

Expressions- und Sequenzanalyse des AF5-Gens bei Patienten mit Akuter  
myeloischer Leukämie und in humanen Leukämiezelllinien

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Dirk Siegfried Scharr  
aus Stuttgart

Gießen 2004

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde  
Abteilung für pädiatrische Hämatologie und Onkologie

Leiter: Prof. Dr. A. Reiter

des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. A. Borkhardt

Gutachter: PD. Dr. L. Fink

Tag der Disputation: 8. Juni 2005

---

1.	Einleitung .....	1
1.1.	MDS und AML .....	1
1.2.	Übersicht zytogenetischer Befunde bei AML und MDS .....	3
1.3.	Karzinogenese und Tumorsuppressorgene .....	4
1.4.	Die chromosomale Region 5q31 .....	6
1.5.	Isolierung von AF5 .....	7
2.	Problemstellung der Arbeit .....	9
3.	Methoden .....	11
3.1.	Untersuchungsmaterial .....	11
3.2.	RNA-Isolation .....	14
3.3.	Isolation der Boten-RNA (mRNA) .....	15
3.4.	Reverse Transkription (cDNA-Synthese) .....	15
3.5.	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	16
3.6.	Reinigung des PCR-Produkts .....	18
3.7.	Agarosegel-Elektrophorese .....	18
3.8.	PCR-Mutagenese .....	20
3.9.	Northern Blot mit nicht-radioaktivem Detektionsverfahren .....	21
3.9.1.	Besonderheiten bei der Arbeit mit RNA .....	22
3.9.2.	Synthese digoxigeninmarkierter Sonden .....	23
3.9.3.	Formaldehyd-Agarosegel-Elektrophorese .....	25
3.9.4.	RNA-Transfer (Northern Blot) .....	25
3.9.5.	Hybridisierung .....	26
3.9.6.	Detektion .....	28
3.9.7.	Kontrolle von Einzelschritten des Northern Blot Protokolls .....	30
3.9.8.	Alternative Hybridisierungs- und Detektionsprotokolle .....	32
3.9.9.	Humaner RNA Dot Blot .....	37
3.10.	DNA-Klonierung .....	38
3.11.	DNA-Sequenzierung .....	42
3.12.	Auswertung der DNA-Sequenzen .....	44
3.13.	Kompetitive RT-PCR und automatische Fragmentlängenanalyse .....	45
4.	Ergebnisse .....	46
4.1.	Expressionsanalyse von AF5 .....	46
4.1.1.	Expression von AF5 in verschiedenen humanen Geweben .....	46
4.1.2.	Expression von AF5 in verschiedenen humanen Leukämiezelllinien .....	48
4.2.	Sequenzierung der AF5-cDNA .....	50
4.2.1.	Spleißvarianten und Exon/Exon-Grenzen von AF5 .....	53
4.2.2.	AF5-Aberrationen bei Patient #1 .....	56
4.2.3.	AF5-Aberrationen bei Patient #2 .....	58
4.2.4.	AF5-Aberrationen bei Patient #3 .....	58
4.2.5.	AF5-Aberrationen der Zelllinie MUTZ-1 .....	62
5.	Diskussion .....	63
5.1.	Biologische Funktion von AF5 .....	63
5.2.	Expressionsanalyse von AF5 .....	65
5.2.1.	Vergleich der Hybridisierungs- und Detektionsprotokolle .....	66
5.2.2.	AF5-Expression .....	68
5.3.	AF5-Sequenzierung .....	69
5.3.1.	AF5-Spleißvarianten .....	70

---

5.3.2.	Intron-Insertionen durch aberrantes Spleißen .....	71
5.3.3.	Deletionen in der AF5-cDNA-Sequenz .....	74
5.3.4.	Missensmutation in der GAP-Domäne von AF5 .....	76
5.4.	Ist das „two hit“-Modell Knudsons für AF 5 bestätigt?.....	77
6.	Zusammenfassung .....	79
	Summary .....	80
7.	Literatur.....	81
8.	Anhang .....	94
8.1.	Primer.....	94
8.1.1.	Primer für die Synthese der DIG cDNA-Sonden.....	94
8.1.2.	Primer für die Synthese der AF5-cDNA-Fragmente (C0-C4).....	94
8.1.3.	Primer für die Nachweisreaktion der Deletion nt256(del4) bei Pat. #1 .....	96
8.1.4.	Primer für die Nachweisreaktion der Insertion 1290ins52 bei Pat. #3 .....	96
8.1.5.	Primer für die Synthese des 5' und 3' Endes von AF5.....	96
8.2.	AF5-cDNA-Sequenz .....	97
8.3.	Sequenzen der Insertionen.....	98
8.3.1.	1149ins96 .....	98
8.3.2.	1290ins52 .....	98
8.3.3.	1993ins74 .....	99
8.4.	Vektor für cDNA-Klonierung.....	99
8.5.	Puffer und Lösungen .....	99
9.	Danksagung.....	102
10.	Lebenslauf .....	103

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1:	Physikalische Karte der chromosomalen Region 5q31 modifiziert nach Jaju et al.....	7
Abbildung 2:	Schematische Darstellung funktioneller Domänen in der Aminosäuresequenz von AF5 .....	8
Abbildung 3:	PCR-Mutagenese zur Differenzierung von AF5-Fragmenten mit und ohne Deletion nt256(del4) .....	20
Abbildung 4:	Differenzierung der Fragmente nach PCR-Mutagenese und Restriktionsverdau mit Avr II .....	21
Abbildung 5:	Aufbau der Vakuum-Blotkammer für den RNA-Transfer vom Agarosegel auf Nylonmembranen .....	26
Abbildung 6:	Kontrolle der DIG-markierten DNA-Sonden mit Agarosegel-Elektrophorese .....	30
Abbildung 7:	Sensitivitätsbestimmung der DIG-markierten Northern Blot Sonden .....	31
Abbildung 8:	Kontrolle des RNA-Transfers während des Northern Blots .....	31
Abbildung 9:	Sensitivität der Northern Blot Hybridisierung nach dem modifizierten Protokoll von Roche .....	33
Abbildung 10:	Northern Blot Hybridisierung nach dem modifizierten Protokoll von Engler-Blum et al. ....	35
Abbildung 11:	Northern Blot Hybridisierung mit ExpressHyb™, Clontech. ....	36
Abbildung 12:	Position der Northern Blot Sonde in Bezug auf die Domänen der AF5-cDNA-Sequenz .....	46
Abbildung 13:	Relative AF5-Expression in 50 verschiedenen humanen Geweben .....	47
Abbildung 14:	Northern Blot mit Gesamt-RNA aus 11 verschiedenen humanen Leukämiezelllinien .....	49
Abbildung 15:	Schematische Darstellung der klonierten Fragmente mit Bezug auf die bekannten Domänen der AF5-cDNA .....	51
Abbildung 16:	Elektrophorese von AF5-Spleißvarianten .....	54
Abbildung 17:	Vergleich der AF5-Spleißvarianten mit der Wildtypsequenz und den Proteinmotiven .....	55
Abbildung 18:	Genomische Struktur von AF5 mit Kennzeichnung der Exon/Intron- Grenzen .....	56
Abbildung 19:	Screening-Test mit PCR zur Differenzierung von AF5-Fragmenten mit und ohne Deletion nt256(del4) .....	57
Abbildung 20:	Schematische Darstellung des Intron 8, Lage und Sequenzen der Insertion 1290ins52 und der Spleißdonor-und Spleißakzeptorstellen ....	59
Abbildung 21:	PCR zum spezifischen Nachweis der Insertion 1290ins52 .....	60
Abbildung 22:	Genescan-Analyse zur semiquantitativen Abschätzung der Expression von 1290ins52 .....	61
Abbildung 23:	Hypothetisches Modell der AF5-Funktion in der RAS vermittelten Signalkaskade .....	65

Abbildung 24: Auswirkungen der Intron-Insertionen auf die Aminosäuresequenz von AF5.....	72
Abbildung 25: Auswirkungen der Deletionen auf die Aminosäuresequenz von AF5.....	75
Abbildung 26: Mutation einer kryptischen Spleißdonorstelle im Exon 6.....	76

### Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: FAB-Klassifikation der Myelodysplastischen Syndrome .....	1
Tabelle 2: Daten zu den Patientenproben und den Kontrollen .....	12
Tabelle 3: Zusammenstellung der verwendeten permanenten Leukämiezelllinien ....	13
Tabelle 4: Reaktionsansatz Reverse Transkription .....	16
Tabelle 5: Reaktionsansatz Standard-PCR .....	17
Tabelle 6: Reaktionsansatz und PCR-Zyklusbedingungen für die Synthese digoxigeninmarkierter DNA-Sonden.....	24
Tabelle 7: Empfohlene Hybridisierungsbedingungen nach Engler-Blum et al. [155] .	34
Tabelle 8: Gegenüberstellung der Detektionslösungen von Roch und Engler-Blum et al. ....	34
Tabelle 9: Gegenüberstellung der Protokollvarianten für Northern Blot Hybridisierung und Detektion von Roche [143], Engler-Blum et. al. [155] und Yang, Kain [157] .....	37
Tabelle 10: Restriktionsansatz DNA-Klonierung.....	39
Tabelle 11: Reaktionsansatz Dephosphorylierung .....	40
Tabelle 12: Ligase-Ansatz DNA-Klonierung .....	40
Tabelle 13: Reaktionsansatz und Zyklusbedingungen für die DNA-Sequenzierung....	43
Tabelle 14: Ergebnisse der AF5-cDNA-Sequenzierung bei den Patienten mit AML, der Zelllinie MUTZ-1 (MDS) und den gesunden Kontrollpersonen.....	52
Tabelle 15: Kostenanalyse der Hybridisierungs- und Detektionsprotokolle .....	66

**Fusionspartnergene von ALL-1/MLL, Stand 8/2003, Literaturhinweis 71, 72, 73**

AF = ALL-1 Fusionspartnergene auf Chromosom (Nummer und Bande)	
AF-1p (1p32)	Funktion bei der Endozytose
AF-1q (1q21)	Funktion unbekannt
LAF4 (2q11.2-2q12)	Lymphoid nuclear protein related to AF4, vermutlich ein Transkriptionsaktivator
AF3p21	Kernprotein mit SH3-Domäne
GMPS (3q24)	Guanosine 5'-Mono Phosphate Synthetase, beteiligt an der Purinsynthese
LPP (3q28)	Lipoma Preferred Partner oder LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma
AF4/FEL (4q21)	Transkriptionsaktivator
AF5q31	besitzt Homologie zu AF4 und LAF4
AF5/GRAF (5q31)	GTPase Regulator Associated with FAK, GAP von Rho (G-Protein der RAS Familie) vermutlich negativer Regulator von Rho in der RAS-MAPK Signalkaskade
AF6q21	vermutlich ein Transkriptionsregulator
AF5 $\alpha$ (5q12)	SoxLZ/Sox6 leucine zipper binding protein
AF6 (6q27)	vermutlich an der Signaltransduktion beteiligt
AF9 (9p22)	Transkriptionsaktivator
AF9q34	RAS GTPase aktivierendes Protein
FBP17 (9q34)	Formin Binding Protein 17, Interaktion mit Sorting nexin 2 (SNX2) in vivo und in vitro
AF10 (10p12)	Transkriptionsfaktor
ABI-1 (10p11.2)	Abl-Interactor 1, Zellwachstumsinhibitor
LCX (10q22)	Leukemia associated protein with a CXXC domain
MLL-Duplikation	+11 oder Trisomie 11
LARG (11q23 telomer von MLL)	Leukemia Associated Rho Guanine nucleotide exchange factor
GPHN (14q23.3)	Gephyrin, verankert inhibitorische neuronale Rezeptoren mit dem subsynaptischen Zytoskelett
MPFYVE (15q14)	MLL Partner containing FYVE domain
AF15q14	Kernprotein
CBP (16p13.3)	CREB-binding protein. Transkriptionsfaktor. Bindet spezifisch an das DNA-bindende Protein CREB und verbindet dieses mit der Transkriptionseinheit.
GAS7 (17p13)	Growth Arrest-Specific 7, vermutlich an der Reifung und Differenzierung von Kleinhirn-Neuronen beteiligt.
AF17 (17q21)	Transkriptionsregulator
LASP1 (17q12-21)	LIM, Actin binding and SH3 Protein
RAR- $\alpha$ (17q12)	Retinoic Acid Receptor Alpha, Transkriptionsfaktor
AF17q25/MSF	MLL Septin-like Fusion, Homologie zu Proteinen der Septin-Familie
ELL (19p13.1)	Eleven Ninteen Lysin rich Leukemia, beeinflusst die RNA-Polymerase II und spielt vermutlich eine Rolle beim Zellwachstum
EEN (19p13)	Extra Eleven Nineteen Leukemia Fusion Gene, besitzt eine

	SH3-Domäne
ENL (19p13.3)	Eleven Nineteen Leukemia, Transkriptionsaktivator
hCDCrel (22q11.2)	human cell division cycle regulation 1, Familie der Septin Proteine
P300 (22q13.2)	adenovirus E1A-associated 300-kD protein, Transkriptions-Coaktivator
AFX1 (Xq13)	Transkriptionsfaktor
SEPT2 (Xq22)	Septin 2, Zytoskelettorganisation und Zytokinese
SEPT6 (Xq24)	Septin 6, Zytoskelettorganisation und Zytokinese

### Nomenklatur Karyotyp und Chromosomenanomalien

Beispiel	Beschreibung
+4mar	zusätzliches Marker-Chromosom 4
+i(11q)	zusätzliches Isochromosom 11q
-5	Verlust des Chromosoms 5
11q-	Verkürzung des langen Arms von Chromosom 11
1p	kurzer Arm Chromosom 1
5q	langer Arm Chromosom 5
6p+	Verlängerung des kurzen Arms von Chromosom 6
add(1)(p11)	zusätzliches genetisches Material unbekannter Herkunft am kurzen Arm von Chromosom 1 Bande p11
del(7q)	Deletion des langen Arms von Chromosom 7
der(7)t(7;11)(q35;q13)	vom Chromosom 7 abgeleitetes („derived“) Chromosom
hsr	homogeneous staining region
ins	Insertion
inv(1)(p12p31)	Inversion der Bande p12p31 auf Chromosom 1
r	Ringchromosom
t(9;22)(q34;q11)	reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22, Bruchstelle am langen Arm von Chromosom 9 in der Bande q34 und am langen Arm von Chromosom 22 in der Bande q11

### Abkürzungen und wichtige Begriffe

ABL1	Abelson murine Leukemia oncogene 1, Tyrosinkinase, siehe BCR
ADRB2	Adrenergic Receptor Beta 2
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
Allel	Die mutationsbedingt abweichende (= alternative) Zustandsform eines Gens an einer bestimmten Position im Genom. Eine Person besitzt an jedem autosomalen Locus zwei Allele, eines vom Vater und eines von der Mutter.
AML	Akute Myeloische Leukämie
Amplimer	Synonym Primer. Oligonukleotid, das spezifisch an eine bestimmte Zielsequenz einer Nukleinsäuresequenz bindet und von dem in der PCR die DNA-Synthese startet.
Annealing	Zusammenlagerung komplementärer DNA- oder RNA-Stränge zu einem Doppelstrang.



Antisense-Strang	Gegensinn-Strang, dient der RNA-Polymerase bei der Transkription als Matrize.
AS	Aminosäuresequenz
BAC	künstlicher Bakterienchromosomenklon
BBR	Roche Blockreagenz
BCR	Breakpoint Cluster Region, fusioniert mit ABL bei der Translokation t(9;22)(q34;q11), Philadelphiachromosom, GAP für p21rac (G-Protein der RAS-Familie)
BrdU	5-bromodeoxyuridin, Reportermolekül, mit dem DNA-Sonden markiert werden können
C <sub>0</sub> t-1 DNA	DNA-Fraktion mit einem hohen Anteil hochrepetetiver Sequenzen
cDNA	Komplementäre DNA, die das Enzym Reverse Transkriptase anhand einer mRNA-Matrize synthetisiert. Dabei entsteht zuerst eine einzelsträngige DNA, deren Sequenz komplementär zur mRNA ist.
cis-aktiv	Nukleinsäuresequenz in der Nachbarschaft eines Gens, die kontrollierend auf die Expression oder Funktion des Gens wirkt.
CMML	Chronische Myelomonozytäre Leukämie
CSF1R	Colony Stimulating Factor 1 Receptor, Rezeptor-Tyrosinkinase
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-Chloro) Tricyclo[3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]Decan}-4-yl) Phenylphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
Denaturierung	Trennung komplementärer Stränge in DNA- beziehungsweise RNA-Einzelstänge.
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DMPC	Dimethyl Pyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
EMBL	Europäisches Molekularbiologisches Labor
Enhancer	Kombination kurzer Sequenzelemente, die die Transkription eines Gens stimulieren.
ENX-1	Enhancer of zeste, humanes Homologon zu einem Entwicklungsgen von <i>Drosophila melanogaster</i> , es reguliert als Transkriptionsfaktor die Expression von Homeoboxgenen.
eRF1	translation Releasing Factor
Exon	Abschnitt eines Gens, der im Rahmen der Expression in ein mRNA-Produkt oder eine reife mRNA übersetzt wird. Manche Exons bestehen aus kodierender und/oder nicht-kodierender DNA (untranslatierte Sequenzen)
Exon Skipping	Form des alternativen Spleißens, bei dem bestimmte Spleißstellen übersprungen werden, die normalerweise zum Spleißen der RNA benutzt werden. In der gespleißten RNA fehlen ganze Exons.
FAB	French American British Group
FAK	Focal Adhesion Kinase

---

FISH	in situ-Hybridisierung mit Fluoreszenzfarbstoff
GAP	GTPase aktivierende Proteine
GAP-Domäne	Guanosintriphosphat aktivierende Domäne
GDP	Guanosindiphosphat
GEFs	guanin nucleotide exchange factors, „Guanosin Austauschfaktoren“
Gen	DNA-Abschnitt, der ein Polypeptid oder RNA-Produkt kodiert.
Gesamt-RNA	Ribonukleinsäure-Gemisch aus mRNA, tRNA, rRNA, snRNA, cytoplasmatischer RNA
G-Protein	GTP bindende Proteine
GTP	Guanosintriphosphat
Haushaltsgen	Gen, dessen Expression für das Funktionieren der meisten Zelltypen notwendig ist.
Ig	Immunglobulin
IL12B	Interleukin 12B
Intron	Nicht-kodierende DNA, die benachbarte Exons eines Gens trennt.
IRF-1	Interferon Regulatory Factor 1
JMML	Juvenile Myelomonozytäre Leukämie
KM	Knochenmark
Leseraster	Rahmen in dem die Information von einem RNA-Strang während der Translation abgelesen wird. Grundlage sind die Nukleotidtriplets.
Ligation	Bildung von 3'-5'-Phosphodiesterbindungen zwischen Nukleotiden unterschiedlicher DNA-Moleküle oder desselben Moleküls.
M4Eo	eosinophile Variante der AML-M4
MAPK	Mitogen Aktivierte Proteinkinase
MDS	Myelodysplastische Syndrome
MHC	Major Histocompatibility Complex
Missense-Mutation	Mutation, die durch Austausch eines Nukleotids im kodierenden Triplet zum Aminosäureaustausch in der Proteinprimärsequenz führt.
MLL	Mixed Lineage Leukemia oder Myeloid/Lymphoid Leukemia (= ALL-1, HTRX, HRX)
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
nt	Nukleotid
NF1	Neurofibromatose Typ 1
Onkogen	Gen, das an der Kontrolle der Zellproliferation beteiligt ist.
ORF	Open Reading Frame
P1-Klon	DNA-Klon des Bakteriophagen P1, mit dem besonders lange Inserts vermehrt werden können
PAS	Periodic Acid SCHIFF Reaction, histochemischer Nachweis von (Muco-) Polysacchariden, Muco- u. Glucoproteiden, Gluco- u. Phospholipiden
PCR	Polymerasekettenreaktion
PML	Promyelocytic Leukemia Protein, Transkriptionsfaktor
POX	Peroxidase
RACE-PCR	Schnelle PCR von cDNA-Enden. Wird eingesetzt um das unbekannte Ende eines cDNA-Moleküls zu identifizieren.
RAF	Proto-Onkogen, Serine/Threonine-Proteinkinase

---

RAS	Gruppe von Proto-Onkogenen, die für G-Proteine kodieren
Restriktions-schnittstelle	DNA-Sequenz von 4-8 bp Länge, die von einer Restriktionsendonuklease erkannt wird.
Rho	G-Protein der RAS-Familie
RNA	Ribonukleinsäure
RNasen	Ribonuklease, Sammelbezeichnung RNA spaltender/hydrolysierender Enzyme
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
S-Phase	DNA-Synthese im Zellzyklus
G1-Phase	Lücke zwischen M-Phase (Mitose) und S-Phase im Zellzyklus
Sense-Strang	Sinn-Strang, komplementär zum Gegensinn-Strang, stimmt mit der Sequenz der transkribierten RNA überein.
SH3-Domäne	Src Homology 3 Domäne
SMAD5	SMA5-Mothers Against Decapentaplegic homolog 5
snRNA	kleine nukleäre (small nuclear) RNA
Sonde	DNA- oder RNA-Sequenz, die markiert ist und spezifisch an eine gesuchte Nukleinsäuresequenz bindet.
Spleißen	Vorgang bei dem aus dem Primärtranskript die Intronsequenzen herausgeschnitten werden und die Exonsequenzen zusammengefügt werden.
TAE	Tris-Acetat-EDTA
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
trans-aktiv	Kontrolle der Genexpression durch ein Produkt, das von einem entfernt gelegenen Gen kodiert wird. Die Kontrolle erfolgt meist über Bindung an cis-aktive Sequenzen.
Transformation	Prozeß, bei dem DNA in Zellen eingeschleust wird
Tris	Trometamol
tRNA	transfer RNA
TS	Tumorsuppressorgen
UTP	Uridintriphosphat
UTS	untranslatierte Sequenz

## 1. Einleitung

### 1.1. MDS und AML

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind klonal erworbene Störungen pluripotenter hämatopoetischer Stammzellen. Eine gestörte Proliferation und Differenzierung, insbesondere myeloischer Vorläuferzellen führt zu einer ineffizienten Hämatopoese aller drei Blutzellreihen mit normo- bis hyperzellulärem Knochenmark. Im peripheren Blut resultiert daraus eine Mono-, Bi- oder Panzytopenie, welche sich klinisch durch Anämiezeichen, Blutungskomplikationen und/oder Infektanfälligkeit manifestiert. Die French American British Group (FAB) erarbeitete 1982 ein Klassifikationssystem, das die klinisch und prognostisch heterogene Gruppe von Erkrankungen basierend auf morphologischen Kriterien und der Blastenzahl in Knochenmark und peripherem Blut in fünf Untergruppen einteilt [1].

Untergruppe	Blasten peripheres Blut	Blasten Knochenmark (KM)	Weitere Kriterien
Refraktäre Anämie (RA)	< 1%	< 5%	
RA mit Ringsideroblasten (RARS)	< 1%	< 5%	> 15% Ringsideroblasten im KM
RA mit Exzess von Blasten (RAEB)	< 5%	5-20%	
RAEB in Transformation (RAEBt)	> 5%	20-30%	Auerstäbchen in Granulozytenvorläuferzellen
Chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML)	< 5%	< 20%	Periphere Blutmonozytose >10 <sup>3</sup> /µl

**Tabelle 1: FAB-Klassifikation der Myelodysplastischen Syndrome**

Betroffen sind überwiegend ältere Patienten, das mediane Erkrankungsalter liegt zwischen 58-74 Jahren, die jährliche Inzidenzrate wird auf 4-13/100000 geschätzt [2, 3].

MDS kommen jedoch auch bei unter 60-jährigen Patienten und selten bei Kindern vor (Juvenile Myelomonozytäre Leukämie = JMML).

MDS sind instabile hämatologische Erkrankungen, die zu einer Abnahme der Differenzierungsfähigkeit und Zunahme der peripheren Zytopenie neigen. In bis zu 30% der Fälle wird ein Übergang in die akute myeloische Leukämie (AML) beschrieben [4]. Früher wurden sie als Ausdruck der Progressivität unter dem Begriff der „Präleukämie“ subsumiert. Die Pathogenese des MDS bis zur Leukämie vollzieht sich nach Jacobs und Clark über zahlreiche Zwischenstufen [5, 6]. Nach einer initialen irreversiblen Genschädigung der hämatopoetischen Stammzelle durch chemische, strahlenbedingte, virale oder noch unbekannte Noxen folgen wahrscheinlich noch reversible Schädigungen, die zu einem Wachstumsvorteil einzelner Zellklone führen. Im weiteren Verlauf bis zum Vollbild der leukämischen Zelle führt eine zunehmende genetische Instabilität zur Entwicklung von Chromosomenaberrationen. Von den Schäden sind vermutlich Gene betroffen, die eine Rolle bei der Regulation der Zellproliferation und -differenzierung spielen. Überdies ist das Versagen der körpereigenen Immunantwort von Bedeutung. Für die Pathogenese ist offenbar die Summation unterschiedlicher Faktoren ausschlaggebend, womit die steigende Prävalenz von MDS im höheren Lebensalter zu erklären ist.

Eine AML wird bei einem Nachweis von mehr als 30% Myeloblasten im Knochenmark diagnostiziert. Im Kindesalter sind Leukämien mit 34,7% aller malignen Erkrankungen am häufigsten vertreten, darunter wird in ca. 15% eine AML und in ca. 82% eine ALL diagnostiziert. Die altersstandardisierte jährliche Inzidenzrate der AML beträgt nach Angaben des Deutschen Kinderkrebsregisters 0,7/100000 für Kinder bis zum 15. Lebensjahr [7]. Die AML ist für den kleineren Anteil der akuten Leukämien im Kindesalter verantwortlich aber im Vergleich zur ALL schlechter therapierbar. Dies wird in der niedrigeren 15-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit der AML mit 42% gegenüber der ALL mit 74% deutlich. Im Erwachsenenalter hingegen werden 80% der akuten Leukämien durch die AML verursacht. Mit 75 Jahren beträgt die altersabhängig steigende Inzidenz 14/100000 [8, 9].

Anhand morphologischer Kriterien erstellte die FAB Mitte der 70er-Jahre ein Zellklassifikationssystem [10]. Danach werden 8 Subtypen (M0-M7) der AML unterschieden, die sich in Zellgröße, Zellkernform, Kernchromatinstruktur, Nukleolen,

Zytoplasmaanteil, Basophilie und Vakuolisierung unterscheiden. Ergänzt wurden die Einteilungskriterien durch zytochemische Färbetechniken, die mit PAS, POX und unspezifischer Esterase eine Differenzierung zwischen lymphatischer und myeloischer Zellreihe erlauben und neben den morphologischen Kriterien zur Subklassentypisierung herangezogen werden.

Nach der Entwicklung der Hybridomtechnik zur Herstellung monoklonaler Antikörper [11] wurde ein weiteres „Werkzeug“ zur Bestimmung von Linienzugehörigkeit und Reifegrad maligner Zellen bereitgestellt. Die Immunphänotypisierung wird zur Abgrenzung der AML gegenüber biphänotypischen und lymphatischen Leukämien eingesetzt und sichert die Diagnose einer AML vom Subtyp M0, M6 und M7.

## **1.2. Übersicht zytogenetischer Befunde bei AML und MDS**

Im Rahmen der Leukämiediagnostik sind zytogenetische Befunde von unterschiedlicher Bedeutung. Mit dem Nachweis klonaler Karyotypveränderungen ist der neoplastische Charakter der Erkrankung gesichert. Einzelne zytogenetische Befunde sind diagnosetypisch bzw. -spezifisch. Zum Teil gibt es eine enge Beziehung zwischen spezifischem zytogenetischem Befund und der Prognose einer Erkrankung. Ferner dienen sie als Marker der Remissionsüberwachung.

Die AML FAB-Gruppen M3 und M4Eo sind durch spezifische chromosomale Aberrationen charakterisiert. Die Translokation  $t(15;17)(q22,q11-12)$  wird regelhaft in der Subgruppe M3 (Promyelozytenleukämie) nachgewiesen. Auf molekularer Ebene resultieren daraus Rearrangements und eine aberrante Expression des Retinsäurerezeptor-alpha Gens auf Chromosom 17 [12, 13, 14]. Damit eröffnet sich ein spezifischer Therapieansatz mit all-trans-Retinsäure während der Induktionsphase [15, 16, 17]. Der Nachweis des chimeren Fusionsgens PML/RAR- $\alpha$  mittels Polymerasekettenreaktion wird zur Therapieüberwachung eingesetzt. Die Inversion  $inv(16)(p13;q22)$  ist spezifisch für die eosinophile Variante der AML-M4 (M4Eo) und ist mit einer günstigen Prognose verbunden [18]. Marker einer guten Prognose ist auch der Nachweis der Translokation  $t(8;21)(q22;q22)$ . Sie ist in Verbindung mit anderen Anomalien häufig in den Subtypen M2 und M4 anzutreffen [19, 20].

Prognostisch ungünstig sind Veränderungen des Chromosoms 11 im Bereich der Bande q23 einzuschätzen. Derartige Aberrationen sind bei verschiedenen AML-Subtypen zu

finden: bei AML-M5 die Translokation t(9;11)(p22;q23), bei AML-M4 und -M5 die Translokationen t(10;11)(p12;q23) und t(11;19)(q23;p13.1) [21, 22, 23]. 11q23-Aberrationen sind außerdem bei der Akuten Lymphatischen Leukämie und bei sekundären Leukämieformen zu finden.

MDS-Subklassen spezifische chromosomale Aberrationen sind nicht bekannt. Ein gehäuftes Auftreten von Trisomie 8 wird bei CMML beschrieben [24, 25]. Häufig beobachtete strukturelle Anomalien betreffen Deletionen am langen Arm der Chromosomen 5, 7 und 11 sowie numerische Störungen wie Monosomie 7, Trisomie 8 oder 21 und der Verlust des y-Chromosoms [26, 27, 28, 29, 30, 31, 32]. Die am häufigsten beschriebenen Anomalien bei sekundären therapieassoziierten MDS sind Monosomie 7, 5 und del5q [33, 34]. Grundsätzlich ist die Prognose umso schlechter und die Transformationsrate umso höher anzunehmen, desto zahlreicher und komplexer die Karyotypanomalien sind.

Eine Sonderform mit günstiger Prognose stellt das 5q-Syndrom mit isolierter del(5q) als einzige chromosomale Anomalie dar [35, 36]. Es ist charakterisiert durch Anämie, Dysmegakaryopoiesie, hypolobulierte Megakaryozyten, Makrozytose und normale bis erhöhte Thrombozytenzahlen. Betroffen sind vor allem Frauen im 7. Lebensjahrzehnt, das Risiko zur leukämischen Transformation liegt bei weniger als 20% [37, 38].

### 1.3. Karzinogenese und Tumorsuppressorgene

Nach einem Modell von Armitage und Doll [39] ist Krebsentstehung Folge von durchschnittlich sechs bis sieben aufeinanderfolgenden Mutationen in einer somatischen Zelle. Bei einer Mutationsrate von  $10^{-6}$  pro Zelle ist es sehr unwahrscheinlich, dass eine der ca.  $10^{14}$  Zellen eines Menschen maligne entartet (Wahrscheinlichkeit der malignen Entartung einer Körperzelle = ca.  $10^{14} \times 10^{-36}$ ). Durch Selektion unter den somatischen Zellen eines Organismus kann es dennoch zur Krebsentstehung kommen. Dabei spielen zwei Mechanismen eine Rolle. Bestimmte Mutationen steigern die Zellproliferation, andere führen durch eine Beeinträchtigung der Stabilität des Genoms zu einer erhöhten Gesamtmutationsrate. Drei Gruppen von Genen konnten identifiziert werden, die an der Karzinogenese beteiligt sind [40]:

- Onkogene fördern die Zellproliferation. Das normale, nicht-mutierte Gen besitzt in der Zelle eine oder mehrere physiologische Funktionen und wird als

Protoonkogen bezeichnet. Mutiert das Protoonkogen zum Onkogen ist seine Aktivität erhöht, wodurch die Zellproliferation unangemessen gesteigert wird. Die Mutation zum Onkogen bedeutet für die Zelle einen Funktionsgewinn und kann sich damit in heterozygoter Form auf den Phänotyp auswirken.

- Tumorsuppressorgene hemmen bzw. kontrollieren die Zellproliferation. Sie regulieren die proliferationsfördernden Eigenschaften der Protoonkogenen, damit Gewebeerneuerung und –funktion erhalten bleiben. Die maligne Entartung einer Zelle wird durch einen Funktionsverlust hervorgerufen und ist an eine biallelische Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen gebunden.
- Mutatorgene sind für die Erhaltung der Integrität des Genoms und die Zuverlässigkeit des Informationstransfers verantwortlich. Sie sind zum Beispiel an der Korrektur fehlgepaarter Basen beteiligt. Nur ein Funktionsverlust in Verbindung mit der Inaktivierung beider Allele kann eine Tumorentstehung verursachen.

Knudson formulierte für die Entstehung maligner Erkrankungen ein Modell der biallelischen Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Er zeigte in einer epidemiologischen Studie für das Retinoblastom, einem seltenen malignen Netzhauttumor des Kindesalters, dass zwei hintereinander auftretende Mutationsereignisse zum Ausbruch der Erkrankung führen [41, 42, 43, 44]. In 60% der Fälle tritt der Augentumor sporadisch und nur einseitig auf. Bei 40% der Betroffenen entsteht der Tumor bilateral und wird autosomal dominant als unvollständig penetrantes Merkmal an die Nachkommen vererbt. Ein mutiertes Allel muß deshalb schon mit den Keimbahnzellen an die Nachkommen weitergegeben werden. Die somatischen Zellen dieser Individuen besitzen somit vor Ausbruch der Krankheit bereits einen defizienten Retinoblastomlocus. Das zweite Mutationsereignis inaktiviert das verbleibende Allel und führt zur Ausprägung des Phänotyps. Die sporadischen Fälle werden durch Mutationen auf somatischer Ebene verursacht, wobei zunächst nur ein Klon somatischer Zellen den ersten Treffer trägt. Das Retinoblastomgen wurde auf Chromosom 13 in der Region q14 lokalisiert. Cavane et al. konnten Knudsons Modell belegen [45]. Sie untersuchten Tumorzellen und normale Blutzellen von Patienten mit Retinoblastom auf Restriktions-Schnittstellen-Polymorphismus. Dabei zeigte sich, dass die DNA der Blutzellen für bestimmte Marker der chromosomalen Region 13q14 heterozygot war, die Tumorzellen jedoch homozygot (loss of heterozygosity, LoH-Analyse). Sie folgerten daraus, in den



Tumorzellen den 2. Treffer nach Knudsons „two hit“-Modell nachgewiesen zu haben, der den Verlust der verbleibenden funktionellen Kopie eines Tumorsuppressorgens anzeigt.

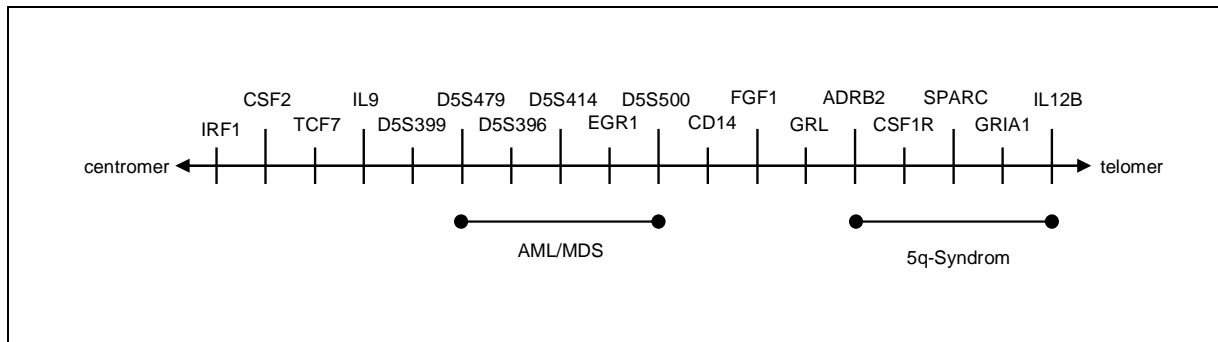
#### **1.4. Die chromosomale Region 5q31**

Die chromosomale Aberration del(5q) ist nach dem Philadelphia-Chromosom die zweite strukturelle chromosomale Veränderung, die bei malignen hämatologischen Erkrankungen entdeckt wurde [46]. Van den Berghe H. et al. beschrieben 1974 unterschiedliche hämatologische Erkrankungen mit Deletionen des langen Arms von Chromosom 5 (5q) [35]. Das Spektrum an Erkrankungen, bei denen 5q-Aberrationen festgestellt wurden, hat sich in der Zwischenzeit enorm erweitert. Es beinhaltet maligne hämatologische Erkrankungen, verschiedene maligne epitheliale und mesenchymale Tumoren und selten auch solide benigne Tumoren [47]. In der Gruppe der hämatologischen Erkrankungen überwiegen MDS und AML.

