

Klonierung und Charakterisierung des Formin-  
bindenden Proteins 17 ( FBP 17),  
einem neuen 11q23 / MLL-Fusionspartner bei  
Patienten mit  
Akuter Myeloischer Leukämie

**Inaugural-Dissertation**  
**zur**  
**Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**  
**der Humanmedizinischen Fakultät**  
**der Justus-Liebig-Universität Gießen**

vorgelegt von

**Gönnna-Frauke Rehkamp**

aus Wilhelmshaven

Gießen, 2003

**Aus dem  
Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin  
des  
Universitätsklinikums Gießen**

Gutachter: PD Dr. med. A. Borkhardt

Gutachter: Prof. Dr. med. Pralle

Tag der Disputation: 15.03.2004

**Meinem Mann Christoph und unserem Sohn Luke in Liebe und Dankbarkeit**

## Inhaltsverzeichnis

<b>Erklärung von gebrauchten Abkürzungen und Begriffen</b>	<b>i</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>S. 1</b>
1.1. Allgemeines	S. 1
1.2. Historischer Abriss	S. 1
1.3. Klassifikationen von Leukämien	S. 1
1.4. Ätiologie	S. 4
1.5. Pathogenese	S. 6
1.6. Region 11q23 / MLL-Rearrangements	S. 11
<b>2. Zielstellung der Arbeit</b>	<b>S. 13</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>S. 14</b>
3.1. Isolation von DNA	S. 14
3.1.1. Isolation von genomischer DNA	S. 14
3.1.2. Isolation von Plasmid-DNA	S. 14
3.1.3. Isolation von DNA aus PCR-Produkten	S. 15
3.1.4. Isolation von DNA aus Agarose-Gel	S. 15
3.2. Isolation von RNA	S. 16
3.3. cDNA-Synthese	S. 17
3.4. Southern Blot und Screening einer P1-Klon-Bibliothek	S. 17
3.5. Northern Blot	S. 18
3.6. Polymerase Chain Reaction (PCR)	S. 19
3.7. Modifikationen der PCR	S. 20
3.7.1. Nested PCR	S. 20
3.7.2. RACE-PCR	S. 21
3.8. DNA-Klonierung	S. 22
3.9. DNA-Sequenzierung	S. 24
3.10. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	S. 26
3.11. Immunhistochemie	S. 26

<b>4. Ergebnisse</b>	<b>S. 27</b>
4.1. Zytogenetische Daten von Säuglingen mit Leukämien	S. 27
4.2. Fallbericht	S. 28
4.3. Isolation eines neuen MLL-Partnergens	S. 29
4.4. mRNA-Expression von FBP 17	S. 37
4.5. Proteinexpression	S. 38
4.5.1. Zusammenfassung der Proteinexpression von FBP 17	S. 40
4.6. Untersuchungen auf FBP 17 / 9q34 und FISH-Analysen bei Patienten mit 9q34-Aberrationen	S. 44
<b>5. Diskussion</b>	<b>S. 47</b>
5.1. 11q23-Aberrationen bei Säuglingen	S. 47
5.2. MLL-FBP 17	S. 48
5.3. Formine	S. 50
5.4. Protein-Expression	S. 51
5.5. Untersuchungen bei Patienten mit 9q34-Aberrationen	S. 51
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>S. 52</b>
<b>7. Danksagung</b>	<b>S. 53</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>S. 54</b>
<b>9. Anhang</b>	<b>S. 62</b>
9.1. Sequenz FBP 17	S. 62
9.2. Primer	S. 63
9.3. Vektor pBluescript	S. 66
<b>10. Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>S. 67</b>
<b>11. Lebenslauf</b>	<b>S. 68</b>

### Erklärung von gebrauchten Abkürzungen und Begriffen

ALL	Akute <b>L</b> ymphatische <b>L</b> eukämie; Proliferation von lymphopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks
AML	Akute <b>M</b> yeloidische <b>L</b> eukämie; Proliferation von myeloopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks
B-ALL	Akute <b>L</b> ymphatische <b>L</b> eukämie von <b>B</b> -Zell-Lymphozyten (CD 19-positiv)
C-ALL	Akute <b>L</b> ymphatische <b>L</b> eukämie vom <b>common</b> typ, CD 10 <sup>+</sup> (calla-Antigen-positiv)
CD	<b>C</b> luster of <b>D</b> ifferentiation: Ordnungssystem der Antigenstrukturen der Zelle; „CD-Marker“
Cdc 15	<b>C</b> ell <b>d</b> ivision <b>c</b> ontroll protein 15, eine essentielle Proteinkinase im Zellzyklus; reguliert in Hefen die Actin-Reorganisation während der Mitose
Cdc 42	<b>C</b> ell <b>d</b> ivision <b>c</b> ontroll protein 42
Chromosom	Ein sich selbständig replizierendes DNA-Molekül mit mehreren Genen
CIP4	Vermittler zwischen der cdc42 Kinase, Cytoskelett-Proteinen und weiteren Proteinen
CLL	<b>C</b> hronisch <b>L</b> ymphatische <b>L</b> eukämie; monoklonale Proliferation reifer B-Lymphozyten (selten auch der T-Lymphozyten) in Knochenmark, Lymphknoten, Blut, Milz und Leber
CML	<b>C</b> hronisch <b>M</b> yeloidische <b>L</b> eukämie; maligne Entartung der myeloischen Stammzellen, vor allem starke Vermehrung der Granulozyten und deren Vorstufen
Deletion, del	Stückverlust an einem Chromosom

DNA-Klonierung	Mittels eines Klonierungsvektors Vermehrung eines rekombinaten DNA-Moleküls in einem Wirtsorganismus
DNA-Sequenzierung	Bestimmung der Nukleotidreihenfolge eines DNA-Moleküls
EMBL	<b>E</b> uropean <b>M</b> olecular <b>B</b> iology <b>L</b> aboratory: Labor in Heidelberg, das eine Datenbank aller bekannten DNA-Sequenzen enthält.
Exon	Ein Abschnitt codierender DNA
FAB	Leukämieklassifikation nach morphologisch-zytochemischen Kriterien, ausgearbeitet durch eine <b>F</b> ranzösisch – <b>A</b> merikanisch – <b>B</b> ritische Arbeitsgruppe
FER	Protoonkogen; Protein-Tyrosinkinase
FER-CIP4	Homologiedomäne, bei der es sich um ein Strukturmotiv handelt, das eine mögliche Regulationsfunktion auf die GTPase Rho ausübt.
FISH	<b>F</b> luoreszenz- <b>i</b> n- <b>s</b> itu- <b>H</b> ybridisierung
FBP 17	<b>F</b> ormin- <b>b</b> indendes <b>P</b> rotein 17
GAP	<b>G</b> TPase <b>a</b> ktivierendes <b>P</b> rotein
Gen	aus Nukleotiden aufgebauter DNA-Abschnitt, der für ein Protein kodiert
Inversion	Durch einen Bruch an zwei Stellen des Chromosoms mit Richtungsänderung eines Abschnittes nach Wiedereingliederung kommt es zu einer Strukturveränderung. Man unterscheidet perizentrische (Zentromer mit einbezogen) und parazentrische Inversionen.
Intron	Ein Abschnitt nicht codierender DNA
MDS	<b>M</b> yelodysplastisches <b>S</b> yndrom, beschreibt eine Gruppe von Erkrankungen der hämatopoetischen Stammzellen mit Proliferations- und Differenzierungsstörungen

	<p>aller drei blutbildenden Zellsysteme mit nachfolgender Anämie, Leuko- und / oder Thrombozytopenie</p>
MLL Gen	<p><b>Mixed Lineage Leukemia</b> Gen, auch als ALL-1, HRX oder HRTX bezeichnet. 100kb genomische DNA großes Gen auf Chromosom 11q23, kodiert für einen Transkriptionsfaktor</p>
Nested PCR	<p>PCR-Verfahren, bei dem die Zielsequenz zunächst durch ein extern und nachfolgend intern lokalisiertes Primerpaar amplifiziert wird. Dient der Steigerung von Sensitivität und Spezifität.</p>
Northern Blot	<p>Methode, um RNA aus einem Agarosegel auf einer Membran zu immobilisieren und nachfolgend mit einer genspezifischen, markierten Sonde zu hybridisieren.</p>
P1-Klon	<p>Klonierung-System, das den Bakteriophagen P1 als Vektor nutzt</p>
PAC	<p><b>Plasmid Artificial Chromosome</b></p>
PCR	<p><b>Polymerase Chain Reaktion</b> = Polymerase Kettenreaktion, bei der enzymatisch in vitro DNA-Abschnitten vermehrt werden.</p>
Promotor	<p>Nucleotidsequenz eines Gens, die ein Signal für die Anheftung der RNA-Polymerase darstellt.</p>
Protease	<p>Proteinabbauendes Enzym</p>
RACE-PCR	<p><b>Rapid amplification of cDNA ends</b>; spezielles PCR-Verfahren zur semispezifischen Amplifikation. Das Verfahren basiert auf der Verwendung nur eines genspezifischen Primers, der mit einem unspezifischen Primer willkürlicher Sequenz zusammen eingesetzt wird.</p>

RAS	Protoonkogene (K-RAS, H-RAS, N-RAS), wobei Punktmutationen in den RAS-Genen zu den häufigsten genetischen Veränderungen in menschlichen Tumoren gehören.
Rho	Familie kleiner GTPasen
RT-PCR	Reverse Transcriptase - PCR; spezielles PCR-Verfahren, bei dem die mRNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden muss und anschließend amplifiziert wird.
SMART	<b>Switching Mechanism At 5'end of RNA Transcript;</b> PCR-Methode, bei der first-strand cDNA gleich in die RACE-PCR eingesetzt werden kann.
Southern Blot	Methode, um DNA aus einem Agarosegel auf einer Membran zu immobilisieren und nachfolgend mit einer genspezifischen, markierten Sonde zu hybridisieren.
Splicing	Entfernung der Intronsequenz aus einem primären RNA-Transkript durch ein Spliceosom, einem Enzymkomplex
Touch-down-PCR	Spezielles PCR-Verfahren, bei dem die Annealingtemperatur der Primer im Verlauf der PCR sukzessive abgesenkt wird.
Transkriptionsfaktor	Proteine, die durch Bindung an spezifischen DNA-Abschnitten die mRNA-Synthese von Genen (= die Transkription) regulieren. Diese „trans“-wirkenden Faktoren sind nicht an einen Ort des Genoms gebunden und können sich daher frei im Zellkern bewegen und so die Aktivität von mehreren Genen beeinflussen. Die mRNA-Synthese eines einzelnen Gens kann wiederum durch

	mehrere Transkriptionsfaktoren gesteuert werden.
Translokation	Bruchstücktausch zwischen zwei oder mehreren Chromosomen
YAC	<b>Y</b> east <b>a</b> rtificial <b>c</b> hromosoms
3'-Ende	Das Ende eines Polynukleotids, das die Hydroxylgruppe an der 3'-Position des Zuckers trägt.
5'-Ende	Das Ende eines Polynukleotids, das die Phosphatgruppe an der 5'-Position des Zuckers trägt.

## **1. Einleitung**

### **1.1. Allgemeines**

Leukämien sind hämatologische Neoplasien, bei denen eine klonale Vermehrung einer hämatopoetischen Vorläuferzelle vorliegt. Durch die Verdrängung der normalen Hämatopoese resultiert eine Knochenmarksinsuffizienz. Sekundär kann es auch zu einer Infiltration von anderen Organen und Geweben, wie zum Beispiel von Milz, Lymphknoten, Leber, ZNS etc. kommen.

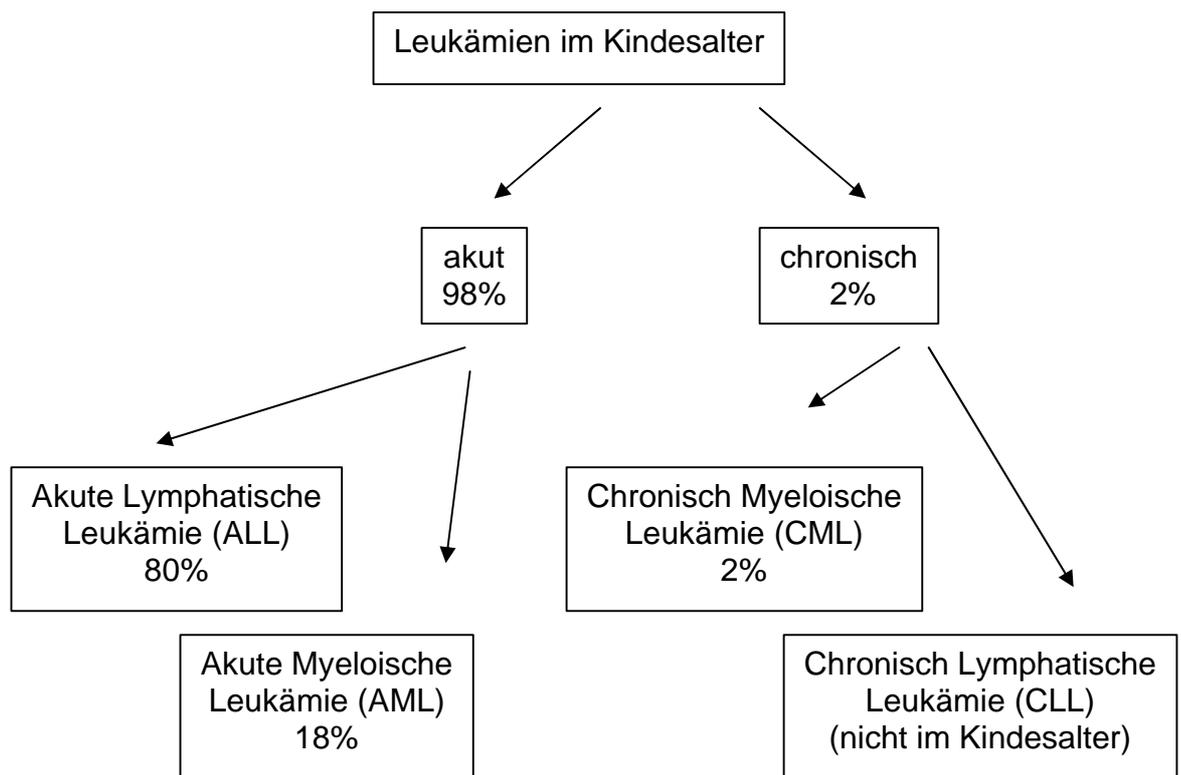
### **1.2. Historischer Abriss**

1845 wurde die Leukämie erstmals von Virchow in Berlin und dem Schotten Benett beschrieben. Virchow gab der Erkrankung ihren Namen, übersetzt heißt sie Weißblütigkeit. Anfang des 20. Jahrhunderts unterschied Friedrich akute und chronische Formen. Verschiedene Therapieversuche zur Linderung der Erkrankung wurden unternommen – angefangen bei Arsen, Olivenöl und Benzol über eine passager wirksame Röntgenbestrahlung bis zu Bluttransfusionen bzw. Austauschtransfusionen. Einen wegweisenden Durchbruch in der Therapie der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) brachte die Anwendung von Folsäureantagonisten, über die Faber und Mitarbeiter 1948 im New England Journal of Medicine berichteten.

### **1.3. Klassifikationen von Leukämien**

Leukämien werden zum einen in akute und chronische, zum anderen in lymphatische und myeloische Leukämien unterteilt. Außerdem kann man die Leukämien morphologisch, immunophänotypisch, zyto- und molekulargenetisch weiter differenzieren. Dies ist heutzutage vor Therapiebeginn obligat.

Im Kindesalter kommen Akute Lymphatische (ALL), Akute Myeloische (AML) Leukämien sowie Chronisch Myeloische Leukämien (CML) vor. Die im Erwachsenenalter häufig vorkommende Chronisch Lymphatische Leukämie (CLL) findet sich so gut wie nie im Kindesalter.



**Abbildung 1: Übersicht über die unterschiedlichen Leukämieformen**

Die Akute Lymphatische Leukämie (ALL) teilt man vor allem nach immunologischen Kriterien ein. Hierdurch wird eine Zuordnung zu einem bestimmten Differenzierungsstadium und dem Ursprung aus B- oder T-Zellen möglich, d.h. zwischen der B-ALL (2-3%), der T-ALL (12-15%), der Common-ALL / prä-B-ALL (75%), der Pro-B-ALL 6-8% und der sehr seltenen Akuten Undifferenzierten Leukämie (AUL) kann unterschieden werden.

Die Entwicklung der Hybridomtechnik zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern erlaubte wesentliche Fortschritte in der immunologischen Klassifikation der Leukämien (G. Köhler, C. Milstein 1975). Durch sie können diverse Differenzierungssysteme, so genannte cluster of differentiation (CD Marker) nachgewiesen werden, die den Reifungsstufen der B- und T-Zellreihe entsprechen. Zur Leukämieklassifikation wird ein Panel verschiedener Antikörper eingesetzt, da die Expression eines bestimmten Antigens bis auf wenige Ausnahmen keine absolute Linienspezifität aufweist.

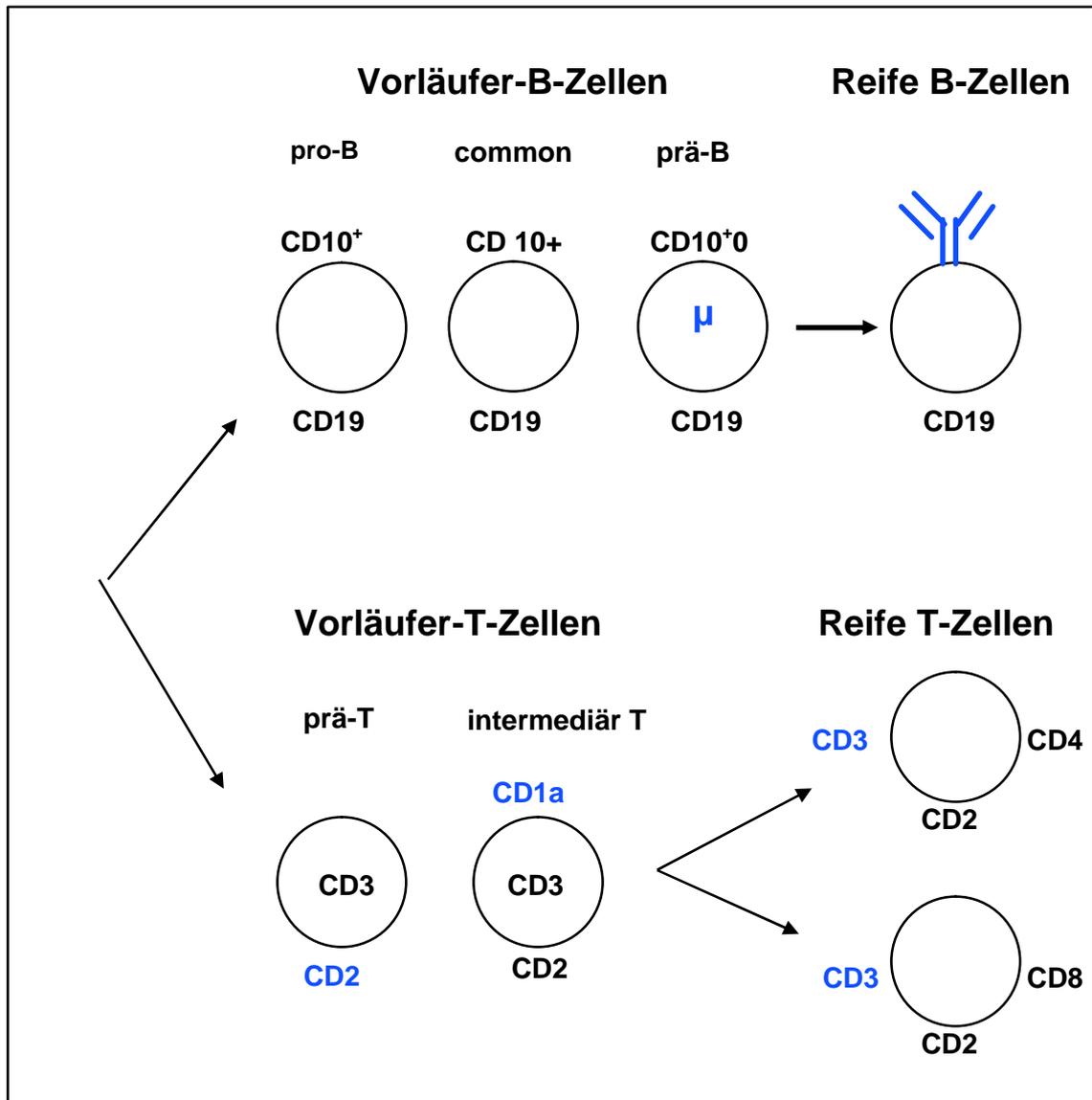


Abbildung 2: Akute Lymphatische Leukämien, immunologische Klassifikation

Die Akute Myeloische Leukämie wird vor allem nach morphologischen, immunzytochemischen und molekulargenetischen Kriterien unterschieden.

Die AML wird nach ihrer Morphologie nach der French-American-British-Klassifikation (FAB) unterteilt in:

- M 1 = Myeloblastenleukämie (selten Granula)
- M 2 = Myeloblastenleukämie mit Reifungszeichen (azurophile Granula)
- M 3 = Promyelozytenleukämie (hypergranuläre Promyelozyten)

- M 4 = Myelomonozytäre Leukämie (monozytoide Blasten)
- M 5 = Monoblastenleukämie (Monoblasten, Promonozyten)
- M 6 = Erythroleukämie (unreife Erythroblasten)
- M 7 = Megakaryozytenleukämie (unreife Blasten)

Zytochemisch kann man die Subtypen der AML nach dem Fehlen oder Vorhandensein von Myeloperoxydase, spezifischer Esterase (Chloracetatesterase) und / oder unspezifischer Esterasen ( $\alpha$ -Naphthylacetatesterase,  $\alpha$ -Naphthylbutyratesterase, Naphtolacetatesterase) unterscheiden.

