in der RT- und Real-Time-PCR

Zum Nachweis der Sensitivität wurde von jeder Translokation jeweils eine Verdünnungsreihe in der primären und nested RT-PCR und eine Real-Time-PCR durchgeführt.

3.2.1 Verdünnungsreihen für t(8;21)

Als Positivkontrolle wurde die AML1/ETO-positive Zelllinie Kasumi-1 eingesetzt. In der primären PCR gelang der Sensitivitätsnachweis im Doppelansatz bis 10^{-3} . In der nested PCR gelang der Nachweis im Doppelansatz bis 10^{-4} .

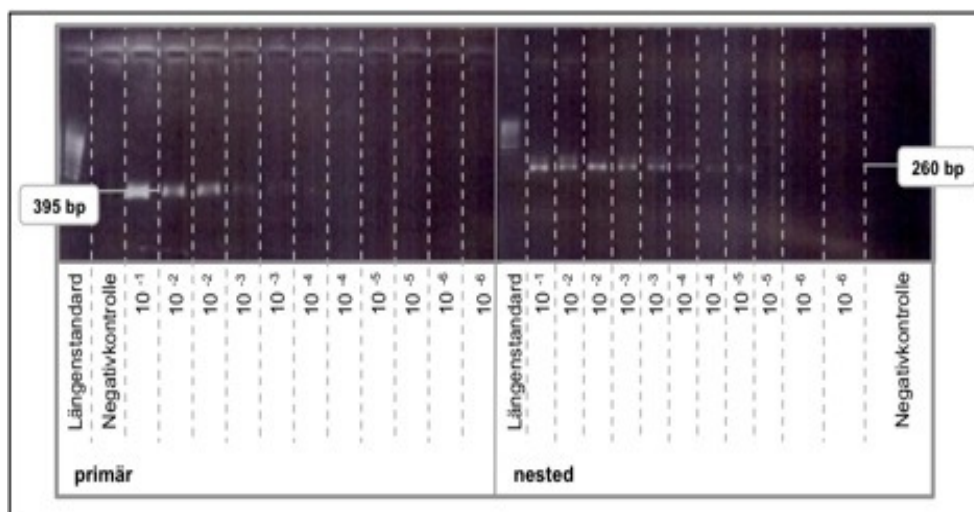


Abb. 1: Verdünnungsreihe t(8;21) primäre und nested RT-PCR

Aufgetragen sind jeweils ein Längenstandard, eine Negativkontrolle und cDNA in den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-6} . In der primären PCR (Bild links) ist ein Signal im Doppelansatz bis 10^{-3} sichtbar, in der nested PCR (Bild rechts) ebenfalls im Doppelansatz bis 10^{-4} .

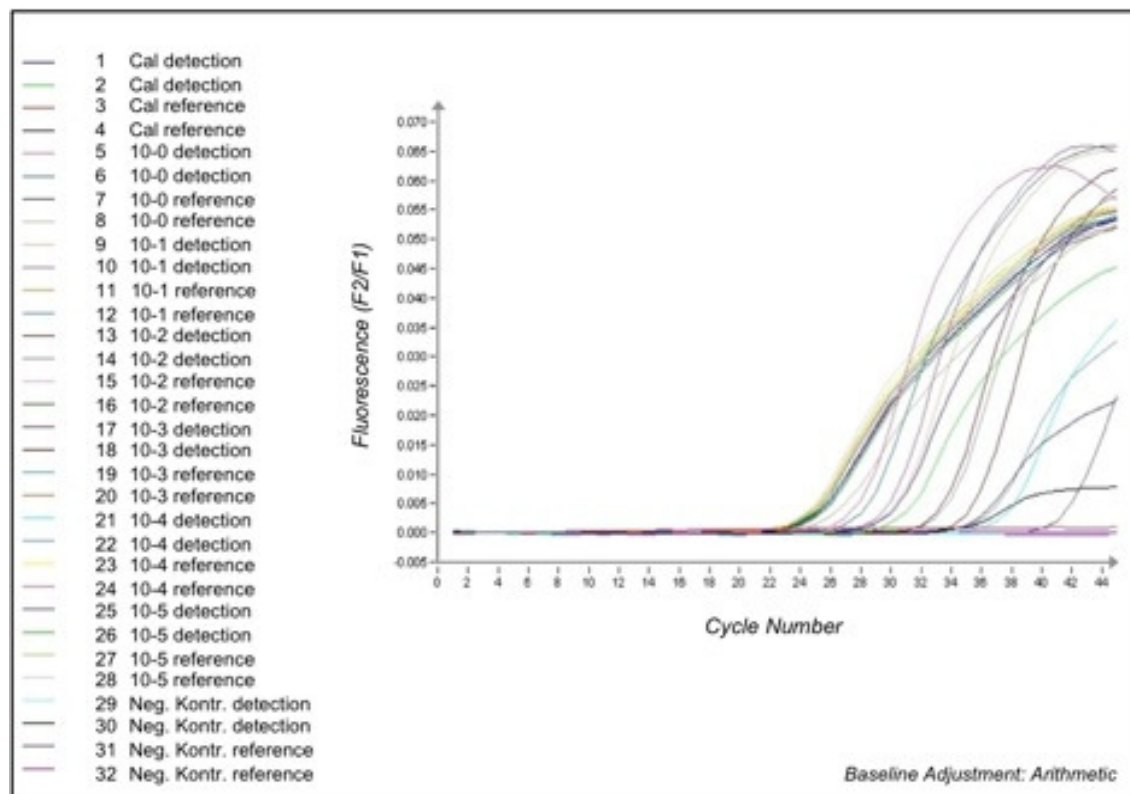


Abb. 2: Verdünnungsreihe t(8;21) Real-Time-PCR

Nr. 1-4 entspricht der Calibrator-RNA (Positivkontrolle), Nr. 5-28 entspricht der cDNA in den Verdünnungsstufen 10^0 bis 10^{-5} , Nr. 29-32 entspricht der Negativkontrolle. Alle Proben sind jeweils im Doppelsatz aufgetragen, zweimal für die Detektion (detection), zweimal für das Referenzgen (reference). Die x-Achse zeigt die Zyklenanzahl an, auf der y-Achse ist das Fluoreszenzsignal dargestellt.

In der Real-Time-PCR wurde für t(8;21) eine Sensitivität von 10^{-5} erreicht. Die Verdünnungsstufe 10^{-1} wurde im 28. PCR-Zyklus positiv, 10^{-2} im 32., bzw. 34. Zyklus, 10^{-3} ebenfalls im 32. Zyklus, 10^{-4} im 36. Zyklus und 10^{-5} im 30. Zyklus.

3.2.2 Verdünnungsreihen für inv(16)

In der konventionellen PCR zeigte sich ein Sensitivitätsnachweis von 10^{-2} in der primären PCR und 10^{-4} in der nested PCR. Als Positivkontrolle wurde eine Patientenprobe eingesetzt, die aus Voruntersuchungen inv(16)-positiv bekannt ist. Die photometrisch bestimmte RNA-Konzentration lag bei $67,9 \mu\text{g/ml}$, die cDNA-Konzentration bei $29,1 \mu\text{g/ml}$. Als Hintergrundzellen wurden HL60-Zellen eingesetzt, die als inv(16)-negative Zelllinie bekannt sind.

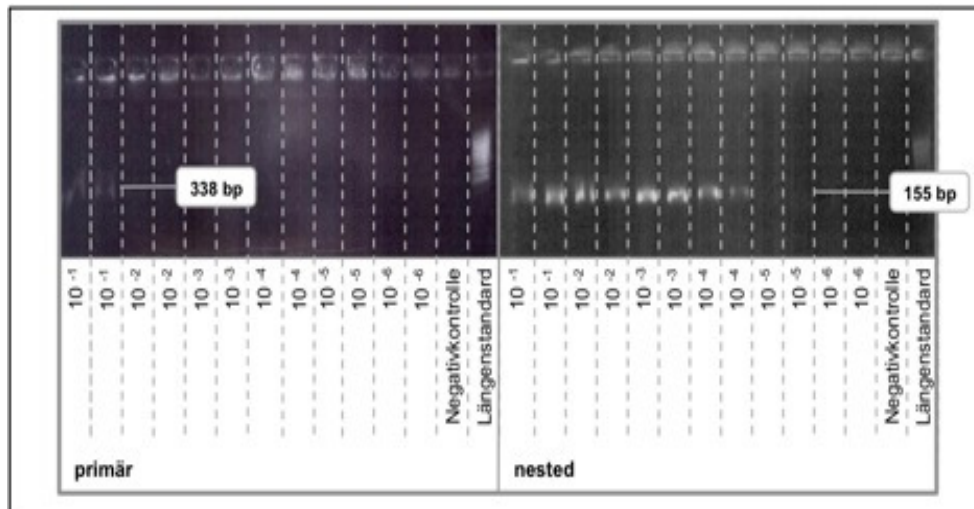


Abb. 3: Verdünnungsreihe inv(16) primäre und nested PCR
Aufgetragen sind jeweils ein Längenstandard, eine Negativkontrolle und cDNA in den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-6} . In der primären PCR (Bild links) ist ein Signal im Doppelansatz bis 10^{-2} sichtbar, in der nested PCR (Bild rechts) ebenfalls im Doppelansatz bis 10^{-4} .