Der Verlust an genetischem Material und der damit verbundene Funktionsverlust in den maligne entarteten Zellen implizierten, dass an der Pathogenese dieser Erkrankungen ein Tumorsuppressorgen beteiligt sein könnte. Das Ausmaß an verloren gegangenem genetischem Material auf Chromosom 5 reicht von kleinen interstitiellen Deletionen bis hin zur Deletion des gesamten Chromosoms 5. Le Beau MM. et al. konnten bei Patienten mit MDS, AML und 5q-Syndrom die chromosomale Bande 5q31 als regelhaft gemeinsam deletierte Region identifizieren [48, 49]. Dieser Bande konnten mehrere für die Hämatopoese relevante Gene zugeordnet werden, unter anderen die Gene für Interleukine, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren [50]. Einige dieser Gene, IRF-1 [51, 52], CSF1R (FMS) [53], SMAD5 [54, 55, 56] und eRF1 [57] wurden für das vermutete Tumorsuppressorgen in der Region 5q31 gehalten, konnten jedoch in dieser Funktion bisher nicht bestätigt werden.

Anhand der Ergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen konnte eine genomische Karte der sensiblen Region auf dem langen Arm von Chromosom 5 erstellt werden [49, 58, 59, 60, 61, 62]. Für die hämatologischen Erkrankungen mit 5q-Aberrationen ergeben sich demnach zwei kritische chromosomale Bereiche, welche auf verschiedene Krankheitsentitäten mit unterschiedlichem klinischem Verlauf hinweisen. Das kleinste gemeinsam deletierte Segment bei Patienten mit MDS/AML, der malignen Verlaufsform von 5q31-Aberrationen, wurde von Zhao N. et al. [61] auf einen 1-1,5Mb großen

Abschnitt zwischen den Markern D5S479 und D5S500 eingegrenzt. Hingegen scheint ein telomer gelegener Abschnitt von ca. 3Mb Größe zwischen den Genen ADRB2 und IL12B für das eher benigne verlaufende 5q-Syndrom von Bedeutung zu sein.



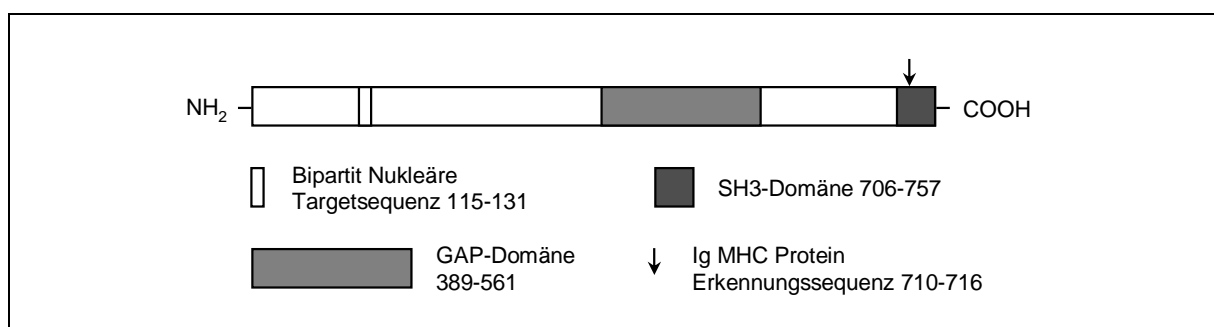
**Abbildung 1: Physikalische Karte der chromosomalen Region 5q31 modifiziert nach Jaju et al.**

### 1.5. Isolierung von AF5

AF5 konnte von S. Bojesen und A. Borkhardt anhand eines Einzelfalls mit der seltenen Translokation  $t(5;11)(q31;q23)$  bei einem Säugling mit Juveniler Myelomonozytärer Leukämie (JMML) isoliert werden. Translokationen mit Beteiligung der Region 11q23 werden zahlreich beschrieben und finden sich häufig bei akuten myeloischen und lymphatischen Leukämien, Lymphomen und gelegentlich auch bei soliden Tumoren [63, 64]. Sie sind in der Regel mit einer schlechten Prognose assoziiert. In dieser Region konnte von mehreren Autoren ein Gen lokalisiert und kloniert werden, welches in den meisten Fällen einer 11q23-Aberration rearrangiert ist [65, 66, 67, 68, 69]. MLL auch ALL-1, HRX, HTRX genannt, konnte in der Folge als Transkriptionsfaktor identifiziert werden und besitzt Homologie zu einem Entwicklungsgen (*trx*) von *Drosophila melanogaster*. Als Protoonkogen bildet es durch Translokation zahlreiche Fusionsgene, welche als Onkogene agieren können. Zurzeit (Stand August 2003) sind 61 wiederkehrende Translokationen mit Beteiligung von MLL und mehr als 35 verschiedene Partnergene bekannt [70, 71, 72]: AF-1p [73], AF-1q [74], LAF4 [75], AF3p21 [76, 77], GMPS [78], LPP [79], AF4/FEL [67, 80], AF5q31 [81], AF6q21 [82], AF5 $\alpha$  und AF6 [83, 84], AF9 [85, 86], AF9q34 [87], FBP17 [88], AF10 [89], ABI-1 [90], LCX [91], MLL-Duplikation [92], LARG [93], GPHN [94, 95], MPFYVE [96], AF15q14 [97], CBP [98, 99, 100, 101], GAS7 [102, 103], AF17 [104], LASP1, RAR- $\alpha$  [105], AF17q25/MSF [106,

107], ELL [23], EEN [108], ENL [109], hCDCrel [110], P300 [111], AFX1 [112, 113], SEPT2 [114] und SEPT6 [115].

S. Bojesen und A. Borkhardt beschreiben [116, 117] einen neuen MLL-Fusionspartner: AF5 oder humanes GRAF Gen (GTPase regulator associated with FAK). Ausgangspunkt ihrer Untersuchungen waren Southern Blot-Analysen mit einer cDNA-Probe von MLL, welche die Breakpoint Cluster Region umfasst [118]. Mit der FISH-Analyse konnten sie die Beteiligung von MLL bei der Translokation t(5;11)(q31;q23) beweisen. Schließlich gelang es ihnen mit RACE-PCR, von der bekannten MLL-Sequenz ausgehend, ein 350 bp großes Fragment des neuen MLL-Fusionsgens zu identifizieren. Dieses Fragment diente als Matrize spezifischer 3' und 5' RACE-PCR Untersuchungen mit cDNA der humanen Leukämiezelllinie K562 als Template. Sie konnten ein 3163 bp großes cDNA-Fragment klonieren, die Sequenz ist im Anhang 8.2 und in der EMBL-Datenbank unter „Accession number“ Y10388 zu finden. Die Sequenz vor dem Startkodon entspricht der „KOZAK-Sequenz“, CACCATGG, welche für die Einleitung der RNA-Translation erforderlich ist [119]. Der größte offene Leserahmen (ORF) beträgt 759 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz trägt zwischen Position 389 und 561 eine Guanosintriphosphat aktivierende Domäne (GAP-Domäne), am Carboxyterminus findet sich eine SH3-Domäne (Aminosäuren 706-757) sowie eine Immunglobulin-Erkennungssequenz (Aminosäuren 710-716) und am Aminoterminus eine nukleäre Targetsequenz (Aminosäuren 115-131).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung funktioneller Domänen in der Aminosäuresequenz von AF5**

## 2. Problemstellung der Arbeit

Im Rahmen der routinemäßig durchgeführten zytogenetischen Analyse von Knochenmarkproben an der Universitätskinderklinik Gießen wurde 1995 ein Säugling mit juveniler myelomonozytärer Leukämie, einer Form des MDS, und Translokation  $t(5;11)(q31;q23)$  identifiziert (Karotypisierung Dr. I. Loncarevic, Onkogenetisches Labor Gießen). Ausgehend von diesem Einzelfall wurden in der Arbeitsgruppe um Prof. A. Borkhardt (Hämatologisch-Onkologisches Forschungslabor der Universitätsklinik Gießen, Prof. A. Reiter) mehrere Fragestellungen bearbeitet. Für diese Arbeit sind folgende Aspekte von zentraler Bedeutung und unter anderem Hinweise, dass der Translokationspartner von Chromosom 11 auf 5q31 ein Tumorsuppressorgen (TS) sein kann:

1. Der Translokationspartner von Chromosom 11 betrifft die Region 5q31, die häufig bei Patienten mit MDS oder AML deletiert ist. In dieser chromosomalen Region wird seit langem ein TS vermutet.
2. Bojesen S. und Borkhardt A. konnten mit Hilfe der seltenen Translokation  $t(5;11)(q31;q23)$  ein neues MLL-Fusionsgen identifizieren und das Partnergen (AF5) auf 5q31 klonieren.
3. AF5 ist ein Homologon zu dem von Hildebrand J.D. et al. 1996 klonierten und charakterisierten tierischen GRAF-Gen [120]. Es besitzt eine potentiell anti-onkogene Funktion durch Inhibition von Zellwachstum und -proliferation.

Sollte es sich bei AF5 um ein TS handeln, ist nach dem „two hit“-Modell von Knudson die Inaktivierung beider AF5-Allele im Falle einer Tumorentstehung zu erwarten. Bojesen S. konnte bei 11 von 20 Patienten mit MDS/AML und zytogenetisch nachgewiesener Deletion eines AF5-Allels mit Southern Blot eine Abberation des verbleibenden AF5-Allels auf genomischer Ebene nachweisen [116].

---

Für diese Arbeit wurden zwei Ziele formuliert: Analyse der AF5-Expression und der AF5-cDNA-Sequenz zum Nachweis von Minormutationen im verbleibenden AF5-Allel. Im Einzelnen wurden folgende Teilaspekte erarbeitet:

1. Etablierung eines nicht-radioaktiven Northern Blot.
2. Expressionsanalyse von AF5 in verschiedenen humanen Geweben und Leukämiezelllinien.
3. Klonierung und Sequenzierung der cDNA von AF5 bei Patienten mit AML, der Zelllinie MUTZ-1 (MDS) und einer gesunden Kontrollperson.
4. Auswertung der gewonnenen Sequenzdaten und Vergleich mit der Referenzsequenz [116] auf Mutationen und Spleißvarianten.

## 3. Methoden

### 3.1. Untersuchungsmaterial

Für die cDNA-Sequenzanalyse von AF5 wurden kryokonservierte mononukleäre Knochenmarkzellen der zentralen Gießener Leukämiezellbank verwendet. Dort werden Proben aus mehr als 70 verschiedenen Kliniken in Deutschland gesammelt. Im Rahmen der Routinediagnostik wird im Referenzlabor für pädiatrische onkozytogenetische Analysen (Leiter: Prof. Dr. Harbott) der Karyotyp bestimmt. Die Patientenproben wurden nach der Diagnose (MDS/AML), welche auf klinischen, morphologischen, zytogenetischen, immunologischen Daten basiert, und dem zytogenetischen Nachweis einer 5q-Aberration ausgewählt.

Zur Bestätigung des „two hit“-Modells nach Knudson für AF5 untersuchten S. Bojesen und A. Borkhardt periphere Blut- oder Knochenmarkproben von 20 Patienten mit MDS/AML und zytogenetisch nachgewiesener Monosomie 5 oder 5q-Aberration. Sie konnten bei 13 der 20 Patienten mit FISH-Analyse die Deletion eines AF5-Allels nachweisen, bei 11 von 20 zeigten sich aberrante Banden im Southern Blot nach EcoRI- oder Hind III-Restriktionsverdau, 8 Patienten wiesen ein deletiertes AF5-Allel und AF5-Aberrationen im verbleibenden Allel auf. Die FISH-Analyse wurde mit dem P1-Klon L0649Q6 als Probe durchgeführt. Folgende Tabelle faßt die klinischen und zytogenetischen Daten der eingesetzten Blut- und Knochenmarkproben zusammen.

Nr.	Sex	Alter	Diagnose	Blasten	Karyotyp	Literatur 116, 117	
						Southern Blot	FISH- Signale
#1	m	12 J.	AML	75%	45;X0,del(5)(q14q34) 46;XY,del(5)(q14q34)	R	1
#2	m	84 J.	AML	35%	45;XY,-5,del(5)(q13q31), del(6)(q15)?,del(7)(p15) hsr(7),(q22q24?),hsr(11) (q13),add(14)(p11)- 20add(22)(p11)+r	R	1
#3	w	79 J.	AML	65%	54-55;XX,+X,del(5)(q13q31), +8,+10,+i(11q),add(12)(q24) +14,+18,+21,+22, t(9;11)(p21;q23)?	R	1
#4	w	63 J.	AML		47;XX,+del(5)(q13q33)	R	2
#5	w	67 J.	AML		48;XX,-12,-13,+20,-22, +4mar,del(5)(q12),6p+, del(7q),del(8)(p21),17q+	R	kein Mat.
K1	m	28 J.	gesund	nicht untersucht			
K2	m	32 J.	gesund	nicht untersucht			

**Tabelle 2: Daten zu den Patientenproben und den Kontrollen**

**Zusammenfassung der klinischen und zytogenetischen Daten der Patienten mit 5q-Aberration (#1-#5) und der gesunden Kontrollpersonen (K1, K2). Southern Blot und FISH-Analyse nach S. Bojesen und A. Borkhardt (Literaturangabe 116, 117), R = rearrangiert. Das Geschlecht wurde mit weiblich (w) und männlich (m), das Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in Jahren angegeben. Die Spalte Blasten zeigt den Anteil an Blasten in der Knochenmarkprobe an.**

Die Patientenproben #1, #2, #3 und #5 besitzen komplexe Karyotypveränderungen. In den Proben #1, #2 und #3 ist mit der FISH-Analyse der Verlust eines AF5-Allels nachgewiesen. Für Probe #5 lag kein Untersuchungsmaterial zur Durchführung der FISH-Analyse vor. Die Probe #4 weist im Gegensatz zu den anderen nur eine einfache Karyotypanomalie in Form einer interstitiellen Deletion im Bereich von 5q auf, bei der

jedoch die Bande 5q31 beteiligt ist. In der FISH-Analyse wurden zwei Signale detektiert. K1 und K2 sind gesunde Kontrollpersonen, bei denen mononukleäre Zellen aus peripherem Blut gewonnen wurden. Für die Sequenzanalyse von AF5 wurde cDNA der Proben #1-#4 und K1 kloniert. Die Proben #5 und K2 wurden zur Direktsequenzierung von PCR-Fragmenten eingesetzt.

Bei der Methodenetablierung und Expressionsanalyse von AF5 kamen verschiedene permanente humane Leukämiezelllinien zum Einsatz. Alle Zelllinien weisen komplexe Karyotypveränderungen auf.

Zelllinie	Zelltyp	5q-Aberration	Literatur
HL-60	Akute myeloische Leukämie (FAB M2)	-5	121
REH	B-Zell Vorläufer Leukämie	-5	122
NALM-6	B-Zell Vorläufer Leukämie	t(5;12)(q33.2;p13.2)	123
K-562	Chronisch myeloische Leukämie in Blastenkrise	nein	124
JOSK-I	Histiozytäres Lymphom	t(1;5)(p21.1;q23)	125
MUTZ-1	Myelodysplastisches Syndrom	del(5)(q13/q33)x1-2	126
MONO-MAC-6	Akute monozytäre Leukämie (AML FAB M5)	nein	127
ML-2	Akute myelomonozytäre Leukämie (AML FAB M4)	nein	128
THP-1	Akute monozytäre Leukämie	nein	129
MV4-11	Akute monozytäre Leukämie (AML FAB M5)	nein	130
CCEM-SENSIBEL	Akute lymphatische Leukämie	nein	131

**Tabelle 3: Zusammenstellung der verwendeten permanenten Leukämiezelllinien**

Die Zelllinien wurden bis auf CCEM-SENSIBEL über die Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen Braunschweig (DSMZ) bezogen. Im Literaturhinweis [132] sind detaillierte Informationen zu Zelltyp, Herkunft, Morphologie, Zytogenetik, Immunologie und jeweiligem Erstbeschreiber zu finden. Die Zelllinien wurden in



Dimethylsulfoxid (Merck, Darmstadt) unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum und Begasung mit 5% Kohlendioxid im eigenen Zellkulturlabor des Onkogenetischen Labors kultiviert.

Hervorzuheben ist die Zelllinie MUTZ-1, bei der wie bei den oben aufgeführten Patientenproben die komplette cDNA von AF5 sequenziert wurde. Die Zelllinie MUTZ-1 wurde 1996 von K. Steube et al. aus peripherem Blut eines 5-jährigen Mädchens mit MDS (FAB RAEB) etabliert [126]. Das Myelodysplastische Syndrom entwickelte sich aus einer bereits bestehenden Fanconi Anämie und schritt rasch zu einer Akuten Myeloischen Leukämie (FAB M2) fort. Die Zellen besitzen immunologische Prä-B-Zell-Marker (CD10+, CD19+, cyIgM+) und einen komplexen Karyotyp:

nahezu-triploider Karyotyp mit 12% Polyploidy; 68(68-73)<3n>X; der(X),-X,add(1)(p11), der(2)t(2;?11)(q22;q23),der(3)t(3;5)(q27;q14)t(5;22)(q35;q12)x2,del(3)(p11),del(3)(q11), del(5)(q13/q33)x1-2,der(6)t(3;6)(p23;p21.2)x2,der(7)t(7;11)(q35;q13),der(8)t(1;8)(q11;q24),add(9)(q34),del(9)(p13),der(14)t(14;?)(q23;?),der(14)t(14;?)(p11;?)t(1;?)(q11;?),add(14)(p11),der(15)t(5;15)(p13;p11)x2,der(16)t(7;16)(q21.1;q24),add(18)(p11), add(21)(p11); 1q11Rearrangements wie bei transformierender Fanconi Anämie. In der AF5 spezifischen FISH-Analyse wurden drei Signale detektiert [116].

### 3.2. RNA-Isolation

Die Gesamt-RNA aus permanenten Leukämiezelllinien wurde nach Chomczynski und Sacchi [133, 134] mit einer modifizierten Ein-Schritt-Methode isoliert. Ca.  $5-10 \times 10^6$  Zellen wurden in 1ml TRIzol-Reagens (Firma GibcoBRL, Life Technologies™) suspendiert. Das Reagens enthält in homogener Lösung Guanidinisothiozyanat und Phenol. Die denaturierenden Eigenschaften der Lösung zerstören zelluläre Membranen und verhindern gleichzeitig den enzymatischen Abbau der freigesetzten RNA durch ubiquitär vorkommende Ribonukleasen. Nach Zusetzen von 200 µl Chloroform und Zentrifugation (<12000 g, 15 min., 4 °C) trennt sich das Gemisch in eine wässrige RNA-haltige Phase und eine organische Phase, in der Proteine und DNA enthalten sind. Die wässrige Phase wurde abpipettiert und die RNA mit 500 µl Isopropanol gefällt. Das gelartige Pellet wurde mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert. Zur Quantifizierung der RNA-Menge wurde das Pellet nach Dekantieren des Ethanols und Lufttrocknen in 20 µl Wasser aufgenommen, ein Teil

davon 1/50 verdünnt und im Spektrofotometer (DU 64, Beckmann, München) die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Entsprechend der Annahme, dass ein Absorptionswert von 1 einem RNA-Gehalt von 40 mg/ml wässriger Lösung entspricht konnte die Konzentration der Ausgangslösung geschätzt werden. Der Ertrag an Gesamt-RNA pro Isolation schwankte zwischen 10-80 µg.

### **3.3. Isolation der Boten-RNA (mRNA)**

Die Isolation und Reinigung der mRNA aus der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe von Polystyren-Latex-Partikeln [135]. Diese sind kovalent mit dem 5'-Ende eines Oligonukleotid, bestehend aus 30 Thymidinresten (Oligo-(dT)30), gekoppelt (Oligotex, Firma Qiagen, Hilden). Durch 10-minütige Inkubation der in Wasser gelösten Gesamt-RNA bei hohen Salzkonzentrationen (10 mM Tris-HCL pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% SDS) kommt es zur Hybridisierung zwischen den Poly-Adenosin-Enden der mRNA und den Oligo-(dT)30-Resten. Durch Zentrifugation und Dekantieren des Überstandes wurden die Struktur-RNAs (Ribosomale und Transfer-RNA) aus dem Gemisch entfernt. Die gebundene mRNA wurde bei niedriger Salzkonzentration (5 mM Tris-HCl, pH 7,5) und Erwärmen auf 70 °C eluiert. Aus 50-100 µg Gesamt-RNA konnten ca. 1,5-3 µg mRNA isoliert werden.

### **3.4. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)**

Die RNA wurde mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (SuperScript™ Reverse Transcriptase, GIBCO BRL, USA), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben [136]. Für alle Polymerasekettenreaktionen, bei denen cDNA als Ausgangsmaterial diente, wurde 1,5-2 µg isolierte RNA revers transkribiert. Die Reaktion wird durch Hexanukleotide vielfältiger Sequenzkombinationen gestartet, die zufällig an unterschiedlichen Stellen der RNA hybridisieren.

Folgender Reaktionsansatz wurde in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$  angesetzt:

Reagenzien	Volumen ( $\mu\text{l}$ )	Endkonzentration
RT-Puffer, 5 fach	4,0	1 fach
Dithiothreitol (0,1 M)	2,0	10 mM
dATP, dGTP, dCTP, dTTP (8 mM)	je 1,0	je 400 $\mu\text{M}$ dNTP
Random Primer (100 $\mu\text{M}$ )	1,0	5 $\mu\text{M}$
RNAse-Inhibitor (40 U/ $\mu\text{l}$ )	1,0	2 U/ $\mu\text{l}$ (40 U)
Reverse Transkriptase (200 U/ $\mu\text{l}$ )	1,0	10 U/ $\mu\text{l}$ (200 U)
RNA	7,0	1,5-2 $\mu\text{g}$
Gesamt	20,0	

**Tabelle 4: Reaktionsansatz Reverse Transkription**

Um Sekundärstrukturen zu lösen wurde die isolierte RNA bei 65  $^{\circ}\text{C}$  für fünf Minuten denaturiert. Die cDNA-Synthese erfolgte bei 37  $^{\circ}\text{C}$  über eine Stunde.

### 3.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein zyklisches Verfahren aus drei aufeinander folgenden temperaturabhängigen Reaktionsschritten zur exponentiellen in vitro Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte [137, 138]. Ein Zyklus setzt sich aus folgenden Schritten zusammen:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Matrize zu Einzelsträngen bei 94  $^{\circ}\text{C}$ .
2. Anlagerung (Annealing) der Amplimere (Primer) bei 50-72  $^{\circ}\text{C}$ .
3. DNA-Synthese ausgehend von den Amplimeren mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase bei 72  $^{\circ}\text{C}$ .

Die Primer sind 15-30 bp lange Oligonukleotide, die komplementär zur amplifizierenden DNA-Sequenz am Sense- und Antisensestrang hybridisieren. Für ihre Synthese sind Kenntnisse über die Ziel-DNA Voraussetzung. Die Annealingtemperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der zu erwartenden Doppelhelix. Sie liegt etwa 5  $^{\circ}\text{C}$  unter  $T_m$  und wird im Wesentlichen von der Länge und dem G/C-Gehalt der Primer bestimmt. Sie wurde für die verwendeten PCR Protokolle empirisch ermittelt.

Die DNA-Synthese erfolgt mit dem hitzestabilen Enzym „Taq-DNA-Polymerase“ aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*. Es katalysiert die Primerverlängerung durch

kovalente Bindung der vier „DNA-Bausteine“ (die Desoxynucleotridtriphosphate: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) an den 3'-Enden komplementär zur Matrize. Zu Beginn der Kettenreaktion mit geringer Produktmenge und hoher Enzymaktivität kommt es in jedem Zyklus zu einer Verdopplung der Ziel-DNA. Mit Abnahme der Enzymaktivität und Anhäufung des PCR-Produkts nach mehreren Zyklen geht die exponentielle Amplifikationsphase in eine lineare und schließlich in eine Plateauphase ohne nennenswerte Neusynthese über. In 30 Zyklen werden etwa  $10^5$ - $10^9$  Kopien der DNA-Matrize vervielfältigt.

Ein Standard-Ansatz der PCR mit 50  $\mu$ l Reaktionsvolumen setzt sich wie folgt zusammen:

Reagenzien	Volumen ( $\mu$ l)	Endkonzentration
Reaktionspuffer, 10 fach konz.	5,0	1 fach
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5	1,5 mM
dATP, dCTP, dGTP, dTTP (8 mM)	je 1,0	je 160 $\mu$ M
Sense und Antisense Primer (20 $\mu$ M)	je 1,0	je 0,4 $\mu$ M (20 pmol)
Taq-Polymerase	variabel	2,5 U/50 $\mu$ l
Template-DNA	variabel	50-100 ng
steriles, bidest H <sub>2</sub> O	add 50	
Gesamt	50	

**Tabelle 5: Reaktionsansatz Standard-PCR**

Für die weiter unten beschriebene Synthese digoxigeninmarkierter cDNA-Sonden und die Amplifikation der AF5-cDNA-Fragmente wurden die Spezifität und Sensitivität der Standard-PCR erhöht, indem zwei PCRs hintereinander ausgeführt wurden („nested-PCR“). Im zweiten Lauf wurde ein Mikroliter 1:1000 verdünnten PCR-Produkts des ersten Durchganges als Matrize eingesetzt. Die Primer des zweiten Laufes wurden so gewählt, dass sie strangabwärts der im ersten Lauf amplifizierten DNA-Sequenzen hybridisieren. Ferner kam eine modifizierte DNA-Polymerase (Taq Gold™, Perkin-Elmer, New Jersey, USA), die erst durch Erhitzen auf 92-95°C aktiviert wird, zum Einsatz. Dadurch kann eine unspezifische DNA-Synthese durch fehlgebundene Primer bei Raumtemperatur unterdrückt werden.

Die Primerauswahl und Anpassung der Zyklusbedingungen erfolgte empirisch nach allgemeinen Grundsätzen [139]:

1. Vermeidung komplementärer 3'-Enden von Sense- und Antisense-Primern
2. G/C-Gehalt von 55-60 % und nahezu gleiche Schmelztemperaturen
3. Vermeidung von Primersekundärstrukturen und Palindromen Sequenzen
4. Vermeidung tandemförmiger Wiederholungen von einem oder mehreren Nukleotiden

Die Amplimere wurden von einem kommerziellen Anbieter (Roth, Karlsruhe) bezogen.

### **3.6. Reinigung des PCR-Produkts**

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden vor der weiteren Verarbeitung, z.B. Direktsequenzierung oder Klonierung, mit Hilfe des QIAquick Spin Kits (Qiagen, Hilden) gereinigt. Grundlage der Reinigungsprozedur sind kleine Separationssäulen, welche eine Silicat-Gel Membran besitzen. Die DNA bindet abhängig von der Osmolarität und dem pH-Wert an die Membran, kann so von Verunreinigungen getrennt werden und anschließend in Tris-Puffer oder Wasser wieder gelöst werden. Die Reinigungsprozedur wurde nach Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde in 50 µl sterilem Aqua bidest gelöst und anhand der Lichtabsorption bei 260 nm in einem Spektrofotometer quantifiziert. Ein Absorptionswert von 1 entspricht 50 µg/ml DNA.

### **3.7. Agarosegel-Elektrophorese**

DNA besitzt in wässriger Lösung ein negativ geladenes Zucker-Phosphat-Gerüst. Im elektrischen Feld wandern die Moleküle in Richtung des positiven Pols, der Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit im Agarosegel, welches je nach Agaroseanteil ein unterschiedlich dichtes Porensystem darstellt, hängt weitgehend von der Größe der DNA-Moleküle ab. Je kürzer ein DNA-Fragment ist, desto schneller wird es durch das Gel bewegt. Die Agarosegel-Elektrophorese ermöglicht somit die Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe [140].

Es wurden Gele, je nach erwarteter Fragmentlänge, mit einem unterschiedlichen Agaroseanteil hergestellt. Fragmente in der Größenordnung <1 kb, 1-5 kb und >5 kb wurden in 2 %, 1,5 % bzw. 1 % Agarosegelen fraktioniert. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1 fach TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst. Die Proben und ein DNA-

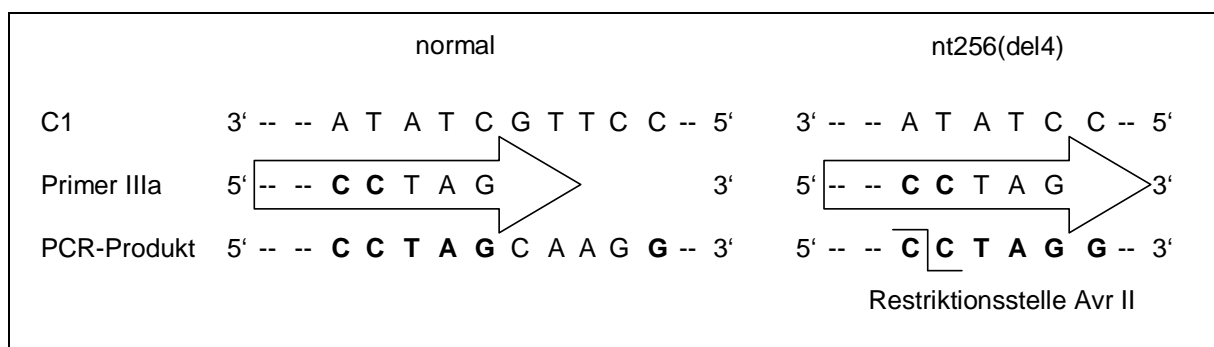
---

Längenstandard wurden mit Blaumarker gemischt und getrennt in die Taschen des gehärteten Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte entsprechend des Agaroseanteils bei 80-120 Volt Spannung mit TAE als Puffersystem. Im Anschluss wurde die DNA in einem 0,1 % Ethidiumbromid-Wasserbad für ca. 10 Minuten gefärbt und durch Fluoreszenz mit einer 312 nm UV-Lampe sichtbar gemacht. Im Vergleich mit dem DNA-Längenstandard konnte die Länge der getrennten Fragmente abgeschätzt werden. Zur Dokumentation wurde mit einer Sofortbildkamera (Polaroid MP-4 Land, Polaroid Typ 667 schwarzweiß Land Film, Kodak Orangefilter Nr. 22) ein Foto angefertigt.

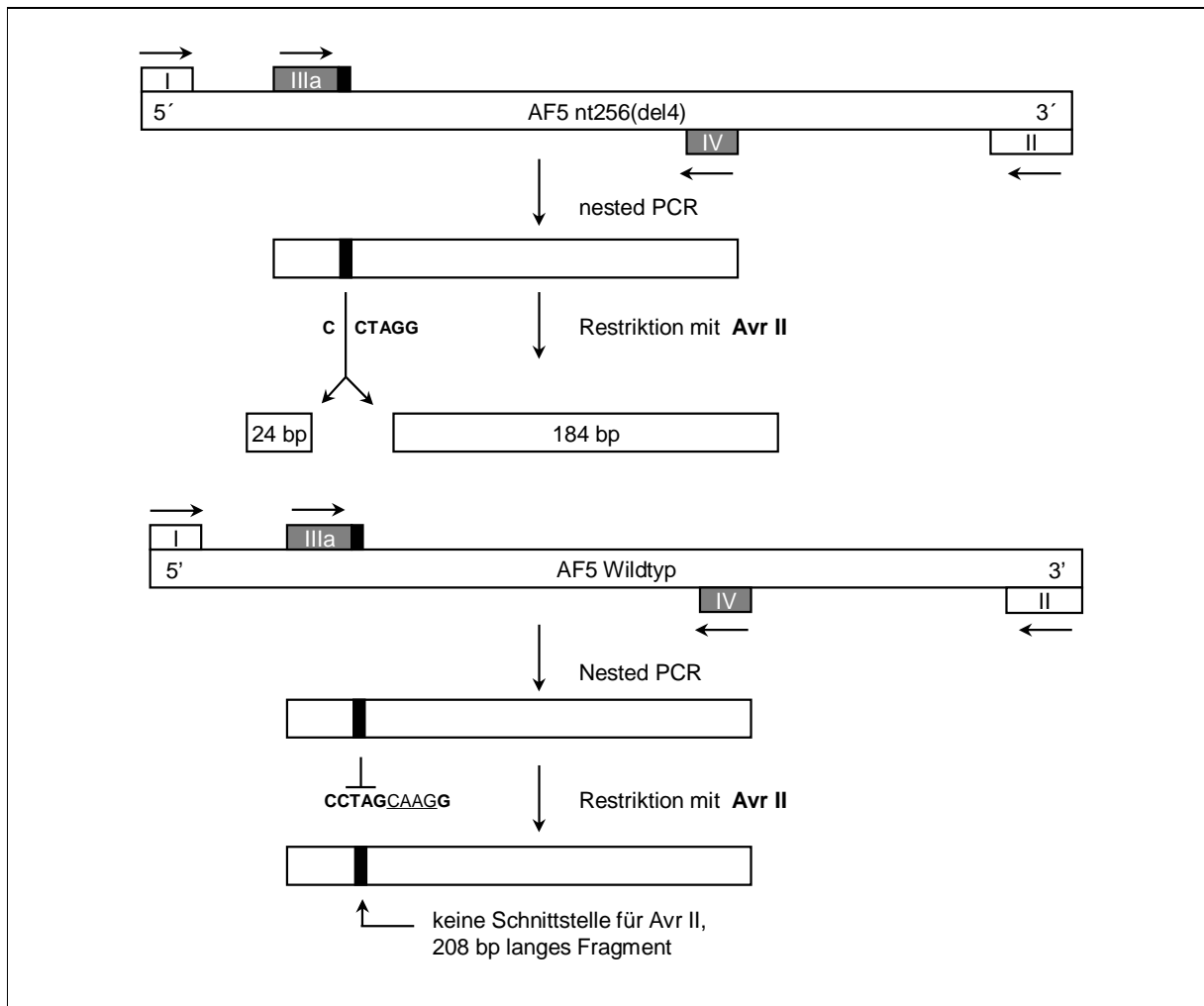
### 3.8. PCR-Mutagenese

Mit der PCR können gezielt Punktmutationen in ausgewählte Sequenzabschnitte eingebracht werden. Für die spezifische Amplifikation einer DNA-Sequenz mit PCR ist eine korrekte Basenpaarung am 3'-Ende der Primer erforderlich. Strangaufwärts kann die Primersequenz von der Matrize in einzelnen Nukleotiden abweichen ohne die Synthese des gewünschten PCR-Fragments zu stören. Mit Hilfe der PCR-Mutagenese konnte ein Screening-Test zum Nachweis einer Deletion von 4 bp in AF5-Klonen entwickelt werden.

Im Fragment C1 von Patient #1 wurde mit DNA-Sequenzierung eine Deletion von 4 bp an Position 256-259 (nt256del4) entdeckt. Um weitere C1-Klone auf diese Mutation hin zu untersuchen, wurde mit PCR-Mutagenese eine künstliche Restriktionsstelle erzeugt. Der Sense-Primer (IIIa) besitzt kurz vor dem 3'-Ende zwei Fehlpaarungsstellen, Abbildung 3. Während der PCR werden das aberrante und das normale C1-Fragment vervielfältigt. Durch Austausch der Nukleotide AT in CC enthält das PCR-Produkt der aberranten Sequenz eine Restriktionsschnittstelle für AvrII (CCTAGG) und wird in ein 184 bp und ein 24 bp Fragment gespalten. Mit Elektrophorese können die geschnittenen 184 bp großen von den nicht-geschnittenen 208 bp großen Fragmenten differenziert werden, Abbildung 4. Zur Kontrolle wurde die PCR mit Primer IIIb durchgeführt wobei in den amplifizierten Fragmenten kein Nukleotidaustausch hervorgerufen wird. Weder das PCR-Produkt mit noch ohne die Deletion werden von Avr II geschnitten. Die Primersequenz von IIIa und IIIb sind im Anhang 8.1.3. aufgeführt.



**Abbildung 3: PCR-Mutagenese zur Differenzierung von AF5-Fragmenten mit und ohne Deletion nt256(del4)**



**Abbildung 4: Differenzierung der Fragmente nach PCR-Mutagenese und Restriktionsverdau mit Avr II**

### 3.9. Northern Blot mit nicht-radioaktivem Detektionsverfahren

Ein wesentliches Anliegen vorliegender Arbeit war die Etablierung eines nicht-radioaktiven Northern Blots zur AF5-Expressionsuntersuchung. Der Northern Blot ist eine vom Southern Blot abgeleitete Methode zur Analyse von RNA. Zunächst muss aus verschiedenen Zelltypen Gesamt- oder mRNA isoliert werden. Die RNA wird in einem denaturierenden Gel der Größe nach fraktioniert. Die fraktionierten RNA-Moleküle werden auf eine Membran übertragen, fixiert und mit markierten Nukleinsäuresonden, welche komplementär zur gesuchten Ziel-RNA sind, hybridisiert. Wesentliche Unterschiede zwischen Southern und Northern Blot sind:

- die Ziel-Nukleinsäure beim Northern Blot ist RNA und keine DNA



- die Ziel-DNA beim Southern Blot muss vor Analyse mit einem oder mehreren Restriktionsendonukleasen geschnitten werden
- die Ziel-RNA beim Northern Blot ist einzelsträngig, durch intramolekulare Basenpaarung können sich Sekundärstrukturen ausbilden, dies erfordert zur korrekten elektrophoretischen Fraktionierung denaturierende Bedingungen.