Molekular-zytogenetisch werden Untersuchungen auf chromosomale Aberrationen wie Translokationen, Inversionen, Genumlagerungen, Onkogenamplifikationen etc. durchgeführt.

Immunphänotypisch können linienspezifische oder in bestimmten Reifungsstadien auftretende Zellantigene mittels monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden.

#### **1.4. Ätiologie**

Die Ätiologie von Leukämien ist zum großen Teil unbekannt. Verschiedene Faktoren werden als Auslöser diskutiert, wie zum Beispiel Benzol, hohe Dosen ionisierender Strahlung, virale Faktoren. So ist bekannt, dass das HTLV-Virus 1 (human t-cell-leukemia-virus-1) T-Zell-Leukämien des Erwachsenen (ATL) induziert. Auch unselektive Zellgifte, die im Rahmen von Polychemotherapien verwendet werden, können Leukämien auslösen, vor allem alkylierende Zytostatika und Etoposid. Daneben existieren auch noch genetisch bedingte Erkrankungen, die mit einem erhöhten Leukämierisiko einhergehen, wie z.B. die Trisomie 21 (Down-Syndrom), die Bruton'sche Agammaglobulinämie, das Wiskott-Aldrich-Syndrom und das „Schwere Kombinierte Immundefizienzsyndrom“ (SCID). Das Fanconi-Syndrom, das Bloom-Syndrom sowie die Ataxia teleangiectasia zeigen bei allgemein chromosomaler Instabilität des Gesamtgenoms eine extrem gesteigerte Leukämieneigung.

Wahrscheinlich handelt es sich um ein Zusammenspiel von genetischen Faktoren, einer besonderen Exposition und so genannten immunologischen

Modifikatoren (zum Beispiel Immunsuppression oder Infektion), die zur klonalen Proliferation von Leukämiezellen führen.

So hat sich auch die Arbeitsgruppe um Mel Greaves in London in den vergangenen Jahren mit der Ätiologie der ALL beschäftigt, und zwar mit der Assoziation von Infektionen und common-ALL, der häufigsten Leukämieform im Kindesalter. Man geht heute davon aus, dass eine Infektion wenig pathogener Infektionserreger in Kombination mit einem hyperregenerativen Immunsystem zu einer unkontrollierten Proliferation von B-Vorläuferzellen beiträgt. Der Zeitpunkt der Infektion spielt unter anderem eine Rolle. Schon kurz nach Geburt kommt jedes Kind mit vielen banalen Krankheitserregern in Kontakt, wodurch das neonatale Immunsystem moduliert wird (C. Barrios et al. 1996). Bei fehlender Exposition, zum Beispiel durch übertriebene Hygiene, kann diese Modulation unterbleiben und daraus eine inadäquate Immunantwort bei späterer Exposition resultieren. Diese Annahme wird durch diverse epidemiologische Daten gestützt, die zeigen, dass Kinder, die mit Geschwistern aufwachsen, gestillt wurden oder früh eine Krabbelgruppe besucht haben, statistisch signifikant seltener an einer common-ALL erkranken (M. F. Greaves 1991).

Dennoch bleibt das spezifische infektiöse Agens bisher unklar. In einer Fallkontrollstudie wurden von Mitarbeitern des Deutschen Krebsregisters Seren auf die Prävalenz von Antikörpern gegen Epstein-Barr-Virus (EBV), Humanes Herpes Simplex Virus 6 (HHV-6), adeno-assoziiertes Virus 2 (AAV-2) und Parvovirus B19 (B-19) untersucht. Dabei fand sich kein protektiver Effekt für HHV-6, AAV-2 oder B-19. Allerdings wurden bei Kindern mit Leukämien unter 6 Jahren häufiger Antikörper gegen EBV gefunden (B. Schlehofer et al. 1996).

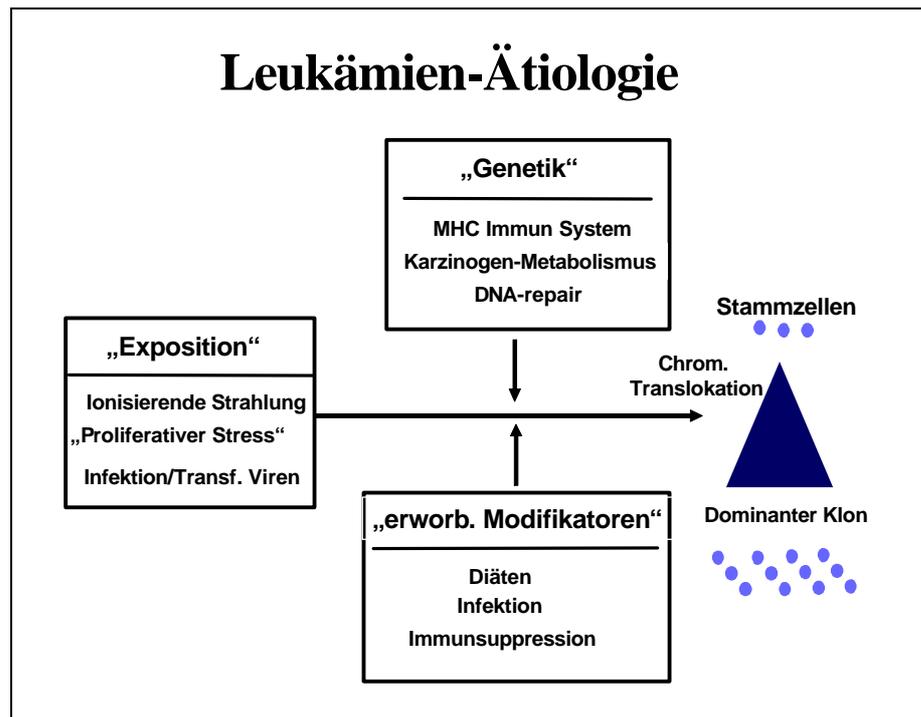


Abbildung 3: Multifaktorielle Ätiologie von Leukämien

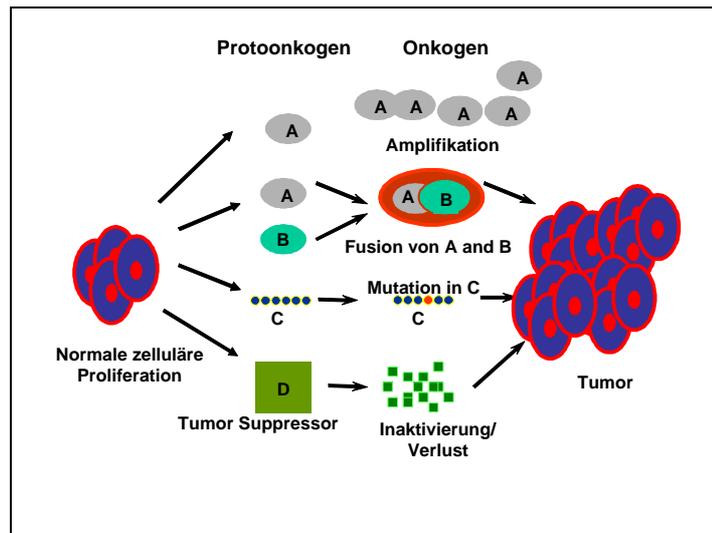
### 1.5. Pathogenese

Die Umwandlung einer gesunden Zelle in eine Tumorzelle bezeichnet man als maligne oder neoplastische Transformation (C. Wagener 1996). Aufgrund eines raschen, von normalen Regulationsmechanismen unbeeinflussten Wachstums sowie einer gestörten Reifungstendenz kommt es zu einer ungehemmten Proliferation und Suppression der nichtneoplastischen Hämatopoese, die sich klinisch in einer Anämie, Granulozytopenie und Thrombozytopenie zeigt. Ferner kommt es zu einer Ausschwemmung der malignen Zellen in das periphere Blut. Die leukämische Proliferation muss nicht nur im Knochenmark stattfinden, sondern auch in anderen Organen, vor allem in Haut, Lymphknoten, Gonaden, Nasennebenhöhlen und ZNS.

Reagiert die Zelle hyperaktiv auf normale Wachstumsstimuli oder von diesen entkoppelt und somit dereguliert, kann es zu dieser malignen Entartung einer gesunden Zelle kommen. Die Deregulation führt zur einer uneingeschränkten Fortführung des Zellzyklus, einer Unfähigkeit der Zellen, sich vollständig zu differenzieren, einer fehlenden Apoptose bei Genomschäden sowie zu einer Akkumulation von Mutationen, wodurch einzelne Zellklone einen Wachstumsvorteil erhalten (D. J. Riley, W. H Lee 2002).

Man geht davon aus, dass aufgrund genetischer Defekte sich Tumoren entwickeln. So weisen viele Neoplasien spezifische Genomveränderungen auf, finden sich bei Erkrankungen mit gestörten DNA-Reparatursystemen eine erhöhte Inzidenz von Tumoren und induzieren Karzinogene DNA-Veränderungen (J. D. Rowley 1984; B. A. Ponder 1980; B. N. Ames 1979; A. E. Kulozik et al. 2000). Ferner gibt es Tumore, die nach den Mendelschen Gesetzen vererbt werden (A. G. Knudson, Jr. 1983). Bei Leukämien findet man oft chromosomale Aberrationen, die zur Veränderungen von Genstruktur und -funktion führen und somit zu einem Verlust der Kontrollfunktion von Proliferations- und Differenzierungsprozessen.

Diese genetischen Veränderungen in Tumoren kann man in zwei Gruppen gliedern. In der einen Gruppe findet man durch Translokationen, Amplifikationen oder Punktmutationen veränderte Gene, die man Onkogene nennt und die aktiv an der malignen Transformation beteiligt sind. In der anderen Gruppe kommt es durch Verlust beider Allele eines Gens zur leukämischen Transformation. Diese Gene nennt man Tumorsuppressorgene. Onkogene kann man über ihre Aktivierung, „gain of function“ genannt, definieren. Dagegen zeichnen sich Tumorsuppressorgene durch ein „loss of function“ aus. Hierunter versteht man, dass zu einem bestimmten Zeitpunkt das funktionstüchtige Genprodukt nicht in ausreichender Konzentration für normales Wachstum und Differenzierung vorhanden ist. Mittlerweile sind über 250 Onkogene isoliert worden, die Aktivierung eines Allels eines Onkogens reicht aus, um Tumorstadium hervorzurufen. Im Gegensatz hierzu ist bei den Tumorsuppressorgenen, von denen bisher erst ca. 30 bekannt sind, der Funktionsausfall auf beiden Allelen eines Suppressorgens nötig. Daher spricht man auch von „rezessiven“ Tumorgenen (A. Borkhardt 2002).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aktivierungs- bzw. Inaktivierungsmechanismen von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen**

Onkogene wurden entdeckt, als man beobachtete, dass einige retrovirale Viren neoplastisches Wachstum provozieren können. Es zeigte sich, dass homologe Sequenzen dieser viralen Onkogene im menschlichen Genom vorkommen, so dass man diese Gene zelluläre Onkogene nannte (H. E. Varmus, C. A. Lowell 1994; J. M. Bishop 1991; T. Hunter 1991). Prototypen der viralen Onkogene lassen sich aus dem Genom aller Wirbeltiere isolieren, man bezeichnet sie als Proto-Onkogene. Ein Teil dieser Gene, wie zum Beispiel das c-MYC-Gen beim Burkitt-Lymphom oder das ABL-Gen bei der CML, ist an der Entstehung humaner Tumoren beteiligt (I. Magrath 1990; A. de Klein et al. 1982). Um Onkogene zu identifizieren, bedient man sich verschiedener Ansätze. So kann man zelluläre Äquivalente retroviraler Onkogene bei Sequenzhomologien klonieren, amplifizierte DNA-Sequenzen in Tumorzellen charakterisieren, Bruchpunkte tumorspezifischer Chromosomenanomalien klonieren, mittels DNA-Transfektionsassays transformierende Gene identifizieren oder durch Insertionsmutagenese aktivierte Gene klonieren.

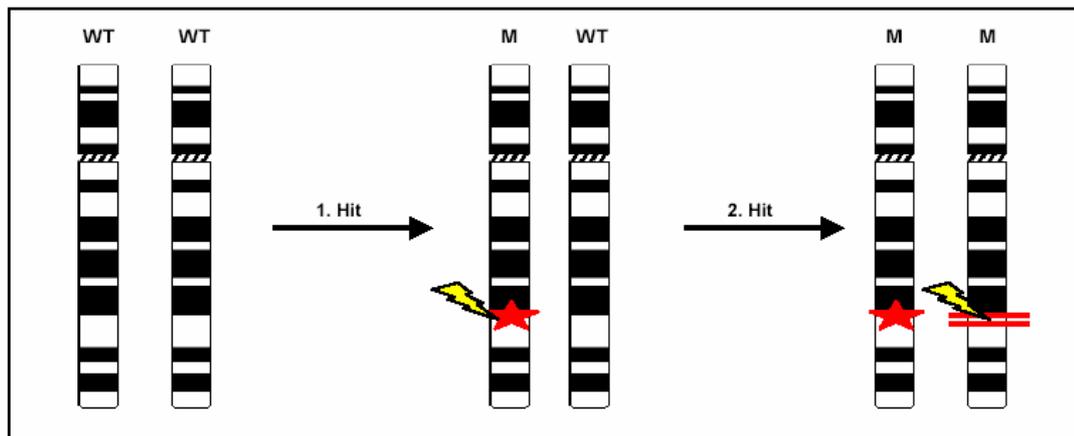
Durch Punktmutationen, Amplifikation von Proto-Onkogenen oder Translokationen, die ein Proto-Onkogen von seiner Regulatorsequenz entkoppeln, kann es zu einer Aktivierung von Onkogenen kommen. Bei letzterem kommt es zu einer deregulierenden Genexpression, die jedoch auch zu einer malignen Transformation der Zellen führt (T. Boehm et al. 1988; T. H. Rabbitts, T. Boehm 1991). Da es sowohl bei der Ampifizierung

als auch bei der Deregulation der Genexpressions zu einem Funktionszugewinn kommt, spricht man von „gain-of-function-Mutationen“.

Durch Translokationen kann aber auch ein Fusionsgen exprimiert werden, dass biochemische Fähigkeiten aufweist, die keiner der Translokationspartner im Wildtyp zeigt und die als Fusionsprodukt zu einer malignen Zelltransformation führen (Cleary, 1991). Dies konnte zum Beispiel für das Fusionsprotein MLL-ENL nachgewiesen werden, das bei einer Translokation t(11;19)(q23;p13.1) bei der AML gebildet wird.

Die Tatsache, dass einige Tumore durch spezifische chromosomale Deletionen charakterisiert sind, führte zur Entdeckung der Tumorsuppressorgene. Man nimmt an, dass im deletierten Bereich Gene liegen, deren Verlust zur Tumorentstehung führt bzw. diese unterstützt. Über Heterozyzitätsverlust-Analysen mit Hilfe eng beieinander liegender polymorpher DNA-Marker kann man den deletierten Bereich weiter eingrenzen. Diesen DNA-Marker findet man im Tumorgewebe homozygot um so häufiger deletiert, je näher ein solcher am gesuchten Ort des Krankheitsgens liegt. Durch Isolierung benachbarter genomischer DNA aus gesunden Zellen desselben Gewebes kann man, von diesem Marker ausgehend, eine Sonde erstellen und zur Hybridisierung mit mRNA in Northern Blots einsetzen. Die Tumorsuppressor-mRNA kann man dann durch ihr Fehlen im kranken Gewebe erkennen, wenn man die Hybridisierungsmuster von RNA aus krankem und gesundem Gewebe vergleicht (C. Wagener 1996). Diese Heterozyzitätsverlustanalyse wurde beim Rb-Gen erstmals erfolgreich eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein bei Retinoblastomen mutiertes Gen (S. H. Friend et al. 1987; Y. K. Fung et al. 1987). Diese Erkrankung wird bei 40% der betroffenen Kinder autosomal-dominant vererbt. In diesen Fällen treten die Tumore in der Retina beidseits auf. Im Gegensatz hierzu findet sich bei fehlender genetischer Disposition ein meist nur einseitiger Tumorbefall. Darauf zurückgreifend postulierte A.G. Knudson eine „Two Hit“-Hypothese. Sie besagt, dass zwei von einander unabhängige Ereignisse die neoplastische Transformation der Retinazelle hervorrufen (A. G. Knudson, Jr. 1971). Bei der genetisch bedingten Form gelangt bereits ein defektes Allel in die Keimbahn und somit in alle Körperzellen, der Funktionsverlust des anderen Allels muss durch eine

zusätzliche Mutation hervorgerufen werden. Bei der nicht genetisch bedingten Form sind zwei somatische Mutationen am RB-Locus in der gleichen Zelle zur Tumorenstehung nötig. Dies erklärt auch, warum die genetisch bedingten Retinoblastome deutlich früher als die nicht genetisch bedingten auftreten.

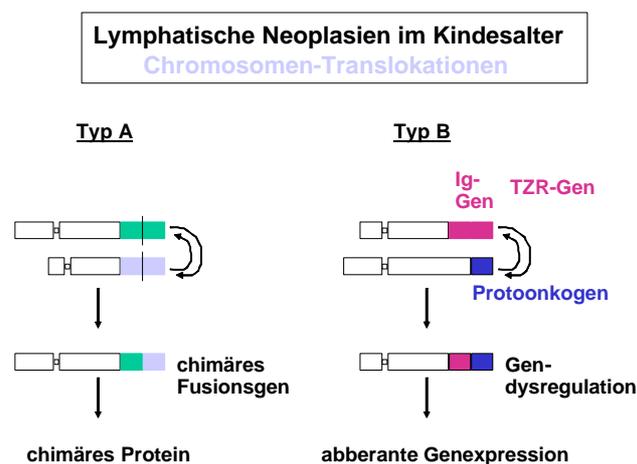


**Abbildung 5: Two-Hit-Hypothese nach Knudson: Beide Allele eines Gens mutieren in zwei unabhängigen Schritten. Dadurch kommt es zum Funktionsverlust. WT = Wildtyp, M = mutiert**

Es lassen sich verschiedene Wirkungsmechanismen der Tumorsuppressorgene nachweisen. So wirken sie zum Beispiel als GTPase-stimulierende Proteine, die in den RAS-Signaltransduktionsweg eingreifen (z.B. NF1), als Proteinphosphatasen, die antagonistisch zu Proteinkinasen wirken, die in allen Signaltransduktionskaskaden eine entscheidende Rolle spielen (z.B. PTEN als Antagonist der PI3-Kinase), als Antagonisten der RNA-Synthese (z.B. VHL), als Kinaseinhibitoren (z.B. p16), als Transkriptionsfaktoren blockierender Proteine (z.B. Rb) oder wie p53 (D. A. Ingram et al. 2001; M. C. Seminario, R. L. Wange 2002; J. W. Rocco, D. Sidransky 2001; H. Yang, W. G. Kaelin, Jr. 2001; A. E. Kulozik et al. 2000; S. P. Chellappan et al. 1991; A. J. Levine et al. 1991; C. Prives 1994)

### 1.6. Region 11q23 / MLL-Rearrangements

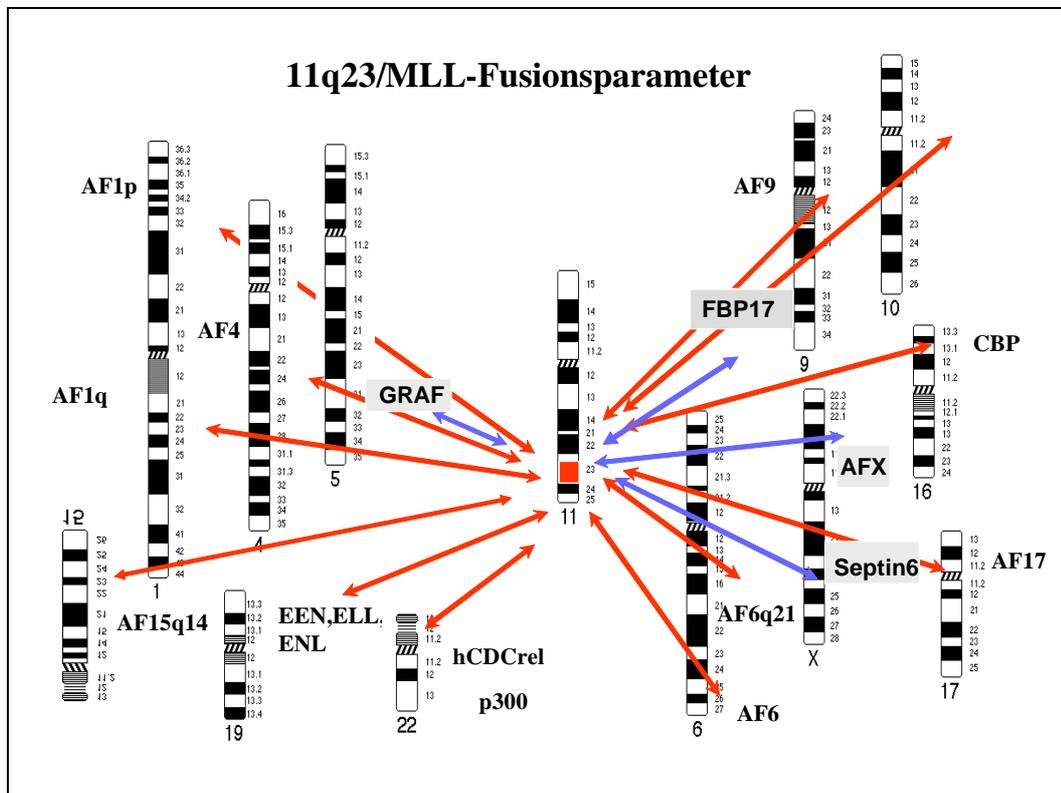
Im Kindes- wie Erwachsenenalter gehören Aberrationen der chromosomalen Region 11q23 zu den häufigsten spezifischen Veränderungen bei akuten Leukämien. Die Prognose von Patienten mit 11q23-Aberrationen ist im allgemeinen deutlich schlechter als die der ohne diese zytogenetische Veränderung. Bei dieser Aberration entsteht meist durch Genfusionierung ein chimeres Hybridgen (Typ A). Dieses Hybridgen unterscheidet sich qualitativ von den zwei fusionierten Einzelgenen. Davon abzugrenzen ist ein Aktivierungsmechanismus, bei dem ein ursprünglich inaktives Gen aktiviert wird, nachdem es fälschlicherweise unter die Kontrolle eines starken Genpromotors gekommen ist (Typ B). Das Gen an sich ist nicht verändert, durch die Fehlregulierung kommt es jedoch zu einer Überexpression.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Chromosomen-Translokation: Bei Typ A entsteht ein neues Genprodukt, bei Typ B wird ein Gen vermehrt gebildet**

Die meisten zytogenetischen Veränderungen der Region 11q23 betreffen das Gen MLL. Dieses MLL-Gen, auch ALL-1, HRX oder HRTX genannt, wurde von Janet Rowley et al. zuerst identifiziert und von verschiedenen Arbeitsgruppen kloniert (S. Ziemin-van der Poel et al. 1991). Es handelt sich um ein 100kb genomische DNA großes Gen, das durch Translokation trunkiert ist und mit verschiedenen Partnergenen der Chromosomen 1,3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 16, 17, 19, 20, 22 und X fusionieren kann. Bisher sind 32 Rekombinationspartner von MLL in verschiedenen Laboren in den USA, Frankreich, Großbritannien und Deutschland kloniert worden. Ihre Funktion

und physiologische Bedeutung ist jedoch nur bei einigen wenigen Rekombinationspartnern bekannt.



