

Charakterisierung genomischer Bruchpunkte
innerhalb des MLL-Gens bei Leukämien im
Kindesalter

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

vorgelegt von
aus

Thomas Leis
Gelnhausen

Gießen 2000

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. R. Repp

Gutachter: Prof. Dr. U. Müller

Tag der Disputation: 4. April 2001

Einige Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

1. Leis T, Repp R, Borkhardt A, Metzler M, Schlager F, Harbott J, Lampert F. A new fingerprint method for sequence analysis of chromosomal translocations at the genomic DNA level. *Leukemia* 1998; 12:758-763.
2. 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(2):195-202.
3. Gillert E, Leis T, Repp R, Reichel M, Hosch A, Breitenlohner I, Angermuller S, Borkhardt A, Harbott J, Lampert F, Griesinger F, Greil J, Fey GH, Marschalek R. A DNA damage repair mechanism is involved in the origin of chromosomal translocations t(4;11) in primary leukemic cells. *Oncogene* 1999; 18:4663-4671

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	2
2.1 Chromosomale Translokationen als Ursache von Leukämien	2
2.2 Chromosomale Translokationen mit Beteiligung der Region 11q23.....	2
2.2.1 11q23 Aberrationen bei der akuten lymphoblastischen Leukämie.....	3
2.2.2 11q23 Aberrationen bei der akuten myeloblastischen Leukämie.....	4
2.2.3 Sekundäre akute Leukämien mit MLL-Gen Rekombinationen.....	4
2.2.4 MLL-Rekombinationen bei akuten Leukämien im Säuglingsalter	4
2.3 Mögliche Mechanismen der Rekombination des MLL-Gens.....	5
2.3.1 Alu-Sequenzen	6
2.3.2 Topoisomerase II Erkennungssequenzen.....	7
2.3.3 VDJ-Rekombination.....	8
2.4 Verfahren zur Sequenzierung chromosomaler Bruchpunkte.....	9
3 PROBLEMSTELLUNG DER ARBEIT	10
4 MATERIAL UND METHODEN	11
4.1 Ausgangsmaterial.....	11
4.1.1 Leukämiezelllinien	11
4.1.2 Patientenmaterial.....	11
4.2 Isolation mononukleärer Zellen.....	13
4.3 DNA-Isolation.....	13
4.4 Polymerase-Ketten-Reaktion	14
4.5 Long-PCR.....	15
4.6 Agarosegel-Elektrophorese	19
4.7 Reinigung der Long-PCR Produkte.....	20
4.8 Restriktionsverdau der Long-PCR-Produkte	21
4.9 Fluoreszenzmarkierung der Restriktionsfragmente.....	21
4.9.1 Ligation FAM-markierter Adapter an die Restriktionsfragmente	22
4.9.2 Fluoreszenzmarkierung von Restriktionsfragmenten mittels Reverser Transkriptase und Fluoro-dUTP Labelling Mix	22
4.9.3 Fluoreszenzmarkierung von Restriktionsfragmenten mittels Taq-Polymerase und Fluoro-dUTP Labelling Mix	23
4.9.4 Fluoreszenzmarkierung von Restriktionsfragmenten mittels Taq-Polymerase und 11-Fluorescein-dUTP.....	23

4.10	Reinigung der fluoreszenzmarkierten Restriktionsfragmente	23
4.11	Automatische Fragmentlängenanalyse	24
4.12	Automatische DNA-Sequenzierung	26
4.13	Auswertung der Sequenzdaten	29
5	ERGEBNISSE	30
5.1	Methodenentwicklung	30
5.1.1	Long-PCR zur Amplifikation der Genomabschnitte mit MLL-Gen-Rekombination	30
5.1.1.1	Amplifikation der MLL-Bruchpunkt-Cluster-Region	30
5.1.1.2	Amplifikation des Bruchpunktareals bei der Translokation t(4;11)(q21;q23).....	31
5.1.1.3	Amplifikation des Bruchpunktareals bei der Translokation t(9;11)(p22;q23).....	31
5.1.1.4	Amplifikation des Bruchpunktareals bei der Translokation t(X;11)(q13;q23)	31
5.1.2	Verfahren zur Fluoreszenzmarkierung der Restriktionsfragmente.....	32
5.1.2.1	Fluoreszenzmarkierung von Restriktionsfragmenten mittels FAM-Adapter-Ligation.....	33
5.1.2.2	Fluoreszenzmarkierung von Restriktionsfragmenten mittels Reverser Transkriptase und „Fluoro-dUTP Labelling Mix“	33
5.1.2.3	Fluoreszenzmarkierung von Restriktionsfragmenten mittels Taq-Polymerase und „Fluoro-dUTP Labelling Mix“	34
5.1.2.4	Fluoreszenzmarkierung von Restriktionsfragmenten mittels Taq-Polymerase und 11-Fluorescein-dUTP (Fluorogreen)	34
5.1.3	Eingrenzung des MLL-Bruchpunktes durch hochauflösende Fragmentlängenanalyse	36
5.1.4	Sequenzierung der MLL-Bruchpunkte.....	38
5.2	Probenanalytik	39
5.2.1	Lokalisation der MLL-Bruchpunkte	39
5.2.1.1	Charakterisierung des Verteilungsmusters aller MLL-Bruchpunkte	40
5.2.1.2	Charakterisierung des Verteilungsmusters bei ausschließlicher Betrachtung der t(4;11)-Bruchpunkte	43
5.2.2	Lage der MLL-Bruchpunkte in Beziehung zu Alu-repetitiven Elementen.....	46
5.2.3	Verteilung potentiell rekombinationsbegünstigender Sequenzmotive im Bezug zur Lokalisation der MLL-Bruchpunkte.....	48
5.2.3.1	Topoisomerase-II-Erkennungssequenzen.....	49
5.2.3.2	VDJ-Rekombinase-Erkennungssequenzen.....	52
5.2.4	Lage und Verteilung von rekombinationsbegünstigenden Sequenzmotiven in den sequenzierten Partnergen-Anteilen.	54
5.2.4.1	Topoisomerase II-Erkennungssequenzen.....	54
5.2.4.2	VDJ-Rekombinase-Erkennungssequenzen.....	55
6	DISKUSSION	56
6.1	Entwicklung einer Methode zur Ermittlung der Sequenz chromosomaler Bruchpunkte bei MLL-Gen-Aberrationen	56
6.1.1	Auf der Polymerase-Kettenreaktion basierende Verfahren zur Amplifikation bruchpunktüberspannender DNA-Fragmente.....	56
6.1.1.1	Direkte Amplifikation eines Bruchpunktareals bei MLL-Gen-Aberrationen mittels Long-PCR.....	56
6.1.1.2	Panhandle-PCR.....	57
6.1.1.3	Inverse Polymerase-Ketten-Reaktion (IPCR).....	59

6.1.2	Analyse der bruchpunktüberspannenden Long-PCR-Produkte	60
6.1.2.1	Hochauflösende DNA-Fragmentlängenanalyse	60
6.1.2.2	Direktsequenzierung des genomischen Bruchpunktes	61
6.2	Nutzung der genomischen MLL-Bruchpunktsequenzen für klinische Fragestellungen	62
6.2.1	Diagnostik der „minimalen Resterkrankung“ (MRD-Diagnostik)	62
6.2.2	Retrospektiver Nachweis leukämischer Blasten	63
6.3	Analyse der Bruchpunktsequenzen von Knochenmarksproben mit MLL-Gen-Aberrationen	64
6.3.1	Verteilung genomischer Bruchpunkte innerhalb des MLL-Gens	64
6.3.1.1	Verteilung genomischer Bruchpunkte bei Patienten mit primärer de-novo Leukämie	65
6.3.1.2	Verteilung genomischer Bruchpunkte des MLL-Gens bei sekundärer therapieinduzierter akuter Leukämie	66
6.3.1.3	Verteilung genomischer Bruchpunkte des MLL-Gens bei akuter Leukämie im Säuglingsalter	66
6.3.2	Assoziation zwischen MLL-Bruchpunkten und Alu-repetitiven Elementen	66
6.3.3	Der Erwartungswert des mittleren Abstandes zwischen verschiedenen Sequenzmotiven und MLL-Bruchpunkten	67
6.3.3.1	Räumliche Assoziation zwischen Topoisomerase-Erkennungssequenzen und MLL-Bruchpunkten	68
6.3.3.2	Räumliche Assoziation zwischen VDJ-Rekombinase-Erkennungssequenzen und MLL-Bruchpunkten	69
6.3.4	Das DNA-Damage-Repair-Modell	70
7	ZUSAMMENFASSUNG	73
8	LITERATURVERZEICHNIS	75
9	ANHANG	88
9.1	Sequenzen der Fusionsbereiche des MLL-Gens mit den Partnergenen	88
9.2	Oligonukleotide	93
9.3	Fluoreszenzfarbstoffe	95
9.4	Puffer und Lösungen	96
9.5	Chemikalien	98
9.6	Geräte	99

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Nested-L-PCR	19
Abbildung 2:	Nested-Long-PCR.....	32
Abbildung 3:	Fluoreszenzmarkierung der Restriktionsfragmente.....	35
Abbildung 4:	Eingrenzung der Lage des Bruchpunktes durch hochauflösende Fragmentlängenanalyse	37
Abbildung 5:	Lage der genomischen Bruchpunkte in der MLL-BCR	40
Abbildung 6:	Verteilung der Bruchpunkte auf 2 Hälften der MLL-BCR.....	41
Abbildung 7:	Verteilung der Bruchpunkte auf 8 gleich lange Regionen der MLL-BCR.....	42
Abbildung 8:	Lage der genomischen Bruchpunkte des MLL-Gens bei t(4;11)	43
Abbildung 9:	Verteilung der t(4;11)-Bruchpunkte auf die 2 Hälften der MLL-BCR.....	44
Abbildung 10:	Verteilung der t(4;11)-Bruchpunkte auf 8 gleich lange Regionen der MLL-BCR	45
Abbildung 11:	Lage der MLL-Bruchpunkte in Relation zu Alu-Repeats	47
Abbildung 12:	Lage der MLL-Bruchpunkte in Relation zu Topoisomerase-II-Erkennungssequenzen	51
Abbildung 13:	Lage der MLL-Bruchpunkte in Relation zu VDJ-Nonamer- und Heptamer-Motiven.....	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Leukämiezelllinien.	11
Tabelle 2:	Patientendaten	12
Tabelle 3:	Lage der genomischen Bruchpunkte in der MLL-BCR.....	39
Tabelle 4:	Asymptotischer Chi-Quadrat-Test bei Verteilung der Bruchpunkte auf zwei Hälften der MLL-BCR.....	41
Tabelle 5:	Asymptotischer Chi-Quadrat-Test bei Verteilung der Bruchpunkte auf 8 gleich lange Regionen der MLL-BCR	42
Tabelle 6:	Asymptotischer Chi-Quadrat-Test bei Verteilung der t(4;11)-Bruchpunkte auf zwei Hälften der MLL-BCR.....	44
Tabelle 7:	Asymptotischer Chi-Quadrat-Test bei Verteilung der t(4;11)-Bruchpunkte auf 8 gleich lange Regionen der MLL-BCR.....	45
Tabelle 8:	Lage der Alu-repetitiven Elemente in der MLL-Bruchpunkt-Cluster-Region	46
Tabelle 9:	Asymptotischer Chi-Quadrat-Test zur Lage von MLL-Bruchpunkten in Alu-repetitiven Sequenzen.....	47
Tabelle 10:	Potentiell rekombinationsbegünstigende Sequenzmotive.....	49
Tabelle 11:	Lage von Topoisomerase-II-Erkennungssequenzen in der MLL-BCR.....	50
Tabelle 12:	Position von VDJ-Heptamer- und VDJ-Nonamer-Motiven in der MLL-BCR.....	52
Tabelle 13:	Topoisomerase-II-Erkennungssequenzen in Partnergenanteilen.....	54
Tabelle 14:	VDJ-Heptamer-Motive in Partnergenanteilen.....	55
Tabelle 15:	Long-PCR-Primer-Oligonukleotide.....	93
Tabelle 16:	Sequenzierprimer-Oligonukleotide	94
Tabelle 17:	Oligonukleotide zur FAM-Adapterligation.....	94
Tabelle 18:	Primerkombinationen zur Amplifikation und Sequenzierung.....	95

1 Einleitung

Leukämien werden durch eine unkontrollierte klonale Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen verursacht. Mit einer Erkrankungshäufigkeit von etwa 4 pro 100.000 Kindern unter 15 Jahren sind sie die häufigste maligne Erkrankung des Kindesalters (1). In der Bundesrepublik Deutschland werden pro Jahr etwa 600 Neuerkrankungen diagnostiziert. Dabei leiten sich etwa 80% von lymphatischen Vorläuferzellen ab, sie werden als akute lymphoblastische Leukämien (ALL) bezeichnet. Etwa 20% der Erkrankungen sind sog. akute myeloblastische Leukämien (AML), die sich aus der myeloischen Zellreihe ableiten. Chronische Verlaufsformen der Leukämien sind im Kindesalter sehr selten.

Die Akkumulation leukämischer Blasten im Knochenmark führt zur Verdrängung der normalen Hämatopoese mit folgender Knochenmarkinsuffizienz. Auch können leukämische Blasten extramedulläre Organe wie Lymphknoten, Leber und Milz infiltrieren. Weniger häufig betroffen sind Nieren, Haut, Hoden und zentrales Nervensystem. Aufgrund der Knochenmarkinsuffizienz treten Symptome wie gestörtes Allgemeinbefinden, Blässe, Blutungsneigung und erhöhte Infektanfälligkeit auf. Die Infiltration extramedullärer Organe äußert sich in Knochenschmerzen, Bauchschmerzen, Hepatomegalie, Splenomegalie und Lymphknotenschwellungen. Unbehandelt führen Leukämien zum Tod des Kindes (2).

Die Behandlung von Kindern mit akuter Leukämie erfolgt in Deutschland im Rahmen von prospektiven multizentrischen Therapiestudien innerhalb der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH). Am weitesten verbreitet sind die Protokolle der BFM-Studiengruppe (aktuell ALL-BFM 95, ALL-BFM 99 MRD-Pilot, ALL-BFM 2000, AML-BFM 98). Mit Hilfe geeigneter Stratifizierungsmerkmale, wie z.B. dem Immunphänotyp der Blasten, der Leukämiezellmasse oder molekulargenetischen Merkmalen der malignen Zellen wird eine risikoadaptierte zytostatische Polychemotherapie durchgeführt, die mit weiteren Therapieoptionen, wie der Transplantation hämatopoetischer Stammzellen kombiniert werden kann. Bei der akuten lymphoblastischen Leukämie werden mit diesem Vorgehen derzeit Dauerheilungsraten von über 70% erreicht.

2 Literaturübersicht

2.1 Chromosomale Translokationen als Ursache von Leukämien

Maligne Erkrankungen sind nach heutiger Sicht mit genetischen Veränderungen in den betroffenen Zellen verbunden. Bei der malignen Transformation hämatopoetischer Zellen spielen chromosomale Translokationen eine besondere Rolle. Durch den Austausch genetischen Materials zwischen den betroffenen Chromosomen kommt es zu quantitativen oder qualitativen Störungen der normalen Genexpression. Die Folge der Überexpression von Protoonkogenen oder der Expression von chimären Fusionsgenen ist eine unkontrollierte klonale Proliferation der betroffenen Zellen (3;4).

Ein Beispiel für die Überexpression eines Protoonkogens ist die Translokation t(8;14) beim Burkitt-Lymphom. Die gesteigerte Expression des intakten c-MYC-Onkogens auf Chromosom 14 resultiert hierbei aus der Fusion mit dem Immunglobulinschwerkettengen IgH auf Chromosom 8 (5;6).

Liegen die chromosomalen Brüche innerhalb von Genen, so führen Translokationen bei Erhalt des Leserahmens zur Expression von chimären Fusionsgenen (7). Erstes beschriebenes Beispiel hierfür war die zum Philadelphia-Chromosom führende Translokation t(9;22) mit der Fusion von Teilen des BCR-Gens an Teile des ABL-Gens. Das BCR-ABL-Fusionsprotein zeigt eine zum ursprünglichen ABL-Protein gesteigerte Tyrosinkinase-Aktivität (8-11).

2.2 Chromosomale Translokationen mit Beteiligung der Region 11q23

Ein bei Leukämien des Kindesalters häufig an chromosomalen Translokationen beteiligter Genombereich ist die Region 11q23 auf dem langen Arm des Chromosoms 11 (12;13). Die weitaus größte Zahl dieser 11q23-Aberrationen betrifft das MLL-Gen (mixed-lineage-leukemia oder myeloid-lymphoid-leukemia) (14), auch bezeichnet als ALL-1-Gen (acute lymphoblastic-leukemia) (15), als HRX- oder HTRX-Gen (human-homologue of trithorax) (16;17). Rekombinationen andere Gene der Region 11q23, wie das RCK- und das PLZF-Gen sind nur in Einzelfällen beschrieben (18-20).

Das MLL-Gen überspannt etwa 100 Kilobasen (kb) der Region 11q23. 37 Exons codieren für ein etwa aus 3969 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 431 Kilodalton (21;22). Translokationen des MLL-Gens führen zur Bildung eines chimären Fusionsgens aus einem MLL-Anteil und einem Anteil des jeweiligen Partnergens. Bisher sind mehr als 30 Fusionspartner des MLL-Gens beschrieben (23). Die häufigsten Translokationen sind t(4;11)(q21;q23), t(6;11)(q27;q23), t(9;11)(p22;q23) und t(11;19)(q23;p13). Fusionspartner des MLL-Gens sind dabei das AF4-Gen auf Chromosom 4 (15;24), das AF6-Gen auf Chromosom 6 (25), das AF9-Gen auf Chromosom 9 (26;27), sowie das ENL-Gen auf Chromosom 19 (16). Seltener betroffen ist das ELL-Gen auf Chromosom 19 (28;29). Der zytogenetische Nachweis einer 11q23-Rekombination und der Nachweis spezifischer chimärer mRNAs mittels Reverser-Transkriptase-PCR (RT-PCR) ist fester Bestandteil der Diagnostik im Rahmen der Therapiestratifizierung (30-34). Rekombinationen des MLL-Gens finden sich sowohl bei akuten lymphoblastischen als auch bei akuten myeloblastischen Leukämien (35;36).

2.2.1 11q23 Aberrationen bei der akuten lymphoblastischen Leukämie

Bei der akuten lymphoblastischen Leukämie des Kindesalters sind 11q23-Aberrationen in etwa 5-10% nachweisbar. Häufigste Translokation ist die t(4;11) mit einer Fusion zwischen dem MLL-Gen und dem AF4-Gen. Weniger häufig wird die Translokationen t(11;19) zwischen dem MLL-Gen und dem ENL-Gen beobachtet (37). Patienten mit ALL und 11q23-Translokation zeigen überdurchschnittlich häufig eine Hyperleukozytose und extramedulläre Manifestationen wie Hepatosplenomegalie und ZNS-Beteiligung. Die Lymphoblasten weisen in der Regel den unreifen Immunphänotyp einer pro-B-ALL auf. Insbesondere Patienten mit einer Translokation t(4;11) haben eine schlechte Prognose (38;39). Der Nachweis dieser Translokation bzw. des chimären MLL/AF4-Fusionstranskripts führt deshalb bei der Stratifizierung im Rahmen der Therapiestudie ALL-BFM-95 und der nachfolgenden Pilotstudie ALL-BFM 99 MRD-Pilot zu einer Einteilung in die Hochrisikogruppe. Der Nachweis dieser Rekombination bei einer akuten lymphoblastischen Leukämie gilt als Indikation für eine

Stammzelltransplantation (SZT) von einem HLA-identischen Geschwisterspender in der ersten Remission.

2.2.2 11q23 Aberrationen bei der akuten myeloblastischen Leukämie

Bei akuten myeloblastischen Leukämien (AML) des Kindesalters werden chromosomale Translokationen mit Beteiligung der Region 11q23 in etwa 5% beobachtet. Am häufigsten nachweisbar ist die Translokation t(9;11) zwischen MLL und AF9, seltener sind neben anderen die Translokationen t(11;19) zwischen MLL und ELL und t(6;11) zwischen MLL und AF6. Ähnlich wie bei der ALL zeigen diese Patienten vermehrt eine Hyperleukozytose sowie extramedulläre Manifestationen mit Hepatosplenomegalie und ZNS-Befall. Die Myeloblasten zeigen bevorzugt einen FAB-M4 (akute myelomonozytäre Leukämie) oder einen M5-Subtyp (akute Monoblastenleukämie) (40).

2.2.3 Sekundäre akute Leukämien mit MLL-Gen Rekombinationen

Therapieinduzierte sekundäre akute Leukämien bei Patienten, die im Rahmen einer Chemotherapie eines primären Malignoms mit Hemmern des Enzyms Topoisomerase II aus der Gruppe der Epipodophyllotoxine behandelt wurden, weisen gehäuft MLL-Rekombinationen auf. In der Regel handelt es sich dabei um akute myeloblastische- (t-AML), selten um akute lymphoblastische Leukämien (t-ALL). Die durch Topoisomerasehemmer induzierte sekundäre AML zeichnet sich im Gegensatz zu den durch Alkylantien bedingten Formen durch eine kurze Latenzzeit, durch das Fehlen einer myelodysplastischen Phase und durch die bevorzugte Morphologie FAB-M4 oder M5 aus. Die häufigste Translokation bei der t-AML ist t(9;11) (41-50).

2.2.4 MLL-Rekombinationen bei akuten Leukämien im Säuglingsalter

Etwa 2,5-5% der akuten lymphoblastischen Leukämien (ALL) und 6-14% der akuten myeloblastischen Leukämien (AML) im Kindesalter treten bereits im ersten Lebensjahr auf. In dieser Altersgruppe stellen Translokationen des MLL-Gens mit verschiedenen Partnergenen die häufigste nachweisbare genetische Rekombination dar. Sie lassen sich in 70-80% aller ALL und in bis zu 60% aller AML im Säuglingsalter nachweisen (51-53).

Häufigste Rekombination bei der Säuglings-ALL ist die Translokation t(4;11). Der Nachweis des MLL/AF4-Fusionsgens geht dabei gehäuft mit einem Erkrankungsalter unter 6 Monaten, mit einer fehlenden Expression des Oberflächenmarkers CD10, mit einer Hyperleukozytose, mit einer Hepatosplenomegalie sowie mit einer erhöhten Inzidenz eines ZNS-Befalls einher. Die MLL/AF4-Rekombination korreliert mit einer extrem schlechten Prognose (54-56).

Häufigste Rekombination bei der AML im Säuglingsalter ist die Translokation t(9;11) mit einem MLL/AF9-Fusionsgen. Die Säuglings-AML, meist FAB-Subtyp M4 oder M5, ist ebenfalls mit einer erhöhten Inzidenz extramedullärer Manifestationen und einer schlechten Prognose assoziiert (57).

Ein besonders hohes Erkrankungsrisiko haben eineiige Zwillinge, bei denen ein Zwilling an einer akuten Leukämie mit MLL-Rekombination erkrankt ist. Der Nachweis eines identischen Leukämiezellklons bei Zwillingen, die beide an einer akuten Leukämie mit MLL-Rekombination erkrankt waren, weist auf die schon intrauterine maligne Transformation bei einem Zwilling mit nachfolgender „Metastasierung“ in den zweiten Zwilling hin. Diese Beobachtung bei Zwillingen läßt den Schluß zu, daß es sich bei Leukämien im Neugeborenenalter bzw. im Säuglingsalter um angeborene Leukämien mit einer MLL-Rekombination schon in utero handelt (58-60).

2.3 Mögliche Mechanismen der Rekombination des MLL-Gens

Bei der überwiegenden Mehrzahl der Translokationen des MLL-Gens sowohl bei primären akuten (de-novo) Leukämien als auch bei sekundären akuten Leukämien nach Therapie mit Topoisomerasehemmern liegt der genomische Bruchpunkt innerhalb einer nur etwa 8,3 Kilobasen langen sogenannten Bruchpunkt-Cluster-Region dieses Gens. Sie wird von Schnittstellen für das Restriktionsenzym BamHI innerhalb der Exone 5 und 11 begrenzt. Da nach Einführung dieser Nomenklatur weitere Exone abgegrenzt werden konnten, wird von einigen Autoren inzwischen eine neue Exonbezeichnung verwendet, nach der die Bruchpunkt-Cluster Region zwischen den Exonen 8 und 14 liegt (22;61). Die Bezeichnung der die MLL-Bruchpunktregion begrenzenden Exone in dieser Arbeit bezieht sich auf die ursprüngliche Nomenklatur (21;62). Die Basensequenz dieser Region ist bekannt.

Verschiedene Mechanismen, die einen Bruch des Gens in dieser begrenzten Bruchpunkt-Cluster-Region begünstigen könnten, werden diskutiert.

2.3.1 Alu-Sequenzen

Alu-Sequenzen sind etwa 300 Basenpaare lange repetetive Sequenzen aus der Gruppe der SINEs (short interspersed nuclear elements). Sie sind mit einer Kopienzahl von etwa 500.000 bis 1.000.000 ubiquitär über das menschliche Genom verteilt und treten bei einer Gleichverteilung etwa alle 3000 bis 5000 Basenpaare auf (63;64). Sie bestehen aus zwei zu einem tandemförmigen Dimer angeordneten homologen Monomeren mit einer 32 Basenpaare langen Insertion im zweiten Monomer. Die beiden Monomere werden durch eine kurze A-reiche Region voneinander getrennt (65). Je nach Grad der Homologie der verschiedenen Alu-Sequenzen werden sie in Alu-Subfamilien eingeteilt. Ihre Aufgabe im menschlichen Genom ist letztendlich unbekannt (66;67).

Ungleiches Crossing-over zwischen homologen Alu-Elementen in Keimbahnzellen führt möglicherweise zu Deletionen und Duplikationen in Genen. Diese genetische Veränderungen werden in einigen Fällen für die Entstehung angeborener Erkrankung verantwortlich gemacht (68-75).

Auch an Rekombinationsereignissen in somatischen Zellen scheinen Alu-Elemente beteiligt zu sein. So treten in den an der reziproken Translokation $t(9;22)(q34;q11)$ (Philadelphia-Translokation) beteiligten Genen, dem ABL-Gen auf Chromosom 9 und dem BCR-Gen auf Chromosom 22, Alu-repetetive Sequenzen in extrem hoher Dichte auf (76). Bei Patienten mit Philadelphia-Chromosom positiver Leukämie lagen charakterisierte genomische Bruchpunkte sowohl im BCR-Gen als auch im ABL-Gen direkt in Alu-homologen Sequenzen oder in ihrer unmittelbaren Nähe (77-79).

Auch bei Rekombinationen des MLL-Gens wird eine Beteiligung von Alu-Repeats diskutiert. So finden sich bei einigen erwachsenen Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML) ohne zytogenetisch erkennbare Veränderungen in den Blasten, sowie bei der Mehrzahl der Patienten mit AML und Trisomie 11 direkte Tandem-Duplikationen von Teilen des MLL-Gens. Dafür verantwortlich gemacht wird von einigen Autoren eine Rekombination zwischen Alu-Sequenzen in Intron 1 mit Alu-Sequenzen in Intron 6 bzw. in Intron 8 (80-82). Eine ursächliche Beteiligung von Alu-

repetitiven Sequenzen an reziproken Translokationen des MLL-Gens mit verschiedenen Partnergenen wird auch wegen der hohen Dichte von 8 Alu-Sequenzen in der MLL-Bruchpunkt-Cluster-Region diskutiert (62).