Mit dem Northern Blot wird das Expressionsmuster eines spezifischen Gens in verschiedenen Zelltypen und Geweben untersucht. Es können Aussagen darüber gemacht werden in welchen Zelltypen und wie stark ein Gen exprimiert wird. Transkripte mit unterschiedlichem Molekulargewicht können differenziert werden und zeigen den Gebrauch alternativer Promotoren, Spleiß- oder Polyadenylierungsstellen an [141].

Im klassischen Northern Blot-Verfahren werden radioaktiv markierte Sonden zur Detektion der Ziel-RNA eingesetzt, womit gewisse Nachteile verbunden sind. Die Sonden sind zeitlich begrenzt haltbar. Es sind besondere räumliche Bedingungen und Vorsichtsmaßnahmen im Umgang mit dem radioaktiven Material notwendig, damit eine Gesundheitsgefährdung vermieden werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb eines der neueren nicht-radioaktiven Detektionsverfahren mit Digoxigenin markierten Sonden eingesetzt [142].

Das angewandte Protokoll ist in fünf Schritte unterteilt und wurde zunächst nach Empfehlungen des „DIG System User's Guide for Filter Hybridization“ von Roche durchgeführt [143]: a) Synthese digoxigeninmarkierter Hybridisierungssonden b) Elektrophorese der Ziel-RNA, c) RNA-Transfer vom Agarosegel auf Nylonmembranen (Northern Blotting), d) Hybridisierung, e) Detektion.

### **3.9.1. Besonderheiten bei der Arbeit mit RNA**

Ubiquitär vorkommende Ribonukleasen führen zur Degradierung von RNA. Lösungen, Glaswaren, Kunststoffwannen und die Elektrophoresekammer wurden daher vor Benutzung speziell behandelt. Das verwendete Aquabidest wurde 1:10 mit einer DMPC-Stocklösung (50% Ethanol, 1% DMPC) gemischt und ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend autoklaviert. Alle Puffer und Lösungen wurden mit DMPC behandeltem Aquabidest angesetzt. Alle Glaswaren bei 240 °C für 4 Stunden ausgebacken. Der Elektrophoresetank wurde mit 0,5 % SDS gewaschen, anschließend mit Wasser gespült und mit Ethanol getrocknet. Vor Gebrauch wurde der

Tank mit 3 % Wasserstoffperoxydlösung gefüllt und nach 10 Minuten mit DMPC behandeltem Aquabidest gespült. Die Plastikwannen wurden mit einer Reinigungslösung (0,1 N NaOH, 1 mM EDTA) behandelt.

### **3.9.2. Synthese digoxigeninmarkierter Sonden**

Nicht-radioaktive Sonden können mit Reportermolekülen wie BrdU [144], Biotin [145] und Digoxigenin [146, 147] markiert werden. In der Nachweisreaktion bindet ein spezifischer Antikörper oder ein anderer Ligand (z.B. Avidin), der eine hohe Affinität zum Reportermolekül besitzt. Die Affinitätsgruppe ist mit einem Enzym oder Fluoreszenzfarbstoff konjugiert, welche die Heteroduplices aus Ziel-DNA/RNA und Sonde sichtbar macht.

Digoxigenin ist ein Pflanzensteroid aus Digitalispflanzen. Für die Markierung von DNA- oder RNA-Sonden ist es über eine Kette von 11 Atomen kovalent mit dUTP bzw. UTP verbunden. In enzymabhängigen Reaktionen wie Nick-Translation, „Random primed DNA Labelling“, PCR oder in vitro Transkription kann das modifizierte Nukleotid in die Sonde eingebaut werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden cDNA-Sonden mit der PCR hergestellt. Im Reaktionsansatz sind die vier Desoxynukleotide dATP, dGTP, dCTP, dTTP und das DIG-markierte Desoxyuridin enthalten (DIG-dUTP). Das dTTP und DIG-dUTP sind in einem Verhältnis von 65:35 dem Ansatz hinzugegeben. Dies ermöglicht eine hohe Syntheserate und führt zur Markierung ungefähr jeder 25. Base [142]. Der in der Nachweisreaktion eingesetzte Anti-Digoxigenin-Antikörper deckt mit einem Molekulargewicht von 750 KD ungefähr 20 Basen ab. Eine höhere Markierungsrate ist somit nicht notwendig. Die Sondensynthese wurde mit dem kommerziell erhältlichen PCR DIG Probe Synthesis Kit von Roche durchgeführt.

Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes und die PCR-Zyklusbedingungen sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

Reagenzien	Volumen ( $\mu\text{l}$ )	Endkonzentration
PCR Puffer mit $\text{MgCl}_2$ , 10 fach konzentriert	5,0	1 fach
PCR DIG-Mix, 10 fach konzentriert: dATP, dCTP, dGTP (2 mM); 1,3 mM dTTP und 0,7 mM DIG-11-dUTP	5,0	200 $\mu\text{M}$ dATP, dCTP, dGTP, 130 $\mu\text{M}$ dTTP, 70 $\mu\text{M}$ DIG-11-dUTP
Sense und Antisense Primer (20 $\mu\text{M}$ )	je 1,0	0,4 $\mu\text{M}$ (20 pmol)
Enzym-Mix, Expand High Fidelity; 3,5 U/ $\mu\text{l}$	0,7	0,05 U/ $\mu\text{l}$ (2,5 U)
Template: Plasmid-DNA (10-100 pg) bzw. 1:1000 verdünntes PCR-Produkt	1,0	
steriles, bidest $\text{H}_2\text{O}$	36,3	
Gesamt	50,0	

Zyklus	Phase	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	95 $^{\circ}\text{C}$	2 min.
2-31	Denaturierung	95 $^{\circ}\text{C}$	20 sek.
	Anlagerung	65 $^{\circ}\text{C}$	30 sek.
	Verlängerung	72 $^{\circ}\text{C}$	60 sek.
32	Verlängerung	72 $^{\circ}\text{C}$	7 min.
33	Kühlung	4 $^{\circ}\text{C}$	

**Tabelle 6: Reaktionsansatz und PCR-Zyklusbedingungen für die Synthese digoxigeninmarkierter DNA-Sonden**

Es wurde eine 292 bp große ENX-1 cDNA-Sonde und eine 447 bp große AF5-cDNA-Sonde hergestellt. Das ENX-1 Gen wird in Kapitel 3.9.8 beschrieben. Die Sequenzen der Primer, ihre genaue Position in der cDNA von ENX-1 und AF5 und die Fragmentlänge des PCR-Produktes sind im Anhang 8.1.1 zusammengestellt. Für die ENX-1 Sonde wurde eine „nested“ PCR-Reaktion angewandt. Matrize der Markierungsreaktion war 1 $\mu\text{l}$  1:1000 verdünnten PCR-Produkts des 1. Laufes. Die Primer begrenzen einen Abschnitt der cDNA-Sequenz zwischen Basenpaar 1679 und

1969, der für eine cysteinreiche Domäne (CXC-Domäne) des Proteins kodiert. Der GC-Gehalt der Sonde beträgt 50%.

Die AF5-Sonde ist komplementär zum größten Teil der GAP-Domäne zwischen Nukleotid 1301 bis 1747 in der cDNA-Sequenz. Als Matrize diente 10-100 pg Plasmid-DNA eines AF5-cDNA-Klons. Die AF5-Sonde besitzt einen GC-Gehalt von 46%.

### **3.9.3. Formaldehyd-Agarosegel-Elektrophorese**

Die Elektrophorese wurde nach einem modifizierten Protokoll von Roche Customer Service durchgeführt [148].

Um die einzelsträngigen RNA-Moleküle unter denaturierenden Bedingungen zu fraktionieren, wurde ein Gel mit einem Anteil von 1 % Agarose und 2 % Formaldehyd hergestellt. Für 100 ml Agarosegel wurde 1 g Agarose in 94,6 ml MOPS-Puffer durch Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen im Wasserbad auf ca. 60 °C erfolgte die Zugabe von 5,4 ml 12,3 M (37 %) Formaldehyd zu einer Endkonzentration von 0,66 M (2 %) [149].

Die isolierte Boten- bzw. Gesamt-RNA wurde mit Isopropanol und Na-Acetat gefällt und anschließend in zwei Schritten mit 100 % und 75 % Ethanol gewaschen [150]. Nach kurzem Lufttrocknen wurde die RNA in 20 µl Ladepuffer aufgenommen. Der Ladepuffer wurde mit 250 µl deionisiertem Formamid, 83 µl Formaldehyd (37 %), 50 µl 10 fach MOPS-Puffer und 0,01 % Bromphenolblau hergestellt. Die Proben wurden 10 Minuten bei 65 °C im Heizblock denaturiert und danach sofort in Eiswasser abgekühlt. Um eine Reaktion zwischen Formamid und Formaldehyd während der Lagerung zu verhindern, wurde der RNA-Ladepuffer für jede Elektrophorese neu angesetzt.

Das gehärtete Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und 1 fach MOPS-Laufpuffer bis zur Geloberkante eingefüllt. Es folgte ein 5-minütiger Vorlauf des unbeladenen Gels mit 5 V/cm [150]. Danach Auftragen der Proben sowie des RNA-Längenmarkers II (Roche) und ein weiterer Vorlauf bis die Gelschlitze vollständig entleert waren. Nach Aufschütten von Laufpuffer bis über Gelniveau und erfolgte die Elektrophorese über Nacht (ca. 15-18 Stunden) mit 2 V/cm.

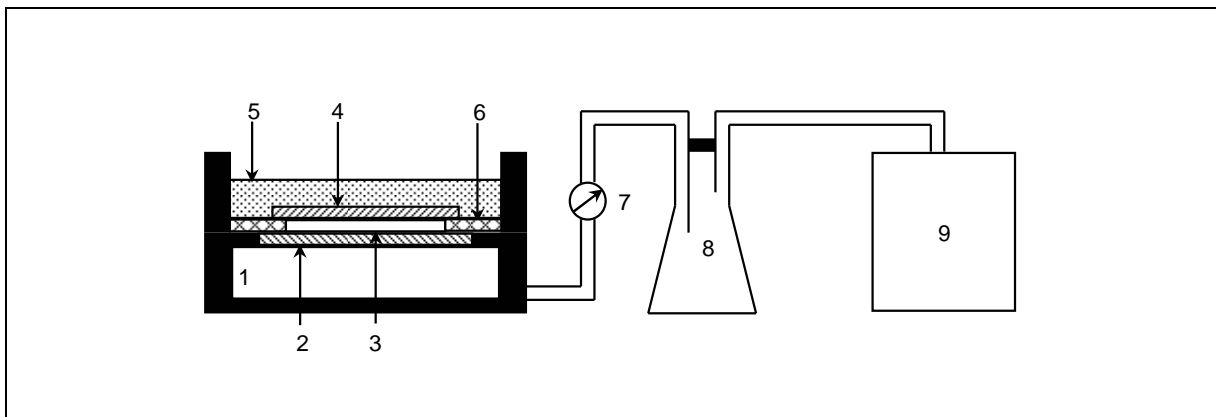
### **3.9.4. RNA-Transfer (Northern Blot)**

Der vertikale RNA-Transfer vom Agarosegel auf positiv geladene Nylonmembranen (Roche) erfolgte mit einer Vakuumbloktkammer (Keuz, Gießen) [151, 152]. Es wurden

Nylonmembranen gegenüber Nitrozellulosemembranen bevorzugt, da sie weniger empfindlich sind, stärkere Bindungseigenschaften für Nukleinsäuren aufweisen und bei Einsatz der Chemolumineszenz als Detektionsverfahren eine Signalverstärkung bewirken [142].

Das Gel wurde zunächst zweimal 15 Minuten in 20 fach SSC inkubiert, um Formaldehydreste zu entfernen. Die Nylonmembran wurde mit Wasser befeuchtet und mittig auf der Teflonplatte der Vakuumblokkammer positioniert. Nach Auflegen des Dichtungsgummis und des Gels wurde langsam ein Unterdruck aufgebaut. Nun konnte 20 fach SSC bis über Gelniveau nachgefüllt werden. Der Transfer erfolgte für 3 Stunden bei minus 60 bis 80 mbar Unterdruck.

Die RNA wurde durch Ultraviolettbestrahlung mit  $1,2 \text{ kJ/m}^2$  (Stratalinker UV Crosslinking) kovalent an der Membran fixiert, im Anschluss mit Wasser gespült um SSC-Reste zu entfernen und luftgetrocknet. Durch UV-Crosslinking kann bei Detektion digoxigeninmarkierter DNA-Sonden die Signalintensität im Vergleich zur Backmethode und Alkalifixierung erhöht werden [153].



**Abbildung 5: Aufbau der Vakuumblokkammer für den RNA-Transfer vom Agarosegel auf Nylonmembranen**

**Blotaufbau im Längsschnitt dargestellt. Über die Elektropumpe wird in der Blokkammer ein Unterdruck von 60-80 mbar erzeugt. 1 Blokkammer, 2 Teflonplatte, 3 Nylonmembran, 4 Agarosegel, 5 SSC, 6 Dichtungsgummi, 7 Barometer, 8 Überlaufgefäß, 9 Elektropumpe**

### 3.9.5. Hybridisierung

Intention der molekularen Hybridisierung ist die Ausbildung von Heteroduplexen zwischen markierter Sonde und Ziel-Nukleinsäure. Damit wird es möglich aus einer

heterogenen Sequenzpopulation diejenigen zu identifizieren, die zur Sonde komplementär sind.

Die Stabilität von Nukleinsäurehybriden ist von mehreren Parametern abhängig [40]:

- Temperatur
- Basenzusammensetzung (Anzahl der GC-Paare) und Grad der Homologie
- Zusammensetzung der Hybride (DNA:DNA, DNA:RNA, RNA:RNA)
- chemische Umgebung: monovalente Kationen stabilisieren, Formamid oder Harnstoff destabilisiert
- Länge der Nukleinsäurestränge

Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) ist ein Maß für die Stabilität von doppelsträngigen Nukleinsäuren. Es ist die Temperatur, bei der Nukleinsäuredoppelstränge in die einzelsträngige Form übergehen. Da die Lichtabsorption von einzelsträngigen Nukleinsäuren bei UV-Licht von 260 nm zunimmt, kann  $T_m$  spektrofotometrisch bestimmt werden. Für RNA/DNA- und RNA/RNA-Hybride gilt:

$$T_m (\text{°C}) = 79,8 + 18,5(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,58(\% \text{ GC}) + 11,8(\% \text{ GC})^2 - (820/L)$$

[Na<sup>+</sup>] = Natriumionenkonzentration in mol pro Liter

% GC = Anteil der GC-Paare des gebildeten Hybrids

L = Länge der Doppelhelix in Basenpaaren

Ein Prozent Formamid in der Hybridisierungslösung senkt die  $T_m$  um ca. 0,6 °C und 6 M Harnstoff um etwa 30 °C.

Die Reassoziationskinetik zweier einzelsträngiger komplementärer Nukleinsäuren hängt hauptsächlich von der Konzentration (mol Nukleotide pro Liter) einer bestimmten Nukleinsäuresequenz und der Reaktionszeit ab, wenn die Natriumionenkonzentration und Temperatur konstant gehalten werden. Um die Bildung gewünschter Heteroduplices zu erleichtern, muss die stark heterogene Ziel-Nukleinsäure, die eventuell nur wenige komplementäre Sequenzen enthält, im Überschuss vorhanden sein.

Die heterogene Sequenzpopulation beim Northern Blot ist RNA, welche auf der Nylonmembran fraktioniert und fixiert vorliegt. Hybridisiert wurde mit DIG-markierten cDNA- und RNA-Sonden.

Zunächst wurde nach dem Protokoll des „DIG System User's Guide for Filter Hybridization“ von Roche vorgegangen. Es wurde der kommerziell erhältliche Hybridisierungspuffer DIG Easy Hyb (Roche) eingesetzt. Dieser Puffer wurde speziell für

die Hybridisierung nicht-radioaktiver Sonden entwickelt und enthält als denaturierendes Agens Harnstoff. Nach Angaben des Herstellers kann er analog zu Puffern mit einem Anteil von 50% Formamid eingesetzt werden. Für DNA:RNA-Hybride wird eine Sondenkonzentration von 25 ng DNA/ml bei 50 °C Hybridisierungstemperatur und für RNA:RNA-Hybride eine Konzentration von 100 ng/ml bei 68 °C empfohlen. Diese Empfehlungen gelten für Sonden mit 100% Homologie zur Ziel-Nukleinsäure und 50% GC-Gehalt.

Im Einzelnen erfolgte die Hybridisierung in folgenden Schritten:

1. Prähybridisierung der Nylonmembran in Hybridisierungspuffer bei 50 °C (DNA-Sonde) bzw. 68 °C (RNA-Sonde). Die Membran wurde dazu in eine wasserdichte Plastiktüte mit 20 ml vorgewärmtem Puffer pro 100 cm<sup>2</sup> Oberfläche eingeschweißt und für 60 Minuten in einem Wasserbad auf einem Rüttler leicht bewegt.
2. Hybridisierung mit 25 ng/ml DNA-Sonde bzw. 100 ng/ml RNA-Sonde (Gesamtvolumen 4,2 ml für eine 120 cm<sup>2</sup> große Membran) im Wasserbad bei 50/68 °C über Nacht (> 12 Stunden). Die Sonde wurde zuvor in einem kochenden Wasserbad für 5 Minuten denaturiert und anschließend auf Eiswasser gekühlt.
3. 2-mal nicht-stringentes Waschen der Membran mit Waschpuffer 1 (2-fach SSC; 0,1 % SDS) bei Raumtemperatur für 5 Minuten.
4. 2-mal stringentes Waschen mit Waschpuffer 2 (0,1-fach SSC; 0,1% SDS) bei 68°C für 15 Minuten.

### **3.9.6. Detektion**

Die Heteroduplexe aus Ziel-RNA und Digoxigenin-markierten cDNA/RNA-Sonden wurden mit polyklonalen Anti-Digoxigenin Fab-Fragmenten vom Schaf detektiert. Die Fab-Fragmente binden spezifisch an die Digoxigeninreste der Sonden. Sie sind mit dem Enzym alkalische Phosphatase konjugiert. Als Substrat wird ein Dioxetanderivat (CSPD) eingesetzt, welches enzymatisch durch die alkalische Phosphatase dephosphoryliert wird und dabei Licht mit einer Wellenlänge von 477 nm emittiert. Die eingeschweißte Nylonmembran wird in einer Filmkassette direkt auf einen Röntgenfilm aufgelegt. Der Röntgenfilm wird an den Stellen durch das Chemilumineszenzsignal geschwärzt, an denen das Antikörper Fab-Fragment gebunden hat.

Die Detektion wurde mit kommerziell erhältlichen Komponenten (DIG Luminescent Detection Kit und DIG Wash and Block Buffer Set, Roche) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Schritte des Detektionsverfahrens im Einzelnen (Schritte 1-5 bei Raumtemperatur und auf Rüttler mit 50 rpm):

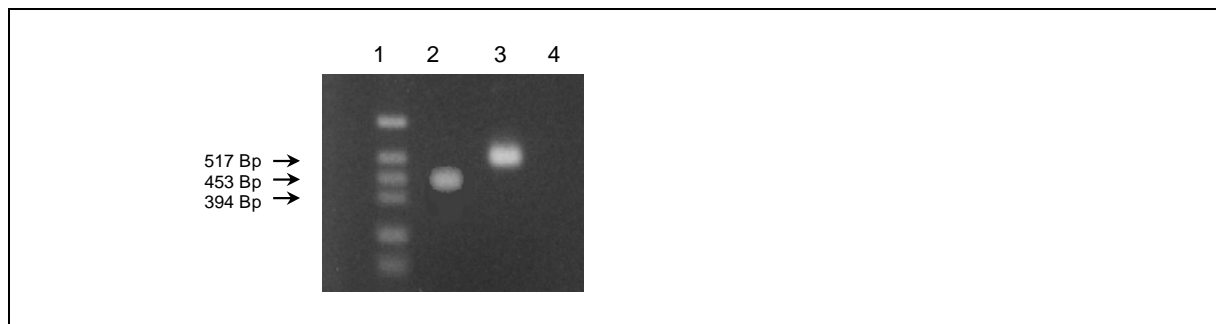
1. Nach Hybridisierung wurde die Membran 5 Minuten mit 50 ml Waschpuffer gewaschen.
2. Die Block-Stocklösung wurde 1:10 mit Maleinsäurepuffer verdünnt, die Membran 30 Minuten in 50 ml Blocklösung 1 fach konzentriert inkubiert. Dieser Schritt vermindert eine unspezifische Bindung des Antikörperkonjugates an die Membran.
3. 3 µl Anti-Digoxigenin Fab Konjugat wurden zu 30 ml Blocklösung gegeben (1:10000 Verdünnung) und die Membran wurde für 30 Minuten in diesem Gemisch inkubiert.
4. Waschen der Membran für 2-mal 15 Minuten in 50 ml Waschpuffer.
5. Anschließend wurde die Membran 5 Minuten in 30 ml Detektionspuffer equilibriert.
6. 10 µl CSPD wurden mit 990 µl Detektionspuffer gemischt (1:100 Verdünnung). Die Membran wurde mit der RNA-tragenden Seite nach oben auf eine lichttransparente Plastiktüte gelegt und die CSPD-Lösung gleichmäßig über der Membran verteilt und für 5 Minuten inkubiert. Die überschüssige CSPD-Lösung wurde vorsichtig abgestreift und die Membran in der Tüte luftblasenfrei einschweißt.
7. Die eingeschweißte Membran wurde für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert, anschließend in der Dunkelkammer auf einen Röntgenfilm gelegt und der Film für 5 Minuten bis mehrere Stunden in einer Filmkassette belichtet.



### 3.9.7. Kontrolle von Einzelschritten des Northern Blot Protokolls

Das Gelingen des Northern Blots hängt vom fehlerfreien Ablauf der Einzelschritte ab. Um Fehler während der Teilprozesse erkennen zu können, wurden mehrere Kontrollprozeduren zwischengeschaltet.

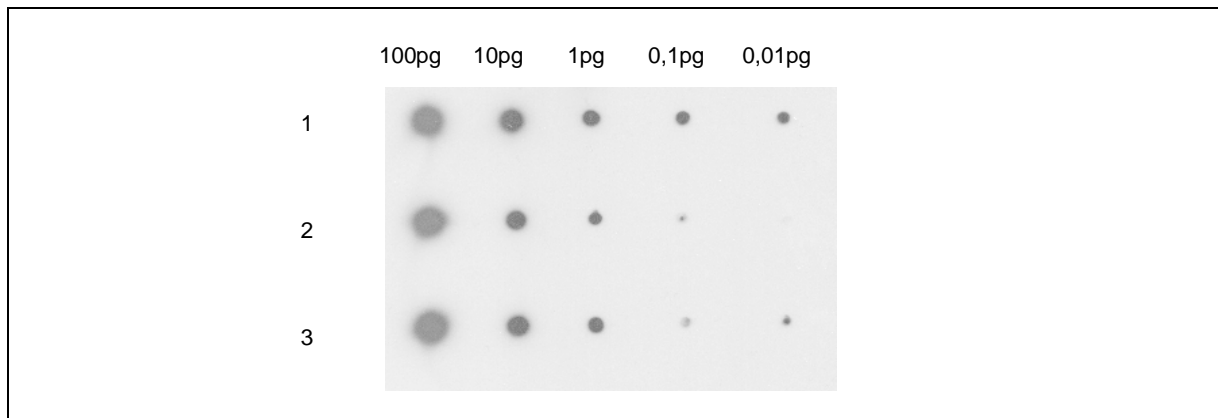
1. Die Synthese und Spezifität der Markierungsreaktion wurde mit Hilfe einer Agarosegel-Elektrophorese geprüft. Die Wanderungsgeschwindigkeit einer DIG-markierten Sonde ist im Vergleich zu einem identischen unmarkierten Fragment infolge des größeren Molekulargewichtes langsamer. Das PCR-Produkt aus der Markierungsreaktion wurde mit dem korrespondierenden nicht-markierten Fragment in einer Elektrophorese verglichen.



**Abbildung 6: Kontrolle der DIG-markierten DNA-Sonden mit Agarosegel-Elektrophorese**

**1 Längenmarker, 2 unmarkierte AF5-cDNA-Sonde 447bp, 3 DIG-markierte AF5-cDNA-Sonde 447 bp, 4 Negativkontrolle**

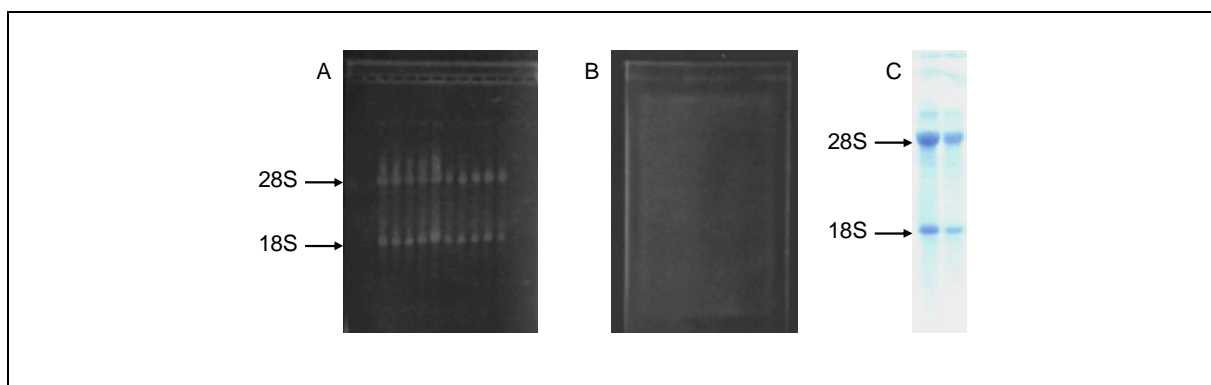
2. Die Effizienz des Digoxigenineinbaus während der Markierungsreaktion wurde mit einem Spot-Test abgeschätzt. Hierzu wurden Verdünnungsreihen einer Kontroll-Sonde bekannter Konzentration und den neu synthetisierten Sonden angefertigt. Jeweils ein Mikroliter der Verdünnungsreihe wurde auf einer Nylonmembran fixiert und nach Detektion die Intensität der Spots von Kontrolle und Sonde verglichen.



**Abbildung 7: Sensitivitätsbestimmung der DIG-markierten Northern Blot Sonden**

**1 DIG-markierte Kontroll-DNA, 2 DIG-markierte ENX-1 cDNA-Sonde, 3 DIG-markierte AF5-cDNA-Sonde**

- Die RNA-Integrität und der Transfer wurden durch Färbung des Agarosegels in 0,1% Ethidiumbromid vor und nach Northern Blot geprüft. In UV-Licht von 312 nm stellt sich die Gesamt-RNA als flauer Schweif dar, zwei prominente unscharfe Banden kennzeichnen die 28S und 18S ribosomale RNA. Alternativ dazu wurde ein Teil der Nylonmembran nach dem Blot abgeschnitten und mit Methylenblau gefärbt. Die Banden der 28S (4,8kb) und 18S (1,8kb) ribosomalen RNA können als Längenstandard genutzt werden.



**Abbildung 8: Kontrolle des RNA-Transfers während des Northern Blots**

**A Agarosegel vor Northern Blot, B nach Blot, C Methylenblaufärbung einer Nylonmembran nach Blot**

- Nach Detektion der Ziel-Sonde wurde in den meisten Fällen mit einer  $\beta$ -Actin RNA-Sonde hybridisiert.  $\beta$ -Actin ist ein Haushaltsgen, welches nahezu

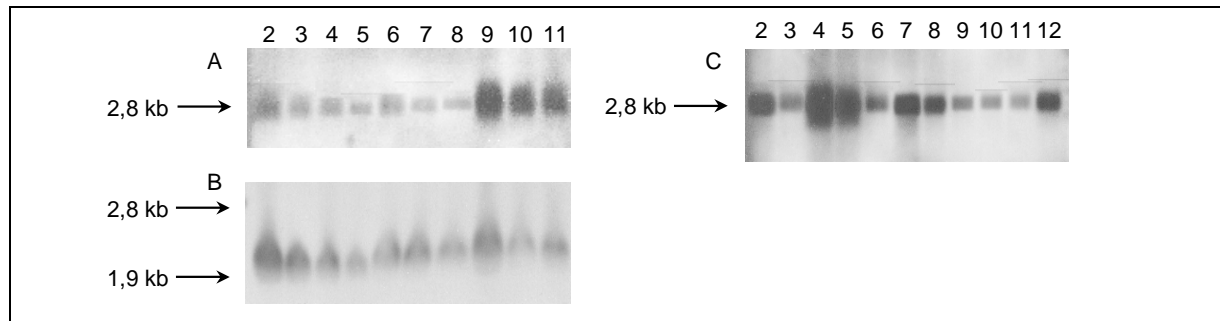
gleichförmig in den unterschiedlichen humanen Geweben exprimiert wird. Es erlaubt damit eine Aussage zur aufgetragenen RNA-Menge. Die gewebespezifische Expression von ENX-1 und AF5 kann im Vergleich zum  $\beta$ -Actin-Signal semiquantitativ abgeschätzt werden.

### **3.9.8. Alternative Hybridisierungs- und Detektionsprotokolle**

Anfangs wurden die Teilschritte Hybridisierung und Detektion des Northern Blots nach Empfehlungen des „DIG System User's Guide for Filter Hybridization“ von Roche ausgeführt. In diesem Abschnitt sollen zwei alternative Protokolle beschrieben werden, welche im Rahmen der Methodenetablierung erprobt wurden. Zu beachten ist, dass unterschiedliche Hybridisierungssonden eingesetzt wurden. Ursprünglich war das Northern Blot-Verfahren zur Expressionsanalyse von ENX-1 vorgesehen. ENX-1 ist das humane Homologon zu Enhancer of zeste, einem Gen von *Drosophila melanogaster*. Es reguliert als Transkriptionsfaktor die Expression von Homeoboxgenen. Hobert et al. [154] zeigten, dass ENX-1 mit Vav interagiert, einem Protoonkogen, welches eine entscheidende Rolle bei der Proliferation und Signaltransduktion im hämatopoetischen System spielt. Während der Etablierungsphase des Northern Blots wurden in der Arbeitsgruppe um Prof. A. Borkhardt neue Erkenntnisse bei der Analyse des AF5-Gens gewonnen. Daher trat anstelle der Expressionsanalyse des ENX-1 Gens die des AF5-Gens in den Vordergrund. Das von Roche empfohlene Protokoll und die in diesem Abschnitt beschriebenen Protokolle sind daher nur eingeschränkt vergleichbar und sollen deskriptiv gegenübergestellt werden.

Zunächst mussten die empfohlenen Hybridisierungsbedingungen nach Roche [143] in empirischen Versuchsreihen modifiziert werden. Das ENX-1 Transkript war mit 25 ng/ml DNA-Sonde und 50 °C Hybridisierungstemperatur nicht fassbar. Die Sondenkonzentration wurde schrittweise erhöht und die Hybridisierungstemperatur verringert. Ein schwaches ENX-1 spezifisches Signal von 2,8 kb [154] konnte erstmals mit 100 ng DNA Sonde/ml und bei 42 °C Hybridisierungstemperatur detektiert werden. Nach Erhöhung der Sondenkonzentration auf 300 ng/ml bei unveränderter Hybridisierungstemperatur war das ENX-1 Transkript in Verdünnungsreihen aus Gesamt- und mRNA bis 1  $\mu$ g und 0,1  $\mu$ g in humanen Leukämiezelllinien nachweisbar.

Für die Kontrollhybridisierung mit der  $\beta$ -Actin RNA-Sonde wurde die empfohlene Hybridisierungstemperatur wegen langer Belichtungszeiten auf 60 °C reduziert.



**Abbildung 9: Sensitivität der Northern Blot Hybridisierung nach dem modifizierten Protokoll von Roche**

**A** Northern Blot mit Gesamt-RNA aus humanen Leukämiezelllinien. Bahn 2-5 SUP-T1 (10, 5, 3, 1  $\mu$ g), Bahn 6-8 MONO-MAC-6 (10, 5, 3  $\mu$ g), Bahn 9-11 REH (10, 5, 3  $\mu$ g). Hybridisierung mit 300 ng/ml ENX-1 cDNA-Sonde bei 42 °C. **B** gleicher Northern Blot wie A, Hybridisierung mit  $\beta$ -Actin RNA Sonde, 100 ng/ml bei 60 °C. **C** Northern Blot mit mRNA aus humanen Leukämiezelllinien. Bahn 2-3 ML-2 (1; 0,3  $\mu$ g), Bahn 4-6 REH (1; 0,3; 0,1  $\mu$ g), Bahn 7-8 K-562 (0,7; 0,1  $\mu$ g), Bahn 9-11 HL-60 (0,7; 0,3; 0,1  $\mu$ g), Bahn 12 SUP-T1 (0,3  $\mu$ g). Hybridisierung mit ENX-1 cDNA-Sonde wie A. Es wurde keine Kontrollhybridisierung mit  $\beta$ -Actin durchgeführt.

Grundlage der ersten Protokollvariante war eine Arbeit von Engler-Blum et al. [155]. Sie hatten zum Ziel die Sensitivität nicht-radioaktiver Northern Blot Verfahren auf der Basis digoxigeninmarkierter Sonden zu verbessern. Sie überprüften die Teilschritte der Northern Blot Prozedur, wodurch sich im Vergleich mit dem Roche-Protokoll Unterschiede bei Hybridisierung und Detektion ergaben. Die besten Ergebnisse erzielten sie nach Modifikation eines auf Church und Gilbert zurückzuführenden Hybridisierungsprotokolls [156]. Grundlage des Protokolls ist ein Natriumphosphatpuffer. In der folgenden Tabelle sind die Pufferzusammensetzung, die empfohlene Hybridisierungstemperatur und -dauer und der Waschpuffer zusammengestellt. Die Membran wurde dreimal bei 65 °C gewaschen.

Sondenart und Konzentration	Hybridisierungspuffer	Temperatur und Dauer	Waschpuffer
cDNA 2,5 ng/ml	0,25 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7,2); 1 mM EDTA; 20% SDS 0,5 % BBR	68 °C für mindestens 6 Stunden	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1 mM EDTA; 1 % SDS

**Tabelle 7: Empfohlene Hybridisierungsbedingungen nach Engler-Blum et al. [155]**

**BBR = Roche Blockreagenz**

Die kritischen Parameter der Antigen-Antikörper Interaktion sind Temperatur, pH-Wert und Osmolarität. Engler-Blum et al. wandelten das auf einem Maleinsäurepuffer basierende Detektionsprotokoll von Roche wie folgt ab: Die Konzentration an monovalenten Kationen wurde erhöht, der pH-Wert von 7,5 nach 8,0 verschoben, der Anteil an Blockreagenz wurde reduziert und das Anti-DIG-AP Konjugat wurde 1:15000 statt 1:10000 verdünnt. In nachstehender Tabelle sind die Unterschiede gegenübergestellt.

	Roche [143]	Engler-Blum et al. [155]
Waschlösung	0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; 0,3 % Tween 20; pH 7,5	0,1 M Maleinsäure; 3 M NaCl; 0,3 % Tween 20; pH 8,0
Blocklösung	1 % BBR in 0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; pH 7,5	0,5 % BBR in Waschlsg.
Konjugatlösung	Blocklsg + anti-DIG-AP Konjugat (1:10000)	Blocklsg + anti-DIG-AP Konjugat (1:15000)
Substrat-Puffer	0,1 M Tris-HCL; 0,1 M NaCl, pH 9,5	0,1 M Tris-HCL; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl <sub>2</sub> ; pH 9,5
Substratlösung	CSPD (25 mM) 1:100 in Substratpuffer	CSPD (25 mM) 1:100 in Substratpuffer

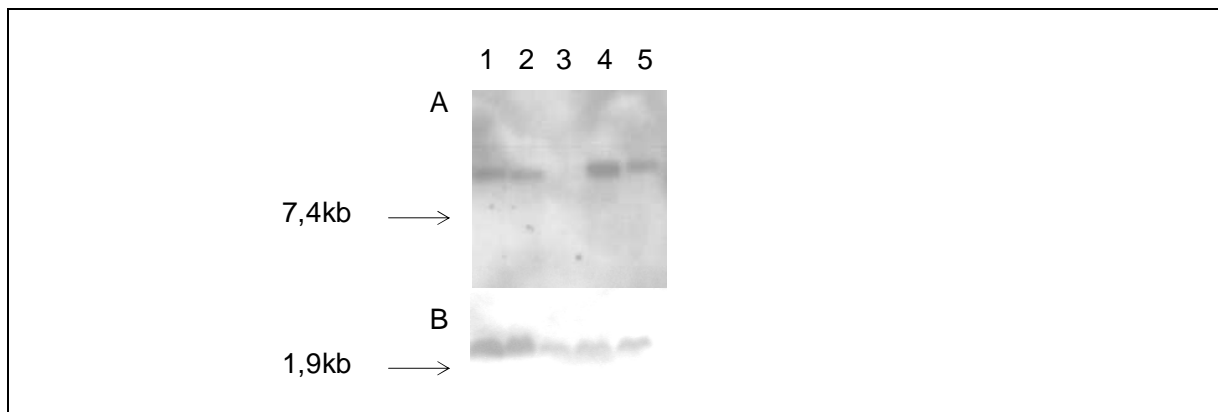
**Tabelle 8: Gegenüberstellung der Detektionslösungen von Roch und Engler-Blum et al.**

**BBR = Roche Blockreagenz**

Die Sensitivitätssteigerung durch Modifikation des Detektionsvorgangs führten sie darauf zurück, dass eine Erhöhung der Osmolarität zur Stabilisierung von RNA/DNA- und DNA/DNA-Hybriden beiträgt und die unspezifische Bindung des anti-DIG-AP

Konjugates an die Nylonmembran durch Änderung der Salzkonzentration und des pH-Wertes verringert wird.