**Abbildung 7 : MLL-Rekombinationspartner bei akuten Leukämien von 11q23, wobei die blauen Pfeile die Gene kennzeichnen, die in Gießen erstmals identifiziert wurden.**

Die MLL-Partnergene sind jedoch auch unabhängig von ihrer Rolle bei der Leukämogenese interessant, da Mutationen von ihnen zu verschiedenen anderen Krankheitsbildern führen. So führen zum Beispiel Punktmutationen im MLL-Partnergene CBP von Chromosom 16 zum Rubinstein-Taybi-Syndrom. Hierbei handelt es sich um einen Fehlbildungskomplex mit Oligophrenie, Minderwuchs, breiten Daumen und Großzehen. Charakteristisch ist die kranio-mandibulo-fasziale Dysplasie, das so genannte Vogelgesicht mit gebogener Schnabelnase. Das Risiko für die Entwicklung von Malignomen, darunter auch von Leukämien, ist im weiteren Leben der Patienten stark erhöht.

## 2. Zielstellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die molekularbiologische Charakterisierung einer komplexen Chromosomenaberration bei akuten myeloblastischen Leukämien im Kindesalter.

Im Einzelnen sollten dabei die folgenden Teilaspekte berücksichtigt werden:

1. Zusammenfassende Darstellung der im Onkogenetischen Labor der Kinderklinik der Universitätsklinik Gießen vorliegenden Proben von Kindern mit Säuglingsleukämie.
2. Charakterisierung einer speziellen Chromosomenaberration mit dem Karyotyp 46,XY,ins(11;9)(q23;q34)inv(11)(q13q23).
3. Identifizierung eines neuen MLL-Translokationspartnergens durch Klonierung der chromosomalen Bruchpunktregion des unter 2. genannten Karyotyps.
4. Sequenzierung des Gens sowie Bestimmung der genauen chromosomalen Lokalisation und der mRNA-Expression.
5. Etablierung eines Sondensystems für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH-Sonde) von 9q34-Veränderungen bei Kindern mit Leukämie.
6. Analyse des kodierten Proteins hinsichtlich seiner verschiedenen Domänen und der Proteinexpression im Gewebe (Analyse von Prof. R.M. Bohle, Institut für Pathologie, Justus-Liebig-Universität Gießen).

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Isolation von DNA**

##### **3.1.1. Isolation von genomischer DNA**

Genomische DNA haben wir mit dem Mammalian Genomic DNA Extraction Kit (Cambridge Molecular Technologies, MWG Biotech) isoliert:

Ca.  $10^5$  Zellen/ $\mu$ l wurden in einem Cap zentrifugiert (15000 x g, 10 Minuten, 22°C), der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde mit 300  $\mu$ l TrisHCl-Buffer gelöst (10mM TrisHCl pH 7.6, 10mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM EDTA, 2,5 % Nonidet P-40), anschließend mit 300  $\mu$ l salzigen Buffer vermischt (10mM TrisHCl pH 7.6, 10mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4M NaCl, 2mM EDTA, 0,7% SDS) und für 60 Minuten bei 55°C aufbewahrt, bis die Lösung völlig durchsichtig und homogen war. Anschließend wurden 150  $\mu$ l 6M NaCl<sub>2</sub> zugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die Lösung zentrifugiert (20000 x g; 10 Minuten; 22°C), der Überstand in ein neues Cap abpipettiert und 650  $\mu$ l (höchstens  $\frac{3}{4}$  vom Volumen des Überstandes) 100% Isopropanol dazugegeben. Nach erneuter Abzentrifugation (20000 x g; 10 Minuten; 22°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet wurde mit 500  $\mu$ l 70% Ethanol gewaschen. Das Ethanol wurde abzentrifugiert (20000 x g; 5 Minuten; 22°C) und anschließend das Pellet luftgetrocknet, bis das Ethanol gerade verdampft war. Um die DNA zu lösen, wurden 50  $\mu$ l 10mM Tris-Puffer, pH 6 zugegeben und für 3 Tage in den Kühlschrank gestellt, bis das DNA-Pellet gelöst war.

##### **3.1.2. Isolation von Plasmid-DNA**

Plasmid-DNA haben wir mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) isoliert:

Bakterien aus 4 ml LB-Kulturmedium wurden bei 2600 x g für 1 Minute zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 250  $\mu$ l Buffer P1 (50mM TrisHCL pH8,00, 1mM EDTA, 100  $\mu$ g/ml RNase) resuspendiert. Die Lyse fand in 250  $\mu$ l Buffer P2 für 5 Minuten statt (200 mM NaOH, 1% SDS). Nach der Lyse präzipitierte die Bakterien-DNA mit den Bakterienmembranen und -proteinen durch Zugabe von 350  $\mu$ l Buffer N3 (3,0M K<sup>+</sup>-Acetat, pH 5,5), der gleichzeitig die Lösung neutralisierte. Die Lösung wurde für 10 Minuten

bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und das Pellet anschließend verworfen. Der Überstand wurde abpipettiert, in eine Qiaprep Säule gegeben und abzentrifugiert. Mit 500 µl Buffer PB wurde die DNA, die von der Säule festgehalten wurde, durch Zentrifugation gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, auf die Säule wurde 750 µl Buffer PE gegeben. Nach Abzentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurde die Säule erneut für 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein frisches cap gegeben und die DNA mit 50 µl H<sub>2</sub>O eluiert. Die DNA-Menge lag zwischen 2–30 µg, abhängig von der Anzahl der Plasmide pro Zelle.

### **3.1.3. Isolation von DNA aus PCR-Produkten**

DNA aus PCR-Produkten haben wir mit dem QIAquick PCR Purifikation Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) isoliert:

5 Volumen von Buffer PB wurden mit 1 Volumen PCR Produkt gemischt und in eine spin column gegeben und bei 13000 rpm für 60 Sekunden abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Um die in der Säule fixierte DNA zu waschen, wurden 750 µl Buffer PE zugegeben, erneut für 60 Sekunden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und anschließend die Säule noch einmal bei maximaler Geschwindigkeit für 1-2 Minuten zentrifugiert, um eventuelle Reste noch abzuzentrifugieren. Anschließend wurde die DNA in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst und in ein frisches Cap abzentrifugiert. Die so isolierte DNA kann bei -20°C aufbewahrt werden.

### **3.1.4. Isolation von DNA aus Agarose-Gel**

DNA aus Agarose-Gel haben wir mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen isoliert:

Die aus dem Gel ausgeschnittenen Fragmente wurden pro 1 Volumen mit 3 Volumen Buffer QG (100 mg ~ 100 µl) bei 50°C für 10 Minuten inkubiert. Das Gel muss komplett gelöst sein. Die Lösung hat eine gelbe Farbe (sonst 10 µl 3M Natriumacetat für Farbumschlag zugeben). Pro 1 Volumen Gel wurde 1 Volumen 100% Isopropanol zugegeben, jedoch nicht zentrifugiert! Die Lösung wurde über spin columns abzentrifugiert, der Überstand verworfen. Um die in der Säule fixierte DNA zu waschen, wurden 750 µl Buffer PE

zugegeben, erneut für 60 Sekunden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und anschließend die Säule noch einmal bei maximaler Geschwindigkeit für 1-2 Minuten zentrifugiert, um eventuelle Reste noch abzuzentrifugieren. Anschließend wurde die DNA in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst und in ein frisches Cap abzentrifugiert. Die DNA kann bei -20°C aufbewahrt werden.

### **3.2. Isolation von RNA**

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Blut- oder Knochenmarkzellen wurde durch eine modifizierte Methode nach Sacchi und Chomczynski durchgeführt (P. Chomczynski, N. Sacchi 1987). 5-10 x 10<sup>6</sup> Zellen einer Zellkultur oder Patientenmaterial wurde in 1 ml Trizol<sup>®</sup> (monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat) durch wiederholtes Pipettieren lysiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine komplette Dissoziation von Nukleoprotein-Komplexen zu erreichen. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform, Inkubation bei Raumtemperatur für 2-3 Minuten und Zentrifugation bei maximal 12000 x g bei 4°C für 15 Minuten entstehen eine untere rote Phenolchloroformphase, eine Interphase und eine wässrige, farblose obere Phase, die abpipettiert wurde. Durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol wurde die RNA aus dieser wässrigen Phase präzipitiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur werden die Proben erneut zentrifugiert (12000 x g, 10 Minuten, 4°C). Das vor der Zentrifugation oft noch nicht sichtbare RNA-Präzipitat bildet sich als gelartiges Pellet an der Seite und am Boden des Röhrchens aus. Den Überstand pipettiert man ab und wäscht das RNA-Pellet mit 1 ml 75% Ethanol. Nach erneuter Zentrifugation (7500 x g, 4°C, 10 Minuten) wird der Überstand entfernt, das RNA-Pellet getrocknet und dann in 20 µl RNase-freiem Wasser gelöst und anschließend bei 55-60°C für 10 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese (s. 3.3).

### 3.3. cDNA-Synthese

Für die von uns verwendete Smart-RACE-PCR wurde cDNA direkt von Gesamt-RNA nach folgendem Protokoll synthetisiert.

RNA wurde bei 65°C für 5 Minuten erhitzt, um sekundäre RNA-Strukturen zu schmelzen. Anschließend wurde die RNA sofort auf Eis gelagert.

Zu 1-5 µg Gesamt-RNA wurde folgender Mix gegeben:

- 4 µl 5 x First Strand Buffer (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
- 5 µl dNTP (2mM von jedem dNTP, insgesamt 8mM)
- DTT, 100mM (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
- RNasin, 33 U/µl (Promega, Mannheim, Deutschland)
- Random Hexamer, 100 pmol (Boehringer Mannheim, Deutschland)
- Superscript, 200 U/µl (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

Dieser Mix wurde auf 20 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde er für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, um die Superscript MMLV Reverse Transkriptase zu inaktivieren.

1-5 µl dieser cDNA werden als Template für eine RT-PCR eingesetzt.

### 3.4. Southern Blot und Screening einer P1-Klon-Bibliothek

Diese molekulargenetischen Standardtechniken wurden als nichtradioaktives Verfahren durchgeführt.

Über das RZPD, Berlin, Deutschland ([www.rzpd.de](http://www.rzpd.de)) sind Nylon-Membranen erhältlich, die das gesamte humane Genom in P1-Klonen enthalten. Wir haben diese hybridisiert und detektiert. Der größeren Dimension (22 x 22 cm) der P1-Membranen wurde Rechnung getragen, in dem die Mengenangaben der einzelnen Lösungen, die bei Southern Blots benutzt wurden, entsprechend erhöht wurden.

Für Southern Blots wurde genomische DNA isoliert und mit dem Restriktionsenzym BamH I (20 U/µg) nach einem Protokoll des Anbieters (Roche, Mannheim) verdaut. Nach der Aufkonzentration der DNA wurde diese über ein 0,6%iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (20 Stunden bei 22 V). Nach Färbung des Gels in Ethiumbromid wurde ein Photo mit einer 254 mm UV-Lampe aufgenommen. Anschließend wurde das Gel

zweimal in 300 ml 0,5M NaOH, 1,5M NaCl gewaschen, um die DNA zu denaturieren. Danach wurde die DNA auf eine 10 x 15 cm Nylonmembran (Roche, Mannheim) fixiert. Die Vakuumblokkammer (Keutz, Giessen) war für 2 Stunden zwischen -0,05 und -0,1bar eingestellt. Zur Blotkontrolle wurde das Gel erneut gefärbt und ein Kontrollphoto aufgenommen. Um die DNA auf der Nylonmembran zu fixieren, wurde die Membran für 30 Minuten bei 120°C in die Trockenkammer gelegt. Bei 40°C wurde die Membran mit 30 ml DIG Easy Hyp (Roche, Mannheim) für zwei Stunden, 50 rpm im Wasserbad prähybridisiert. 100 ng Digoxigenin-markierten DNA-Probe in 20 µl H<sub>2</sub>O wurden in kochendem Wasser 5 Minuten lang denaturiert, anschließend einige Minuten auf Eis gestellt, bevor die Sonde zu 4 ml DIG Easy Hyp (Roche, Mannheim) (Endkonzentration 25 ng/ml Sonde) gegeben wurde. Die Nylonmembran und die Sonde wurden luftblasenfrei in einer Plastiktüte eingeschweißt und für 15 Stunden bei 40°C und 0 rpm zur Hybridisierung in ein Wasserbad gelegt. Anschließend wurden die Blots zweimal in 200 ml 2xSSC, 0,1% SDS (15 Minuten, 120rpm, Raumtemperatur) und zweimal in 200 ml 0,2xSSC, 0,1% SDS (15 Minuten, 120rpm, 68°C) gewaschen. Zur Detektion wurden fertige Lösungen von Roche, Mannheim verwendet. Mit 0,5 µl anti-Digoxigenin-Antikörper in 50 ml Blockingbuffer (Roche, Mannheim) wurden die spezifischen Restriktionsfragmente durch eine Chemolumineszenz-Reaktion für 30 Minuten bei 50 rpm detektiert. Nach Waschvorgängen, um überflüssige Antikörper wegzuwaschen, wurden 10 µl CSPD (in 990 µl Detectionbuffer gelöst) auf den Filter pipettiert und bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert. Die Expositionszeit des Filters in der Filmkassette betrug etwa 2 Stunden. Mehrere verschiedene Expositionszeiten sind möglich und auch nötig, um das optimale Verhältnis zwischen Signalstärke und Hintergrund zu finden.

### 3.5. Northern Blot

Diese molekulargenetische Standardtechnik wurde ebenfalls als nichtradiaktives Verfahren durchgeführt. Wir benutzten kommerziell erhältliche Membranen („Multiple Tissue Membran“ von Clontech, Palo Alto, USA), auf denen bereits die RNA aus verschiedenen „Gewebe“ immobilisiert war. Die Membranen wurden in RNase freien Plastiktüten mit

30 ml ExpressHyp™ Hybridisation Solution (Clontech, Palo Alto, USA) bei 86°C für 30 Minuten bei 90 rpm prähybridisiert. Die Lösung wurde anschließend verworfen. Die DIG-Sonde wurde bei 100°C für 10 Minuten denaturiert und anschließend für 10 Minuten auf Eis gestellt, bevor sie mit 5 ml Hybridisierungslösung (Endkonzentration der Sonde 10 ng/ml Hybridisierungslösung) vermischt zu dem Filter in der RNase freien Plastiktüte luftblasenfrei eingeschweißt wurde. Die Hybridisierung fand bei 68°C für 60 Minuten bei 90 rpm statt. Anschließend wurden die Filter zweimal nicht-stringent (30 ml 2xSSC, 0,1% SDS) bei Raumtemperatur für 15 Minuten bei 90 rpm und zweimal stringent (1,2xSSC, 0,1% SDS) bei 65°C für 15 Minuten bei 90 rpm gewaschen. Die Detektion wurde wie im Kapitel „Southern Blot“ beschrieben durchgeführt. Die Expositionszeit betrug 15 Minuten bis 4 Stunden.

Das Strippen der Membranen sollte möglichst vermieden werden, war jedoch durch eine Inkubation der Membranen für 10 Minuten bei 95°C in 200 ml 0,5% SDS in DMPC-H<sub>2</sub>O möglich. Anschließend wurde die Membran in dieser Lösung bei 23°C für 10 Minuten inkubiert. Bis zur nächsten Hybridisierung konnten die Filter bei -20°C aufbewahrt werden.

### **3.6. Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Die PCR ist ein zyklisches Verfahren, mit dem man in vitro DNA-Abschnitte exponentiell vermehren kann. Die Entwicklung dieser Technik wurde maßgeblich von Mullis und Faloona (K. B. Mullis, F. A. Faloona 1987; R. K. Saiki et al. 1988) vorangetrieben. Das Verfahren besteht aus drei Reaktionsschritten, die temperaturabhängig sind. Der erste Schritt besteht in einer Denaturierung der doppelsträngigen Ausgangs-DNA zu Einzelsträngen bei 94°C. Im zweiten Schritt werden zwei („sense“ und „antisense“) Primer an die Einzelstrang-DNA angelagert, auch „Annealing“ genannt. Die Primer bestehen in der Regel aus 18-30 Basenpaaren langen Oligonukleotiden. Nach ihrer Länge und ihrem G/C-Gehalt richtet sich die „Annealingtemperatur“, die in der Regel zwischen 50°C und 70°C liegt. Sie wurde empirisch bestimmt. Im dritten Reaktionsschritt der PCR wird die Neusynthese des jeweils komplementären DNA-Stranges durch die Primer bei 72°C initiiert. Dafür wird eine hitzestabile DNA-Polymerase benutzt,

welche das wiederholte Durchlaufen aller drei Schritte ohne entscheidenden Wirkungsverlust der Enzymaktivität durch Hitzedenaturierung bei 94°C ermöglicht. Wir haben als hitzestabile DNA-Polymerase die Taq(-Gold)-Polymerase von Perkin Elmer, Langen, Deutschland benutzt, die von *Thermus aquaticus*, einem hitzestabilen Bakterium, gewonnen wird.

Zu Beginn der PCR kommt es aufgrund der geringen Produktmenge und der noch hohen Polymerase-Enzymaktivität zu einer Verdopplung der Ausgangsmenge der DNA pro Zyklus. Diese exponentielle Phase der PCR mündet über eine lineare Phase (Anhäufung des PCR-Produkts, Enzymaktivitätsverlust der Polymerase, diverse komplizierte Interaktionen zwischen den akkumulierenden DNA-Fragmenten) in eine Plateauphase, in der es kaum noch zu einer Neusynthese von DNA-Fragmenten kommt.

Wir haben folgenden PCR-Ansatz von 50 µl benutzt:

5 µl 10 x Reaktionspuffer (200mM Tris-HCL ph 8,4, 500mM KCL,  
50mM MgCL<sub>2</sub>)

1,5 µl 50mM MgCL

je 1 µl dATP, dGTP, dCTP, dTTP (10mM)

20 pmol sense primer

20 pmol antisense primer

2,5 U Taq-Polymerase

50-100 ng DNA als Ausgangstemplate

H<sub>2</sub>O ad 50 µl

### **3.7. Modifikationen der PCR**

#### **3.7.1. Nested PCR**

Durch zwei hintereinander geschaltete PCR-Reaktionen, „nested-PCR“ genannt, kann man sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität einer PCR deutlich erhöhen. Dafür muss man die Primer des 2. PCR-Laufs innerhalb der im 1. PCR-Lauf amplifizierten DNA-Sequenz legen. Als Template für den 2. Lauf wird das PCR-Produkt des 1. Laufs (1 µl) unverdünnt oder bis zu 1:1000 verdünnt genommen.

Um die PCR-Reaktion optimieren zu können, wurden die Primer nach empirischen Grundsätzen (z.B. G/C-Gehalt von 55-60%; Vermeidung von

komplementären 3'-Enden von sense- und antisense Primern; Vermeidung von Primersekundärstrukturen etc.) ausgewählt und bei kommerziellen Anbietern (vor allem Roth, Karlsruhe) bestellt.

Im Anhang findet sich eine Tabelle mit den in dieser Arbeit verwendeten Primern.

### 3.7.2. RACE-PCR

RACE steht für **R**apid **A**mplification of **c**DNA **e**nds. Es handelt sich hierbei um eine semispezifische PCR. Diese von Frohman entwickelte Methode ermöglicht eine Amplifikation von cDNA auch dann, wenn man nur ein Fragmentende kennt (M. A. Frohman et al. 1988). An dieses binden die genspezifischen Primer. An die unbekannte Seite des Hybridfragments werden so genannte "Adapter" ligiert. Diese Adaptersequenzen werden nachfolgend benutzt, um Primer zu entwickeln, die an den Adapter binden.

Dies ermöglicht eine Amplifikation, wobei günstigerweise ein spezielles PCR-Verfahren, die so genannte touch-down PCR benutzt wird. Bei der touch-down PCR wird die Annealingtemperatur während der PCR immer weiter verringert.