2.3.2 Topoisomerase II Erkennungssequenzen

Topoisomerasen II sind an die Zellkernmatrix assoziierte Enzyme, die an Replikations-, Transkriptions- und Rekombinationvorgängen der Zelle beteiligt sind. Die Topoisomerase katalysiert dabei in einem ersten Schritt einen transienten DNA-Doppelstrangbruch. Dabei bindet das Enzym am 5'-Ende eines jeden Strangbruchs und bildet einen DNA-Topoisomerase-Komplex („cleavable complex“). In einem zweiten Schritt erfolgt eine Entspiralisierung der DNA und die Religasierung der Stränge (83). Die basenspezifische Interaktion der Topoisomerase II mit der DNA ist abhängig von einer unter Vertebraten hochkonservierten 18 Basenpaare langen Konsensus-Sequenz (Erkennungssequenz). Sie besteht aus 10 spezifischen sog. Non-N-Positionen, 8 weitere Positionen sind variabel (sog. N-Positionen) (5'-[A/G]N[T/C]NNC NNG[T/C]NG[G/T]TN[T/C]N[T/C]-3') (84). Eine hohe Affinität der Topoisomerase ist dabei zu erwarten, wenn auf einem DNA-Strang eine Basenhomologie von 100% oder von 90% (10 bzw. 9 der Non-N-Positionen) und auf dem direkten Gegenstrang eine Homologie von mindestens 50% (5 der Non-N-Positionen) zur Topoisomerase-Konsensus-Sequenz gegeben ist. Die DNA-Topoisomerase-Interaktion ist in vivo zusätzlich abhängig von weiteren DNA-bindenden Proteinen und ihrer Wechselwirkung mit der DNA, so daß nicht jede Topoisomerase-Konsensus-Sequenz auch eine Bindung des Enzyms an die DNA erlaubt. (85).

Topoisomerase II hemmende Chemotherapeutika aus der Gruppe der Epipodophyllotoxine, wie Etoposid (VP-16) und Teniposid (VM-26) und aus der Gruppe der Anthrazykline, wie Doxorubicin, erzielen ihre Wirkung unter anderem durch Stabilisierung der intermediären DNA-Topoisomerase-Komplexe. Sie unterbinden so die Religasierung der DNA-Stränge mit folgender Akkumulation von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen (86-88).

Das gehäufte Auftreten von Sekundärleukämien mit MLL-Translokationen nach Therapie mit Topoisomerasehemmern läßt einen Zusammenhang zwischen einer aberranten Funktion des Enzyms und der Rekombination des MLL-Gens vermuten.

2.3.3 VDJ-Rekombination

Die VDJ-Rekombination in lymphatischen Vorläuferzellen dient einer möglichst großen Diversität bei der Bildung von Immunglobulinen (Ig) in B-Lymphozyten bzw. von T-Zell-Rezeptoren (TCR) in T-Lymphozyten. Die hohe Variabilität der V-Regionen der H-Ketten bzw. der L-Ketten der Immunglobuline wird durch eine somatische Rekombination nicht homologer Genabschnitte erreicht. Dabei werden durch eine lymphozytenspezifische Rekombinase die für die variablen Bereiche der Immunglobuline kodierenden V- und J-Abschnitte (L-Ketten) bzw. V-, D- und J-Abschnitte (H-Ketten) rekombiniert (VDJ-Rekombination) (89). Die spezifische Erkennungssequenz der VDJ-Rekombinase besteht dabei aus jeweils einem hochkonservierten Heptamer (5'-CACAGTG-3') und einem ebenfalls konservierten Nonamer (5'-ACAAAACC-3'), getrennt von einem nichtkonservierten Abschnitt von 12 bzw. 23 Basenpaare Länge, dem sog. Spacer (90). Diese Heptamer-Spacer-Nonamer-Sequenz flankiert die V-Exone, die J-Exone (joining segments) und die D-Segmente (diversity-segments). Die VDJ-Rekombinase katalysiert die Zusammenlagerung und Ligation der V- und J-Abschnitte (L-Ketten-Genlokus), bzw. der V-, D- und J-Abschnitte (H-Ketten-Genlokus) zu einem letztendlich für die variable Region eines Immunglobulins kodierenden Gen. Zwischen den V-,D- und J-Abschnitten liegende genomische DNA-Abschnitte werden bei dem Rekombinationsprozeß deletiert.

Durch die terminale Desoxynukleotidyltransferaseaktivität (TdT) der VDJ-Rekombinase werden bei der Ligation der Genabschnitte vereinzelt zusätzliche nicht matrizenodierte sog. N-Nukleotide eingebaut (91;92). In analoger Weise verläuft die nichthomologe somatische Rekombination der T-Zell-Rezeptor-Genabschnitte (93).

Pathologische Rekombinationen unter Beteiligung von Immunglobulingenen oder T-Zell-Rezeptorgenen werden auf eine fehlerhafte VDJ-Rekombination zurückgeführt. Sie werden bei verschiedenen malignen Erkrankungen

beobachtet. So findet sich beim Burkitt-Lymphom regelhaft die Translokation t(8;14) mit Rekombination des Immunglobulinschwerketten-Gens (IGH-Lokus) mit dem cMYC-Protoonkogen. Seltener werden beim Burkitt-Lymphom die Translokationen t(2;8) und t(8;22) beobachtet. Auch hier kommt es zur Rekombination von Immunglobulingenen (IGL λ -Lokus, IGL κ -Lokus) mit cMYC (5;6). Ähnliche Mechanismen werden bei der Rekombination von T-Zell-Rezeptorgenen mit Onkogenen bei der Entstehung von T-Zell-Leukämien und Lymphomen angenommen (94).

Die Beobachtung von VDJ-Heptamer- und VDJ-Nonamer ähnlichen Motiven in der Nähe von MLL/AF4 Fusionspunkten bei zwei Zelllinien und die Präsenz möglicher N-Nukleotide an den Fusionspunkten sind Grundlage der Diskussion über eine Beteiligung einer aberranten VDJ-Rekombinasefunktion bei der Vermittlung von MLL-Rekombinationen (95).

2.4 Verfahren zur Sequenzierung chromosomaler Bruchpunkte

Da Fusionspunkte zwischen Partnergenen bei Translokationen in der Regel innerhalb von Introns mit einer Länge von mehreren tausend Basenpaaren lokalisiert sind, war die Sequenzierung solcher Fusionspunkte bisher sehr aufwendig.

Methoden zur Darstellung genomischer Bruchpunkte des MLL-Gens beruhten im Wesentlichen auf einem Screening einer für jeden Patienten oder jede Zelllinie erstellten DNA-Bank mittels Southern-Blot-Analyse mit einer Hybridisierungsprobe der MLL-Bruchpunktregion. Auf diese Weise identifizierte DNA-Fragmente mit einer MLL-Rekombination wurden cloniert und sequenziert. Wohl wegen des hohen technischen und zeitlichen Aufwandes dieser Methodik waren zu Beginn dieser Arbeit nur einzelne genomische Bruchpunkte des MLL-Gens beschrieben (62;95-97). Über Lage und Verteilung solcher Bruchpunkte bei einer größeren Anzahl von Patienten war bisher wenig bekannt.

3 Problemstellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines Verfahrens, mit dem die DNA-Sequenz chromosomaler Bruchpunkte innerhalb des MLL-Gens mit möglichst geringem Aufwand ermittelt werden kann. Mit Hilfe dieser Technik sollte eine größere Zahl von Knochenmarks- oder Blutproben von Kindern mit akuter Leukämie und Translokation des MLL-Gens untersucht werden, um Informationen über die zur Translokation führenden Rekombinationsmechanismen zu erhalten.

Im einzelnen waren dazu folgende Schritte notwendig:

1. Entwicklung einer Methode zur schnellen Eingrenzung genomischer Bruchpunkte des MLL-Gens.
2. Direktsequenzierung der den Fusionspunkt umgebenden DNA-Sequenz.
3. Analyse der Lage und Verteilung der Bruchpunkte innerhalb der Bruchpunkt-Cluster-Region des MLL-Gens.
4. Korrelation der Lage der Bruchpunkte zu rekombinationsbegünstigenden Sequenzmotiven wie VDJ-Rekombinase-Signalsequenzen, Topoisomerase-Erkennungssequenzen und Alu-Elementen.
5. Analyse der gewonnenen Partnersequenzen mit Hinblick auf rekombinationsbegünstigende Sequenzmotive.

4 Material und Methoden

4.1 Ausgangsmaterial

4.1.1 Leukämiezelllinien

Zur Etablierung der Methoden wurde DNA aus permanenten Leukämiezelllinien verwandt, die Träger verschiedener, bereits charakterisierter Rekombinationen des MLL-Gens sind (98).

Tabelle 1: Leukämiezelllinien

Nr	Zelllinie	Translokation	Fusionsgen	Leukämie	Referenz
P1	RS4;11	t(4;11)(q21;q23)	MLL/AF4	AML FAB M4	(99)
P2	MV4-11	t(4;11)(q21;q23)	MLL/AF4	AML FAB M5	(100)
P3	THP-1	t(9;11)(p22;q23)	MLL/AF9	AML FAB M4	(101)
P4	Mono-Mac-6	t(9;11)(p22;q23)	MLL/AF9	AML FAB M5	(102)
P5	Karpas 45	t(X;11)(q13;q23)	MLL/AFX	T-ALL	

Jeder Zelllinie wurde eine Probennummer (P1 bis P5) zugeordnet. Die Spalte „Translokation“ beschreibt die genetische Rekombination der Zelle, die Spalte „Fusionsgen“ beschreibt das bei dieser Rekombination entstandene Fusionsgen. Die Spalte „Leukämie“ beschreibt die nach morphologischen und immunologischen Kriterien erhobene Form der Leukämie, aus deren Blasten die jeweilige Zelllinie etabliert wurde.

RS4;11 stammt von J. Kersey, Minneapolis, der Depositor für Karpas 45 ist A. Karpas, Cambridge. Alle anderen Zelllinien wurden von der DSM (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) in Braunschweig bezogen (103). Alle permanenten Leukämiezelllinien wurden in 10 ml eines Kulturmediums in 25 ml Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ in der Umgebungsluft im Zellkulturbrutschrank kultiviert.

4.1.2 Patientenmaterial

Insgesamt wurde Material von 24 Patienten untersucht. Dabei handelte es sich in den allermeisten Fällen um Knochenmark, in einzelnen Fällen auch um peripheres Blut. Die jeweilige Rekombination des MLL-Gens war durch die im Rahmen der Routinediagnostik durchgeführten zytogenetischen und molekularbiologischen Untersuchungen bekannt, das jeweilige Partnergen war durch die ebenfalls im Rahmen der Diagnostik durchgeführten RT-PCR-Untersuchungen bereits charakterisiert. 17 Proben waren MLL/AF4-positiv, 7 Patienten waren Träger einer MLL/AF9-Rekombination.

Tabelle 2: Patientendaten

Nr.	Name	Alter	Geschl.	Leukämie	WBC	Blast%	Zytogenetik
P6	LA						
P7	LC						
P8	ZK	1;2	w	AML-M4	52.000	85	46XX, t(4;11)
P9	JT	1;7	m	ALL, pro-B	112.000	76	46XY, t(4;11)
P10	SR	0;5	w	ALL, pro-B	96.000	60	46XX, t(4;11)
P11	SM	0;9	w	ALL, pro-B	56.000	82	46XX, t(4;11)
P12	DC	11;0	w	MDS, AML (?)	21.000	34	46XX, t(4;11), +4
P13	KU	2;3	m	ALL	34.000	45	t(4;11)
P14	TI	4;6	m	ALL, pro-B	89.000		t(4;11)
P15	WE	3;1	m	ALL, pro-B	90.000	83	t(4;11), +14, +mar
P16	GE	5;1	m	ALL, pro-B	48.000	35	t(4;11)
P17	PR	10;0	m	ALL, pro-B	159.000	79	t(4;11)
P18	BN	4;2	m	ALL, pro-B	110.000	45	t(4;11)
P19	PI	1;9	w	ALL, pro-B	90.000	60	t(4;11)
P20	EY	1;2	m	ALL, pro-B	145.000	75	t(4;11)
P21	KT	3;2	w	ALL, pro-B	180.000	68	t(4;11)
P22	CO	0;11	m	AML-M5	48.000	50	t(9;11)
P23	WX	9;2	m	AML-M5	56.000	32	t(9;11), +6,+mar
P24	KG	4;8	m	AML-M5	28.000	57	t(9;11)
P25	VS	6;2	m	AML-M5	40.000	30	t(9;11)

Jedem Patienten wurde eine Probennummer (P6 bis P25) zugeteilt, die Namen der Patienten werden aus Datenschutzgründen nur in verschlüsselter Form wiedergegeben. Das Alter ist in Jahren und Monaten (J;M) angegeben und bezieht sich auf den Zeitpunkt der Diagnosestellung. Das Geschlecht ist mit weiblich (w) und männlich (m) angegeben. Die Leukozytenzahl pro μl (WBC) und die Blastenzahl in Prozent der Gesamtleukozyten (Blast%) beziehen sich ebenfalls auf den Zeitpunkt der Diagnosestellung. Angegeben sind hier nur die Daten der Patienten, bei denen eine Charakterisierung des genomischen Bruchpunktes gelang (s.u.)

Die meisten Proben stammen aus dem zentralen Referenzlabor für pädiatrische onkozytogenetische Analysen (Prof. Dr. J. Harbott) der Justus-Liebig-Universität Gießen. Ein Teil der Proben wurde vom zytogenetischen Referenzlabor der pädiatrischen Therapiestudien der Republik Österreich (Prof. Dr. O.A. Haas, St. Anna-Kinderspital, Wien) bereitgestellt. Zwei der Proben stammen aus dem Labor von Prof. Dr. Mel F. Greaves, London (Leukaemia Research Fund Centre at the Institute of Cancer Research, Chester Beatty Laboratories, 237 Fulham Road, London, UK).

4.2 Isolation mononukleärer Zellen

Zur Isolation der mononukleären Zellen aus heparinisiertem Blut oder Knochenmark wurde dieses zunächst bei 400 x g (1500 U/min, Hettich Rotanta IP) über 10 Minuten zentrifugiert. Dann wurde der Plasmaüberstand entfernt und das Probenvolumen mit dem gleichen Volumen PBS-Puffer resuspendiert. Mit jeweils 5 ml der so vorbereiteten Probe wurden 5 ml Lymphodex-Trennmedium (Dichte 1,077 g/cm³) überschichtet und erneut bei etwa 400 x g über 30 Minuten zentrifugiert. Die durch diese Zentrifugation in der Grenzschicht direkt über dem Ficoll-Hypaque-Gradientenbereich angereicherte mononukleäre Zellfraktion wurde vorsichtig abgesaugt, in 5 ml PBS gewaschen und erneut mit 400 x g über 10 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml PBS resuspendiert, nach Bestimmung der Zellzahl im automatischen Zellcounter zunächst in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei -70°C gelagert.

4.3 DNA-Isolation

Die hochmolekulare genomische DNA aus der Zellsuspension permanenter Leukämiezelllinien bzw. Lymphozytenkonzentraten, Knochenmark oder peripherem Blut der Patienten wurde mittels Anionenaustauschersäulen auf Silicagelbasis (QIAGEN Genomic-tips 100/G, QIAGEN GmbH, Hilden) isoliert und gereinigt. Die hochspezifische, vom pH-Wert und von der Salzkonzentration abhängige Bindungsfähigkeit der Anionenaustauschersäulen für DNA basiert auf der Interaktion zwischen den in wässriger Lösung negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA und der positiv geladenen DEAE-Gruppen (Diethylaminoethanol) auf der Oberfläche des Silicagels der Säulen. Es wurden maximal 2×10^7 Leukozyten eingesetzt, um die Kapazität der Austauschersäulen von 100 µg DNA nicht zu überschreiten und ein Verstopfen zu vermeiden. Die Zellen wurden in 5 ml PBS-Puffer aufgenommen. Durch Zugabe von 15 ml eisgekühltem sterilem bidestilliertem Wasser und 5 ml eines eisgekühlten Saccharosepuffers (Puffer C1) wurden die Zellmembrane bei zehnmütiger Inkubation auf Eis osmotisch zerstört. Das nach Zentrifugation erhaltene Zellkernpellet wurde zur Lyse der Zellkerne sowie zur gleichzeitigen Denaturierung und dem Verdau der Proteine in 5 ml eines Lysepuffers (Puffer G2) plus 95 µl Proteinase K (20 mg/ml) resuspendiert und eine

Stunde bei 50°C inkubiert. Das erhaltene Lysat wurde mittels der mit 4 ml Puffer QBT equilibrierten Anionenaustauschersäulen gereinigt. Nach dem Waschen der Säulen mit 15 ml Puffer QC wurde die DNA mittels 5 ml Puffer QF eluiert, mittels 3,5 ml Isopropanol präzipitiert und in 70% Ethanol gewaschen. Nach kurzem Trocknen des erhaltenen DNA-Pellets bei Raumtemperatur wurde dieses in 100 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen und zur vollständigen Lösung der hochmolekularen DNA über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die so isolierte genomische DNA liegt zum größten Teil in Fragmentlängen von 50 bis 100 Kilobasen (kb) vor. Fünf Mikroliter der Lösung wurden in 95 µl bidestilliertem Wasser für die Messung am Spektralphotometer eingesetzt. Eine Quantifizierung der DNA erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 nm. 10^7 Zellen ergaben im Durchschnitt ca. 30 µg genomische DNA.

4.4 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist ein der semikonservativen Replikation von DNA in eukaryonten Zellen nachempfundenen Verfahren zur exponentiellen Vermehrung (Amplifikation) bestimmter DNA-Abschnitte *in vitro*. Das Prinzip wurde erstmals von Kary Mullis beschrieben (104). Dabei wird ein DNA-Abschnitt in geeignetem Puffermilieu unter Zugabe der vier Deoxyribonukleotid-Triphosphat-Bausteine und einer DNA-Polymerase kopiert. Als Startermoleküle dienen dabei zum jeweiligen Strang komplementäre synthetische Oligonukleotide, die sog. Primer, die das zu amplifizierende DNA-Fragment flankieren. Zur Positionierung der Primer muß die flankierende Nukleotidsequenz des zu amplifizierenden DNA-Bereichs bekannt sein. Die Amplifikation erfolgt in drei sich zyklisch wiederholenden temperaturabhängigen Reaktionsschritten. Im ersten Schritt werden die DNA-Doppelstränge durch Hitzedenaturierung (Melting) in Einzelstränge überführt. Im zweiten Schritt lagern sich nach Abkühlung die zum jeweiligen Strang komplementären Oligonukleotide an ihre Zielsequenz an (Annealing). Im dritten Schritt erfolgt beim Temperaturoptimum der DNA-Polymerase durch Kettenverlängerung (Extension) an den 3'-Enden der Primer die Synthese eines zum jeweiligen Vorlagenstrang komplementären Gegenstranges. Die so entstandenen neuen Doppelstränge werden im nächsten Zyklus wieder zu Einzelsträngen denaturiert, die wiederum als Vorlage (Template) für die nachfolgende Strangsynthese dienen.

Die aufeinanderfolgenden Temperaturschritte Melting, Annealing und Extension bilden einen PCR-Zyklus. Durch Wiederholen dieser Zyklen erhält man theoretisch eine exponentielle Vermehrung des gewünschten DNA-Abschnittes. Die Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase (z.B. Taq-DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*) und die Einführung geeigneter Geräte (Thermocycler) ermöglichten die Automatisierung des Verfahrens (105).

Die sog. nested-PCR dient der weiteren Erhöhung von Sensitivität und Spezifität der Reaktion. Sie besteht aus zwei hintereinandergeschalteten PCR-Läufen. Im ersten Lauf wird dabei mittels eines „externen“ Primerpaares ein längeres PCR-Fragment amplifiziert. Die „internen“ Primer des zweiten Laufes liegen innerhalb der im ersten Lauf amplifizierten DNA-Sequenz. Als Template dient im zweiten Lauf das PCR-Produkt des ersten Laufes.

4.5 Long-PCR

Die Long-PCR ist eine Modifikation der konventionellen PCR, die die Amplifikation sehr langer DNA-Abschnitte bis etwa 35.000 Basenpaare ermöglicht (106). Diese Verbesserung wird durch verschiedene Modifikationen der konventionellen PCR erreicht. Wesentlich ist dabei die Kombination einer thermostabilen DNA-Polymerase (z.B. rTth-DNA-Polymerase aus *Thermus thermophilus*) mit einer geringen Menge einer zweiten thermostabilen DNA-Polymerase, die eine 3'-zu-5'-Exonukleaseaktivität besitzt (z.B. Vent_R[®]-DNA-Polymerase aus *Thermococcus litoralis*) (107). Dieses Enzym korrigiert die beim Einbau der Nukleotide während der Kettenverlängerung auftretenden Fehler (Proofreading-Komponente). Diese Fehleinbauten am 3'-Ende werden für vorzeitige Kettenabbrüche und dadurch für die Limitierung der Fragmentlängen bei der PCR verantwortlich gemacht. Der Zusatz von Glycerin und DMSO (Dimethylsulfoxid) ermöglicht relativ kurze Denaturierungszeiten bei moderater Denaturierungstemperatur (94°C) und minimiert dadurch Schädigungen der Template-DNA. Die sorgfältige Auswahl von sehr langen (> 30 Basen) Primeroligonukleotiden mit hohen Schmelztemperaturen ermöglicht eine sehr hohe Annealingtemperatur. Dadurch wird die Amplifikation unspezifischer Produkte durch unspezifische

Primerbindung am Template weitgehend unterdrückt, die Spezifität der PCR wird erhöht. Die hohe Primer-Annealingtemperatur kann einen separaten Annealingschritt im Temperaturprotokoll überflüssig machen. Anstelle eines Drei-Temperatur-Protokolls einer konventionellen PCR wird dann bei der Long-PCR ein Zwei-Temperatur-Protokoll aus einem kurzen Denaturierungsschritt und einem langen kombinierten Annealing- und Extensionschritt angewandt. Der Extensionschritt ist entsprechend der längeren PCR-Fragmente länger als bei der herkömmlichen PCR. Die Verwendung eines sog. Hotstart-Protokolls reduziert unspezifische Primerbindungen, die Bildung von Primerdimeren und die Veränderung der Primeroligonukleotide an ihrem 3'-Ende durch die Exonukleaseaktivität der Vent_R[®]-DNA-Polymerase während des von 4°C oder Raumtemperatur ausgehenden Temperaturanstieges im ersten PCR-Zyklus.

Zur Amplifikation der DNA-Fragmente mittels Long-PCR wurde das „GeneAmp[®] XL PCR Kit“ (Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland) verwendet. Das automatische Hotstart-Protokoll wurde mittels „AmpliWax[®] PCR Gem 100-Wachskugeln“ realisiert. Diese bilden nach dem Schmelzen eine Wachsschicht, die einen unteren Reagentienmix aus bidestilliertem Wasser, PCR-Puffer, dNTP, Magnesium und den Primern von einem oberen Reagentienmix mit bidestilliertem Wasser, Puffer, der DNA-Polymerase und dem jeweiligen Template trennt. Auf diese Weise ist eine unspezifische Interaktion zwischen den Reagentien vor Beginn der eigentlichen PCR ausgeschlossen. Erst durch den Temperaturanstieg im initialen Denaturierungsschritt der PCR auf 94°C schmilzt die trennende Wachsschicht, unterer und oberer Reagentienmix werden vermischt und die Reaktion kann beginnen.

Zur Erhöhung der Sensitivität und Spezifität wurde eine Nested-Long-PCR mit zwei hintereinander geschalteten Läufen von je 28 Zyklen durchgeführt. Dazu wurden im ersten Lauf 100 ng genomische DNA eingesetzt. Für den zweiten Lauf wurde dann 1 µl des PCR-Produktes aus dem ersten Lauf als Template verwendet. Im zweiten Lauf wurden anstelle der externen Primer ein internes Primerpaar eingesetzt. Volumina und Konzentrationen sowie das Temperaturverlaufsprotokoll der beiden PCR-Läufe waren identisch.

Der Reaktionsansatz der Nested-Long-PCR mit automatischem Hotstart sah folgendermaßen aus:

Unterer Reagentienmix:

12	µl	3,3 x XL-Puffer II
2	µl	dATP (10 mM)
2	µl	dCTP (10 mM)
2	µl	dGTP (10 mM)
2	µl	dTTP (10 mM)
4,8	µl	Mg(OAc) ₂ (25 mM)
1,6	µl	Primer up (sense) (20 µM)
1,6	µl	Primer down (antisense) (20 µM)
12	µl	bidestilliertes Wasser (ad 40 µl)

Oberer Reagentienmix:

1	µl	Template-DNA (100 ng/µl)
2	µl	rTth-DNA-Polymerase XL (2 U/µl)
18	µl	3,3 x XL-Puffer II
39	µl	bidestilliertes Wasser (ad 60 µl)

Temperaturverlaufsprotokoll:

Hold:	94°C	- 1 min.
Cycle:	16 Zyklen:	94°C - 15 sec.
		68°C - 10 min.
Auto:	12 Zyklen:	94°C - 15 sec.
		68°C - 10 min., „Time-Extension“ 15 sec.
Hold:	72°C	- 10 min
Hold:	4°C	forever

Zunächst wurde ein Mastermix für den unteren Reagentienmix aus bidestilliertem Wasser, Puffer, dNTP, Primern und Magnesiumlösung erstellt und auf die einzelnen Reaktionscups verteilt. Darauf wurde je eine AmpliWax[®] PCR Gem 100-Wachskugel gegeben und durch fünfminütige Inkubation bei 80°C zum Schmelzen gebracht. Auf die so entstandene Trennschicht wurde der obere Mastermix aus bidestilliertes Wasser, Puffer und rTth-DNA-Polymerase XL aliquotiert. Das jeweilige Template wurde erst unmittelbar vor Beginn der Reaktion zugegeben. Das Erstellen der Mastermixe und deren Aliquotierung erfolgte zur Vermeidung von

Kontaminationen in einem separaten sog. Prä-PCR-Raum. Als Thermocycler wurde ein GeneAmp® PCR System 9600 (Perkin Elmer, Überlingen) verwendet.

Anhand der bekannten Basenpaarsequenz des MLL-Gens in Region 11q23 (15;16) wurden Primeroligonukleotide in Exon 5 (upstream, sense) und 11 (downstream, antisense) des Gens positioniert. Diese flankieren die gesamte MLL-Bruchpunktregion (62) und dienen zu deren Amplifikation mittels Long-PCR. Bei Kombination von MLL-Primern mit translokationsspezifischen Gegenprimern für das Partnergen erhält man ein chimäres PCR-Produkt, das sich aus einem Teil der MLL-Bruchpunktregion und aus einem Teil des jeweiligen Translokationspartnergens zusammensetzt. Ein solches PCR-Produkt enthält den gesuchten Fusionspunkt von MLL-Gen und Partnergen bzw. den Bruchpunkt des MLL-Gens auf genomischer Ebene. Anhand bekannter mRNA-Sequenzen wurden Primeroligonukleotide in den die Bruchpunktregion flankierenden Exonen folgender Partnergene ausgesucht:

- AF4-Gen auf Chromosom 4, Region 4q21 (26)
- AF9-Gen auf Chromosom 9, Region 9p22 (26)
- AFX-Gen auf dem X-Chromosom, Region Xq13 (108)

Die jeweils verwendeten Primeroligonukleotide sind in Tabelle 15 im Anhang aufgeführt.

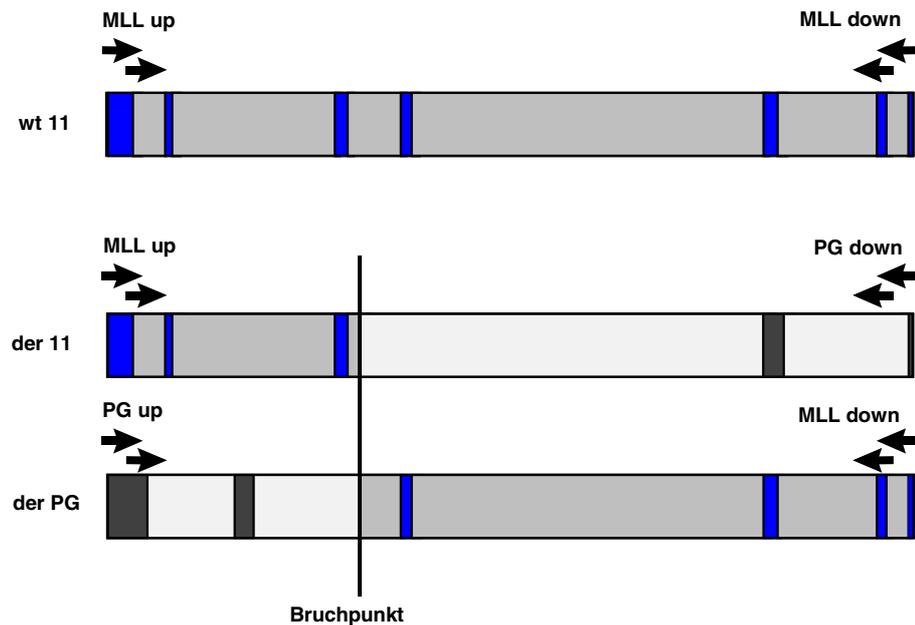


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Nested-L-PCR

Amplifikation der unrearrangierten MLL-Bruchpunkt-Cluster-Region (wt 11) und der durch die Translokation entstandenen chimären Derivatprodukte (der 11; der PG) aus MLL-Anteilen und Partnergen-Anteilen (PG). Blaue Bereiche: MLL-Exon; dunkelgrau: Partnergen-Exon, helleres grau: Intronbereiche beider Gene.