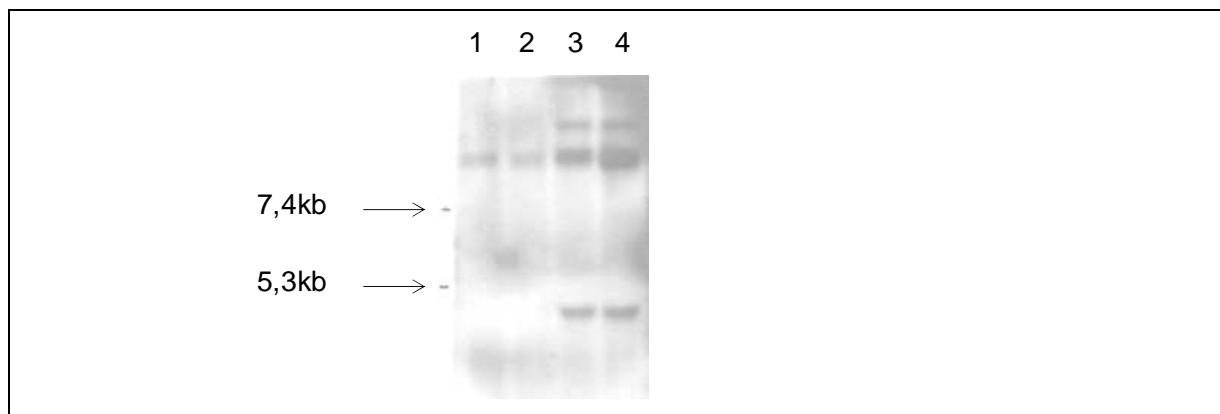
Die von Engler-Blum et al. empfohlenen Hybridisierungsbedingungen mussten für die 447 bp große AF5-Sonde angepasst werden. Um ein AF5-Transkript detektieren zu können, musste die Sondenkonzentration von 2,5 ng auf 25 ng/ml Hybridisierungslösung erhöht und die Temperatur von 68 °C auf 60 °C gesenkt werden.



**Abbildung 10: Northern Blot Hybridisierung nach dem modifizierten Protokoll von Engler-Blum et al.**

Aufgetragen sind je 20µg Gesamt-RNA aus den Leukämiezelllinien 1 HL-60, 2 REH, 3 K-562, 4 JOSK, 5 MUTZ-1. A Hybridisierung mit AF5-cDNA-Sonde [25 ng/ml]. B Kontrollhybridisierung mit  $\beta$ -Actin RNA-Sonde nach dem Protokoll von Roche.

Die zweite Protokollvariante wurde mit einem von T.-T. Yang und S.R. Kain entwickelten Hybridisierungspuffer [157] (ExpressHyb™, Clontech) durchgeführt. Sie entwickelten eine Hybridisierungslösung, mit der die langen Inkubationszeiten von 12-24 Stunden auf 1-6 Stunden verkürzt werden können. Für die AF5 spezifische 447 bp große cDNA-Sonde mussten die empfohlenen Hybridisierungsbedingungen wie folgt angepasst werden: Die Sondenkonzentration musste von 2-10 ng/ml Puffer auf 100 ng/ml angehoben und die Hybridisierungstemperatur von 68 °C auf 60 °C reduziert werden. Nach Hybridisierung wurde mit 2 fach SSC, 0,1 % SDS für 30 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend mit 0,1 fach SSC, 0,1 % SDS für 30 Minuten bei 60°C gewaschen. Die Detektion erfolgte nach dem Protokoll von Roche.



**Abbildung 11: Northern Blot Hybridisierung mit ExpressHyb™, Clontech.**

**Aufgetragen sind je 10 µg Gesamt-RNA aus den Leukämiezelllinien 1 JOSK-I, 2 MUTZ-1, 3 MONO-MAC-6, 4 ML2. Hybridisierung mit AF5-cDNA-Sonde [100 ng/ml].**

In nachstehender Tabelle sind die Unterschiede der drei Protokollvarianten für Hybridisierung und Detektion zusammenfassend dargestellt. Für die ENX-1 und die AF5 spezifische cDNA-Sonde mussten die Protokolle in empirischen Versuchsreihen angepasst werden, die Abweichungen im Vergleich zu den empfohlenen Bedingungen sind in der letzten Spalte aufgeführt.

Protokoll	Hybridisierung	Detektion	Abweichung
Roche	Puffer: DigEasyHyb™	Maleinsäurepuffer: 0,1 M	ENX-1 cDNA-Sonde 300 ng/ml; Temp. 42 °C
	Sonde: DNA 25 ng/ml	Maleins.; 0,15 M NaCl (pH 7,5)	
	Temp.: 50 °C	Konjugatpuffer: Anti-DIG-AP-	
	Dauer: über Nacht	Konjugat 1:10000 in Malein- säurepuffer + 1 % BBR	
	Waschpuffer: 2 fach SSC; 0,1 % SDS und 0,1 fach SSC; 0,1 % SDS	Detektionspuffer: 0,1 M Tri-HCl; 0,1 M NaCl (pH 9,5)	
Engler-Blum et al. Variante 1	Puffer: modifizierter Church-Puffer	Maleinsäurepuffer: 0,1 M Maleins.; 3 M NaCl (pH 8)	AF5-cDNA- Sonde 25 ng/ml; Temp. 60 °C
	Sonde: DNA 2,5 ng/ml	Konjugatpuffer: Anti-DIG-AP-	
	Temp.: 68 °C	Konjugat 1:15000 in Malein- säurepuffer + 0,5 % BBR	
	Dauer: über Nacht	Detektionspuffer: 0,1 M Tris- HCl; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl <sub>2</sub> (pH 9,5)	
Yang, Kain Variante 2	Puffer: ExpressHyb™	wie Roche	AF5-cDNA- Sonde 100 ng/ml; Temp. 60 °C; Dauer: 6 Std.
	Sonde: DNA 2-10ng/ml		
	Temp.: 68 °C		
	Dauer: 1-6 Std.		
	Waschpuffer wie Roche		

**Tabelle 9: Gegenüberstellung der Protokollvarianten für Northern Blot Hybridisierung und Detektion von Roche [143], Engler-Blum et. al. [155] und Yang, Kain [157]**

### 3.9.9. Humaner RNA Dot Blot

Mit dem „Human RNA Master Blot™“ (Clontech, Palo Alto, USA) wurde die AF5-Expression in 50 verschiedenen humanen Geweben untersucht. Die RNA ist punktförmig aufgetragen (Dot Blot), eine Differenzierung verschieden großer Transkripte ist nicht möglich. Die Menge an aufgetragener RNA je Gewebeprobe wurde vom



Hersteller gemäß der Expression acht unterschiedlicher Haushaltsgene kalibriert. Die Intensität der detektierten Signale ist deshalb direkt vergleichbar und zeigt die relative Expression des untersuchten Gens in den verschiedenen Geweben an.

Der Blot wurde mit der 447 bp großen AF5-cDNA-Sonde nach Angaben des Herstellers hybridisiert. 15 ml ExpressHyb<sup>TM</sup> (Clontech) und 1,5 mg denaturierte DNA aus Lachshodengewebe wurden gemischt. Der Dot Blot wurde in 10ml der Lösung für 30 Minuten bei 65 °C inkubiert. 80 ng der DIG-markierten cDNA-Sonde wurden mit 30 µg C<sub>0</sub>t-1 DNA, 150 µg DNA aus Lachshodengewebe und 50 µl 20 fach SSC vermengt und mit sterilem Aquabidest auf ein Endvolumen von 200 µl aufgefüllt. Diese Mischung wurde bei 95-100 °C für 5 Minuten denaturiert und anschließend auf Eiswasser gekühlt. Die vorbehandelte Sonde wurde zu 5 ml Prähybridisierungslösung gegeben. Die Sondenkonzentration betrug 16 ng/ml. Die Hybridisierung erfolgte bei 65 °C über Nacht. Durch die Zugabe der Lachs DNA und C<sub>0</sub>t-1 DNA während der Prähybridisierung und Hybridisierung wird eine unspezifische Bindung der Sonde an repetitive Sequenzen unterdrückt.

Im Anschluss erfolgten zwei hintereinander durchgeführte Waschprozeduren für jeweils 20 Minuten mit 2 fach SSC, 1 % SDS bei Raumtemperatur und 0,1 fach SSC, 0,5 % SDS bei 65 °C. Jeder Waschvorgang wurde einmal wiederholt.

Die Detektion erfolgte nach dem Protokoll von Roche.

### **3.10. DNA-Klonierung**

Für die AF5-Sequenzanalyse bei Patienten mit AML, der humanen Leukämiezelllinie MUTZ-1 (MDS) und der gesunden Kontrollen wurden definierte Abschnitte der cDNA auf zellulärer Basis nach einem Standardprotokoll [150] kloniert. Das Protokoll kann in 5 Teilschritte gegliedert werden:

- Amplifikation des gewünschten AF5-cDNA-Fragments mit „nested-PCR“
- Kovalente Verbindung des AF5-Fragmentes mit dem Replikon/Vektor (Ligation)
- Einschleusen der rekombinierten DNA in Empfängerorganismen (Transformation)
- Selektion und Vermehrung transformierter Empfängerzellen mit rekombinierter AF5-Vektor DNA
- DNA-Isolierung aus den Empfängerorganismen

Zuerst wurden ausgewählte AF5-cDNA-Fragmente mit „nested-PCR“ amplifiziert. Die Amplimere wurden so gewählt, dass fünf überlappende Fragmente von AF5 (C0 bis C4) mit einer Länge zwischen ca. 300 bis 900 bp für die Klonierung zur Verfügung standen. Mit den Primern wurden an den 5'-Enden der Sense- und Antisensestränge Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen (NotI und KspI) eingefügt.

Als Vektor diente pBlue-script SK+ (Stratagene, Heidelberg), siehe Anhang 8.4. In der Polylinkerregion von pBlue-script befinden sich ebenfalls Erkennungssequenzen für NotI und KspI. Vektor und AF5-Fragmente mußten vor Ligation mit den Restriktionsendonukleasen NotI und KspI zur Ausbildung überhängender oder kohäsiver Enden geschnitten werden. Mit der Auswahl unterschiedlicher Erkennungssequenzen, die nach der Restriktion keine komplementären Enden bilden, wird eine intermolekulare Konkaterisierung oder intramolekulare Ringbildung vermieden. Folgender Restriktionsansatz wurde hergestellt:

Restriktionsenzym KspI/NotI	50 U (5 µl)
DNA	1-10 µg (Vol. variabel)
spezifischer Restriktionspuffer 10fach konz.	25 µl
steriles bidest H <sub>2</sub> O	add 250 µl
Restriktionsbedingungen	Inkubation bei 37 °C für 3 Std.

**Tabelle 10: Restriktionsansatz DNA-Klonierung**

Um eine intramolekulare Ringbildung des Vektors während der Ligation zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatgruppen mit dem Enzym alkalische Phosphatase entfernt. Phosphodiestergruppen können dann nur in Anwesenheit der 5'-Phosphatgruppe des zu klonierenden AF5-Fragmentes entstehen. Die Anzahl rekombinierter DNA-Moleküle kann mit dieser Prozedur erhöht werden. Ein Dephosphorylierungsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Phosphatase CIP (Roche)	2 U (2 µl)
Vektor DNA	5-10 µg (50 µl)
Dephosphorylierungspuffer 10 fach konz.	10 µl
steriles bidest H <sub>2</sub> O	38 µl
Bedingungen	Inkubation bei 37 °C für 1 Std.

**Tabelle 11: Reaktionsansatz Dephosphorylierung**

Mit Hilfe des Enzyms T4 DNA Ligase (Roche) wurde das jeweilige AF5-Fragment mit pBlue-script kovalent zu einem zirkulären rekombinierten DNA-Molekül verbunden. Zuvor wurden Vektor und Insert mit Agarosegel-Elektrophorese auf Integrität geprüft und die DNA-Menge spektrofotometrisch quantifiziert. Folgender Ligase-Ansatz wurde hergestellt. Für die Reaktion sind niedrige Temperaturen erforderlich, damit zunächst Wasserstoffbrücken zwischen den kurzen überhängenden Enden der DNA-Fragmente entstehen können.

Vektor (pBlue-script SK+)	100 ng (100 ng/µl)
AF5-cDNA-Fragment	X ng (Vol. variabel) $X = A \cdot B \cdot C / D$ (A=Vektormenge in ng, B=bevorzugtes Zielsequenz/Vektor Verhältnis, C=Länge der Zielsequenz in bp, D=Länge des Vektors in bp)
Ligationspuffer (Roche) 10 fach konzentriert	2 µl
ATP (Roche)	1 µl (100 mM)
T4 DNA Ligase (Roche)	1 µl (5 U/µl)
steriles bidest H <sub>2</sub> O	add 20 µl
Bedingungen	Inkubation bei 16 °C über Nacht

**Tabelle 12: Ligase-Ansatz DNA-Klonierung**

Als Empfängerorganismus wurde der JM101 E. coli Bakterienstamm (Stratagene, Heidelberg) eingesetzt. Von JM101 wurde in Luria-Bertani (LB)-Medium auf einem Rüttler bei 37 °C und 250 Umdrehungen pro Minute über Nacht eine Vorkultur hergestellt. 100 µl der Vorkultur wurden mit 5 ml LB-Medium gemischt und für weitere zweieinhalb Stunden inkubiert. Ein ausreichendes Bakterienwachstum der Hauptkultur

wurde im Spektrofotometer bei 600 nm Wellenlänge mit Lichtabsorptionswerten von 0,3 bis 0,6 nachgewiesen.

Um DNA-Moleküle aufnehmen zu können, müssen die Bakterien empfänglich oder kompetent gemacht werden. Die Hauptkultur wird dazu nach Zentrifugation in 2 ml eiskaltem Calciumchlorid resuspendiert und 24 Stunden auf Eis inkubiert. Für die Transformation werden 20 µl rekombinierter Vektor-AF5-DNA mit 100 µl Bakteriensuspension gemischt, für 90 Sekunden auf 42 °C erwärmt und anschließend 10 Minuten auf 4 °C abgekühlt. Während der Transformation nehmen die meisten Bakterien nur ein Vektor-Molekül auf, so dass aus dem heterogenen Gemisch sehr ähnlicher DNA-Moleküle nach PCR einzelne AF5-Sequenzen selektiert werden.

Der Vektor ist mit einem Ampicillinresistenzgen ausgestattet. In einem ampicillinhaltigen Medium wird somit ein Wachstum nicht-transformierter Bakterien unterdrückt. In der Polylinkerregion von pBlue-script ist das LacZ-Gen integriert, welches das Enzym β-Galactosidase exprimiert. Es spaltet das Substrat X-Gal, wobei ein blauer Farbstoff entsteht. Im rekombinierten AF5-Vektor Molekül wird LacZ inaktiviert. Auf Nährboden, der X-Gal enthält, können Bakterienkolonien mit rekombiniertem Vektor (weiß) von solchen ohne (blau) unterschieden werden.

Die transformierten Bakterien wurden zunächst in 200 µl LB-Medium bei 37 °C für 45 Minuten vermehrt. In der Zwischenzeit wurden Petrischalen mit Agar beschichtet, welcher LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin enthält. Die Oberfläche der Nährböden wurde mit X-Gal präpariert, anschließend wurden 100 µl Bakteriensuspension je Nährboden ausplattiert. Die Petrischalen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert, am nächsten Tag wurden die weißen Bakterienkolonien von den Platten abgenommen und separat in je 5 ml ampicillinhaltigem LB-Medium vermehrt. 600 µl der Bakteriensuspension wurden mit 400 µl Glycerol gemischt und bei -20 °C als Dauerkultur gelagert, aus dem Restvolumen wurde DNA für die Sequenzanalyse isoliert. Die Vektor-DNA wurde mit dem Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Empfehlungen des Herstellers isoliert. Die Bakteriensuspension wurde zentrifugiert und das Pellet in 300 µl P1 Puffer (50 mM TrisHCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Durch Zufügen von Puffer P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) wurden die Bakterienzellmembranen lysiert sowie Chromosomale-, Plasmid-DNA und Proteine denaturiert. Nach 5-minütiger Inkubationszeit wurde 150 µl eiskalter P3 Puffer (3,0 M K-

Acetat pH 5,5) zugegeben und SDS, Proteine, Chromosomale-DNA und Zellwandbestandteile gefällt. Die Vektor-DNA verblieb aufgrund ihrer Ringstruktur und geringeren Größe in Lösung. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 14000-18000 g wurde die Vektor-DNA als klarer Überstand abgenommen. QIAGEN-tip 20 Säulen wurden mit 1 ml QBT Puffer (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15 % Isopropanol, 0,15 % Triton X-100) gespült, anschließend die Vektor-DNA aufgetragen. Die Säulen bestehen aus einem speziellen Anionenaustauscherharz mit positiv geladenen Gruppen. Die negativ geladenen Phosphatgruppen der Plamid-DNA binden je nach Osmolarität und pH-Wert der Pufferlösung an das Anionenaustauscherharz. Die Säulen wurden viermal mit 1 ml QC Puffer (1,0 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15 % Isopropanol) gewaschen, um Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurde die DNA mit 800 µl QF Puffer (1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 15 % Isopropanol) von der Matrix gelöst. Die DNA wurde mit 560 µl Isopropanol gefällt und für 30 Minuten mit 20000 g zentrifugiert. Das Isopropanol wurde dekantiert und das DNA-Pellet mit 75 % Ethanol gereinigt. Nach Entfernen des Ethanols wurde das Pellet bei 37 °C getrocknet und in 30 µl sterilem Aquabidest über Nacht bei Raumtemperatur resuspendiert. Die Ausbeute an rekombinierter Vektor-DNA pro Isolation schwankte zwischen 2-30 µg.

### 3.11. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der AF5-cDNA-Klone erfolgte nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger et al. [158]. Dabei dient ein Strang des zu sequenzierenden Fragments als Matrize. Mit Hilfe einer DNA-Polymerase, eines spezifischen Primers und der vier verschiedenen Desoxynukleotide erfolgt die Synthese des komplementären Strangs. Im Reaktionsansatz sind außer den bei der PCR üblichen 2'-Desoxynukleotide auch in geringerer Menge Didesoxynucleotide enthalten. Ihnen fehlt am 2'- und 3'-Kohlenstoffatom der Ribose eine Hydroxylgruppe. Die Kettenverlängerung des komplementären Stranges erfolgt durch Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-Kohlenstoffatom des zuletzt stehenden Nukleotids und dem 5'-Kohlenstoffatom des folgenden. Den Didesoxynucleotiden fehlt die Hydroxylgruppe am 3'-Kohlenstoffatom, die Phosphodiesterbindung kann daher nicht gebildet werden und es kommt zum Abbruch der Kettenverlängerung. Da in zufälliger Verteilung an einer der vielen Positionen, an denen das entsprechende Nukleotid

vorkommt, ein Kettenabbruch erfolgt, entsteht ein Gemisch von Fragmenten, welche sich nur in einem Nukleotid bezüglich ihrer Größe unterscheiden und am Kettenende ein markiertes Didesoxynukleotid tragen. Die Fragmente werden mit einem hochauflösenden denaturierenden Polyacrylamidgel nach Größe getrennt. Die DNA-Sequenz wird infolge der verschiedenfarbigen Markierung des Didesoxynukleotids und der Fragmentgröße zusammengesetzt.

In vorliegender Arbeit wurde ein zyklisches Sequenzierungsverfahren ähnlich einer PCR mit drei hintereinander geschalteten temperaturabhängigen Schritten verwandt. Als Matrize diente doppelsträngige DNA, sowohl PCR-Produkt (Direktsequenzierung von Kontrolle 2 und Probe #5) als auch rekombinierte Plasmid-DNA (Kontrolle 1, Proben #1, #2, #3, #4 und MUTZ-1). Im Reaktionsansatz wird nur ein spezifischer Primer zugesetzt, die Amplifikation erfolgt deshalb im Gegensatz zur PCR nur linear und nicht exponentiell [159]. Ferner sind für die Reaktion ein geeignetes Puffersystem und die 4 Desoxynukleotide und Didesoxynukleotide, welche mit 4 unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, erforderlich.

Das Verfahren wurde automatisiert und mit kommerziell erhältlichen Komponenten durchgeführt. Zum Einsatz kamen der Prism Ready Reaction Dye Terminator Kit<sup>®</sup> (Perkin-Elmer, Langen) und das GeneAmp<sup>®</sup> PCR-System 9600 (Perkin-Elmer). Das Reaktionsgemisch und die Zyklusbedingungen sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Terminator Ready Reaction Mix	8,0 µl
Matrizen-DNA	20-500 ng, Volumen variabel (PCR-Produkt oder rekombinierte Plasmid-DNA)
Sequenzierprimer	1 µl (4 µM)
steriles bidest H <sub>2</sub> O	add 20 µl
Zyklusbedingungen	25 mal (96 °C für 10 Sek., 50-60 °C für 5 Sek., 60 °C für 4 Min.), Kühlung bei 4 °C

**Tabelle 13: Reaktionsansatz und Zyklusbedingungen für die DNA-Sequenzierung**

Um überschüssige fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide vom Amplifikationsprodukt zu entfernen, wurde anschließend mit Natrium-Acetat gefällt und mit 70 % Ethanol gereinigt. Die Proben wurden in Ladepuffer bestehend aus Formamid, 25 mM EDTA und

50 mg/ml Blue-Dextran aufgenommen und vor der Elektrophorese denaturiert, indem sie 2 Minuten auf 90 °C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt wurden.

Für den automatisierten Prozess der Größenfraktionierung, Detektion und Datenverarbeitung wurde der 373A-Sequenzierautomat (ABI/Perkin-Elmer, Langen), Apple Macintosh IIci-Computer und zugehörige Software eingesetzt. Das hochauflösende denaturierende Polyacrylamidgel wurde aus 6 % Acrylamid, 8,3 M Harnstoff und 1 fach TBE-Puffer hergestellt. Der stark polare Harnstoff im Gel konkurriert mit den Amino- und Carboxylgruppen der Nukleotide um die Bildung von Wasserstoffbrücken und verhindert so die Zusammenlagerung der einzelsträngigen DNA-Moleküle. Die Polymerisation des Gels wurde durch Zugabe von 10 % Ammoniumpersulfat und TEMED induziert. Mit Hilfe des Sequenzierautomaten erfolgte die vertikale Elektrophorese bei max. 2500 Volt, 40 Milliampere und 30 Watt über 14 Stunden mit 1 fach TBE-Laufpuffer. Ein Argonlaser tastet im Bereich der Scannregion das Gel kontinuierlich ab und regt die im elektrischen Feld wandernden fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide zur Sekundärstrahlung an. Die vier Didesoxynukleotide sind mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert, ddATP grün, ddCTP gelb, ddGTP blau und ddTTP rot. Das emittierte Licht wird durch eine Linse fokussiert, über einen Fotomultiplier in ein elektrisches Signal umgewandelt und an den angeschlossenen Computer übertragen. Mit Hilfe der Software können die gewonnenen Daten zu einem Gelbild verarbeitet werden und aus den Chromatogrammen wird direkt die DNA-Sequenz generiert.

### **3.12. Auswertung der DNA-Sequenzen**

Die aus der Sequenzierung hervorgegangenen Daten wurden mit Hilfe der Software OMIGA 1,0 (Oxford Molecular, Oxford UK) archiviert und weiter ausgewertet. Mehr als 350 Sequenzdateien wurden mit der AF5-Referenz-Sequenz [116] verglichen. Unbekannte Sequenzen und die drei Insertionen von 52 bp, 74 bp und 96 bp (siehe unten), wurden mit der HUSAR 4,0 Software des Europäischen Molekularbiologischen Labors (EMBL) in Heidelberg auf bekannte Motive hin untersucht.

### 3.13. Kompetitive RT-PCR und automatische Fragmentlängenanalyse

Die kompetitive RT-PCR ermöglicht eine Quantifizierung von mRNA [160]. Mit dem Enzym Reverse Transkriptase wird mRNA in komplementäre DNA umgeschrieben (cDNA). Die Anzahl der cDNA-Kopien entspricht im Idealfall der Expression eines bestimmten Gens. Durch anschließende Amplifikation der cDNA mit PCR kann ein spezifisches Transkript nachgewiesen werden. Bei der kompetitiven RT-PCR enthält die mRNA-Probe einen internen Standard, der reverse transkribiert und während der PCR co-amplifiziert wird. Im Vergleich mit dem Standard ist eine Quantifizierung der Genexpression möglich. In vorliegender Arbeit mußte kein interner Standard konstruiert werden. Untersucht wurde die Expression eines alternativen Exons von AF5. Die Auswahl der Primer ermöglichte die gleichzeitige Verfielfältigung des Transkripts mit und ohne alternatives Exon. Die Fragmente konnten aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe von 52bp mit der automatischen Fragmentlängenanalyse unterschieden werden. Die semiquantitative Auswertung erfolgte mittels rechnergestützter Densitometrie.

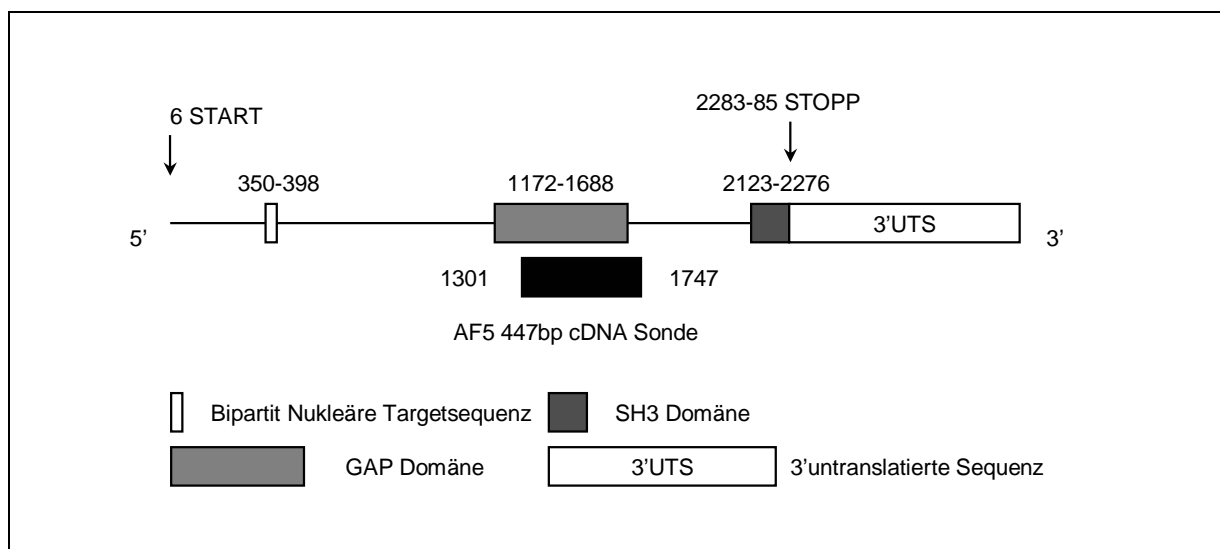
Die Fragmentlängenanalyse wurde mit dem 373A-Sequenzierautomaten (ABI/Perkin-Elmer, Langen) und der „Genescan 672“-Software (PE-Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Für die PCR wurden fluoreszenzmarkierte Primer eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde 1:10 mit sterilem Aqua bidest verdünnt, 1 µl der Verdünnung wurde mit 0,5 µl GENESCAN Standard (GENESCAN 255TMRox, Perkin-Elmer) und 2,5 µl Formamid gemischt. Die Proben wurden bei 90 °C für 3 Minuten denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Für die Größenfraktionierung wurde ein hochauflösendes Polyacrylamidgel entsprechend der Methode DNA-Sequenzierung hergestellt. Jeweils 4 µl der denaturierten Proben wurden in einer Spur des Gels analysiert. Der beigefügte GENESCAN Standard enthält mit rotem Fluoreszenzfarbstoff markierte Fragmente definierter Größe. Der Standard wird während der Elektrophorese wie die Proben entsprechend seines Molekulargewichtes fraktioniert, die Software erlaubt durch Vergleich der PCR-Fragmente mit den Standardfragmenten eine Größenbestimmung auf 1-2 Basenpaare. Die Elektrophorese erfolgte bei max. 2500 Volt, 40 Milliampere und 30 Watt über 14 Stunden mit 1 fach TBE-Laufpuffer. Das Detektionsprinzip wurde bereits im Abschnitt DNA-Sequenzierung beschrieben.



## 4. Ergebnisse

### 4.1. Expressionsanalyse von AF5

Für die Expressionsanalyse von AF5 mit Northern Blot wurde eine 447 bp große digoxigeninmarkierte cDNA-Sonde hergestellt. Die Synthese und Markierungsreaktion der Sonde erfolgte mit „nested-PCR“. Die Primer wurden so gewählt, dass die Sonde den größten Teil der funktionell wichtigen GAP-Domäne von AF5 abdeckt. Folgende Abbildung veranschaulicht die Lage der Sonde in Bezug auf die bekannten Proteinmotive der cDNA-Sequenz.



**Abbildung 12: Position der Northern Blot Sonde in Bezug auf die Domänen der AF5-cDNA-Sequenz**

Die Zahlenangaben über den Domänen kennzeichnen das Anfangs- und Endnucleotid in der cDNA-Sequenz.

#### 4.1.1. Expression von AF5 in verschiedenen humanen Geweben

Das Expressionsmuster von AF5 in verschiedenen humanen Geweben wurde mit einem humanen RNA Dot Blot (Human RNA Master Blot™, Clontech, Palo Alto, California, USA) untersucht. Der Blot enthält mRNA aus 50 verschiedenen humanen Geweben. Vom Hersteller wurde die aufgetragene Probenmenge gemäß der Expression acht unterschiedlicher Haushaltsgene kalibriert. Die Intensität des detektierten Signals ist in den verschiedenen Geweben somit direkt vergleichbar. Gewebe mit einem kräftigen Signal exprimieren AF5 hoch, solche mit einem schwachen Signal niedrig. In Abbildung

13 ist ein überbelichteter Röntgenfilm zu sehen, um auch niedrig exprimierende Gewebe erkennen zu können.

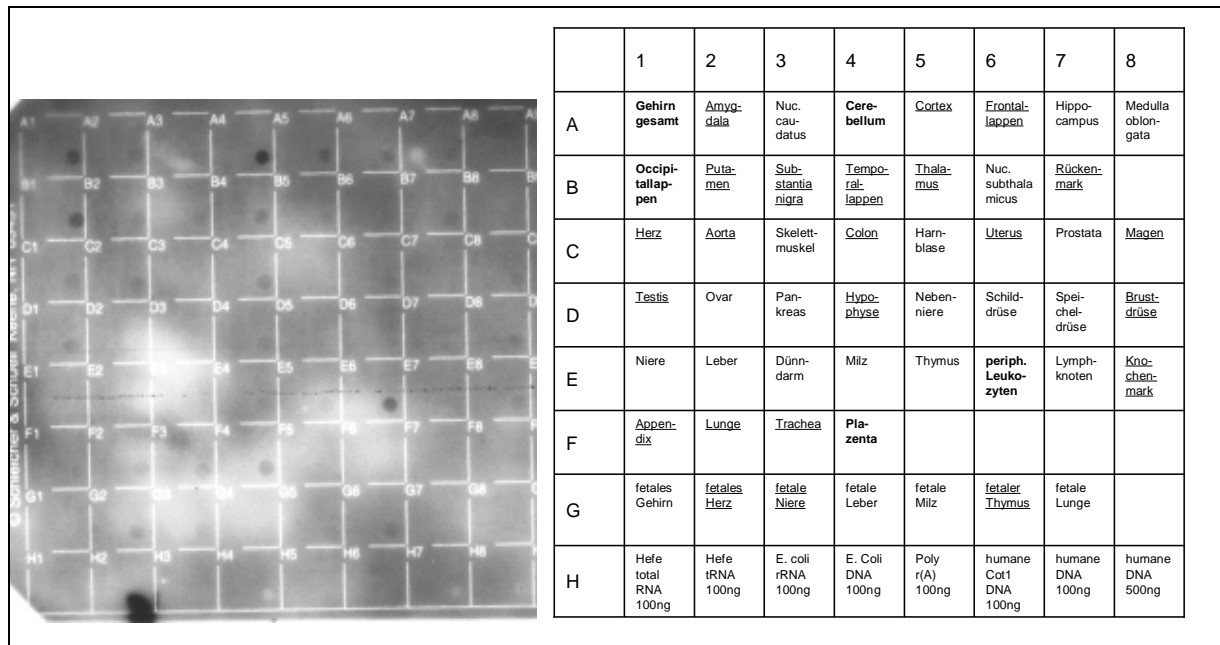


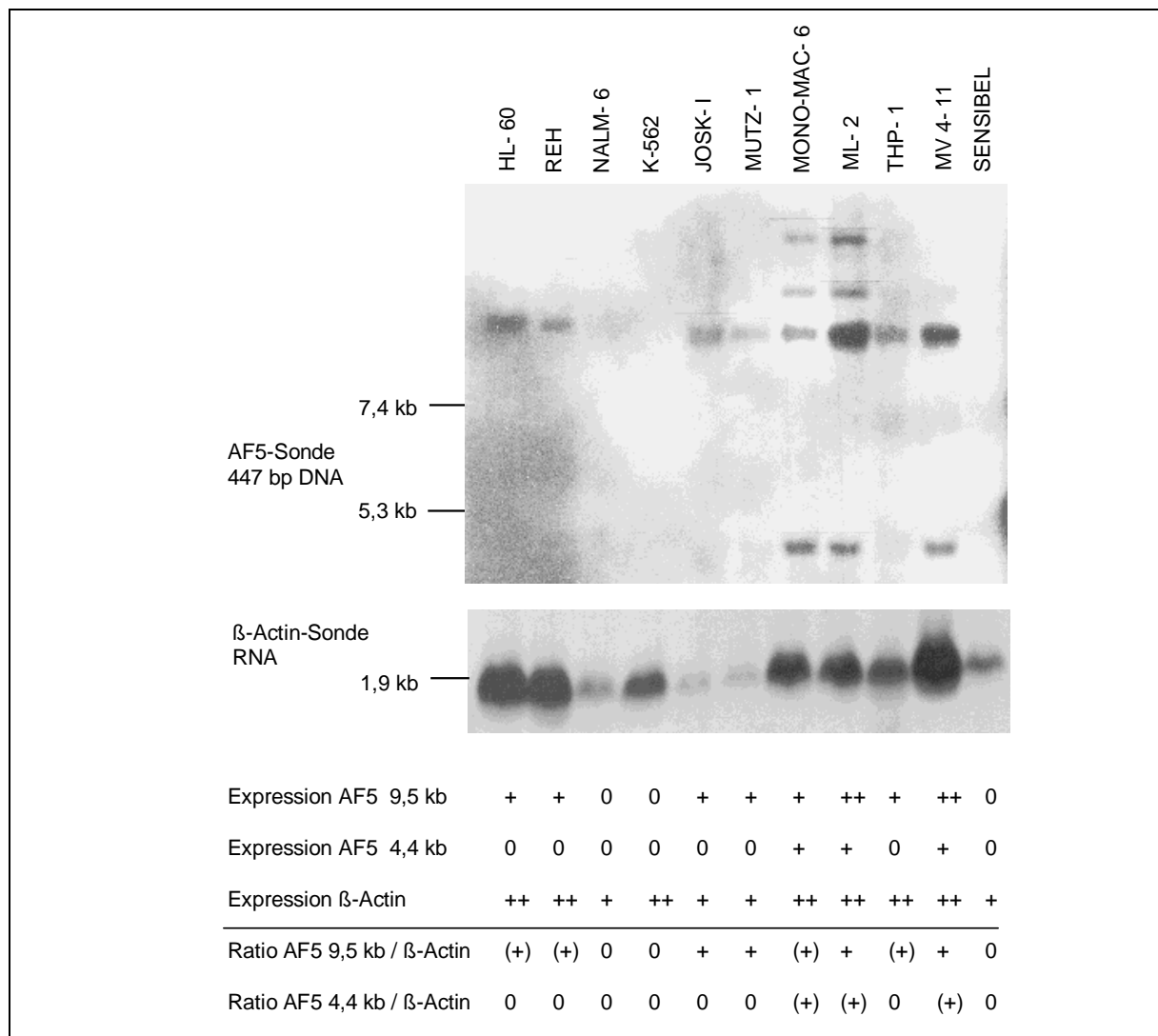
Abbildung 13: Relative AF5-Expression in 50 verschiedenen humanen Geweben

Links in der Abbildung ist ein belichteter Röntgenfilm des Northern Dot Blots (Clontech, Palo Alto) mit RNA aus 50 verschiedenen humanen Geweben dargestellt. Im Blotdiagramm kann das detektierte Signal einem Gewebe zugeordnet werden. Zur Veranschaulichung wurden Gewebe mit hoher AF5-Expression fett markiert und solche mit erkennbarer Expression unterstrichen.