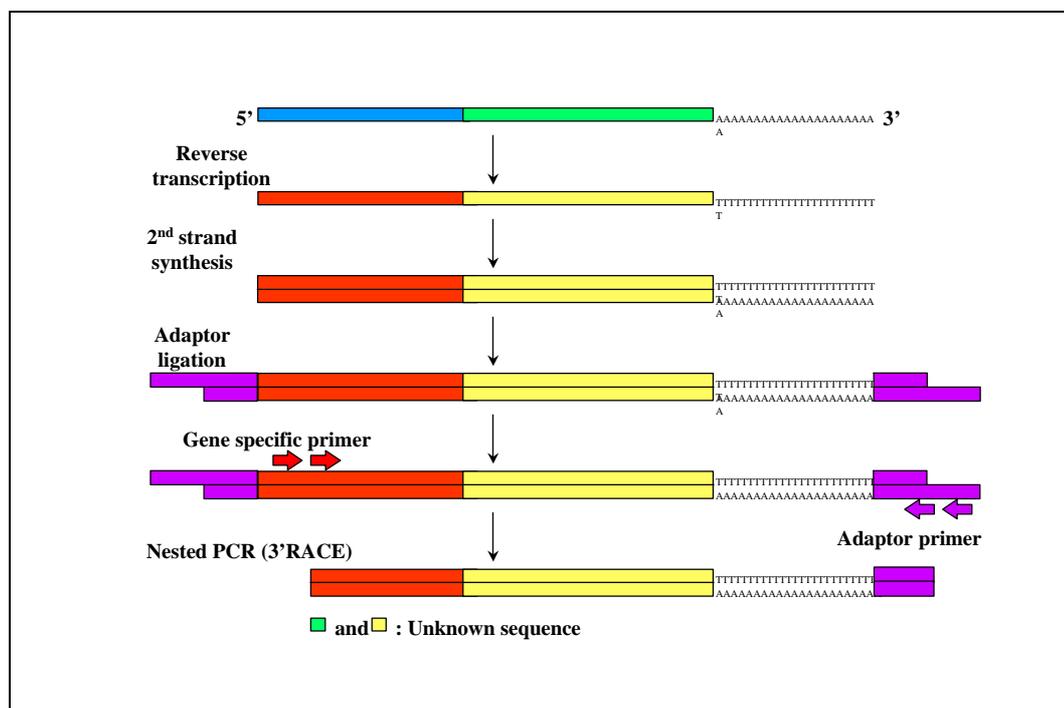


Abbildung 8: Schematische Darstellung der RACE-Methode und Adapterligation

Zur Isolierung des unbekanntes MLL-Partnergens wurde das Smart-Race-Kit der Firma Clontech (Palo Alto, USA) genommen. Smart steht für **Switching Mechanism At 5'end of RNA Transcript**. Diese Smart-Technik eliminiert die teilweise schwierige Adapterligation und ermöglicht es, first-strand cDNA gleich in die RACE-PCR einzusetzen. Die Amplifikationsbedingungen waren folgende:

5 Zyklen: 94°C – 5 Sekunden; 72°C – 3 Minuten

5 Zyklen: 94°C – 5 Sekunden; 70°C – 10 Sekunden; 72°C – 3 Minuten

25 Zyklen: 94°C – 5 Sekunden; 68°C – 10 Sekunden; 72°C – 3 Minuten (1. Lauf)

20 Zyklen: 94°C – 5 Sekunden; 68°C – 10 Sekunden; 72°C – 3 Minuten (2. Lauf)

### 3.8. DNA-Klonierung

Teilweise war es bei dieser Arbeit notwendig, spezifische DNA-Fragmente zu klonieren. Die Klonierung führten wir mit einem apathogene E.coli-Stamm (JM101) als Empfängerorganismus und p.Bluescript SK+ (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) als Vektor durch (s. Anhang). Mittels PCR amplifizierten wir die zu klonierenden DNA Fragmente, auch Inserts genannt. Am 5'-Ende der PCR-Primer waren die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen (Not 1 und Ksp 1; von Roche, Mannheim, Deutschland) integriert.

Zur Dephosphorylierung des Vektors wurde 20 µl von diesem (geschnitten mit Not 1 und Ksp1) mit 5 µl 10 x Puffer, 1 µl CIP (1U/µl; Roche, Mannheim, Deutschland) und 24 µl H<sub>2</sub>O vermischt und bei 37°C 1 Stunde ins Wasserbad gestellt. Die anschließende Reinigung des geschnittenen und dephosphorylierten pBluescripts erfolgte über „spin columns“ und anschließender Resuspendierung in 20 µl H<sub>2</sub>O. Anschließend wurde der Vektor mit dem Insert über Nacht bei 16°C im Wasserbad in folgendem Ansatz ligiert:

- 1  $\mu$ l pBluescript (100 ng/ $\mu$ l)
- 2  $\mu$ l 10 x Ligasepuffer (Boehringer Mannheim, Deutschland)
- 1  $\mu$ l ATP (100 mM) (Boehringer Mannheim, Deutschland))
- 1  $\mu$ l T4 – DNA-Ligase (5 U/ $\mu$ l) (Boehringer Mannheim, Deutschland)
- x  $\mu$ l Insert
- H<sub>2</sub>O ad 20  $\mu$ l

Das molare Verhältnis von Insert : Vektor soll bei 3-10 : 1 liegen. Um die Insertmenge ausrechnen zu können, bedient man sich der Formel  $X = (100\text{ng} \times A \times B) : C$ , wobei X für die Insertmenge in ng, A für das gewünschte molare Verhältnis Insert : Vektor, B für die Insertlänge in bp und C für die Plasmidlänge in bp steht. Für pBluescript liegt die Plasmidlänge bei 2960 bp. Während der Ligation wurde über Nacht schon eine Vorkultur von 20 ml LB-Medium mit den Empfängerzellen JM101 E.coli (und eine ohne JM101 E.coli als Kontrolle für Kontaminationen) bei 37°C und 250 rpm hochgeschüttelt. Am nächsten Tag wurden 100  $\mu$ l der Vorkultur mit 20 ml neuem LB-Medium für ca. 2 ½ Stunden bei 250 rpm zur Hauptkultur hochgeschüttelt, bis bei  $\lambda = 600$  nm eine optische Dichte von 0,3 – 0,6 bestand. Um die Zellen kompetent zu machen, wurde anschließend die Hauptkultur bei 2500 rpm und 4°C für 20 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet, die Bakterienzellen, mit 10 ml 0,1M CaCl<sub>2</sub> (auf Eis gekühlt) behandelt. Nach erneuter Abzentrifugation (1500 rpm, 20 Minuten, 4°C) und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 2 ml 0,1M CaCl<sub>2</sub> (auf Eis gekühlt) gelöst und über Nacht auf Eis im Kühlraum gelagert. Zur Transformation wurden die 100  $\mu$ l kompetenten Bakterien am nächsten Tag mit 20  $\mu$ l Ligaseansatz für 30 Minuten auf Eis gestellt, anschließend für 90 Sekunden bei 42°C erhitzt. Nach erneuten 10 Minuten auf Eis wurden je Probe 200  $\mu$ l LB-Medium ohne Ampicillin (37°C) zugegeben und für 45 Minuten bei 37°C auf den Heizblock gestellt. 100  $\mu$ l der Ligaseansatz / Kompetente Bakterien / LB-medium-Lösung werden auf einer mit X-Gal (50 mg/ml) und IPTG (200 mg/ml) vorbehandelten Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C gelagert. Die verschiedenen Cloning sites von pBluescript SK+ liegen im LacZ Gen (siehe Anhang), welches das Enzym  $\beta$ -Galactosidase enthält. Dieses Enzym baut X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) zu einem

dunkelblauen Reaktionsprodukt ab. Setzt man dem Agar IPTG, das als Induktor für die  $\beta$ -Galactosidase dient, sowie Ampicillin zu, so färben sich die Kolonien ohne Rekombinanten blau. In den weißen Kolonien ist das Insert enthalten; durch die Auseinanderreißung des LacZ-Gens kann eine  $\beta$ -Galactosidase gebildet werden und es somit auch nicht zu einer Blaufärbung der Kolonien kommen.

Die weißen Klone (mindestens fünf) wurden mit einer Pipettenspitze gepickt und über Nacht in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (60  $\mu$ g/ml) bei 37°C und 250 rpm hochgeschüttelt. Am nächsten Tag wurde daraus die DNA isoliert (siehe oben), davor jedoch wurden noch 600  $\mu$ l Klonkultur mit 400  $\mu$ l Glycerin bei minus 20°C eingefroren für eventuelle spätere Arbeiten.

### **3.9. DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung erfolgte durch die Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger, Nicklen und Coulson (F. Sanger et al. 1977). Diese Methode besteht darin, dass bei einer Polymerisationsreaktion am Matrizenstrang zusätzlich zu den vier Desoxynukleotiden GTP, TTP, ATP und CTP auch Didesoxynukleotide dGTP, dTTP, dATP und dCTP zugesetzt werden. Wegen der fehlenden 3'-OH-Gruppe der Didesoxynukleotide kommt es zum Abbruch der Polymerisation bei Einbau eines solchen Didesoxynukleotids. Welches Nukleotid wann eingebaut wird, passiert nach dem Zufallsprinzip und hängt vom Verhältnis Desoxynukleotiden zu Didesoxynukleotiden im Reaktionsansatz ab. Am Ende der Sequenzreaktion entsteht ein statistisches Gemisch von verschieden langen DNA-Fragmenten, wobei das letzte Nukleotid immer zum Kettenabbruch geführt hat. Mittels eines hochauflösenden Polyacrylamidgels werden die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Im Gegensatz zu den Desoxynukleotiden sind die Didesoxynukleotide (radioaktiv oder wie bei uns) fluoreszenzoptisch markiert, so dass die DNA-Sequenz bestimmt werden kann.

Zur Sequenzierung wurde der automatische DNA-Sequenzierungsautomaten 373A von Perkin Elmer / Applied Biosystems (Langen, Deutschland) benutzt. Die fluoreszenzoptisch markierten Didesoxynukleotide wurden von einem Argonlaser (Hauptemission bei 488 nm und 514 nm) angeregt. Über einen Photomultiplier wurde die Sekundärstrahlung der markierten DNA-Fragmente

an ein angeschlossenes Computersystem geschickt und in DNA-Sequenzdaten direkt umgewandelt.

Den Sequenzansatz haben wir mit dem ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ReactionKit von Perkin Elmer durchgeführt. Er setzte sich zusammen aus:

6 µl Terminator Ready Mix

1 µl Primer M13 Forward bzw Primer M13 Reverse

500 ng plasmid DNA

H<sub>2</sub>O ad 20 µl

96°C – 10 Sekunden; 50°C – 5 Sekunden; 60°C – 4 Minuten für 25 Zyklen

Der Ansatz wurde mit

2 µl 3M Natriumacetat, pH 4,6

50 µl 95% Ethanol

vermischt, für zehn Minuten auf Eis gestellt und anschließend für 25 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpipette abgenommen, das Pellet mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen und für fünf Minuten erneut bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Der Überstand wurde wieder mit der Wasserstrahlpipette abgenommen und das Pellet danach in der Vakuumpumpe für 5-10 Minuten getrocknet. Auf dieses getrocknete Pellet wurde ein Gemisch aus 4 µl Formamid und 1 µl Bluedextran gegeben, gevortext und abzentrifugiert. Bis zum Beladen des Sequenzierungsgels wurde das Pellet im Kühlschrank aufbewahrt, um es direkt vor der Gelbeladung für zwei Minuten auf 90°C zu erhitzen.

### **3.10. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)**

Zur Lokalisation des neuen MLL-Translokationspartners wurden isolierte cDNA-Klone, die insgesamt 3200 bp Basenpaare kodieren, durch Nick-Translation mit Digoxigenin-11-dUTP markiert (J. Sambrock et al. 1989). Mit Tetramethyl-Rhodaminisothiocyanat (TRITC) konjugierten Anti-Digoxigenin-11-dUTP erfolgte die Detektion (Sigma-Aldrich, Deisenhofen). Anschließend wurden die Objektträger mit 4,6-diamino-2-phenylindol (DAPI) gegengefärbt und einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen) analysiert.

Die FISH-Analysen zur chromosomalen Lokalisation und Deletion des neuen MLL-Translokationspartners bei unserem Patienten wurden bei Herrn Prof. Dr. O. A. Haas im St. Anna-Kinderspital in Wien durchgeführt.

Über das Deutsche Ressourcenzentrum für das Deutsche Humangenomprojekt, Berlin wurden für die FISH-Untersuchungen neben cDNA-Klone auch P1/PAC-Klone bezogen. Hierfür screenen wir eine humane Genbibliothek (mehr als 54.000 PAC-Klonen) mit partieller FBP 17-cDNA. Die positiven Klone wurden über das Deutsche Ressourcenzentrum des humanen Genomprojekts (Prof. Leurach, Berlin, [www.rzpd.de](http://www.rzpd.de)) angefordert.

Durch Hybridisierung der vorgefertigten Filter mit der FBP 17 cDNA wurde die Genbibliothek nach den Bedingungen analog denen der Southern-Blot-Hybridisierung gescreent.

### **3.11. Immunhistochemie**

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden mit anti-FBP 17-Antiseren (Eurogentec, Belgien) von Herrn Prof. R.M. Bohle, Institut für Pathologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen, mittels APAP-Technik durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit können in zwei Teile gegliedert werden:

1. Isolation und Charakterisierung eines neuen MLL-Partnergens auf Chromosom 9q34
2. Erstellung von genomischen PAC / P1-Sonden für in situ Hybridisierung einer FBP17-Probe für Patienten mit AML und 9q34 - Aberrationen

### 4.1. Zytogenetische Daten von Säuglingen mit Leukämien

Vom 1.1.1994 – 30.10.1999 wurden im Onkogenetischen Labor der Universitäts-Kinderklinik Gießen (Prof. Dr. J. Harbott) 117 Knochenmarkproben von Kindern unter 1 Jahr mit akuten Leukämien untersucht, wovon 62 eine ALL und 55 eine AML zeigten.

In beiden Gruppen zeigten sich überproportional viele Aberrationen von Chromosom 11 in der Bande q23. Bei Patienten mit einer ALL machte die Translokation t(4;11) knapp die Hälfte der Aberrationen aus, daneben kamen noch andere 11q23-Veränderungen wie zum Beispiel die Translokationen t(1;11) oder t(11;19) vor.

Bei Patienten mit einer AML ist die Translokation t(9;11) am häufigsten zu finden; seltener sind die Translokationen t(3;11), t(1;11) oder t(6;11). Unter der Gruppe „weitere Aberrationen“ sind verschiedenste, in kleiner Anzahl vorkommende Aberrationen zusammengefasst. Aus dieser Gruppe stammte die Knochenmarkprobe des Patienten, die zu den Ergebnissen dieser Arbeit führte.

Auffällig ist, dass sowohl bei Kindern mit ALL als auch mit AML nur selten ein normaler Karyotyp zu finden ist, das heißt die Mehrzahl der Säuglinge mit Leukämien weisen einfache oder komplexe Chromosomenaberrationen auf.

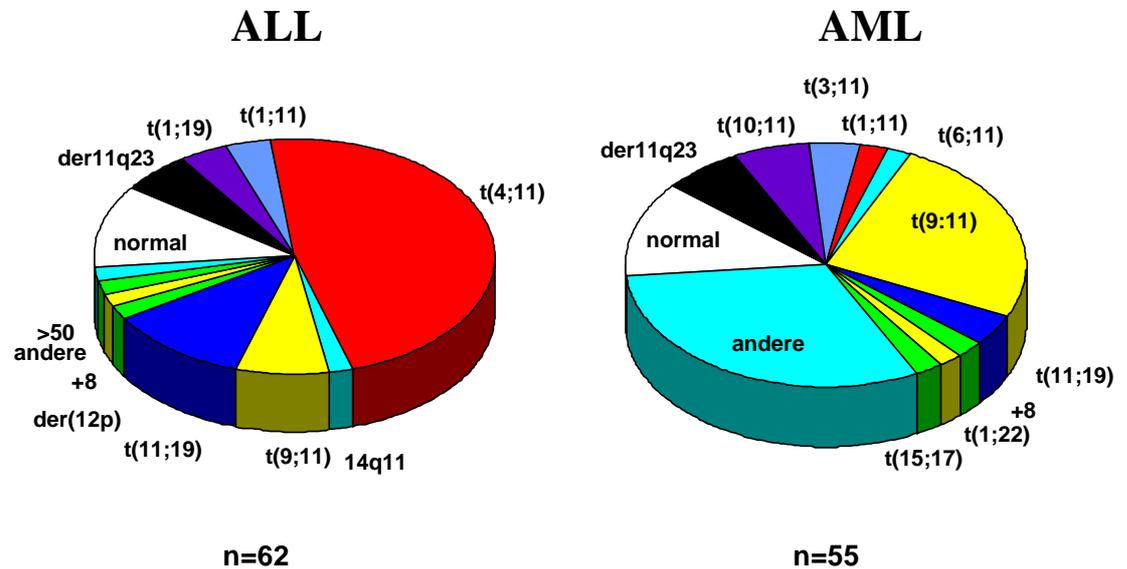


Abbildung 8: Zytogenetische Daten von Kindern < 1 Jahr mit akuten Leukämien (Onkogenetisches Labor der Universitäts-Kinderklinik Gießen, Prof. Dr. J. Harbott)

#### 4.2. Fallbericht

Bei einem 14 Monate alten Jungen wurde eine AML-FAB M4 (Myelomonozytäre Leukämie) mit Infiltration der Gingiva diagnostiziert. Das weiße Blutbild zeigte 35 G/L mit 7% Blasten im Differentialblutbild, das Knochenmark 38% Myeloblasten. Der Hämoglobinwert lag bei 123 g/L, die Thrombozyten bei 249 G/L.

Der Junge wurde nach dem AML-BFM97-Chemotherapie-Protokoll behandelt und ist nun 36 Monate nach Diagnosestellung in stabiler Erstremission.

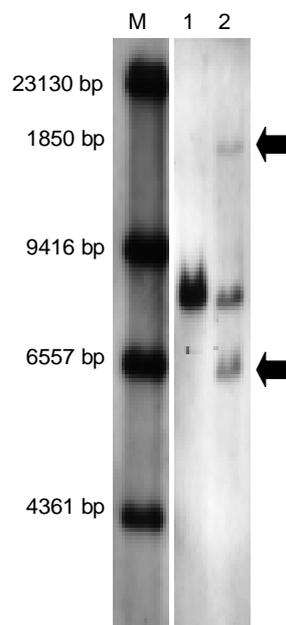
Die konventionelle Giemsa-Färbung der Metaphasechromosomen ergab eine perizentrische Inversion auf dem langen Arm von Chromosom 11 unter Beteiligung der Region q23, inv(11)(q23;123).

### 4.3. Isolation eines neuen MLL-Partnergens

Als erstes wollten wir prüfen, ob das MLL-Gen in die 46, XY, inv(11)(q13q23) Aberration involviert ist. Diese chromosomale Aberration war durch die zytogenetische Analyse festgestellt worden. Mit zwei voneinander unabhängigen Methoden, Southern Blot und FISH, haben wir die Involvierung des MLL-Gens geprüft.

Da MLL auf 11q23 liegt, führten wir einen Southern Blot mit einer 0,859 kb Bam HI cDNA-Sonde durch. Mit dieser Sonde können Rearrangements in der breakpoint of cluster region (BCR) von MLL detektiert werden, einer 8,3 kb großen Region, die zwischen den Bam HI Restriktionsseiten liegt (M. J. Thirman et al. 1993). Bei Aberrationen stellt sich neben der Germline Bande bei 8,3 kb eine oder sogar zwei zusätzliche Banden dar.

In unserem Fall war eine zusätzliche Bande bei 6,5 kb nachweisbar, wodurch wir das MLL-Rearrangement nachweisen konnten.

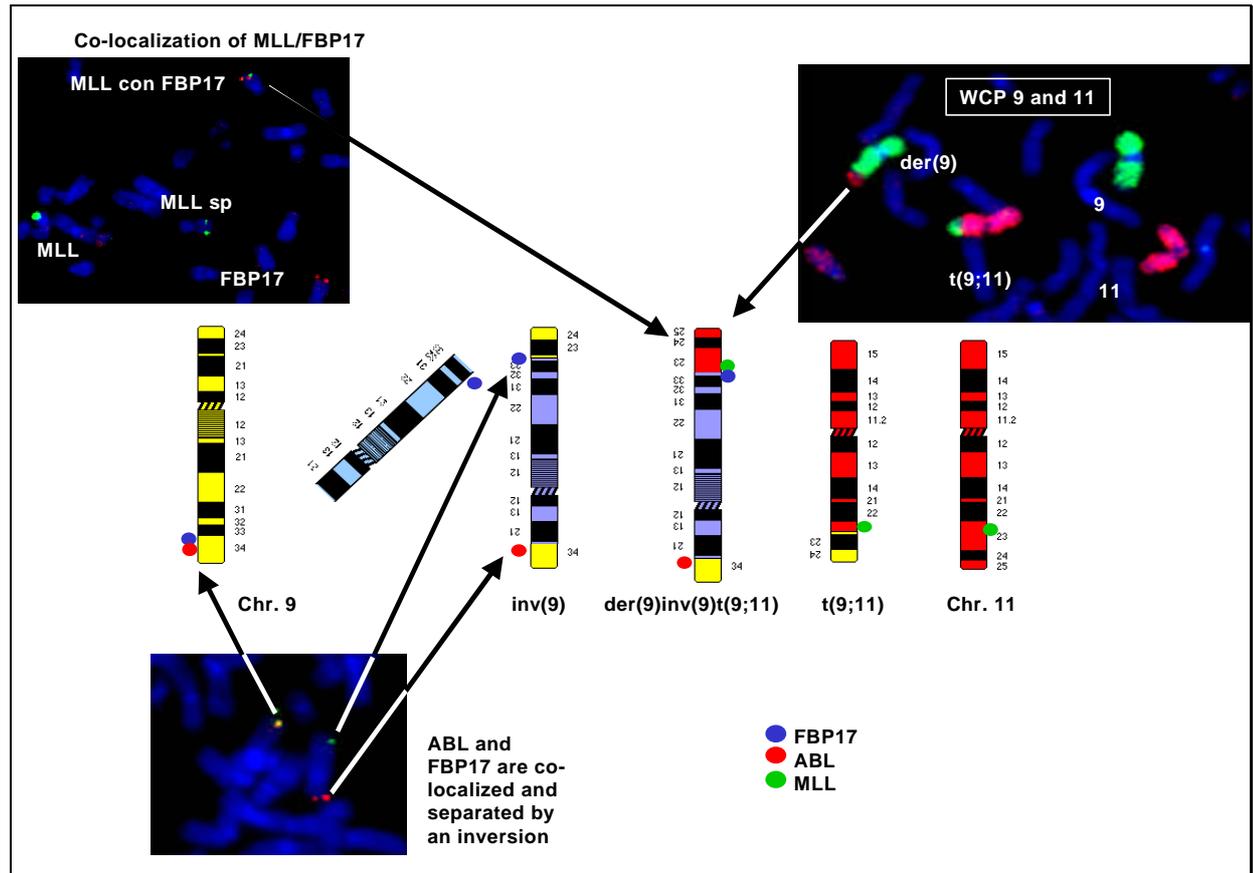


**Abbildung 9: Southern Blot zur Überprüfung des MLL-Gens.** In Reihe M ist ein Standardmarker aufgetragen, Reihe 1 zeigt das normale 8,3 kb MLL-Fragment (Zell-Linie HL 60). Die DNA des Patienten ist in Reihe 2 aufgetragen. Neben dem 8,3 kb Germline-Fragment erkennt man deutlich ein aberrantes Allel bei 6,5 kb und 18,5 kb (Pfeile).