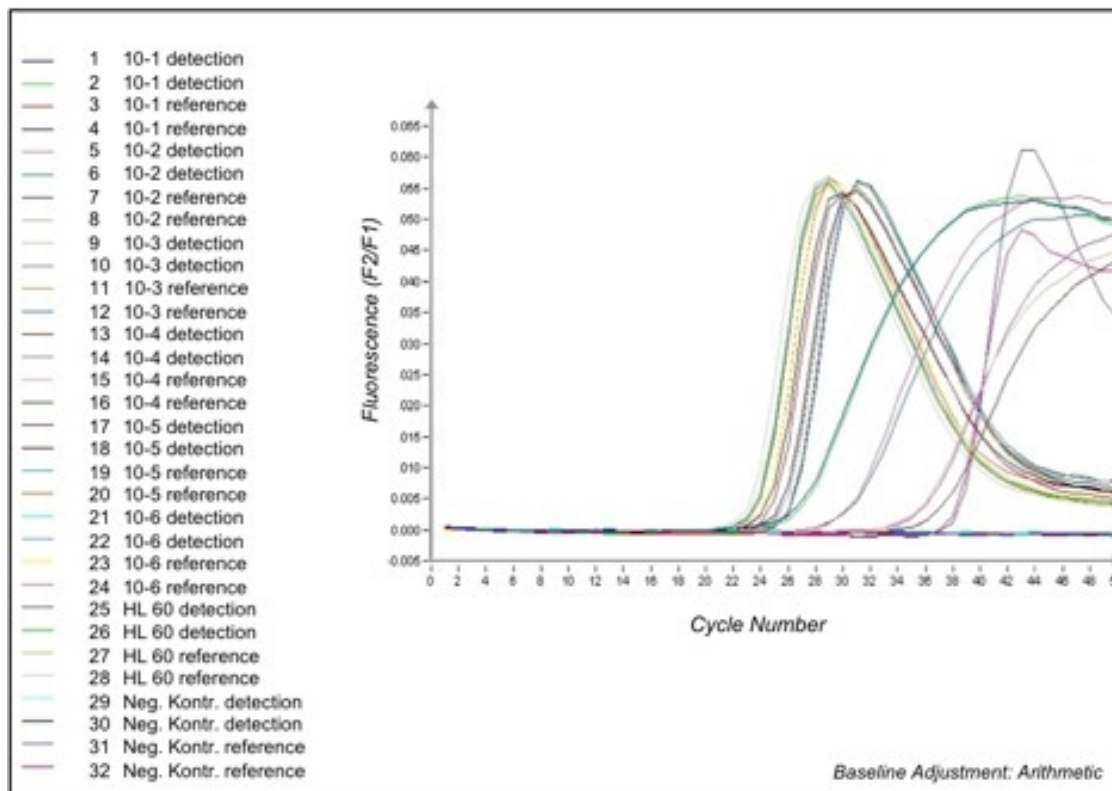


Abb. 4: Verdünnungsreihe inv(16) Real-Time-PCR
Nr. 1-24 entspricht der cDNA in den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-6} , Nr. 25-28 entspricht der cDNA der als Hintergrund eingesetzten inv(16)-negativen HL-60-Zellen, Nr. 29-32 entspricht der Negativkontrolle. Alle Proben sind jeweils im Doppelansatz aufgetragen, zweimal für die Detektion, zweimal für das Referenzgen. Die x-Achse zeigt die Zyklanzahl an, auf der y-Achse ist das Fluoreszenzsignal dargestellt.

In der Real-Time-PCR wurde *inv(16)* mit einer Sensitivität von 10^{-4} nachgewiesen. Mit zunehmender Verdünnung wurde eine höhere Zykluszahl bis zum Nachweis der Translokation benötigt. Die Verdünnung 10^{-1} wurde im 27. Zyklus positiv, die Verdünnung 10^{-2} im 30., 10^{-3} zwischen dem 33. und 36. Zyklus und 10^{-4} im 37. bzw. 38. Zyklus.

3.2.3 Verdünnungsreihen für *t(15;17)*

Bei der Translokation *t(15;17)* wurde in der primären PCR eine Sensitivität von 10^{-2} erreicht, die nested PCR zeigt eine Sensitivität von bis zu 10^{-3} . Als Positivkontrolle wurde hierbei eine Patientenprobe eingesetzt, die aus Voruntersuchungen als *t(15;17)*-positiv bekannt ist. Photometrisch wurde ein RNA-Gehalt von 98 $\mu\text{g/ml}$ sowie ein cDNA-Gehalt von 32,7 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt.

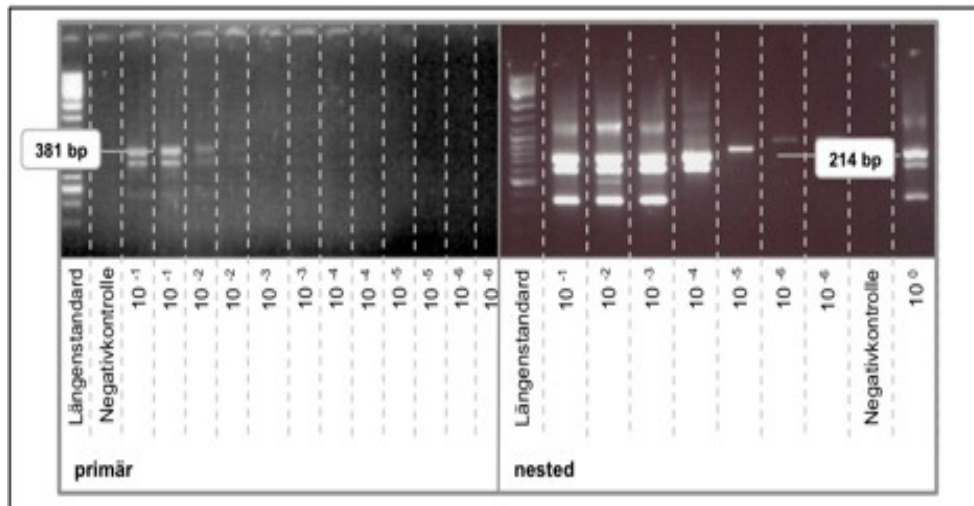


Abb. 5: Verdünnungsreihe *t(15;17)* primäre und nested RT-PCR

Aufgetragen sind jeweils ein Längenstandard, eine Negativkontrolle und cDNA bei der primären PCR im Doppelansatz in den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-6} , in der nested PCR noch zusätzliches Auftragen von 10^0 als Positivkontrolle. In der primären PCR (Bild links) ist ein Signal im Doppelansatz bis 10^{-2} sichtbar, in der nested PCR (Bild rechts) ebenfalls im Doppelansatz bis 10^{-3} .

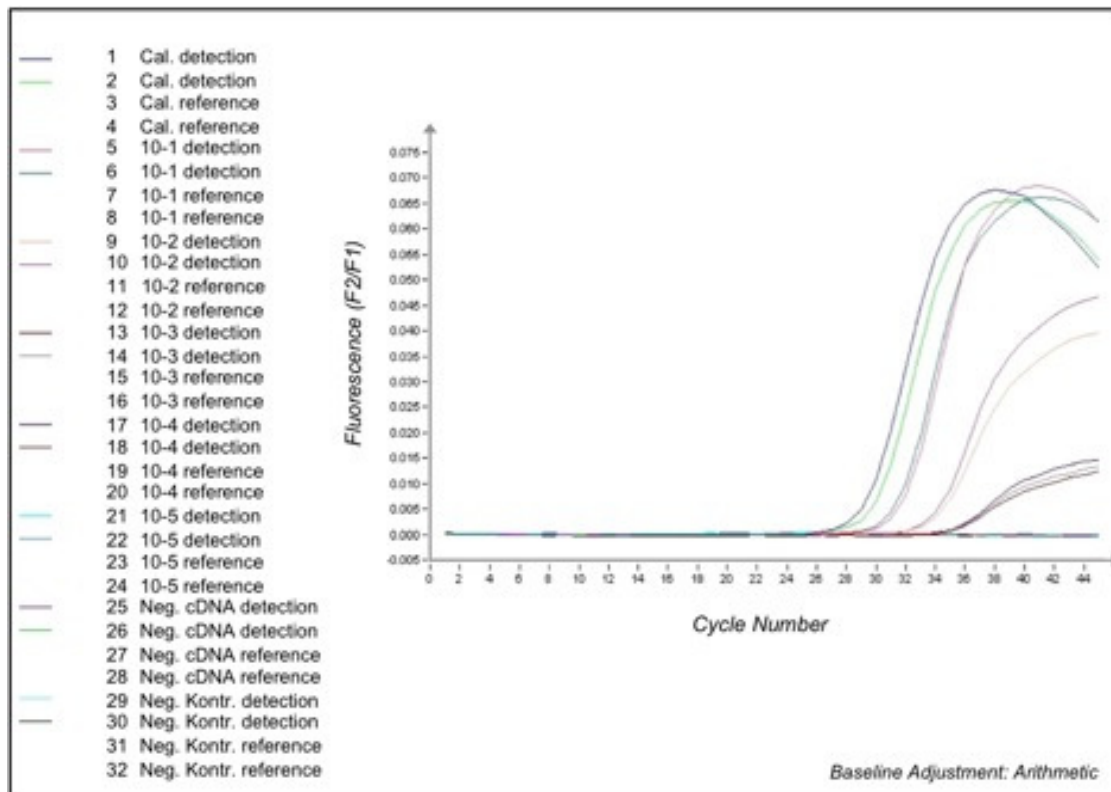


Abb. 6: Verdünnungsreihe t(15;17) Real-Time-PCR

Nr. 1-4 entsprechen der Calibrator-cDNA (Positivkontrolle), Nr. 5-24 entspricht der cDNA in den Verdünnungsstufen 10^0 bis 10^{-5} , Nr. 25-28 entspricht der cDNA der als Hintergrund eingesetzten t(15;17)-negativen HL-60-Zellen, Nr. 29-32 entspricht der Negativkontrolle. Alle Proben sind jeweils im Doppelansatz aufgetragen, zweimal für die Detektion, zweimal für das Referenzgen. Die x-Achse zeigt die Zyklanzahl an, auf der y-Achse ist das Fluoreszenzsignal dargestellt.

Die Real-Time-PCR für t(15;17) zeigte eine Sensitivität bis zu 10^{-4} an. 10^{-1} wurde im 31. Zyklus positiv, 10^{-2} im 33. Zyklus, 10^{-3} im 34. und 10^{-4} im 35. Zyklus.

3.2.4 Verdünnungsreihen für t(9;22)

Die primäre PCR zeigte eine Sensitivität von 10^{-3} . In der nested PCR gelang bis 10^{-3} der Nachweis im Doppelansatz, bei 10^{-4} zeigte sich eine Bande noch in einer Probe des Doppelansatzes. Als Positivkontrolle wurde die bcr-abl-positive Zelllinie K562 eingesetzt. Der photometrisch bestimmte cDNA-Gehalt lag bei 84,4 $\mu\text{g/ml}$.