Kräftig AF5 exprimierende Gewebe sind Gehirn gesamt, Cerebellum, Occipitallappen, periphere Leukozyten und Plazenta. Ein nachweisbares Transkript findet sich in Amygdala, Cortex, Frontallappen, Putamen, Substantia nigra, Temporallappen, Thalamus, Rückenmark, Herz, Aorta, Colon, Uterus, Magen, Testis, Hypophyse, Brustdrüse, Knochenmark, Appendix, Lunge, Trache, fetalem Herz, fetaler Niere und fetalem Thymus. Ein AF5-Transkript fehlt in Nucleus caudatus, Hippocampus, Medulla oblongata, Nucleus subthalamicus, Skelettmuskel, Harnblase, Prostata, Ovar, Pankreas, Nebenniere, Schilddrüse, Speicheldrüse, Niere, Leber, Dünndarm, Milz, Thymus, Lymphknoten, fetales Gehirn, fetale Leber, fetale Milz und fetale Lunge.

#### 4.1.2. Expression von AF5 in verschiedenen humanen Leukämiezelllinien

Für die Expressionsanalyse von AF5 in verschiedenen humanen Leukämiezelllinien wurde ein Northern Blot mit je 10 µg Gesamt-RNA hergestellt, siehe Kapitel 3.9.3 und 3.9.4. Im Vergleich mit dem oben beschriebenen Dot Blot können durch die Fraktionierung der RNA AF5-Transkripte mit unterschiedlichem Molekulargewicht differenziert werden. Nach Bojesen S. sind zwei Transkripte von 9,5 kb und 4,4 kb zu erwarten [116]. Die Hybridisierung wurde nach der Protokollvariante von Yang und Kain mit ExpressHyb<sup>TM</sup> (Clontech) und einer Sondenkonzentration von 100 ng/ml bei 60 °C für 6 Stunden durchgeführt. Die Detektion der digoxigeninmarkierten Sonden und die Hybridisierung mit der  $\beta$ -Actin Kontrollsonde erfolgte nach den modifizierten Protokollen des „DIG System User's Guide for Filter Hybridization“ von Roche. Nach Belichtung eines Röntgenfilms wurde die Intensität der Banden in einer dreistufigen Skala bewertet. Mit ++ wurde eine starke, mit + eine schwache und mit 0 eine nicht nachweisbare Expression beurteilt. Die relative AF5-Expression wurde anschließend im Verhältnis zum  $\beta$ -Actinsignal ermittelt. AF5 wurde danach stark +, schwach (+) oder nicht exprimiert (0).  $\beta$ -Actin ist ein Haushaltsgen und wird nahezu gleichförmig in allen Geweben exprimiert. Folgende Abbildung zeigt einen Northern Blot mit RNA aus 11 verschiedenen humanen Leukämiezelllinien.



**Abbildung 14: Northern Blot mit Gesamt-RNA aus 11 verschiedenen humanen Leukämiezelllinien**

Hybridisierung mit der AF5-cDNA-Sonde (Film oben) und einer  $\beta$ -Actin RNA-Sonde (Film unten). Am linken Filmrand sind die Banden 7,4 kb, 5,3 kb und 1,9 kb des RNA Längenmarkers II (Roche) angegeben. Es sind vier unterschiedliche AF5-Banden zu erkennen, die beiden bekannten Transkripte (9,5 kb und 4,4 kb) [116] sind oberhalb der 7,4 kb und unterhalb der 5,3 kb Marke zu sehen. Die Intensität der Banden wurde nach einer dreistufigen Skala bewertet: ++ starke, + schwache, 0 keine Expression. Im unteren Teil der Tabelle ist die relative Expression der Transkripte im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin wiedergegeben. AF 5 wurde folglich stark +, schwach (+) oder nicht (0) exprimiert.

Das 9,5 kb große Transkript wird in den Zelllinien JOSK-1, MUTZ-1, ML-2 und MV 4-11 stark exprimiert. Es ist bei HL-60, REH, MONO-MAC-6, THP-1 schwach und bei NALM-

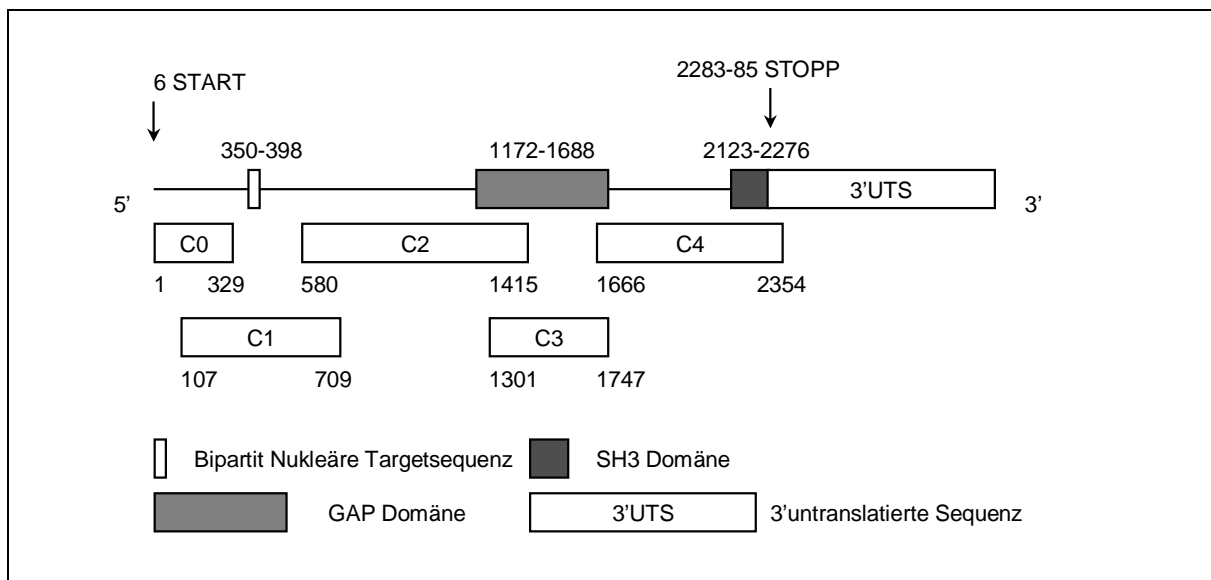
6, K-562, CCEM-SENSIBEL nicht nachweisbar. Eine Expression des 4,4 kb großen Transkripts ist nur in den Zelllinien MONO-MAC-6, ML-2 und MV 4-11 festzustellen. Auffällig sind ferner zwei zusätzliche Banden (> 9,5 kb) in den Zelllinien MONO-MAC-6 und ML-2.

#### **4.2. Sequenzierung der AF5-cDNA**

Zwei Ziele wurden mit der Sequenzierung von AF5 verfolgt:

- Die Identifikation von Spleißvarianten, um Exon/Exon-Grenzen in der cDNA aufzuzeigen
- Der Nachweis von Minormutationen zur Bestätigung des „two hit“-Modells nach Knudson für Tumorsuppressorgene

Auf der Suche nach Minormutationen wurden 5 sich überlappende Fragmente der AF5-cDNA kloniert. Nachdem RNA aus den Proben #1, #2, #3, #4, der Zelllinie MUTZ-1 und der gesunden Kontrolle 1 isoliert und in cDNA umgeschrieben worden war, wurden mit einer „seminested“-PCR die Fragmente C0-C4 mit einer Größe zwischen 329 bp und 836 bp amplifiziert. Die Klonierung erfolgte mit Hilfe des Vektors pBlue-script SK+ und dem Bakterienstamm E. coli JM101 (Stratagene, Heidelberg). In folgender Abbildung ist dargestellt, welcher Abschnitt von AF5 und welches Sequenzmotiv mit dem jeweiligen Fragment kloniert wurden.



**Abbildung 15: Schematische Darstellung der klonierten Fragmente mit Bezug auf die bekannten Domänen der AF5-cDNA**

Die Patientenproben stellen ein Gemisch aus malignen Blasten und normalen mononukleären Zellen dar. Da die vermuteten AF5-Mutationen auf die Blastenzellpopulation beschränkt sind, wurden je 3-5 Klone von jedem Fragment sequenziert. Um methodenbedingte Fehler zu erfassen, wurde die Sequenzreaktion jeweils doppelt angesetzt. Insgesamt wurden ca. 160 Zellklone untersucht, dabei entstanden mehr als 320 Sequenzdaten. In Tabelle 14 sind alle Abweichungen von der AF5-Referenzsequenz [116] und die entdeckten Spleißvarianten zusammengefasst.

Proben Nr.	Abweichung von der AF5-Referenzsequenz	Spleißstellen aus cDNA-Klonen und Direktsequenzierung
#1	1149ins96, 1993ins74, nt256(del4)	389/90, 491/92, 1993/94, 2104/05
#2	A1255G	1993/94, 2104/05
#3	1290ins52	1290/91, 1993/94, 2104/05
#4	unverändert	161/62, 1149/50, 1215/16, 1414/15, 1541/42, 1908/09, 1993/94, 2104/05, 2794/95
MDS-Zelllinie MUTZ-1	nt939(del352)	161/62, 389/90, 491/92, 1290/91, 1541/42, 1703/04, 1843/44, 1993/94, 2104/05, 2196/97
Gesunde Kontrolle #1	unverändert	161/62, 790/91, 1300/01, 1468/69, 1703/04, 1843/44, 1993/94, 2104/05, 2195/96, 2974/75
Spleißstellen aus Direktsequenzierung		
Gesunde Kontrolle #2	Diese Proben wurden nur zur Sequenzierung von PCR-Fragmenten eingesetzt	161/62, 1468/69, 1541/42, 2974/75
#5		1149/50, 1500/01

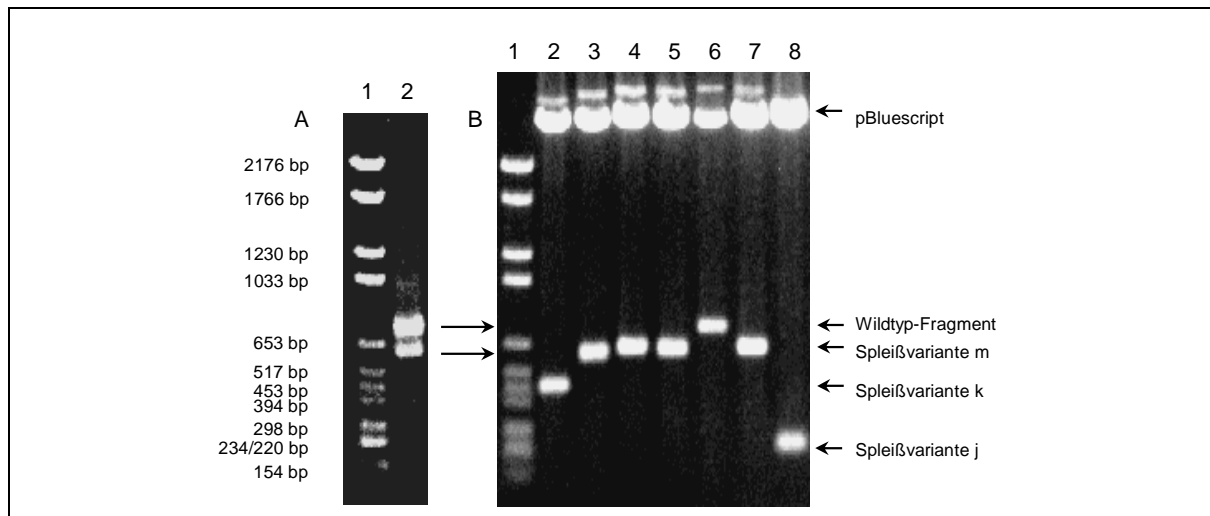
**Tabelle 14: Ergebnisse der AF5-cDNA-Sequenzierung bei den Patienten mit AML, der Zelllinie MUTZ-1 (MDS) und den gesunden Kontrollpersonen**

Auf der Suche nach Spleißstellen wurden außer den DNA-Klonen C0-C4 auch PCR-Fragmente sequenziert. Wegen der relativ hohen Fehlerrate der PCR wurden Aberrationen im Vergleich mit der AF5-Referenzsequenz nicht als Minormutationen gewertet. Für die Direktsequenzierung wurde mit „seminested“-PCR ein 1741 bp großes Fragment des 5'-Endes und mit „nested“-PCR ein 1708 bp großes Fragment des 3'-Endes von AF5 amplifiziert. Die zur Initiation der PCR eingesetzten Primer, deren Sequenzen und Bindungsstellen sind im Anhang 8.1.5 wiedergegeben. Als Matrize wurde cDNA der Patientenproben #1, #4, #5, der Zelllinie MUTZ-1 und der gesunden Kontrollen 1 und 2 eingesetzt.

#### 4.2.1. Spleißvarianten und Exon/Exon-Grenzen von AF5

Mit der Elektrophorese von PCR-Fragmenten und Inserts konnten erste Hinweise für das Vorliegen von Spleißvarianten gefunden werden. Der Zusammenhang soll exemplarisch für Fragment C4 der Kontrolle #1 beschrieben werden. Vor Klonierung wurde das PCR-Produkt und nach Klonierung das Insert mit Elektrophorese kontrolliert. Im Gelbild (Abbildung 16, links) des PCR-Produkts fällt neben dem regulären Fragment von 689 bp eine weitere Bande von ca. 600 bp auf. Die Banden wurden aus dem Gel herausgeschnitten, die DNA isoliert und anschließend kloniert. Die Inserts wurden mit den Restriktionsenzymen KspI und BamH1 von der Vektor-DNA getrennt und zur Kontrolle erneut mit Elektrophorese fraktioniert. Im Gelbild der Inserts (Abbildung 16, rechts) sind außer den PCR-Fragmenten 689 bp und 600 bp nochmals zwei zusätzliche Banden mit einer Größe von ca. 450 bp und 230 bp zu sehen. Für die Sequenzierung wurden neben den regulären Inserts gezielt solche mit abweichender Größe ausgesucht. In der Sequenz der Varianten fehlten interstitiell unterschiedlich große Abschnitte im Vergleich zum C4 Wildtyp-Fragment. Wurde dieselbe Variante in einer Patientenprobe und einer gesunden Kontrolle entdeckt und/oder in mehreren Patientenproben, interpretierten wir diesen Befund als Exon-Skipping und folgerten daraus Spleißvarianten von AF5 entdeckt zu haben.





**Abbildung 16: Elektrophorese von AF5-Spleißvarianten**

**Bahn A1 und B1 DNA-Marker II (Roche). Bahn A2 PCR-Produkt des Fragments C4. Bahn B2-B8 Inserts von C4 nach Restriktionsverdau mit KspI und BamH1, am oberen Gelrand ist die Vektorbande zu sehen.**

In Abbildung 17 sind schematisch alle Spleißvarianten im Vergleich mit der AF5-Wildtyp-Sequenz zu sehen. Am oberen Bildrand ist AF5 als hellgrauer Balken dargestellt. Mit senkrechten Strichen sind die Exon/Exon-Grenzen markiert. Mit a bis m wurden die Spleißvarianten bezeichnet, die Lücke zeigt den herausgespleißten Abschnitt an. Sequenzmotive, die ganz oder teilweise durch den Spleißvorgang verloren gingen wurden über die Varianten projiziert. Die Proben, in denen die Varianten gefunden wurden, sind darunter aufgeführt. DS oder K rechts daneben stehen für Direktsequenzierung oder Klonierung und weisen auf die Matrize der Sequenzreaktion hin.



Aus den Exon/Exon-Grenzen der cDNA kann die genomische Struktur von AF5 abgeleitet werden, siehe Abbildung 18. Wie weiter unten beschrieben wurden bei den Patienten #1 und #3 Insertionen gefunden, die sich von den benachbarten Intronsequenzen ableiten lassen. Auf der Suche nach Spleißmutationen wurde deshalb das Intron 8 komplett und das Intron 16 partiell von den Rändern der angrenzenden Exons sequenziert. Durch Nachweis der GT- und AG-Dinukleotide am Anfang und Ende der Introns sowie der Spleißdonor und Spleißakzeptorstellen konnten diese Exon/Intron-Grenzen auf genomischer Ebene nachgewiesen werden.

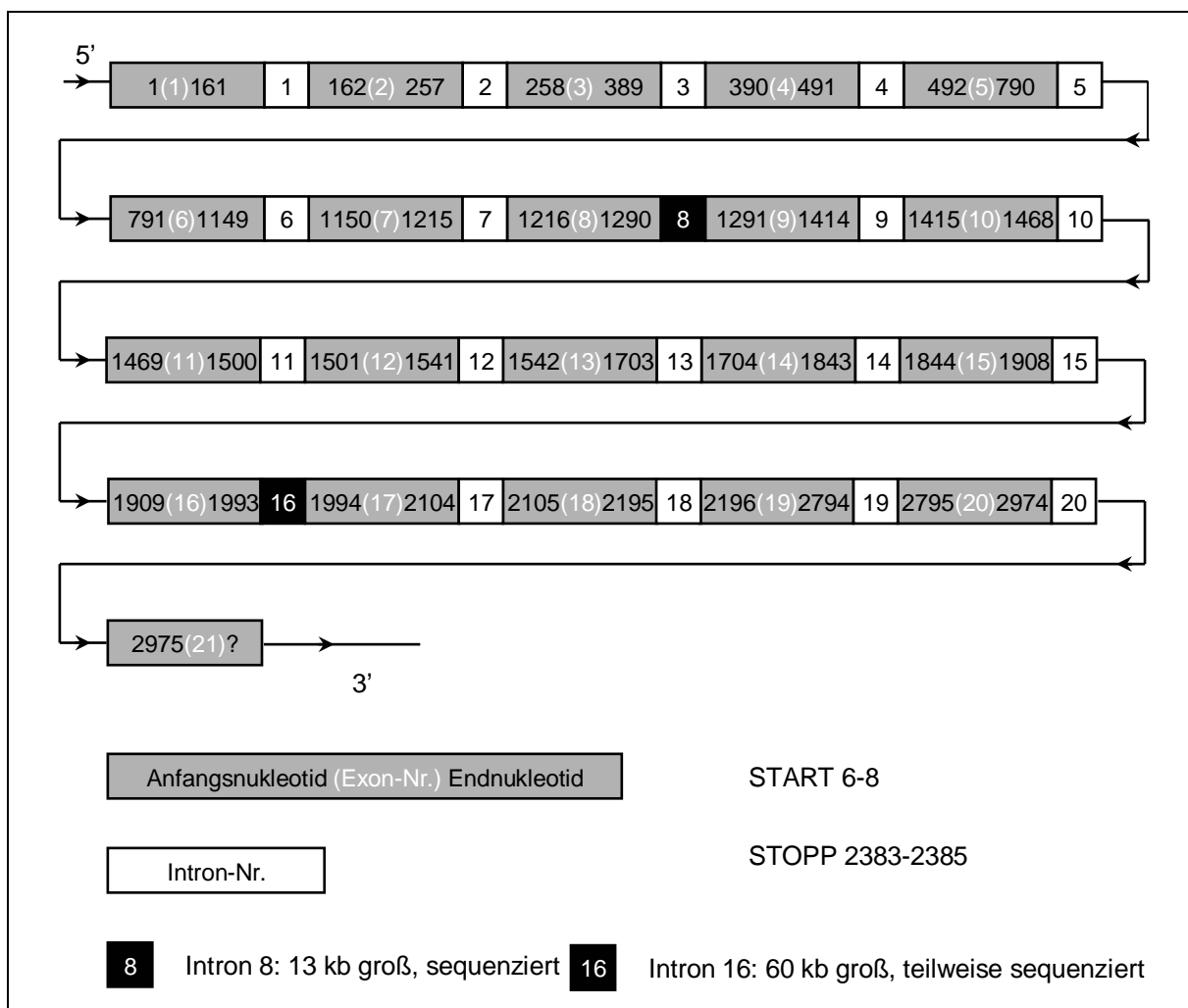
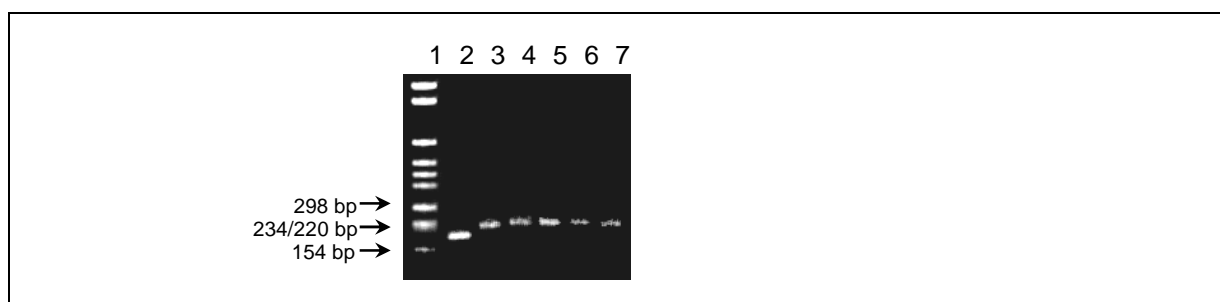


Abbildung 18: Genomische Struktur von AF5 mit Kennzeichnung der Exon/Intron-Grenzen

#### 4.2.2. AF5-Aberrationen bei Patient #1

In Fragment C1 wurde eine Deletion von 4 bp korrespondierend zur AF5-cDNA-Sequenz Position 256-259 gefunden. Der Befund konnte in 2 von 9 Klonen

nachgewiesen werden. Die nt256(del4) verursacht eine Leserasterverschiebung, wodurch 56 bp strangabwärts ein Stopp-Kodon zwischen Nukleotid 312-314 entsteht. Da methodenbedingte Fehler als Ursache dieser vermutlich pathogenetisch bedeutsamen Mutation ausgeschlossen werden sollten, wurde die gesamte Prozedur der Klonierung beginnend mit der PCR der C1-Fragmente wiederholt. Mit Hilfe der PCR-Mutagenese wurde ein Screening-Test entwickelt, um mit geringem Aufwand eine größere Anzahl von C1-Klonen auf die gesuchte Deletion hin zu untersuchen, siehe Kapitel 3.8. In einer „nested“-PCR wurde ein 208 bp großes Fragment des fraglichen Abschnitts von C1 amplifiziert. Enthielt das PCR-Fragment die Deletion, wurde es durch die Restriktionsendonuklease Avr II in ein 184 bp und ein 24 bp großes Fragment gespalten. Die PCR-Fragmente ohne die Deletion besaßen keine Erkennungssequenz für Avr II und konnten mit Elektrophorese aufgrund ihrer Größe von den geschnittenen Fragmenten differenziert werden. Mit diesem Screening-Test wurden 33 weitere C1-Klone von Patient #1 auf nt256(del4) hin untersucht, es konnten jedoch keine zusätzlichen aberranten Klone identifiziert werden.



**Abbildung 19: Screening-Test mit PCR zur Differenzierung von AF5-Fragmenten mit und ohne Deletion nt256(del4)**

**Bahn 1 DNA-Längenstandard VI (Roche). Bahn 2, 4, 6 PCR mit Primerpaar IIIa und IV, Matrize Zellklon f, 11 und 12. Bahn 3, 5, 7 PCR mit Primerpaar IIIb (Wildtyp-Sequenz) und IV, Matrize Zellklon f, 11 und 12. Zellklon f ist die Positivkontrolle mit nachgewiesener Deletion nt256(del4). Für eine detaillierte Beschreibung der PCR-Mutagenese siehe Kapitel 3.8.**

In Fragment C2 von Patient #1 wurde eine Insertion von 96 bp zwischen Nukleotid 1149 und 1150 (1149ins96) und in Fragment C4 eine Insertion von 74 bp zwischen Nukleotid 1993 und 1994 (1993ins74) in der korrespondierenden AF5-Sequenz festgestellt. Beide Insertionen wurden in jeweils 3 von 5 sequenzierten Klonen gefunden. Die Nukleotide

1149/1150 und 1993/1994 markieren in der AF5-cDNA-Sequenz Exon/Exon-Grenzen, Abbildung 18. 1993ins74 verschiebt das Leseraster, es entsteht ein Stopp-Kodon an Position 2310-2312. 1149ins96 verlängert die cDNA-Sequenz von AF5 um 96 bp ohne Veränderung des Leserasters.

Weiterführende Untersuchungen zu 1993ins74 sind in Abschnitt 4.2.4 beschrieben.

#### **4.2.3. AF5-Aberrationen bei Patient #2**

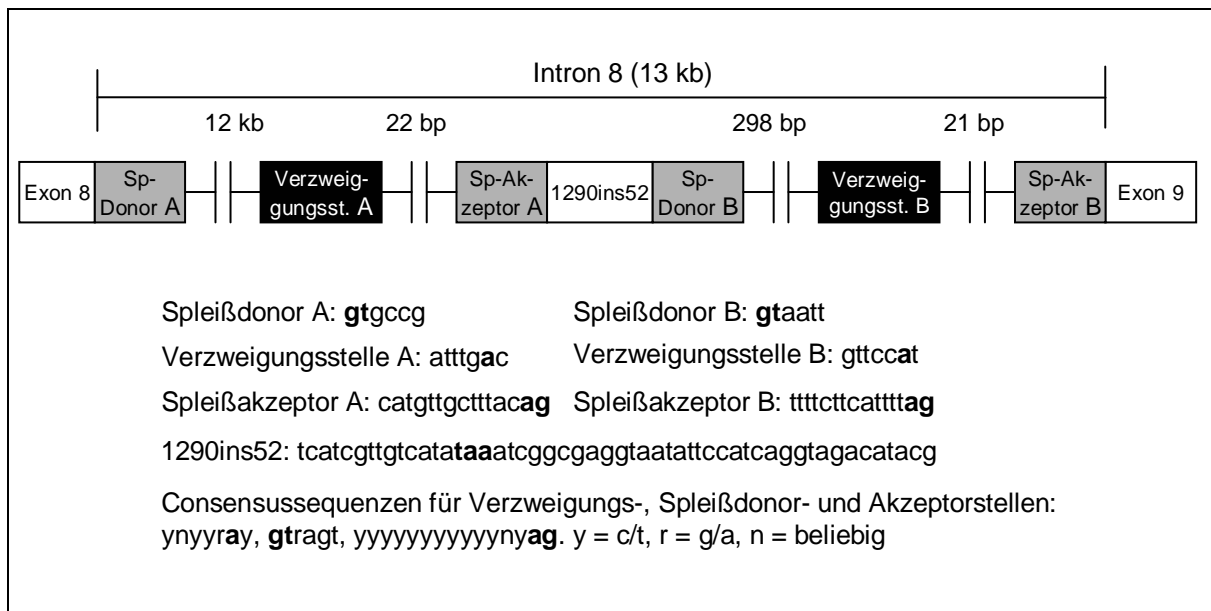
Bei Patient #2 wurde in Fragment C2 eine Punktmutation mit Austausch des Nukleotids Adenosin durch Guanosin an Position 1255 (A1255G) in der korrespondierenden AF5-cDNA-Sequenz gefunden. A1255 ist das zweite Nukleotid im Kodon und verursacht als Missense-Mutation einen Aminosäureaustausch. Die Mutation betrifft den für die GAP-Domäne kodierenden AF5-Sequenzabschnitt und ist daher möglicherweise von funktioneller Bedeutung. Sie wurde in 1 von 4 sequenzierten C2-Klonen des Patienten #5 festgestellt und konnte mit PCR bei keiner von 15 gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen werden. Damit kann ein DNA-Polymorphismus als Ursache für A1255G ausgeschlossen werden.

#### **4.2.4. AF5-Aberrationen bei Patient #3**

Die Patientenprobe #3 wies im Fragment C2 eine 52 bp große Insertion zwischen Exon 8 und 9 an Position 1290/91(1290ins52) in der AF5-cDNA-Sequenz auf. Dieser Befund wurde in 2 von 4 sequenzierten Klonen gefunden.

Wie bei Insertion 1993ins74 (Patientenprobe #1) wird durch 1290ins52 eine Leserasterverschiebung verursacht. Es entsteht ein aberrantes Stopp-Kodon an Position 1305-1307 der AF5-cDNA-Sequenz. Die Leserasterverschiebung erfolgt 118 bp nach Beginn des GAP-Domäne kodierenden Abschnittes. Um diesen Befund zu bestätigen erfolgten weitere Untersuchungen. Zunächst wurde 1290ins52 mit zu diesem Zeitpunkt bekannten Exon- und Intronsequenzen von AF5 verglichen. Die 52 bp Insertion konnte dabei einem 524 bp großen Fragment strangaufwärts der 3' Spleißstelle des benachbarten 13 kb großen Introns 8 zugeordnet werden. Das gesamte Intron 8 wurde sequenziert und ein Sequenzvergleich mit der Datenbank GenBank vorgenommen. Die reverskomplementäre Sequenz des Introns stimmt demnach mit Nukleotid 32086-44629 des künstlichen Bakterienchromosomenklons (BACs) 118L13 (GenBank accession no.

005348) überein. Die 52 bp Insertion liegt zwischen Position 32560-32611 des BACs 118L13 und ist in originäre Spleißdonor- und Spleißakzeptorstellen eingebettet. In Abbildung 20 ist das Intron 8 mit den angrenzenden Exons 8 und 9, der Insertion 1290ins52 sowie den vermuteten Verzweigungs-, Spleißdonor- und Spleißakzeptorstellen dargestellt. Die fett markierten Nukleotide in der Grafik sind für einen normalen Spleißvorgang notwendig. In der Consensussequenz sind die regelhaft anzutreffenden Nukleotide an der jeweiligen Position angegeben. Die fett gekennzeichneten Nukleotide in der Insertion 1290ins52 markieren das aberrante Stopp-Kodon.

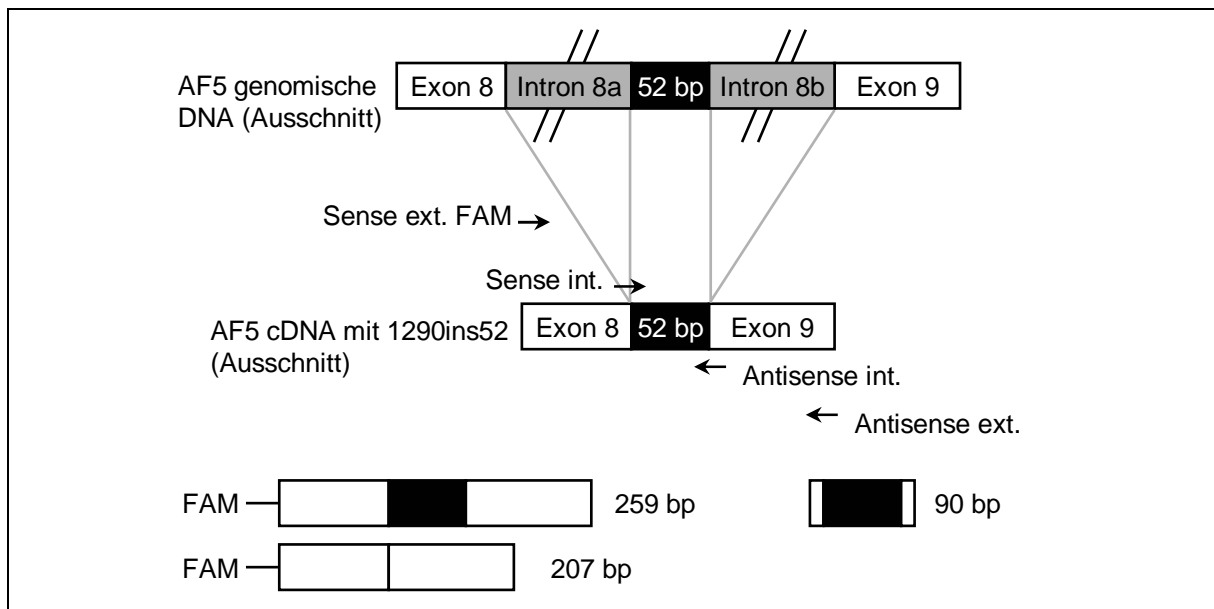


**Abbildung 20: Schematische Darstellung des Intron 8, Lage und Sequenzen der Insertion 1290ins52 und der Spleißdonor- und Spleißakzeptorstellen**

Die fett markierten Nukleotide in den Sequenzen der Verzweigungsstellen, den Spleißdonor- und Spleißakzeptorstellen sind konserviert und für einen normalen Spleißvorgang notwendig. Die fett markierten Nukleotide in der Sequenz der Insertion zeigen das Stopp-Kodon an.

Die 52 bp Insertion leitet sich aufgrund dieser Ergebnisse am ehesten aus einem alternativen Spleißvorgang ab. Mit PCR konnte das alternative Exon außer bei Patient #3 auch bei mehreren gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen werden. Dazu wurde eine „nested“-PCR mit einem chimären internen Primerpaar durchgeführt, welches zur spezifischen Amplifikation des alternativen Exons führt, Abbildung 21. Die Sequenzen der Primer sind im Anhang 8.1.4 zusammengestellt. Die Primerbindungsstellen liegen

überlappend in der Sequenz von Exon 8/1290ins52 und 1290ins52/Exon 9. Ist 1290ins52 in der cDNA enthalten, wird ein 90 bp großes PCR-Fragment amplifiziert. Mit einer kompetitiven semiquantitativen RT-PCR wurde die relative Menge an alternativ gegenüber regulär gepleißter mRNA bestimmt. Hierzu wurde ein externer Primer der oben genannten „nested“-PCR mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Bindungsstelle des fluoreszenzmarkierten Senseprimers liegt im Bereich des 3'-Endes von Exon 8, die des Antisenseprimers im Bereich des 5'-Endes von Exon 9. Die Amplifikation von Wild-Typ cDNA ergibt ein Fragment von 207 bp, die von cDNA mit der Insertion 1290ins52 eines von 259 bp.

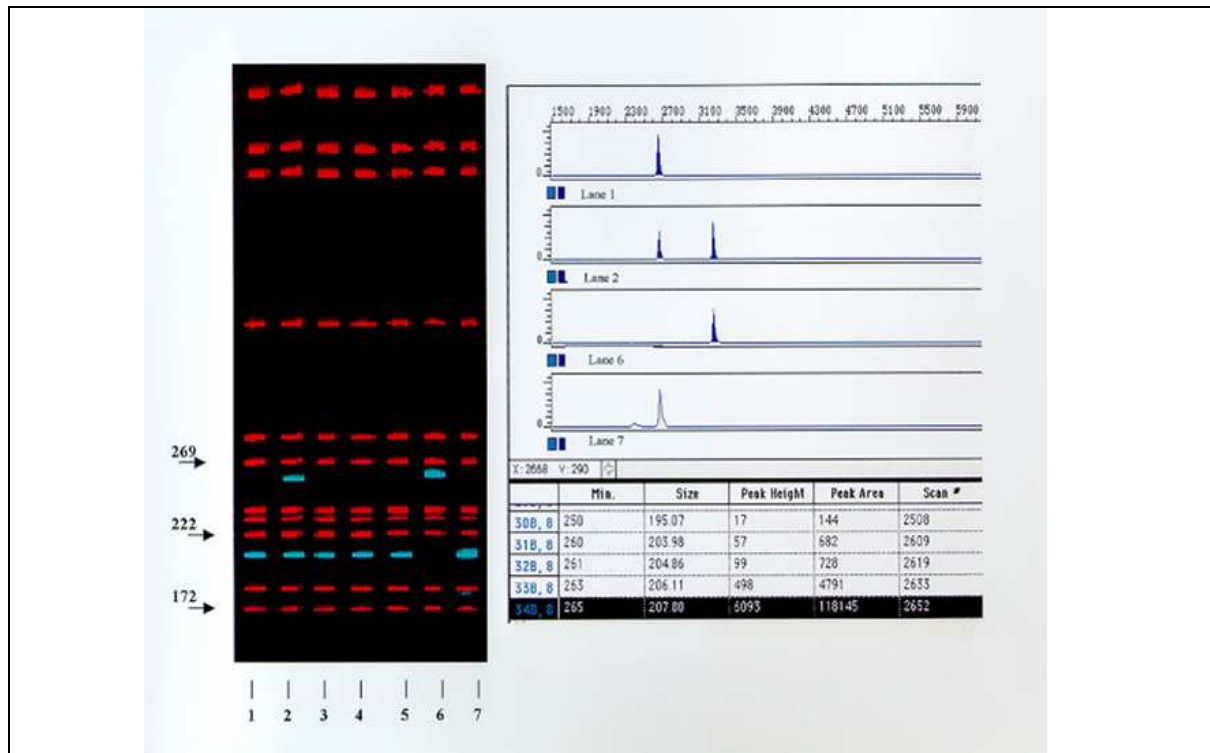


**Abbildung 21: PCR zum spezifischen Nachweis der Insertion 1290ins52**

Mit dem chimeren internen Primerpaar kann in einer „nested“-PCR die Insertion 1290ins52 spezifisch nachgewiesen werden, es entsteht ein 90 bp Fragment. Das externe Primerpaar produziert zwei unterschiedliche PCR-Fragmente, ein 259 bp großes mit der Insertion und ein 207 bp großes ohne die Insertion. Der Sense ext.-Primer ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, zwischen den beiden Fragmenten kann mit Genescan-Analyse differenziert werden.