Die FISH-Analyse mit einem FBP 17 enthaltenen Klon, ICRFP700L11103Q5, und diversen anderen Proben auf Chromosom 9 und 11 zeigte ein ungesplittetes Signal auf dem normalen Chromosom und zwei Signale auf dem Chromosom mit der Inversion, wie auf Abbildung 10 gezeigt. Hierdurch wurde das maskierte Rearrangement  $\text{ins}(11;9)(q23q34)\text{inv}(11)(q13q23)$  aufgedeckt.

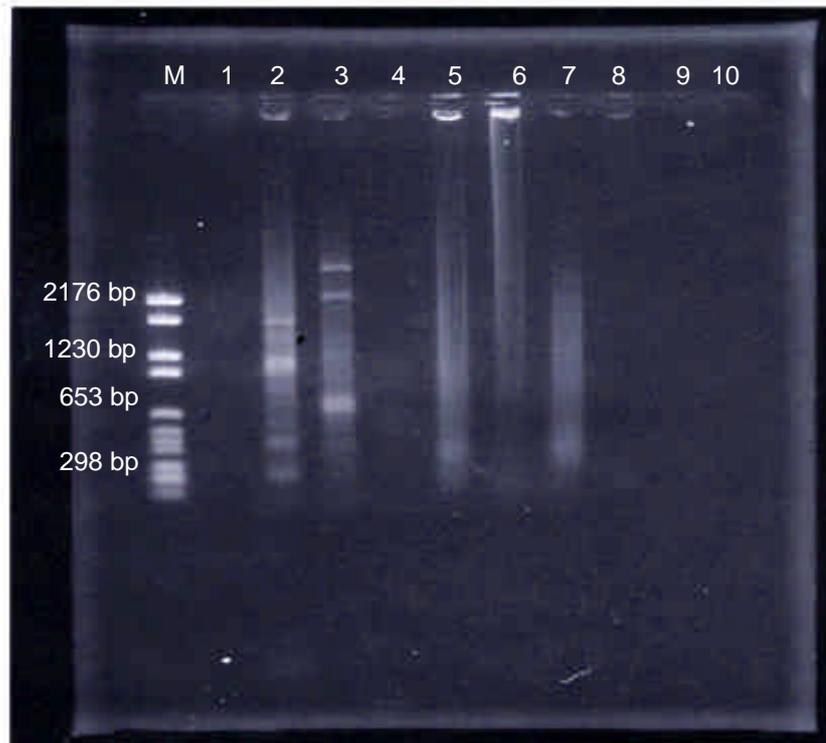
Die FBP 17 enthaltenen Klone ICRFP700L11103Q5 und C1943 bezogen wir vom Deutschen Ressourcen Center für das Humane Genomprojekt (RZPD) in Berlin / Deutschland. Der MLL enthaltenden YAC-Klon 13HH4 wurde von Brian Young, London / Großbritannien, der PAC-Klon mit dem 3'- und 5' Ende des MLL Gens von Ed Schuurung, Leiden / Niederlande sowie der das 11q subtelomere YAC-Klon von Lyndal Kearny, Oxford / Großbritannien zur Verfügung gestellt (L. Kearney et al. 1992; A. von Bergh et al. 2000, Y. Ning et al. 1996). Das Teile des ABL-Gens enthaltende abl18 Cosmid wurde von der Biomed 1 Concerted Action (CT94-1703) produziert.

Diese Klone wurden vorher durch Screening einer humanen P1-Bibliothek identifiziert.



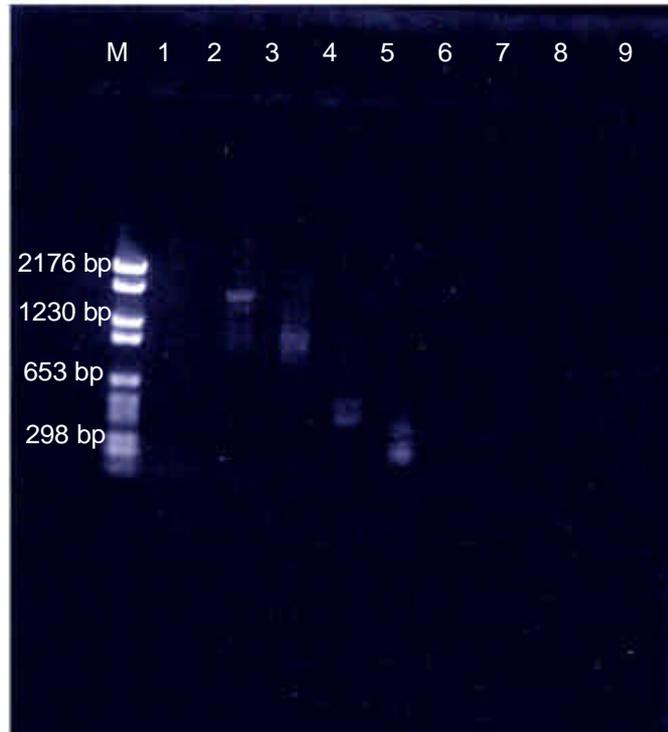
**Abbildung 10: FISH-Analyse und schematische Darstellung der komplexen Chromosomenaberration. Es handelt sich um eine Inversion und Translokation t(9;11). (Prof. O.A. Haas, St. Anna-Kinderspital, Wien, Österreich)**

Nachdem wir nachweisen konnten, dass das MLL-Gen in die Aberration involviert ist, wollten wir das unbekannte Partnergen von MLL nachweisen. Hierfür benutzten wir die RACE-PCR-Methode (s. 2.9.2.). Die Patienten-mRNA wurde aus Leukozyten isoliert und in Einzelstrang-cDNA reverse transkribiert. Der komplementäre Strang wurde synthetisiert und an die zwei cDNA-Enden des Adaptor ligiert. Bei MLL-Translokationen ist es oft möglich, aus den Zellen das Fusionstranskript mit MLL upstream und das Partnergen downstream zu isolieren. Dafür setzten wir eine 3'RACE-PCR mit einem sense primer ein, der an das 5' Ende der cDNA-Sequenz von der breakpoint cluster region (BCR) des MLL-Gens bindet.



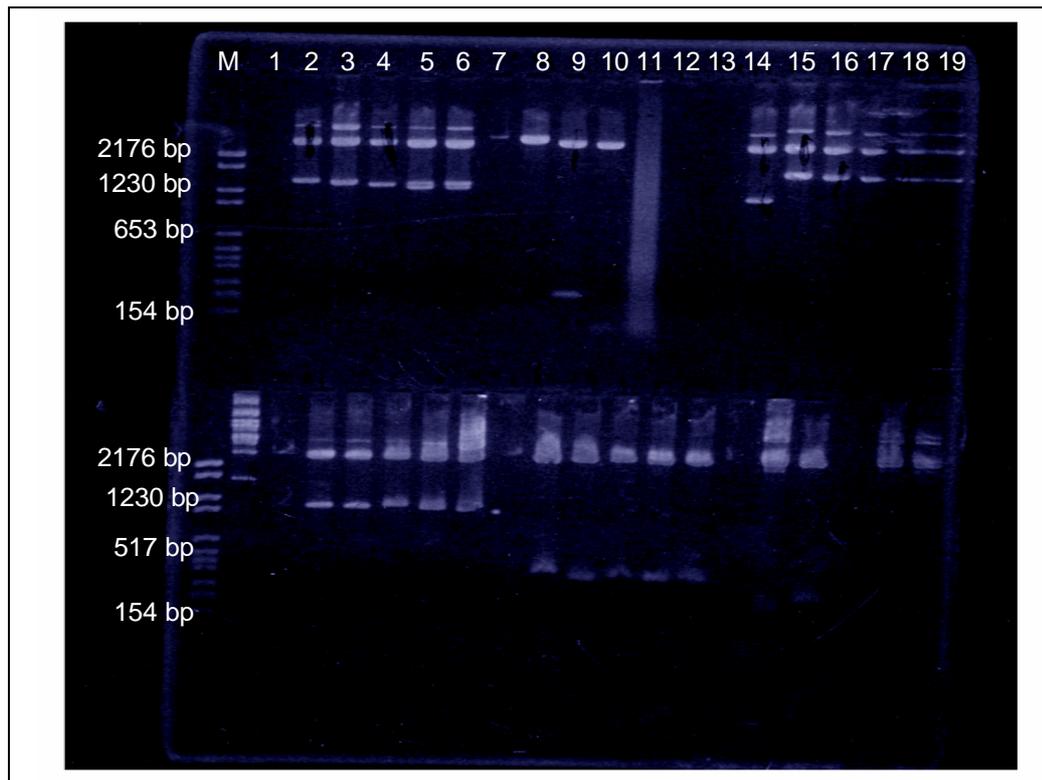
**Abbildung 11: 5' RACE-PCR zur Isolierung des unbekanntes Gens: In Reihe M ist der Längenmarker VI (Roche Diagnostics, Mannheim) aufgetragen, die Reihen 2 und 3 zeigen Ergebnisse der 3'-PCR von dem Patienten, aus dessen Material wir das neue Gen isolieren, die Reihen 5 bis 7 Material von einem anderen Patienten.**

Die 3' RACE-PCR zeigte fünf verschiedene Banden, die wir aus dem Gel ausschneiden und daraus dann die DNA isolierten, um sie dann für Klonierungen und anschließende Sequenzierungen nutzen zu können. Das in Abbildung 12 gezeigte Kontrollgel nach Isolierung der DNA zeigt die fünf Fragmente erneut.



**Abbildung 12: Kontrollgel, der aus ausgeschnittenen Banden isolierten DNA: Fragment 1 liegt bei 1700 bp, Fragment 2 bei 1200 bp, Fragment 3 bei 480 bp, Fragment 4 bei 320 bp und Fragment 5 bei 200 bp.**

Nach dem in Teil 3 beschriebenen Protokoll klonierten wir die fünf isolierten DNA-Fragmente. Wir isolierten die DNA aus den gepickten Klonen. Abbildung 13 zeigt geschnittene DNA diverser Klone aus diesem Klonierungsvorgang.



**Abbildung 13: Kontrollgel nach Klonierung:** In Reihe M der oberen und unteren Reihe ist der Längenmarker VI (Roche, Diagnostics, Manneheim) dargestellt. Die Reihen 2-13 zeigen Material anderer Patienten. In den Reihen 14-19 der oberen Reihe sowie in der gesamten unteren Reihe ist Material des Patienten dargestellt, dass zu den Ergebnissen dieser Arbeit führte. Die Reihen 14-19 der oberen Reihe zeigt die geschnittenen 1700 bp-Fragmente, ebenso in Reihe 2 der unteren Reihen. In der unteren Reihe ist ferner in den Reihen 4-8 die geschnittenen 1200 bp-Fragmente, in den Reihen 10-14 die der 480 bp-Fragmente sowie in den Reihen 16-19 die der 320 bp-Fragment dargestellt

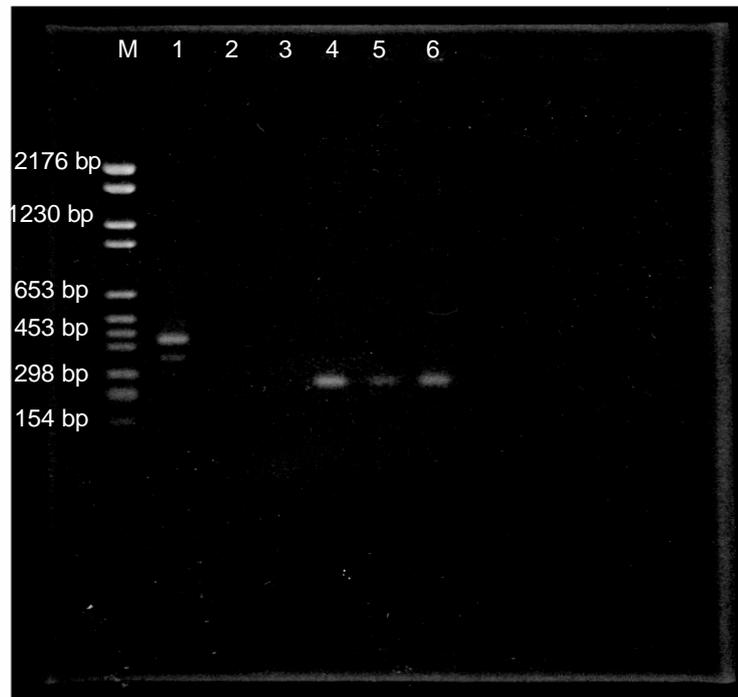
Sequenziert haben wir die Klone aus Reihe 15, 16, 17, 19 und 20 der oberen Reihe sowie Reihe 2, 10, 11, 16 und 17 der unteren Reihe. Die meisten Klone enthielten normale cDNA von MLL. Die Klone des 320 bp Fragments (Lane 16, 17) enthielten jedoch nur 190 bp normaler MLL-Sequenz bis Exon 8 (Nomenklatur nach Gu et. al), daran war eine andere DNA-Sequenz fusioniert, die nicht vom MLL-Gen stammte. Die neu gefundene Sequenz von 206 bp erwies sich als humanes Gegenstück zu dem Formin-bindenden Protein17 (FBP 17) der Maus. Die Sequenz war identisch mit der humanen DNA-Sequenz, die bereits aus einer human brain library geklont und KIAA 0554 genannt worden war (Gen Bank Accession Nr. AB011126).

Um das MLL/FBP17-Fusionsprodukt zu bestätigen, entwickelten wir eine bispezifische RT-PCR mit MLL- und FBP17-Primern. Die MLL-Primer, die

schon bei der RACE-PCR benutzt wurden, kombinierten wir mit zwei antisense FBP17-Primern.

Ebenso versuchten wir das reziproke FBP17 / MLL-Fusionsprodukt mit FBP17 sense Primern und antisense MLL-Primern zu amplifizieren.

Das MLL-Fusionsprotein besteht fast aus dem gesamten FBP 17-Gen, das unter Erhaltung des Leserahmens an das MLL-Exon 7 fusioniert ist.



**Abbildung 14:** Ergebnis der RT-PCR mit einem MLL exon 5 Primer und einem FBP 17 antisense Primer: In Reihe M ist der Standardlängenmarker VI (Roche Diagnostics, Mannheim) aufgetragen, Reihe 1 zeigt das MLL-/FBP 17 Fusionstranskript. Die kleinere Bande stellt ein zusätzliches Splicing von MLL Exon 6 dar. Reihe 2 und 3 sind Negativkontrollen. In Reihe 4-6 stellt sich die amplifizierte Sequenz des ABL-Gens dar, die zur Kontrolle der RNA des Patienten sowie der zwei Zelllinien (K562 und HL60) angefertigt wurden.

Über BLASTX, einer Proteindatenbank ([www.ncbi.gov](http://www.ncbi.gov)), verglichen wir die Proteinsequenz des von uns neu isolierten Gens mit anderen Proteinsequenzen, die sich als das humane Gegenstück zu FBP17 der Maus herausstellte. FBP 17 der Maus ist partiell geklont (231 Aminosäuren) und zeigt 90% Homologie zu der von uns gefundenen Aminosäuresequenz.

Diese gefundene Sequenz von 206 bp diente als Bindungsstelle für spezifische Primer für 5'RACE-PCRs, mit denen wir das unbekannte 5'-Ende des Gens finden wollten. Für diese Experimente benutzen wir cDNA der

Zelllinie MV 411 als Ausgangs-cDNA. Wir konnten das 5' Ende weiter klonieren, jedoch gelang es uns nicht, das erste ATG-Startcodon zu klonieren. Insgesamt haben wir eine 2042 Nukleotid lange durchgehende Sequenz mit einem offenen Leserahmen von 679 Aminosäuren nachgewiesen. Die von uns klonierte FBP 17 Sequenz wurde in der Gen-Datenbank mit der Accession Nummer AF265550 der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt.

Die Suche nach Proteindomänen ergab eine lange homologe Region mit der *cdc 15* (Aminosäuren 96-290). Dies ist ein Protein mit einer Schlüsselfunktion für die Organisation des Zytoskeletts bei *Schizosaccharomyces pombe*. Am Aminoterminus von FBP17 fanden wir eine sogenannte FER-CIP4 homologe (FCH) Domäne, die sich in dem *cdc42* interagierenden Protein CIP4, dem Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase FER und anderen Proteinen darstellen ließ, die möglicherweise die kleine GTPase Rho regulieren (P. Aspenström 1997). Weiter konnten wir zeigen, dass die Aminosäuren 475 – 537 des humanen FBP 17 für eine Proteindomäne kodieren, die als Bindungsstelle für Proteinen wie Serin / Threonin Kinase PKN, Rophilin und Rhotekin gefunden wurde (T. F. Vogt et al. 1993). Diese Proteine sind Effektormoleküle von Rho und vermitteln möglicherweise verschiedenen Aktivitäten von Rho bei Zytokinen, Neuritenretraktion von Neuroblastomzellen, Zellwachstum, Transformation und Transkription. Der Carboxy-Terminus (Aminosäuren 612 – 669) von FBP 17 enthielt eine SH3-Domäne, die vorher schon in diversen anderen MLL-Partnergenen gefunden wurde (J. F. DiMartino, M. L. Cleary 1999). Abbildung 15 zeigt ein schematisches Diagramm von dem neuen MLL / FBP 17 Fusionsprodukt, wobei die einzelnen Abschnitte nicht maßstabsgetreu gezeichnet sind. MLL wie FBP17 zeigen beide ein COOH-Ende und ein NH<sub>2</sub>-Ende. Das MLL und FBP 17 sind unter Erhaltung des Leserahmens im Bereich des MLL-Exon 7 miteinander fusioniert, wobei fast das gesamte FBP 17-Gen erhalten geblieben ist.

Der Bruch befindet sich in der Zink-Finger-Region des MLL-Gens, das NH<sub>2</sub>-Ende wird von MLL, das COOH-Ende von FBP 17 gestellt. Die mutmaßliche Rho-bindende Domäne des FBP 17-Gens ist im Fusionsprotein enthalten. Allerdings konnten wir die durch Sequenzanalyse zu vermutende Interaktion

von Rho-A mit FBP 17 mittels „yeast two hybrid protein-protein“ nicht nachweisen (U. Fuchs et al. 2001).

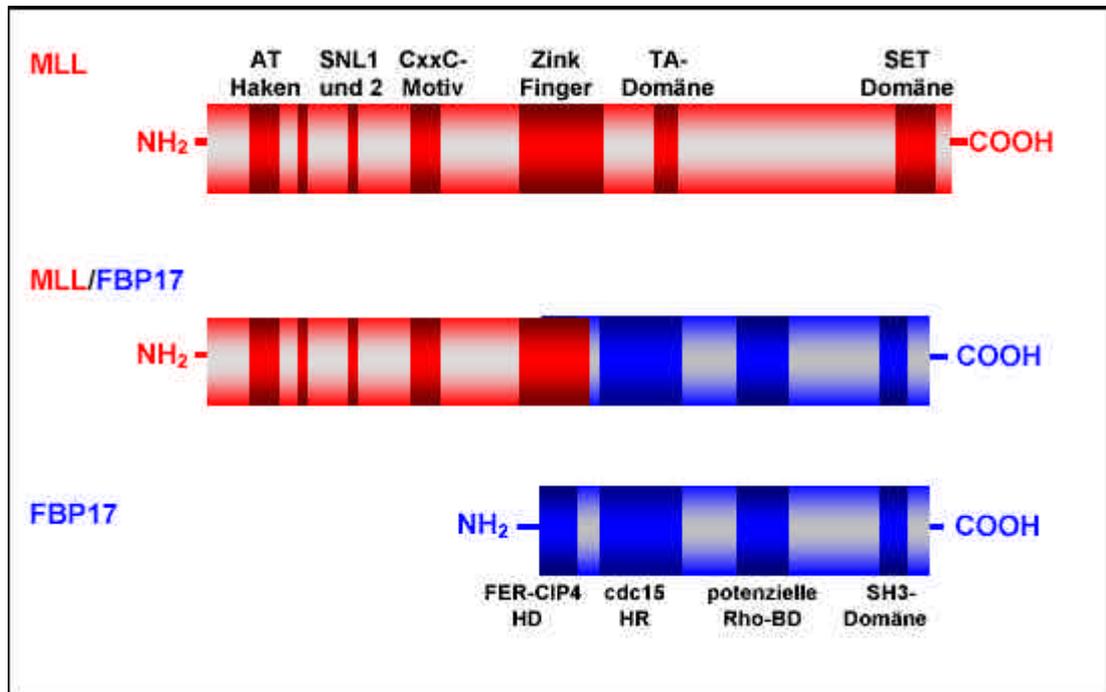
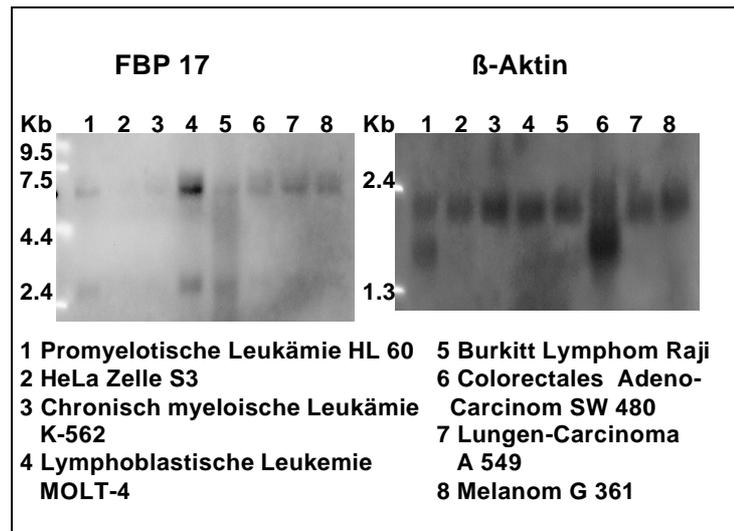


Abbildung 15: Schematische Darstellung der in-frame Genfusion von MLL / FBP 17 (nicht maßstabsgetreu). MLL wie FBP 17 zeigen beide ein COOH-Ende und ein NH<sub>2</sub>-Ende. Der Bruch befindet sich im Zinkfinger des MLL-Gens. Die mutmaßliche Rho-bindende Domäne des FBP 18-Gens ist im Fusionsprotein enthalten.