4.6 Agarosegel-Elektrophorese

Agarosegele bilden eine Matrix, deren Dichte durch die Konzentration der Agarose bestimmt wird (109). DNA besitzt in wässriger Lösung bei neutralem oder alkalischem pH-Wert durch Dissoziation ein negativ geladenes Zucker-Phosphat-Gerüst. Auf Grund dieser Eigenschaften lassen sich DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld über ein Gel der Länge nach auftrennen. Die DNA-Fragmente wandern dabei in Richtung der Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit linearer doppelsträngiger DNA ist dabei umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl der Basenpaare des jeweiligen DNA-Fragmentes (110).

Zur Herstellung eines 0,8% Gels wurde Agarose in der entsprechenden Menge 1 x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA) kurz aufgeköcht und dann in einen abgedichteten Gelträger gegossen. Ein eingesetzter Kunststoffkamm sparte dabei Vertiefungen aus, die nach Abkühlen des Gels zur Aufnahme

der Proben dienen. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer plaziert und mit dem Elektrophoreselaufpuffer (1 x TAE) überschichtet.

Sechs Mikroliter der Long-PCR-Produkte wurden mit 1,5 µl Probenpuffer gemischt und in die durch Entfernen des Kammes entstandenen Vertiefungen pipettiert. Gleichzeitig wurde ein DNA-Längenstandard aus einem Gemisch von DNA-Fragmenten definierter Länge aufgetragen (DNA-Längenstandard I, II oder III, Roche Molecular Systems, Mannheim). Nach Anlegen eines elektrischen Feldes mit max. 5 V/cm Elektrodenabstand wandern die DNA-Moleküle in Richtung Anode. Der dem Probenpuffer zugesetzte Blaumarker (Bromphenolblau) dient als Orientierung über die Lauflänge der Elektrophorese. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel zur Visualisierung der DNA-Banden für 10 Minuten in ein Ethidiumbromidbad gegeben und nach zehnmütigem Waschen im Wasserbad unter UV-Licht (Wellenlänge 254 nm) mit einer Polaroid-Sofortbildkamera fotografiert. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der unter UV-Licht ein gelboranges Licht im sichtbaren Spektrum emittiert. Es interkaliert zwischen die Basenpaare der DNA und färbt so die DNA-Banden im Agarosegel spezifisch an (111). Ethidiumbromid ist ein Mutagen und mit entsprechender Vorsicht zu handhaben. Durch Vergleichen der Probenbanden mit den Markerbanden des DNA-Längenstandards ist eine grobe Längenbestimmung der PCR-Fragmente möglich.

4.7 Reinigung der Long-PCR Produkte

Um die Long-PCR-Produkte einer weiterführenden Analyse durch Restriktionsverdau unterziehen zu können, mußten Reaktionsbestandteile der PCR und der Puffer entfernt werden. Dies wurde mit Molekulargewichtsfiltren realisiert, die für Moleküle mit einem Molekulargewicht größer als 100.000 Dalton undurchlässig sind (Ultrafree[®]-MC 100.000 NMWL Filter Unit, Millipore, Eschborn). Zu diesem Zweck wurden die PCR-Ansätze in die Filtersäulen gegeben und mit bidestilliertem Wasser auf 400 µl aufgefüllt. Bei der folgenden Zentrifugation bei max. 5000 x g wurde das bidestillierte Wasser zusammen mit den dNTP, den Primeroligonukleotiden, der DNA-Polymerase und der Pufferlösung abfiltriert, während PCR-Fragmente, die größer als 300 Basenpaare sind, am Filter retiniert wurden. Nach anschließender erneuter Zentrifugation mit 300 µl

bidestilliertem Wasser zum Waschen wurden 50 µl bidestilliertes Wasser auf den Filter gegeben, um die gereinigten PCR-Produkte aufzunehmen und in ein neues Cup zu überführen.

Jeweils 16 µl der so gereinigten und in bidestilliertem Wasser gelösten PCR-Produkte wurden in den nachfolgenden Restriktionsverdau eingesetzt.

4.8 Restriktionsverdau der Long-PCR-Produkte

Sowohl das 8149 Basenpaare lange Long-PCR-Fragment der MLL-Bruchpunktregion als auch die Long-PCR-Fragmente der durch Translokation entstandenen Fusionsprodukte, bestehend aus einem Teil MLL und einem Teil Partnergen, wurden einem Restriktionsverdau unterzogen. Die ausgewählten Restriktionsenzyme Tru91 (112) und Dde1 (113) erfüllen dabei zwei wesentliche Bedingungen. Zum einen ergeben sie in einem hochauflösenden Elektrophoresesystem gut analysierbare Fragmente mit einer Länge von ca. 100 bis 600 Basepaaren. Zum anderen erzeugen sie einen 5'-Überhang an den Restriktionsfragmenten, dessen erste freie Base ein Adenosinrest ist. Dies ergibt die Möglichkeit, an den 3'-Enden der Restriktionsfragmente ein fluoreszenzmarkiertes dUTP einzubauen.

Zu je 16 µl des gereinigten und in bidestilliertem Wasser gelösten PCR-Produktes wurden je 2 µl des erforderlichen Restriktionspuffers (10 x konzentriert) und je 2 µl des jeweiligen Restriktionsenzym (10 U/µl) gegeben. Für das Restriktionsenzym Tru91 wurde der Restriktionspuffer L, für das Restriktionsenzym Dde1 wurde der Restriktionspuffer H verwendet. Die Restriktionsansätze wurden für 3 Stunden bei dem Temperaturoptimum von 37°C (Dde1) bzw. 65°C (Tru91) des jeweiligen Enzyms inkubiert.

4.9 Fluoreszenzmarkierung der Restriktionsfragmente

Die durch Restriktionsverdau der Long-PCR-Produkte entstandenen Fragmente wurden mit einem Fluoreszenzfarbstoff endmarkiert (Endlabelling), um sie einer hochauflösenden Fragmentlängenanalyse mit laseroptischer Produktdetektion unterziehen zu können. Dabei wurden verschiedene Markierungsverfahren auf ihre Reproduzierbarkeit hin untersucht.

4.9.1 Ligation FAM-markierter Adapter an die Restriktionsfragmente

Bei diesem Markierungsverfahren finden Restriktionsverdau und Fluoreszenzmarkierung in einem einzigen Reaktionsschritt statt. Es beruht auf der Ligation von mit 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden an die bei dem Restriktionsverdau entstandenen Fragmente mittels einer T4-DNA-Ligase.

Dazu wurden zu 11,2 µl PCR-Produkt 2,0 µl Tru 91, 2,0 µl Puffer L, 1,0 µl ATP (100 mM) und 1,0 µl T4-DNA-Ligase (5 U/µl) sowie die beiden Oligonukleotide gegeben. Eines der beiden Oligonukleotide (Tru-91-Linker) ist an seinem 5'-Ende komplementär zu dem von Tru 91 generierten 5'-Überhang der Restriktionsfragmente und kann so an diese binden. Das zweite Oligonukleotid (Adapter-5'FAM) ist revers komplementär dazu und wird somit ebenfalls an die Restriktionsfragmente ligiert. Durch den FAM-Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende dieses zweiten Oligonukleotids erhalten die Fragmente ihre Fluoreszenzmarkierung. Bei diesem Verfahren werden die einzelnen Restriktionsfragmente um 29 Nukleotide entsprechend der Länge der anligierten Oligonukleotide verlängert. Sequenzen der beiden Oligonukleotide siehe Tabelle 17 im Anhang.

4.9.2 Fluoreszenzmarkierung von Restriktionsfragmenten mittels Reverser Transkriptase und Fluoro-dUTP Labelling Mix

Auch bei diesem Verfahren können der Restriktionsverdau und das Markieren der Fragmente in einem Reaktionsansatz durchgeführt werden. Wegen der Inkompatibilität der Temperaturoptima von Taq-DNA-Polymerase (72°C) und der Restriktionsenzyme Tru 91 (65°C) und Dde1 (37°C) wurde eine M-MLV-Reverse Transkriptase mit einem Temperaturoptimum von 37°C zum auffüllen der Restriktionsschnittstellen mit einem fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid verwendet.

Zu 14 µl gereinigtem PCR-Produkt wurden 2,0 µl Restriktionsendonuklease Tru 91 (10 U/µl), 2,0 µl Restriktionspuffer M, 1,0 µl Fluoro-dUTP Labelling Mix und 1,0 µl Reverse Transkriptase (200 U/µl) gegeben. Während der anschließenden Inkubation bei 37°C über 3 Stunden erfolgte sowohl der Verdau der PCR-Produkte als auch die Endmarkierung der dabei entstandenen Fragmente.

4.9.3 Fluoreszenzmarkierung von Restriktionsfragmenten mittels Taq-Polymerase und Fluoro-dUTP Labelling Mix

Zu 20 µl des Restriktionansatzes (siehe Kapitel 4.8) wurden 1,0 µl Taq-DNA-Polymerase (2,5 U/µl), 3,0 µl 10 x PCR-Puffer, 3,0 µl bidestilliertes Wasser, sowie 3,0 µl eines speziellen „Labelling-Mixes“ (Fluoro-dUTP Labelling Mix, Pharmacia Biotec) gegeben. Der „Labelling-Mix“ enthielt fluoreszenzmarkiertes dUTP (11-Fluorescein-dUTP, 10µM) sowie die konventionellen Nukleotidtriphosphate dATP, dGTP, dCTP (je 1 µM). Hierdurch wurde der 5´-Überhang der Restriktionsschnittstellen (sticki end) bei der anschließenden Inkubation bei 72°C von der Taq-DNA-Polymerase vollständig aufgefüllt.

4.9.4 Fluoreszenzmarkierung von Restriktionsfragmenten mittels Taq-Polymerase und 11-Fluorescein-dUTP

Dieses Verfahren ist zu dem im vorherigen Kapitel beschriebenen weitgehend analog. Da in diesem Ansatz keine normalen Nukleotidtriphosphate zugegeben werden, erfolgt aber kein vollständiges Auffüllen der von den Restriktionsenzymen generierten 5´-Enden, sondern nur der Einbau eines fluoreszenzmarkierten Nukleotids direkt an das 3´-Ende der Restriktionsfragmente.

Zu den 20 µl des Restriktionansatzes der Long-PCR-Produkte (siehe Kapitel 4.8) wurden nach dem dreistündigen Verdau zur Endmarkierung der Restriktionsfragmente noch 2,0 µl Fluorogreen (11-Fluorescein-dUTP, 1 ng/µl, Amersham Life Science, England), 1,0 µl Taq-DNA-Polymerase (2,5 U/µl) und 3,0 µl 10 x PCR-Puffer gegeben und mit 4,0 µl bidestilliertem Wasser auf 30 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 72°C über 30 Minuten, bei der das fluoreszenzmarkierte dUTP an den Adenosinrest des 5´-Überhanges der Restriktionsfragmente bindet.

4.10 Reinigung der fluoreszenzmarkierten Restriktionsfragmente

Der Überschuß an nichteingebauten Fluorescein-dUTP-Nukleotiden wurde mit Hilfe des „QIAquick Nucleotide Removal Kit“ (QIAGEN GmbH, Düsseldorf) entfernt. Dabei handelt es sich um zentrifugierbare Säulen (spin column) mit einer Silicagelmembran, die abhängig vom Salz- und pH-Wert

spezifisch DNA bindet. Der 30 µl Markierungsansatz wurde mit 300 µl des Puffers PN vermischt und in die Säulen gegeben. Durch einminütige Zentrifugation mit 6000 rpm (ca 4000 x g, Eppendorf EBA 12 R) wurden so die fluoreszenzmarkierten Restriktionsfragmente an der Silicagelmembran der Säulen gebunden, während alle anderen Bestandteile des Markierungsansatzes abgetrennt wurden. Nach einem Waschschriff mit 750 µl Puffer PE wurden die gebundenen fluoreszenzmarkierten Restriktionsfragmente mit 50 µl bidestilliertem Wasser mittels Zentrifugation bei 10000 x g für eine Minute eluiert.

Von den so gereinigten und in bidestilliertem Wasser gelösten fluoreszenzmarkierten Restriktionsfragmenten wurde zur Sicherstellung eines vollständigen Verdau ein 6 µl-Aliquot über ein 2% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Gesamtmenge an Proben-DNA wurde durch Vergleich mit den Markerbanden bekannter Länge und Menge eines DNA-Längenmarkers (DNA-Längenstandard VI, Roche Molecular Systems, Mannheim) abgeschätzt.

4.11 Automatische Fragmentlängenanalyse

Durch Vergleich des Restriktionsmusters des PCR-Produkts der nichtrearrangierten MLL-Bruchpunktregion mit dem Restriktionsmuster eines PCR-Produktes eines durch Translokation entstandenen Fusionsgens aus MLL-Gen und dem jeweiligen Partnergen lassen sich einzelne Restriktionsfragmente dem jeweiligen Ursprungsgen zuordnen. Jedes ursprünglich der MLL-Bruchpunktregion zuzuordnende Restriktionsfragment, welches im Restriktionsmuster des Hybridgenes nicht mehr nachweisbar ist, muß durch Anteile des Partnergens im Rahmen der Translokation ersetzt worden sein. Durch Zuordnung der im Fusionsgen identifizierten MLL-Restriktionsfragmente zu einer anhand der bekannten DNA-Sequenz (62) erstellten Restriktionsfragmentkarte der MLL-Bruchpunktregion läßt sich so der Übergang von MLL-Gen zu seinem Partnergen auf wenige hundert Basenpaare genau eingrenzen.

Die Restriktionsfragmentlängenanalyse der MLL-Bruchpunktregion und der durch Translokation entstandenen Hybridgene erfordert wegen der geringen Längendifferenz der Fragmente ein hochauflösendes Elektrophoresesystem,

das eine exakte Differenzierung und Längenbestimmung der Fragmente ermöglicht. Die dazu verwendete Polyacrylamidgelelektrophorese mit laserinduzierter Detektion und softwaregestützter Längenberechnung der fluoreszenzmarkierten Fragmente in einem Sequenzierautomaten 373A (PE-Biosystems, Weiterstadt) erlaubt unter optimalen Bedingungen eine Trennschärfe von 1 Base Längendifferenz. Dazu tastet ein Argonlaser das Gel bei laufender Elektrophorese in einer Scanregion kontinuierlich ab. Erreicht ein fluoreszenzmarkiertes DNA-Fragment diese Scanregion, so wird es vom Laser zur Sekundärstrahlung angeregt. Diese wird durch eine Linse fokussiert, über einen Photomultiplier in ein elektrisches Signal umgewandelt und an den angeschlossenen Computer (Apple Macintosh IIci) übertragen. Durch Einbringen verschiedener Filter in die Sekundärstrahlung können 4 verschiedene Fluoreszenzfarben gleichzeitig detektiert werden. Parallel zu den blau fluoreszierenden Restriktionsfragmenten wurde ein rot fluoreszenzmarkierter interner Längenstandard (Genescan-Standard 2500 ROX) mit DNA-Fragmenten definierter Länge zur Eichung der Längenbestimmung aufgetragen. Mit Hilfe der „Genescan 672“-Software (PE-Biosystems, Weiterstadt) generiert der Computer aus den so gesammelten Daten ein Elektrophorese-Gelbild und berechnet die exakten Fragmentlängen der Restriktionsfragmente. Die elektropherographische Darstellung der Restriktionsfragmentanalyse stellt ein für die jeweilige Probe spezifisches Restriktionsmuster dar.

Zur elektrophoretischen Auftrennung der fluoreszenzmarkierten Restriktionsfragmente wurde ein denaturierendes 6% Polyacrylamidgel verwendet, das zwischen zwei fluoreszenzfreie, planare Glasplatten (PE-Biosystems, Weiterstadt) gegossen wurde. Die Glasplatten wurden mit einem fluoreszenzfreien Detergenz (Alconox, New York, USA) gewaschen, mit bidestilliertem Wasser gespült und mit 70% Isopropanol nachbehandelt. Nach dem Trocknen mit fluoreszenzfreien Tüchern (Kimwipes, Kimberly-Clark) wurden 0,4 mm dicke Abstandshalter (Spacer) zwischen die beiden Platten gelegt, durch die die angestrebte Geldicke von 0,4 mm festgelegt wird. Die Platten und Spacer wurden mittels Metallklammern fixiert.

Folgende Substanzen zur Gelherstellung wurden verwendet:

Harnstoff	30	g
Acrylamid 40% (Acrylamid/Bisacrylamid 19:1)	9	ml
10 x TBE-Puffer	6	ml
Aqua dest. (fluoreszenzfrei)	23,5	ml

Der Harnstoff wurde durch Rühren gelöst. Die Gellösung wurde dann mittels Vakuumfiltration durch einen 0,2 µm Filter filtriert und danach in ein Becherglas überführt. Durch Zugabe von 180 µl 10% APS (Ammoniumpersulfat) und 24 µl TEMED (Tetramethylethyldiamin) wurde die Polymerisation der Acrylamidmonomere zu Acrylamidpolymeren und deren Quervernetzung mit Bisacrylamid initiiert. Die Lösung wurde dann sofort zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und ein Kunststoffkamm eingesetzt, der 24 Taschen für das Auftragen der Proben aussparte. In horizontaler Lage polymerisierte das Gel innerhalb von 2 Stunden. Nichtpolymerisiertes Acrylamid ist ein Haut und Schleimhäute penetrierendes kumulatives Neurotoxin und mit entsprechender Vorsicht zu handhaben. Die Glasplatten mit dem polymerisierten Gel wurden im Sequenzierautomaten plziert und gegebenenfalls noch einmal von Staubpartikeln gereinigt. Nach einem Probescan des Gels zur Überprüfung der Sauberkeit der Platten wurden die Pufferkammern eingesetzt und der Laufpuffer (1 x TBE) eingefüllt. Nach Entfernen des Kammes und Ausspülen der Probentaschen (Slots) mit Laufpuffer wurde ein Elektrophoresevorlauf gestartet. Die gereinigten und in Wasser gelösten fluoreszenzmarkierten Restriktionsfragmente wurden 10 bis 30 fach verdünnt. Jeweils 1 µl der verdünnten Fragmente wurde in einen Elektrophoreselaufpuffer aus 2,5 µl Formamid und 0,5 µl ROX-Längenstandard gegeben. Die Proben wurden 2 Minuten bei 90°C denaturiert und dann 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Sofort anschließend wurden 3 µl je Probe in die ausgespülten Probentaschen des Gels gegeben und die Elektrophorese bei max. 2500 Volt, 40 Milliampere und 30 Watt über 14 Stunden durchgeführt.

4.12 Automatische DNA-Sequenzierung

Die Direktsequenzierung des Fusionsbereiches der Long-PCR-Produkte der translozierten Hybridgene über den Bruchpunkt hinweg erfolgte nach dem Prinzip der Dideoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger (114).

Dabei wird ein an den zu sequenzierenden Matrizenstrang hybridisierendes synthetisches Primeroligonukleotid an seinem 3'-Ende mittels einer DNA-Polymerase verlängert. Im Reaktionsansatz sind dabei neben den vier konventionellen 2'-Desoxynukleotidtriphosphaten dATP, dCTP, dGTP, dTTP, auch die 2'-3'-Dideoxynukleotidtriphosphate ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP (Dye-Terminatoren) enthalten, denen die 3'-Hydroxylgruppe fehlt. Wird nun nach einer Zufallsverteilung ein solches Dideoxynukleotid während der Kettenverlängerung eingebaut, so kommt es an dieser Stelle zum Syntheseabbruch. Man erhält ein statistisches Gemisch unterschiedlich langer, am Originalstrang synthetisierter DNA-Fragmente, die jeweils mit einem Dideoxynukleotid enden und über ein Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt werden können. Durch verschiedenfarbige Fluoreszenzmarkierung der Dideoxynukleotide wird die Analyse der Basenpaarfolge im Sequenzierautomaten 373A ermöglicht. Dideoxy-ATP erscheint dabei grün, ddCTP gelb, wird aber zur besseren Erkennbarkeit am Bildschirm schwarz dargestellt, ddGTP erscheint blau und ddTTP rot.

Für die Sequenzierung wurde das „ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit With AmpliTaq® DNA Polymerase, FS“ (PE-Biosystems, Weiterstadt) verwendet. Es beruht auf dem Prinzip des „Taq-Cycle-Sequencing“. Als DNA-Polymerase wird dabei eine modifizierte, hitzestabile Taq-DNA-Polymerase verwendet (115). Dies ermöglicht ein der PCR analoges, zyklisches Drei-Temperatur-Protokoll aus Hitzedenaturierung (Melting), Primeranlagerung (Annealing) und Kettenverlängerung (Extension) in einem Thermocycler. Der Premix enthält neben den Dye-Terminatoren noch die Nukleotide dATP, dITP, dCTP, dTTP, Tris-HCl (pH 9,0), MgCl₂, thermostabile Pyrophosphatase und die o.g. AmpliTaq DNA Polymerase FS (siehe Sequenzierprotokoll des Herstellers). Der Reaktionsansatz für die Sequenzierung setzte sich folgendermaßen zusammen:

Premix	8,0	µl
Sequenzierprimer (3,2 pmol)	1,0	µl
PCR-Produkt	200	ng
Aqua dest.	ad 20	µl

Die Amplifikation erfolgte in 25 Zyklen in einem GeneAmp® PCR System 9600 (Perkin Elmer, Überlingen) nach folgendem Temperaturprotokoll:

96°C	10 Sekunden
50°C	5 Sekunden
60°C	4 Minuten

Nach Beendigung der Amplifikation wurden überschüssige fluoreszenzmarkierte Dideoxynukleotide mittels Ethanolpräzipitation entfernt. Dazu wurden die Proben in ein Gemisch aus 2 µl 3M Natriumacetat pH 4,6 und 50 µl Ethanol 95% gegeben, gemischt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 20.000 x g wurde der Überstand entfernt, das Pellet mit 250 µl Ethanol 70% gewaschen und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 5 µl eines Loading-Puffers aus 5:1 Formamid/50mM EDTA pH 8,0 gelöst, dann für 2 Minuten bei 90°C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. 4 µl der Probe wurden auf ein 6% Polyacrylamidgel des 373A-DNA-Sequenzierautomaten aufgetragen. Die Zusammensetzung des Gels sowie die Parameter der Elektrophorese waren analog zu den Elektrophoresebedingungen bei der automatischen Fragmentlängenanalyse (Genescan). Die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente werden der Länge nach elektrophoretisch aufgetrennt und in der Scanregion des Sequenzierautomaten vom Laser detektiert. Aus den so gesammelten Daten generiert der angeschlossene Computer ein Gelbild und erstellt aus den Chromatogrammen direkt die DNA-Sequenzen.

Die Primeroligonukleotide zur Direktsequenzierung der Fusionspunkte wurden im MLL-Anteil der rekombinierten DNA möglichst nahe an den durch die automatische Fragmentlängenanalyse eingegrenzten Bruchpunkt des MLL-Gens positioniert. Repetitive Bereiche der MLL-Gensequenz wie z.B. Alu-Repeats wurden dabei nach Möglichkeit vermieden, um eine hohe Primerspezifität zu gewährleisten. Die Schmelztemperatur des Primer-Template-Komplexes wurde im Bereich von 50°C-56°C kalkuliert (116). War eine Vermeidung repetitiver Sequenzen nicht möglich, so wurden zur Verbesserung der Spezifität längere Primeroligonukleotide ausgewählt und die Annealingtemperatur der Sequenzreaktion auf 60°C erhöht. Die Primer wurden so ausgewählt, daß das 3'-terminale Ende des Oligonukleotids außerhalb der repetitiven Region lag.

Die Auswahl der Sequenzprimeroligonukleotide im Hinblick auf die Lage innerhalb repetitiver Sequenzen des MLL-Gens erfolgte softwaregestützt mittels der PCGene-6.85-Software (IntelliGenetics Inc., Genf, Schweiz). Alle verwendeten Sequenzierprimer sind in Tabelle 16 im Anhang zusammengestellt.

4.13 Auswertung der Sequenzdaten

Die durch direkte Sequenzierung des PCR-Produkts des Fusionsgens gewonnenen Sequenzdaten wurden mittels der PCGene-6.85-Software (IntelliGenetics Inc., Genf) mit der Sequenz der MLL-Bruchpunktregion (62) verglichen. Auf diese Weise war der Übergang von MLL-Sequenz in die Sequenz des jeweiligen Partnergens erkennbar, der jeweilige Bruchpunkt des MLL-Gens wurde bestimmt. Die weitere Auswertung der Sequenzdaten im Hinblick auf den Bruchpunkt umgebende Sequenzmotive erfolgte unter Verwendung der HUSAR 4.0 Software des Europäischen Molekularbiologischen Labors (EMBL) in Heidelberg.

5 Ergebnisse

5.1 Methodenentwicklung

5.1.1 Long-PCR zur Amplifikation der Genomabschnitte mit MLL-Gen-Rekombination

Das zu entwickelnde Verfahren zur Ermittlung der DNA-Sequenz chromosomaler Bruchpunkte bei MLL-Gen-Rearrangements sollte an Knochenmarksproben von Patienten mit Leukämie durchgeführt werden können. Da hierbei nur eine begrenzte Menge an Ausgangsmaterial zur Verfügung steht, wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als derzeit sensitivstes Verfahren zur Vermehrung spezifischer DNA-Zielsequenzen eingesetzt. Die bei der Lokalisation möglicher Bruchpunkte zu berücksichtigenden Regionen (Bruchpunkt-Cluster-Region) übersteigen jedoch deutlich die mit normaler PCR amplifizierbaren Längen und erforderten deshalb den Einsatz eines für hohe Amplifikatgrößen optimierten Protokolls, der Long-PCR (L-PCR). Die zur Amplifikation der Bruchpunkt-Cluster-Region des MLL-Gens und bruchpunktüberspannender DNA-Abschnitte bei MLL-Rearrangements mit verschiedenen Partnergenen verwendeten PCR-Primersequenzen sind in Tabelle 15 im Anhang aufgelistet. Die bei den untersuchten Proben eingesetzten Primerkombinationen sind in Tabelle 18 aufgeführt.

5.1.1.1 Amplifikation der MLL-Bruchpunkt-Cluster-Region

Mittels nested L-PCR gelang die Amplifikation eines 8149 Basenpaare langen Fragmentes, das die gesamte Bruchpunktregion des MLL-Gens (MLL-Bruchpunkt-Cluster-Region) auf genomischer Ebene beinhaltet. Die Amplifikation dieses Fragmentes wurde bei allen untersuchten Zelllinien und Patientenproben durchgeführt und diente als Positivkontrolle der PCR-Reaktion (Abb. 2, Spur 3).

5.1.1.2 Amplifikation des Bruchpunktareals bei der Translokation t(4;11)(q21;q23)

Mittels Kombination von MLL-Primern mit AF4-Gegenprimern wurden bei 16 Patienten mit MLL/AF4-Rekombination chimäre PCR-Produkte auf genomischer Ebene amplifiziert, die den gesuchten, durch Translokation entstandenen Fusionspunkt zwischen MLL- und AF4-Gen beinhalten. Lediglich bei einer Patientenprobe gelang die Amplifikation nicht. Die Zelllinien MV4;11 und RS4;11 mit bekannter Translokation t(4;11)(q21;q23) wurden als Positivkontrollen verwendet. Es wurden sowohl MLL-upstream (sense) Primer als auch MLL-downstream (antisense) Primer mit AF4-Gegenprimern kombiniert (Abb. 2, Spuren 5-7).