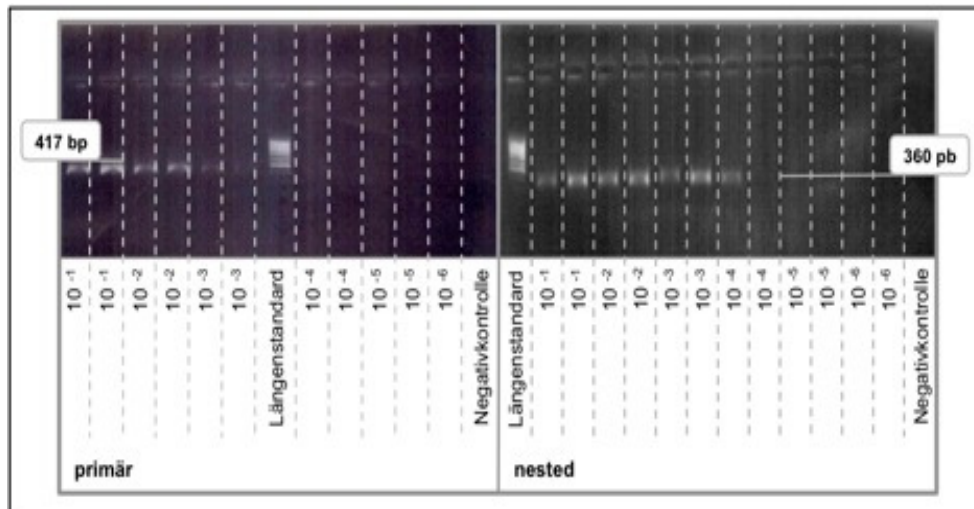


Abb. 7: Verdünnungsreihe t(9;22) primäre und nested RT-PCR

Aufgetragen sind jeweils ein Längenstandard, eine Negativkontrolle und cDNA in den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-6} . In der primären PCR (Bild links) ist ein Signal im Doppelansatz bis 10^{-3} sichtbar, in der nested PCR (Bild rechts) in einem der zwei Ansätze bis 10^{-4} .

In der Real-Time-PCR für t(9;22) wurde ebenfalls im Doppelansatz eine Sensitivität von 10^{-4} erreicht.

Translokation	Real-Time-PCR	Primäre PCR	Nested PCR
t(8;21)	10^{-5}	$10^{-3}/10^{-4}$	10^{-4}
inv(16)	10^{-4}	10^{-2}	10^{-4}
t(15;17)	10^{-4}	10^{-2}	10^{-3}
t(9;22)	10^{-4}	10^{-3}	$10^{-3}/10^{-4}$

Tab. 4: Übersicht der erreichten Sensitivitätslevel der verschiedenen Methoden

3.3 Transkriptnachweis in der Real-Time-PCR

3.3.1 Nachweis der Translokation t(15;17) in der Real-Time-PCR

Insgesamt gelang bei sechs der 42 (14,3%) untersuchten Proben in der Real-Time-PCR der Nachweis der Translokation t(15;17).

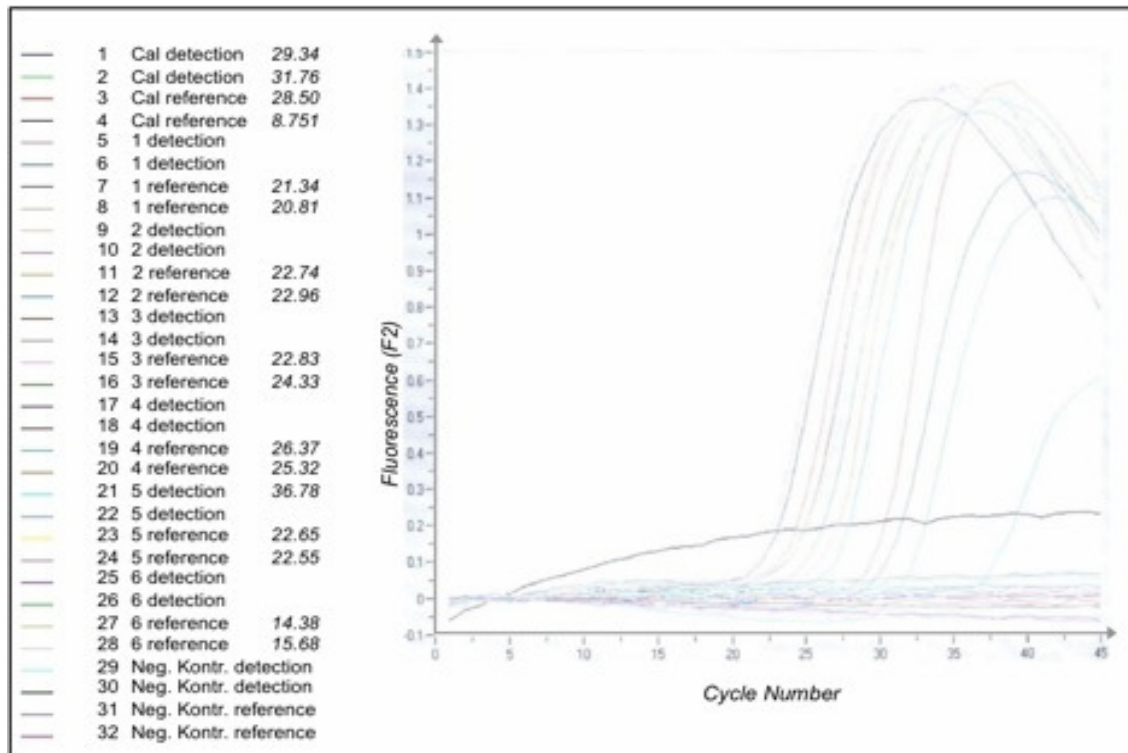


Abb. 8: Nachweis von t(15;17) in Patientenprobe Nr. 5

Nr. 1-4 entsprechen der Calibrator-cDNA (Positivkontrolle), Nr. 5-28 entspricht der jeweiligen Proben-cDNA (Probennummer 1-5), Nr. 29-32 entspricht der Negativkontrolle. Alle Proben sind jeweils im Doppelansatz aufgetragen, zweimal für die Detektion, zweimal für das Referenzgen. Die x-Achse zeigt die Zyklanzahl an, auf der y-Achse ist das Fluoreszenzsignal dargestellt.

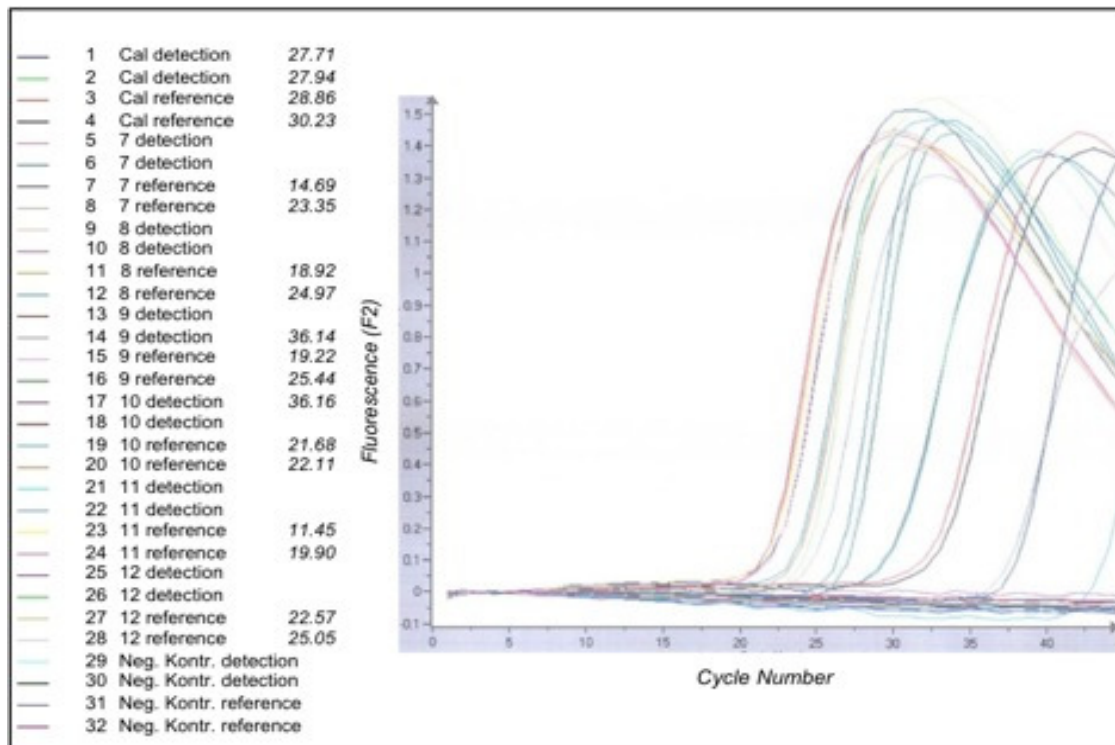


Abb. 9: Nachweis von t(15;17) in Patientenprobe Nr. 9 und 10

Nr. 1-4 entsprechen der Calibrator-cDNA (Positivkontrolle), Nr. 5-28 entspricht der jeweiligen Proben-cDNA (Probennummer 7-12), Nr. 29-32 entspricht der Negativkontrolle. Alle Proben sind jeweils im Doppelansatz aufgetragen, zweimal für die Detektion, zweimal für das Referenzgen. Die x-Achse zeigt die Zyklanzahl an, auf der y-Achse ist das Fluoreszenzsignal dargestellt.

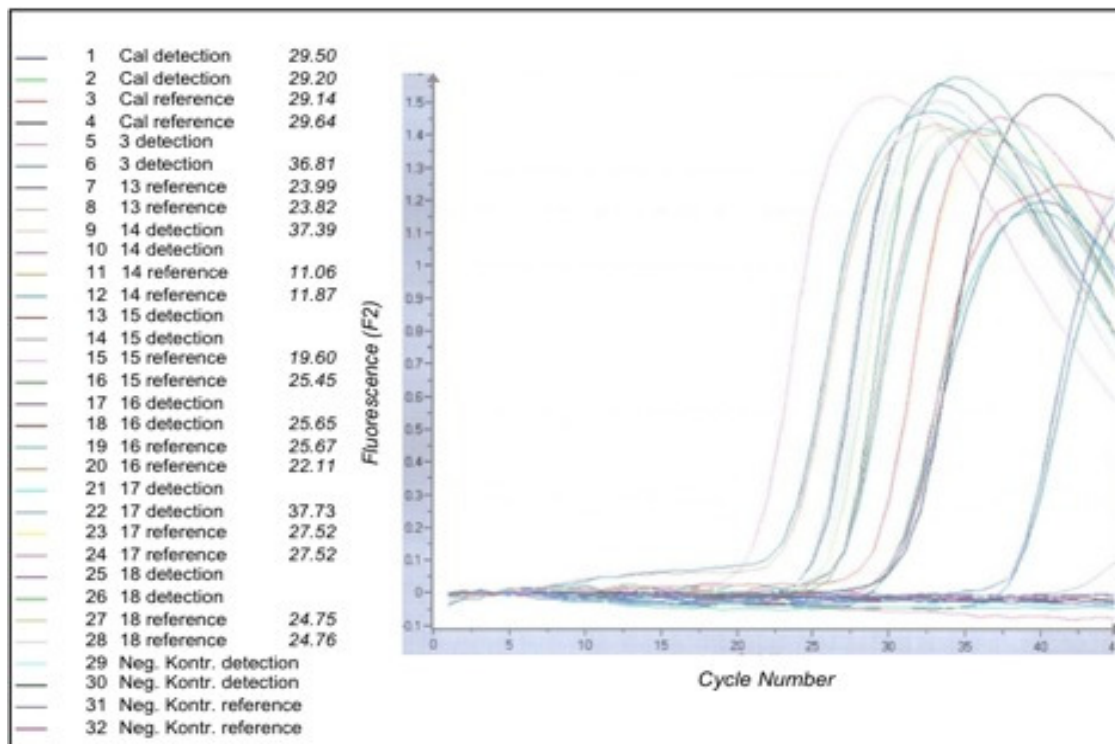


Abb. 10: Nachweis von t(15;17) in Patientenprobe Nr. 13, 14 und 17

Nr. 1-4 entsprechen der Calibrator-cDNA (Positivkontrolle), Nr. 5-28 entspricht der jeweiligen Proben-cDNA, Nr. 29-32 entspricht der Negativkontrolle. Alle Proben sind jeweils im Doppelansatz aufgetragen, zweimal für die Detektion, zweimal für das Referenzgen. Die x-Achse zeigt die Zyklanzahl an, auf der y-Achse ist das Fluoreszenzsignal dargestellt.