#### 4.4. mRNA - Expression von FBP 17

Mittels Northern Blots untersuchten wir die Expression von FBP 17 in Normalgewebe.

Hierfür verwendeten wir kommerziell erhältlicher Northern Blots (Clontech, Palo Alto, California, USA). Diese hybridisierten wir mit 10 µl / ng (50 µl / ng) einer selbst hergestellten Gen-Sonde. Wir untersuchten die Filter „Human Cancer Cell Line“, Human Multiple Tissue“ sowie „Human Immune System Multiple Tissue II“. Anschließend führten wir Positivkontrollen mit einer selbst hergestellten β-Aktin-Sonde her.



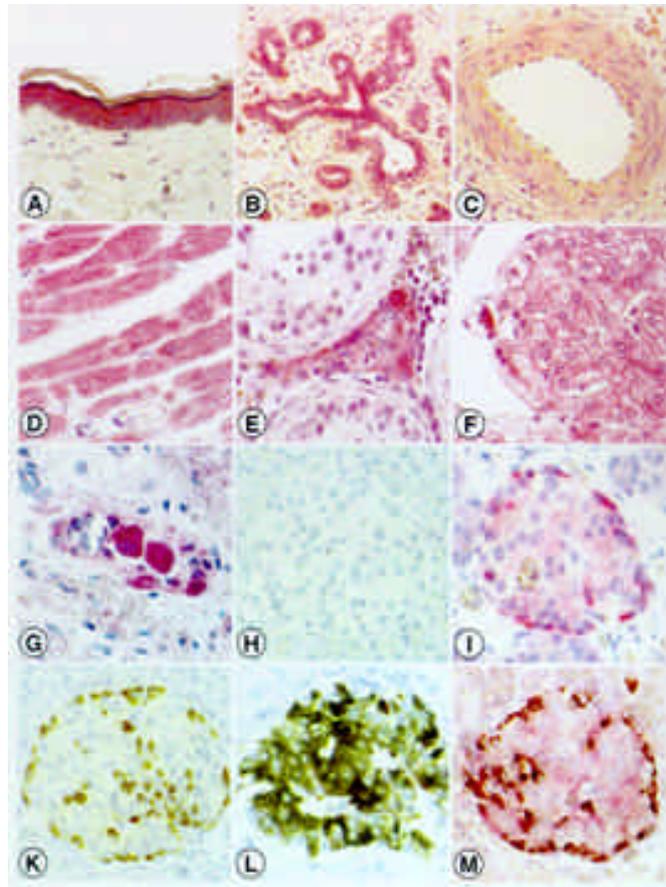
**Abbildung 16: Expression von FBP 17 im Northern Blot für Humane Krebszell-Linien**

Mit dem „Human multiple tissue Blot“ wurde die Expression von FBP 17 in Herz, Gehirn (gesamt), Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskulatur, Niere und Pankreas geprüft, beim „Human Immune System Multiple Tissue Blot“ in Niere, Lymphknoten, Thymus, periphere Blut-Leukozyten, Knochenmark und fetaler Leber, wobei sich jedoch keine Expression zeigte.

#### **4.5. Proteinexpression**

Mit polyklonalen Antikörpern (kommerzielle Herstellung durch Eurogentec, Brüssel, Belgien) wurden im Pathologischen Institut der Universitätsklinik Gießen bei Prof. Bohle insgesamt mehr als 250 histologische Strukturen untersucht. Dabei zeigte sich, dass FBP 17 ausschließlich in im Zytoplasma von Zellen exprimiert wird. Vor allem in Epithelzellen des respiratorischen Systems, des Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes sowie im Reproduktionssystem zeigt sich eine starke Expression von FBP 17. Ebenfalls zeigte sich eine deutliche Expression von FBP 17 in Ganglienzellen des Plexus myentericus, im braunen Fettgewebe, in Kardiomyozyten und in den Glucagon-produzierenden Zellen der Langerhans-Inseln (nicht in den Insulin-produzierenden Zellen!). Eine schwache Expression zeigte sich dagegen in Alveolarmakrophagen, Granulosazellen und Lymphozyten. Im hämatopoetischen System zeigte sich eine FBP 17 Expression

überraschenderweise nur während der Erythropoese, wohingegen myeloopoetische Zellen FBP 17 nicht exprimierten.



**Abbildung 17:** Verteilung der Proteinexpression von FBP 17 in Paraffin-eingebettetes Gewebe. Zytoplasmatische Immunreaktion in Epidermis (A) , Ductalen Zellen der Mamdrüsen (B), Kardiomyozyten (D), Leydig-Zellen des Hodens (E), Hepatozyten (F), Gangliozyten des Plexus myentericus (G) und in Glucagon-produzierenden A-Zellen des Pankreas (I) . FBP 17 enthaltendes Gewebe stellt sich APAP rot dar. Glucagon enthaltendes Gewebe stellt sich braun dar (K); sich rot-braun darstellendes Gewebe zeigt eine starke FBP 17 (rot) Expression in Glucagon-produzierenden A-Zellen. Schwache FBP17 Expression in glatter Muskulatur von Gefäßen (C) und Insulin-produzierenden B-Zellen des Pankreas (I, L, M). Keine FBP 17 – Expression in Bindegewebe (A, B, G), Endothelzellen (C, D, F Zentrales Gefäß) und testikuläre Keimzellen (E). Negativkontrolle (H) Bild von Prof. Bohle, Institut für Pathologie, Universität Gießen, mit freundlicher Genehmigung.

#### 4.5.1. Zusammenfassung der Proteinexpression von FBP 17

- = Keine Färbung
- + = Leichte Färbung
- ++ = Starke Färbung
- V = Intensität der Färbung variiert innerhalb einer Gewebeprobe oder zwischen zwei untersuchten Proben

Das Ergebnis ergab sich aus mindestens zwei verschiedenen Proben von jedem untersuchten Gewebe.

System			Expression	
Herz-Kreislauf	Herz	Myokard	++	
		Kapillaren	-	
		Endokard	-	
	Gefäße (in allen untersuchten Geweben)	Endothel	-	
		Media	+	
		Adventitia	-	
		Kapillaren	-	
Respirationstrakt	Trachea / Hauptbronchus	Respiratorisches Epithel	V+ / ++	
		Submucöse Glandula	• Serös	+
			• Mukös	-
		Hyaliner Knorpel	-	
	Lunge	Respiratorisches Epithel	+	
		Alveolarepithel	-	
		Alveolarmakrophagen	+	
		Alveolarsepten	-	
Gastrointestinaltrakt	Submandibuläre Drüsen	Muköse Acinuszellen	-	
		Seröse Acinuszellen	-	
		Intercalated Ductus	V+ / ++	

		Ductus	V+ / ++
Ösophagus		Epithel Basalschicht	++
		Epithel Squamosaschicht	++
		Muscularis	-
		Submuköse muköse Glandula	-
		Submuköse seröse Glandula	+
		Enterische Ganglien	+
Magen		Oberflächliches Epithel	+
		Epithel der Foveola	+
		Epithel der Fundusganglien	+
		Muscularis	-
		Enterische Ganglien	V+ / ++
Dünndarm		Epithel	+
		Muscularis	-
		Enterische Ganglien	++
		Lymphgewebe	-
Kolon		Oberflächiges Epithel	V+ / ++
		Epithel der Krypten	V+ / ++
		Muscularis	-
		Enterische Ganglien	++
		Lymphgewebe	-
Leber		Hepatozyten	++
		Gallengänge	+
		Kupffer Zellen	-
		Portalvenen	-

	Pankreas	Langerhans Inseln <ul style="list-style-type: none"> <li>• Insulin-produzierende Zellen</li> <li>• Glucagon-produzierende Zellen</li> </ul>	+ ++
		Acinuszellen	-
		Ducuts	+
Harntrakt	Niere	Glomerula	-
		Proximale Tubuli	V+ / ++
		Distale Tubuli	-
		Sammelrohre	-
	Harnblase	Urothel	V+ / ++
		Glatte Muskulatur	-
Fortpflanzungs- system	Testis	Tubuli seminiferi	-
		Leydig-Zellen	++
	Epididymis	Epithel	V+ / ++
		Muscularis	-
	Prostata	Glandulaepithel	V+ / ++
		Myoepitheliale Zellen	-
		Stroma	-
	Ovar	Granulosazellen	+
		Luteinisierende Granulosazellen	+
		Thekazellen	+
		Stroma	-
	Eierstöcke	Epithel	V+ / ++
		Stroma	-
	Portio / Cervix	Squamöses Epithel	++
		Muköses Epithel	-
	Endometrium	Epithel	+
		Stroma	-

	Brustdrüsen	Ductusepithelzellen	+
		Acinusepithelzellen	+
		Myoepitheliale Zellen	-
		Stroma	-
Endokrine Drüsen	Nebennierenrinde	Zona glomerulosa	+
		Zona fasciculata	-
		Zona reticularis	+
		Medulla	+
	Schilddrüse	Follikelepithel	-
Lymphatisches / hämatopoetisches Gewebe	Lymphknoten	Keimzentrum	+
		Lymphozyten	-
		T-Zell-Region / high endothelial venules	-
		Sinuszellen	+
	Milz	Weiße Pulpa Lymphozyten	-
		Rote Pulpa	-
	Tonsillen	Basale Epithelschicht	++
		Squamöse Epithelschicht	++
		Follikel	+
	Knochenmark	Erythropoetische Zellen	++
		Myeloepoetische Zellen	-
		Megakaryozyten	-
	Haut	Epidermis	Basalschicht
Squamöse Schicht			++
Hornhaut			++
Schweißdrüsen			+
Mesenchymales Gewebe	Stützgewebe		-
	Fettgewebe	Weiß	-
		Braun	++

	Muskulatur	Quergestreifte Muskelzellen	+
		Weiche Muskelzellen	-
	Periphere Nerven		-
	Osteozyten		-
	Mesothelium		V+ / ++

#### 4.6. Untersuchungen auf FBP17/ 9q34 und FISH-Analysen bei Patienten mit 9q34 Abnormitäten

Wir screenen eine humane P1-Library, die einen positiven Klon, ICRFP700L111035 zeigte. Dieser Klon wurde daraufhin auf die Anwesenheit von FBP17 mittels PCR und Southern Blot untersucht. Die zwei-Farben-FISH mit Material von Patienten mit Chronisch Myeloischer Leukämie und einer Translokation t(9;22)(q34;q11) zeigte, dass FBP17 bei 9q34 lokalisiert blieb. FBP17 lokalisiert sich zentromerisch sowohl zu ABL (Abbildung 18) als auch zu CAN und TAN-1. CAN und TAN-1 sind zwei weitere Gene, die distal von ABL lokalisiert sind und in Leukämie-spezifische Translokationen involviert sind. Abbildung 18 zeigt weiterhin repräsentative Beispiele von Hybridisierungsmustern, die wir mit verschiedenen FISH-Proben von unserem Patienten erhalten haben, sowie ein Schema, das die Ergebnisse zusammenfasst.

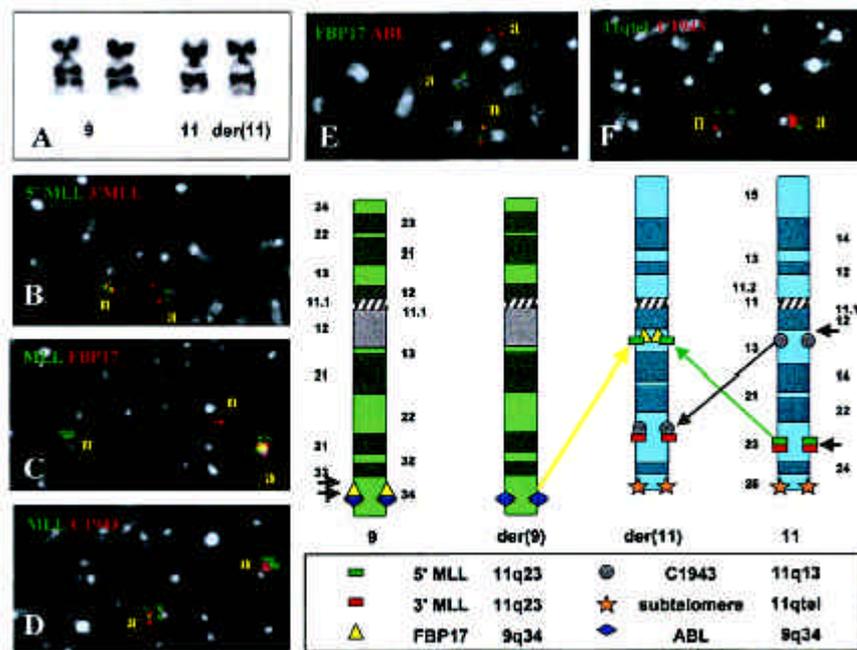


Abbildung 18: Zusammenfassung der Zytogenetik und FISH-Analysen unseres Patienten. (A) Karyotyp der Chromosomen 9 und 11. In (B) – (F) n = normale Chromosomen, a = abnormale Chromosomen. (B) FISH mit 3'-MLL und 5'-MLL Proben, die den Gensplit zeigen. Das 3'-Ende bleibt in 11q23, das 5'-Ende findet sich bei 11q13. (C) FISH-Analyse mit einem MLL-YAC und FBP17-YAC zeigt, dass ein Teil der MLL-Probe sich mit FBP 17 zusammen bei 11q13 lokalisiert. Die genaue Organisation des MLL/FBP17-Fusionsprodukts kann nicht genau erkannt werden. Dass der Part von FBP 17 nicht gesehen werden kann, zeigt, dass der verbliebene 5'-Anteil entweder zu klein ist, um ihn auf 9q34 zu orten, oder deletiert ist. Es kann keine reziproke 5-FBP17/MLL3'-Fusion generiert werden. (D) FISH-Analyse mit dem MLL YAC Klon und dem PAC-Klon C1934, der auf 11q13 lokalisiert ist, bestätigt die parazentrische  $inv(11)(q13q23)$  und zeigt, dass der 2. Bruchpunkt von Chromosom 11 zentromerisch zu C1934 liegt. (E) FISH-Analyse mit dem FBP17 enthaltenden PAC-Klon und einem ABL-Cosmid bestätigt den Bruch zwischen FBP17 und ABL, wobei ABL telomerisch zu FBP17 liegt. (F) FISH-Analyse mit dem PAC-Klon C1943 und einer 11q subtelomeren Probe bestätigt die Kolo-kalisation von MLL/FBP17 auf 11q13 als Folge einer Insertion und einer Inversion, weniger einer Translokation und Inversion, da die telomerische Region von Chromosom 11 erhalten bleibt. In der schematischen Darstellung unten rechts ist dieses komplexe Rearrangement zusammengefasst, die kurzen schwarzen Pfeile zeigen die Bruchpunkte.

Um weitere Patienten mit möglichen Rearrangements des FBP17 Gens zu finden, suchten wir in unserer Datenbank nach Kindern mit neu diagnostizierter AML (n=708) und 9q34-Aberrationen (n=10). Ein Patient mit einer Translokation  $t(6;9)(p23;q34)$  und vier seltene Fälle von AML mit einer Translokation  $t(9;22)$  und BCR/ABL-Rearrangement wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen. Von vier der fünf übrig gebliebenen Fälle war Material verfügbar, das wir analysieren konnten. In drei dieser vier Fälle lokalisierte sich die FBP17 Probe auf 9q34. Bei dem vierten Patient dagegen, einem 5-jährigen Mädchen mit AML-M5 und einem komplexen Karyotyp

[46,XX, der(9)t(9;11)(p22;q23)?inv(9)(p22q34), der(11)t(9;11)(p22;q23)], lokalisierte sich die 3'-MLL-Probe gemeinsam mit FBP17 auf 9q34. Da diese Patientin jedoch ein anderes MLL-Rearrangement (MLL/AF9) aufwies, dürfte diese Kolo-kalisation eher ein zufälliges Nebenprodukt als eine spezifische MLL/FBP17-Fusion sein. Wir interpretierten es als Ergebnis der perizentrischen Inversion inv(9)(p22q34), der(9)t(9;11), wodurch die MLL-Probe in die Nähe von FBP17 lokalisiert wurde.

Insgesamt konnten damit keine weiteren Patienten mit FBP 17-Rearrangement identifiziert werden.

## 5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt die Identifizierung eines seltenen Rearrangement bei einem 14 Monate alten Jungen mit AML-M4. Das MLL-Partnergen auf Chromosom 11 konnte als humanes FBP 17-Gen (Forminbindendes Protein) identifiziert werden. Die Arbeit erbrachte die FBP 17-Sequenz von 2042 bp, das FBP 17-mRNA- und Protein-Expressionsmuster, sowie die chromosomale Lokalisation auf 9q34.

### 5.1. 11q23 Aberrationen bei Säuglingen

Wie unsere Daten als auch die anderer Gruppen zeigen, finden sich 11q23-Aberrationen bei Säuglingen mit Leukämien sehr häufig (C. S. Chen et al. 1993; G. H. Reaman et al. 1985; C. M. Spier et al. 1984; J. Rubnitz et al. 1994). Insgesamt zeigen 5-10 % aller Patienten, Kinder wie Erwachsene, mit ALL, AML, MDS und wenig differenzierter oder biphänotypischer Leukämie ein 11q23-Rearrangement (S. Heim, F. Mitelman 1995). Diese MLL-Rearrangements finden sich als Deletionen, Translokationen, Duplikationen oder Inversionen. Patienten mit ALL und einer solchen 11q23-Aberrationen haben insgesamt eine schlechte Prognose. Daran haben auch aggressivere Induktionstherapien oder Stammzelltransplantationen nichts wesentlich geändert. Diese Patienten erreichen zwar die Remission mit gleicher Wahrscheinlichkeit wie Patienten ohne MLL-Rearrangement, sie erleiden aber häufiger einen Rückfall bzw. die Remissionsphase ist deutlich kürzer. Eine Studie vom St. Jude Hospital von 1997 zeigt ein 5-Jahres-ereignisfreies-Intervall von  $11 \pm 7$  % für Kinder mit B-Zell-ALL und bestimmten MLL-Rearrangement im Vergleich zu  $74 \pm 5$  % für Kinder ohne ein solches Rearrangement (J. E. Rubnitz et al. 1997; C.-H. Pui et al. 1994). Dagegen konnte in diversen Studien gezeigt werden, dass bei Kindern wie Erwachsenen mit AML und einer Translokation t(9;11) eine günstigere Prognose vorliegt als bei Patienten mit anderen chromosomalen Aberrationen oder ohne nachweisbares Rearrangement (K. Mrózek et al. 1997; G. J. Swansbury et al. 1998).

## 5.2. MLL-FBP 17

Bei dem von uns in dieser Arbeit beschriebenen Gen FBP 17 handelt es sich um ein neues, vorher nicht bekanntes MLL-Partnergen. Die konventionelle Giemsa-Färbung ergab eine perizentrische Inversion auf dem langen Arm von Chromosom 11 unter Beteiligung der Region q23,  $inv(11)(q23;123)$ . Die FISH-Analyse deckte die komplexe, maskierte Aberration  $ins(11;9)(q23q34)inv(11)(q13q23)$  auf.

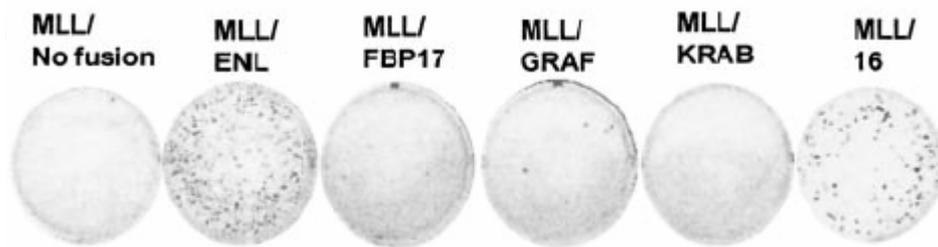
Bei den übrigen, bisher entdeckten 30 MLL-Partnergenen handelt es sich um vergleichsweise einfache reziproke chromosomale Aberrationen (P. M. Ayton, M. L. Cleary 2001). In den letzten Jahren sind einige neue MLL-Partnergene bei seltenen Translokationen entdeckt worden, so auch unter anderem das GRAF-Gen in unserem Labor (A. Borkhardt et al. 2000). Die klinische Bedeutung dieser seltenen MLL-Rearrangement mag zwar eher gering sein, ihre weitere Charakterisierung jedoch weitere Aufschlüsse über die Mechanismen der MLL-initiierten Leukämogenese aufzeigen.