Mit Genescan-Analyse wurde das fluoreszenzmarkierte PCR-Produkt ausgewertet, Abbildung 22. Bei den gesunden Kontrollpersonen wurden bevorzugt die kürzeren 207 bp großen Fragmente amplifiziert, was auf eine überwiegende Expression der regulär gepleißten RNA hindeutet. Patient #3 zeigt dagegen beide Fragmente (207bp, 259bp) in

gleicher Intensität, so dass in den Leukämiezellen von einer Überexpression der alternativ gespleißten RNA auszugehen ist.



**Abbildung 22: Genescan-Analyse zur semiquantitativen Abschätzung der Expression von 1290ins52 Bahn 2 Patientenprobe #3. Es sind zwei Fragmente (blau) zu erkennen, ein 259 bp großes mit der Insertion und ein 207 bp großes ohne die Insertion. Sie erscheinen im schwarz-weißen Ausdruck etwas heller als die Banden des Längenstandards (rot) und liegen unterhalb der Marke 269 bp und 222 bp. Im nebenstehenden Diagramm ist die Intensität des Fluoreszenzsignals als Fläche dargestellt. Bahn 1 und 3-5 gesunde Kontrollpersonen. Bahn 6 Positivkontrolle für die Insertion. Bahn 7 Negativkontrolle.**

Im Hinblick auf einen fehlerhaften Spleißvorgang wurden die Verzweigungs-, Spleißdonor- und Spleißakzeptorstellen bei Patient #3 und 12 gesunden Kontrollpersonen auf Mutationen hin untersucht. Es konnten keine Aberrationen bei den 10 untersuchten DNA-Klonen von Patient #3 und den gesunden Kontrollen gefunden werden.

Um den Ursprung der Insertion 1993ins74 von Patientenprobe #1 zu klären, wurde wie zuvor für 1290ins52 beschrieben vorgegangen. Die Insertion konnte dem ca. 60 kb großen Intron 17 zwischen Exon 17 und 18 zugeordnet werden. Die 74 bp-Sequenz



---

stimmt reverskomplementär mit den Nukleotiden 128142-128215 des BACs 205e20 (GenBank accession no. 004782) überein. Mit einer spezifischen „nested“-PCR konnte die Insertion auch bei mehreren gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. In den umgebenden Intronsequenzen wurden die Spleißdonor- und Spleißakzeptorstellen sowie die potentiellen Verzweigungsstellen identifiziert. Auch die Herkunft der Insertion 1993ins74 ist am ehesten durch einen alternativen Spleißvorgang zu erklären.

#### **4.2.5. AF5-Aberrationen der Zelllinie MUTZ-1**

In 3 von 3 sequenzierten C2-Fragmenten der Zelllinie MUTZ-1 sind 352 bp ab Nukleotidposition 939 deletiert, nt939(del352). Eine Spleißstelle zwischen Nukleotid 938/939 wurde in keiner anderen Patientenprobe oder Kontrolle gefunden. Die Deletion bewirkt eine Leserasterverschiebung mit Generierung eines Stopp-Kodons zwischen Nukleotid 990 und 992. Nachuntersuchungen zu dieser möglicherweise pathogenetisch bedeutsamen AF5-Aberration stehen noch aus.

## 5. Diskussion

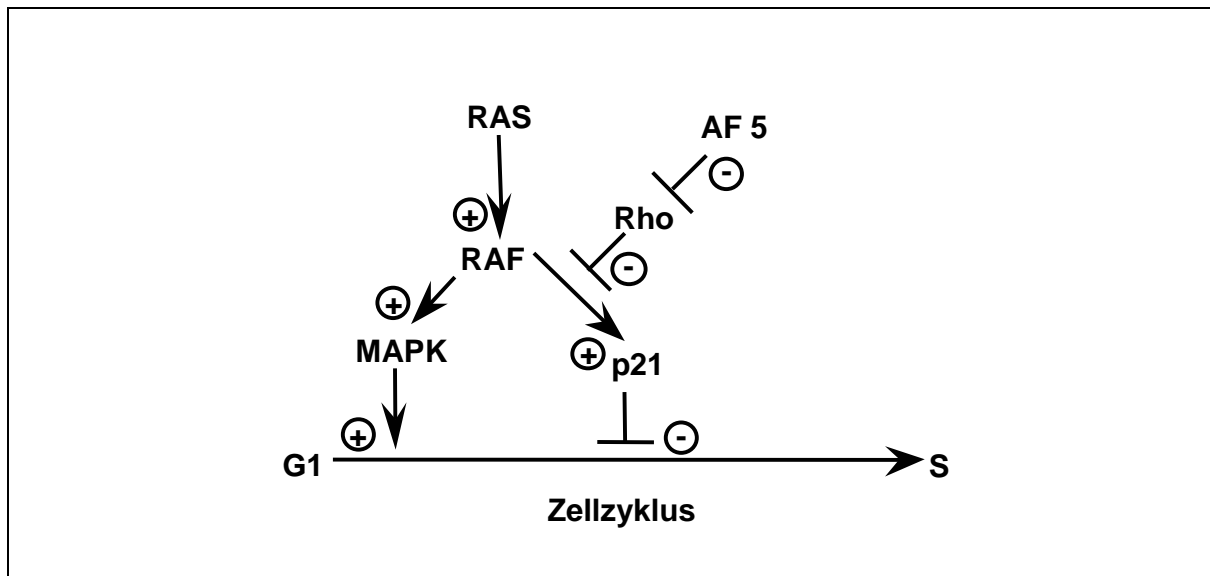
Bojesen S. und Borkhardt A. [116, 117] konnten dank eines Einzelfalls mit der seltenen Translokation t(5;11)(q31;q23) AF5 als neues MLL-Fusionsgen in der chromosomalen Region 5q31 identifizieren und klonieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die Expression und cDNA-Sequenz des AF5-Gens untersucht. Für die Expressionsanalyse in verschiedenen humanen Leukämiezelllinien wurde ein nicht-radioaktives Northern Blot Verfahren etabliert. Die Sequenzanalyse bei Patienten mit AML und der Zelllinie MUTZ-1 (MDS) diente der Bestätigung des „two hit“-Modells nach Knudson, wonach der biallelische Funktionsverlust eines Tumorsuppressorgens zur Entstehung maligner Tumoren führt. Es wurden mehrere potentiell pathogenetisch bedeutsame Mutationen entdeckt, die Auswirkungen auf die Proteinstruktur von AF5 haben können. Ferner konnten durch Sequenzierung zahlreicher Spleißvarianten Hinweise auf die genomische Struktur von AF5 gewonnen werden.

### 5.1. Biologische Funktion von AF5

Die zelluläre Signaltransduktion beschreibt die Übertragung extrazellulärer Signale in das Zellinnere. Ausgelöst durch unterschiedliche spezifische Signalmoleküle wird eine proteinvermittelte Kaskade an zellulären Prozessen ausgelöst, die in ihrer Endstrecke regulierend auf die Transkription, Translation, Stoffwechselaktivität, Proliferation oder das Zytoskelett etc. wirken. Bei zahlreichen Signaltransduktionswegen spielen GTP bindende Proteine (G-Proteine) eine zentrale Rolle. G-Proteine sind als eine Art „molekularer Schalter“ an der Signalvermittlung beteiligt und stoßen in aktiver GTP-gebundener Form weitere Kettenreaktionen an. Sie werden durch intrinsische GTPase-Aktivität dephosphoryliert und in die inaktive GDP-gebundene Form überführt [161]. Der Wechsel zwischen aktiver und inaktiver Form wird von anderen Proteinen beeinflusst. GTPase aktivierende Proteine (GAP) stimulieren die intrinsische Aktivität zur GTP-Hydrolyse. „Guanosin Austauschfaktoren“ (guanine nucleotide exchange factors, GEFs) vermitteln die Abspaltung des GDP, damit eine erneute GTP-Bindung erfolgen kann. Die Familie der RAS Proteine sind prototypische G-Proteinen [162], die über die RAS-MAPK Signalkaskade eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion, Zellproliferation und malignen Transformation spielen.

Das AF5-Gen konnte mit Hilfe einer Einzelfallanalyse als Fusionspartner von MLL isoliert werden. AF5 ist das humane Homologon zu dem von Hildebrand et al. klonierten tierischen GRAF-Gen [120]. Sie untersuchten die durch Integrin-Zelloberflächenrezeptoren vermittelte Signaltransduktion, die an der Organisation des Actin-Zytoskeletts und an der Regulation der Genexpression beteiligt ist. Mit Expressionsklonierung gelang ihnen die Identifikation einer cDNA aus Hühnerembryonen, welche ein GAP kodiert. Sie bezeichneten das Protein GRAF, da es durch Bindung an die Protein-Tyrosin-Kinase FAK oder pp125<sup>FAK</sup> die GTPase-Aktivität der G-Proteine RhoA und Cdc42 in vitro stimuliert („GTPase Regulator Associated with FAK“ = GRAF). Die GAP-Domäne von AF5 weist eine hohe Übereinstimmung zu BCR auf. BCR ist das bisher einzige GAP kodierende Gen, welches an einer malignen hämatologischen Erkrankung beteiligt ist [163]. Das bei der CML, ALL und selten auch bei der AML nachzuweisende Philadelphiachromosom (t(9;22)(q34;q11)) fusioniert das BCR mit dem ABL Gen [164, 165]. In beiden Hybridproteinen BCR/ABL und MLL/AF5 fehlt die funktionell wichtige GAP Domäne [117, 166].

Das AF5-Gen vermittelt seine GTPase aktivierende Funktion über die Bindung an die Tyrosinkinase FAK. Auf molekularer Ebene entsteht die Bindung zwischen AF5 und der C-terminalen Domäne von FAK über die SH3-Domäne. AF5 stimuliert die intrinsische GTPase-Aktivität von RhoA, das durch Dephosphorylierung von GTP zu GDP inaktiviert wird. AF5 agiert somit als negativer Regulator von RhoA. RhoA wiederum reguliert p21 negativ [167], ein bekannter Inhibitor des Zellzyklus in Zellen mit onkogen transformiertem RAS [168, 169, 170]. Aus den Teilschritten der RAS-MAPK Signalkaskade, an denen AF5 beteiligt ist, kann somit folgendes in Abbildung 23 zusammengefasstes Modell abgeleitet werden.



**Abbildung 23: Hypothetisches Modell der AF5-Funktion in der RAS vermittelten Signalkaskade**  
**MAPK, mitogen aktivierte Proteinkinase.**

Ein Funktionsverlust von AF5 würde demnach zu einer erhöhten Aktivität von RhoA führen. RhoA supprimiert p21. Mit dem Ausbleiben der inhibitorischen Funktion von p21 auf den Zellzyklus würde der mitogene Arm der RAS-MAPK vermittelten Signalkaskade dominieren. Dies würde im Zellzyklus den Übergang von der G1- in die S-Phase fördern. Taylor et al. zeigten *in vivo*, dass AF5 RhoA in transfizierten Swiss 3T3 Zellen negativ reguliert, auf Cdc42 jedoch keinen Einfluss ausübt [171]. Die GAP-Domäne des AF5-Proteins spielt dabei eine funktionell entscheidende Rolle.

## 5.2. Expressionsanalyse von AF5

Für die Expressionsanalyse von AF5 in humanen Geweben und verschiedenen humanen Leukämiezelllinien wurde ein nicht-radioaktives Northern Blot Verfahren eingesetzt. Der Northern Blot ist eine arbeits- und zeitaufwendige Methode, die insbesondere wegen der vielen Teilschritte und wegen des vulnerablen Untersuchungsmaterials störanfällig ist. Im klassischen Verfahren werden die Sonden radioaktiv markiert. Häufig wird das Isotop Phosphor-32 mit einer Halbwertszeit von 14,3 Tagen verwendet. Daraus lassen sich die Nachteile der radioaktiven Methode ableiten: Eine begrenzte Haltbarkeit der markierten Sonden, die potentielle Gesundheitsgefährdung und zum Teil mehrere Tage dauernde Filmbelichtungszeiten. Es müssen gewisse Vorsichtsmaßnahmen und Verhaltensregeln, die sich aus der

Strahlenschutzverordnung ableiten, eingehalten werden. Eine Zulassung des Labors für den Umgang mit radioaktivem Material ist erforderlich. Mit digoxigenin-markierten Sonden können diese Probleme umgangen werden, für die Nachweisreaktion ist jedoch ein weiterer Arbeitsschritt (Detektion) notwendig. Die Sensitivität nicht-radioaktiver Northern Blots wird maßgeblich von den Hybridisierungs- und Detektionsbedingungen bestimmt [155]. In vorliegender Arbeit wurden drei unterschiedliche Varianten für Hybridisierung und Detektion miteinander verglichen.

### 5.2.1. Vergleich der Hybridisierungs- und Detektionsprotokolle

Hilfestellung bei der Auswahl einer der drei vorgestellten Protokollvarianten (siehe Kapitel 3.9.8) soll folgende Kostenanalyse geben. Die Varianten nach Roche und Yang/Kain wurden mit kommerziell erhältlichen Komponenten durchgeführt. Für die Variante nach Engler-Blum wurden Puffer und Lösungen aus den Grundsubstanzen hergestellt. Grundlage des Vergleichs sind die Hybridisierungs- und Detektionskosten von 10 Northern Blots mit je 150 cm<sup>2</sup> Fläche. Die Preise der Grundsubstanzen, Kits und Einzelkomponenten wurden den Onlinekatalogen der Hersteller Roche und Sigma/Aldrich entnommen (Stand November 2003) oder per Email erfragt (Clontech). Von der Kostenanalyse wurden Arbeitsschritte ausgenommen, die bei allen Varianten gleich durchgeführt wurden, zum Beispiel Sondensynthese, RNA-Isolation, Elektrophorese und Northern Blot.

Protokoll	Hybridisierungspuffer	Detektion
Roche (Basel, Schweiz)	DIG Easy Hyb™ ca. 123,00 €	ca. 84,00 €
Yang/Kain (Clontech, Palo Alto, USA)	ExpressHyb™ ca. 70,00 €	Protokoll wie Roche ca. 84,00 €
Engler-Blum	Chruchbuffer ca. 5,50 €	ca. 24,50 €

**Tabelle 15: Kostenanalyse der Hybridisierungs- und Detektionsprotokolle**

**Grundlage der Kostenberechnung sind 10 Hybridisierungen und Detektionen einer 150 cm<sup>2</sup> großen Membran.**

Mit allen drei Varianten konnten ENX-1 oder AF5 spezifische Transkripte nachgewiesen werden. Die Sensitivität der Methode nach Roche reicht für ENX-1 Transkripte bis 1 µg Gesamt-RNA und 0,1 µg mRNA (siehe Abbildung 9). Mit AF5 wurden keine RNA-

Verdünnungsreihen hybridisiert, so dass ein direkter Sensitivitätsvergleich der Protokolle nicht möglich ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Sensitivität der Protokolle nach Engler-Blum und Yang/Kain vergleichbar ist. In Zelllinien mit schwacher AF5-Expression kann mit beiden Methoden ein Transkript detektiert werden (REH, HL-60,) und AF5-Transkripte sind in den gleichen Zelllinien unter der Nachweisgrenze (K-562), siehe Abbildung 10 und Abbildung 14.

Das Protokoll von Engler-Blum ist mit Abstand die günstigste Variante, jedoch auch die mit dem größten Arbeitsaufwand. Puffer und Lösungen für Hybridisierung müssen aus Einzelkomponenten hergestellt werden, die Gefahr der RNA-Degradierung ist höher als bei gebrauchsfertigen Komponenten. Wird die Durchführung zahlreicher Northern Blots geplant, ist aus Kostengründen die Etablierung des Engler-Blum Protokolls zu erwägen. Werden nur Einzelexperimente durchgeführt, stellt das DIG-System von Roche mit gebrauchsfertigen Komponenten von der Sondensynthese bis zur Detektion eine deutliche Arbeitserleichterung dar. Ein Kompromiss in Bezug auf Kosten und Arbeitsaufwand wäre die Kombination aus Hybridisierung nach dem Engler-Blum Protokoll und Detektion mit den Komponenten von Roche. Inwieweit diese Kombination kompatibel ist und vergleichbare Ergebnisse zeigt muß jedoch erst geprüft werden.

Die Hybridisierung mit ExpressHyb bietet den Vorteil einer deutlich reduzierten Hybridisierungsdauer, 1-6 Stunden gegenüber mindestens 12 Stunden bei den anderen Protokollen. Aufgrund der hohen Viskosität von ExpressHyb ist die Handhabung gegenüber den anderen Hybridisierungslösungen schwieriger. So kam es beim Wechseln der Membran von der Prähybridisierung zur Hybridisierung leicht zu einem Umschlagen und Verkleben der Enden der Membran oder es war deutlich schwerer, die Membran luftblasenfrei für die Hybridisierung einzuschweißen.

Mehrere Northern Blot Experimente schlugen mit jeder Protokollvariante fehl. Bei Kontrolle der Einzelschritte (siehe Kapitel 3.9.7) konnte die mögliche Ursache am ehesten auf die Hybridisierung eingegrenzt werden. Die Hybridisierung wurde in einem ca. 30 x 60 cm messendem Wasserbecken mit automatischer Wärmeregulierung durchgeführt. Bei einer externen Nachmessung der Temperatur mußte festgestellt werden, dass die eingestellte Soll-Temperatur um bis zu 5 °C schwankt. Eventuell ist darin auch die Ursache für das Misslingen der Northern Blot Experimente zu suchen.

Um diese Unsicherheit zu vermeiden, sollte wenigstens versuchsweise das Protokoll mit einem speziellen Hybridisierungssofen durchgeführt werden.

### 5.2.2. AF5-Expression

AF5 ist das humane Homologon zu GRAF, welches ursprünglich von Hildebrand et al. [120] aus Hühnerembryozellen isoliert wurde. In der Northern Blot Analyse beschreiben die Autoren ein ca. 5,0 kb großes Transkript, welches in verschiedenen Hühnergeweben, jedoch vor allem in Gehirn und Leber exprimiert wird. Bei der weiteren Charakterisierung von GRAF bestätigte sich dieser Befund [172]. In Mausgeweben fielen als Haupttranskript eine ca. 8,5 kb große Bande auf, die stark in Gehirn und Herzmuskelgewebe exprimiert wird. Ferner wurde weniger kräftig ein ca. 4,5 kb Transkript in allen Geweben (Herz, Gehirn, Milz, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere, Hoden) exprimiert. In einzelnen Geweben konnten weitere Transkripte von 7 kb, 2,5 kb und 2 kb Größe detektiert werden.

Die Ergebnisse des Northern Dot Blots zeigen, dass AF5 in einem breiten Spektrum von humanen Geweben exprimiert wird. Auffallend ist die deutliche Expression im Kleinhirn und in verschiedenen Regionen der Großhirnrinde im Gegensatz zu subkortikalen Kerngebieten, Thalamus, Medulla oblongata und Rückenmark. Im Unterschied zu adultem und fetalem Herzmuskelgewebe ist in der Skelettmuskulatur kein AF5-Transkript nachzuweisen. Die kräftige Expression in peripheren Leukozyten im Vergleich zum Knochenmark deutet auf eine zunehmende Bedeutung von AF5 in höher differenzierten Zellformen hin. Weitere stark exprimierende Gewebe sind Plazenta und Colon. In den unterschiedlichen fetalen Geweben mit Ausnahme von fetalem Herz wird AF5 nur schwach exprimiert. Im Vergleich zu Hildebrands Ergebnissen mit Hühnergewebe sei das Fehlen eines AF5-Transkriptes in humanem Lebergewebe erwähnt.

Borkhardt A. und Bojesen S. weisen für das AF5-Gen ein 9,5 und 4,4 kb Transkript in verschiedenen menschlichen Geweben, Tumorzelllinien und Geweben des Immunsystems nach [116, 117]. Hohe Expressionslevel für das 9,5 kb Transkript sind in Gehirn, Herzmuskel, Plazenta, Bronchialkarzinom und kolorektalem Adenokarzinom zu finden, wogegen das 4,4 kb Transkript außer in Plazenta, Bronchialkarzinom, kolorektalem Adenokarzinom auch in Vollblut stärker exprimiert wird.

Auch bei der Expressionsanalyse von AF5 in verschiedenen humanen Leukämiezelllinien wurden die von Borkhardt und Bojesen gezeigten Haupttranskripte nachgewiesen. In den Zelllinien MONO-MAC-6 und ML-2 fallen jedoch zwei weitere Transkripte größer 9,5 kb auf. Sie sind am ehesten als zusätzliche Spleißvarianten von AF5 oder unspezifische Banden zu deuten, da beide Zelllinien das zu erwartende 9,5 kb und 4,4 kb Transkript exprimieren und keine 5q-Aberration im Karyotyp besitzen. Aberrante Transkripte kleiner 4,4 kb wurden in keiner der untersuchten Zelllinien festgestellt.

NALM-6 exprimiert AF5, als einzige Zelllinie mit 5q-Aberration, nicht. Eine pathogenetische Bedeutung dieses Befundes ist dennoch unwahrscheinlich. Aus dem  $\beta$ -Actinsignal der Kontrollhybridisierung ist zu folgern, dass nur eine geringe RNA-Menge aufgetragen wurde und Ursache des fehlenden Signals ist. Wenn AF5 in den NALM-6 Zellen darüber hinaus nur schwach exprimiert wird, ist die Sensitivität des Northern Blots im Vergleich mit anderen Methoden der Expressionsanalyse (z. B. RT-PCR) zu gering um ein Transkript zu detektieren. Nicht nachweisbare Transkripte von AF5 in K-562 und CCEM-SENSIBEL, Zelllinien ohne 5q-Aberration, sind ähnlich zu interpretieren. Gegen ein fehlendes Transkript in der Zelllinie K-562 spricht zudem, dass Bojesen die AF5-cDNA-Sequenz aus K-562 klonierte [116].

Für die Northern Blot Analyse sind zu große RNA-Mengen notwendig, um auch die in dieser Arbeit untersuchten Patientenproben zu analysieren. Der 5'-Nuklease-Assay [173] bietet eine Alternative, die geringe Sensitivität des Northern Blots bei der Expressionsanalyse von Genen zu umgehen. Diese Methode wurde in Form der „Taqman-Technologie“ (Firma Perkin-Elmer) vor kurzem in der Arbeitsgruppe eingeführt.

### **5.3. AF5-Sequenzierung**

Die Sequenzierung erfolgte mit dem Ziel eine bi-allelische Inaktivierung von AF5 bei Patientenproben mit AML und der Zelllinie MUTZ-1 (MDS) nachzuweisen und damit das „two hit“-Modell nach Knudson für Tumorsuppressorgene zu bestätigen. Zu diesem Zweck wurden Proben ausgesucht, die im Karyotyp 5q-Aberrationen aufwiesen und somit bereits ein AF5-Allel verloren hatten. Die Untersuchungen von Bojesen [116] zeigten ferner, dass alle Proben aberrante Banden im Southern Blot besaßen. In der



FISH-Analyse hatten die Proben #1, #2 und #3 nur ein AF5-Signal, während Probe #4 zwei Signale und MUTZ-1 drei Signale vorwies.

In drei von vier untersuchten Patientenproben und der Zelllinie MUTZ-1 konnten relevante cDNA-Sequenzveränderungen festgestellt werden. Im Übrigen konnte mit dem Nachweis von zahlreichen Spleißvarianten auf die Exon/Intron-Struktur von AF5 geschlossen werden. In den folgenden Abschnitten werden die AF5-Aberrationen und deren mögliche Auswirkungen auf Proteinebene beschrieben.

### **5.3.1. AF5-Spleißvarianten**

RNA-Spleißen ist ein physiologischer Vorgang, bei dem aus eukaryonten Genen funktionstüchtige RNA-Transkripte erstellt werden. Aus den Primärtranskripten werden die nicht-kodierenden Sequenzen (Introns) herausgeschnitten und die kodierenden Sequenzen (Exons) miteinander verbunden (Spleißen). An diesem komplexen Ablauf, der durch trans-aktive Faktoren (Proteine) moduliert werden kann, sind cis-aktive Nukleinsäuresequenzen (Spleißdonor-, Spleißakzeptor-, Verzweigungsstellen) und kleine Ribonukleoproteine aus dem Kern (snRNP) direkt beteiligt.

Alternatives Spleißen findet als konstitutiver Prozess in unterschiedlichen Geweben statt, es kann jedoch auch Folge eines bestimmten Entwicklungsstadiums oder einer physiologischen Anpassungsreaktion auf veränderte Umweltbedingungen sein. Die Auswirkungen alternativen Spleißens reichen von der Regulierung der Genexpression bis zur Produktion unterschiedlicher Proteinisoformen mit zum Teil gewebe-spezifischen Funktionen [174].

Während der AF5-Sequenzierung fielen zahlreiche im Vergleich zur Referenzsequenz kürzere Fragmente auf, denen interstitiell mehr oder weniger große Abschnitte fehlten. Diese wurden als Spleißvarianten interpretiert sofern gleiche Varianten bei Patienten und gesunden Kontrollen auftraten, die Restsequenz der Varianten mit der Referenz übereinstimmte, es zu keinen Kodonveränderungen an den Grenzen der Exons kam und keine Leserasterverschiebung daraus resultierte. Ohne Kenntnis der Ursache können die gefundenen Spleißvarianten durch den Vorgang des Exon-Überspringens (Skipping) erklärt werden. Die Spleißstellen markieren demnach Exon/Exon-Grenzen in der cDNA und geben Hinweise auf die genomische Struktur von AF5, siehe Abbildung 18.

Die Ergebnisse bildeten die Grundlage weiterführender Untersuchungen mit genomischer DNA. Von den angrenzenden Exons wurden das Intron 8 und partiell auch das Intron 16 bereits für diese Arbeit sequenziert und mit dem Nachweis der Spleißstellen die Exon/Intron-Grenzen aufgezeigt.

### **5.3.2. Intron-Insertionen durch aberrantes Spleißen**

Häufige Ursache eines aberranten Spleißvorgangs sind Punktmutationen in den konservierten Sequenzen der Spleißdonor-, Spleißakzeptor- oder Verzweigungsstellen. Ganze Exons können aus diesem Grund übersprungen werden und in der reifen RNA fehlen. Intronsequenzen können in die kodierende Sequenz übernommen werden, zu einer Leserasterverschiebung und/oder Generierung von Stopp-Kodons führen. Daraus resultieren grundlegende Veränderungen der Aminosäuresequenz mit potentiell pathogener Bedeutung für die Proteinfunktion.

Demgegenüber können aberrante Spleißstellen durch Mutationen kryptischer Spleißstellen (Sequenzen, die natürlichen Spleißstellen ähnlich sind) entstehen [175]. Diese beeinflussen meist dann den Spleißvorgang fehlerhaft, wenn sie in der Nähe natürlicher Spleißstellen liegen. Andere bisher weniger häufig beschriebene Ursachen aberranten Spleißens sind Mutationen, die eine veränderte Sekundärstruktur der prä-mRNA bewirken [176], Mutationen in Exonsequenzen, die zum Überspringen des Exons führen oder eine gestörte Aktivität trans-agierender Faktoren wie Proteine, die den Ablauf modulieren [177].

Drei unterschiedliche aberrante Spleißvarianten von AF5 wurden bei Patient #1 und #3 entdeckt. Deren mutmaßliche Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz sind in Abbildung 24 dargestellt.

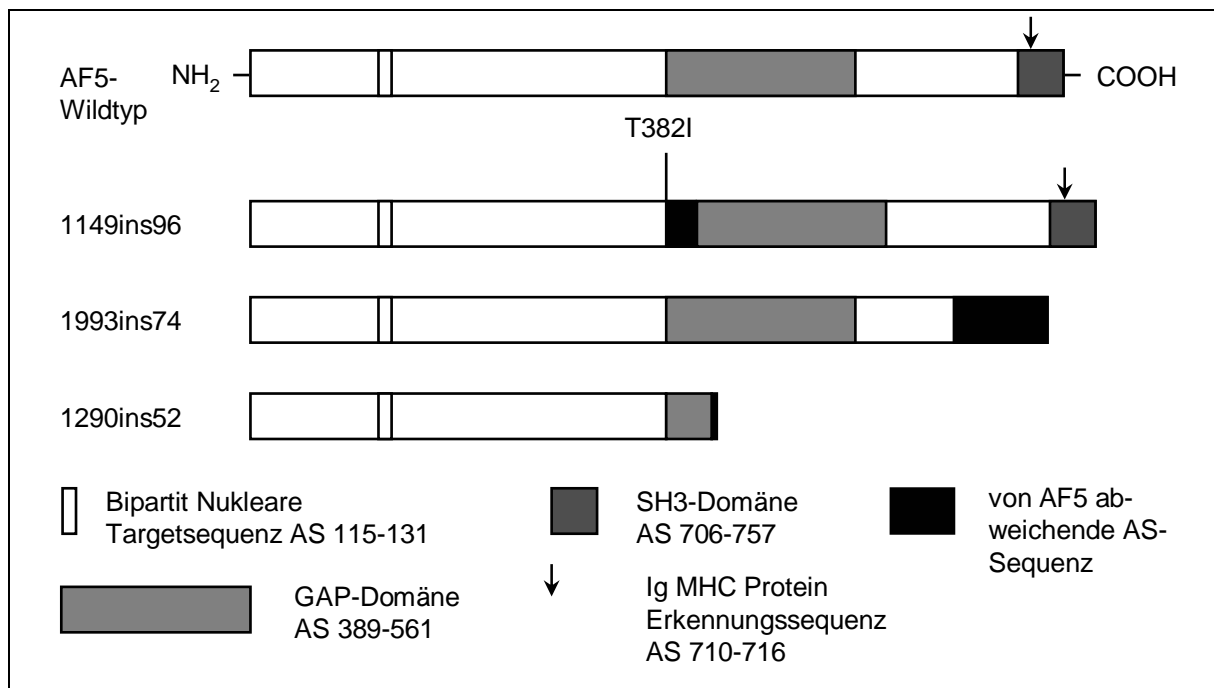
Mit 1149ins96 werden kurz vor der GAP-Domäne 32 Aminosäuren in das AF5-Protein eingefügt. An der Verbindungsstelle von Exon 6 und 1149ins96 ändert sich das Kodon von ACT nach ATA. Durch diese Missensmutation wird Threonin an Position 382 in der Aminosäuresequenz durch Isoleucin ersetzt (T382I). Bekannte Proteinmotive oder Domänen wurden nach einem Datenbankvergleich mit PROSITE in der neuen Aminosäuresequenz nicht gefunden.

Die Insertion 1993ins74 verschiebt das Leseraster. Die Aminosäuresequenz von AF5 ist ab Position 664 verändert. Ein Stopp-Kodon an Nukleotid 2310-2312 terminiert die

Translation vorzeitig. Im aberranten AF5-Protein fehlt die SH3-Domäne und die Immunglobulin-MHC-Erkennungssequenz. Wie oben erläutert ist die SH3-Domäne für die Interaktion mit der FAK-Tyrosinkinase von funktioneller Bedeutung.

Eine Leserasterverschiebung wird auch durch 1290ins52 verursacht. Die Translation wird durch ein Stopp-Kodon (1305-1307) in der Insertion beendet. Die GAP-Domäne fehlt im aberranten Protein bis auf die ersten 40 Aminosäuren. Die GAP-Domäne ist die zentrale Funktionseinheit im AF5-Protein.

Alle drei Insertionen sind an Exon/Intron-Grenzen eingeschoben. Die Insertionen 1993ins74 und 1290ins52 konnten dem benachbarten Intron zugeordnet werden. Sie sind von regulären Spleißstellen umgeben.



**Abbildung 24: Auswirkungen der Intron-Insertionen auf die Aminosäuresequenz von AF5**

Durch eine Missensemutation an der Verbindungsstelle von Exon 6 und 1149ins96 entsteht ein nichtkonservativer Aminosäureaustausch, Threonin (polar, ungeladen) 382 in der Aminosäuresequenz wird durch Isoleucin (unpolar) ersetzt (T382I). Die schwarzen Balken in der Abbildung zeigen Abweichungen von der Aminosäuresequenz durch die aberranten Spleißvarianten an.

Mit PCR wurden alle Insertionen nicht nur in den Patientenproben, sondern auch bei gesunden Kontrollen nachgewiesen. Eine kompetitive semiquantitative RT-PCR zeigte

für die Insertion 1290ins52, dass in den Kontrollproben überwiegend das regulär gespleißte Fragment exprimiert wird, während in der Patientenprobe #3 das aberrant gespleißte Fragment überexprimiert wird. Einen vergleichbaren Befund beschreiben Wallace et al. [178] für das Tumorsuppressorgen NF1. In vier Krankheitsfällen von Neurofibromatose entdeckten sie eine das NF1-Gen verkürzende Insertion direkt vor der GAP-Domäne. Die Insertion war in Proben gesunder Kontrollen ebenfalls nachweisbar, sie wurde im Vergleich zum normalen Transkript jedoch schwach exprimiert. Sie folgerten daraus, dass für die Pathogenese der Erkrankung nicht allein ein qualitativ verändertes Transkript verantwortlich ist, sondern auch die Relation von aberrantem zu regulärem Transkript bedeutsam ist.

Die Insertion 1290ins52 wurde bei Patient #3 und den gesunden Kontrollen auf Spleißmutationen in genomischer DNA untersucht. In 10 Klonen des Patienten und bei 12 gesunden Kontrollen konnte keine Abweichung in der Konsensussequenz der Spleißstellen gefunden werden. Die Insertion ist daher am ehesten als alternatives Exon zu bezeichnen.

Welche Funktion besitzt ein alternatives Exon, das zu einem vermutlich nicht funktionstüchtigen Protein führt? Eine mögliche Erklärung ebenfalls anhand des NF1-Gens geben Ars E. et al. [179]. Sie entdeckten in Proben einer Familie mit Neurofibromatose eine 31 bp Insertion, die wegen Leserasterverschiebung zu einem auf 183 Aminosäuren verkürzten NF1-Protein führte. Das Vorhandensein der Insertion korrelierte jedoch nicht mit dem Auftreten der Erkrankung. Nur zwei Mitglieder der fünfköpfigen Familie waren an Neurofibromatose erkrankt, während die Insertion bei allen nachweisbar war. Sie konnten das gleiche Transkript in anderen Proben mit und ohne NF1-Phänotyp entdecken. Dabei bemerkten sie, dass das aberrante Transkript in Abhängigkeit von der Dauer zwischen Blutabnahme und RNA-Isolation in den Proben vorhanden war. Sie konnten beweisen, dass das Transkript mit dem alternativen Exon durch Kältestress induziert wurde, im Cytoplasma wieder zu finden war und der mRNA-Fraktion angehörte. Sie vermuteten, dass unter Kältestress die Sekundärstruktur der prä-RNA so verändert wurde, dass eine Interaktion zwischen Spleißosom und den Spleißstellen des alternativen Exons möglich wurde, die unter physiologischen Bedingungen nicht zustande kommen kann. Als alternative Erklärung führten sie eine

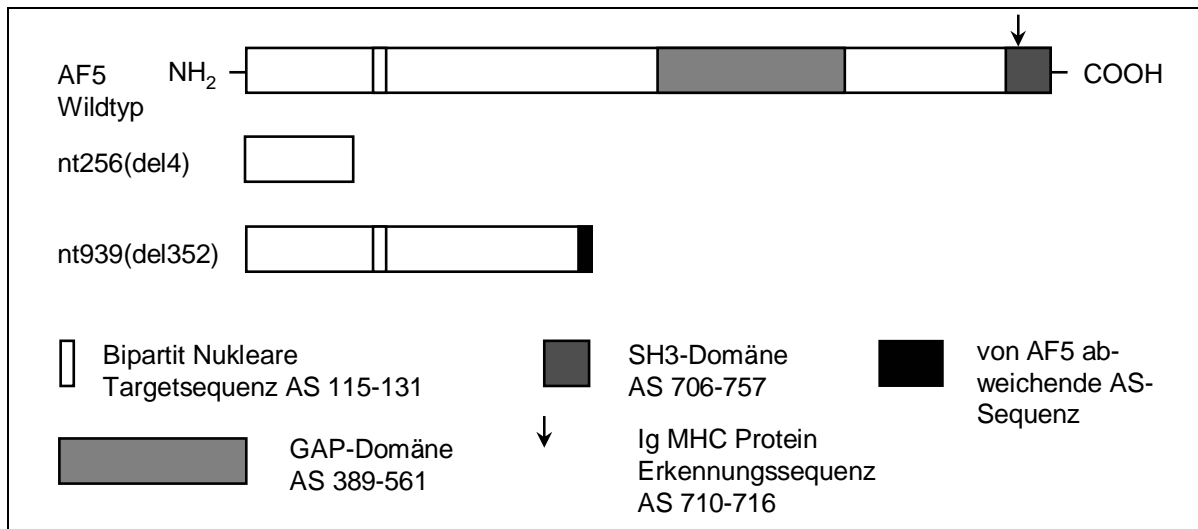
unter Kältestress abweichende Aktivität trans-agierender Faktoren, die den Spleißvorgang modifizieren, an.

In Bezug auf AF5 liegt folgende Interpretation nahe. Ein alternatives Exon, das zur Inaktivierung des Gens führt, verlagert das Gleichgewicht auf die mitogene Seite der RAS-MAPK Signalkaskade. Je nach Funktionszustand oder Entwicklungsphase der Zelle oder des Organismus könnte dies einen physiologischen Vorgang darstellen und zum Beispiel den erhöhten Verbrauch an Leukozyten durch eine angehobene Zellteilungsrate ausgleichen. In der Pathogenese der Leukämogenese könnte die Deregulierung solch einer physiologischen Anpassungsreaktion eine Rolle spielen.