5.1.1.3 Amplifikation des Bruchpunktareals bei der Translokation t(9;11)(p22;q23)

Die direkte Amplifikation eines rearrangierten PCR-Fragments gelang zunächst bei der Zelllinie THP-1. Die hierbei verwendeten Primer lagen in der bekannten AF9 mRNA-Sequenz (26). Bei der Zelllinie Mono-Mac-6 war mit diesen Primeroligonukleotiden zunächst keine Amplifikation möglich. Anhand der durch direkte Sequenzierung (s.u.) der MLL/AF9-Bruchpunktregion der Zelllinie THP-1 erhaltenen AF9-Intronsequenz wurden neue AF9-antisense-Primer ausgewählt. Mit diesen gelang schließlich die Amplifikation eines rearrangierten PCR-Fragments. Bei 4 weiteren t(9;11) positiven Patienten wurde ein PCR-Fragment auf genomischer Ebene direkt amplifiziert (Abb. 2, Spuren 9-11). Bei 3 Patienten gelang die Amplifikation nicht.

5.1.1.4 Amplifikation des Bruchpunktareals bei der Translokation t(X;11)(q13;q23)

Die Amplifikation des Fusionsgens wurde bei der die Translokation t(X;11)(q13;q23) tragenden Zelllinie Karpas 45 durchgeführt, weitere Proben standen nicht zur Verfügung. Die Sequenz des MLL-Translokationspartnergens AFX auf Region q13 des X-Chromosoms war zuvor in unserer Arbeitsgruppe ermittelt worden (108).

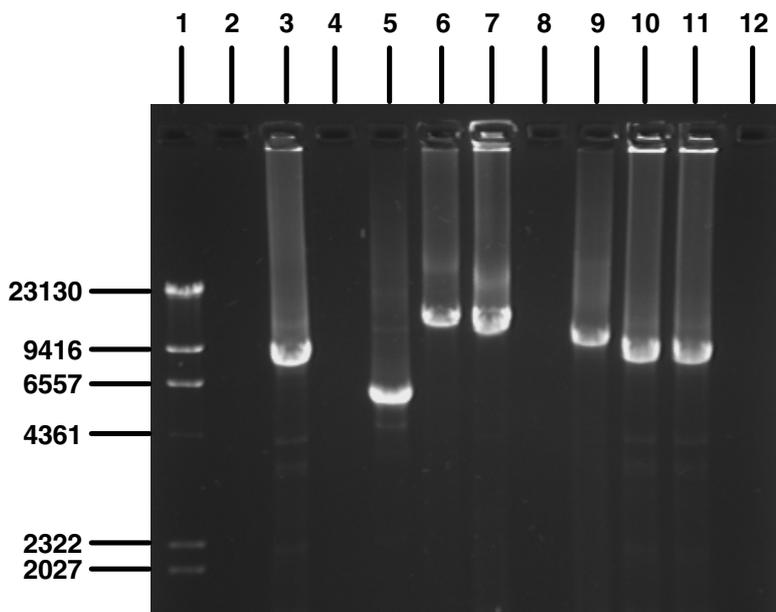


Abbildung 2: Nested-Long-PCR

Agarosegelelektrophoretische Darstellung der L-PCR-Banden von einigen Proben mit Translokation des MLL-Gens und der MLL-Bruchpunkt-Cluster-Region. Spur 1: DNA-Längenstandard II (λ -DNA/Hind III-Fragmente), die Fragmentlängen der Markerbanden sind am linken Bildrand angegeben. Spur 2: L-PCR-Negativkontrolle, sog. Wasserprobe. Spur 3: L-PCR-Fragment der MLL-Bruchpunkt-Cluster-Region (MLL-BCR) eines gesunden Probanden (TL). Spur 5-7: PCR-Produkte von Proben mit t(4;11): Spur 5: der 11 von RS4;11; Spur 6: der 11 von ZK; Spur 7: der 4 von PI. Spur 9-11 PCR-Produkte von Proben mit t(9;11): Spur 9: der 11 von THP-1; Spur 10: der 11 von WX; Spur 11: der 9 von CO. Die Spuren 4;8 und 12 wurden zur besseren Übersicht freigelassen.

5.1.2 Verfahren zur Fluoreszenzmarkierung der Restriktionsfragmente

Die PCR-Fragmente sowohl der MLL-Bruchpunktregion als auch die PCR-Produkte der rekombinierten Proben (Fusionsgene) wurden einer automatischen hochauflösenden fluoreszenzgestützten Restriktionsfragmentlängenanalyse im 373A Sequenzierautomaten unterzogen. Durch Verwendung eines internen Längenstandards wurde mittels der Genescan 672 Software die Länge (Basenzahl) der jeweiligen markierten Restriktionsfragmente exakt bestimmt. Um ein detailliertes „Mapping“ der genomischen Bruchpunkte durchführen zu können, ist eine hohe Spezifität und Reproduzierbarkeit der Restriktionsmuster (sog. Pattern) erforderlich. Einzelne Fragmente müssen eindeutig identifizierbar sein und dem jeweiligen Gen zugeordnet werden können. Die entstehenden

Fragmentlängen bei Verdau des 8149 Basenpaare langen MLL-PCR-Produktes waren bekannt. Verschiedene Verfahren der Fluoreszenzmarkierung der Restriktionsfragmente wurden auf ihre Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit hin untersucht.

5.1.2.1 Fluoreszenzmarkierung von Restriktionsfragmenten mittels FAM-Adapter-Ligation

Bei diesem Markierungsverfahren finden Restriktionsverdau und Fluoreszenzmarkierung in einem einzigen Reaktionsschritt statt. Die einzelnen Restriktionsfragmente werden um die Länge der anligierten Oligonukleotide (29 Basen) verlängert. Hierdurch wurde die Fragmentlängenanalyse erschwert; die Spezifität der Fragmente im Chromatogramm war eingeschränkt. Eine Zuordnung der einzelnen Fragmente zu den bekannten Restriktionsfragmentmustern des MLL-PCR-Produkts war nur begrenzt möglich (Abb. 3, Spur D).

5.1.2.2 Fluoreszenzmarkierung von Restriktionsfragmenten mittels Reverser Transkriptase und „Fluoro-dUTP Labelling Mix“

Auch bei dieser Technik können Restriktionsverdau und Fluoreszenzmarkierung der Fragmente in einem einzigen Reaktionsansatz durchgeführt werden. Wegen der Inkompatibilität der Temperaturoptima von Taq-DNA-Polymerase (72°C) und der Restriktionsenzyme Tru 91 (65°C) und Dde1 (37°C) wurde der Einbau der fluoreszenzmarkierten Nukleotide mit einem Reverse-Transkriptase-Enzym (37°C) durchgeführt. Die Fragmentlängenanalyse war hiermit durchführbar (Abb. 3, Spur C). Im Vergleich zu den nachfolgend beschriebenen Techniken wiesen die einzelnen Restriktionsfragmente jedoch weniger charakteristische Signalmuster auf, die ihre Zuordnung erleichterten. Die unterschiedlichen Temperaturoptima zwischen Reverser Transkriptase (37°C) und dem Restriktionsenzym Tru 91 (65°C) waren ein weiterer Grund, warum diese Technik wieder verlassen wurde.

5.1.2.3 Fluoreszenzmarkierung von Restriktionsfragmenten mittels Taq-Polymerase und „Fluoro-dUTP Labelling Mix“

Bei diesem Verfahren werden die 5'-Überhänge der Restriktionsschnittstellen vollständig aufgefüllt. Die Länge der markierten Restriktionsfragmente war gut zu bestimmen, jedoch erschienen diese durch das vollständige Auffüllen der Schnittstellen um jeweils 2 (Tru 91) bzw. 3 Basen (Dde1) verlängert. Die einzelnen Fragmente wiesen zwar charakteristische Signalverläufe auf, diese Muster waren jedoch weniger ausgeprägt als bei der im folgenden Abschnitt beschriebenen Technik, weshalb die Fragmente etwas schlechter zu identifizieren und zuzuordnen waren (Abb. 3 Spur B).

5.1.2.4 Fluoreszenzmarkierung von Restriktionsfragmenten mittels Taq-Polymerase und 11-Fluorescein-dUTP (Fluorogreen)

Bei diesem Markierungsverfahren, bei dem nur die fluoreszenzmarkierten Nukleotide am 3'-Ende der Restriktionsfragmente angefügt, die Schnittstellen aber nicht vollständig aufgefüllt werden, entstanden in der chromatographischen Darstellung gut reproduzierbare Restriktionsmuster der jeweiligen Probe (Abb. 3, Spur A). Die Signale wiesen ganz charakteristische Muster auf, die den einzelnen Restriktionsfragmenten zugeordnet werden konnten. Die hohe Spezifität der Chromatogrammsignale mit verschiedenen Peakhöhen und Breiten und vereinzelt Doppelpeaks resultiert aus zwei charakteristischen Eigenschaften der Taq-DNA-Polymerase. Zum einen werden modifizierte Deoxynukleotide, wie das verwendete 11-Fluorescein-dUTP, in Abhängigkeit von der unmittelbaren Nachbarsequenz unterschiedlich effektiv eingebaut (117). Zum anderen werden durch die Nukleotidyltransferaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase vom Matrizenstrang (Template) unabhängig einzelne Nukleotide (Adenosin) an das 3'-terminale Ende im Reaktionsansatz vorhandener DNA-Stränge (Restriktionsfragmente) angehängt (118).

Bei Verwendung des Restriktionsenzym Dde1 ergibt sich eine weitere Variationsmöglichkeit. Dieses Enzym akzeptiert in der zentralen Position des Palindroms seiner Erkennungssequenz (CTNAG) jedes Nukleotid. Steht an dieser variablen Stelle ein Adenosin (dATP) (CTAAG), so können zwei fluoreszenzmarkierte dUTP eingebaut werden, das Fluoreszenzsignal wird

verstärkt. Durch das Anhängen des fluoreszenzmarkierten Nukleotids erschienen die einzelnen Fragmente im Vergleich zu den erwarteten Fragmentlängen bei der bekannten MLL-Bruchpunktregion um jeweils eine bzw. zwei Basen verlängert.

Dieser Ansatz zeigte im Vergleich zu allen anderen untersuchten Fluoreszenzmarkierungsverfahren die charakteristischsten und am besten reproduzierbaren elektropherographischen Restriktionsmuster und wurde deshalb für alle weiteren automatischen Fragmentlängenanalysen verwendet.

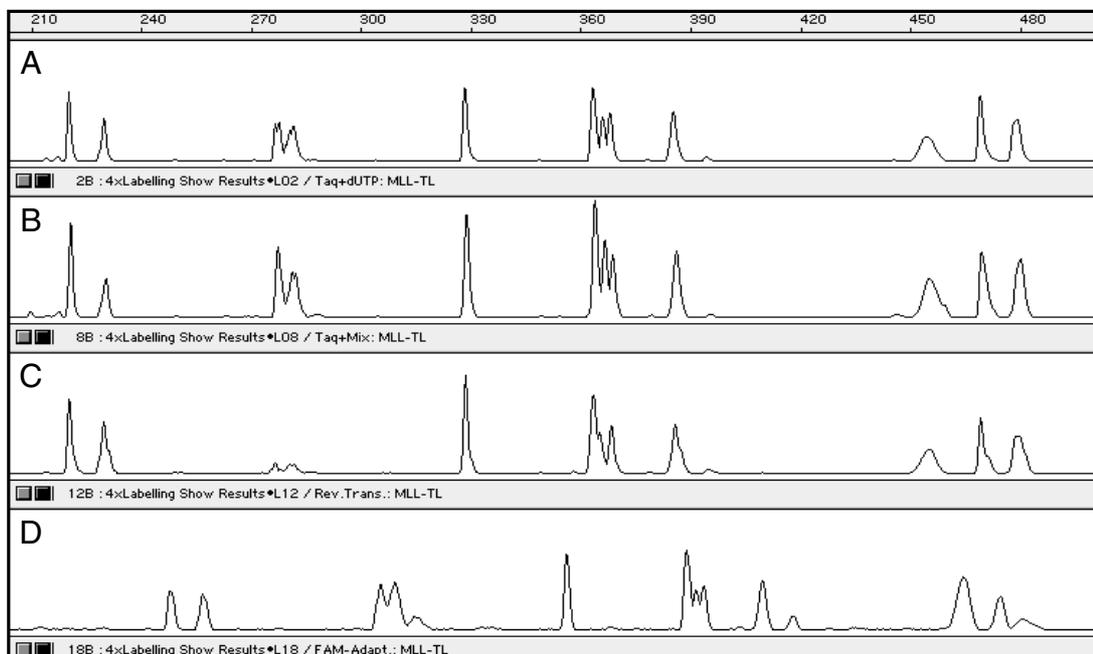


Abbildung 3: Fluoreszenzmarkierung der Restriktionsfragmente

Vergleich verschiedener Fluoreszenzmarkierungsverfahren nach Restriktionsverdau der MLL-Bruchpunktregion mit Tru91. Darstellung der Fragmente von 210 bis 480 Basenpaare.

A: Chromatogramm nach Anhang von 11-Fluorescein-dUTP (Fluorogreen) mittels Taq-Polymerase an die 3'-Enden der Restriktionsfragmente. **B:** Gleicher Ausschnitt nach auffüllen der Restriktionsschnittstellen mit einem Mix aus fluoreszenzmarkierten und konventionellen Nukleotiden (Fluoro-dUTP Labelling Mix) ebenfalls mit einer Taq-Polymerase. Beide Verfahren ergeben spezifische und reproduzierbare Restriktionsmuster, die Längenzuordnung wird bei B durch das Auffüllen der Schnittstellen jedoch ungenauer. **C** zeigt das Chromatogramm nach Auffüllen der Schnittstellen mit Fluoro-dUTP Labelling Mix mittels Reverser Transkriptase. **D** entstand nach FAM-Adapter-Ligation an die Restriktionsfragmente. Es zeigt sich eine verminderte Spezifität der einzelnen Peaks sowie die Verschiebung des Chromatogramms durch die durch Adapterligation bedingte Verlängerung der einzelnen Fragmente.

5.1.3 Eingrenzung des MLL-Bruchpunktes durch hochauflösende Fragmentlängenanalyse

In einem Fragmentlängenbereich von etwa 100 bis 600 Basenpaare war durch die hochauflösende Fragmentlängenanalyse mit Hilfe des 373A-Sequenzierautomaten und der Genescan 672-Software (PE-Biosystems, Weiterstadt) die sichere Diskriminierung von 2 Basenpaaren Längendifferenz möglich. Durch die hohe Längenauflösung und die hohe Spezifität der einzelnen Fragmente in der chromatographischen Darstellung gelang durch Vergleich der Restriktionsmuster rekombinierter PCR-Produkte mit nichtrekombinierten PCR-Produkten eine eindeutige Zuordnung der einzelnen Fragmente zum MLL-Genbereich bzw. zum Partnergenbereich. Erkennbar wurde auch, welche MLL-Anteile bei der Rekombination durch Partnergenanteile ersetzt worden waren.

Durch Zuordnung noch vorhandener und auch ersetzter MLL-Anteile zu der enzyspezifischen, anhand der bekannten DNA-Sequenz erstellten Restriktionskarte der MLL-Bruchpunktregion war so der Fusionspunkt zwischen MLL-Gen und Partnergen bis auf wenige hundert Basenpaare genau einzugrenzen. Die Verwendung von zwei Enzymen (Tru91 und Dde1) erhöht dabei das Auflösungsvermögen deutlich. Die Eingrenzung des MLL-Bruchpunktes durch das hochauflösende „Mapping“ ist dabei unabhängig vom jeweiligen Partnergen (Abb. 4).

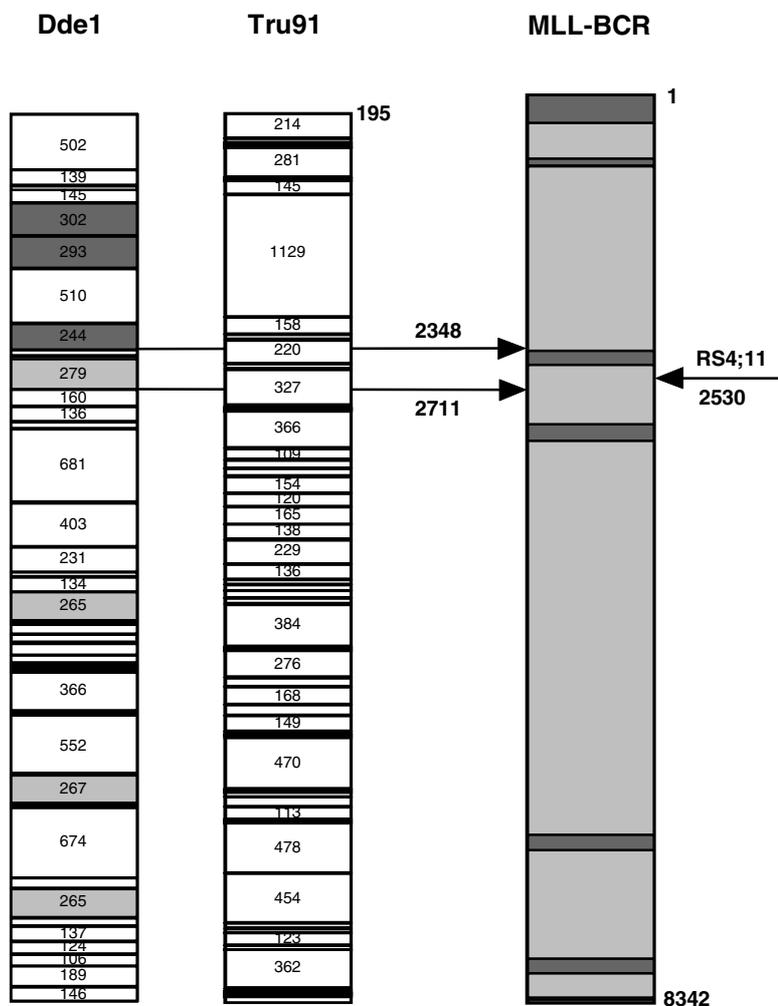
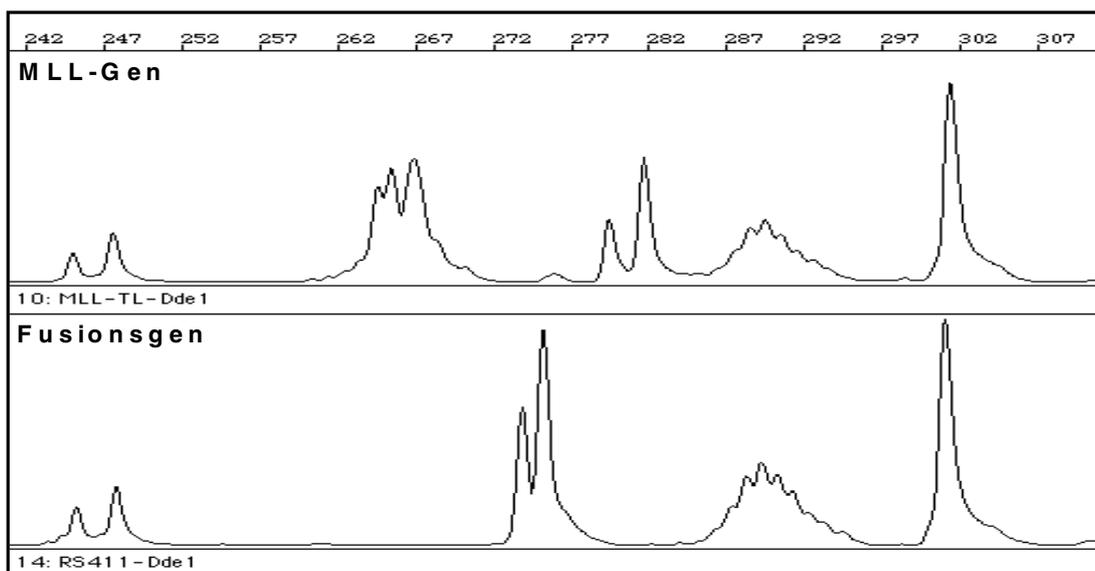


Abbildung 4: Eingrenzung der Lage des Bruchpunktes durch hochauflösende Fragmentlängenanalyse

Oben: Vergleich eines Ausschnittes des Restriktionsmusters der MLL-Bruchpunkt-Cluster-Region mit dem Restriktionschromatogramm des durch Translokation entstandenen MLL/AF4-Fusionsgens der Zelllinie RS4;11. Als Restriktionsenzym diente hier Dde1. Erkennbar ist, daß im Fusionsgen noch die MLL-Fragmente mit der Länge von 244, 293 und 302 Basenpaaren zu finden sind, während die Fragmente mit der Länge 265, 267 und 279 Basenpaare im Fusionsgen nicht mehr nachweisbar sind.

Unten: Restriktionskarte der Bruchpunkt-Cluster-Region des MLL-Gens (MLL-BCR). Die beiden Säulen auf der linken Seite zeigen schematisch die Restriktionskarten des durch Long-PCR erhaltenen PCR-Fragmentes der MLL-BCR nach Verdau mit den Restriktionsenzymen Tru91 bzw. Dde1. Die exakten Fragmentlängen der jeweiligen Restriktionsfragmente mit einer Länge größer 100 Basenpaare sind angegeben. Die rechte Säule repräsentiert ein BamH1-Fragment des MLL-Gens, das die gesamte 8342 Basenpaare lange Bruchpunkt-Cluster-Region zwischen Exon 5 und 11 (Exon 5-11 dunkelgrau, dazwischenliegende Introns hellgrau) beinhaltet. Die angegebenen Nukleotid-Positionen entsprechen denen bei Gu et. al. (62). Die im Chromatogramm des Fusionsgens eindeutig dem MLL-Gen zuzuordnenden Restriktionsfragmente mit der Länge 244, 293 und 302 Basenpaare sind im oberen Bereich der Restriktionskarte (Dde1) dunkelgrau markiert. Die im MLL/AF4-Fusionsgen nicht mehr nachweisbaren MLL-Fragmente mit der Länge 265, 267 und 279 Basenpaare sind hellgrau unterlegt. Die Lage des genomischen Fusionspunktes konnte damit auf den Bereich zwischen den Nukleotidpositionen 2348 und 2711 eingegrenzt werden. Der Pfeil auf der linken Seite markiert den tatsächlichen genomischen Fusionspunkt zwischen MLL und AF4 der Zelllinie RS4;11 nach Direktsequenzierung bei der Nukleotidposition 2530 der MLL-BCR.

5.1.4 Sequenzierung der MLL-Bruchpunkte

Die mit der hochauflösenden Fragmentlängenanalyse gewonnenen Daten wurden genutzt, um Primeroligonukleotide MLL-seitig möglichst nahe an den Fusionspunkt zwischen MLL-Gen und Partnergen zu positionieren. Mit diesen Primern konnte aus der bekannten MLL-Gensequenz heraus über den Fusionspunkt hinweg in das jeweilige Partnergen hineinsequenziert werden. Zum einen stellt sich so der gesuchte MLL-Bruchpunkt dar, zum anderen erhält man Sequenzdaten des Partnergens in unmittelbarer Nachbarschaft des durch die Rekombination entstandenen Fusionsgens auf genomischer Ebene. Als Template diente dabei das jeweilige chimäre PCR-Produkt der rearrangierten Probe. Die Direktsequenzierung des MLL-Bruchpunktes ist unabhängig vom jeweiligen Partnergen. Auf diese Weise wurde der genomische Bruchpunkt des MLL-Gens bei insgesamt 20 Patientenproben und bei 5 Zelllinien sequenziert. Alle erhaltenen Sequenzdaten finden sich in Kapitel 9.1 im Anhang.

5.2 Probenanalytik

5.2.1 Lokalisation der MLL-Bruchpunkte

Tabelle 3 zeigt die Lage der Bruchpunkte in der 8342 Basenpaare langen MLL-Bruchpunkt-Cluster-Region. Die Angaben über die Lage des genomischen Bruchpunktes beziehen sich auf die Sequenz der MLL-Bruchpunkt-Cluster-Region nach Gu et.al. (62). Abb. 5 stellt die Lokalisation der Bruchpunkte graphisch dar. Die Lage des Bruchpunktes der t(4;11)-positiven Zelllinie RS4;11 stimmt mit der bei Gu et. al. bereits beschriebenen Lage überein (62;95). In der Zelllinie MV4;11 findet sich der genomische Bruchpunkt 33 Basenpaare weiter 5'-wärts als bei Gu et al. beschrieben bei Nukleotid 1128/1129 (119).

Tabelle 3: Lage der genomischen Bruchpunkte in der MLL-BCR

Nr	Name	PCR-Produkt	Bruchpunkt	Acc-Nr	Topo	VDJ	Alu
P1	RS4;11	der11 (MLL/AF4)	2530 / 2531	AJ000159	1212	509	-
P2	MV4;11	der11 (MLL/AF4)	1128 / 1129	AJ000160	190	476	+
P3	THP-1	der11 (MLL/AF9)	1806 / 1807	AJ000161	488	215	-
P4	Mono-Mac-6	der11 (MLL/AF9)	6588 / 6589	AJ000162	277	418	-
P5	Karpas 45	der11 (MLL/AFX)	4900 / 4901		203	829	+
P6	LA	der11 (MLL/AF4)	5703 / 5704		167	467	-
P7	LC	der4 (AF4/MLL)	4023 / 4022		147	48	+
P8	ZK	der11 (MLL/AF4)	3758 / 3759	AJ000171	412	313	-
P9	JT	der11 (MLL/AF4)	2739 / 2740	AJ000172	1421	718	-
P10	SR	der11 (MLL/AF4)	6523 / 6524	AJ000173	342	353	-
P11	SM	der4 (AF4/MLL)	6783 / 6782	AJ000175	82	607	-
P12	DC	der4 (AF4/MLL)	2557 / 2556	AJ000174	1239	536	-
P13	KU	der4 (AF4/MLL)	2681 / 2680	AJ000166	1363	660	-
P14	TI	der11 (MLL/AF4)	6627 / 6628	AJ000167	238	457	-
P15	WE	der11 (MLL/AF4)	764 / 765	AJ000168	554	112	-
P16	GE	der11 (MLL/AF4)	6348 / 6349	AJ000169	517	178	+
P17	PR	der11 (MLL/AF4)	2812 / 2813	AJ000178	1358	791	-
P18	BN	der4 (AF4/MLL)	6418 / 6417	AJ000176	447	248	-
P19	PI	der4 (AF4/MLL)	3018 / 3017	AJ000177	1152	997	-
P20	EY	der11 (MLL/AF4)	6051 / 6052	AJ000179	515	119	-
P21	KT	der11 (MLL/AF4)	2301 / 2302	AJ000800	983	280	-
P22	CO	der9 (AF9/MLL)	3544 / 3543	AJ000163	626	527	-
P23	WX	der11 (MLL/AF9)	1040 / 1041	AJ000165	278	388	+
P24	KG	der11 (MLL/AF9)	1025 / 1026	AJ000164	293	373	+
P25	VS	der11 (MLL/AF9)	4663 / 4664	AJ000170	34	592	-

Amplifizierte und sequenzierte derivative Fusionsgene (PCR-Produkt), Lage der genomischen Bruchpunkte innerhalb der MLL-BCR, Acc-Nr der Sequendaten in der EMBL-Datenbank. Abstand der MLL-Bruchpunkte von der nächstgelegenen Topoisomerase-Erkennungssequenz (Topo) bzw. vom VDJ-Heptamer oder -Nonamer (VDJ). Lage der Bruchpunkte innerhalb (+) oder außerhalb (-) eines Alu-Repeats (Alu).