Insgesamt konnte bei sechs der 42 (14,3%) untersuchten Proben in der Real-Time-PCR ein Translokationsnachweis für t(15;17) erbracht werden. Alle sechs der 42 jeweils im Doppelansatz untersuchten Proben wurden in einem der zwei untersuchten Ansätze positiv (Probennummer 5, 9, 10, 13, 14, 17).

Nr.	Real-Time-PCR
	6/42 Proben positiv (14,3%)
5	1/2 +
9	1/2 +
10	1/2 +
13	1/2 +
14	1/2 +
17	1/2 +

Tab. 5: Anzahl der positiven Proben in der Real-Time-PCR.

Nr.	Zykluszahl mit Transkriptnachweis der Probe	Zykluszahl mit Transkriptnachweis der Reference
5	37	23
	neg	23
9	neg	20
	37	26
10	37	22
	neg	23
13	neg	24
	37	24
14	38	23
	neg	23
17	neg	28
	38	28

Tab. 6: Zykluszahl der Real-Time-PCR bis zum Nachweis von Transkript oder Referenzgen, jeweils im Doppelansatz

Zwei dieser positiven Proben stammen von gesunden Stammzellspendern, die vier übrigen Proben stammen von Patienten.

Nr.	Diagnose
5	NHL
9	Spender
10	NHL
13	NHL
14	Spender
17	NHL (MM)

Tab. 7: Positive Ergebnisse von t(15;17) mit Diagnose

Ein Transkript konnte im Vergleich zum Referenzgen jeweils erst nach höherer Zykluszahl nachgewiesen werden. So erfolgte der Transkriptnachweis in den Zyklen 37 und 38, das Referenzgen wurde in den Zyklen 20-28 nachgewiesen (s. Tab. 6, Abb. 11).

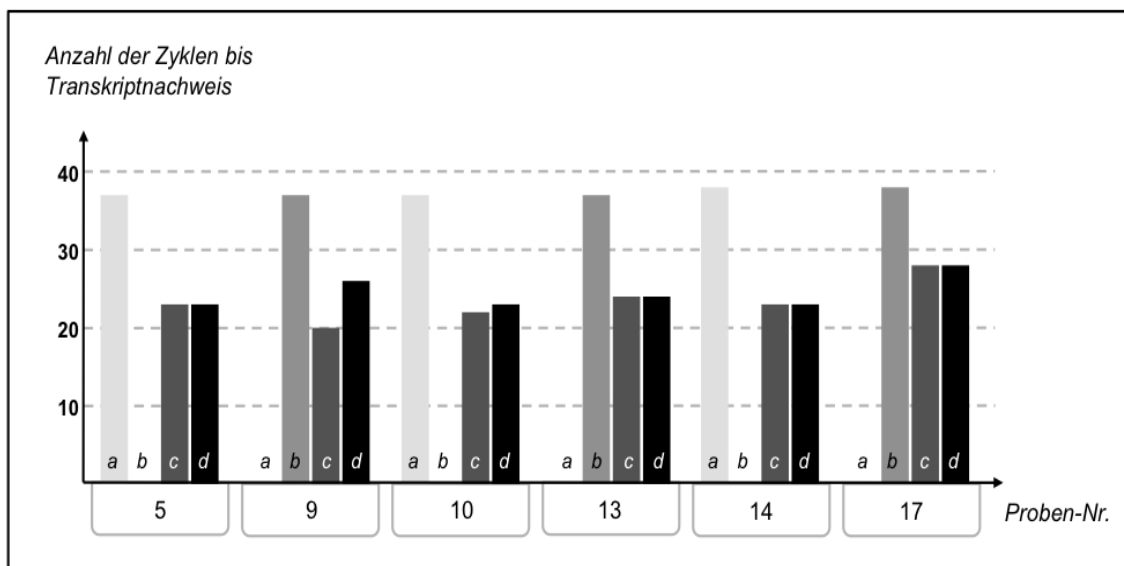


Abb. 11: Anzahl der Zyklen bis zum Transkriptnachweis

Auf der x-Achse sind die Proben (Nr. 5, 9, 10, 11, 13, 14, 17) aufgetragen, a und b entsprechen der Proben-cDNA, Balken c und d entsprechen dem Referenzgen, auf der y-Achse ist die Zyklusanzahl bis zum Transkriptnachweis dargestellt.

Die Anzahl der Zyklen in der das Transkript in den Patienten- und Spenderproben nachgewiesen wurde, liegt im Mittelwert bei 37,3 Zyklen (37-38), beim Housekeeping-Gen (G6PDH) bei 23,9 Zyklen (20-28).

3.3.2 Real-Time-PCR von t(8;21)

In keiner der 42 Proben konnte im Doppelansatz in der Real-Time-PCR die Translokation t(8;21) nachgewiesen werden.

3.3.3 Real-Time-PCR von inv(16)

In keiner der 42 Proben konnte im Doppelansatz in der Real-Time-PCR die Translokation inv(16) nachgewiesen werden.

3.3.4 Real-Time-PCR von t(9;22)

In keiner der 42 Proben konnte im Doppelansatz in der Real-Time-PCR die Translokation t(9;22) nachgewiesen werden.

3.4 Primäre und nested RT-PCR der Proben mit positivem Transkriptnachweis in der Real-Time-PCR

Bei den sechs Proben mit positiven Transkriptnachweisen in der Real-Time-PCR wurde eine primäre und nested RT-PCR durchgeführt, um diese Ergebnisse zu bestätigen.

Zuvor wurde zum Nachweis einer intakten cDNA eine abl-PCR aller sechs in der Real-Time-PCR positiven Proben durchgeführt. In allen Proben konnte das entsprechende Amplikon gezeigt werden.

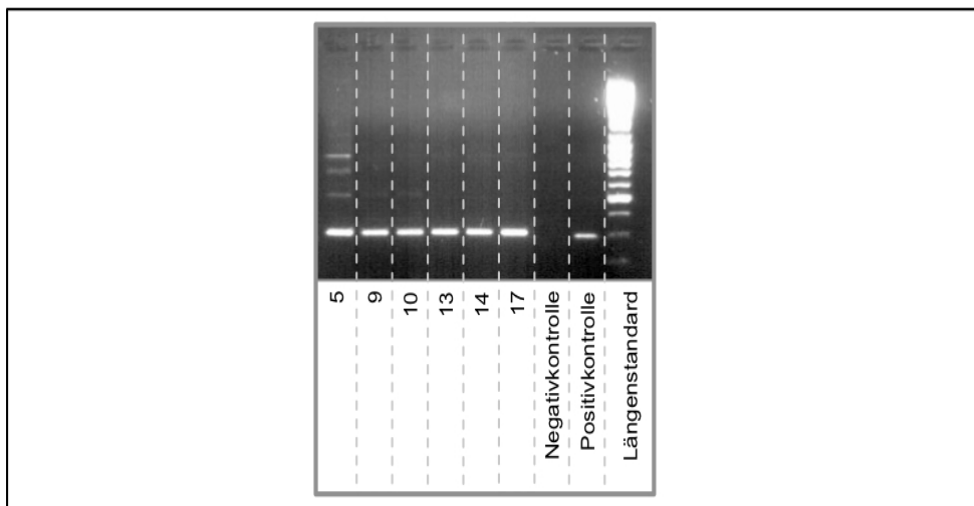


Abb. 12: abl-PCR der Patientenproben

Aufgetragen sind die cDNA der Proben 5, 9, 10, 13, 14 und 17, eine Negativkontrolle, eine Positivkontrolle und ein Längenstandard.

In den Proben 5 und 10 konnte der Transkriptnachweis mittels RT-PCR bestätigt werden. Nr. 5 und 10 wurden in einem von zwei Ansätzen in der nested PCR positiv. Die in der Real-Time-PCR positiven Proben 9, 13, 14 und 17 zeigten in der RT-PCR weder in der primären noch in der nested Untersuchung einen Transkriptnachweis.

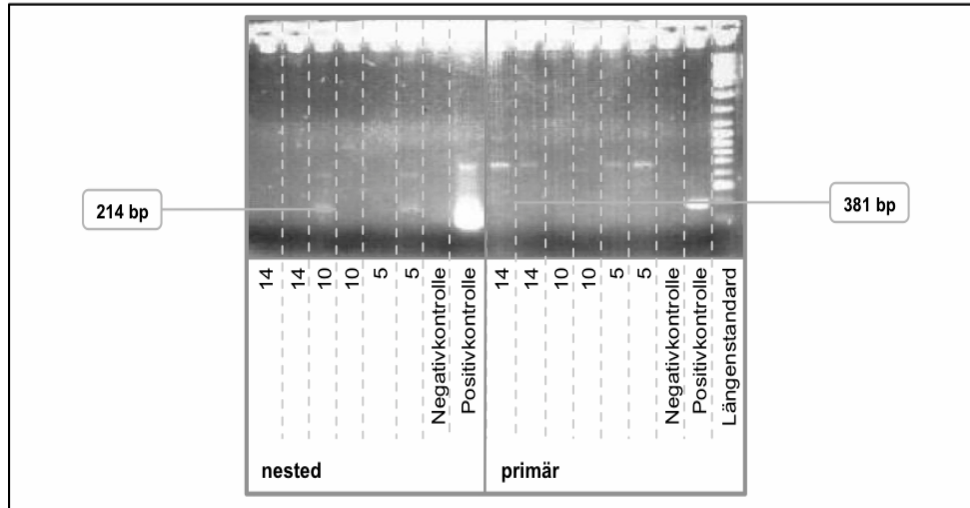


Abb. 13: primäre und nested PCR für PML-RAR α der Patientenproben Nr. 5, 10 und 14. Aufgetragen sind ein Längenstandard, sowie jeweils eine Negativkontrolle, eine Positivkontrolle und cDNA der jeweiligen Probe (Nr. 5, 10 und 14). Der linke Bildabschnitt entspricht der nested PCR, der rechte der primären PCR.