### **5.3.3. Deletionen in der AF5-cDNA-Sequenz**

Die Deletion von 4 bp nt256(del4) im Fragment C1 der Patientenprobe #1 verursacht durch Leserasterverschiebung ein Stopp-Kodon an Nukleotid 312-314 in der korrespondierenden AF5-cDNA-Sequenz. Ein von diesem Transkript abgeleitetes AF5-Protein ist auf 102 Aminosäuren verkürzt, die vier bekannten Proteinmotive fehlen.

Alle drei sequenzierten Klone von Fragment C2 der Zelllinie MUTZ-1 sind um 352 Nukleotide verkürzt. Deletiert sind die Basenpaare 939 bis 1290 in der AF5-cDNA-Sequenz. Auch in diesem Fall entsteht durch Leserasterverschiebung ein auf 328 Aminosäuren verkürztes Protein. Die Aminosäuresequenz ist ab Position 312 verändert, im aberranten Protein fehlen bis auf die bipartit nukleare Targetsequenz alle bekannten Strukturmotive.



**Abbildung 25: Auswirkungen der Deletionen auf die Aminosäuresequenz von AF5**

Die Deletion nt256(del4) wurde zunächst in 2 von 9 sequenzierten Klonen festgestellt. Um diesen Befund zu bestätigen, wurde die PCR und Klonierung des C1-Fragments wiederholt und 33 weitere Klone auf diese Aberration untersucht. In allen nachuntersuchten Klonen zeigte sich die Wildtyp Sequenz. Als Ursache der Deletion muß am ehesten ein PCR-Artefakt angenommen werden. Die verwendete DNA-Polymerase (AmpliTaQ Gold<sup>TM</sup>, Perkin Elmer) besitzt keine Korrekturfunktionen und führt bei in vitro Replikation von DNA mit der PCR zu einer relativ hohen Kopierfehlerrate. Das Endprodukt der PCR setzt sich somit aus einem Gemisch höchst ähnlicher aber nicht identischer DNA-Kopien zusammen. Für die Sequenzierung wurde die cDNA anschließend kloniert. Während der Transformation wird ein einzelnes Molekül aus dem PCR-Gemisch ähnlicher Fragmente selektiert und in vivo mit hoher Präzision repliziert. Da die gleiche Deletion in keinem der nachuntersuchten Klone wiederentdeckt wurde, ist eine fehlerhafte Replikation während der PCR als Ursache anzunehmen.

Nachuntersuchungen zur Deletion nt939(del352) stehen aus. Die Größe des deletierten Abschnitts schließt einen PCR-Artefakt oder einen Sequenzierfehler als Ursache nahezu aus. Der Verlust von 352 bp ist am wahrscheinlichsten mit einem aberranten Spleißvorgang zu erklären. Die Spleißstelle an Position 1290/91 wurde bereits durch Sequenzierung des Intron 8 belegt. Eine Spleißstelle zwischen Nukleotid 938/39 wurde in keiner der untersuchten Proben beobachtet. Bis zur Position 938 stimmt die Sequenz der aberranten Klone mit der von AF5 überein. Zur weiteren Abklärung sollte genomische DNA von MUTZ-1 sequenziert werden. Die Sequenz des deletierten

Abschnittes beginnt mit GGA. Durch eine Punktmutation zu GTA kann eine Spleißdonorstelle im Exon entstehen und Ursache für den aberranten Spleißvorgang sein.

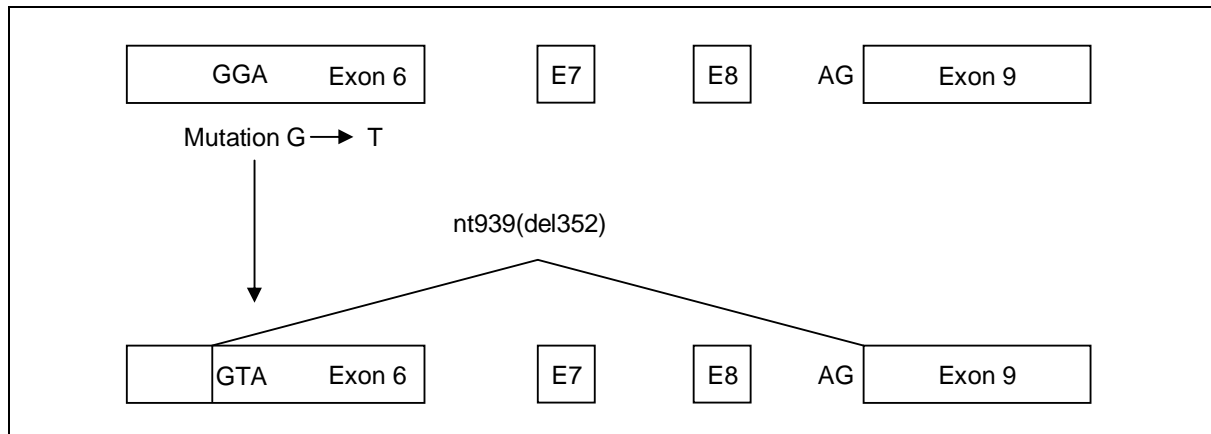


Abbildung 26: Mutation einer kryptischen Spleißdonorstelle im Exon 6

#### 5.3.4. Missensmutation in der GAP-Domäne von AF5

In Patientenprobe #2 wurde eine Missense-Mutation A1255G entdeckt, die zum Austausch von Asparagin durch Serin an Position 417 der Aminosäuresequenz führt. Ein Polymorphismus an dieser Position ist sehr unwahrscheinlich, da die Sequenz von 15 untersuchten Kontrollpersonen keine Abweichung vom Wildtyp ergab. Von der Mutation ist die funktionell wichtige GAP-Domäne betroffen. Asparagin an Position 417 im AF5-Protein korrespondiert mit Position 225 (Asparagin) im GRAF Protein und Position 90 (Threonin) in p50RhoGAP. p50RhoGAP ist das GTPase aktivierende Protein für G-Proteine aus der Rho-Familie. Die Analyse der Kristalstruktur von p50RhoGAP und RhoA zeigt, dass Thr-90 an der Hydrogenbindung zwischen RhoA und RhoGAP beteiligt ist [180]. Longenecker et al. vermuten, dass über Asparagin 225 im GRAF-Protein die Spezifität zu bestimmten G-Proteinen (Cdc42 und RhoA) vermittelt wird [181].

Aus beiden Untersuchungen kann für Asparagin 417 eine zentrale funktionelle Position in der GAP-Domäne des AF5-Proteins abgeleitet werden. Asparagin gehört zur Subklasse der polar, ungeladenen Aminosäuren. Die Seitenkette enthält eine Amidgruppe. Serin gehört zur gleichen Subklasse, in der Seitenkette befindet sich jedoch eine Hydroxylgruppe. Mögliche Folge der Missense-Mutation ist eine gestörte Interaktion zwischen AF5 und RhoA.

#### 5.4. Ist das „two hit“-Modell Knudsons für AF 5 bestätigt?

Die Ergebnisse dieser Arbeit ergänzen die Befunde von Bojesen und Borkhardt [116, 117]. 81% der von ihnen untersuchten Patienten mit AML/MDS und 5q-Aberration hatten nur noch ein AF5-Allel (16 von 20 Proben wurden mit FISH-Analyse untersucht, 13 von 16 zeigten ein AF5-Signal). 8 der 13 Proben mit einem AF5-Allel (61%) hatten in genomischer DNA aberrante Banden im Southern Blot als Hinweis für eine Mutation im verbleibenden AF5-Allel. Alle der in dieser Arbeit untersuchten Proben mit einem AF5-Allel und positivem Southern Blot zeigten relevante cDNA-Mutationen (Proben #1, #2, #3). Ferner konnte eine wahrscheinlich AF5 inaktivierende Deletion in der humanen Leukämiezelllinie MUTZ-1 gefunden werden. Die gesunde Kontrollperson zeigte wie erwartet außer alternativer Spleißvarianten keine Abweichung von der AF5-Referenzsequenz. Patientenprobe #4 hatte zwar die als Einschlusskriterium definierte 5q31-Aberration im Karyotyp, in der FISH-Analyse jedoch zwei AF5-Signale, cDNA-Mutationen wurden keine festgestellt.

Formal ist mit den Ergebnissen der cDNA-Sequenzierung für 3 Patienten mit AML und für die Zelllinie MUTZ-1 (MDS) das „two hit“-Modell Knudsons bestätigt. Daraus kann jedoch nicht gefolgert werden, dass AF5 ein Tumorsuppressorgen ist oder gar das lange gesuchte Tumorsuppressorgen in der chromosomalen Region 5q31.

Die cDNA-Mutationen wurden bisher nicht auf Proteinebene bestätigt. Die potentielle Funktion von AF5, Zellwachstum und -proliferation zu inhibieren, ist von seinem tierischen Homologon (GRAF) abgeleitet und bislang nicht gesichert. Wie im Falle des Retinoblastom könnte der Beweis für die vermutete Tumorsuppressorfunktion von AF5 durch in vitro Transfektionsuntersuchungen erbracht werden. 1987 konnte das Retinoblastomgen (RB) als erstes Tumorsuppressorgen von Lee WH et al. kloniert werden [182]. Durch retroviralen Gentransfer einer Wildtyp Kopie von RB in Retinoblastom- und Osteosarcomzellen konnten sie den neoplastischen Phänotyp korrigieren [183].

Gegen die Tumorsuppressor-These spricht, dass AF5 telomer von dem für AML/MDS kleinsten gemeinsam deletierten Segment der chromosomalen Region 5q31 liegt [184]. Wie in Abschnitt 1.4 beschrieben variiert das Ausmaß an 5q-Aberrationen beträchtlich, so dass möglicherweise unterschiedliche Gene pathogenetische Relevanz für Initiation und Progression dieser Erkrankungen besitzen. Es drängt sich die Frage auf, ob für die



---

unterschiedlichen hämatologischen Neoplasien mit 5q-Aberration überhaupt ein einzelnes Gen verantwortlich gemacht werden kann. Die Pathogenese des MDS bis zur Leukämie verläuft nach Jacobs und Clark [5, 6] über zahlreiche Zwischenstufen. Durch Mutationen werden unterschiedliche Gene inaktiviert, die vermutlich eine Rolle bei der Regulation von Zellproliferation und -differenzierung spielen. Ferner ist bekannt, dass häufig auftretende Krebsarten oft durch die kombinierte Mutation mehrerer Gene und durch verschiedene Umweltfaktoren verursacht werden [40]. Alle bisher unternommenen Versuche mit positioneller Klonierung in der chromosomalen Region 5q31 ein einzelnes Gen zu identifizieren, das für die Pathogenese verantwortlich ist, sind leider nicht erfolgreich gewesen.

## 6. Zusammenfassung

S. Bojesen und A. Borkhardt identifizierten AF5 anhand eines Einzelfalls als ein neues MLL-Partnergen in der chromosomalen Region 5q31. In 5q31 wird seit langem ein Tumorsuppressorgen insbesondere für die Akute Myeloische Leukämie und Myelodysplastische Syndrome vermutet. AF5 ist das humane Homologon zu dem von Hildebrand J.D. et al. 1996 aus Hühnergewebe klonierten und charakterisierten GRAF-Gen. Es besitzt eine potenzielle anti-onkogene Funktion durch Inhibition von Zellwachstum und -proliferation.

In dieser Arbeit wurden die Expression und die cDNA-Sequenz von AF5 untersucht. Für die Expressionsanalyse wurde ein nicht-radioaktives Northern Blot Verfahren etabliert. Ein Northern Dot Blot mit RNA aus 50 unterschiedlichen humanen Geweben zeigt, dass AF5 in einem breiten Spektrum von humanen Geweben exprimiert wird. Hohe Expressionslevel finden sich in Gehirn, peripheren Leukozyten und Plazenta. In Skelettmuskulatur ist im Vergleich zu Herzmuskelgewebe kein Transkript nachweisbar. Zwei Haupttranskripte von 9,5 kb und 4,4 kb finden sich in den humanen Leukämiezelllinien. Die Zelllinien JOSK-I (Histiocytäres Lymphom), MUTZ-1 (Myelodysplastisches Syndrom), ML-2 (Akute myelomonozytäre Leukämie) und MV4-11 (Akute monozytäre Leukämie) exprimieren AF5 stark.

Die Sequenzanalyse wurde an Patientenproben mit AML, der Leukämiezelllinie MUTZ-1 (MDS) und einer gesunden Kontrollperson vorgenommen. Die Proben wurden aufgrund von 5q-Aberrationen ausgewählt. Zahlreiche Spleißvarianten von AF5 konnten gefunden werden. In drei von fünf Proben und in MUTZ-1 konnten relevante Mutationen erkannt werden, die möglicherweise Einfluß auf die Proteinstruktur von AF5 besitzen. Formal erfüllen die Ergebnisse der cDNA-Sequenzierung, mit dem Nachweis einer bi-allelischen Inaktivierung von AF5, die Kriterien nach Knudson für Tumorsuppressorgene. Dass AF5 eine andere Bedeutung in der Pathogenese Myelodysplastischer Syndrome bis zur akuten Leukämie besitzt, ist aufgrund seiner Lage telomer von dem für AML/MDS kleinsten gemeinsam deletierten Segment der chromosomalen Region 5q31 anzunehmen. Es sind weitere funktionelle Untersuchungen des Proteins notwendig, um die physiologische Rolle und die pathogenetische Bedeutung von AF5 bei der Tumorentstehung zu verstehen.

## Summary

Having examined one case, S. Bojesen and A. Borkhardt identified AF5 as a new MLL-partner gene in the chromosomal region 5q31. For a long time a tumor suppressor gene has been assumed in 5q31 especially for the acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. AF5 is the human homologue to the GRAF-gene cloned and characterized from chicken tissue by Hildebrand J.D. et al. 1996. It has a potential anti-oncogenic function through inhibition of cell growth and -proliferation.

In this paper the expression and the cDNA-sequence of AF5 have been analysed. To analyse the AF5-expression a non-radioactive northern blot has been established. A northern dot blot with RNA from 50 different human tissues shows that AF5 is expressed in a wide range of various human tissue. High expression levels can be found in the brain, peripheral leukocytes and placenta. In skeletal muscle compared to cardiac muscle tissue a transcript cannot be proved. A 9,5 kb and 4,4 kb transcript can be found in human leukemic cell lines. High expression levels show the cell lines JOSK-I (histiocytic lymphoma), MUTZ-1 (myelodysplastic syndrome), ML-2 (acute myelomonocytic leukemia) and MV4-11 (acute monocytic leukemia).

The sequence analysis was done on patient samples with AML, the leukemic cell line MUTZ-1 and a healthy control. The samples were chosen on the basis of 5q-aberrations. Several splice variants of AF5 could be found. In three out of five samples and in MUTZ-1 relevant mutations could be recognized which might have an influence on the protein structure of AF5. Formally the results of the cDNA-sequencing with a bi-allelic inactivation of AF5 have confirmed the definition by Knudson of tumor suppressor genes. It is probable that AF5 has another meaning in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes to acute leukemia because of its position telomer of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases. More functional examinations of the AF5-protein are necessary to understand the physiological role and the pathogenetic meaning in the emergence of a tumor.

## 7. Literatur

- 1 Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Garlnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982; 51: 189-199.
- 2 Aul C, Germing U. Myelodysplastische Syndrome. *Internist* 1998; 39: 1168-1180.
- 3 Aul C, Bowen DT, Yoshida Y. Pathogenesis, etiologie and epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 1998; 83: 71-86.
- 4 Gallagher A, Darley RL, Padua RA. The molecular basis of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 1997; 82: 191-204.
- 5 Jacobs A, Clark RE. Pathogenesis and clinical variations in the myelodysplastic syndromes. *Clin Haemat* 1986; 15: 925-951.
- 6 List AF, Jacobs A. Biology and pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Semin Oncol* 1992; 19: 14-24.
- 7 URL: <http://www.kinderkrebsregister.de>: Jahresbericht 2002.
- 8 Sandler DP. Epidemiology of acute myelogenous leukaemia. *Semin Oncol* 1987; 14: 359-364.
- 9 Heimpel H, Fischer A, Aul C, et al. Erkrankungendes Blutes und des Lymphsystems. In: Classen M, Dierkesmann R, Heimpel H, eds. *Rationale Diagnostik und Therapie in der Inneren Medizin*. München: Urban & Schwarzenberg 1996.
- 10 Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukemias. *Br J Haematol* 1976; 33: 451-458.
- 11 Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495-497.
- 12 Kakizuka A, Miller WH Jr, Umesono K, Warrell RP Jr, Frankel SR, Murty VV, Dmitrovsky E, Evans RM. Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* 1991; 66: 663-674.
- 13 Alcalay M, Zangrilli D, Pandolfi PP, Longo L, Mencarelli A, Giacomucci A, Rocchii M, Biondi A, Lo Cocco F, Diverio D, Donti E, Grignani F, Pelicci PG. Translocation breakpoint of acute promyelocytic leukemia lies within retinoic acid receptor a locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1977-1981.
- 14 Longo L, Pandolfi PP, Biondi A, Rambaldi A, Mencarelli A, Lo Coco F, Diverio D, Pegoraro L, Avanzi G, Tabilio A, Donti E, Grignani F, Pelicci PG. Rearrangements and aberrant expression of the retinoic acid receptor a gene in acute promyelocytic leukemias. *J Exp Med* 1990; 172: 1571-1575.
- 15 Castaigne S, Chomienne C, Daniel MT, Ballerini P, Berger R, Fenaux P, Degos L. All-trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. I. Clinical results. *Blood* 1990; 76: 1704-1709.
- 16 Fenaux P, Le Deley MC, Castaigne S, Archimbaud E, Chomienne C, Link H, Guerci A, Duarte M, Daniel MT, Bowen D, et al. Effect of all transretinoic acid in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. Results of a multicenter randomized trial. *European APL 91 Group. Blood* 1993; 82: 3241-3249.

- 17 Grignani F, Fagioli M, Alcalay M, Longo L, Pandolfi PP, Donti E, Biondi A, Lo Coco F, Grignani F, Pelicci PG. Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment. *Blood* 1994; 83: 10-25.
- 18 Liu P, Tarle SA, Hajra A, Claxton DF, Marlton P, Freedman M, Siciliano MJ, Collins FS. Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science* 1993; 261: 1041-1044.
- 19 Miyoshi H, Shimizu K, Kozu T, Maseki N, Kaneko Y, Ohki M. (8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10431-10434.
- 20 Miyoshi H, Kozu T, Shimizu K, Enomoto K, Maseki N, Kaneko Y, Kamada N, Ohki M. The t(8;21) translocation in acute myeloid leukemia results in production of an AML1-MTG8 fusion transcript. *EMBO J* 1993; 12: 2715-2721.
- 21 Nakamura T, Alder H, Gu Y, Prasad R, Canaani O, Kamada N, Gale RP, Lange B, Crist WM, Nowell PC, et al.. Genes on chromosomes 4, 9, and 19 involved in 11q23 abnormalities in acute leukemia share sequence homology and/or common motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4631-4635.
- 22 Chaplin T, Ayton P, Bernard OA, Saha V, Della Valle V, Hillion J, Gregorini A, Lillington D, Berger R, Young BD. A novel class of zinc finger/leucine zipper genes identified from the molecular cloning of the t(10;11) translocation in acute leukemia. *Blood* 1995; 85: 1435-1441.
- 23 Thirman MJ, Levitan DA, Kobayashi H, Simon MC, Rowley JD. Cloning of ELL, a gene that fuses to MLL in a t(11;19)(q23;p13.1) in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12110-12114.
- 24 Brady AF, Waters CS, Pocha MJ, Brueton LA. Chronic myelomonocytic leukaemia in a child with constitutional partial trisomy 8 mosaicism. *Clin Genet* 2000; 58: 142-146.
- 25 Ferro MT, Vazquez-Mazariego Y, Ramiro S, Santiago MF, Garcia-Sagredo JM, Nunez R, Hernandez JM, San Roman C. Trisomy/ tetrasomy of chromosome 8 and +i(8q) as the sole chromosome abnormality in three adult patients with myelomonocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 120: 163-165.
- 26 Sendi H, Hichri H, Elghezal H, Gribaa M, Laatiri A, Elloumi M, Lakhel R, Saad A. Cytogenetic survey of 117 Tunisian patients with de novo myelodysplastic syndrome. *Ann Genet* 2002; 45: 131.
- 27 Haase D, Fonatsch C, Freund M, Wormann B, Bodenstern H, Bartels H, Stollmann-Gibbels B, Lengfelder E. Cytogenetic findings in 179 patients with myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* 1995; 70: 171-187.
- 28 Bernasconi P, Alessandrino EP, Boni M, Bonfichi M, Morra E, Lazzarino M, Campagnoli C, Astori C. Karyotype in myelodysplastic syndromes: relations to morphology, clinical, evolution, and survival. *Am J Hematol* 1994; 46: 270-277.
- 29 Sole F, Prieto F, Badia L, Woessner S, Florensa L, Caballin MR, Coll MD, Besses C, Sans-Sabrafen J. Cytogenetic studies in 112 cases of untreated myelodysplastic syndromes. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 64: 12-20.
- 30 Heim S. Cytogenetic findings in primary and secondary MDS. *Leuk Res* 1992; 16: 43-46.

- 31 Parlier V, van Melle G, Beris P, Schmidt PM, Tobler A, Haller E, Bellomo MJ. Hematologic, clinical, and cytogenetic analysis in 109 patients with primary myelodysplastic syndrome. Prognostic significance of morphology and chromosome findings. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; 78: 219-231.
- 32 Jotterand M, Parlier V. Diagnostic and prognostic significance of cytogenetics in adult primary myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 1996; 23: 253-266.
- 33 Johansson B, Mertens F, Heim S, Kristoffersson U, Mitelman F. Cytogenetics of secondary myelodysplasia (sMDS) and acute nonlymphocytic leukemia (sANLL). *Eur J Haematol* 1991; 47: 17-27.
- 34 Le Beau MM, Albain KS, Larson RA, Vardiman JW, Davis EM, Blough RR, Golomb HM, Rowley JD. Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes and acute nonlymphocytic leukemia: further evidence for characteristic abnormalities of chromosome No. 5 and 7. *J Clin Oncol* 1986; 4: 325-345.
- 35 Van Den Berghe H, Cassiman JJ, David G, Fryns JP, Michaux JL, Sokla G. Distinct haematological disorders with deletion of the long arm No. 5 chromosome. *Nature* 1974; 251: 437-438.
- 36 Sokla G, Michaux JL, Van den Berghe H, Cordier A, Rodhain J, Ferrant A, Moriau M, Sonnet J. The 5q- chromosome. *Blood* 1975; 46: 519-533.
- 37 Van den Berghe H, Vermaelen K, Mecucci C, Barbieri D, Tricot G. The 5q- anomaly. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 17: 189-255.
- 38 Pedersen B, Jensen IM. Clinical and prognostic implications of 5q deletions: 96 high resolution studied patients. *Leukemia* 1991; 5: 566-573.
- 39 Armitage P, Doll R. The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *Br J Cancer* 1954; 8: 1-12.
- 40 Strachan T, Read AP. *Molekulare Humangenetik*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 1996.
- 41 Knudson AG. Mutation and Cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 820-823.
- 42 Knudson AG. Heredity and human cancer. *Am J Pathol* 1974; 77: 77-84.
- 43 Knudson AG, Hethcote HW, Brown BW. Mutation and childhood cancer: A probabilistic model for the incidence of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 5116-5120.
- 44 Knudson AG. Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10914-10921.
- 45 Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 1983; 305: 779-784.
- 46 Van den Berghe H, Michaux L. 5q-, Twenty-five years later: a synopsis. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 94: 1-7.
- 47 Mitelman F. *Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer*. Fifth ed. New York: Wiley-Liss 1994.
- 48 Le Beau MM, Albain KS, Larson RA, Vardiman JW, DavisEM, Blough RR, Golomb HM, Rowley JD. Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes and acute nonlymphocytic leukemia: further

- evidence for characteristic abnormalities of chromosomes no. 5 and 7. *J Clin Oncol* 1986; 4: 325-345.
- 49 Le Beau MM, Espinosa R, Neuman WL, Stock W, Roulston D, Larson RA, Keinanen M, Westbrook CA. Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5484-5488.
- 50 URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- 51 Boultonwood J, Fidler C, Lewis S, MacCarthy A, Sheridan H, Kelly S, Oscier D, Buckle VJ, Wainscoat JS. Allelic loss of IRF1 in myelodysplasia and acute myeloid leukemia: retention of IRF1 on the 5q- chromosome in some patients with the 5q- syndrome. *Blood* 1993; 82: 2611-2616.
- 52 Willman CL, Sever CE, Pallavicini MG, Harada H, Tanaka N, Slovak ML, Yamamoto H, Harada K, Meeker TC, List AF, et al. Deletion of IRF-1, mapping to chromosome 5q31.1, in human leukemia and preleukemic myelodysplasia. *Science* 1993; 259: 968-971.
- 53 Boultonwood J, Rack K, Kelly S, Madden J, Sakaguchi AY, Wang LM, Oscier DG, Buckle VJ, Wainscoat JS. Loss of both CSF1R (FMS) alleles in patients with myelodysplasia and a chromosome 5 deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6176-6180.
- 54 Zavadil J, Brezinova J, Svoboda P, Zemanova Z, Michalova K. Smad5, a tumor suppressor candidate at 5q31.1, is hemizygotously lost and not mutated in the retained allele in human leukemia cell line HL60. *Leukemia* 1997; 11: 1187-1192.
- 55 Fuchs O, Simakova O, Klener P, Cmejlova J, Zivny J, Zavadil J, Stopka T. Inhibition of Smad5 in human hematopoietic progenitors blocks erythroid differentiation induced by BMP4. *Blood Cells Mol Dis* 2002; 28: 221-233.
- 56 Hejlik DP, Kottickal LV, Liang H, Fairman J, Davis T, Janecki T, Sexton D, Perry W 3rd, Tavtigian SV, Teng DH, Nagarajan L. Localization of SMAD5 and its evaluation as a candidate myeloid tumor suppressor. *Cancer Res* 1997; 57: 3779-3783.
- 57 Dubourg C, Toutain B, Helias C, Henry C, Lessard M, Le Gall JY, Le Treut A, Guenet L. Evaluation of ETF1/eRF1, mapping to 5q31, as a candidate myeloid tumor suppressor gene. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 134: 33-37.
- 58 Fairman J, Chumakov I, Chinault AC, Nowell PC, Nagarajan L. Physical mapping of the minimal region of loss in 5q- chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7406-7410.
- 59 Horrigan SK, Westbrook CA, Kim AH, Banerjee M, Stock W, Larson RA. Polymerase chain reaction-based diagnosis of del (5q) in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome identifies a minimal deletion interval. *Blood* 1996; 88: 2665-2670.
- 60 Boultonwood J, Fidler C, Soularue P, Strickson AJ, Kostrzewa M, Jaju RJ, Cotter FE, Fairweather N, Monaco AP, Muller U, Lovett M, Jabs EW, Auffray C, Wainscoat JS. Novel genes mapping to the critical region of the 5q- syndrome. *Genomics* 1997; 45: 88-96.
- 61 Zhao N, Stoffel A, Wang PW, Eisenbart JD, Espinosa R, Larson RA, Le Beau MM. Molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5

- in malignant myeloid diseases to 1-1,5 Mb and preparation of a PAC-based physical map. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6948-6953.
- 62 Jaju RJ, Boulwood J, Oliver FJ, Kostrzewa M, Fidler C, Parker N, McPherson JD, Morris SW, Muller U, Wainscoat JS, Kearney L. Molecular cytogenetic delineation of the critical deleted region in the 5q- syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 22: 251-266.
- 63 Canaani E, Nowell PC, Croce CM. Molecular genetics of 11q23 chromosome translocations. *Adv Cancer Res* 1995; 66: 213-234.
- 64 Youg BD, Saha V. Chromosomal abnormalities in leukemia: The 11q23 paradigm. *Cancer Surv.* 1996; 28: 225-245.
- 65 Ziemer-van der Poel S, McCabe N, Gill H J, Espinosa R, Patel Y, Harden A, et al. Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10735-10739.
- 66 Cimino G, Moir DT, Canaani O, Williams K, Crist WM, Katzav S, Cannizzaro L, Lange B, Nowell PC, Croce CM, et al. Cloning of ALL-1, the locus involved in leukemias with the t(4;11)(q21;q23), t(9;11)(p22;q23), and t(11;19)(q23;p13) chromosome translocations. *Cancer Res* 1991; 51: 6712-6714.
- 67 Gu Y, Nakamura T, Adler H, Prasad R, Canaani O, Cimino G, et al. The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to *Drosophila trithorax* to the AF-4 gene. *Cell* 1992; 71: 701-708.
- 68 Djabali M, Selleri L, Parry P, Bower M, Young B, Evans GA. A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukaemias. *Nat Genet* 1993; 4: 431.
- 69 Tkachuk D C, Kohler, Cleary M L. Involvement of a homolog of *Drosophila trithorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* 1992; 71: 691-700.
- 70 Huret JL. MLL (myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 1997. URL: <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/MLL.html>.
- 71 Hess JL, Huret JL. MLL (myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*.2000 . URL: <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/MLL.html>.
- 72 Marschalek R. MLL (myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 2002. URL:<http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/MLL.html>.
- 73 Bernard OA, Mauchauffe M, Mecucci C, Van den Berghe H, Berger R. A novel gene, AF-1p, fused to HRX in t(1;11)(p32;q23), is not related to AF-4, AF-9 nor ENL. *Oncogene*. 1994; 9: 1039-1045.
- 74 Tse W, Zhu W, Chen HS, Cohen A. A novel gene, AF1q, fused to MLL in t(1;11)(q21;q23), is specifically expressed in leukemic and immature hematopoietic cells. *Blood* 1995; 85: 650-656.
- 75 von Bergh AR, Beverloo HB, Rombout P, van Wering ER, van Weel MH, Beverstock GC, Kluin PM, Slater RM, Schuurin E. LAF4, an AF4-related gene, is fused to



- MLL in infant acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 35: 92-96.
- 76 Sano K, Hayakawa A, Piao JH, Kosaka Y, Nakamura H. Novel SH3 protein encoded by the AF3p21 gene is fused to the mixed lineage leukemia protein in a therapy-related leukemia with t(3;11) (p21;q23). *Blood* 2000; 95: 1066-1068.
- 77 Sano K. Structure of AF3p21, a new member of mixed lineage leukemia (MLL) fusion partner proteins-implication for MLL-induced leukemogenesis. *Leuk Lymphoma* 2001; 42: 595-602.
- 78 Pegram LD, Megonigal MD, Lange BJ, Nowell PC, Rappaport EF, Felix CA. t(3;11)(q25;q23) fuses MLL with the GMPS (guanosine 5'-monophosphate synthetase) gene in treatment-related acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 1999; 94: 2227.
- 79 Daheron L, Veinstein A, Brizard F, Drabkin H, Lacotte L, Guilhot F, Larsen CJ, Brizard A, Roche J. Human LPP gene is fused to MLL in a secondary acute leukemia with a t(3;11) (q28;q23). *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 31: 382-389.
- 80 Corral J, Forster A, Thompson S, Lampert F, Kaneko Y, Slater R, Kroes WG, van der Schoot CE, Ludwig WD, Karpas A, et al. Acute leukemias of different lineages have similar MLL gene fusions encoding related chimeric proteins resulting from chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 8538-8542.
- 81 Taki T, Kano H, Taniwaki M, Sako M, Yanagisawa M, Hayashi Y. AF5q31, a newly identified AF4-related gene, is fused to MLL in infant acute lymphoblastic leukemia with ins(5;11)(q31;q13q23). *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14535-14540.
- 82 Hillion J, Le Coniat M, Jonveaux P, Berger R, Bernard OA. AF6q21, a novel partner of the MLL gene in t(6;11)(q21;q23), defines a forkhead transcriptional factor subfamily. *Blood* 1997; 90: 3714-3719.
- 83 Taki T, Hayashi Y, Taniwaki M, Seto M, Ueda R, Hanada R, Suzukawa K, Yokota J, Morishita K. Fusion of the MLL gene with two different genes, AF-6 and AF-5alpha, by a complex translocation involving chromosomes 5, 6, 8 and 11 in infant leukemia. *Oncogene* 1996; 13: 2121-2130.
- 84 Prasad R, Gu Y, Alder H, Nakamura T, Canaani O, Saito H, Huebner K, Gale RP, Nowell PC, Kuriyama K, et al. Cloning of the ALL-1 fusion partner, the AF-6 gene, involved in acute myeloid leukemias with the t(6;11) chromosome translocation. *Cancer Res* 1993; 53: 5624-5628.
- 85 Albain KS, Le Beau MM, Ullirsch R, Schumacher H. Implication of prior treatment with drug combinations including inhibitors of topoisomerase II in therapy-related monocytic leukemia with a 9;11 translocation. *Genes Chromosomes Cancer* 1990; 2: 53-58.
- 86 Super HJ, Martinez-Climent J, Rowley JD. Molecular analysis of the Mono Mac 6 cell line: detection of an MLL-AF9 fusion transcript. *Blood* 1995; 85: 855-856.
- 87 von Bergh A, Beverloo B, Slater R, Groot A, Rombout P, Kluin P, Schuurin E. Cloning of unknown MLL fusion transcripts identifies two novel MLL fusion partners. *Blood* 2000; 96: 2984.

- 88 Fuchs U, Rehkamp G, Haas OA, Slany R, Konig M, Bojesen S, Bohle RM, Damm-Welk C, Ludwig WD, Harbott J, Borkhardt A. The human formin-binding protein 17 (FBP17) interacts with sorting nexin, SNX2, and is an MLL-fusion partner in acute myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 8756-8761.
- 89 Chaplin T, Bernard O, Beverloo HB, Saha V, Hagemmeijer A, Berger R, Young BD. The t(10;11) translocation in acute myeloid leukemia (M5) consistently fuses the leucine zipper motif of AF10 onto the HRX gene. *Blood* 1995; 86: 2073-2076.
- 90 Taki T, Shibuya N, Taniwaki M, Hanada R, Morishita K, Bessho F, Yanagisawa M, Hayashi Y. ABI-1, a human homolog to mouse Abl-interactor 1, fuses the MLL gene in acute myeloid leukemia with t(10;11)(p11.2;q23). *Blood* 1998; 92: 1125-1130.
- 91 Ono R, Taki T, Taketani T, Taniwaki M, Kobayashi H, Hayashi Y. LCX, leukemia-associated protein with a CXXC domain, is fused to MLL in acute myeloid leukemia with trilineage dysplasia having t(10;11)(q22;q23). *Cancer Res* 2002; 62: 4075-4080.
- 92 Chichman SA, Canaani E, Croce CM. Self-fusion of the ALL1 gene. A new genetic mechanism for acute leukemia. *JAMA* 1995; 273: 571-576.
- 93 Kourlas PJ, Strout MP, Becknell B, Veronese ML, Croce CM, Theil KS, Krahe R, Ruutu T, Knuutila S, Bloomfield CD, Caligiuri MA. Identification of a gene at 11q23 encoding a guanine nucleotide exchange factor: evidence for its fusion with MLL in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 2145-2150.
- 94 Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Seto M, Morishita K, Suzuki K, Ueda R, Ueda K, Kamada N, Greaves M. GPHN, a novel partner gene fused to MLL in a leukemia with t(11;14)(q23;q24). *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 32: 212-221.
- 95 Kuwada N, Kimura F, Matsumura T, Yamashita T, Nakamura Y, Wakimoto N, Ikeda T, Sato K, Motoyoshi K. t(11;14)(q23;q24) generates an MLL-human gephyrin fusion gene along with a de facto truncated MLL in acute monoblastic leukemia. *Cancer Res* 2001; 61: 2665-2669.
- 96 Chinwalla V, Chien A, Odero M, Neilly MB, Zeleznik-Le NJ, Rowley JD. A t(11;15) fuses MLL to two different genes, AF15q14 and a novel gene MPFYVE on chromosome 15. *Oncogene* 2003; 22: 1400-1410.
- 97 Hayette S, Tigaud I, Vanier A, Martel S, Corbo L, Charrin C, Beillard E, Deleage G, Magaud JP, Rimokh R. AF15q14, a novel partner gene fused to the MLL gene in an acute myeloid leukaemia with a t(11;15)(q23;q14). *Oncogene* 2000; 19: 4446-4450.
- 98 Satake N, Ishida Y, Otoh Y, Hinohara S, Kobayashi H, Sakashita A, Maseki N, Kaneko Y. Novel MLL-CBP fusion transcript in therapy-related chronic myelomonocytic leukemia with a t(11;16)(q23;p13) chromosome translocation. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 20: 60-63.
- 99 Taki T, Sako M, Tsuchida M, Hayashi Y. The t(11;16)(q23;p13) translocation in myelodysplastic syndrome fuses the MLL gene to the CBP gene. *Blood* 1997; 89: 3945-3950.
- 100 Rowley JD, Reshmi S, Sobulo O, Musvee T, Anastasi J, Raimondi S, Schneider NR, Barredo JC, Cantu ES, Schlegelberger B, Behm F, Doggett NA, Borrow J,

- Zeleznik-Le N. All patients with the T(11;16)(q23;p13.3) that involves MLL and CBP have treatment-related hematologic disorders. *Blood* 1997; 90: 535-541.
- 101 Sobulo OM, Borrow J, Tomek R, Reshmi S, Harden A, Schlegelberger B, Housman D, Doggett NA, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ. MLL is fused to CBP, a histone acetyltransferase, in therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;16)(q23;p13.3). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 732-737.
- 102 Harrison CJ, Cuneo A, Clark R, Johansson B, Lafage-Pochitaloff M, Mugneret F, Moorman AV, Secker-Walker LM. Ten novel 11q23 chromosomal partner sites. European 11q23 Workshop participants. *Leukemia* 1998; 12: 811-822.
- 103 Magonigal MD, Cheung NKV, Rappaport EF, Nowell PC, Wilson RB, Jones DH, Addya K, Leonard DGB, Kushner BH, Williams TM, Lange BJ, Felix CA. Detection of leukemia-associated MLL-GAS7 translocation early during chemotherapy with DNA topoisomerase II inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 2814-2819.
- 104 Prasad R, Leshkowitz D, Gu Y, Alder H, Nakamura T, Saito H, Huebner K, Berger R, Croce CM, Canaani E. Leucine-zipper dimerization motif encoded by the AF17 gene fused to ALL-1 (MLL) in acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8107-8111.
- 105 Robert L. Redner, Susanne M. Gollin, Sandra S. Kaplan, Sofia Shekhter-Levin. Involvement of the MLL and RARA genes in a patient with acute monocytic leukemia with t(11;17)(q23;q12). *Blood* 1999; 94 Suppl 1.
- 106 Osaka M, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ. MSF (MLL septin-like fusion), a fusion partner gene of MLL, in a therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;17)(q23;q25). *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 6428-6433.
- 107 Taki T, Ohnishi H, Shinohara K, Sako M, Bessho F, Yanagisawa M, Hayashi Y. AF17q25, a putative septin family gene, fuses the MLL gene in acute myeloid leukemia with t(11;17)(q23;q25). *Cancer Res* 1999; 59: 4261-4265.
- 108 So CW, Caldas C, Liu MM, Chen SJ, Huang QH, Gu LJ, Sham MH, Wiedemann LM, Chan LC. EEN encodes for a member of a new family of proteins containing an Src homology 3 domain and is the third gene located on chromosome 19p13 that fuses to MLL in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2563-2568.
- 109 Rubnitz JE, Morrissey J, Savage PA, Cleary ML. ENL, the gene fused with HRX in t(11;19) leukemias, encodes a nuclear protein with transcriptional activation potential in lymphoid and myeloid cells. *Blood* 1994; 84: 1747-1752.
- 110 Magonigal MD, Rappaport EF, Jones DH, Williams TM, Lovett BD, Kelly KM, Lerou PH, Moulton T, Budarf ML, Felix CA. t(11;22)(q23;q11.2) In acute myeloid leukemia of infant twins fuses MLL with hCDCrel, a cell division cycle gene in the genomic region of deletion in DiGeorge and velocardiofacial syndromes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6413-6418.
- 111 Ida K, Kitabayashi I, Taki T, Taniwaki M, Noro K, Yamamoto M, Ohki M, Hayashi Y. Adenoviral E1A-Associated Protein p300 Is Involved in Acute Myeloid Leukemia With t(11; 22)(q23; q13). *Blood* 1997; 90: 4699-4704.
- 112 Parry P, Wei Y, Evans G. Cloning and characterization of the t(X;11) breakpoint from a leukemic cell line identify a new member of the forkhead gene family. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; 11: 79-84.