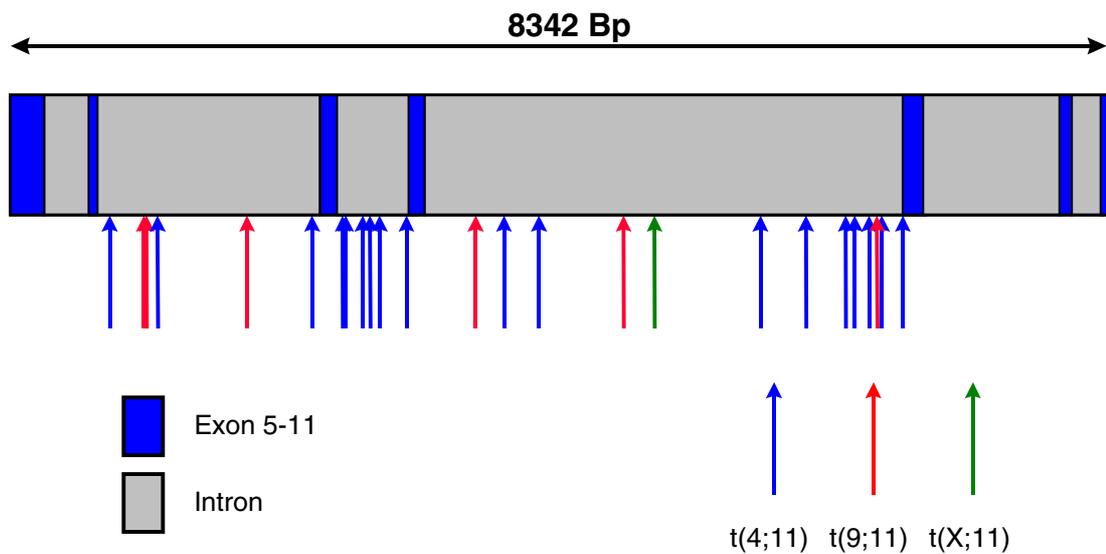


Abbildung 5: Lage der genomischen Bruchpunkte in der MLL-BCR

5.2.1.1 Charakterisierung des Verteilungsmusters aller MLL-Bruchpunkte

Untersucht werden sollte die Verteilung der genomischen Bruchpunkte innerhalb der MLL-Bruchpunkt-Cluster-Region. Um Aussagen über eine Gleichverteilung oder aber über eine nicht zufällige Verteilung der genomischen Bruchpunkte treffen zu können, wurde die Verteilung mittels eines asymptotischen Chi-Quadrat-Tests statistisch ausgewertet.

Teilt man die MLL-Bruchpunkt-Cluster-Region in eine 5´-Hälfte (Region 1: Basen 1-4171) und in eine 3´-Hälfte (Region 2: Basen 4172-8342), so fallen 15 der 25 sequenzierten Bruchpunkte in die 5´-Region und 10 der Bruchpunkte in die 3´-Region (Abb. 6).

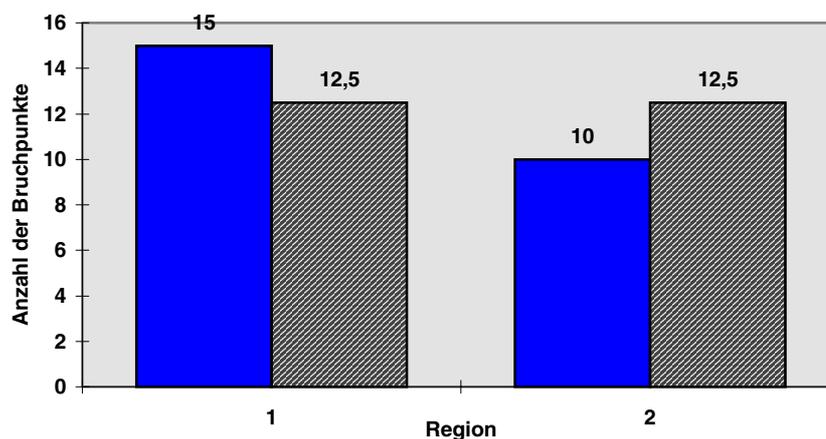


Abbildung 6: Verteilung der Bruchpunkte auf 2 Hälften der MLL-BCR

Blaue Säulen repräsentieren die Anzahl der Bruchpunkte in der jeweiligen Region (Beobachtungswert). Graue Säulen zeigen die zu erwartende Anzahl von Bruchpunkten in jeder Region bei einer angenommenen Gleichverteilung über die MLL-BCR (Erwartungswert).

Tabelle 4: Asymptotischer Chi-Quadrat-Test bei Verteilung der Bruchpunkte auf zwei Hälften der MLL-BCR

Region	Bereich	Beobachtet	Erwartet	Chi-Quadrat
1	1-4171	15	12,5	0,50
2	4172-8342	10	12,5	0,50
Summe		25	25	1,00
p-Wert				0,3173

Im asymptotischen Chi-Quadrat-Test zeigt sich anders als in der Literatur beschrieben (120) keine signifikante Präferenz der Bruchpunkte für eine der beiden Regionen bei Patienten mit De-novo-Leukämie ($p=0,3173$).

Die exakte Bestimmung der Lage der Bruchpunkte ermöglicht eine genauere Analyse ihrer Verteilung durch Einteilung der MLL-Bruchpunkt-Region in 8 gleich lange Regionen aus jeweils 1043 Basenpaaren (Abb. 7).

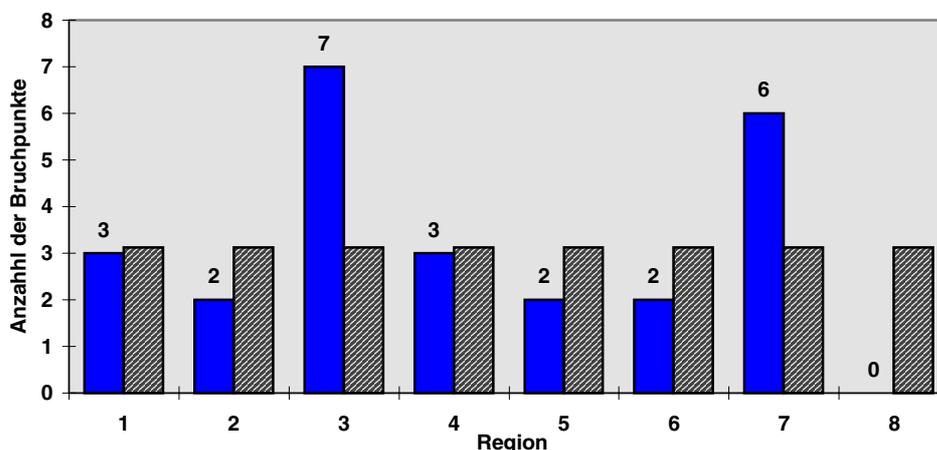


Abbildung 7: Verteilung der Bruchpunkte auf 8 gleich lange Regionen der MLL-BCR

Blaue Säulen repräsentieren die Anzahl der Bruchpunkte in der jeweiligen Region (Beobachtungswert). Graue Säulen zeigen die zu erwartende Anzahl von Bruchpunkten in jeder Region bei einer angenommenen Gleichverteilung über die MLL-BCR (Erwartungswert).

Tabelle 5: Asymptotischer Chi-Quadrat-Test bei Verteilung der Bruchpunkte auf 8 gleich lange Regionen der MLL-BCR

Region	Bereich	Beobachtet	Prozent	Erwartet	Chi-Quadrat
1	1-1043	3	12	3,125	0,01
2	1044-2086	2	8	3,125	0,41
3	2087-3129	7	28	3,125	4,81
4	3130-4172	3	12	3,125	0,01
5	4173-5215	2	8	3,125	0,41
6	5216-6258	2	8	3,125	0,41
7	6259-7301	6	24	3,125	2,65
8	7302-8342	0	0	3,125	3,13
Summe		25	100	25	11,80
p-Wert					0,1073

Angegeben ist neben dem tatsächlichen Beobachtungswert und dem Erwartungswert bei angenommener Gleichverteilung auch die prozentuale Verteilung der Bruchpunkte auf die 8 Regionen.

Im asymptotischen Chi-Quadrat-Test (Tabelle 5) zeigt sich keine signifikante Abweichung von einer Gleichverteilung der genomischen Bruchpunkte über die 8 Regionen ($p=0,1073$). Eine Häufung von 28% aller Bruchpunkte in Region 3 und 24% aller Bruchpunkte in Region 7 zeigt aber einen Trend zur Bruchpunkt-Cluster-Bildung in Intron 7 und am 3'-Ende von Intron 8 der MLL-Bruchpunkt-Region.

5.2.1.2 Charakterisierung des Verteilungsmusters bei ausschließlicher Betrachtung der t(4;11)-Bruchpunkte

Die folgenden Analysen beziehen sich ausschließlich auf die untersuchten Proben mit einer Translokation t(4;11). Um die Hypothese einer unterschiedlichen Verteilung der chromosomalen Bruchpunkte innerhalb der MLL-Bruchpunkt-Cluster-Region in Abhängigkeit von den jeweils beteiligten Partnergenen überprüfen zu können, wurde diese Translokation einer gesonderten Betrachtung unterzogen, da sie bei Leukämien die häufigste Translokation mit einer Beteiligung des MLL-Gens darstellt. Abbildung 8 stellt die Verteilung der t(4;11)-Bruchpunkte graphisch dar.

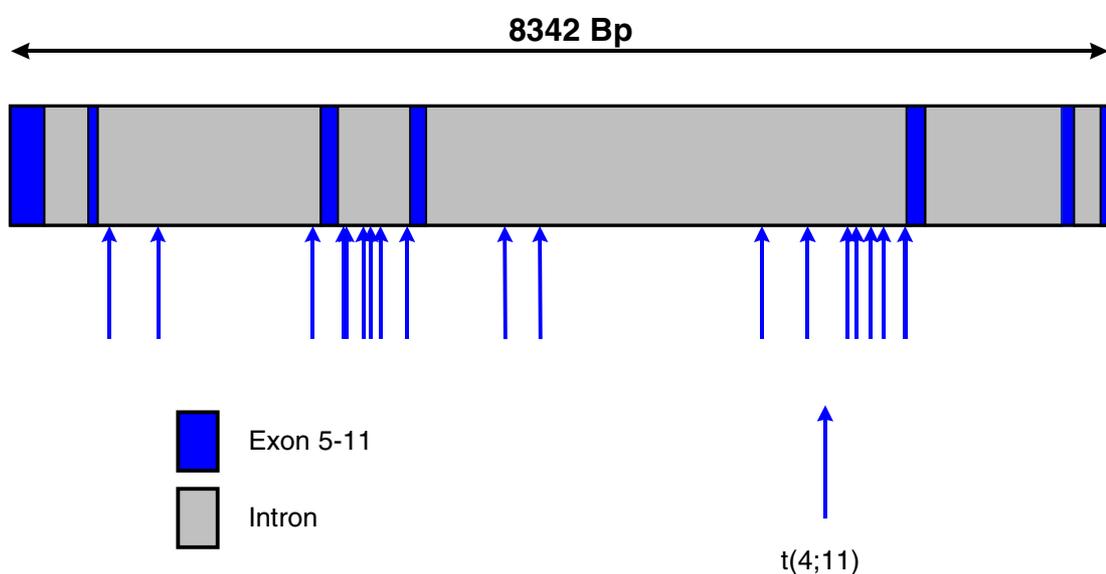


Abbildung 8: Lage der genomischen Bruchpunkte des MLL-Gens bei t(4;11)

Bei 11 Proben mit Translokation $t(4;11)$ liegt der genomische Bruchpunkt im 5'-Bereich der MLL-Bruchpunktregion, 7 der 18 sequenzierten Bruchpunkte fallen in die 3'-Region (Abb. 9).

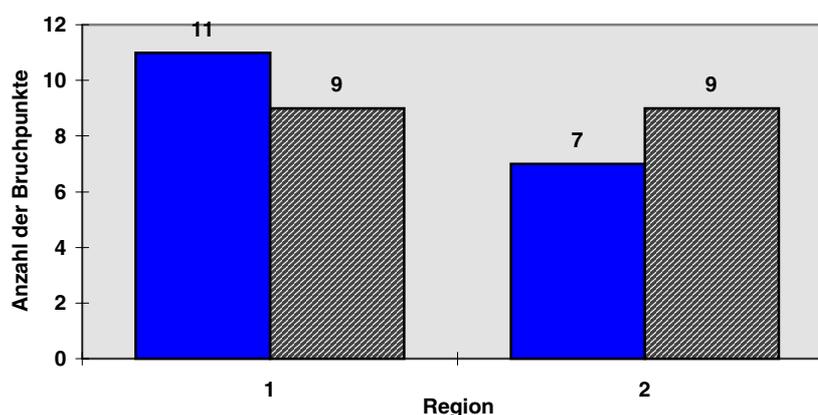


Abbildung 9: Verteilung der $t(4;11)$ -Bruchpunkte auf die 2 Hälften der MLL-BCR

Blaue Säulen repräsentieren die Anzahl der $t(4;11)$ -Bruchpunkte in der jeweiligen Region (Beobachtungswert). Graue Säulen zeigen die zu erwartende Anzahl von Bruchpunkten in jeder Region bei einer angenommenen Gleichverteilung über die MLL-BCR (Erwartungswert).

Tabelle 6: Asymptotischer Chi-Quadrat-Test bei Verteilung der $t(4;11)$ -Bruchpunkte auf zwei Hälften der MLL-BCR

Region	Bereich	Beobachtet	Erwartet	Chi-Quadrat
1	1-4171 (50%)	11	9	0,44
2	4172-8342 (50%)	7	9	0,44
Summe		18	18	0,89
p-Wert				0,3455

Auch bei den Proben mit Translokation $t(4;11)$ von Patienten mit De-novo-Leukämie läßt sich im asymptotischen Chi-Quadrat-Test eine signifikante Häufung in einer der beiden Regionen nicht zeigen ($p=0,3455$).

Die genauere Analyse der Verteilung der t(4;11)-Bruchpunkte über 8 gleich lange Regionen zeigt eine Häufung von 38,9% der Bruchpunkte in Region 3 und 27,8% in Region 7 (Abb. 10).

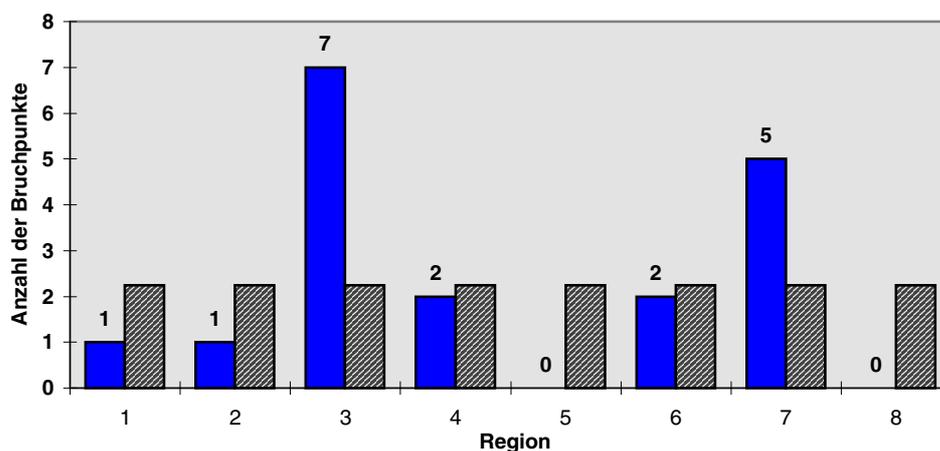


Abbildung 10: Verteilung der t(4;11)-Bruchpunkte auf 8 gleich lange Regionen der MLL-BCR

Blaue Säulen repräsentieren die Anzahl der t(4;11)-Bruchpunkte in der jeweiligen Region (Beobachtungswert). Graue Säulen zeigen die zu erwartende Anzahl von Bruchpunkten in jeder Region bei einer angenommenen Gleichverteilung über die MLL-BCR (Erwartungswert).

Tabelle 7: Asymptotischer Chi-Quadrat-Test bei Verteilung der t(4;11)-Bruchpunkte auf 8 gleich lange Regionen der MLL-BCR

Region	Bereich	Beobachtet	Prozent	Erwartet	Chi-Quadrat
1	1-1043	1	5,6	2,25	0,69
2	1044-2086	1	5,6	2,25	0,69
3	2087-3129	7	38,9	2,25	10,03
4	3130-4172	2	11,1	2,25	0,03
5	4173-5215	0	0	2,25	2,25
6	5216-6258	2	11,1	2,25	0,03
7	6259-7301	5	27,8	2,25	3,36
8	7302-8342	0	0	2,25	2,25
Summe		18	100	18	19,33
p-Wert					0,0072

Angegeben ist neben dem tatsächlichen Beobachtungswert und dem Erwartungswert bei angenommener Gleichverteilung auch die prozentuale Verteilung der Bruchpunkte auf die 8 Regionen. Hervorgehoben ist die prozentuale Häufung von t(4;11)-Bruchpunkten in Region 3 und 7.

Der asymptotischen Chi-Quadrat-Test (Tabelle 7) zeigt eine eindeutig signifikante Abweichung von einer Gleichverteilung der t(4;11)-Bruchpunkte über die 8 Regionen mit einer Bruchpunkt-Cluster-Bildung in Intron 7 (Region 3) und am 3'-Ende von Intron 8 (Region 7) ($p=0,0072$).

5.2.2 Lage der MLL-Bruchpunkte in Beziehung zu Alu-repetitiven Elementen

Alu-Sequenzen spielen möglicherweise beim Austausch von genetischem Material zwischen den homologen Chromosomen während der Meiose eine Rolle. Von verschiedenen Autoren wurde ihre Beteiligung auch an chromosomalen Translokationen vermutet.

Innerhalb der MLL-Bruchpunktregion wurden von Gu et. al. insgesamt acht Alu-Repeats beschrieben (62) (Tabelle 8). Lediglich 6 (24%) der 25 hier sequenzierten MLL-Bruchpunkte liegen innerhalb einer solchen Alu-Sequenz. Drei (16%) der insgesamt 18 sequenzierten Bruchpunkte bei Proben mit Translokation t(4;11) (MV4;11 / LC / GE) und 2 (33%) der insgesamt 6 sequenzierten Bruchpunkte bei t(9;11) (WX / KG) liegen innerhalb eines Alu-Repeats. Weiterhin liegt der genomische Bruchpunkt der Zelllinie Karpas 45 mit t(X;11) in einem Alu-Repeat. Die Mehrzahl aller genomischen Bruchpunkte der MLL-Bruchpunkt-Region (76%) liegt außerhalb der Alu-repetitiven Segmente.

Tabelle 8: Lage der Alu-repetitiven Elemente in der MLL-Bruchpunkt-Cluster-Region

Alu-Repeat	Position	Typ	Länge	sense	Probennummer	Name
a	799-1108	J	309	sense	P23 / P24	WX / KG
b	1119-1420	Sx	301	sense	P2	MV4;11
c	1432-1716	Sb0	284	sense	-	-
d	1921-2216	J	295	sense	-	-
e	3973-4268	Sb0	295	sense	P7	LC
f	4764-5094	J	330	sense	P5	Karpas 45
g	6072-6362	S	290	sense	P16	GE
h	7164-7427	Sx	263	sense	-	-

Beschrieben wird die Position in der MLL-BCR, die Länge der jeweiligen Alu-Sequenz und deren Orientierung (62). Die Spalten „Probennummer“ und „Name“ geben an, bei welcher Probe der genomische Bruchpunkt innerhalb eines Alu-Repeats liegt.

Die graphische Darstellung verdeutlicht die Lage der MLL-Bruchpunkte und die Lage der Alu-Repeats in der MLL-Bruchpunkt-Region (Abb. 11)

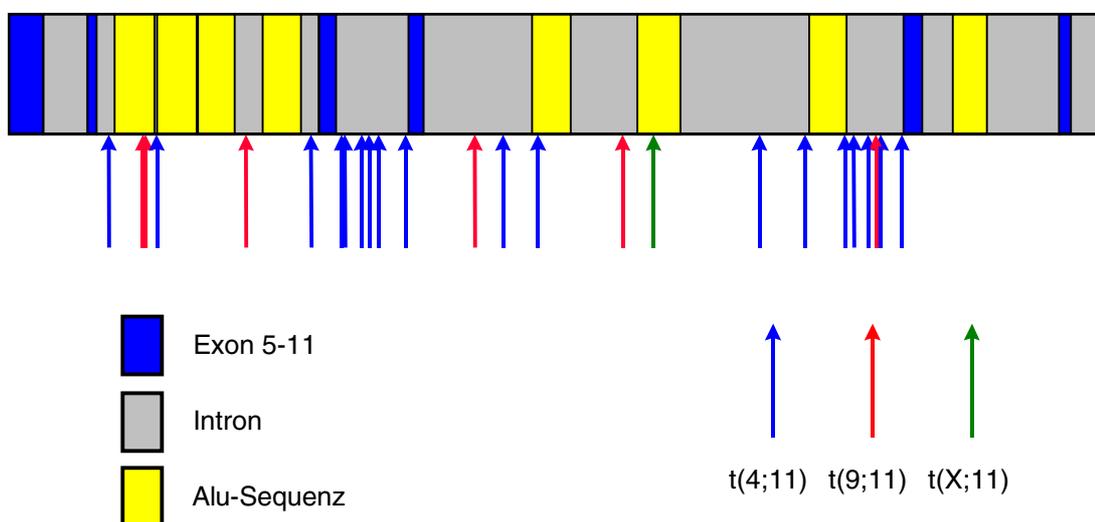


Abbildung 11: Lage der MLL-Bruchpunkte in Relation zu Alu-Repeats

Insgesamt machen Alu-Repeats 2367 Basenpaare (28,37%) der insgesamt 8342 Basenpaare langen MLL-Bruchpunktregion aus. Die Verteilung von 6 genomischen Bruchpunkten in Alu-Repeats und 19 Bruchpunkten in den verbleibenden Non-Alu-Bereichen der MLL-Bruchpunktregion zeigt im asymptotischen Chi-Quadrat-Test keine Abweichung von einer Gleichverteilung der Bruchpunkte ($p=0,6560$). Somit läßt sich eine Häufung von MLL-Bruchpunkten in Alu-Repeats nicht belegen (Tabelle 9).

Tabelle 9: Asymptotischer Chi-Quadrat-Test zur Lage von MLL-Bruchpunkten in Alu-repetitiven Sequenzen

Region	Länge (Basen)	Beobachtet	Erwartet	Chi-Quadrat
Alu	2367	6	7	0,14
Non-Alu	5975	19	18	0,05
Summe		25	25	0,19
p-Wert				0,6560

5.2.3 Verteilung potentiell rekombinationsbegünstigender Sequenzmotive im Bezug zur Lokalisation der MLL-Bruchpunkte

Mittels der HUSAR 4.0 Software des Europäischen Molekularbiologischen Labors (EMBL) in Heidelberg wurde die Lage der zu untersuchenden Sequenzmotive (siehe Tabelle 10) innerhalb der MLL-Bruchpunktregion untersucht. Anschließend wurde die Lage der Bruchpunkte mit der Lage der Sequenzmotive verglichen, um eine evtl. Korrelation zwischen der Verteilung der Bruchpunkte und bestimmter Sequenzmotive erkennen zu können.

Dazu wurde für jedes Sequenzmotiv ein Erwartungswert berechnet, der abhängig von Lage und Verteilung der Motive, näherungsweise den Mittelwert der Abstände zwischen den Bruchpunkten und den Sequenzmotiven für den Fall einer von einem Motiv unabhängigen Verteilung der Bruchpunkte über die MLL-BCR-Region angibt. Ist der tatsächliche Mittelwert der Abstände zwischen Motiv und Bruchpunkten deutlich kleiner als der errechnete Erwartungswert, so ist von einem Zusammenhang zwischen Lage der Bruchpunkte und Lage der Sequenzmotive in der MLL-BCR-Region auszugehen. Eine Beteiligung des Sequenzmotivs am bruchpunktgenerierenden Translokationsgeschehen wäre dann wahrscheinlich.

Das Verfahren zur näherungsweisen Berechnung eines Erwartungswertes des mittleren Abstandes zwischen Motiv und Bruchpunkt wurde mit Hilfe des Institutes für Biomathematik der Justus-Liebig-Universität Gießen erstellt. Dabei wurde zugrunde gelegt, daß der maximale Abstand eines Bruchpunktes zu einem Sequenzmotiv dann zu beobachten ist, wenn der Bruchpunkt genau in der Mitte zwischen zwei benachbarten Sequenzmotiven liegt. Daraus ergibt sich, daß der maximale Abstand eines MLL-Bruchpunktes von einem bestimmten Sequenzmotiv der Hälfte des Abstandes der beiden dem Bruchpunkt benachbarten Sequenzmotive zueinander entspricht. Der Abstand zweier benachbarter Sequenzmotive wird als Intervall bezeichnet. Der mittlere Abstand zwischen Bruchpunkt und Sequenzmotiv beträgt dann ein Viertel des durch die beiden benachbarten Sequenzmotive gebildeten Intervalls. Bei mehreren über die MLL-Bruchpunkt-Region verteilten Motiven ergeben sich mehrere Intervalle. Diese werden ihrer Länge nach gewichtet.

Zur Berechnung des Erwartungswertes des Mittelwertes der Abstände zwischen Bruchpunkten und Motiven ergab sich so folgende Berechnungsformel:

$$\sum \text{Intervall}^2_{(1-n)} / 4 \times 8342$$

Tabelle 10: Potentiell rekombinationsbegünstigende Sequenzmotive

Sequenzmotiv	Konsensus-Sequenz
Topoisomerase-II-Erkennungssequenz	5´-[A/G]N[T/C]NNCNG[T/C]NG[G/T]TN[T/C]N[T/C]-3´
VDJ-Heptamer	5´-CACAGTG-3´
VDJ-Nonamer	5´-ACAAAACC-3´

5.2.3.1 Topoisomerase-II-Erkennungssequenzen

Bei der Auswertung von Topoisomerase-Erkennungssequenzen im MLL-Gen und den jeweiligen Partnergenen wurden stringente Kriterien zu Grunde gelegt. Zur Anerkennung als Topoisomerase-Erkennungssequenz sollte dabei mindestens eine Übereinstimmung von 90% auf einem DNA-Strang (9 von 10 der Non-N-Positionen) und eine Übereinstimmung von mindestens 50% (5 von 10 der Non-N-Positionen) auf dem direkt überlappenden Gegenstrang vorliegen (84;85;120). Die variablen 8 N-Positionen der Topoisomerase-Konsensus-Sequenz wurden zur Bewertung nicht herangezogen.

Diesen Kriterien entsprachen 7 Sequenzmotive innerhalb der MLL-Bruchpunktregion. Davon zeigte eine Erkennungssequenz in Exon 9 des MLL-Gens eine hundertprozentige Übereinstimmung (10 von 10 Basen der Non-N-Positionen) auf einem Strang (antisense) und eine siebenzigprozentige (7 von 10 Basen der Non-N-Positionen) auf dem Gegenstrang (sense) (62). Sechs weitere Topoisomerase-Erkennungssequenzen entsprachen den oben beschriebenen Minimalkriterien mit einer Übereinstimmung von 90% auf einem Strang und mindestens 50% auf dem Gegenstrang (120) (Tabelle 11).

Tabelle 11: Lage von Topoisomerase-II-Erkennungssequenzen in der MLL-BCR

Topo	Position	sense	antisense
1	1310-1327	5	9
2	4162-4179	6	9
3	4689-4706	9	5
4	5528-5545	5	9
5	6857-6874	7	10
6	6950-6967	5	9
7	8092-8109	6	9

Nukleotidpositionen der Topoisomerase-Konsensus-Sequenzen nach Gu et. al. (62). Angabe der Übereinstimmung der Konsensus-Sequenz mit dem jeweiligen Strang (sense, antisense), berücksichtigt wurden nur die 10 „Non-N-Positionen“. Hervorgehoben ist die vollständig homologe Topoisomerase-II-Erkennungssequenzen in Exon 9.

Werden die Bewertungskriterien für eine Topoisomerase-Erkennungssequenz gelockert, so ergeben sich insgesamt 11 Topoisomerase-Konsensus-Sequenzhomologe mit einer Homologie von 9 der 10 Non-N-Positionen wenn der Gegenstrang völlig unberücksichtigt bleibt. Bei Zulassung einer weiteren Basenfehlpaarung (8 von 10 der Non-N-Positionen) steigt die Anzahl auf 129, bei Zulassung von drei Fehlpaarungen (7 von 10 der Non-N-Positionen) gar auf 703 Topoisomerase-Konsensus-Sequenzhomologe innerhalb der 8342 Basenpaare langen MLL-Bruchpunkt-Cluster-Region (62).

Die graphische Darstellung verdeutlicht die Lage der MLL-Bruchpunkte und die Lage der Topoisomerase-Erkennungssequenzen in der MLL-Bruchpunkt-Cluster-Region (Abb. 12).