Aktuelle Informationen zu den bisher beschriebenen 11q23-Aberrationen, ihre biologische Relevanz und die Eigenschaften der Fusionspartner findet man im „Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology“ (J. L. Huret et al. 2000) und in der „Mitelman database of chromosome aberration in cancer“ im Internet (F. Mitelman et al. 2001).

Die MLL-Partnerproteine kann man in zwei Gruppen einteilen. Zum einen in nukleäre MLL-Partnerproteine, die in Transkriptionsregulationsmechanismen involviert sind, zum anderen in zytoplasmatische Proteine, die bei der molekularen Signalübertragung eine Rolle spielen (P. M. Ayton, M. L. Cleary 2001).

FBP 17 ist ein im Zytoplasma lokalisiertes Protein, das durch die Fusion mit MLL nach nukleär verlagert wird und seiner Funktion im Zytoplasma entzogen wird (U. Fuchs et al. 2001). In durchgeführten Koloniebildungsassays (CFC-Tests; (C. Lavau et al. 1997) in einem murinen Modellsystem zeigte sich ein geringes transformierendes Potential für das MLL-FBP 17-Fusionsprodukt (U. Fuchs et al. 2001). Die Bedeutung dieses Ergebnis ist im Vergleich zu anderen MLL-Fusionspartner, wie z.B. MLL / ENL oder MLL / ELL, jedoch unklar, zumal auch bei MLL / ELL ein Rückgang des transformierenden Potentials bei Erhöhung der Zellpassagen zu

beobachten ist (C. Lavau et al. 1997; C. Lavau et al. 2000b; J. F. DiMartino et al. 2000; C. Lavau et al. 2000a). Zu klären ist die physiologische Bedeutung von FBP 17 in der gesunden Zelle und ob ein Fehlen des FBP 17-Proteins dazu beiträgt, dass eine Neoplasie entsteht. Sollte dies so sein, wäre FBP 17 eher als ein Tumorsuppressorgen anzusehen.



**Abbildung 19: Ergebnisse der in vitro Transformation / CFC Test nach drei Passagen. Die Anzahl der Kolonien korreliert mit der Transformationsaktivität. Es zeigt sich eine starke Transformationsaktivität von MLL / ENL und der Fusion von MLL mit der ENL Transaktivierungsdomäne (MLL / 16). Bei MLL / FBP 17 zeigen sich nur wenige Kolonien. Eine trunkierte Form von MLL (keine Fusion) und eine Fusion von MLL mit der Repressordomäne KRAB zeigt keine Transformationsaktivität. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. Slany, Tübingen.**

Durch die Fusion von MLL mit einem Partnergen entsteht ein neues Hybridgen. Allen MLL-Fusionsgenen ist gemeinsam, dass die Fusion immer „in frame“ entsteht, das heißt der Leserahmen der beteiligten Proteine bleibt erhalten. Durch die Fusion werden die chimären Anteile aus dem N-terminalen MLL-Anteil und dem C-terminalen Partnergenanteil exprimiert. Die DNA-Bindungsdomänen des MLL-Protein wie AT-Haken, CxxC-Motiv werden so mit diversen Domänen des Partnerproteins vereint. Allen MLL-Fusionen ist ferner der Verlust der SET-Domäne des MLL-Proteins gemeinsam. Hierbei handelt es sich um eine Domäne bei chromosomalen Proteinen, die an der Modulation der Genaktivität beteiligt ist und somit eventuell eine entscheidende Rolle bei der Zusammensetzung aktivierender oder reprimierender Chromatinkomplexe spielt (J. F. DiMartino, M. L. Cleary 1999). Die nach Aberration, in der Regel reziproke Translokation, entstandenen Fusionsgene weisen also ganz neue Eigenschaften auf als die jeweiligen Gene alleine. Man vermutet, dass diese neuen Eigenschaften zur Leukämogense beitragen, was für die Fusionsgene MLL-ENL nach

t(11;19)(q23;p13.3) und MLL-ELL nach t(11;19)(q23;p13.1) auch gezeigt werden konnte (R. K. Slany et al. 1998; C. Lavau et al. 1997).

Der Verlust der normalen Funktionen des MLL-Proteins durch die Fusion ist nicht allein für die Leukämieentstehung verantwortlich, wie Versuche im murinen Modellsystem gezeigt haben. MLL reguliert die Expression von HOX-Genen, die bei der frühen Stammzellentwicklung und Hämopoese eine Rolle spielen (H. J. Lawrence et al. 1996). Jedoch führt eine Haploinsuffizienz für MLL im murinen Modellsystem nicht zu einer Neoplasie, sondern nur zu einer gestörten Hämatopoese (J. F. DiMartino, M. L. Cleary 1999). In Replattierungsassays (CFC-Test) führte retrovirale Transduktion muriner myeloischer Vorläuferzellen mit trunkiertem MLL, wie man es in diversen Fusionsproteinen findet, zu keiner Transformation der Zellen (J. F. DiMartino et al. 2000; U. Fuchs et al. 2001; C. Lavau et al. 1997)

### 5.3. Formine

Formine sind Proteinprodukte von Limb deformity (LD) locus und regulieren die embryonale Entwicklung der Maus. Mutationen im LD locus stören die Ausbildung der distalen Extremitäten und die der metanephritischen Nieren. Formin-bindende Proteine wurden ursprünglich als eine Gruppe von Proteinen identifiziert, die die LD Proteine der Maus binden können. Während in-vitro-screening Versuche zur Identifizierung von möglichen anderen Liganden von Formin-bindenden Proteinen führten, identifizierte die Arbeitsgruppe um Bedford acht Klone, worunter Klon 7 strukturelle Ähnlichkeiten mit einer Trithorax-ähnlichen Sequenz aufwies, dem MLL-homologen Gen in der Maus (M. T. Bedford et al. 1997). Wir konnten zeigen, dass das Gen, das für FBP 17 codiert, in vivo mit dem trunkierten MLL Gen fusioniert. Diese Genfusion kodiert für ein neues chimerisches MLL / FBP 17 Protein, welches in neoplastische Transformationsprozesse involviert ist.

FBP 17 zeigt entlang großer Abschnitte eine Homologie mit cell division cycle (CDC) Genen. Interessanterweise sind ähnliche Regionen ebenfalls in zwei anderen MLL-Fusionspartnern vorhanden, nämlich in MSF und hCDCrel. Diese sind in die Translokationen t(11;17)(q23;q25) sowie t(11;22)(q23;q11) involviert. Computeranalysen legen die Vermutung nahe, dass FBP 17 eine übereinstimmende Rho-bindende Sequenz enthält und daher mit kleinen

GTP Domänen interagieren könnte. Rho spielt in der Regulation der zytoskelettalen Organisation und in der Wachstumskontrolle eine entscheidende Rolle. Es ist in die Zellzyklusprogression involviert und kann zum Beispiel Swiss 3T3 Zellen induzieren, dass diese in die G1-Phase und dann in die S-Phase eintreten können (M. F. Olson et al. 1995).

#### **5.4. Proteinexpression**

Immunhistochemische Studien zeigten, dass der Wildtyp FBP 17 ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert ist, wie es auch bei Proteinen von anderen MLL-Partnergenen der Fall ist, so z.B. bei AF 6, MSF, hCSCrel, GRAF und ABI-1 (T. Joh et al. 1997). FBP 17 wird in vielen Geweben des Körpers exprimiert, besonders stark in den epithelialen Zellen des respiratorischen, gastrointestinalen Systems, des Urogenitaltraktes und des Reproduktionssystems, weiterhin deutlich in den enterischen Ganglien, im braunen Fettgewebe, Kardiomyozyten und Glucagon-produzierenden Zellen des Pankreas. Hier findet sich eine Übereinstimmung mit dem kürzlich in unserem Labor identifizierten GRAF-Gen, dass ebenfalls stark in den Glucagon-produzierenden, nicht jedoch in den Insulin-produzierenden Zellen des Pankreas exprimiert wird (S. Bojesen 1999). Auffällig ist, dass FBP 17 nur in erythropoetischen Zellen, nicht jedoch in myeloepoetischen Zellen exprimiert wird. Dies könnte auf eine spezifische Funktion von FBP 17 in der Erythropoese hinweisen.

#### **5.5. Untersuchungen bei Patienten mit 9q34 Aberrationen**

Da wir keine weiteren Patienten mit FBP 17-Rearrangement identifizieren konnten, handelt es sich dabei wahrscheinlich um eine sehr seltene Aberration. Die genaue Häufigkeit von FBP 17-Rekombinationen bei Patienten mit ALL, AML oder gar anderen Tumorentitäten lässt sich jedoch nur durch größere Screeninguntersuchungen feststellen. Dafür bildet das von uns entwickelte FISH-Sondensystem mit P1-Klonen eine gute Voraussetzung.

## 6. Zusammenfassung

Diese Arbeit präsentiert die molekulare Charakterisierung einer reziproken Inversion  $\text{ins}(11;9)(q23;q34)\text{inv}(11)(q13;q23)$  in den Leukämiezellen eines 14 Monate alten Jungens mit Akuter Myeloischer Leukämie M4. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem in die Aberration involvierten Gen auf Chromosom 11q23 um MLL handelt. Dies ermöglichte die Isolierung eines neuen MLL-Partnergens auf Chromosom 9q34.

Eine neue cDNA-Sequenz von 2042 bp mit einem offenem Leserahmen von 679 Aminosäuren konnte isoliert werden, jedoch gelang es uns nicht, das erste ATG Codon zu klonieren. Das Gen ist das humane Gegenstück zum Formin-bindenden Protein 17 der Maus (FBP 17). Das Expressionsmuster und die genomische Struktur von FBP 17 wurden identifiziert, genomische P1- und YAC-Klone wurden identifiziert, die zukünftige FISH-Studien des FBP 17-Lokus ermöglichen. Die genomische Lokalisation von FBP 17 wurde auf Chromosom 9q34 nachgewiesen.

## 7. Danksagung

Während meiner Zeit im onkogenetischen Forschungslabor der Kinderklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen wurde ich von vielen Personen unterstützt, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Besonders meinem Betreuer und Erstkorrektor PD Dr. A. Borkhardt, der das Thema und die finanziellen Mittel bereitstellte, schulde ich besonderen Dank für die engagierte Begleitung und endlose Geduld.

Prof. Dr. O. Haas vom St. Anna Kinderhospital in Wien danke ich für die Anfertigung der schönen und informativen FISH-Analysen.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen danke ich Prof. Dr. R. Bohle vom Pathologischen Institut der Universität Gießen.

Viele Personen haben mich bei der täglichen Arbeit im Onkogenetischen Forschungslabor unterstützt, denen ich an dieser Stelle danken möchte: Claudia Keller, Dr. U. Fuchs, Kirstin Salser, Dr. C. Damm-Walk, Dominique Bartelheimer, Cathrin Link und Heike Mettal. Besonderer Dank gebührt Frau Claudia Keller und Frau Dr. U. Fuchs, die mich in die Laborwelt einführten, beim Erlernen der diversen Techniken unterstützten und immer Zeit für meine Fragen und Probleme hatten.

Diese Arbeit wurde finanziell durch die Mildred-Scheel-Stiftung für Krebsforschung, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Österreichischen Kinderkrebshilfe unterstützt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann, dessen Geduld und Unterstützung zum Gelingen der Arbeit beitrugen.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Ames, B. N.  
"Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer."  
Science, 1979, 204 587-593.
2. Aspenström, P.  
"A cdc42 target protein with homology to the non-kinase domain of FER has a potential role in regulating actin cytoskeleton."  
Curr Biol 1997, 7 479-487.
3. Ayton, P. M., Cleary, M. L.  
"Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins."  
Oncogene, 2001, 20 5695-5707.
4. Barrios, C., Brawand, P., Berney, M., Brandt, C., Lambert, P.-H., and Siegrist, C.-A.  
"Neonatal and early life immune responses to various forms of vaccine antigens quantitatively differ from adult responses:predominance of Th2-biased pattern which persists after adult boosting."  
Eur J Immunol 1996 26 1489-1496.
5. Bedford, M. T., Chan, D. C, Leder, P.  
"FBP WW domains and the Abl SH3 domain bind to a specific class of proline-rich ligands."  
EMBO J, 1997, 16 2376-2383.
6. Bishop, J. M.  
"Molecular themes in oncogenesis."  
Cell, 1991, 64 235-248.
7. Boehm, T., Lavenir, I., Forster, A., Wadey, R. B., Cowell, J. K., Harbott, J., Lampert, F., Waters, J., Sherrington, P., Couillin, P. et al.  
"The T-ALL specific t(11;14)(p13;q11) translocation breakpoint cluster region is located near to the Wilms tumour predisposition locus."  
Oncogene, 1988, 3 691-695.
8. Bojesen, S.  
"Molecular Characterisation of the Rare Translocation t(5;11)(q31;q23) Identifies a Novel MLL Partner Gene - A Candidate Tumor SUPpressor Gene of Acute Myelogenous Leukemia of Chromosome 5q31."  
Dissertation im Fachbereich Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität, Gießen, 1999.
9. Borkhardt, A.  
"Tumorsuppressorgene."  
Die gelben Hefte, 2002, 42, 81-90.

10. Borkhardt, A., Bojesen, S., Haas, O. A., Fuchs, U., Bartelheimer, D., Loncarevic, I., Bohle, R. M., Harbott, J., Repp, R., Jaeger, U. et al.  
"The human GRAF gene is fused to MLL in a unique t(5;11)(q31;q23) and both alleles are disrupted in three cases of myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia with a deletion 5q."  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2000, 97 9168-9173.
11. Chellappan, S. P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J. M., Nevins, J. R.  
"The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein."  
Cell,1991, 65 1053-1061.
12. Chen, C. S., Sorensen, P. H., Domer, P. H., Reaman, G. H., Korsmeyer, S. J., Heerema, N. A., Hammond, G. D., Kersey, J. H.  
"Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome."  
Blood, 1993, 81 2386-2393.
13. Chomczynski, P., Sacchi, N.  
"Single-step method of RNA isolation by guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction."  
Anal Biochem, 1987, 162 156-159.
14. de Klein, A., Geurts van Kessel, A. H. M., Grosveld, G., Bartram, C. R., Hagemeijer, A., Bootsma, D., Spurr, N. K., Heisterkamp, N., Groffen, J., Stephenson, J. R.  
"A cellular oncogene is translocated to the philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia."  
Nature, 1982, 300 765-767.
15. DiMartino, J. F., Cleary, M. L.  
"MLL rearrangements in haematological malignancies: Lessons from clinical and biological studies."  
Br J Haematol, 1999, 106 614-626.
16. DiMartino, J. F., Miller, T., Ayton, P. M., Landewe, T., Hess, J. L., Cleary, M. L., Shilatifard, A.  
"A carboxy-terminal domain of ELL is required and sufficient for immortalization of myeloid progenitors by MLL-ELL."  
Blood, 2000, 96 3887-3893.
17. Friend, S. H., Horowitz, J. M., Gerber, M. R., Wang, X. F., Bogenmann, E., Li, F. P., Weinberg, R. A.  
"Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: organization of the sequence and its encoded protein."  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A,1987, 84 9059-9063.

18. Frohman, M. A., Dush, M. K., Martin, G. R.  
"Rapid production of cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer."  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 1988, 85 8998-9002.
19. Fuchs, U., Rehkamp, G., Haas, O. A., Slany, R., Konig, M., Bojesen, S., Bohle, R. M., Damm-Welk, C., Ludwig, W. D., Harbott, J. et al.  
"The human formin-binding protein 17 (FBP17) interacts with sorting nexin, SNX2, and is an MLL-fusion partner in acute myelogeneous leukemia."  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2001, 98 8756-8761.
20. Fung, Y. K., Murphree, A. L., T'Ang, A., Qian, J., Hinrichs, S. H., Benedict, W. F.  
"Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene."  
Science, 1987, 236 1657-1661.
21. Greaves, M. F.  
"Models of childhood acute lymphoblastic leukaemia."  
Leukemia, 1991, 5 819-821.
22. Heim, S., Mitelman, F.  
"Cancer Cytogenetics: Chromosomal and Molecular Aberrations of Tumor Cells."  
New York: John Wiley and Sons, 1995.
23. Hunter, T.  
"Cooperation between oncogenes."  
Cell, 1991, 64 249-270.
24. Huret, J. L., Dessen, P., Le Minor, S., Bernheim, A.  
"The "Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology" on the Internet and a review on infant leukemias."  
Cancer Genet Cytogenet, 2000, 120 155-159.  
[http:// www.infobiogen.fr/services/chromcancer](http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer)
25. Ingram, D. A., Hiatt, K., King, A. J., Fisher, L., Shivakumar, R., Derstine, C., Wenning, M. J., Diaz, B., Travers, J. B., Hood, A. et al.  
"Hyperactivation of p21(ras) and the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, cooperate to alter the proliferation of neurofibromin-deficient mast cells in vivo and in vitro."  
J Exp Med, 2001, 194 57-69.
26. Joh, T., Yamamoto, K., Kagami, Y., Kakuda, H., Sato, T., Yamamoto, T., Takahashi, T., Ueda, R., Kaibuchi, K., Seto, M.  
"Chimeric MLL products with a Ras binding cytoplasmic protein AF6 involved in t(6;11) (q27;q23) leukemia localize in the nucleus."  
Oncogene, 1997, 15 1681-1687.

27. Kearney, L., Bower, M., Gibbons, B., Das, S., Chaplin, T., Nacheva, E., Chessells, J. M., Reeves, B., Riley, J. H., Lister, T. A. et al.  
"Chromosome 11q23 translocations in both infant and adult acute leukemias are detected by in situ hybridization with a yeast artificial chromosome."  
Blood, 1992, 80 1659-1665.
28. Knudson, A. G., Jr.  
"Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma."  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 1971, 68 820-823.
29. Knudson, A. G., Jr.  
"Model hereditary cancers of man."  
Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol, 1983, 29 17-25.
30. Köhler, G., Milstein, C.  
"Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity."  
Nature, 1975, 256 495-497.
31. Kulozik, A. E., Hentze, M. W, Hagemeyer, C., Bartram, C. R.  
"Molekulare Medizin." :  
Walter de Gruyter, Berlin, New York, 2000.
32. Lavau, C., Du, C. C., Thirman, M., Zeleznik-Le, N.  
"Chromatin-related properties of CBP fused to MLL generate a myelodysplastic-like syndrome that evolves into myeloid leukemia."  
EMBO J, 2000a, 19 4655-4664.
33. Lavau, C., Luo, R. T., Du, C. C., Thirman, M. J.  
"Retrovirus-mediated gene transfer of MLL-ELL transforms primary myeloid progenitors and causes acute myeloid leukemias in mice."  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2000b, 97 10984-10989.
34. Lavau, C., Szilvassy, S. J., Slany, R., Cleary, M. L.  
"Immortalization and leukemic transformation of a myelomonocytic precursor by retrovirally transduced HRX-ENL."  
EMBO J, 1997, 16 4226-4237.
35. Lawrence, H. J., Sauvageau, G., Humphries, R. K., Largman, C.  
"The role of HOX homeobox genes in normal and leukemic hematopoiesis."  
Stem Cells, 1996, 14 281-291.
36. Levine, A. J., Momand, J., Finlay, C. A.  
"The p53 tumour suppressor gene."  
Nature, 1991, 351 453-456.
37. Magrath, I.  
"The pathogenesis of Burkitt's lymphoma."  
Cancer Res, 1990, 55 133-270.

38. Mitelman, F., Johansson, B., and Mertens, F  
"Mitelman database of chromosome aberrations in cancer."  
2001, <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelmann>
39. Mrózek, K., Heinonen, K., Lawrence, D., Carroll, A. J., Koduru, P. R. K., Rao, K. W., Strout, M. P., Hutchison, R. E., Moore, J. O., Mayer, R. J. et al.  
"Adult patients with de novo acute myeloid leukemia and t(9; 11)(p22;q23) have a superior outcome to patients with other translocations involving band 11q23: A cancer and leukemia group B study."  
Blood, 1997, 90 4532-4538.
40. Mullis, K. B., Faloona, F. A.  
"Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction."  
Methods Enzymol, 1987, 155 335-350.
41. Ning, Y., Roschke, V., Smith, A. C. M., Macha, M, Precht, K., Riethman, H., Ledbetter, D. H., Flint, J., Horsley, S., Regan, R et al.  
"A complete set of human telomeric probes and their clinical application."  
Nat Genet, 1996, 14 86-89.
42. Olson, M. F., Ashworth, A., Hall, A.  
"An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G<sub>1</sub>."  
Science, 1995, 269 1270-1272.
43. Ponder, B. A.  
"Genetics and cancer."  
Biochim Biophys Acta, 1980, 605 369-410.
44. Prives, C.  
"How loops, beta sheets, and alpha helices help us to understand p53."  
Cell, 1994, 78 543-546.
45. Pui, C.-H., Behm, F. G., Downing, J. R., Hancock, M. L., Shurtleff, S. A., Ribeiro, R. C., Head, D. R., Mahmoud, H. H., Sandlund, J. T., Furman, W. L. et al.  
"11q23/MLL rearrangement confers a poor prognosis in infants with acute lymphoblastic leukemia." J Clin Oncol, 1994, 12 909-915.
46. Rabbitts, T. H., Boehm, T.  
"Structural and functional chimerism results from chromosomal translocation in lymphoid tumors."  
Adv Immunol, 1991, 50 119-142.