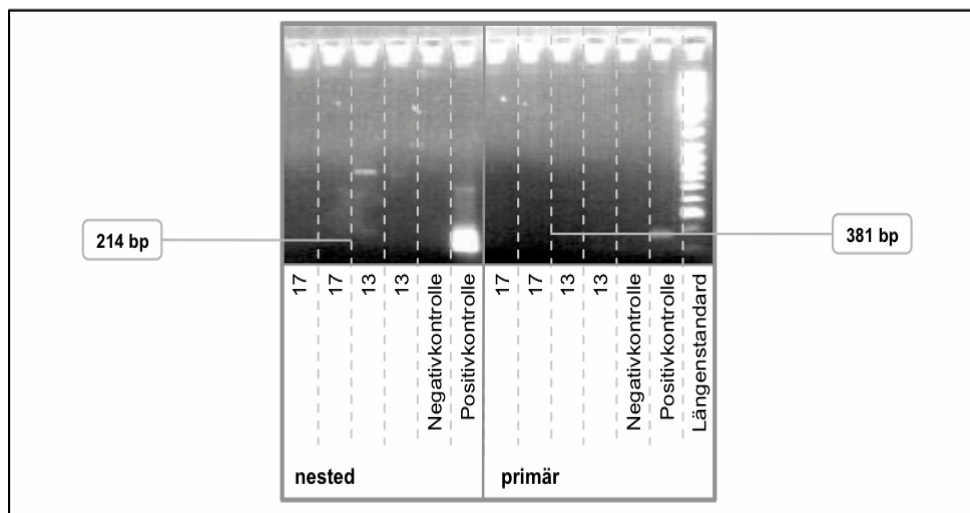


Abb. 14: primäre und nested PCR für PML-RAR α der Patientenproben Nr. 13 und 17. Aufgetragen sind ein Längenstandard, sowie jeweils eine Negativkontrolle, eine Positivkontrolle und cDNA der jeweiligen Probe (Nr. 13 und 17). Der linke Bildabschnitt entspricht der nested PCR, der rechte der primären PCR.

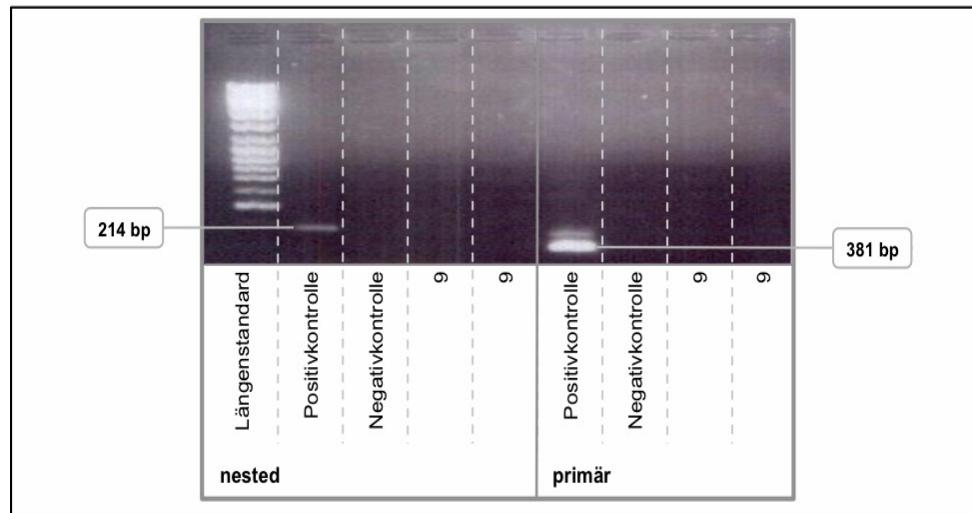


Abb. 15: primäre und nested PCR für PML-RAR α der Patientenprobe Nr. 9. Aufgetragen sind ein Längenstandard, sowie jeweils eine Negativkontrolle, eine Positivkontrolle und cDNA der Probe (Nr. 9). Der linke Bildabschnitt entspricht der nested PCR, der rechte Bildabschnitt der primären PCR.

Insgesamt konnte in der Real-Time-PCR bei sechs aus 42 Proben (14,3%) ein Transkriptnachweis von t(15;17) erbracht werden. Die mittels konventioneller PCR untersuchten Proben zeigten in der primären PCR in keiner der sechs Proben einen Transkriptnachweis, in der nested PCR in zwei Proben.

Nachweis von PML-RAR α	Nr.	Real-Time-PCR	Primäre PCR	Nested PCR
	5	1/2 +	0/4	1/4
	9	1/2 +	0/4	0/4
	10	1/2 +	0/4	1/4
	13	1/4 +	0/4	0/4
	14	1/4 +	0/4	0/4
	17	1/4 +	0/4	0/4

Tab. 8: Übersicht der Proben mit Transkriptnachweis von PML-RAR α in der Real-Time-PCR und RT-PCR

Insgesamt konnte bei 14,3% der Proben die Translokation t(15;17) nachgewiesen werden, dies entspricht einem Anteil von 12,1% in den Patientenproben (4/33) und 22,2% in den Spenderproben (2/9). In der Altersgruppe <60 Jahre lag der Transkriptnachweis bei allen Proben bei 12,9% (4/31), bei weiterer Unterteilung entfallen 12% (3/25) auf die Patientenproben und 25% (1/6) auf die Spenderproben. In der Altersgruppe >60 Jahre lag der Transkriptnachweis bei allen Proben bei 18,2% (2/11). Davon entfallen 12,5% (1/8) auf die Patientenproben, 33,3% (1/3) auf die Spenderproben.

Alter (Jahre)	untersuchte Proben	t(8;21)	inv(16)	t(15;17)	t(9;22)	Translokationshäufigkeit
22-77	alle (n = 42)	0/42	0/42	6/42 (14,3%)	0/42	14,3%
22-67	Patienten (n = 33)	0/33	0/33	4/33 (12,1%)	0/33	12,1%
38-77	Spender (n = 9)	0/9	0/9	2/9 (22,2%)	0/9	22,2%
<60	aus allen Proben (n = 31)	0/31	0/31	4/31 (12,9%)	0/31	12,9%
<60	Patientenproben (n = 25)	0/25	0/25	3/25 (12%)	0/25	12%
<60	Spender (n = 6)	0/6	0/6	1/6 (16,7%)	0/6	16,7%
≥ 60	aus allen Proben (n = 11)	0/11	0/11	2/11 (18,2%)	0/11	18,2%
≥ 60	Patientenproben (n = 8)	0/8	0/8	1/8 (12,5%)	0/8	12,5%
≥ 60	Spender (n = 3)	0/3	0/3	1/3 (33,3%)	0/3	33,3%

Tab. 9: Nachweis der Translokationen in der Real-Time-PCR unterteilt in Patient vs. Spender und Alter

4 Diskussion

Durch myeloablative Therapien mit autologer Stammzell- oder Knochenmarktransplantation bei Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen wurden erhebliche Therapiefortschritte in der Primärbehandlung oder in Rezidivsituationen gemacht. Es können aufgrund immer weiter entwickelter Chemotherapieeregime höhere Raten kompletter Remissionen erreicht werden, Kehrseite dieses Fortschrittes sind jedoch eine steigende Inzidenz von bis zu 20% von t-AML und t-MDS (Micallef et al. 2000, Pedersen-Bjergaard et al. 2000). Die Behandlung von t-AML/MDS ist bislang nicht zufriedenstellend, die Mehrzahl der Patienten verstirbt innerhalb von zwei Jahren, in einer Studie von Micallef et al. (2000) bereits 10 Monate nach Diagnosestellung. In den meisten retrospektiven Studien zur Sekundärleukämogenese wurden die Untersuchungen zur Erkennung einer MRD oder einer t-AML/MDS erst nach myeloablativen Therapien mit anschließender autologer Stammzelltransplantation durchgeführt. Aufgrund dieses Vorgehens ist es nicht geklärt, ob die nach Transplantation auftretenden t-AML/MDS bereits auf die Vortherapien oder auf die Hochdosis-Konditionierungstherapien zurückzuführen sind. Für weitere Ergebnisse über frühe posttherapeutische Aberrationen mit ihren eventuell daraus resultierende Leukämien und der t-AML/MDS Früherkennung wurden in dieser Arbeit Leukapheresatproben vor einer Hochdosischemotherapie untersucht.

Um die Ergebnisse dieser Arbeit mit denen anderer Arbeitsgruppen vergleichen zu können, wurden zunächst Verdünnungsreihen aller untersuchten Translokationen angefertigt. Die Ergebnisse lagen bei allen Translokationen bei 10^{-3} bis 10^{-5} und damit im Bereich der Publikation von van Dongen et al. (1999), die eine minimale Sensitivität von 10^{-2} in der primären PCR und von 10^{-4} in der nested PCR mit Ausnahme des Nachweis von PML-RAR α mit 10^{-3} beschreibt. Es konnte in dieser Arbeit kein Sensitivitätsvorteil für die Real-Time-PCR oder die nested PCR nachgewiesen werden. Im Einzelnen sind in der Literatur auch höhere Sensitivitäten beschrieben, für die Translokation t(8;21) in der nested PCR bis 10^{-7} und in der Real-Time-PCR von 10^{-6} (Miyamoto et al. 1996, Morschhauser et al. 2000), für inv(16) sowohl in der nested PCR als auch in der Real-Time-PCR von bis zu 10^{-6} (Martinelli et al. 1999, Guerrasio et al. 2002) und für PML-RAR α in der nested PCR von bis zu 10^{-6} (Tobal und Liu Yin 1998). Neben der Untersuchung der Inzidenz t-AML-assoziiierter Aberrationen ist die Detektion dieser Aberrationen im Transplantat insofern potentiell klinisch relevant, da sie zur Erkennung eines präleukämischen Klons vor der Transplantation verwendet werden könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte weder in der konventionellen RT-PCR noch in der Real-Time-PCR ein Transkriptnachweis von AML1/ETO erbracht werden. Bäsecke et al. (2002a) beschreiben ein Auftreten dieser Translokationen in 18% bei gesunden Personen sowie in 40% in Nabelschnurproben, sodass auch im Rahmen dieser Arbeit mit einem Nachweis des Transkripts zu rechnen gewesen wäre. Am ehesten liegt der fehlende Nachweis des AML1-ETO-Transkriptes in dieser Arbeit in der niedrigeren Sensitivität (10^{-3} bis 10^{-5}) der PCR für AML1-ETO.