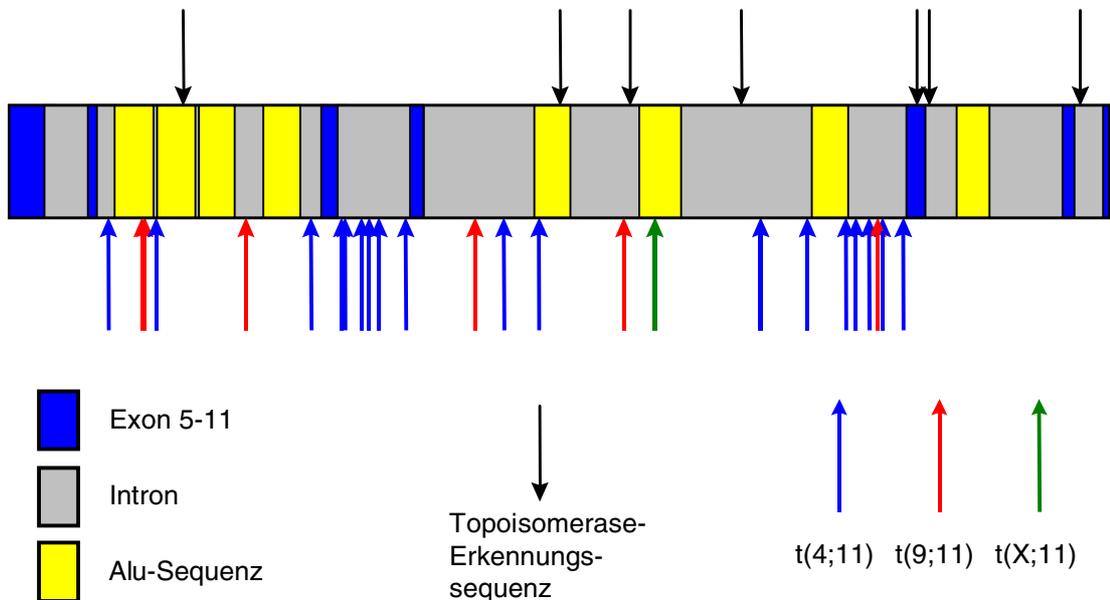


Abbildung 12: Lage der MLL-Bruchpunkte in Relation zu Topoisomerase-II-Erkennungssequenzen

Der genaue Abstand jedes genomischen Bruchpunktes zur nächstgelegenen Topoisomerase-Erkennungssequenz ist in Tabelle 3 aufgeführt. Der minimale Abstand eines genomischen Bruchpunktes des MLL-Gens zu einer nach diesen Kriterien analysierten Topoisomerase-II-Erkennungssequenz beträgt 34 Basepaare (P 25, VS). Der errechnete Erwartungswert des mittleren Abstandes der Bruchpunkte des MLL-Gens zu Topoisomerase-II-Motiven bei unabhängiger Bruchpunktverteilung beträgt 419 Basenpaare, der tatsächliche mittlere Abstand der Bruchpunkte zu der jeweils nächstgelegenen Konsensussequenz beträgt 582 Basenpaare. Ein Zusammenhang zwischen der Verteilung der Bruchpunkte und der Lage der nach stringenten Kriterien erfaßten Topoisomerase-II-Konsensussequenzen läßt sich somit nicht zeigen.

5.2.3.2 VDJ-Rekombinase-Erkennungssequenzen

Vollständige Erkennungssequenzen des VDJ-Rekombinasekomplexes aus konservierten Heptamer- und Nonamer-Motiven und dazwischen liegenden nichtkonservierten „Spacern“ aus 12 bzw. 23 Basenpaaren ließen sich in der MLL-Bruchpunkt-Region nicht nachweisen. Wie schon bei der Analyse der MLL-Region auf Topoisomerase-Erkennungssequenzen wurden bei der Suche nach VDJ-Heptameren und VDJ-Nonameren stringente Kriterien angelegt. Bei der Kürze der Motive von 7 bzw. 9 Basenpaaren wurden keine Mismatches zugelassen. Die Analyse der MLL-Bruchpunktregion zeigte lediglich eine vollständige Nonamer-Sequenz. Es ließen sich insgesamt vier Heptamer-Sequenzen nachweisen (Tabelle 12).

Tabelle 12: Position von VDJ-Heptamer- und VDJ-Nonamer-Motiven in der MLL-BCR

Motiv	Position	Sequenz	sense/antisense
Nonamer	648-656	ACAAAAACC	sense
Heptamer	2018-2024	CACAGTG	sense
Heptamer	4068-4074	CACAGTG	sense
Heptamer	6167-6173	CACAGTG	sense
Heptamer	7387-7393	CACAGTG	sense

Die graphische Darstellung verdeutlicht die Lage der MLL-Bruchpunkte und die Lage der VDJ-Heptamer- und VDJ-Nonamer-Motive in der MLL-Bruchpunkt-Region (Abb. 13).

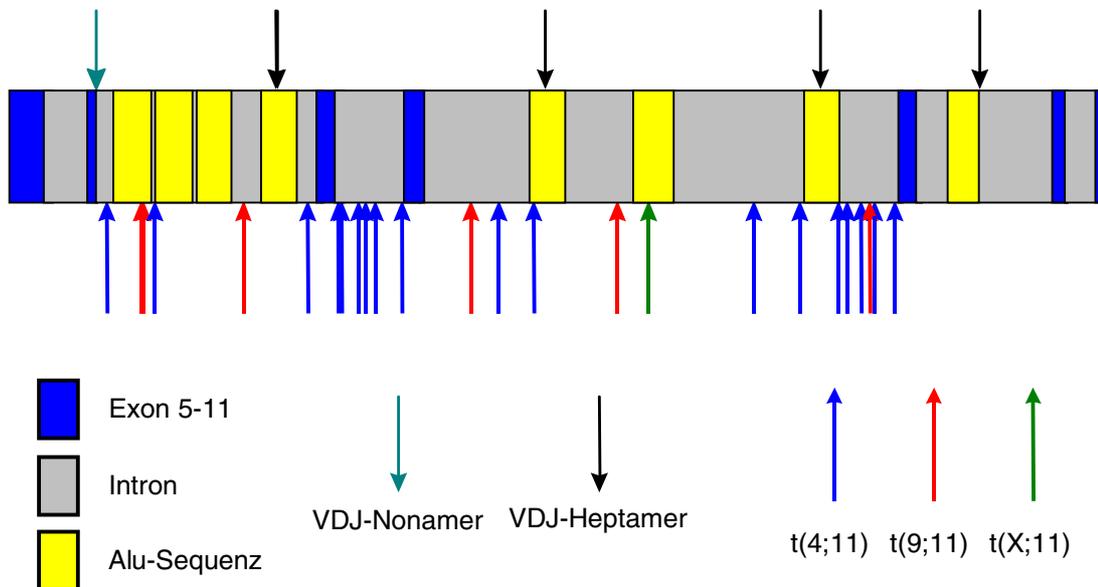


Abbildung 13: Lage der MLL-Bruchpunkte in Relation zu VDJ-Nonamer- und Heptamer-Motiven

Der genaue Abstand jedes genomischen Bruchpunktes zur nächstgelegenen VDJ-Heptamer- oder VDJ-Nonamer-Sequenz ist in Tabelle 3 dargestellt. Der minimale Abstand eines genomischen Bruchpunktes des MLL-Gens zu einem Heptamer-Motiv beträgt 48 Basenpaare (P7, LC). Der errechnete Erwartungswert des mittleren Abstandes der Bruchpunkte des MLL-Gens zu den Heptamer- bzw. Nonamer-Sequenzmotiven beträgt 399 Basenpaare. Der tatsächliche Mittelwert der Abstände der Bruchpunkte zu dem jeweils nächstgelegenen Heptamer/Nonamer-Motiv beträgt 448 Basenpaare. Ein Zusammenhang zwischen der Verteilung der Bruchpunkte und der Lage der nach stringenten Kriterien erfaßten VDJ-Heptamer- und VDJ-Nonamer-Motive läßt sich nicht zeigen.

5.2.4 Lage und Verteilung von rekombinationsbegünstigenden Sequenzmotiven in den sequenzierten Partnergen-Anteilen

Durch die Direktsequenzierung über den Fusionspunkt zwischen MLL-Gen und Partnergen erhält man neben der exakten Lage des genomischen Bruchpunktes innerhalb des MLL-Gens auch Sequenzdaten aus der an den Bruchpunkt angrenzenden Region des Partnergens. Diese wurden auf die oben beschriebenen evtl. rekombinationsbegünstigenden Sequenzmotive hin untersucht. Eine weitergehende statistische Analyse wurde nicht durchgeführt, da von den Partnergenen nur Teilsequenzen in unterschiedlicher Länge zur Verfügung standen.

5.2.4.1 Topoisomerase II-Erkennungssequenzen

Bei der Analyse der Partnergen-Anteile im Hinblick auf Vorkommen und Lage von Topoisomerase-II-Konsensus-Sequenzen wurden die bereits oben beschriebenen stringenten Kriterien angewandt. So ließen sich bei 3 der 18 Proben mit Translokation t(4;11) im AF4-Anteil des Fusionsproduktes Topoisomerase-II-Erkennungssequenzen nachweisen. Bei 2 der 18 Proben mit Translokation t(4;11) entstand eine solche Erkennungssequenz durch die Fusion des MLL-Gens mit dem AF4-Gen. Bei einer der 6 Proben mit Translokation t(9;11) fand sich eine Topoisomerase-II-Erkennungssequenz im AF9-Anteil des Fusionsgens (Tabelle 13).

Tabelle 13: Topoisomerase-II-Erkennungssequenzen in Partnergenanteilen

Probe	Name	Partnergen	Abstand Bp	sense	antisense
P7	LC	AF4	2	7	9
P7	LC	AF4	182	10	7
P9	JT	AF4	125	9	5
P13	KU	AF4	7	5	9
P15	WE	AF4	133	6	10
P22	CO	AF9	49	9	5

Angegeben ist neben dem Abstand vom Fusionspunkt die Homologie der Konsensussequenz zu den DNA-Strängen (sense/antisense). Berücksichtigt wurden dabei nur die Non-N-Positionen. Hervorgehoben sind die Proben LC und KU, bei denen eine Topoisomerase-II-Erkennungssequenz den genomischen Fusionspunkt überspannt.

5.2.4.2 VDJ-Rekombinase-Erkennungssequenzen

Wie schon bei der Analyse der MLL-Bruchpunkt-Region wurden bei der Analyse der Partnergen-Anteile keine Basenfehlpaarungen in den VDJ-Heptamer- und VDJ-Nonamer-Motiven zugelassen. Es fand sich bei nur einer Probe mit Translokation t(4;11) (P19, PI) ein VDJ-Heptamer-Motiv im AF4-Anteil des Fusionsgens. Ebenfalls lies sich bei nur einer Probe mit Translokation t(9;11) ein VDJ-Heptamer nachweisen (Probe 25, VS) (Tabelle 14). VDJ-Nonamer-Sequenzen fanden sich bei keiner der analysierten Proben.

Tabelle 14: VDJ-Heptamer-Motive in Partnergenanteilen

Probe	Name	Gen	Abstand Bp	sense/antisense
P19	PI	AF4	13	sense
P25	VS	AF9	279	sense

Angegeben ist neben dem Abstand vom Fusionspunkt die Ausrichtung (sense/antisense) des jeweiligen Motivs.

6 Diskussion

6.1 Entwicklung einer Methode zur Ermittlung der Sequenz chromosomaler Bruchpunkte bei MLL-Gen-Aberrationen

Da die Bruchpunkte bei chromosomalen Translokationen in sehr großen, meist unbekanntem, Abschnitten des Genoms liegen können, sind sie einer direkten Sequenzierung zunächst nicht zugänglich. Um eine größere Zahl von MLL-Gen-Aberrationen untersuchen zu können, mußte deshalb ein Verfahren entwickelt werden, das die schrittweise Eingrenzung der Bruchpunktlokalisation bis hin zur DNA-Sequenzierung zuverlässig und mit vertretbarem technischen Aufwand erlaubt. Hierbei wurden gezielt bekannte Charakteristika von MLL-Gen-Aberrationen und bereits verfügbare probenspezifische Vorinformationen genutzt.

6.1.1 Auf der Polymerase-Kettenreaktion basierende Verfahren zur Amplifikation bruchpunktüberspannender DNA-Fragmente

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stellt ein technisch einfaches, hochspezifisches und sehr empfindliches Verfahren zur in vitro Vermehrung definierter DNA-Fragmente dar. Sie ist deshalb grundsätzlich geeignet, auch bei chromosomalen Translokationen bruchpunktüberspannende DNA-Fragmente zu amplifizieren. Ihr Einsatz ist jedoch an die Kenntnis von Teilen der Zielsequenz gebunden, in denen die Starteroligonukleotide (Primer) positioniert werden können. Außerdem ist die maximal amplifizierbare Fragmentlänge begrenzt. Mit Hilfe verschiedener Modifikationen des PCR-Reaktionsablaufs lassen sich die Einsatzmöglichkeiten zur Amplifikation chromosomaler Bruchpunkte deutlich erweitern und die systembedingten Einschränkungen zumindest teilweise überwinden.

6.1.1.1 Direkte Amplifikation eines Bruchpunktareals bei MLL-Gen-Aberrationen mittels Long-PCR

In dieser Arbeit wurde ein Nested-Long-PCR Protokoll verwendet, um die bruchpunktüberspannenden Abschnitte der Fusionsgene aus MLL und einem Partnergen direkt zu amplifizieren. Das Long-PCR Protokoll erlaubt die Amplifikation besonders langer DNA-Fragmente von über 20 kb. Für diese direkte Amplifikation eines Fusionsgens bei MLL-Gen-Aberrationen muß das jeweilige Partnergen bekannt sein und die zur Auswahl der PCR-

Primer erforderlichen Teilsequenzen müssen vorliegen. Der Nachweis einer MLL-Gen-Aberration mit dem jeweils beteiligten Partnergen war durch das onkogenetische Referenzlabor (Leiter Prof. Dr. Harbott) der BFM-Studiengruppe im Rahmen der zytogenetischen- und molekulargenetischen Leukämie-Initialdiagnostik erfolgt. Damit war auch die Sequenz der chimären mRNAs in vielen Fällen bekannt, wodurch sich der DNA-Bruchpunkt auf wenige Introns eingrenzen ließ. Die mRNA-Sequenzen vieler potentieller MLL-Partnergene sind mittlerweile verfügbar, ein Partnergen auf dem X-Chromosom wurde in unserem Labor sequenziert. Anhand dieser mRNA-Sequenzen wurden spezifische PCR-Primer ausgewählt, die eine Long-PCR-Amplifikation chimärer Genabschnitte, d.h. der Intronabschnitte mit potentiellen Bruchpunkten, erlaubten. Abgesehen von diesen Einschränkungen ermöglicht die direkte PCR-Amplifikation eine sehr effiziente Bearbeitung größerer Probenzahlen in kurzer Zeit. So konnten die Fusionsgene von insgesamt 18 Proben mit der Rekombination MLL/AF4, von 6 Proben mit der Rekombination MLL/AF9 und von einer Probe mit der Rekombination MLL/AFX amplifiziert werden. Bei einer Probe mit MLL/AF4 sowie bei 3 Proben mit MLL/AF9 gelang die Amplifikation nicht. Bei unbekanntem Partnergen können andere, in der Literatur beschriebene Methoden zur Amplifikation des Bruchpunktareals herangezogen werden. Diese werden in den folgenden beiden Kapiteln kurz beschrieben.

6.1.1.2 Panhandle-PCR

Die Panhandle-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient zur Amplifikation genomischer DNA-Abschnitte mit bekannter 5'-DNA-Sequenz und unbekannter 3'-DNA-Sequenz (121;122). Sie eignet sich damit zur Amplifikation von durch Translokation entstandenen Fusionsgenen aus einem 5'-MLL-Anteil und einem unbekanntem 3'-Partnergenanteil.

Zunächst wird dazu hochmolekulare DNA mit einem einen 5'-Überhang erzeugenden Restriktionsenzym verdaut. Hierzu eignet sich besonders das Enzym BamH1, da nahezu alle genomischen MLL-Bruchpunkte innerhalb des bekannten 8,3 kb langen BamH1-Restriktionsfragmentes des MLL-Gens liegen. Es entstehen Restriktionsfragmente, deren 5'-Ende aus bekannter MLL-DNA-Sequenz besteht, während das 3'-Ende unbekannte Partner-Gen-DNA-Sequenz enthält. Im nächsten Schritt wird ein zum 5'-Ende (Exon 5)

der MLL-Bruchpunktregion komplementäres Oligonukleotid an das 3'-Ende der Restriktionsfragmente ligiert. Nach Strangtrennung durch Hitzedenaturierung kann sich das nun am 3'-Ende des Plusstranges befindliche Oligonukleotid an seine komplementäre Region am 5'-Ende des Restriktionsfragmentes anlagern. Danach wird das 3'-Ende mittels einer DNA-Polymerase MLL-komplementär verlängert. Es entsteht ein aus MLL-Anteilen bestehender Doppelstranganteil (Handle) mit einer Einzelstrang-Schleife (Pan), die den Übergang von MLL in die Partnergenesequenz und damit den gesuchten MLL-Bruchpunkt beinhaltet. Diese schematische Struktur ist für dieses Verfahren namensgebend. Die Amplifikation des Fusionspunktes zwischen MLL und Partnergen erfolgt dann mittels PCR (Panhandle-PCR). Die Amplifikation ergibt ein 8,3 Kilobasen langes PCR-Produkt des BamH1-Fragmentes der normalen unrearrangierten MLL-Bruchpunktregion (wt 11) und ein PCR Produkt, das den gesuchten Fusionspunkt zwischen MLL-Gen und Partnergen enthält (der 11). Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Aufreinigung steht dieses für eine weitere Post-PCR-Analyse zur Verfügung (123).

Felix et.al. (124) und Megonigal et.al. (125) konnten so bei 3 Patienten mit MLL-Rekombination mit einem unbekanntem Partnergen nach Klonierung des Panhandle-PCR-Produktes den Fusionspunkt zwischen MLL-Gen und dem Partnergen sequenzieren und die Lage des Bruchpunktes innerhalb der Bruchpunkt-Cluster-Region des MLL-Gens bestimmen.

Vorteil dieses Verfahrens ist die völlige Unabhängigkeit vom jeweiligen Partnergen der MLL-Rekombination, da die Primeroligonukleotide allein anhand der bekannten MLL-Sequenz ausgewählt werden. Es werden keine für das jeweilige Partnergen spezifischen Primeroligonukleotide zur Durchführung der Amplifikation benötigt. Die Methode erscheint deshalb geeignet, Bruchpunkte des MLL-Gens zu charakterisieren, auch wenn das jeweilige Partnergen unbekannt ist, bzw. von diesem keinerlei Sequenzdaten vorhanden sind. An seine Grenzen stößt dieses Verfahren, wenn das Restriktionsenzym (hier BamH1) ein Fragment generiert, das aufgrund seiner Länge mittels PCR nicht mehr zu amplifizieren ist. Verbesserung wäre dann evtl. durch Verwendung alternativer Restriktionsenzyme oder durch leistungsfähigere PCR-Techniken, z.B. Long-PCR möglich. Aus dem zusätzlich erforderlichen Ligationsschritt und der parallelen Amplifikation des

normalen MLL-Fragments mit dem bruchpunktüberspannenden Fragment resultiert eine Reduktion der Sensitivität im Vergleich zur direkten PCR-Amplifikation eines einzelnen DNA-Abschnittes.

6.1.1.3 Inverse Polymerase-Ketten-Reaktion (IPCR)

Die inverse PCR ermöglicht wie schon die Panhandle-PCR die Amplifikation von rekombinierten DNA-Abschnitten, bestehend aus einem bekannten Genabschnitt und einem durch Translokation fusioniertem unbekanntem Partnergenabschnitt. Sie lässt sich somit zur Charakterisierung von genomischen Fusionspunkten des MLL-Gens mit verschiedenen Partnergenen einsetzen.

Sie beruht auf einem Restriktionsverdau genomischer DNA mit nachfolgender Religasierung der Restriktionsfragmente zu zirkulären DNA-Abschnitten. Einige "ringförmige" DNA-Abschnitte bestehen dann aus einem MLL-Gen-Anteil und einem Partnergenanteil und beinhalten den gesuchten Fusionspunkt zwischen beiden auf genomischer Ebene. Diese DNA-Fragmente dienen als Ausgangsmaterial (Template) für die inverse Polymerase-Kettenreaktion (IPCR). Aufgrund der zirkulären Form ist eine Amplifikation des DNA-Fragmentes über den genomischen Bruchpunkt hinweg mit gegensätzlich ausgerichteten (inversen) Primeroligonukleotiden möglich, die ausschließlich innerhalb der bekannten Sequenz der MLL-Bruchpunktregion liegen. Die Amplifikation ergibt neben einem PCR-Produkt des normalen unrearrangierten MLL-Gens ein weiteres PCR-Produkt, das den gesuchten genomischen Fusionspunkt enthält. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Aufreinigung steht dieses zur weiteren Analyse zur Verfügung.

Marschalek et. al. konnten nach Klonierung und Sequenzierung des IPCR-Produktes den genomischen Fusionspunkt bei Translokation t(4;11) (q21;q23) der permanenten Leukämie-Zelllinie SEM sequenzieren und die Lage des Bruchpunktes innerhalb der MLL-Bruchpunkt-Cluster-Region charakterisieren (126).

Das Verfahren kann nur funktionieren, wenn die entstehenden zirkulären bruchpunktüberspannenden DNA-Moleküle die mit der PCR bzw. Long-PCR amplifizierbare Größe nicht überschreiten. Deshalb werden in der Regel mehrere Restriktionsenzyme in parallelen Ansätzen eingesetzt. Wie bei der

Panhandle-PCR resultiert aus der Coamplifikation des bruchpunkttragenden Fragments mit dem normalen MLL-Genabschnitt, sowie aus der Notwendigkeit einer Ligasereaktion, im Vergleich zur einfachen PCR-Reaktion eine Sensitivitätseinbuße.

6.1.2 Analyse der bruchpunktüberspannenden Long-PCR-Produkte

Die erhaltenen bruchpunktüberspannenden Amplifikate müssen nach der PCR-Reaktion weiter analysiert werden, um die Nukleinsäuresequenz im Bereich des Bruchpunktes zu erhalten. Aufgrund ihrer Größe von mehreren Tausend Nukleotiden und der mit einer einzelnen Sequenzierreaktion maximal erfaßbaren Zahl von etwa 500 bis 1000 Basen wären mehrere Sequenzreaktionen erforderlich, um den Bruchpunkt sicher zu erfassen. Deshalb wurde ein auf einer hochauflösenden Fragmentlängenanalyse basierendes Verfahren entwickelt, das mit geringem Aufwand eine Eingrenzung der Lage des Bruchpunktes auf wenige hundert Basenpaare erlaubt, um dann idealerweise mit nur einer einzigen Sequenzierreaktion die Bruchpunktsequenz ermitteln zu können.

6.1.2.1 Hochauflösende DNA-Fragmentlängenanalyse

Die PCR-Produkte der MLL-Bruchpunktregion und des jeweiligen Fusionsgens wurden nach einem Restriktionsverdau fluoreszenzmarkiert. Hierzu eignete sich die Markierung mit Fluorescein-dUTP am besten, welches mittels einer Taq-Polymerase-Reaktion an die 3'-Enden der Restriktionsfragmente angebunden wurde. Nach hochauflösender Acrylamidgelelektrophorese im Sequenzierautomaten erhielt man so ein spezifisches Restriktionsmuster der MLL-Bruchpunktregion bzw. eines Fusionsgens. Die Verwendung der Taq-Polymerase zum Einbau fluoreszenzmarkierter Nukleotide war dabei entscheidend, um von den einzelnen Restriktionsfragmenten charakteristische Signalmuster zu erhalten. Ursache hierfür ist die variable aber für die einzelnen Restriktionsfragmente sehr gut reproduzierbare Effizienz des Enzyms für den Einbau modifizierter (fluoreszenzmarkierter) Nukleotide und die Addition ungepaarter Basen an DNA-Fragmente (117;118). Durch Vergleich des Restriktionsmusters des Fusionsgens mit einer MLL-Restriktionskarte ließen sich die Fusionspunkte bis auf wenige hundert Basenpaare eingrenzen, ein

Bereich, der sich in der Regel mit einer einzigen Sequenzierreaktion erfassen läßt. Ohne Eingrenzung des Bruchpunktes müßte bei jeder zu untersuchenden Probe die schrittweise oder in mehreren Reaktionen parallel durchgeführte Sequenzierung von evtl. einigen tausend Basenpaaren bis über den genomischen Fusionspunkt hinweg erfolgen.

Die in dieser Arbeit dargestellte Bruchpunkteingrenzung mittels hochauflösender Fragmentlängenanalyse und nachfolgender Direktsequenzierung des Bruchpunktes ist grundsätzlich unabhängig von der Technik, mit der die PCR-Produkte generiert werden. Sie läßt sich somit auch mit der Panhandle-PCR und der Inversen-PCR kombinieren. Prinzipiell ist die dargestellte Technik der hochauflösenden Restriktionsfragmentlängenanalyse zur Eingrenzung genomischer Bruchpunkte nicht auf MLL-Rekombinationen beschränkt, vorausgesetzt, die Sequenz der Region potentieller Bruchpunkte von mindestens einem der beiden Rekombinationspartner ist bekannt.

6.1.2.2 Direktsequenzierung des genomischen Bruchpunktes

Nach Eingrenzung des Bruchpunktes mittels hochauflösender Fragmentlängenanalyse erfolgte die direkte Sequenzierung des Fusionspunktes zwischen MLL-Gen und dem jeweiligen Partnergen. Durch die Direktsequenzierung des PCR-Produktes wurde eine Klonierung vermieden. Diese würde neben dem höheren technischen und zeitlichen Aufwand ein nach der Gentechnik-Verordnung zugelassenes Labor der Sicherheitsstufe 1 (S1-Labor) verlangen. Ohne Klonierung erfordert das gesamte Verfahren nicht die Zulassung nach der Gentechnikverordnung.

6.2 Nutzung der genomischen MLL-Bruchpunktsequenzen für klinische Fragestellungen

Die Lage des durch eine Translokation entstandenen genomischen Bruchpunktes auf DNA-Ebene in der MLL-Bruchpunktregion und die Sequenzdaten um den Bereich des Fusionspunktes des MLL-Gens mit seinem jeweiligen Partnergen sind spezifisch für den jeweiligen malignen Zellklon. Sequenziert man aus vom Patienten gewonnenen Material (Knochenmark) bei der Erstdiagnose der Leukämie den genomischen Fusionspunkt zwischen MLL-Gen und Partnergen, so erhält man einen für den Patienten hochspezifischen klonalen Marker seines leukämischen Zellklons. Die gewonnenen Bruchpunktsequenzen ermöglichen die Auswahl individueller patientenspezifischer PCR-Primeroligonukleotide. Mit diesen läßt sich dann mit einer einfachen PCR-Reaktion jede weitere aus peripherem Blut oder Knochenmark gewonnene Patientenprobe auf leukämische Blasten hin untersuchen.

6.2.1 Diagnostik der „minimalen Resterkrankung“ (MRD-Diagnostik)

Die MRD-Diagnostik dient dem Nachweis maligner Zellen im Knochenmark von Patienten mit MLL-Rekombination und akuter Leukämie im Verlauf der Therapie. Mit ihr können leukämische Blasten auch dann noch nachweisbar sein, wenn sich der Patient klinisch in kompletter hämatologischer Remission befindet. Sie eignet sich damit zu einer genaueren Beurteilung des Ansprechens der Leukämie auf die Therapie. Die MRD-Diagnostik bei Patienten mit einer Translokation t(4;11) oder t(9;11) basiert bisher im wesentlichen auf dem Nachweis von chimären MLL/AF4- bzw. MLL/AF9-mRNA-Fusionstranskripten mittels Reverser-Transkriptase-PCR (32;127-129). Das Ergebnis der RT-PCR kann wegen der instabilen RNA-Moleküle unter ungünstigen Lagerungsbedingungen durch eine schlechte Probenqualität beeinflusst werden. Ruhende Zellen, die möglicherweise keine Fusionstranskripte exprimieren, werden durch die RT-PCR gar nicht erfaßt (119;130).