47. Reaman, G. H., Zeltzer, P., Bleyer, W. A., Amendola, B., Level, C., Sather, H., Hammond, D.  
"Acute lymphoblastic leukemia in infants less than one year of age: a cumulative experience of the children's cancer study group."  
J Clin Oncol, 1985, 3 1513-1521.
48. Riley, D. J. and Lee, W. H.  
"Prospects for tumor suppressor gene therapy: RB as an example."  
in: Tumor Suppressing viruses, genes and drugs - innovative cancer therapy approaches.  
Academic Press, San Diego (USA) (1.), 2002.
49. Rocco, J. W., Sidransky, D.  
"p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression."  
Exp Cell Res, 2001, 264 42-55.
50. Rowley, J. D.  
"Biological implications of consistent chromosome rearrangements in leukemia and lymphoma."  
Cancer Res, 1984, 44 3159-3168.
51. Rubnitz, J., Link, M. P., Shuster, J. J., Carroll, A. J., Hakami, N., Frankel, L. S., Pullen, D. J., Cleary, M. L.  
"Frequency and prognostic significance of HRX rearrangements in infant acute lymphoblastic leukemia: A Pediatric Oncology Group study."  
Blood, 1994, 84 570-573.
52. Rubnitz, J. E., Behm, F. G., Pui, C. H., Evans, W. E., Relling, M. V., Raimondi, S. C., Harrison, P. L., Sandlund, J. T., Ribeiro, R. C., Grosveld, G. et al.  
"Genetic studies of childhood acute lymphoblastic leukemia with emphasis on p16, MLL, and ETV6 gene abnormalities: results of St Jude Total Therapy Study XII."  
Leukemia, 1997, 11 1201-1206.
53. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A.  
"Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase."  
Science, 1988, 239 487-491.
54. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.  
"Molecular cloning: A laboratory manual. "  
Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor University Press, 1989.
55. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R.  
"DNA sequencing with chain terminating inhibitors."  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 1977, 74 5463-5467.

- 
56. Schlehofer, B., Blettner, M., Geletneky, K., Haaf, H. G., Kaatsch, P., Michaelis, J., Mueller-Lantzsch, N., Niehoff, D., Winkelspecht, B., Wahrendorf, J. et al.  
"Sero-epidemiological analysis of the risk of virus infections for childhood leukaemia."  
Int J Cancer, 1996, 65 584-590.
57. Seminario, M. C., Wange, R. L.  
"Signaling pathways of D3-phosphoinositide-binding kinases in T cells and their regulation by PTEN."  
Semin Immunol, 2002, 14 27-36.
58. Slany, R. K., Lavau, C., Cleary, M. L.  
"The oncogenic capacity of HRX-ENL requires the transcriptional transactivation activity of ENL and the DNA binding motifs of HRX."  
Mol Cellular Biol, 1998, 18 122-129.
59. Spier, C. M., Kjeldsberg, C. R., O'Brien, R., Marty, J.  
"Pre-B cell acute lymphoblastic leukemia in the newborn."  
Blood, 1984, 64 1064-1066.
60. Swansbury, G. J., Slater, R., Bain, B. J., Moorman, A. V., Secker-Walker, L. M.  
"Hematological malignancies with t(9;11)(p21-22;q23) - a laboratory and clinical study of 125 cases."  
Leukemia, 1998, 12 792-800.
61. Thirman, M. J., Gill, H. J., Burnett, R. C., Mbangkollo, D., McCabe, N. R., Kobayashi, H., Ziemin-van der Poel, S., Kaneko, Y., Morgan, R., Sandberg, A. A. et al.  
"Rearrangements of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations."  
N Engl J Med, 1993, 329 909-914.
62. Varmus, H. E., Lowell, C. A.  
"Cancer genes and hematopoiesis."  
Blood, 1994, 83 5-9.
63. Vogt, T. F., Jackson-Grusby, L., Rush, J., Leder, P.  
"Formins: phosphoprotein isoforms encoded by the mouse limb deformity locus."  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 1993, 90 5554-5558.
64. von Bergh, A., Emanuel, B., van Zelderen-Bhola, S., Smetsers, T., van Soest, R., Stul, M., Vranckx, H., Schuurin, E., Hagemeyer, A., Kluin, P.  
"A DNA probe combination for improved detection of MLL/11q23 breakpoints by double-color interphase-FISH in acute leukemias."  
Genes,Chromosomes & Cancer, 2000, 28 14-22.

- 
65. Wagener, C.  
"Molekulare Onkologie."  
1. Auflage, Thieme, Stuttgart, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 1996.
  66. Yang, H., Kaelin, W. G., Jr.  
"Molecular pathogenesis of the von Hippel-Lindau hereditary cancer syndrome: implications for oxygen sensing."  
Cell Growth Differ, 2001, 12 447-455.
  67. Ziemer-van der Poel, S., McCabe, N. R., Gill, H. J., Espinosa, R., III, Patel, Y., Harden, A., Rubinelli, P., Smith, S. D., LeBeau, M. M., Rowley, J. D. et al.  
"Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias."  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 1991, 88 10735-10739.

## 9. Anhang

### 9.1. FBP 17-Sequenz

Kodierende Sequenz ohne Start-ATG, GenBank Accession AF265550.

```
1 ggctgtgga cggcggggag gaggagccgc cgaggagacc ccgggcgagg agctgcgagc
61 cggaggaggc cgcgcggact ccgggctttc gcgcgtcgcg gggatctcgg ggggcaaagg
121 gatcgccggg gagggggacc agagagccgc gcccgccgcg cggagcgccc cttcgcgtcc
181 cctgcaccat gagctggggc accgagctct gggatcagtt tgacaactta gaaaaacaca
241 cacagtgggg aattgatatt cttgagaaat atatcaagtt tgtgaaagaa aggacagaga
301 ttgaaactcag ctatgcaaag caactcagga atctttcaaa gaagtaccaa ctaaaaaaga
361 actcgaagga ggaagaagaa tacaagtata cgtcatgtaa agctttcatt tccaacctga
421 acgaaatgaa tgattacgca gggcagcatg aagtatatctc cgagaacatg gcatcacaga
481 tcattgtgga cttggcacgc tatgttcagg aactgaaaca ggagaggaaa tcaaactttc
541 acgatggccc taaagcacag cagcacatcg agacttgctg gaagcagctt gaatctagta
601 aaagggcaggt tgaacgcgat tgcaaagagg cggacagggc gcagcagtac tttgagaaaa
661 tggacgcctga catcaatgtc acaaaagcgg atgttgaaaa ggcccgacaa caagctcaaa
721 tacgtcacca aatggcagag gacagcaaag cagattactc atccattctc cagaaattca
781 accatgagca gcatgaatat taccatactc acatcccaa catcttcag aaaatacaag
841 agatggagga aaggaggatt gtgagaatgg gagagtccat gaagacatat gcagaggttg
901 atcggcaggt gatoccaatc attgggaagt gcctggatgg aatagtaaaa gcagccgaat
961 caattgatca gaaaaatgat tcacagctgg taatagaagc ttataaatca gggtttgagc
1021 ctctctggaga cattgaattht gaggattaca ctcagccaat gaagcgcact gtgtcagata
1081 acagcctttc aaattccaga ggagaaggca aaccagacct caaatttggg ggcaaatcca
1141 aaggaaagtt atggccgttc atcaaaaaaa ataagcttat gtccctttta acatcccccc
1201 atcagcctcc ccctccccct cctgcctctg cctcaccctc tgctgttccc aacggcccc
1261 agtctcccaa gcagcaaaag gaaccctctc cccaccgctt caacgagttc atgacctcca
1321 aacccaaaat ccaactgcttc aggagcctaa agcgtgggct ttctctcaag ctgggtgcaa
1381 caccggagga tttcagcaac ctcccacctg aacaaagaag gaaaaagctg cagcagaaag
1441 tcgatgagtt aaataaagaa attcagaagg agatggatca aagagatgcc ataacaaaa
1501 tgaaagatgt ctacctaaag aatcctcaga tgggagacc agccagtttg gatcacaaat
1561 tagcagaagt cagccaaaat atagagaaac tgcgagtaga gaccagaaa tttgaggcct
1621 ggctggctga ggttgaaggc cggctcccag cacgcagcga gcaggcgcgc cggcagagcg
1681 gactgtacga cagccagaac ccaaccacag tcaacaactg cgcccaggac cgtgagagcc
1741 cagatggcag ttacacagag gagcagagtc aggagagtga gatgaagggt ctggccacgg
1801 attttgacga cgagtttgat gatgaggagc ccctccctgc catagggagc tgcaaagctc
1861 tctacacatt tgaaggctcag aatgaaggaa cgatttccgt agttgaagga gaaacattgt
1921 atgtcataga ggaagacaaa ggcgatggct ggaccgcgat tcggagaaat gaagatgaag
1981 agggttatgt cccacttca tatgtcgaag tctgtttgga caaaaatgcc aaagattcct
2041 ag
```

## 9.2. Primer

Primername	Primersequenz 5' ? 3'
UNP nested Not 1	GCA GCG GCC GCA AGC AGT GGT AAC AAC GCA GAG T
Erler Ex 7 up int KSP 1	GCA CCG CGG CAG CAG ATG GAG TCC ACA GGA TCA GAG TGG
KIA 5' do ex	GAG ATC CCC GCG ACG GCG GAA AGC
KIA 5' do int KSP	GCA CCG CGG CCT CCT CCG GCT CGC AGC TCC TC
KIA up ex-Biotin	GCT TTC CGC CGT CGC GGG GAT CTC
KIA up int	GCG CCC CTT CGC GTC CCC TGC AC
KIA up ex	GCT TTC CGC CGT CGC GGG GAT CTC
KIA 1 down ex	ACT TCT TTG AAA GAT TCC TGA GTT GC
KIA 2 down ex	ACT TCT TTG AAA GAT TCC TGA GTT GC
KIA 2 down int	GCA TAG CTG AGT TCA ATC TCT GTC C
KIA up ex 3' race	GCC CCT TCG CGT CCC CTG CAC
KIA up int 3' race KSP	GCA CCG CGG CAT GAG CTG GGG CAC CGA GCT C
KIA 4 up ex	GAA GCG CAC TGT GTC AGA TAA CAG
KIA 5 down ex	CAA ATT TCT GGG TCT CTA CTC GCT G
KIA 5' do ex	GAG ATC CCC GCG ACG GCG GAA AGC
KIA 5' do int KSP	GCA CCC CGG CCT CCT CCG GCT AGC TCC TC
KIA int up KSP 1	GCA CCG CGG CCA GAG GAG AAG GCA AAC CAG ACC
KIA down int Not 1	GCA GCG GCC GCG CTG ACT TCT GCT AAT TTG TGA TCC
KIA STOP down ex	GGC CTG TGG GAA CAA GC GAC GG
KIA STOP down int Not 1	GCA GCG GCC GCA CTC CCC TCT AGG AAT CTT TGG C
1-KIA 5' do int KSP	GCA CCG CGG CGG CGT ACT CTG CGT TBT TAC CAC

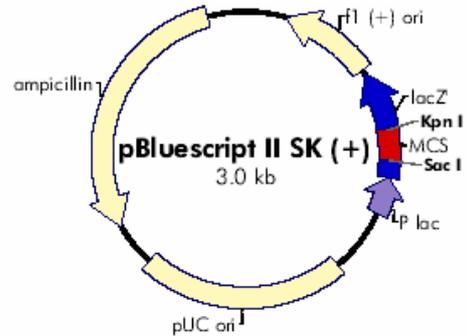
2-KIA 5' do int KSP	GCA CCG CGG GCC GCT CCA CAG CAA AAT CCC CG
3-KIA up int KSP	GCA CCG CGG CAC CT GAG CTG GGG CAC CGA G
4-KIA up ex	CGG AGC GCC CCT TCG CGT CCC
5' KIA 1 up	CCC CGC TCT CCG GGT GTA GGG
5' KIA 2 up	TGG TCA CTA AGA AGT CAT TAC CAG
5' KIA 3 up	AAA TCC AGA GCG GCG ATA GCA
MLL do 9 KSP	GCA CCH CGG CCA GCT GGT CCT CCA GAG GCT CG
MLL do 10/9 KSP	GCA CCG CGG CAC TCC AGC AGC TGC TTT GTA TGA TG
MLL exon 9 down ex	CCT CCA GAG GGC GCT CGT TCT C
MLL exon 9 down int	GAA GGG CTC ACA ACA GAC TTG GC
MLL exon 9 5'race ex	TTC CAG CTG GTC CTC CAG AGG GCG CTC
MLL exon 9 5'race int KSP	GCA CCG CGG GTG GAA GGG CTC ACA ACA GAC TTG GC
MLL ex up	CTG AAT CCA AAC AGG CCA CCA CTC
MLL int up	GGT CTC CCA GCC AGC ACT GGT C
FB-1	CAG TTC AAG CTT GTC CAG GAA TTC (AGCT) (AGCT) (AGCT) (AGCT) (AGCT) (AGCT) (AGCT) GG CCT
FB-2	CAG TTC AAG CTT GTC CAG GAA TTC (AGCT) (AGCT) (AGCT) (AGCT) (AGCT) (AGCT) (AGCT) GC GCT
FB-3	CAG TTC AAG CTT GTC CAG GAA TTC (AGCT) (AGCT) (AGCT) (AGCT) (AGCT) (AGCT) (AGCT) CC GGT
FB-4	CAG TTC AAG CTT GTC CAG GAA TTC (AGCT) (AGCT) (AGCT) (AGCT) (AGCT) (AGCT) (AGCT) CG CGT
Primer 3-Biotin	CAG TTC AAG CTT GTC CAG GAA TTC
CAN up ex	GAT TCC CGA GCG GGA C`GAT GAA GG

CAN down ex	CAC AGA GGT TAC TGC TAC CGT GG
CAN up int-KSP	GCA CCG CGG GGA ATT GCC CAA GGA ACG CTC GAG
CAN down int-Not	GCA GCG GCC GCT TTC ACT GTT TCC CTG ACT TGC AGG
Göma 1 up ex	CGG GGA GGA GGA GCC GCC GAG G
Göma 2 up int-KSP 1	GCA CCG CGG CCC GGG CGA GGA GCT GCG AGC CGG AGG AGG
Gö-Notch do ex	GCG GCG CTG GCA CAG TCA TCA ATG
Gö-Notch up ex	GAG GCC TCC TAC ATC TGC CAC TG
Gö-Notch up int KSP	GCA CCG CGG AGG ATG TCA ACG AGT GTG GCC AG
Gö-Notch do int Not 1	GCA GCG GCC GCC AGT CCA GCC GTT GAC ACA CAC G
ABL up ex	CCA GTA GCA TCT GAC TTT GAG CCT
ABL down ex	CCA GAC TGT TGA CTG GCG TGA TGT
ABL up int	TGA GTG AAG CCG CTC GTT GGA ACT
ABL down int	TTC ACA CCA TTC CCC ATT GTG ATT

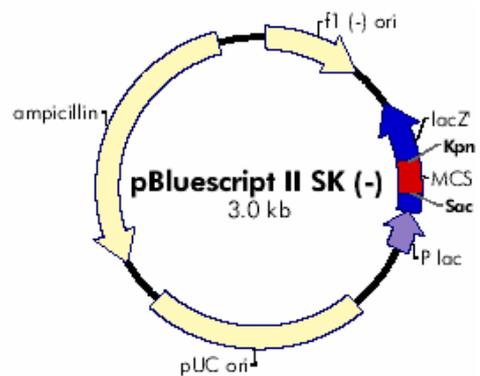
### 9.3. Vektor pBluescript II SK (+/-)

Es wurde der Vektor pBluescript II SK (+/-) der Firma Stratagene verwendet. Nähere Informationen hierzu findet man unter [www.stratagene.com](http://www.stratagene.com)

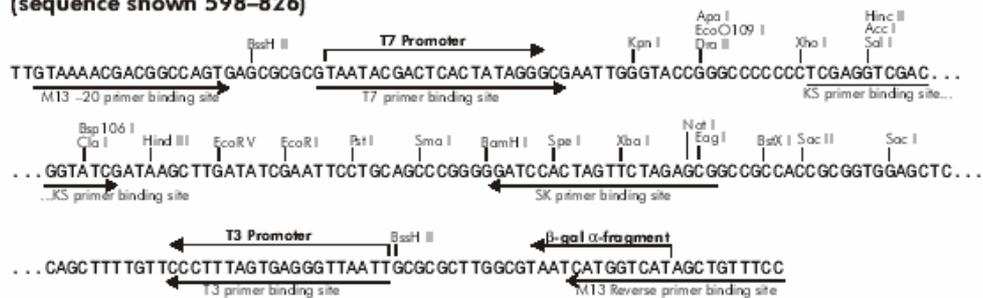
**f1 (+) origin** 135–441  
**β-galactosidase α-fragment** 460–816  
**multiple cloning site** 653–760  
**lac promoter** 817–938  
**pUC origin** 1158–1825  
**ampicillin resistance (bla) ORF** 1976–2833



**f1 (-) origin** 21–327  
**β-galactosidase α-fragment** 460–816  
**multiple cloning site** 653–760  
**lac promoter** 817–938  
**pUC origin** 1158–1825  
**ampicillin resistance (bla) ORF** 1976–2833



#### pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598–826)



## 10. Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Gönn-Frauke Rehkamp

## 11. LEBENS LAUF

Name: Rehkamp, geb. Litzka  
Vorname: Gönn-Frauke Kirstin  
Geburtsdatum: 07.10.1975  
Geburtsort: Wilhelmshaven  
Eltern: Horst und Anneli Litzka, geb. Podlich  
Familienstand: seit dem 05.01.2001 verheiratet mit  
Bernd-Christoph Daniel Rehkamp  
am 09.12.2002 Geburt des gemeinsamen Sohnes  
Luke Christopher

Schulbildung: 1982-1983 Grundschule Wiesenhof  
Wilhelmshaven  
1983-1986 katholische Grundschule Meckenheim  
1986-1995 St. Joseph-Gymnasium Rheinbach

Beruflicher Werdegang: 01.10.1995 Eintritt in die Bundeswehr als  
Sanitätsoffizieranwärter  
25.08.1999 Beförderung zum Leutnant zur See

Hochschulbildung: Wintersemester 1995/1996 bis Sommersemester  
2001 Studium der Humanmedizin an der Justus-  
Liebig-Universität in Gießen  
12.09.1997 Ärztliche Vorprüfung  
27.08.1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen  
Prüfung  
15.09.2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen  
Prüfung  
22.10.2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen  
Prüfung

- Praktisches Jahr: 23.10.2000-11.02.2001  
*Pädiatrie* im Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Gießen  
12.02.2001-03.06.2001  
*Chirurgie* im Kreiskrankenhaus Bad Hersfeld  
04.06.2001-21.09.2001  
*Innere Medizin* im Kreiskrankenhaus Bad Hersfeld
- Ärztliche Tätigkeit: 05.11.2001-11.11.2002 Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Neurochirurgie des Bundeswehrzentralkrankenhauses in Koblenz  
12.11.2002-31.12.2003 Unterbrechung des der Tätigkeit als Ärztin im Praktikum wegen Elternzeit  
Ab 01.01.2004 Fortsetzung der Tätigkeit als Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Radiologie des Bundeswehrzentralkrankenhauses in Koblenz
- Veröffentlichungen: **Originalarbeiten:**  
**The human formin-binding protein 17 (FBP17) interacts with sorting nexin, SNX2, and is an MLL-fusion partner in acute myelogenous leukemia .**  
Fuchs,U., **Rehkamp,G.**, Haas,O.A., Slany,R., König,M., Bojesen,S., Bohle,R.M., Damm-Welk,C., Ludwig,W.D. , Harbott,J., Borkhardt,A.  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98: 8756-8761 (2001)
- Abstracts:**  
**Cloning and functional characterization of a new MLL fusion gene located at 9q34.**  
Fuchs,U., **Rehkamp,G.F.**, Slany,R., Damm-Welk,C., Haas,O., Harbott,J., Bohle,R.M., Borkhardt,A.  
Klinische Pädiatrie 213[4]: S75 (2001)
- The MLL fusion partner FBP17 interacts with Tankyrase, a protein with various functions in different cellular compartments.** Fuchs,U., Rehkamp,G.F., Slany,R., Follo,M., Borkhardt,A.  
Klinische Pädiatrie 214[4]: 260 (2002)
- The Formin Binding Protein FBP17 is fused to MLL in acute myeloid leukemia with insertion**

**ins(11;9)(q23;q34) and interacts with Tankyrase, a protein involved in telomere maintenance.**

Fuchs,U., **Rehkamp,G.F.**, Slany,R., Follo,M., Borkhardt,A.  
Blood 100[11]: 529a (2002)

**Vorträge und Poster:**

**Cloning of AF9alpha – a new fusion partner of MLL in leukemias with aberrations at chromosome 11q23.**

Litzka, G., Fuchs, U., Bohle, R., König, M., Haas, O., Borkhardt, A.  
XIII. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, Wilsede, Juni, 7-10 (2000)

**Cloning and functional characterization of FBP – a new MLL fusion gene located at 9q34**

Fuchs,U., **Rehkamp,G.F.**, Slany,R., Damm-Welk,C., Haas,O.A., Harbott,J., Bohle,R.M., Borkhardt,A.  
14. Tumorzytogenetische Arbeitstagung, Weilburg April, 26-28 (2001)

**Cloning and functional characterization of a new MLL fusion gene located at 9q34.**

Fuchs,U., **Rehkamp,G.F.**, Slany,R., Damm-Welk,C., Haas,O., Harbott,J., Bohle,R.M., Borkhardt,A.  
XIV. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, Wilsede Juni, 6-9 (2001)

**The MLL fusion partner FBP17 interacts with Tankyrase, a protein with various functions in different cellular compartments.**

Fuchs,U., **Rehkamp,G.F.**, Slany,R., Follo,M., Borkhardt,A.  
XV. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, Wilsede Juni, 12-15 (2002)

**The Formin Binding Protein FBP17 is fused to MLL in acute myeloid leukemia with insertion ins(11;9)(q23;q34) and interacts with Tankyrase, a protein involved in telomere maintenance.**

Fuchs,U., **Rehkamp,G.F.**, Slany,R., Follo,M., Borkhardt,A.  
44<sup>th</sup> annual meeting of the American Society of Hematology, Philadelphia Dezember, 6-10 (2002)