Ein Nachweis einer inv(16) ist in der Literatur bei Gesunden bisher noch nicht beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses Ergebnis bestätigt, da weder bei den Patienten noch bei den gesunden Spendern ein Translokationsnachweis erbracht werden konnte.

Desweiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit in keiner Probe die Translokation t(9;22) detektiert, auch hier ist der fehlende Nachweis am ehesten in der niedrigeren Sensitivität der PCR (10^{-3} bis 10^{-4}) im Vergleich zur Arbeit von Biernaux et al. (1995) mit einer Sensitivität von bis zu 10^{-8} zu sehen. BCR-ABL ist in hämatopoetischen Zellen gesunder Personen in geringer Zahl nachzuweisen. In Nabelschnurblutproben konnte BCR-ABL bisher nicht nachgewiesen werden, daher ist davon auszugehen, dass BCR-ABL im Laufe des Lebens erworben und nicht vererbt wird (Biernaux et al. 1995). Stockschläder et al. (1996) gelang der Nachweis von t(9;22) bei einer t-AML nach vorausgehendem NHL. Die Inzidenz von BCR-ABL positiven Proben bei gesunden Erwachsenen übersteigt mit bis zu 30% deutlich die Inzidenz der entsprechenden Leukämie, von daher kann davon ausgegangen werden, dass die meisten dieser Patienten mit BCR-ABL-Nachweis, keine Leukämie entwickeln werden (Biernaux et al. 1995).

Der Nachweis der Translokation t(15;17) mit drei von sechs Proben in der nested RT-PCR zeigt ein überdurchschnittlich hohes Vorkommen. Einzig Quina et al. (2000) gelang der Nachweis des Fusionstranskripts PML-RAR α in 1,2% der Leukozyten in insgesamt 600 untersuchten Proben von drei gesunden Personen. Ein erhöhtes Durchschnittsalter liegt bei den Patienten mit dem Nachweis von PML-RAR α nicht vor. Damit ist die Vermutung, dass es bereits im Vorfeld zu vermehrter Exposition gegenüber genotoxischen Substanzen aus der Umwelt, wie ionisierender Strahlung (Preston et al. 1994), die Exposition gegenüber Benzolen (Smith et al. 1998) oder organischen Lösungsmitteln und Pestiziden (Fagioli et al. 1992) nicht zu stützen. Eine möglich andere Ursache für den vermehrten Nachweis des PML-RAR α Transkripts besteht darin, dass die 33 Patienten sowohl im Rahmen der Mobilisierungstherapie der Stammzellapheresate als auch im Vorfeld mit mehreren Zyklen Chemotherapie und hämatopoetischem Wachstumsfaktor behandelt wurden und hiermit einer erhöhten Genotoxizität ausgesetzt waren. Bei den neun gesunden Stammzellspendern wurde ebenfalls G-CSF eingesetzt, der die beschleunigte Reifung funktionsfähiger

neutrophiler Granulozyten und deren Freisetzung aus dem Knochenmark induziert. Es ist zurzeit nicht bekannt, ob eine Langzeitbehandlung von Patienten mit G-CSF das Auftreten von zytogenetischen Abnormalitäten, eines MDS oder den Übergang in eine Leukämie begünstigt (Bennett et al. 2006). Desweiteren lässt sich aufgrund des Transkriptnachweises nach vergleichsweise hoher PCR-Zyklusanzahl auf eine geringere Menge translokationstragender Zellen schließen. Möglicherweise handelt es sich bei den Translokationen somit nicht um klonale Abberationen sondern um eine vorübergehende genetische Instabilität nach Chemotherapie oder Stammzellmobilisation und die betroffenen Zellen können den genetischen Schaden entweder reparieren oder eliminieren. Zudem kann der Translokationsnachweis in avitalen oder bereits apoptotischen Zellen erbracht worden sein.

Aufgrund dieser Erkenntnisse müssen gefundene genetische Aberrationen differenziert betrachtet werden. Einerseits führt ein Vorhandensein der genetischen Veränderungen nicht immer zu der Entwicklung der assoziierten Leukämie. Einer Vielzahl von nachgewiesenen Fusionstranskripten steht sowohl in der Primärdiagnostik bei Verdacht auf eine de novo AML als auch in der MRD-Diagnostik eine geringe Anzahl von manifesten Leukämieerkrankungen gegenüber. Die meisten der positiven PCR-Resultate scheinen damit eher eine dosisabhängige und vorübergehende durch Chemotherapie ausgelöste genetische Instabilität zu zeigen und kein Hinweis auf eine t-AML in präleukämischer Phase zu sein. Trotz bestimmter Grenzwerte beim Transkriptnachweis in der MRD-Diagnostik, bei deren Überschreiten ein Rezidiv wahrscheinlich ist, wurden Rezidive auch bei Patienten gefunden, bei denen keine oder nur wenige Fusionstranskripte nachweisbar waren (Marcucci et al. 2003). Schnittger et al. (2000) zeigten in ihrer Arbeit, dass insbesondere in der MRD-Diagnostik ein hohe Zahl von Fusionsgenen mit einem erhöhten Risiko des Therapieversagens und dem Auftreten eines Rezidiv zusammenhängen. Bei in vitro Versuchen konnten ebenfalls ein rascher Anstieg von balancierten Translokationen in CD34+ Stammzellen nach Behandlung mit Topoisomerase-Hemmern nachgewiesen werden (Blanco et al. 2004, Libura et al. 2005). Eine retrospektive Studie zeigte ein Auftreten von t-AML spezifischen Translokationen bereits kurze Zeit nach Therapie mit einem Topoisomerase-Hemmer, eine klinisch manifeste t-AML trat erst über ein Jahr später auf (Magonigal et al. 2000). Abruzzese et al. (1999) untersuchten in einer retrospektiven Analyse Material von Patienten mit t-MDS nach Stammzelltransplantation und zeigten, dass bestimmte Aberrationen, die auf einen aberranten Klon hinweisen, bei neun von 12 Patienten bereits vor Transplantation nachweisbar waren. Insgesamt ist davon auszugehen, dass sowohl die konventionellen Chemotherapien als auch mit höherem leukämogenen Risiko die myeloablativen Therapien mit anschließender Stammzell- bzw. Knochenmarktransplantation

an der Entstehung von t-AML/MDS beteiligt sind (Pedersen-Bjergaard et al. 2000). Kollmannsberger et al. (1998) gehen davon aus, dass das erhöhte Risiko der t-AML/MDS eher aus den vorausgehenden Chemotherapien als aus der Hochdosischemotherapie mit anschließender Stammzelltransplantation resultiert. In einer Untersuchung von Lillington et al. (2001) wurde gezeigt, dass bereits vor einer Hochdosischemotherapie die entsprechenden Veränderungen des Karyotyps vorlagen. Hierbei entwickelten 29 von 230 Patienten (12,6%) mit der Primärdiagnose eines NHL eine t-AML/MDS nach Hochdosischemotherapie mit Cyclophosphamid, TBI und autologer Stammzelltransplantation. Bei 20 von 20 untersuchten Patienten konnten bereits vor der Hochdosischemotherapie die entsprechenden Aberrationen nachgewiesen werden. Bei Patienten die keine t-AML/MDS entwickelten, gelang dieses nur in 3 aus 24 Fällen. Somit muss die vorherige Therapie einen Einfluss haben und für eine Entwicklung der t-AML/MDS prädisponieren. Bäsecke et al. (2008) zeigten, dass bei Patienten mit NHL und intermediärer oder hochdosierter Chemotherapie t-AML assoziierte molekulare Aberrationen dosisabhängig in bis zu 55% aller Patienten nachweisbar sind ohne dass im follow-up t-AML vom Topoisomerase-Typ aufgetreten sind.

Die Entwicklung maligner Erkrankungen ist zudem ein mehrstufiger Prozess, bei dem eine bestimmte genetische Aberration zwar vorhanden sein muss, jedoch nicht als alleiniger Auslöser für den klinischen Krankheitsprozess ausreicht. Hier müssen zumindest sekundäre onkogene Veränderungen und eine veränderte immunologische Kontrolle der betroffenen Zellen auftreten, um zu einer klinisch manifesten Leukämieerkrankung zu führen. Ebenso vermuten Stock und Estrov (2000), dass aufgrund der langen Latenzzeit und dem eher seltenen Auftreten einer manifesten Leukämie, der Entwicklung einer APL mindestens ein zweites genetisches Ereignis vorausgehen muss. Insofern ist, wie bereits erwähnt, der molekulargenetische Nachweis eines AML-assoziierten Fusionstranskripts nicht gleichbedeutend mit dem Nachweis einer entsprechenden Leukämie.

Aufgrund der hohen Inzidenz von t-AML im Risikokollektiv der chemotherapierten Patienten sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob ein molekulargenetisches Screening auf t-AML assoziierte Fusionstranskripte sinnvoll zur Früherkennung von sich entwickelnden t-AML eingesetzt werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Aussagen eines möglichen Screenings auf t-AML-assoziierte Translokationen bei Risikopatienten vor autologer Stammzell- oder Knochenmarktransplantation begrenzt sind, da wesentlich mehr Translokationen nachgewiesen werden als t-AML auftreten und dieser Translokationsnachweis damit nicht indikativ für eine bestehende Leukämieentwicklung ist. Ob allerdings das Kollektiv der Patienten, die positiv für Fusionstranskripte, in diesem Fall PML-RARa, sind, ein gegenüber dem negativen Kollektiv grundsätzlich erhöhtes Risiko für

eine t-AML oder ein t-MDS im Verlauf haben (z.B. aufgrund eingeschränkter DNA-Reparaturfähigkeit), ist eine Frage, die nur durch längerfristige Nachbeobachtung geklärt werden kann.