- 113 Borkhardt A, Repp R, Haas OA, Leis T, Harbott J, Kreuder J, Hammermann J, Henn T, Lampert F. Cloning and characterization of AFX, the gene that fuses to MLL in acute leukemias with a t(X;11)(q13;q23). *Oncogene* 1997; 14: 195-202.
- 114 Slater DJ, Hilgenfeld E, Rappaport EF, Shah NR, Megonigal MD, Ried T, Felix CA. Identification of Septin 2 as a new partner gene of MLL in infant AML with a complex translocation. *Blood* 2000; 96 Suppl 1.
- 115 Borkhardt A, Teigler-Schlegel A, Fuchs U, Keller C, König M, Harbott J, Haas OA. An ins(X;11)(q24;q23) fuses the MLL and the Septin 6/KIAA0128 gene in an infant with AML-M2. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 32: 82-88.
- 116 Bojesen S E. 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 on chromosome 5q31. Inaugural-Dissertation JLU Gießen 1999.
- 117 Borkhardt A. Molekulargenetische Untersuchungen chromosomaler Aberrationen bei Hämatologischen Neoplasien im Kindesalter. Habilitationsschrift JLU Gießen 1997.
- 118 Thirman MJ, Gill HJ, Burnett RC, Mbangkollo D, McCabe NR, Kobayashi H, Ziemian van der Poel S, Kaneko Y, Morgan R, Sandberg AA, et al. Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *N Engl J Med* 1993; 329: 909-914.
- 119 Kozak M. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem* 1991; 266: 19867-19870.
- 120 Hildebrand, J.D., Taylor, J.M., Parsons, T. An SH3 Domain-Containing GTPase-Activation Protein for Rho and Ccd42 Associates with Focal Adhesion Kinase. *Molecular and Cellular Biology* 1996; 6: 3169-3178.
- 121 Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, Gallo R. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1979; 54: 713-733.
- 122 Rosenfeld C, Goutner A, Venuat AM, Choquet C, Pico JL, Dore JF, Liabeuf A, Durandy A, Desgrange C, De The G. An effect human leukaemic cell line: Reh. *Eur J Cancer* 1977; 13: 377-379.
- 123 Hurwitz R, Hozier J, LeBien T, Minowada J, Gajl-Peczalska K, Kubonishi I, Kersey J. Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype. *Int J Cancer* 1979; 23: 174-180.
- 124 Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 1975; 45: 321-334.
- 125 Ohta M, Furukawa Y, Ide C, Akiyama N, Utakoji T, Miura Y, Saito M. Establishment and characterization of four human monocytoid leukemia cell lines (JOSK-I, -S, -M and -K) with capabilities of monocyte-macrophage lineage differentiation and constitutive production of interleukin 1. *Cancer Res* 1986; 46: 3067-3074.
- 126 Steube KG, Gignac SM, Zhen-Bo Hu, Teepe D, Harms D, Kabisch H, Gaedicke G, Hansen-Hagge T, Macleod RAF, Quentmeier H, Drexler HG. In Vitro Culture Studies of Childhood Myelodysplastic Syndrome: Establishment of the Cell Line MUTZ-1. *Leukemia and Lymphoma* 1996; 25: 345-363.

- 127 Ziegler-Heitbrock HW, Thiel E, Futterer A, Herzog V, Wirtz A, Riethmuller G. Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer* 1988; 41: 456-461.
- 128 Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Sandberg AA. Cytogenetic characterization of putative human myeloblastic leukemia cell lines (ML-1, -2, and -3): origin of the cells. *Cancer Res* 1986; 46: 3642-3647.
- 129 Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 1980; 26: 171-176.
- 130 Lange B, Valtieri M, Santoli D, Caracciolo D, Mavilio F, Gemperlein I, Griffin C, Emanuel B, Finan J, Nowell P, et al. Growth factor requirements of childhood acute leukemia: establishment of GM-CSF-dependent cell lines. *Blood* 1987; 70: 192-199.
- 131 Foley GE et al. Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer* 1965; 18: 522-529.
- 132 URL:<http://www.dsmz.de>
- 133 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.
- 134 Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 1993; 15: 532-534, 536-537.
- 135 Kuribayashi K, Hikata M, Hiraoka O, Miyamoto C, Furuichi Y. A rapid and efficient purification of poly(A)-mRNA by oligo(dT)30-Latex. *Nucleic Acids Symp Ser* 1988; 19: 61-64.
- 136 Kotewicz ML, D'Alessio JM, Driftmier KM, Blodgett KP, Gerard GF. Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*. *Gene* 1985; 35: 249-258.
- 137 Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology* 1992; 24: 17-27.
- 138 Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.
- 139 Rolfs A, Schuller I, Finck U, Weber-Rolfs I. PCR: Clinical diagnostics and research. 1992. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- 140 McDonnell MW, Simon MN, Studier FW. Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol* 1977; 110: 119-146.
- 141 Krumlauf R. Analysis of gene expression by northern blot. *Mol Biotechnol* 1994; 2: 227-242.
- 142 Holtke HJ, Ankenbauer W, Muhlegger K, Rein R, Sagner G, Seibl R, Walter T. The digoxigenin (DIG) system for non-radioactive labelling and detection of nucleic acids-an overview. *Cell Mol Biol* 1995; 41: 883-905.
- 143 Roche GmbH, Biochemica. The DIG System User's Guide for Filter Hybridization. 1995.

- 144 Traincard F, Ternynck T, Danchin A, Avrameas S. An immunoenzyme technic for demonstrating the molecular hybridization of nucleic acids. *Ann Immunol* 1983; 134: 399-404.
- 145 Langer PR, Waldrop AA, Ward DC. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 6633-6637.
- 146 Kessler C. The digoxigenin:anti-digoxigenin (DIG) technology-a survey on the concept and realization of a novel bioanalytical indicator system. *Mol Cell Probes* 1991; 5: 161-205.
- 147 Seibl R, Holtke HJ, Ruger R, Meindl A, Zachau HG, Rasshofer R, Roggendorf M, Wolf H, Arnold N, Wienberg J, et al. Non-radioactive labeling and detection of nucleic acids. III. Applications of the digoxigenin system. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1990; 371: 939-951.
- 148 Rueger B, Thalhammer J, Obermaier I, Gruenewald-Janho S. Experimental procedure for the detection of a rare human mRNA with the DIG System. Roche Customer Service Lab, International Support, Mannheim Germany. *Biochemica* 1996; 3: 35-38.
- 149 Bonini JA, Hofmann C. A rapid, accurate, nonradioactive method for quantitating RNA on agarose gels. *Biotechniques* 1991; 11: 708-710.
- 150 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* Second Edition 1989.
- 151 Kroczeck RA, Siebert E. Optimization of northern analysis by vacuum-blotting, RNA-transfer visualization, and ultraviolet fixation. *Anal Biochem* 1990; 184: 90-95.
- 152 Passey RJ. Low-power vacuum apparatus for blotting. *Biotechniques* 1997; 22: 598.
- 153 Sato M, Mizobuchi M, Takahara J. UV cross-linking of RNA to nylon membrane is suitable for northern blot hybridization using a digoxigenin-labeled DNA probe. *Biotechniques* 1994; 17: 468, 470-471.
- 154 Hobert O, Jallal B, Ullrich A. Interaction of Vav with ENX-1, a putative transcriptional regulator of homeobox gene expression. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 3066-3073.
- 155 Engler-Blum G, Meier M, Frank J, Muller GA. Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than <sup>32</sup>P-based hybridizations. *Anal Biochem* 1993; 210: 235-244.
- 156 Church GM, Gilbert W. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 1991-1995.
- 157 Yang T-T, Kain SR. Fast Hybridisation Solution for the Detection of Immobilized Nucleic Acids. *BioTechniques* 1995; 18: 498-503.
- 158 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-5467.
- 159 Kretz K, Callen W, Hedden V. Cycle sequencing. *PCR Methods Appl* 1994; 3: 107-112.
- 160 Serazin-Leroy V, Denis-Henriot D, Morot M, de Mazancourt P, Giudicelli Y. Semi-quantitative RT-PCR for comparison of mRNAs in cells with different amounts of housekeeping gene transcripts. *Mol Cell Probes* 1998; 12: 283-291.
- 161 Sprang SR. G Protein Mechanisms: Insights from Structural Analysis. *Annu Rev Biochem* 1997; 66: 639-678.

- 162 Reuter WM, Morgan MA, Bergmann L. Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? *Blood* 2000; 96: 1655-1669.
- 163 Diekmann D, Brill S, Garrett MD, Totty N, Hsuan J, Monfries C, Hall C, Lim L, Hall A. Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature* 1991; 351: 400-402.
- 164 Hariharan IK, Adams JM. cDNA sequence for human bcr, the gene that translocates to the abl oncogene in chronic myeloid leukaemia. *EMBO J* 1987; 6: 115-119.
- 165 Chisoe SL, Bodenteich A, Wang YF, Wang YP, Burian D, Clifton SW, Crabtree J, Freeman A, Iyer K, Jian L, et al. Sequence and analysis of the human ABL gene, the BCR gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. *Genomics* 1995; 27: 67-82.
- 166 Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, Talpaz M. Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias: From Basic Mechanisms to Molecular Therapeutics. *Ann Intern Med* 2003; 138: 819-830.
- 167 Olson MF, Paterson HF, Marshall CJ. Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. *Nature* 1998; 394: 295-299.
- 168 Yang ZY, Perkins ND, Ohno T, Nabel EG, Nabel GJ. The p21 cyclin-dependent kinase inhibitor suppresses tumorigenicity in vivo. *Nat Med* 1995; 1: 1052-1056.
- 169 Mercer WE. Checking on the cell cycle. *J Cell Biochem Suppl* 1998; 30-31: 50-54.
- 170 Cai K, Dynlacht BD. Activity and nature of p21WAF1 complexes during cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 12254-12259.
- 171 Taylor JM, Macklem M, Parsons JT. Cytoskeletal changes induced by GRAF, the GTPase regulator associated with focal adhesion kinase, are mediated by Rho. *Journal of Cell Science* 1999; 112: 231-242.
- 172 Taylor JM, Hildebrand JD, Mack CP, Cox ME, Parsons JT. Characterization of GRAF, the GTPase-activating Protein for Rho Associated with Focal Adhesion Kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 1998; 14: 8063-8070.
- 173 Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7276-7280.
- 174 Lopez AJ. Alternative Splicing of pre-mRNA: Developmental consequences and mechanisms of regulation. *Annu Rev Genet* 1998; 32: 279-305.
- 175 Ars E, Serra E, García J, Kruyer H, Gaona A, Lazaro C, Estivill X. Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. *Human Molecular Genetics* 2000; 9: 237-247.
- 176 Steingrimsdottir H, Rowley G, Dorado G, Cole J, Lehmann AR. Mutations which alter splicing in the human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene. *Nucleic Acids Res* 1992; 6: 1201-1208.
- 177 Savkur RS, Philips AV, Cooper TA. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 2001; 29: 40-47.
- 178 Wallace M, Trimpert RE, Fishbein L, Abernathy CR, Thomson SA. Cryptic out-of-frame NF1 exon splicing in neurofibromas. *ASH Meeting, Abstract* 1998.

- 
- 179 Ars E, Serra E, de la Luna S, Estivill X, Lázaro C. Cold shock induces the insertion of a cryptic exon in the neurofibromatosis typ 1 (NF1) mRNA. *Nucleic Acids Research* 2000; 28: 1307-1312.
- 180 Rittinger K, Walker PA, Eccleston JF, Nurmahomed K, Owen D, Laue E, Gamblin SJ, Smerdon SJ. Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activation protein rhoGAP. *Nature* 1997; 388: 693-697.
- 181 Longenecker KL, Zhang B, Derewenda U, Sheffield PJ, Dauter Z, Parsons JT, Zheng Y, Derewenda ZS. Structure of the BH domain from GRAF and its implications for Rho GTPase recognition. *J Biol Chem* 2000; 275: 38605-38610.
- 182 Lee WH, Bookstein R, Hong F, Young LJ, Shew JY, Lee EY. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification and sequence. *Science* 1987; 235: 1394-1399.
- 183 Huang HJ, Yee JK, Shew JY, Chen PL, Bookstein R, Friedmann T, Lee EY, Lee WH. Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells. *Science* 1988; 242: 1563-1566.
- 184 Borkhardt A, Bojesen S, Haas OA, Fuchs U, Bartelheimer D, Loncarevic IF, Bohle RM, Harbott J, Repp R, Jaeger U, Viehmann S, Henn T, Korth P, Scharr D, Lampert F. 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 USA* 2000; 97: 9168-9173.



## 8. Anhang

### 8.1. Primer

#### 8.1.1. Primer für die Synthese der DIG cDNA-Sonden

Primer der „nested PCR“ für die Synthese der ENX-1 DIG cDNA-Sonde				
ENX-1 up ext	1633-1662	Sense ext	TGGGCTGCACACTGCAGAAAGATA CAGCTG	383
ENX-1 do ext	2014-1984	Antisense ext	TCCCCCAGCCTGCCACGTCAGATG GTGCCAG	
ENX-1 up int	1679-1706	Sense int	CTAACCATGTTTACAACACTATCAACC CTG	292
ENX-1 do int	1969-1937	Antisense int	TGGAGCCCCGCTGAATACTGCAGT TCTTGCAGG	
Primer der PCR für die GRAF DIG cDNA-Sonde				
G6 up	1301-1332	Sense	TGCTTCTGAGACAGAAACAGATAT CTGTGCTG	447
AF5 int do	1747-1710	Antisense	AGCTGGGCATTGGTGAGAGGCATA TCGGGCACGGTGTT	

#### 8.1.2. Primer für die Synthese der AF5-cDNA-Fragmente (C0-C4)

AF5- Fragment	nt Anfang- Ende in der AF5-cDNA	Orien- tierung	Sequenz 5'→3'	Frag- ment- länge
C0	1-23	Sense ext+int	GCACCATGGGGCTCCCAGCGCTC	329
	419-389	Antisense ext	TGTCTCTTTGTCATACTTCTTTTTG GCTTCC	
	329-300	Antisense int	GGCATTCTCAATCATCCGTATCCG TTCATC	

C1	107-137	Sense ext+int	ATTCATCAAGGAGCTCATCAAGGA CGGGAAG	603
	755-727	Antisense ext	CATCAGTGATTCCACTTCTGATCTA GTGC	
	709-683	Antisense int.	GTGTTCTGTATGCTAATGGTAACT GT	
C2	545-570	Sense ext	ATATGTCTTCAAGGTGCAGGAAGT CC	836
	580-609	Sense int	AGATGTTTGAGTTTGTGGAGCCCC TGCTGG	
	1415-1388	Antisense ext+int	TTGAAACTGGTACATCATGAGTGG TCCT	
C3	1257-1290	Sense ext	TCCAGAGTGCAGAAGTTGCTGAGT GTCCTGATGG	447
	1301-1332	Sense int	TGCTTCTGAGACAGAAACAGATAT CTGTGCTG	
	1747-1714	Antisense ext+int	AGCTGGGCATTGGTGAGAGGCATA TCGGGGCACGG	
C4	1632-1664	Sense ext	ACAGTAGCAGCCATCATGGACATC AAATTTTCAG	690
	1666-1698	Sense int	ACATTGTCATTGAGATCCTAATAGA AAACCACG	
	2354-2325	Antisense ext+int	CCTCGACACTGGAATCAGCAGTTG TCATGG	

### 8.1.3. Primer für die Nachweisreaktion der Deletion nt256(del4) bei Pat. #1

Primer-Name	nt Anfang-Ende in der AF5-cDNA	Orienta-tion	Sequenz 5'→3'	Frag-ment-länge
I	166-190	Sense	CTTCAGCGAAGCGGAAGTTTGCAG	408
II	573-541	Anti-sense	CTTGGACTTCCTGCACCTTGAAGA CATATTCC	
IIIa	228-255	Sense	GCAGAAACAGATGATGAGATGTGC <b>CTAG</b>	208
IV	435-410	Anti-sense	TGCCACAATACTTTTCTGTCTCTTT G	
IIIb	228-255	Sense	GCAGAAACAGATGATGAGATGTGT ATAG	

Modifizierter Primer IIIa, fett markiert sind die von der AF5-cDNA-Sequenz abweichenden Nukleotide (PCR-Mutagenese).

### 8.1.4. Primer für die Nachweisreaktion der Insertion 1290ins52 bei Pat. #3

I FAM	Sense ext	TGTGGAAACCAGAGGGGATCAACGAG
II	Sense int	TGCTGAGTGTCTCTGATGGT <b>CATCG</b>
III	Antisense int	CTCAGAAGCAGTCTTGGGGT <b>CGTATG</b>
IV	Antisense ext	CTGGTACATCATGAGTGGTCCTGG

Die fett markierten Nukleotide in den Primern II und III sind komplementär zur Insertion.

### 8.1.5. Primer für die Synthese des 5' und 3' Endes von AF5

Primer-Name	nt Anfang-Ende in der AF5-cDNA	Orienta-tion	Sequenz 5'→3'	Frag-ment-länge
GRAF 5'up, int+ext	7-33	Sense int+ext	TGGGGCTCCCAGCGCTCGAGTTCA GCG	1741

GRAF 5' do, int	1747-1710	Antisense int	AGCTGGGCATTGGTGAGAGGCATA TCGGGCACGGTGTT	
GRAF 5' do, ext	1809-1781	Antisense ext	TCAGGGGCCTCTCGCTGCAGGAC GGGGG	1803
GRAF 3' up, int	1301-1332	Sense int	TGCTTCTGAGACAGAAACAGATAT CTGTGCTG	1708
GRAF 3' do, int	3008-2984	Antisense int	GTTGGGTTGCCGTGGTTACTAAGC G	
GRAF 3' up, ext	1257-1290	Sense ext	TCCAGAGTGCAGAAGTTGCTGAGT GTCCTGATGG	1881
GRAF 3' do, ext	3137-3107	Antisense ext	AATTCCTTGATCCTGTGCTTCAAGT TGTTAG	

## 8.2. AF5-cDNA-Sequenz

1 GCACCATGGG GCTCCAGCG CTCGAGTTCA GCGACTGCTG CCTCGATAGT CCGCACTTCC  
61 GAGAGACGCT CAAGTCGCAC GAAGCAGAGC TGGACAAGAC CAACAAATTC ATCAAGGAGC  
121 TCATCAAGGA CGGGAAGTCA CTCATAAGCG CGCTCAAGAA TTTGTCTTCA GCGAAGCGGA  
181 AGTTTGCAGA TTCCTTAAAT GAATTTAAAT TTCAGTGCAT AGGAGATGCA GAAACAGATG  
241 ATGAGATGTG TATAGCAAGG TCTTTGCAGG AGTTTGCCAC TGTCCTCAGG AATCTTGAAG  
301 ATGAACGGAT ACGGATGATT GAGAATGCCA GCGAGGTGCT CATCACTCCC TTGGAGAAGT  
361 TTCGAAAGGA ACAGATCGGG GCTGCCAAGG AAGCCAAAAA GAAGTATGAC AAAGAGACAG  
421 AAAAGTATTG TGGCATCTTA GAAAAACT TGAATTTGTC TTCCAAAAAG AAAGAATCTC  
481 AGCTTCAGGA GGCAGACAGC CAAGTGGACC TGGTCCGGCA GCATTTCTAT GAAGTATCCC  
541 TGGAATATGT CTTCAAGGTG CAGGAAGTCC AAGAGAGAAA GATGTTTGAG TTTGTGGAGC  
601 CTCTGCTGGC CTTCTGCAA GGA CTCTTCA CTTTCTATCA CCATGGTTAC GAACTGGCCA  
661 AGGATTTCCG GGA CTTCAAG ACACAGTTAA CCATTAGCAT ACAGAACACA AGAAATCGCT  
721 TTGAAGGCAC TAGATCAGAA GTGGAATCAC TGATGAAAAA GATGAAGGAG AATCCCCTTG  
781 AGCACAAGAC CATCAGTCCC TACACCATGG AGGGATACCT CTACGTGCAG GAGAAACGTC  
841 ACTTTGGAAC TTCTTGGGTG AAGCACTACT GTACATATCA ACGGGATTCC AAACAAATCA  
901 CCATGGTACC ATTTGACCAA AAGTCAGGAG GAAAAGGGGG AGAAGATGAA TCAGTTATCC  
961 TCAAATCCTG CACACGGCGG AAAACAGACT CCATTGAGAA GAGGTTTTGC TTTGATGTGG  
1021 AAGCAGTAGA CAGGCCAGGG GTTATCACCA TGCAAGCTTT GTCGGAAGGG GACCGGAGGC  
1081 TCTGGATGGA AGCCATGGAT GGCCGGAAC CTGTCTACAA CTCGAACAAA GACAGCCAGA  
1141 GTGAAGGGAC TGCAGATTG GACAGCATTG GCTTCAGCAT AATCAGGAAA TGCATCCATG  
1201 CTGTGAAAC CAGAGGGATC AACGAGCAAG GGCTGTATCG AATTGTGGGG GTCAACTCCA  
1261 GAGTGCAGAA GTTGCTGAGT GTCCTGATGG ACCCAAGAC TGCTTCTGAG ACAGAAACAG

1321 ATATCTGTGC TGAATGGGAG ATAAAGACCA TCACTAGTGC TCTGAAGACC TACCTAAGAA  
1381 TGCTTCCAGG ACCACTCATG ATGTACCAGT TTCAAAGAAG TTTCATCAA GCAGCAAAAC  
1441 TGGAGAACCA GGAGTCTCGG GTCTCTGAAA TCCACAGCCT TGTTTCATCGG CTCCCAGAGA  
1501 AAAATCGGCA GATGTTACAG CTGCTCATGA ACCACTTGGC AAATGTTGCT AACAACCACA  
1561 AGCAGAATTT GATGACGGTG GCAAACCTTG GTGTGGTGTT TGGACCCACT CTGCTGAGGC  
1621 CTCAGGAAGA AACAGTAGCA GCCATCATGG ACATCAAATT TCAGAACATT GTCATTGAGA  
1681 TCCTAATAGA AAACCACGAA AAGATATTTA ACACCGTGCC CGATATGCCT CTCACCAATG  
1741 CCCAGCTGCA CCTGTCTCGG AAGAAGAGCA GTGACTCCAA GCCCCCGTCC TGCAGCGAGA  
1801 GGCCCCTGAC GCTCTTCCAC ACCGTTTCAGT CAACAGAGAA ACAGGAACAA AGGAACAGCA  
1861 TCATCAACTC CAGTTTGGAA TCTGTCTCAT CAAATCCAAA CAGCATCCTT AATTCCAGCA  
1921 GCAGCTTACA GCCCAACATG AACTCCAGTG ACCCAGACCT GGCTGTGGTC AAACCCACCC  
1981 GGCCCAACTC ACTCCCCCG AATCCAAGCC CAACTTACC CCTCTCGCCA TCTTGCCCA  
2041 TGTTCTCGGC ACCATCCAGC CCTATGCCCA CCTCATCCAC GTCCAGCGAC TCATCCCCCG  
2101 TCAGCACACC GTTCCGGAAG GCAAAGCCT TGTATGCCTG CAAAGCTGAA CATGACTCAG  
2161 AACTTTCTGTT CACAGCAGGC ACGGTCTTCG ATAATGTTCA CCCATCTCAG GAGCCTGGCT  
2221 GGTGGAGGG GACTCTGAAC GGAAAGACTG GCCTCATCCC TGAAAATTAC GTGGAGTTCC  
2281 TCTAACCGTG GGCCCCAGCA GAACTGCTGA GCTTTACATG GTATCCATGA CAACTGCTGA  
2341 TTCCAGTGC GAGGCCATTT CTCTTTGCCA CTGAGAAATG CAGCGTACT GACTCTGTTG  
2401 CTACCTGTCA ACATGAATGT TTCTGTGAGC TCTGGTGTCA CTCATCTCCA TGATCATCTC  
2461 AGCCAACATG CATCAGTACT GCAAGAAAAG AAGTCAATCA GCAGAGGAGA GCATTTGATA  
2521 ACTAAGAGGA AGACTTGCAA AGCCGTTTTT TCATGAGTAC CCTGAATAGG GGGCACTCAT  
2581 TTTGTTTCAA CGGTCCAAAC GCCCAACCTT CAGAAAGAGG AAGTCAGATA GAAATAGTCC  
2641 CTGAGAGCAC ACTGTGTAGC TAAGCCTGCT GGGGCTGGGT GAAGAAATTG GCGCTGAGAT  
2701 CCAGGCTGGA TCCATTGCTT TTGTTTACAA TAGGCACTCT CTCTACCCA CCTCTCAGTA  
2761 ATTGAGAATT AAAGTGCTAC AGGCAGCTGG ATATGTTTGC ATGCAGGATG AAGAGGGTTA  
2821 AAACACTGTT TATATAAGAT CCAATTTTTT ACCATTTTTA AAGCAGCCGT TGGCCTGTCA  
2881 TCAGTGAGAT ACAATCCAGT TTTTTCATGC ACGGGAACAC ACACACCCTG CGTTTTTCCC  
2941 TCCCAGGTTA GGAACTTTTT TGCCACCAAG GGCTGCCATC CATCGCTTAG TAACCACGGC  
3001 AACCCAACCT ACTCTAAAAC CAAACCAAAA AAATAAAATA ACACATCCTC TTTGCATGAC  
3061 ACATTTTTTT TCTCCCCTTT TTGGTACACT TTTTTTGAAT GGTTTTCTAA CAACTGAAG  
3121 CACAGGATCA AGGAATTAGG GTGGTCTACT TGAGGCAGAT GGG

### 8.3. Sequenzen der Insertionen

#### 8.3.1. 1149ins96

TAGAGACAGG ATTTTCATCAT GTTGGCCAGG TTGGTTTTGA ATTCCTGACC  
TCAAGTGATC CACCTGCCTC GGCCTCCCAA AGTGGTGGGA TTTTGG

#### 8.3.2. 1290ins52

TCATCGTTGT CATATAAATC GGCGAGGTAA TATTCCATCA GGTAGACATA CG

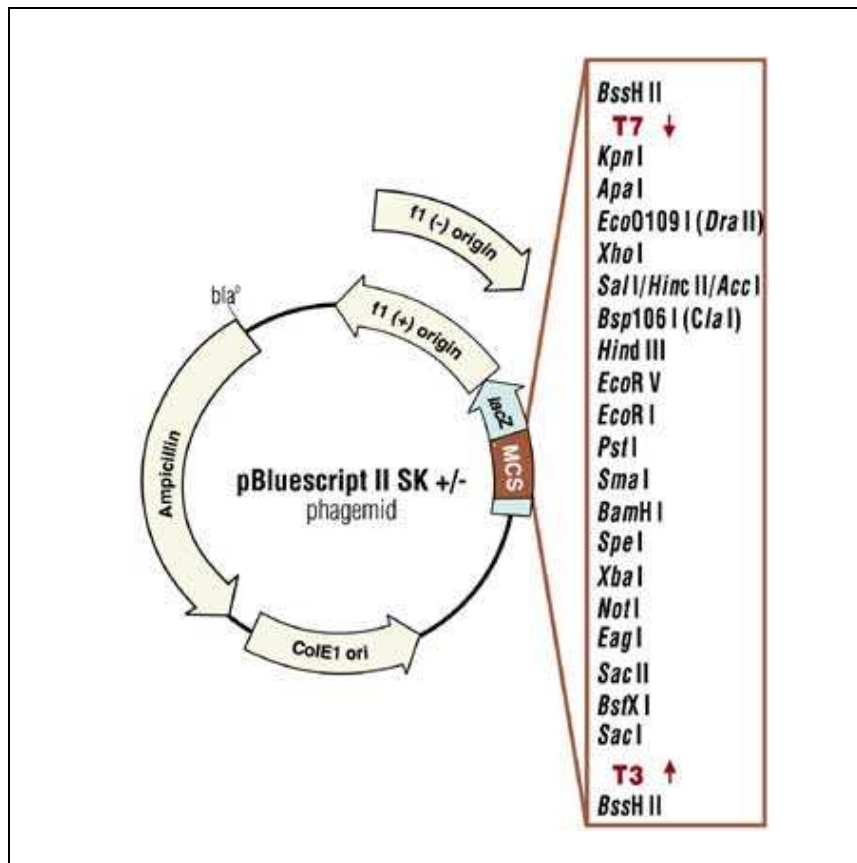
### 8.3.3. 1993ins74

GGTTCATGCG AGTTCAGCAA GCAGTTACCA TGTCTACGGC ATGCCAGGAT  
ACTGTTGGGA AGGTAGTATT CCGT

### 8.4. Vektor für cDNA-Klonierung

pBluescript® II SK(+/-), 2,96 kb, GenBank accession number X52328

Zirkuläre Karte übernommen von [www.stratagene.com](http://www.stratagene.com). Dargestellt sind die funktionellen Domänen und die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen in der Polylinkerregion (MCS). lacZ ist eine Komponente des  $\beta$ -Galactosidase-Gens. Es wird durch eine Insertion in die Polylinkerregion inaktiviert. Ampicillin markiert das Ampicillinresistenz-Gen.



### 8.5. Puffer und Lösungen

Northern Blot Agarosegel; 0,66 M (2 %) Formaldehyd-, 1 % Agarosegel:

1 g Agarose

94,6 ml MOPS 1 fach

5,4 ml Formaldehyd 37 %

**MOPS-Puffer 10 fach konzentriert:**

200 mM MOPS (morpholinopropansulfonic-acid)  
50 mM Natriumacetat  
10 mM EDTA; pH 7,0

**Northern Blot RNA-Ladepuffer:**

250 µl deionisiertes Formamid  
83 µl Formaldehyd 37 %  
50 µl MOPS-Puffer 10 fach konzentriert  
0,01 % Bromphenolblau

**SSC 20 fach konzentriert:**

3 M NaCl  
300 mM Natrium-Citrat-Dihydrat; pH 7,0

**Waschpuffer 1, Hybridisierung (Roche):**

2 fach SSC  
0,1 % SDS

**Waschpuffer 2, Hybridisierung (Roche):**

0,1 fach SSC  
0,1 % SDS

**DIG Wash and Block Buffer Set (Roche):**

Waschpuffer  
100 mM Maleinsäure  
150 mM NaCl; pH 7,5 (+20°C)  
0,3 % Tween ® 20

**Maleinsäurepuffer**

100 mM Maleinsäure  
150 mM NaCl; pH 7,5 (+20°C)

**Blocking stock solution (10 fach konzentriert)**

10 % Blockreagenz in Maleinsäurepuffer

**Detektionspuffer**

100 mM Tris-HCl  
100 mM NaCl; pH 9,5 (+20°C)

**Natriumphosphatpuffer nach Church und Gilbert**

0,25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,2)  
1 mM EDTA  
20 % SDS  
0,5 % BBR

**Waschpuffer nach Church und Gilbert**

20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1 mM EDTA  
1 % SDS

### **Engler-Blum et al. Detektionsprotokoll**

#### **Waschlösung**

0,1 M Maleinsäure  
3 M NaCl  
0,3 % Tween 20; pH 8,0

#### **Substrat-Puffer**

0,1M Tris-HCL  
0,1M NaCl  
50mM MgCl<sub>2</sub>; pH9,5



## 9. Danksagung

Für die freundliche Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung der gesamten Arbeit gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Arndt Borkhardt. Sein Ideenreichtum und seine umfassende Kenntnis der wissenschaftlichen Literatur gaben mir in zahlreichen Diskussionen Anregung sowie Hilfestellung und ermöglichten das Wachsen dieser Arbeit.

Prof. Dr. Fritz Lampert, einem Pionier auf dem Gebiet der onkologischen Genetik, danke ich für die großzügigen Arbeitsbedingungen in seinem Labor, durch die das Zustandekommen meiner Arbeit erst ermöglicht wurde.

Für die hervorragende Anleitung und technische Unterstützung bei der Einarbeitung in die molekularbiologischen Methoden danke ich Frau Claudia Keller.

In der fast täglichen Zusammenarbeit mit Stig Bojesen und Folke Schläger möchte ich den wertvollen fachlichen Austausch, die gegenseitige Hilfsbereitschaft und den persönlichen Kontakt hervorheben, die den Laboralltag wesentlich erleichtert haben.

Ein herzliches Dankeschön gilt meiner Familie, die durch viel Geduld und Aufmunterung dazu beitrug diese Arbeit zu vollenden.

## 10. Lebenslauf

Name	Dirk Scharr
Geburtsdatum	25.07.1969
Geburtsort	Stuttgart
Familienstand	verheiratet, Sohn Moritz am 10.02.2002 geboren
1976-1980	Grundschule
1980-1989	Hegel-Gymnasium, Stuttgart-Vaihingen
05/1989	Allgemeine Hochschulreife
09/1989-11/1990	Diakonissenkrankenhaus Stuttgart, Zivildienst
04/1991-09/1992	Sport-, Gymnastik- und Krankengymnastikschule Waldenburg, die Ausbildung zum Sport- und Physiotherapeuten wurde wegen Beginn des Studiums vor Abschluss beendet
09/1992-09/1998	Justus-Liebig-Universität Gießen
09/1994	Ärztliche Vorprüfung
09/1995	1. Abschnitt d. Ärztlichen Prüfung
09/1998	2. Abschnitt d. Ärztlichen Prüfung
10/1994-02/1996	Studentische Hilfskraft Physiologisches Institut
01/1997-10/1998	Doktorand im molekulargenetischen Labor der Abteilung für Hämatologie und Onkologie des Zentrums für Kinderheilkunde
10/1998-11/1999	Eberhard-Karls-Universität Tübingen Praktisches Jahr: Bürgerhospital Stuttgart
11/1999	3. Abschnitt d. Ärztlichen Prüfung
02/2000-07/2001	Arzt im Praktikum, Klinikum Lahr
11/2001-12/2003	Assistenzarzt, Abteilung Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Emmendingen
Seit 01/2004	Assistenzarzt, Abteilung Innere Medizin I der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Freiburg, den 6. August 2004