Interessanterweise konnten mittels nested-RT-PCR MLL/AF4-Fusionstranskripte auch in gesunden hämatopoetischen Zellen nachgewiesen werden. Diese Berichte von Uckun et al. (131) konnten jedoch bisher von keiner Arbeitsgruppe reproduziert werden und stehen im

Widerspruch zu den Daten anderer Gruppen (132;133). Es ist deshalb nicht auszuschließen, daß die von Uckun et al. publizierten positiven RT-PCR Befunde bezüglich der aus einer Translokation t(4;11) resultierenden chimären mRNAs in fetalem Gewebe artifizielle Resultate darstellen, wie sie bei partiell degradierter RNA durch partielle Überlappung von Fragmenten beider Gene in der PCR-Reaktion entstehen können. Eine Analyse der Bruchpunktsequenzen auf DNA-Ebene könnte diese Frage klären. Schließlich sollte die Verwendung eines stabilen DNA-Markers in der MRD-Diagnostik auch eine im Vergleich zu RNA-basierenden Verfahren exaktere Quantifizierung positiver Zellen ermöglichen, da jede Zelle genau eine Kopie des Markers trägt.

6.2.2 Retrospektiver Nachweis leukämischer Blasten

Nach Bestimmung des genomischen Bruchpunktes aus DNA von Patientenmaterial und nach Auswahl patientenspezifischer Primeroligonukleotide anhand der Bruchpunktsequenz können mittels einfacher PCR-Reaktion leukämische Blasten auch in Material nachgewiesen werden, das lange Zeit unter schlechten Bedingungen gelagert wurde. So gelang mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methode der Nachweis von MLL/AF4-positiven Leukämiezellen auf Guthrie-Test-Karten des Neugeborenenenscreenings von Kindern, die im Alter von 5 Monaten bis zu 2 Jahren an einer akuten Leukämie erkrankten. Dies wurde als stringenter Hinweis auf eine schon intrauterin erworbene Translokation als Ursache der malignen Transformation gewertet (59).

6.3 Analyse der Bruchpunktsequenzen von Knochenmarksproben mit MLL-Gen-Aberrationen

Ziel der Analyse genomischer Bruchpunktsequenzen von MLL-Gen-Aberrationen war es, durch Vergleich ihrer Lokalisation und Sequenzmuster Hinweise auf mögliche ursächliche Mechanismen zu erhalten. Der relativ geringe Aufwand des zur Bruchpunktsequenzierung eingesetzten oben beschriebenen Verfahrens ermöglichte die Analyse einer größeren Zahl von Proben. Mit den erhaltenen Ergebnissen wurden zunächst die von verschiedenen Autoren bisher beschriebenen und meist nur auf der Charakterisierung einzelner Proben basierenden Hypothesen zum translokationsauslösenden Mechanismus bei MLL-Gen-Aberrationen evaluiert.

6.3.1 Verteilung genomischer Bruchpunkte innerhalb des MLL-Gens

Ausgehend von der Basishypothese, daß MLL-Gen-Aberrationen durch einen spezifischen Mechanismus verursacht werden, wäre zu erwarten, daß Ihre Verteilung von einer Zufallsverteilung abweicht. Aus diesem Grund wurde zunächst die Lokalisation der sequenzierten Bruchpunkte innerhalb der bekannten Bruchpunkt-Cluster-Region des MLL-Gens in verschiedenen klinisch definierten Gruppenzuordnungen analysiert. Dabei stellt die Konzentration bisher beschriebener MLL-Gen-Bruchpunkte auf einen Bereich von etwa 8000 Basen bereits eine eindeutige Abweichung von einer Zufallsverteilung dar. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß nur funktionell aktive Translokationen zu einer klonalen Proliferation hämatopoetischer Stammzellen führen und schließlich in Leukämiezellen nachgewiesen werden können. Die Konzentration der MLL-Bruchpunkte in einem zentralen Abschnitt dieses Gens kann somit als Ausdruck einer „biologischen Vorauswahl“ gedeutet werden. Deshalb erscheint es legitim, die Verteilungsanalyse der sequenzierten Bruchpunkte nur auf diesen „leukämierlevanten“ Bereich zu konzentrieren, innerhalb dessen eine biologische Selektion einzelner Bereiche nach dem derzeitigen Kenntnisstand als unwahrscheinlich anzusehen ist (35).

6.3.1.1 Verteilung genomischer Bruchpunkte bei Patienten mit primärer de-novo Leukämie

Strissel Broeker et. al. unterteilten die MLL-Bruchpunktregion in eine centromerwärts gelegene 5´-Hälfte und in eine telomerwärts gelegene 3´-Hälfte. Sie untersuchten die Verteilung der MLL-Bruchpunkte von 31 Patienten mit primärer (de novo) akuter Leukämie auf diese beiden Hälften mittels Southern-Blot-Analyse. Dabei fanden sie eine im Chi-Quadrat-Test signifikante Häufung von 23 (74%) Bruchpunkten in der 5´-Region, nur 8 (26%) der 31 Bruchpunkte lagen in der 3´-Region (120). In einer ähnlichen Analyse fanden Giuseppe Cimino et. al. bei 24 Patienten 16 (66%) Bruchpunkte in der 5´-Hälfte und 8 (33%) Bruchpunkte in der 3´-Hälfte der MLL-Bruchpunktregion (134). Beide Arbeitsgruppen schlossen daraus, daß das MLL-Gen bei primären (de novo) akuten Leukämien bevorzugt in der centromerwärts gelegenen 5´-Region der MLL-Bruchpunktregion bricht. Eine detailliertere Aussage über die Verteilung der MLL-Bruchpunkte war aufgrund der geringen Auflösung der bei diesen Untersuchungen angewandten Southern-Blot-Methode nicht möglich.

Die in dieser Arbeit analysierten 25 Proben aus primären Leukämien zeigen ein anderes Verteilungsmuster der Bruchpunkte. 15 (60%) der Bruchpunkte fallen in die von Strissel Broeker definierte centromere Hälfte, 10 (40%) der Bruchpunkte finden sich in der telomeren Hälfte der MLL-Bruchpunktregion. Im Chi-Quadrat-Test zeigt sich keine signifikante Abweichung von einer Gleichverteilung der Bruchpunkte über die beiden Hälften der MLL-Bruchpunktregion ($p=0,32$). Auch bei Betrachtung der Untergruppe der 18 Proben mit Translokation $t(4;11)$ zeigt sich keine Abweichung von einer Gleichverteilung ($p=0,35$).

Die Sequenzierung der einzelnen genomischen Bruchpunkte ermöglicht die genaue Betrachtung der Verteilung. In der graphischen Übersicht (Abb. 5; Abb. 8) zeigt sich eine Clusterbildung von Bruchpunkten in Intron 7 zwischen Exon 7 und 8 sowie in Intron 8 unmittelbar vor Exon 9 der Bruchpunktregion. In Intron 9 und 10 sind keine genomischen Bruchpunkte nachweisbar. Bei Einteilung der MLL-Bruchpunktregion in 8 gleiche, etwa 1000 Basenpaare lange Abschnitte zeigt sich bei Betrachtung der Untergruppe der Proben mit Translokation $t(4;11)$ eine statistisch signifikante ($p=0,0072$) Abweichung von einer Gleichverteilung mit oben beschriebener Clusterbildung.

6.3.1.2 Verteilung genomischer Bruchpunkte des MLL-Gens bei sekundärer therapieinduzierter akuter Leukämie

Bei Patienten mit sekundärer Leukämie nach Therapie mit Topoisomeraseinhibitoren beschreiben sowohl Strissel et. al. (120) als auch Cimino et. al. (134) eine im Gegensatz zu den primären de-novo-Leukämien eindeutige Häufung der MLL-Bruchpunkte in der 3'-Region der MLL-Bruchpunktregion. Patienten mit sekundärer Leukämie waren in dem von uns untersuchten Kollektiv nicht eingeschlossen.

6.3.1.3 Verteilung genomischer Bruchpunkte des MLL-Gens bei akuter Leukämie im Säuglingsalter

Ein ähnliches Verteilungsmuster der MLL-Bruchpunkte wie bei den sekundären Leukämien beschreiben Cimino et. al. (134) für Bruchpunkte des MLL-Gens bei Patienten mit einer akuten Leukämie des Säuglingsalters. Sie beschreiben eine Häufung von 20 von 28 Bruchpunkten in der telomeren 3'-Hälfte der MLL-Bruchpunktregion.

Aufgrund der Abweichung der Verteilungsmuster bei Patienten mit sekundärer Leukämie und bei Patienten mit einer Leukämie im Säuglingsalter vom Verteilungsmuster bei primären de-novo Leukämien postulieren Strissel et. al. und Cimino et. al. einen gemeinsamen topoisomeraseinduzierten Mechanismus der MLL-Rekombination bei diesen beiden Patientengruppen.

Bei drei der 25 in dieser Arbeit analysierten MLL-Bruchpunkte handelt es sich um Leukämien des Säuglingsalters. 2 der 3 Bruchpunkte finden sich in der telomeren 3'-Hälfte, ein Bruchpunkt findet sich in der centromeren 5'-Hälfte der MLL-Bruchpunktregion. Nähere Aussagen über einen Rekombinationsmechanismus bzw. über die Verteilung der Bruchpunkte waren wegen der zu geringen Probenanzahl nicht möglich.

6.3.2 Assoziation zwischen MLL-Bruchpunkten und Alu-repetitiven Elementen

Alu-repetitive Elemente treten innerhalb der MLL-Bruchpunkt-Region in hoher Dichte auf. Die 8 beobachteten Alu-Sequenzen machen in ihrer Summe insgesamt 2367 (28,4%) der 8342 Basenpaare langen MLL-

Bruchpunktregion aus. Von den 25 in dieser Arbeit charakterisierten Bruchpunkte des MLL-Gens fallen lediglich 6 (24%) in ein solches Alu-repetitives Element. Eine Häufung von Bruchpunkten des MLL-Gens bei reziproken Translokationen in Alu-Elementen ist nicht zu beobachten. Gu et. al. (62) beschreiben die Lage der genomischen Bruchpunkte innerhalb der MLL-Bruchpunktregion bei insgesamt 10 Proben mit verschiedenen MLL-Rekombinationen. Bei 5 dieser 10 Proben findet sich der genomische Bruchpunkt innerhalb eines Alu-Elementes. Allerdings beinhalten nur 6 der 10 Proben eine reziproke Translokation des MLL-Gens und bei nur 2 (33%) dieser 6 Proben fällt der Bruchpunkte in ein Alu-repetitives Element. Bei den anderen 4 von Gu et. al. beschriebenen Rekombinationen handelt es sich um partielle Deletionen bzw. um partielle Duplikationen des MLL-Gens. Bei partiellen Duplikationen wird eine Beteiligung Alu-repetitiver Elemente am Rekombinationsmechanismus von anderen Arbeitsgruppen postuliert (80;82;135). Bei der reziproken Translokation des MLL-Gens mit verschiedenen Partnergenen kann ein solcher Zusammenhang nicht belegt werden.

6.3.3 Der Erwartungswert des mittleren Abstandes zwischen verschiedenen Sequenzmotiven und MLL-Bruchpunkten

Die Lage der Bruchpunkte der in dieser Arbeit vorgestellten 25 Proben wurden mit der Lage der Topoisomerase-Erkennungssequenzen und der VDJ-Rekombinase-Sequenzen verglichen. Zusammen mit dem Institut für Biomathematik der Justus-Liebig-Universität Gießen (Dr. Pabst) wurde ein näherungsweise Berechnungsverfahren entwickelt, mit dem eine Objektivierung des Vergleichs möglich sein sollte. Dazu wurde ein Erwartungswert des mittleren Abstandes der Bruchpunkte zu dem jeweils benachbarten Sequenzmotiv für den Fall einer vom Sequenzmotiv unabhängigen Verteilung der Bruchpunkte berechnet und mit dem tatsächlichen Mittelwert der Abstände verglichen. Wäre der tatsächliche Mittelwert der Abstände deutlich kleiner als der berechnete Erwartungswert, so wäre dies ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Lage der Sequenzmotive und Lage der Bruchpunkte.

Dieses Verfahren kann allerdings nur eine näherungsweise Berechnung sein und nur eine Tendenz beschreiben. Einen Zusammenhang zwischen der Lage der Bruchpunkte und Lage der Topoisomerase-Erkennungssequenzen bzw. der VDJ-Heptamere- und -Nonamere läßt sich mit statistischer Signifikanz damit nicht belegen.

6.3.3.1 Räumliche Assoziation zwischen Topoisomerase-Erkennungssequenzen und MLL-Bruchpunkten

Bei Anwendung stringenter Kriterien mit einer Basenhomologie von mindestens 90% (9 der 10 Non-N-Positionen) auf einem Strang und mindestens 50% (5 der 10 Non-N-Positionen) auf dem direkt überlappenden Gegenstrang finden sich 7 Topoisomerase-Erkennungs-Sequenzen in der MLL-Bruchpunktregion. Die einzige Erkennungs-Sequenz mit einer Homologie von 100% (10 der 10 Non-N-Positionen) liegt in Exon 9 des Gens im 3'-Bereich der MLL-Bruchpunktregion (62). Ihre Lage korreliert mit einer Region, die für die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch Topoisomerase-II-Inhibitoren sensitiv ist. Diese Region stellt wahrscheinlich auch *in vivo* eine Topoisomerase-II-Konsensus-Sequenz dar (136).

Mehrere Autoren beschreiben Topoisomerase-Erkennungssequenzen in der unmittelbaren Umgebung von genomischen Bruchpunkten des MLL-Gens. Sie postulieren daraus einen möglichen ursächlichen Zusammenhang zwischen der MLL-Rekombination und einer aberranten Funktion der Topoisomerase II. Sie lassen bei diesen Einzelfallberichten stringente Auswahlkriterien außer acht und lassen auch Motive mit 2 und mehr Abweichungen von der Topoisomerase-Konsensus-Sequenz zu.

So berichten Negrini et. al. (96) von Topoisomerase-Konsensus-Sequenzen mit 80% Übereinstimmung in unmittelbarer Umgebung eines genomischen Bruchpunktes bei einem Patienten mit akuter myeloblastischer Leukämie (AML) und Translokation t(9;11) sowohl im MLL-Gen als auch im AF9-Gen. Domer et. al. (137) beschreiben eine zu 70% (7 von 10 der Non-N-Positionen) zur Topoisomerase-Erkennungssequenz homologe Region in unmittelbarer Nähe eines genomischen Bruchpunktes des MLL-Gens bei einer Translokation t(4;11). Weiterhin berichten Domer et. al. über einen genomischen Bruchpunkt bei einem Patienten mit einer sekundären akuten lymphoblastischen Leukämie (t-ALL) und einer Translokation t(4;11)

(q21;q23) nach einer Therapie mit Etoposid und Doxorubicin. In der unmittelbaren Umgebung des Bruchpunktes wird auf dem MLL-Gen eine Topoisomerase-Erkennungssequenz mit 80% Homologie und auf dem AF4-Gen eine Topoisomerase-Erkennungssequenz mit lediglich 70% Übereinstimmung beschrieben (97).

Wird bei den Bewertungskriterien die Homologie der Konsensus-Sequenz auf dem Gegenstrang aber vernachlässigt, so sind bei Zulassung eines Mismatches (9 von 10 der Non-N-Positionen) insgesamt 11 Topoisomerase-Konsensus-Sequenzhomologe nachweisbar. Bei zwei Mismatchpositionen (8 von 10 der Non-N-Positionen) steigt die Anzahl auf 129, bei Zulassung von drei Mismatches (7 von 10 der Non-N-Positionen) gar auf 703 Topoisomerase-Konsensus-Sequenzhomologe innerhalb der 8342 Basenpaare langen MLL-Bruchpunktregion (62). Schlüsse über den Zusammenhang zwischen der Funktion der Topoisomerase II und der Rekombination des MLL-Gens, wie von o.g. Autoren gezogen, sind unter diesen Bedingungen nicht mehr zulässig.

Der Vergleich der Lage der in dieser Arbeit vorgestellten 25 Bruchpunkte des MLL-Gens mit der Lage der unter stringenten Kriterien ausgewählten Topoisomerase-Erkennungssequenzen zeigte keinen Hinweis auf eine räumliche Assoziation bzw. ursächliche Beteiligung der Topoisomerasefunktion am Mechanismus der MLL-Rekombination bei primären (de novo) akuten Leukämien des Kindesalters.

6.3.3.2 Räumliche Assoziation zwischen VDJ-Rekombinase-Erkennungssequenzen und MLL-Bruchpunkten

VDJ-Rekombinase vermittelte Translokation von Immunglobulingenen oder T-Zell-Rezeptorgen sind an der Entstehung von B- und T-Zell-Neoplasien beteiligt (94;138;139). Gu. et. al. postulieren einen ähnlichen VDJ-Rekombinase vermittelten Mechanismus bei Translokationen des MLL-Gens (95). Sie stützen diese Annahme auf die Beobachtung von VDJ-Heptamer- und Nonamer-Sequenzen in unmittelbarer Umgebung der genomischen Bruchpunkte der beiden Zelllinien MV4;11 und RS4;11. Die beobachteten VDJ-Heptamere wiesen dabei bis zu 2, die VDJ-Nonamere bis zu 3 Basenfehlpaarungen (Mismatches) zu den vollständigen VDJ-Rekombinase-Sequenzen auf.

Bei Analyse der MLL-Bruchpunktregion (62) ließ sich kein vollständiges Heptamer-Spacer-Nonamer-Motiv nachweisen. Bei Anwendung stringenter Kriterien ohne Zulassung von Abweichungen (Mismatches) bei der Suche nach Heptamer- und Nonamer-Motiven fanden sich lediglich vier Heptamere und nur ein Nonamer. Eine Beziehung zur Lage der genomischen Bruchpunkte des MLL-Gens ließ sich bei der Auswertung der in dieser Arbeit untersuchten 25 Proben nicht nachweisen. Auch die genomischen Bruchpunkte der beiden bei Gu. et. al. beschriebenen Zelllinien MV4;11 und RS4;11 zeigen in ihrer unmittelbaren Umgebung keine unter stringenten Kriterien analysierten VDJ-Rekombinase-Motive.

6.3.4 Das DNA-Damage-Repair-Modell

Mit der hier dargestellten Methode der Bruchpunkteingrenzung und -sequenzierung wurden Fusionspunkte des MLL-Gens mit seinem jeweiligen Partnergen dargestellt, der Bruchpunkt des MLL-Gens wurde bestimmt. Mit Hilfe der so gewonnenen Sequenzdaten der genomischen Fusionspunkte und mit der Kenntnis der Lage des genomischen Bruchpunktes des MLL-Gens wurde von Esther Gillert (Lehrstuhl für Genetik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Arbeitsgruppe um Rolf Marschalek) bei 14 Patienten mit Translokation t(4;11) das jeweilige reziproke Translokat amplifiziert und sequenziert. Beide derivativen Fusionsgene eines jeden Patienten wurden dann mit der unarrangierten MLL-Bruchpunkt-Cluster-Region und mit der zuvor von dieser Arbeitsgruppe sequenzierten AF4-Bruchpunktregion (130;140) verglichen. Anhand der so gewonnenen Informationen konnte das zuvor von Martin Reichel et. al. (Lehrstuhl für Genetik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Arbeitsgruppe um Rolf Marschalek) postulierte „DNA-Damage-Repair-Modell“ als Grundlage der chromosomalen Translokation t(4;11) (141) bestätigt werden.

Die Analyse der Feinstruktur der genomischen Fusionspunkte zeigt dabei verschiedene Charakteristika:

- Alle Translokationen sind reziprok aber nicht balanciert.
- In der unmittelbaren Umgebung der Fusionsstellen sowohl des derivativen Chromosoms 11 (der 11) als auch des derivativen Chromosoms 4 (der 4) finden sich oftmals kurze Duplikationen, Deletionen oder Inversionen von Anteilen der unrearrangierten Bruchpunktregionen.
- Bei einigen derivativen Chromosomen finden sich an der Fusionsstelle kurze zusätzliche Extranukleotide, sog. Füll-Fragmente ("filler-DNA-fragments").
- Bei anderen finden sich kurze, 3 bis 4 Basenpaare lange repetitive Sequenzen, (sog. "mini-direct-repeats"), die jeweils an den beiden nichtrearrangierten und am Fusionspunkt eines derivativen Chromosoms nachweisbar sind.

Der Nachweis der Extranukleotide (filler-DNA-Fragmente) und der kurzen repetitiven Sequenzen (mini-direkt-repeats) an den Fusionspunkten weist auf die Beteiligung des sog. "Fehler tolerierenden DNA-Reparaturmechanismus" (Error-prone-repair-Mechanismus, EPR) hin. Bei diesem EPR-Mechanismus handelt es sich um einen DNA-Reparaturmechanismus aus der Gruppe der Toleranzsysteme. Er tritt auf, wenn bei schweren DNA-Schäden die korrekte Reparatur z.B. durch einfachen Austausch einer einzelnen Base oder eines Polynukleotids nicht mehr möglich ist (142;143).

Aus diesen Charakteristiken der Feinstruktur der Fusionspunkte wurde ein Ablauf der Entstehung der Translokation t(4;11) postuliert (144). In den Bruchpunktregionen der beteiligten Gene MLL und AF4 führt eine schwere DNA-Schädigung zu multiplen Einzel- oder Doppelstrangbrüchen. Die reziproke Translokation mit Duplikationen, Deletionen oder Inversionen im Bereich der Fusionspunkte erfolgt dann im Rahmen einer fehlerhaften DNA-Reparatur durch Ligation der freien DNA-Enden.

Hinweise auf eine Beteiligung anderer, evtl. rekombinationsbegünstigender Elemente wie eine aberrante Funktion der VDJ-Rekombinase ergaben sich nicht.

Offen bleibt die Frage nach den Ursachen der DNA-Schädigung im Bereich des MLL-Gens und des AF4-Gens, die nach diesem Modell die Reparaturaktivität und somit letztendlich die chromosomale Translokation verursachen.

Diskutiert wird die Beteiligung verschiedener carcinogener Faktoren wie ionisierende Strahlung, infektiöse Agentien, Chemikalien oder freie Radikale (145). Es konnte gezeigt werden, daß Inhibitoren der Topoisomerase II, wie Epipodophylotoxine, Doppelstrangbrüche in der MLL-Bruchpunktregion induzieren können (136). Eine nachfolgende fehlerhafte Reparatur könnte verantwortlich sein für die Translokation und somit für die maligne Entartung der Zelle. Dieser Mechanismus könnte die Grundlage sein für die Häufung sekundärer therapieinduzierter akuter Leukämien mit MLL-Translokationen nach einer Therapie mit Hemmern des Enzyms Topoisomerase II.

Ebenfalls diskutiert wird die Beteiligung verschiedener Substanzen, die durch Induktion der Apoptose über die Fragmentation von Chromatinstrukturen zu multiplen DNA-Strangbrüchen führen können. Wird der eingeleitete Prozeß des programmierten Zelltodes unterbrochen, so kann die fehlerhafte Reparatur dieser Strangbrüche zur Ausbildung von reziproken Translokationen führen (146). Insgesamt lassen sich mit dem „damage repair Modell“ die charakteristischen Bruchpunktsequenzen der untersuchten t(4;11)-positiven Knochemarkspuren von Kindern mit akuter Leukämie am besten verstehen. Demgegenüber konnten andere in der Literatur beschriebene Hypothesen nicht bestätigt werden.

7 Zusammenfassung

Zur Charakterisierung genomischer Bruchpunkte bei Kindern mit akuter Leukämie und Translokation des MLL-Gens wurde ein Long-PCR-Verfahren etabliert, mit dem sowohl die gesamte MLL-Bruchpunkt-Cluster-Region als auch chimäre Fusionsgene aus MLL-Anteilen und Partnergenanteilen amplifiziert werden konnten. Durch die Entwicklung eines hochauflösenden Fragmentlängenanalyse-Verfahrens konnte der genomische Bruchpunkt innerhalb der chimären Long-PCR-Fragmente bis auf wenige hundert Basenpaare eingegrenzt werden, so daß sich die DNA-Sequenz der Bruchpunktregion in der Regel mit einer einzigen Sequenzierreaktion direkt ermitteln ließ.

Damit war es möglich, bei insgesamt 18 Proben mit einer Translokation $t(4;11)(q21;q23)$, bei 6 Proben mit einer Translokation $t(9;11)(p22;q23)$ und bei einer Probe mit einer Translokation $t(X;11)(q13;q23)$ den genomischen Bruchpunkt innerhalb des MLL-Gens zu sequenzieren.

Die Lage und Verteilung der Bruchpunkte innerhalb der MLL-Bruchpunktregion wurde untersucht. Dabei zeigte sich eine eindeutige Clusterbildung der Bruchpunkte in Intron 7 und am 3'-Ende von Intron 8. Für die Untergruppe der $t(4;11)$ -positiven Proben war diese Clusterbildung statistisch signifikant. In Intron 5, 9 und 10 fanden sich keine Bruchpunkte.

Um eine Beteiligung potentiell rekombinationsfördernder Elemente am Translokationsgeschehen zu untersuchen, wurde die Lage der Bruchpunkte in der MLL-BCR mit der Lage von Alu-repetitiven Elemente, mit der Lage von Topoisomerase-II-Erkennungssequenzen und mit der Lage von VDJ-Heptamer- und VDJ-Nonamer-Sequenzen korreliert. Es zeigte sich kein Hinweis auf eine ursächliche Beteiligung einer aberranten Funktion des Topoisomerase-II- oder des VDJ-Rekombinase-Komplexes. Auch eine räumliche Assoziation zu Alu-Repeats fand sich nicht.

Die Untersuchung der Feinstruktur beider reziproker Fusionsgene (Kooperation mit dem Lehrstuhl für Genetik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg) bei $t(4;11)$ -positiven Proben erbrachte Hinweise auf eine Beteiligung zellulärer DNA-Reparaturmechanismen nach multiplen DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen an der Entstehung der

chromosomalen Translokation t(4;11) („DNA-Damage-Repair-Modell“, Martin Reichel et al., 1998, Esther Gillert et al., 1999).

Neben wichtigen Informationen zur Entstehung leukämie-assoziiierter Chromosomenbrüche stellt die DNA-Bruchpunktsequenz für Leukämiezellen einen hochspezifischen klonalen Marker dar, der sich sehr gut zum sensitiven Nachweis und zur Quantifizierung residueller Leukämiezellen im Rahmen der Diagnostik der minimalen Resterkrankung eignet (MRD-Diagnostik).

8 Literaturverzeichnis

1. Lampert F, Harbott J, Ritterbach J. Chromosome aberrations in acute leukemia in childhood: analysis of 1009 patients. *Klin Padiatr* 1991; 203(4):311-318.
2. Pui CH. Childhood leukemias. *N Engl J Med* 1995; 332(24):1618-1630.
3. Rabbitts TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994; 372:143-149.
4. Croce CM. Role of chromosome translocations in human neoplasia. *Cell* 1987; 49:155-156.
5. Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79:7824-7827.
6. Dalla-Favera R, Martinotti S, Gallo RC, Erikson J, Croce CM. Translocation and rearrangements of the c-myc oncogene locus in human undifferentiated B-cell lymphomas. *Science* 1983; 219:963-967.
7. Hunger SP, Cleary ML. Chimaeric oncoproteins resulting from chromosomal translocations in acute lymphoblastic leukaemia. *Semin Cancer Biol* 1993; 4:387-399.
8. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960; 132:1497-1497.
9. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 243:290-293.
10. Heisterkamp N, Stephenson JR, Groffen J, Hansen PF, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 1983; 306:239-242.
11. Konopka JB, Watanabe SM, Witte ON. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell* 1984; 37:1035-1042.
12. Rowley JD. Rearrangements involving chromosome band 11q23 in acute leukemia. *Seminars in Cancer Biology* 1993; 4:377-385.
13. Canaani E, Nowell PC, Croce CM. Molecular genetics of 11q23 chromosome translocations. *Adv Cancer Res* 1995; 66:213-234.