5 Zusammenfassung

Durch myeloablative Therapien mit autologer Stammzell- oder Knochenmarktransplantation bei Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen werden aufgrund weiter entwickelter Chemotherapieregime höhere Raten kompletter Remissionen erreicht, bei einer steigenden Inzidenz auf bis zu 20% von t-AML/MDS (Micallef et al. 2000, Pedersen-Bjergaard et al. 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurden das Auftreten der Translokationen bzw. ihrer jeweiligen Fusionstranskripte t(8;21)/AML1/ETO, inv(16)/CBFB-MYH11, t(15;17)/PML-RAR α und t(9;22)/BCR-ABL in 42 Leukapheresaten (33 Patienten mit NHL und 9 gesunde Spender) mittels konventioneller und Real-Time-PCR untersucht. Weder die Translokationen t(8;21), inv(16) noch t(9;22) konnten in dieser Arbeit nachgewiesen werden, obwohl für t(8;21) und t(9;22) bereits ein Auftreten bei Gesunden beschrieben wurde (Bäsecke et al. 2002b, Biernaux et al. 1995). Jedoch konnte die Translokation t(15;17) in 6 von 42 Proben (davon 2 gesunde Spender) in der Real-Time-PCR und in 2 dieser 6 Proben in der nested RT-PCR nachgewiesen werden und zeigt damit ein überdurchschnittlich hohes Auftreten im Vergleich zu anderen Publikationen. Ein erhöhtes Durchschnittsalter und damit eine erhöhte Exposition gegenüber genotoxischen Substanzen aus der Umwelt lagen nicht vor. Jedoch sind Patienten und Spender mit G-CSF vorbehandelt, somit waren alle, die Patienten zusätzlich durch Chemotherapie, einer erhöhten Genotoxizität ausgesetzt. Trotzdem übersteigt der Nachweis des Fusionstranskriptes bei weitem die Inzidenz der t-AML. Möglicherweise handelt es sich bei den Translokationen somit um eine vorübergehende genetische Instabilität nach Chemotherapie oder Stammzellmobilisation, die nicht indikativ für eine Leukämie ist oder es wurde der Nachweis in avitalen oder bereits apoptotischen Zellen erbracht. Die Entwicklung maligner Erkrankungen ist zudem ein mehrstufiger Prozess, bei dem eine bestimmte genetische Aberration zwar vorhanden sein muss, jedoch nicht als alleiniger Auslöser für den klinischen Krankheitsprozess ausreicht. Insgesamt ist davon auszugehen, dass sowohl die konventionellen Chemotherapien als auch die myeloablativen Therapien mit Stammzell- bzw. Knochenmarktransplantation an der Entstehung von t-AML/MDS beteiligt sein können. Aufgrund der hohen Inzidenz von t-AML im Risikokollektiv der chemotherapierten Patienten ist eine Frühdiagnostik anhand molekulargenetischer Parameter wünschenswert. Die Aussagen eines möglichen Screenings auf t-AML-assoziierte Translokationen bei Risikopatienten vor autologer Stammzell- oder Knochenmarktransplantation sind aufgrund des gezeigten häufigen Transkriptnachweises ohne Entwicklung einer t-AML allerdings begrenzt, da dieser Nachweis nicht indikativ ist. Molekulargenetische und chronologische Langzeituntersuchungen des Patientenmaterials müssen folgen, um eine Aussage über das t-AML/MDS-Risiko in dem Kollektiv der Transkript-positiven Patienten machen zu können.

6 Literaturverzeichnis

Abruzzese E, Radford JE, Miller JS, Vredenburg JJ, Rao PN, Pettenati MJ, Cruz JM, Perry JJ, Amadori S, Hurd DD (1999): Detection of abnormal pretransplant clones in progenitor cells of patients who developed myelodysplasia after autologous transplantation. *Blood*, 94, 1814-1819

Alcalay M, Zangrilli D, Pandolfi PP, Longo L, Mencarelli A, Giacomucci A, Rocchi M, Biondi A, Rambaldi A, Lo Coco F (1991): Translocation breakpoint of acute promyelocytic leukaemia lies within the retinoic acid receptor alpha locus. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 88, 1977-1981

Andersen MK, Johansson B, Larsen SO, Pedersen-Bjergaard J (1998): Chromosomal abnormalities in secondary MDS and AML. Relationship to drugs and radiation with specific emphasis on the balanced rearrangements. *Haematologica*, 83, 483-488

Asou N (2003): The role of a Runt domain transcription factor AML1/RUNX1 in leukemogenesis and its clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol*, 45, 129-150

Aul C, Giagounidis A, Germing U (2001): Epidemiological features of myelodysplastic syndromes: Results from regional cancer surveys and hospital-based statistics. *Int J Hematol*, 73, 405-410

Bacher U, Schnittger S, Kern W, Hiddemann W, Haferlach T, Schoch C (2005): The incidence of submicroscopic deletions in reciprocal translocations is similar in acute myeloid leukemia, BCR-ABL positive acute lymphoblastic leukemia, and chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 90, 558-9

Bäsecke J, Cepek L, Mannhalter C, Krauter J, Hildenhausen 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. Letter to the editor.

Bäsecke J, Griesinger F, Trümper L, Brittinger G (2002b): Leukemia- and lymphoma-associated genetic aberrations in healthy individuals. *Ann Hematol*, 81, 64-75

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

Beaumont M, Sanz M, Carli PM, Maloisel F, Thomas X, Detourmignies L, Guerci A, Gratecos N, Rayon C, San Miguel J (2003): Therapy-related acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 21, 2123-2137

Bennett CL, Evens AM, Andritsos LA, Balasubramanian L, Mai M, Fisher MJ, Kuzel TM, Angelotta C, McKoy JM, Vose JM (2006): Haematological malignancies developing in previously healthy individuals who received haematopoietic growth factors: report from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) project. *Br J Haematol*, 135, 642-650

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

- Bishop JF (1996): Does it matter how remission is achieved in acute leukemia? *Leukemia, Suppl 1*, 7-9
- Bishop JF (1997): The treatment of adult acute myeloid leukemia. *Semin Oncol*, 24, 57-69
- Bishop JM (1991): Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, 64, 235-248
- Blanco JG, Edick MJ, Relling MV (2004): Etoposide induces chimeric MLL gene fusions. *FASEB J*, 18, 173–175
- 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
- Carella AM, Dejana A, Lerma E, Podesta M, Benvenuto F, Chimirri F, Parodi C, Sessarego M, Prencipe E, Frassoni F (1996): In vivo mobilization of karyotypically normal peripheral blood progenitor cells in high risk MDS; secondary or therapy-related acute myelogenous leukemia. *Br J Haematol*, 95, 127-130
- Cassileth PA, Harrington DP, Appelbaum FR, Lazarus HM, Rowe JM, Paietta E, Willman C, Hurd DD, Bennett JM, Blume KG (1998): Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission. *N Engl J Med*, 339, 1649-1656
- Cline MJ (1994): The molecular basis of leukemia. *N Engl J Med*, 330, 328-336
- Deininger MW, Vieira S, Mendiola R, Schultheis B, Goldman JM, Melo JV (2000): BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. *Cancer Res*, 60, 2049-2055
- van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F et al. (1999): Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia*, 13, 1901-1928
- Downing JR (1999): The AML1/ETO chimaeric transcription factor in acute myeloid leukaemia: biology and clinical significance. *Br J Haematol*, 106, 296-308
- Ellis M, Ravid M, Lishner M (1993): A comparative analysis of alkylating agent and epipodophyllotoxin-related leukemias. *Leuk Lymphoma*, 11, 9-13
- Estey E, Döhner H (2006): Acute myeloid leukaemia. *Lancet*, 368, 1894–1907
- Fagioli F, Cuneo A, Piva N, Carli MG, Previati R, Balboni M, Tomasi P, Cariani D, Scapoli G, Castoldi G (1992): Distinct cytogenetic and clinicopathologic features in acute myeloid leukemia after occupational exposure to pesticides and organic solvents. *Cancer*, 70, 77-85
- Felix CA (1998): Secondary leukemias induced by topoisomerase-targeted drugs. *Biochim Biophys Acta*, 1400, 233-255
- Friedberg JW, Neuberg D, Stone RM, Alyea E, Jallow H, LaCasce A, Mauch PM, Gribben JG, Ritz J, Nadler LM (1999): Outcome in patients with myelodysplastic syndrome after autologous bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*, 17, 3128-3135

- Fröhling S, Schlenk RF, Kayser S, Morhardt M, Benner A, Döhner K, Döhner H (2006): Cytogenetics and age are major determinants of outcome in intensively treated acute myeloid leukemia patients older than 60 years: results from AMLSG trial AML HD98-B. *Blood*, 108, 3280-8
- Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, Bartram C, de Klein A, Grosveld G (1984): The human c-abl oncogene in the Philadelphia translocation. *J Cell Physiol Suppl*, 3, 179-191
- Guerrasio A, Pilatrinio C, De Micheli D, Cilloni D, Serra A, Gottardi E, Parziale A, Marmont F, Diverio D, Divona M (2002): Assessment of minimal residual disease (MRD) in CBFbeta/MYH11-positive acute myeloid leukemias by qualitative and quantitative RT-PCR amplification of fusion transcripts. *Leukemia*, 16, 1176-1181
- Hiddemann W, Kern W, Schoch C, Fonatsch C, Heinecke A, Wormann B, Buchner T (1999): Management of acute myeloid leukemia in elderly patients. *J Clin Oncol*, 17, 3569-3576
- Higuchi M, O'Brian D, Lenny N, Yang S, Cai Z, Downing JR (2000): Expression of AML1-ETO immortalizes myeloid progenitors and cooperates with secondary mutations to induce granulocytic sarcoma/acute myeloid leukemia. *Blood*, 96, Suppl 1, 222a (947)
- Keating MJ, Smith TL, Kantarjian H, Cork A, Walters R, Trujillo JM, McCredie KB, Gehan EA, Freireich EJ (1988): Cytogenetic pattern in acute myelogenous leukemia: a major reproducible determinant of outcome. *Leukemia*, 2, 403-412
- Kollmannsberger C, Hartmann JT, Kanz L, Bokemeyer C (1998): Risk of secondary myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome following standard-dose chemotherapy or high-dose chemotherapy with stem cell support in patients with potentially curable malignancies. *J Cancer Res Clin Oncol*, 124, 207-214
- Kurzrock R, Shtalrid M, Talpaz M, Kloetzer WS, Gutterman JU (1987): Expression of c-abl in Philadelphia-positive acute myelogenous leukemia. *Blood*, 70, 1584-1588
- Langabeer SE, Walker H, Rogers JR, Burnett AK, Wheatley K, Swirsky D, Goldstone AH, Linch DC (1997): Incidence of AML1/ETO fusion transcripts in patients entered into the MRC AML trials. MRC Adult Leukaemia Working Party. *Br J Haematol*, 99, 925-928
- van Leeuwen FE (1996): Risk of acute myelogenous leukaemia and myelodysplasia following cancer treatment. *Baillieres Clin Haematol*, 9, 57-85
- Lengfelder E, Haferlach C, Saussele S, Haferlach T, Schultheis B, Schnittger S, Ludwig WD, Staib P, Aul C, Grüneisen A (2009): High dose ara-C in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: long-term results of the German AMLCG. *Leukemia*, 23, 2248-2258
- Leone G, Mele L, Pulsoni A, Equitani F, Pagano L (1999): The Incidence of secondary leukemias. *Haematologica*, 84, 937-945
- Leone G, Pagano L, Ben-Yehuda D, Voso MT (2007): Therapy-related leukemia and myelodysplasia: susceptibility and incidence. *Haematologica*, 92, 1389-1398
- Libura J, Slater DJ, Felix CA, 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, 2124-2131

Lillington DM, Micallef IN, Carpenter E, Neat MJ, Amess JA, Matthews J, Foot NJ, Young BD, Lister TA, Rohatiner AZ (2001): Detection of chromosome abnormalities pre-high-dose treatment in patients developing therapy-related myelodysplasia and secondary acute myelogenous leukemia after treatment for non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*, 19, 2472-2481

Löwenberg B, Suci S, Archimbaud E, Haak H, Stryckmans P, de Cataldo R, Dekker AW, Berneman ZN, Thyss A, van der Lelie J (1998): Mitoxantrone versus daunorubicin in induction-consolidation chemotherapy - the value of low-dose cytarabine for maintenance of remission, and an assessment of prognostic factors in acute myeloid leukemia in the elderly: final report. European Organization for the Research and Treatment of Cancer and the Dutch-Belgian Hemato-Oncology Cooperative Hovon Group. *J Clin Oncol*, 16, 872-881

Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. (1999): Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 341, 1051-1062

Lutterbach B, Hiebert SW (2000): Role of the transcription factor AML-1 in acute leukemia and hematopoietic differentiation. *Gene*, 245, 223-235

Marcucci G, Caligiuri MA, Bloomfield CD (2003): Core binding factor (CBF) acute myeloid leukemia: is molecular monitoring by RT-PCR useful clinically? *Eur J Haematol*, 71, 143-154

Martinelli G, Ottaviani E, Testoni N, Visani G, Terragna C, Amabile M, Trabacchi E, Montefusco V, Tura S (1999): Molecular remission in PCR-positive acute myeloid leukemia patients with inv(16): role of bone marrow transplantation procedures. *Bone Marrow Transplant*, 24, 694-697

Megonigal MD, Cheung NK, Rappaport EF, Nowell PC, Wilson RB, Jones DH, Addya K, Leonard DG, Kushner BH, Williams TM (2000) Detection of leukemia-associated MLL-GAS7 translocation early during chemotherapy with DNA topoisomerase II inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*, 97, 2814-2819

Micallef IN, Lillington DM, Apostolidis J, Amess JA, Neat M, Matthews J, Clark T, Foran JM, Salam A, Lister TA et al. (2000): Therapy-related myelodysplasia and secondary acute myelogenous leukemia after high-dose therapy with, autologous hematopoietic progenitor-cell support for lymphoid malignancies. *Clin Oncol*, 18, 947-955

Mitani K (1997): Leukemogenesis by chromosomal translocations. *Leukemia*, 11, Suppl 3, 294-296

Miyamoto T, Nagafuji K, Akashi K, Harada M, Kyo T, Akashi T, Takenaka K, Mizuno S, Gondo H, Okamura T (1996): Persistence of multipotent progenitors expressing AML1/ETO transcripts in long-term remission patients with t(8;21) acute myelogenous leukemia. *Blood*, 87, 4789-4796

Monahan BP, Rector JT, Liu PP, Cotelingem JD, Dahut W (1996) Clinical aspects of expression of inversion 16 chromosomal fusion transcript CBF β /MYH11 in acute myelogenous leukemia subtype M1 with abnormal bone marrow eosinophilia. *Leukemia*, 10, 1653-1675

Morel P, Hebban M, Lai JL, Duhamel A, Preudhomme C, Wattel E, Bauters F, Fenaux P (1993): Cytogenetic analysis has strong independent prognostic value in de novo myelodysplastic syndromes and can be incorporated in a new scoring system: a report on 408 cases. *Leukemia*, 7, 1315-1323

- Morschhauser F, Cayuela JM, Martini S, Baruchel A, Rousselot P, Socié G, Berthou P, Jouet JP, Straetmans N, Sigaux F (2000): Evaluation of minimal residual disease using reverse-transcription polymerase chain reaction in t(8;21) acute myeloid leukemia: a multicenter study of 51 patients. *J Clin Oncol*, 18, 788–794
- Mrozék K, Heinonen K, de la Chapelle A, Bloomfield CD (1997): Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia, *Semin Oncol*, 24, 17-31
- Pedersen-Bjergaard J, Phillip P (1991): Balanced translocations involving chromosome bands 11q23 and 21q22 are highly characteristic of myelodysplasia and leukemia following therapy with cytostatic agents targeting at DNA-topoisomerase II. *Blood*, 78, 1147-1148
- Pedersen-Bjergaard J, Philip P, Larsen SO, Jensen G, Byrting K (1990): Chromosome aberrations and prognostic factors in therapy-related myelodysplasia and acute nonlymphocytic leukemia. *Blood*, 76, 1083-1091
- Pedersen-Bjergaard J, Pedersen M, Roulston D, Philip P (1995): Different genetic pathways in leukemogenesis for patients presenting with therapy-related myelodysplasia and therapy-related acute myeloid leukemia. *Blood*, 86, 3542-3552
- Pedersen-Bjergaard J, Brøndum-Nielsen K, Karle H, B Johansson B (1997a): Chemotherapy-related – and late occurring – Philadelphia chromosome in AML, ALL and CML. Similar events related to treatment with DNA topoisomerase II inhibitors? *Leukemia*, 11, 1571–1574
- Pedersen-Bjergaard J, Pedersen M, Myhre J, Geisler C (1997b): High risk of therapy-related leukemia after BEAM chemotherapy and autologous stem cell transplantation for previously treated lymphomas is mainly related to primary chemotherapy and not to the BEAM-transplantation procedure. *Leukemia*, 11, 1654-1660
- Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Christiansen DH (2000): Therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplasia after high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. *Blood*, 95, 3273-3279
- Preisler HD, Davis RB, Kirshner J, Dupre E, Richards F 3rd, Hoagland HC, Kopel S, Levy RN, Carey R, Schulman P (1987): Comparison of 3 remission induction regimens and two postinduction strategies for the treatment of acute non-lymphocytic leukemia: a cancer and leukaemia group B study. *Blood*, 69, 1441-1448
- Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, Izumi S, Ron E, KuramotoA, Kamada N, Dohy H, Matsuo T et al. (1994): Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res*, 137, 68-97
- Pui CH, Relling MV (2000): Topoisomerase II inhibitor-related acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 109, 13-23
- Pulsoni A, Pagano L, Lo Coco F, Avvisati G, Mele L, Di Bona E, Invernizzi R, Leoni F, Marmont F, Mele A (2002): Clinicobiological features and outcome of acute promyelocytic leukemia occurring as a second tumor: the GIMEMA experience. *Blood*, 100, 1972-1976
- Quesnel B, Kantajian H, Bjergaard JP, Brault P, Estey E, Lai, JL, Tilly H, Stoppa AM, Archimbaud E, Harousseau JL et al. (1993): Therapy-related acute myeloid leukemia with t(8;21), inv(16) and t(8;16): a report on 25 cases and review of literature. *J Clin Oncol*, 11, 2370-2379

- Quina AS, Gameiro P, Sa da Costa M, Telhada M, Parreira L (2000): PML-RARA fusion transcripts in irradiated and normal hematopoietic cells. *Genes Chromosomes Cancer*, 29, 266-275
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2.Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989
- Sawyers CL (2002): Disabling Abl-perspectives on Abl kinase regulation and cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 1, 13-15
- 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
- Schoch C, Kern W, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T (2004): Karyotype is an independent prognostic parameter in therapy-related acute myeloid leukemia (t-AML): an analysis of 93 patients with t-AML in comparison to 1091 patients with de novo AML. *Leukemia*, 18, 120-125
- Smith MT, Zhang L, Wang Y, Hayes RB, Li G, Wiemels J, Dosemeci M, Titenko-Holland N, Xi L, Kolachana P, Yin S, Rothmann N (1998): Increased translocations and aneuploidy in chromosomes 8 and 21 among workers exposed to benzene. *Cancer Res*, 58, 2176-2181
- Solé F, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, Calasanz MJ, Luno E, Prieto F, Granada I, Hernández JM, Cigudosa JC (2000): Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*, 108, 346-356
- Stock W, Estrov Z (2000): Studies of minimal residual disease in acute lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*, 14, 1289-1305
- Stockschlader M, Fiedler W, Zander A, Weh HJ, Hossfeld DK (1996): Philadelphia chromosome-positive secondary acute myeloid leukemia following high-dose chemotherapy with peripheral blood progenitor cell support for relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Hematol*, 73, 291-293
- de Thé H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A (1990): The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature*, 347, 558-61
- Tobal K, Liu Yin JA (1998): RT-PCR method with increased sensitivity shows persistence of PML-RARA fusion transcripts in patients in long-term remission of APL. *Leukemia*, 12, 1349-1354
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988): Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, 319, 525-532
- Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R (1989): Allelotype of colorectal carcinomas. *Science*, 244, 207-210
- Wattjes MP, Krauter J, Nagel S, Heidenreich O, Ganser A, Heil G (2000): Comparison of nested competitive RT-PCR and real-time RT-PCR for the detection and quantification of

AML1/MTG8 fusion transcripts in t(8;21) positive acute myelogenous leukaemia. *Leukemia*, 14, 329-335

White AD, Hoy TG, Jacobs A (1994): Extended cytogenetic follow-up and clinical progress in patients with myelodysplastic syndromes (MDS). *Leuk Lymphoma*, 12, 401-412

Wiernik PH, Banks PL, Case DC Jr., Arlin ZA, Periman, PO, Todd MB, Ritch PS, Enck RE, Weitberg AB (1992): Cytarabine plus idarubicin or daunorubicin as induction and consolidation therapy for previously untreated adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 79, 313-319