14. Ziemin-van der Poel S, McCabe NR, Gill HJ, Espinosa R, III, Patel Y, Harden A, Rubinelli P, Smith SD, LeBeau MM, Rowley JD, Diaz MO. Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1991; 88:10735-10739.
15. Gu Y, Nakamura T, Alder H, Prasad R, Canaani O, Cimino G, Croce CM, Canaani E. The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to *Drosophila trithorax*, to the AF4 gene. *Cell* 1992; 71:701-708.
16. Tkachuk DC, Kohler S, Cleary ML. Involvement of a homolog of *Drosophila trithorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* 1992; 71:691-700.
17. Djabali M, Selleri L, Parry P, Bower M, Young BD, Evans GA. A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukaemias. *Nat Genet* 1992; 2(2):113-118.
18. Chen SJ, Zelent A, Tong JH, Yu HQ, Wang ZY, Derre J, Berger R, Waxman S, Chen Z. Rearrangements of the retinoic acid receptor alpha and promyelocytic leukemia zinc finger genes resulting from t(11;17)(q23;q21) in a patient with acute promyelocytic leukemia. *J Clin Invest* 1993; 91(5):2260-2267.
19. Chen Z, Guidez F, Rousselot P, Agadir A, Chen SJ, Wang ZY, Degos L, Zelent A, Waxman S, Chomienne C. PLZF-RAR alpha fusion proteins generated from the variant t(11;17)(q23;q21) translocation in acute promyelocytic leukemia inhibit ligand-dependent transactivation of wild-type retinoic acid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(3):1178-1182.
20. Akao Y, Seto M, Yamamoto K, Iida S, Nakazawa S, Inazawa J, Abe T, Takahashi T, Ueda R. The RCK gene associated with t(11;14) translocation is distinct from the MLL/ALL-1 gene with t(4;11) and t(11;19) translocations. *Cancer Res* 1992; 52(21):6083-6087.
21. Rasio D, Schichman SA, Negrini M, Canaani E, Croce CM. Complete exon structure of the *ALL1* gene. *Cancer Res* 1996; 56(8):1766-1769.
22. Nilson I, Lochner K, Siegler G, Greil J, Beck JD, Fey GH, Marschalek R. Exon/intron structure of the human ALL-1 (MLL) gene involved in translocations to chromosomal region 11q23 and acute leukaemias. *Br J Haematol* 1996; 93:966-972.
23. Bernard OA, Berger R. Molecular Basis of 11q23 rearrangements in hematopoietic malignant proliferation. *Genes Chrom Cancer* 1995; 13:75-85.
24. Morrissey J, Tkachuk DC, Milatovich A, Francke U, Link M, Cleary ML. A serine/proline-rich protein is fused to HRX in t(4;11) acute leukemias. *Blood* 1993; 81(5):1124-1131.

25. Prasad R, Gu Y, Alder H, Nakamura T, Canaani O, Saito H, Huebner K, Gale RP, Nowell PC, Kuriyama K, Miyazaki Y, Croce CM, Canaani E. Cloning of the ALL-1 fusion partner, the AF-6 gene, involved in acute myeloid leukemias with t(6;11) chromosome translocation. *Cancer Res* 1993; 53:5624-5628.
26. Nakamura T, Alder H, Gu Y, Prasad R, Canaani O, Kamada N, Gale RP, Lange B, Crist WM, Nowell PC, Croce CM, Canaani E. 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 U.S.A* 1993; 90:4631-4635.
27. Iida S, Seto M, Yamamoto K, Komatsu H, Tojo A, Asano S, Kamada N, Ariyoshi Y, Takahashi T, Ueda R. MLLT3 gene on chromosome 9p22 involved in t(9;11) leukemia encodes a serine/proline rich protein homologous to MLLT1 on 19p13. *Oncogene* 1993; 8:3085-3092.
28. 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 U.S.A* 1994; 91:12110-12114.
29. Rubnitz JE, Behm FG, Curcio Brint AM, Pinheiro RP, Carroll AJ, Raimondi SC, Shurtleff SA, Downing JR. Molecular analysis of t(11;19) breakpoints in childhood acute leukemias. *Blood* 1996; 87:4804-4808.
30. Borkhardt A, Repp R, Haupt E, Brettreich S, Buchen U, Gossen R, Lampert F. Molecular analysis of MLL-1/AF4 recombination in infant acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1994; 8:549-553.
31. Repp R, Borkhardt A, Haupt E, Kreuder J, Brettreich S, Hammermann J, Nishida K, Harbott J, Lampert F. Detection of four different 11q23 chromosomal abnormalities by multiplex PCR and fluorescence-based automatic DNA fragment analysis. *Leukemia* 1995; 9:210-215.
32. Biondi A, Rambaldi A, Rossi V, Elia L, Caslini C, Basso G, Battista R, Barbui T, Mandelli F, Masera G. Detection of ALL-1/AF4 fusion transcript by reverse transcription-polymerase chain reaction for diagnosis and monitoring of acute leukemias with the t(4;11) translocation. *Blood* 1993; 82(10):2943-2947.
33. Griesinger F, Elfers H, Ludwig WD, Falk M, Rieder H, Harbott J, Lampert F, Heinze B, Hoelzer D, Thiel E. Detection of HRX-FEL fusion transcripts in pre-pre-B-ALL with and without cytogenetic demonstration of t(4;11). *Leukemia* 1994; 8(4):542-548.
34. Hilden JM, Frestedt JL, Moore RO, Heerema NA, Arthur DC, Reaman GH, Kersey JH. Molecular analysis of infant acute lymphoblastic leukemia: MLL gene rearrangement and reverse transcriptase-polymerase chain reaction for t(4;11)(q21;q23). *Blood* 1995; 86:3876-3882.

35. Rubnitz JE, Behm FG, Downing JR. 11q23 rearrangements in acute leukemia. *Leukemia* 1996; 10(1):74-82.
36. Cimino G, Rapanotti MC, Sprovieri T, Elia L. ALL1 gene alterations in acute leukemia: biological and clinical aspects. *Haematologica* 1998; 83:350-357.
37. Raimondi SC. Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993; 81:2237-2251.
38. Pui CH, Frankel LS, Carroll AJ, Raimondi SC, Shuster JJ, Head DR, Crist WM, Land VJ, Pullen DJ, Steuber CP. Clinical characteristics and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(4;11)(q21;q23): a collaborative study of 40 cases. *Blood* 1991; 77(3):440-447.
39. Behm FG, Smith FO, Raimondi SC, Pui CH, Bernstein ID. Human homologue of the rat chondroitin sulfate proteoglycan, NG2, detected by monoclonal antibody 7.1, identifies childhood acute lymphoblastic leukemias with t(4;11)(q21;q23) or t(11;19)(q23;p13) and *MLL* gene rearrangements. *Blood* 1996; 87(3):1134-1139.
40. Thirman MJ, Gill HJ, Burnett RC, Mbangkollo D, McCabe NR, Kobayashi H, Ziemin-van der Poel S, Kaneko Y, Morgan R, Sandberg AA, Chaganti RSK, Larson RA, Le Beau MM, Diaz MO, Rowley JD. Rearrangements of the *MLL* gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *N Engl J Med* 1993; 329:909-914.
41. Pui C-H, Ribeiro RC, Hancock ML, Rivera GK, Evans WE, Raimondi SC, Head DR, Behm FG, Hazem Mahmoud M, Sandlund JT, Crist WM. Acute myeloid leukemia in children treated with epipodophyllotoxins for acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1991; 325:1682-1687.
42. Whitlock JA, Greer JP, Lukens JN. Epipodophyllotoxin-related leukemia: Identification of a new subset of secondary leukemia. *Cancer* 1991; 68:600-604.
43. Hawkins MM, Wilson LM, Stovall MA, Marsden HB, Potok MH, Kingston JE, Chessells JM. Epipodophyllotoxins, alkylating agents, and radiation and risk of secondary leukaemia after childhood cancer. *BMJ* 1992; 304:951-958.
44. Winick NJ, McKenna RW, Shuster JJ, Schneider NR, Borowitz MJ, Bowman WP, Jacaruso D, Kamen BA, Buchanan GR. Secondary acute myeloid leukemia in children with acute lymphoblastic leukemia treated with etoposide. *J Clin Oncol* 1993; 11:209-217.
45. Hunger SP, Tkachuk DC, Amylon MD, Link MP, Carroll AJ, Welborn JL, Willman CL, Cleary ML. HRX involvement in de novo and secondary leukemias with diverse chromosome 11q23 abnormalities. *Blood* 1993; 81:3197-3203.

46. Felix CA, Winick NJ, Negrini M, Bowman WP, Croce CM, Lange BJ. Common region of ALL-1 gene disrupted in epipodophyllotoxin- related secondary acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 1993; 53:2954-2956.
47. Super HJ, McCabe NR, Thirman MJ, Larson RA, Le Beau MM, Pedersen-Bjergaard J, Philip P, Diaz MO, Rowley JD. Rearrangements of the MLL gene in therapy-related acute myeloid leukemia in patients previously treated with agents targeting DNA- topoisomerase II. *Blood* 1993; 82:3705-3711.
48. Bower M, Parry P, Gibbons B, Amess J, Lister TA, Young BD, Evans GA. Human trithorax gene rearrangements in therapy-related acute leukaemia after etoposide treatment. *Leukemia* 1994; 8:226-229.
49. Felix CA, Hosler MR, Winick NJ, Masterson M, Wilson AE, Lange BJ. ALL-1 gene rearrangements in DNA topoisomerase II inhibitor- related leukemia in children. *Blood* 1995; 85:3250-3256.
50. Felix CA. Secondary leukemias induced by topoisomerase-targeted drugs. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400(1-3):233-255.
51. Taki T, Ida K, Bessho F, Hanada R, Kikuchi A, Yamamoto K, Sako M, Tsuchida M, Seto M, Ueda R, Hayashi Y. Frequency and clinical significance of the MLL gene rearrangements in infant acute leukemia. *Leukemia* 1996; 10:1303-1307.
52. Pui CH, Kane JR, Crist WM. Biology and treatment of infant leukemias. *Leukemia* 1995; 9:762-769.
53. Greaves MF. Infant leukaemia biology, aetiology and treatment. *Leukemia* 1996; 10:372-377.
54. Chen CS, Sorensen PH, Domer PH, Reaman GH, Korsmeyer SJ, Heerema NA, Hammond GD, Kersey JH. Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. *Blood* 1993; 81:2386-2393.
55. Pui CH, Behm FG, Downing JR, Hancock ML, Shurtleff SA, Ribeiro RC, Head DR, Mahmoud HH, Sandlund JT, Furman WL. 11q23/MLL rearrangement confers a poor prognosis in infants with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1994; 12:909-915.
56. Heerema NA, Sather HN, Ge J, Arthur DC, Hilden JM, Trigg ME, Reaman GH. Cytogenetic studies of infant acute lymphoblastic leukemia: poor prognosis of infants with t(4;11) - a report of the Children's Cancer Group. *Leukemia* 1999; 13:679-686.

57. Sorensen PH, Chen C-S, Smith FO, Arthur DC, Domer PH, Bernstein ID, Korsmeyer SJ, Hammond GD, Kersey JH. Molecular rearrangements of the MLL gene are present in most cases of infant acute myeloid leukemia and are strongly correlated with monocytic or myelomonocytic phenotypes. *J Clin Invest* 1994; 93:429-437.
58. Ford AM, Ridge SA, Cabrera ME, Mahmoud H, Steel CM, Chan LC, Greaves M. In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. *Nature* 1993; 363:358-360.
59. Gale KB, Ford AM, Repp R, Borkhardt A, Keller C, Eden OB, Greaves MF. Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:13950-13954.
60. Ford AM, Pombo-de-Oliveira MS, McCarthy KP, MacLean JM, Carrico KC, Vincent RF, Greaves M. Monoclonal origin of concordant T-cell malignancy in identical twins. *Blood* 1997; 89:281-285.
61. Marschalek R, Nilson I, Lochner K, Greim R, Siegler G, Greil J, Beck JD, Fey GH. The structure of the human ALL-1/MLL/HRX gene. *Leuk Lymphoma* 1997; 27(5-6):417-428.
62. Gu Y, Alder H, Nakamura T, Schichman SA, Prasad R, Canaani O, Saito H, Croce CM, Canaani E. Sequence analysis of the breakpoint cluster region in the ALL-1 gene involved in acute leukemia. *Cancer Res* 1994; 54:2327-2330.
63. Jelinek WR, Toomey TP, Leinwand L, Duncan CH, Biro PA, Choudary PV, Weissman SM, Rubin CM, Houck CM, Deininger PL, Schmid CW. Ubiquitous, interspersed repeated sequences in mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77:1398-1402.
64. Schmid CW. Alu: structure, origin, evolution, significance and function of one-tenth of human DNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1996; 53:283-319.
65. Schmid CW, Jelinek WR. The Alu family of dispersed repetitive sequences. *Science* 1982; 216:1065-1070.
66. Jurka J, Milosavljevic A. Reconstruction and analysis of human Alu genes. *J Mol Evol* 1991; 32:105-121.
67. Batzer MA, Deininger PL, Hellmann-Blumberg U, Jurka J, Labuda D, Rubin CM, Schmid CW, Zietkiewicz E, Zuckerkandl E. Standardized nomenclature for Alu repeats. *J Mol Evol* 1996; 42:3-6.
68. Lehrman MA, Russell DW, Goldstein JL, Brown MS. Exon-Alu recombination deletes 5 kilobases from the low density lipoprotein receptor gene, producing a null phenotype in familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83:3679-3683.

69. Lehrman MA, Goldstein JL, Russell DW, Brown MS. Duplication of seven exons in LDL receptor gene caused by Alu-Alu recombination in a subject with familial hypercholesterolemia. *Cell* 1987; 48:827-835.
70. Markert ML, Hutton JJ, Wiginton DA, States JC, Kaufman RE. Adenosine deaminase (ADA) deficiency due to deletion of the ADA gene promoter and first exon by homologous recombination between two Alu elements. *J Clin Invest* 1988; 81:1323-1327.
71. Devlin RH, Deeb S, Brunzell J, Hayden MR. Partial gene duplication involving exon-Alu interchange results in lipoprotein lipase deficiency. *Am J Hum Genet* 1990; 46:112-119.
72. Huang LS, Ripps ME, Korman SH, Deckelbaum RJ, Breslow JL. Hypobetalipoproteinemia due to an apolipoprotein B gene exon 21 deletion derived by Alu-Alu recombination. *J Biol Chem* 1989; 264:11394-11400.
73. Li L, Bray PF. Homologous recombination among three intragene Alu sequences causes an inversion-deletion resulting in the hereditary bleeding disorder Glanzmann thrombasthenia. *Am J Hum Genet* 1993; 53:140-149.
74. Nystrom-Lahti M, Kristo P, Nicolaidis NC, Chang SY, Aaltonen LA, Moisio AL, Jarvinen HJ, Mecklin JP, Kinzler KW, Vogelstein B. Founding mutations and Alu-mediated recombination in hereditary colon cancer. *Nat Med* 1995; 1:1203-1206.
75. Puget N, Torchard D, Serova-Sinilnikova OM, Lynch HT, Feunteun J, Lenoir GM, Mazoyer S. A 1-kb Alu-mediated germ-line deletion removing BRCA1 exon 17. *Cancer Res* 1997; 57:828-831.
76. Chissoe SL, Bodenteich A, Wang YF, Wang YP, Burian D, Clifton SW, Crabtree J, Freeman A, Iyer K, Jian L. Sequence and analysis of the human ABL gene, the BCR gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. *Genomics* 1995; 27:67-82.
77. Chen SJ, Chen Z, d'Auriol L, Le Coniat M, Grausz D, Berger R. Ph1+bcr- acute leukemias: implication of Alu sequences in a chromosomal translocation occurring in the new cluster region within the BCR gene. *Oncogene* 1989; 4:195-202.
78. Chen SJ, Chen Z, Font MP, d'Auriol L, Larsen CJ, Berger R. Structural alterations of the BCR and ABL genes in Ph1 positive acute leukemias with rearrangements in the BCR gene first intron: further evidence implicating Alu sequences in the chromosome translocation. *Nucleic Acids Res* 1989; 17:7631-7642.
79. Jeffs AR, Benjes SM, Smith TL, Sowerby SJ, Morris CM. The BCR gene recombines preferentially with Alu elements in complex BCR-ABL translocations of chronic myeloid leukaemia. *Hum Mol Genet* 1998; 7:767-776.

80. Schichman SA, Caligiuri MA, Strout MP, Carter SL, Gu Y, Canaani E, Bloomfield CD, Croce CM. ALL-1 tandem duplication in acute myeloid leukemia with a normal karyotype involves homologous recombination between Alu elements. *Cancer Res* 1994; 54:4277-4280.
81. So CW, Ma ZG, Price CM, Dong S, Chen SJ, Gu LJ, So CK, Wiedemann LM, Chan LC. MLL self fusion mediated by Alu repeat homologous recombination and prognosis of AML-M4/M5 subtypes. *Cancer Res* 1997; 57:117-122.
82. Strout MP, Marcucci G, Bloomfield CD, Caligiuri MA. The partial tandem duplication of ALL1 (MLL) is consistently generated by Alu-mediated homologous recombination in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:2390-2395.
83. Epstein RJ. Topoisomerases in human disease. *Lancet* 1988; 1:521-524.
84. Spitzner JR, Muller MT. A consensus sequence for cleavage by vertebrate DNA topoisomerase II. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:5533-5556.
85. Ebert SN, Shtrom SS, Muller MT. Topoisomerase II cleavage of herpes simplex virus type 1 DNA in vivo is replication dependent. *J Virol* 1990; 64:4059-4066.
86. Ross W, Rowe T, Glisson B, Yalowich J, Liu L. Role of topoisomerase II in mediating epipodophyllotoxin-induced DNA cleavage. *Cancer Res* 1984; 44:5857-5860.
87. Yang L, Rowe TC, Liu LF. Identification of DNA topoisomerase II as an intracellular target of antitumor epipodophyllotoxins in simian virus 40-infected monkey cells. *Cancer Res* 1985; 45:5872-5876.
88. Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BD, Liu LF. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science* 1984; 226:466-468.
89. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983; 302:575-581.
90. Sakano H, Kurosawa Y, Weigert M, Tonegawa S. Identification and nucleotide sequence of a diversity DNA segment (D) of immunoglobulin heavy-chain genes. *Nature* 1981; 290:562-565.
91. Desiderio SV, Yancopoulos GD, Paskind M, Thomas E, Boss MA, Landau N, Alt FW, Baltimore D. Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells. *Nature* 1984; 311:752-755.
92. Lieber MR, Hesse JE, Mizuuchi K, Gellert M. Lymphoid V(D)J recombination: nucleotide insertion at signal joints as well as coding joints. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:8588-8592.

93. Yancopoulos GD, Blackwell TK, Suh H, Hood L, Alt FW. Introduced T cell receptor variable region gene segments recombine in pre-B cells: evidence that B and T cells use a common recombinase. *Cell* 1986; 44:251-259.
94. Lewis WH, Michalopoulos EE, Williams DL, Minden MD, Mak TW. Breakpoints in the human T-cell antigen receptor alpha chain locus in two T-cell leukaemia patients with chromosomal translocations. *Nature* 1985; 317:544-546.
95. Gu Y, Cimino G, Alder H, Nakamura T, Prasad R, Canaani O, Moir DT, Jones C, Nowell PC, Croce CM, Canaani E. The (4;11)(q21;q23) chromosome translocations in acute leukemias involve the VDJ recombinase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1992; 89:10464-10468.
96. Negrini M, Felix CA, Martin C, Lange BJ, Nakamura T, Canaani E, Croce CM. Potential topoisomerase II DNA-binding sites at the breakpoints of a t(9;11) chromosome translocation in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 1993; 53:4489-4492.
97. Domer PH, Head DR, Renganathan N, Raimondi SC, Yang E, Atlas M. Molecular analysis of 13 cases of MLL/11q23 secondary acute leukemia and identification of topoisomerase II consensus-binding sequences near the chromosomal breakpoint of a secondary leukemia with the t(4;11). *Leukemia* 1995; 9:1305-1312.
98. Drexler HG, MacLeod RAF, Borkhardt A, Janssen JWG. Recurrent translocations and fusion genes in leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia* 1995; 9:480-500.
99. Stong RC, Korsmeyer SJ, Parkin JL, Arthur DC, Kersey JH. Human acute leukemia cell line with t(4;11) chromosomal rearrangement exhibits B lineage and monocytic characteristics. *Blood* 1985; 65:21-31.
100. Lange B, Valtieri M, Santoli D, Caracciolo D, Mavilio F, Gemperlein I, Griffin C, Emanuel B, Finan J, Nowell P, Rovera G. Growth factor requirements of childhood acute leukemia: establishment of GM-CSF dependent cell lines. *Blood* 1987; 70:192-198.
101. 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.
102. 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.
103. Drexler HG, MacLeod RAF, Quentmeier H, Steube H. *DSM Catalogue of Human and Animal Cell Lines*. 4 ed. Braunschweig: 1994.

104. Mullis KB, Faloona FA. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaktion. *Methods in Enzymologie* 1987; 155:335-350.
105. 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.
106. Barnes WM. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from Lambda-bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1994; 91:2216-2220.
107. Cheng S, Fockler C, Barnes WM, Higuchi R. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1994; 91:5695-5699.
108. 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(2):195-202.
109. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrock J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 1 ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor University Press, 1982.
110. Helling RB, Goodman HM, Boyer HW. Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol* 1974; 14:1235-1244.
111. Sharp PA, Sugden B, Sambrook J. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 1973; 12:3055-3063.
112. Kessler C, Manta V. Specificity of restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases a review (Edition 3). *Gene* 1990; 92:1-248.
113. Makula RA, Meagher RB. A new restriction endonuclease from the anaerobic bacterium, *Desulfovibrio desulfuricans*, Norway. *Nucleic Acids Res* 1980; 8:3125-3131.
114. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74:5463-5467.
115. Tabor S, Richardson CC. A single residue in DNA polymerases of the *Escherichia coli* DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:6339-6343.
116. Itakura K, Rossi JJ, Wallace RB. Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. *Annu Rev Biochem* 1984; 53:323-356.

117. Parker LT, Deng Q, Zakeri H, Carlson C, Nickerson DA, Kwok PY. Peak height variations in automated sequencing of PCR products using Taq dye-terminator chemistry. *Biotechniques* 1995; 19:116-121.
118. Clark JM. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:9677-9686.
119. Leis T, Repp R, Borkhardt A, Metzler M, Schlager F, Harbott J, Lampert F. A new fingerprint method for sequence analysis of chromosomal translocations at the genomic DNA level. *Leukemia* 1998; 12:758-763.
120. Pamela L. Strissel Broeker, Heidi Gill Super, Michael J. Thirman, Helen Pomykala, Yuka Yonebayashi, Satoru Tanabe, Nancy Zeleznik-Le, Janet D. Rowley. Distribution of 11q23 Breakpoints Within the MLL Breakpoint Cluster Region in De Novo Acute Leukemia and in Treatment-Related Acute Myeloid Leukemia: Correlation With Scaffold Attachment Regions and Topoisomerase II Consensus Binding Sites. *Blood* 1996; 87:1912-1922.
121. Jones DH, Winistorfer SC. Sequence specific generation of a DNA panhandle permits PCR amplification of unknown flanking DNA. *Nucleic Acids Res* 1992; 20:595-600.
122. Jones DH, Winistorfer SC. Genome walking with 2- to 4-kb steps using panhandle PCR. *PCR Methods Appl* 1993; 2:197-203.
123. Felix CA, Jones DH. Panhandle PCR: a technical advance to amplify MLL genomic translocation breakpoints. *Leukemia* 1998; 12:976-981.
124. Felix CA, Kim CS, Megonigal MD, Slater DJ, Jones DH, Spinner NB, Stump T, Hosler MR, Nowell PC, Lange BJ, Rappaport EF. Panhandle polymerase chain reaction amplifies MLL genomic translocation breakpoint involving unknown partner gene. *Blood* 1997; 90:4679-4686.
125. Megonigal MD, Rappaport EF, Jones DH, Kim CS, Nowell PC, Lange BJ, Felix CA. Panhandle PCR strategy to amplify MLL genomic breakpoints in treatment-related leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:11583-11588.
126. Marschalek R, Greil J, Lochner K, Nilson I, Siegler G, Zweckbronner I, Beck JD, Fey GH. Molecular analysis of the chromosomal breakpoint and fusion transcripts in the acute lymphoblastic SEM cell line with chromosomal translocation t(4;11). *Br J Haematol* 1995; 90:308-320.
127. Cimino G, Elia L, Rivolta A, Rapanotti MC, Rossi V, Alimena G, Annino L, Canaani E, Lo CF, Biondi A. Clinical relevance of residual disease monitoring by polymerase chain reaction in patients with ALL-1/AF-4 positive-acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1996; 92(3):659-664.

128. Cimino G, Elia L, Rapanotti MC, Sprovieri T, Mancini M, Cuneo A, Mecucci C, Fioritoni G, Carotenuto M, Morra E, Liso V, Annino L, Saglio G, De Rossi G, Foa R, Mandelli F. A prospective study of residual-disease monitoring of the ALL1/AF4 transcript in patients with t(4;11) acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000 Jan 1;95(1):96-101.
129. Mitterbauer G, Zimmer C, Fonatsch C, Haas O, Thalhammer-Scherrer R, Schwarzinger I, Kalhs P, Jaeger U, Lechner K, Mannhalter C. Monitoring of minimal residual leukemia in patients with MLL-AF9 positive acute myeloid leukemia by RT-PCR. *Leukemia* 1999; 13(10):1519-1524.
130. Reichel M, Gillert E, Breitenlohner I, Repp R, Greil J, Beck JD, Fey GH, Marschalek R. Rapid isolation of chromosomal breakpoints from patients with t(4;11) acute lymphoblastic leukemia: implications for basic and clinical research. *Cancer Res* 1999; 59:3357-3362.
131. Uckun FM, Herman-Hatten K, Crotty ML, Sensel MG, Sather HN, Tuel-Ahlgren L, Sarquis MB, Bostrom B, Nachman JB, Steinherz PG, Gaynon PS, Heerema N. Clinical significance of MLL-AF4 fusion transcript expression in the absence of a cytogenetically detectable t(4;11)(q21;q23) chromosomal translocation. *Blood* 1998; 92(3):810-821.
132. Kim-Rouille MH, MacGregor A, Wiedemann LM, Greaves MF, Navarrete C. MLL-AF4 gene fusions in normal newborns. *Blood* 1999; 93(3):1107-1108.
133. Trka J, Zuna J, Hrusak O, Michalova K, Muzikova K, Kalinova M, Horak J, Sary J. No evidence for MLL/AF4 expression in normal cord blood samples. *Blood* 1999; 93(3):1106-1107.
134. Cimino G, Rapanotti MC, Biondi A, Elia L, Lo Coco F, Price C, Rossi V, Rivolta A, Canaani E, Croce CM, Mandelli F, Greaves M. Infant acute leukemias show the same biased distribution of ALL1 gene breaks as topoisomerase II related secondary acute leukemias. *Cancer Res* 1997; 57:2879-2883.
135. Schichman SA, Caligiuri MA, Gu Y, Strout MP, Canaani E, Bloomfield CD, Croce CM. ALL-1 partial duplication in acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:6236-6239.
136. Aplan PD, Chervinsky DS, Stanulla M, Burhans WC. Site-specific DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region induced by topoisomerase II inhibitors. *Blood* 1996; 87:2649-2658.
137. Domer PH, Fakharzadeh SS, Chen CS, Jockel J, Johansen L, Silverman GA, Kersey JH, Korsmeyer SJ. Acute mixed-lineage leukemia t(4;11)(q21;q23) generates an MLL-AF4 fusion product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:7884-7888.

138. Haluska FG, Finver S, Tsujimoto Y, Croce CM. The t(8;14) chromosomal translocation occurring in B-cell malignancies results from mistakes in V-D-J joining. *Nature* 1986; 324(6093):158-161.
139. Finger LR, Harvey RC, Moore RC, Showe LC, Croce CM. A common mechanism of chromosomal translocation in T- and B-cell neoplasia. *Science* 1986; 234:982-985.
140. Nilson I, Reichel M, Ennas MG, Greim R, Knorr C, Siegler G, Greil J, Fey GH, Marschalek R. Exon/intron structure of the human AF-4 gene, a member of the AF-4/LAF-4/FMR-2 gene family coding for a nuclear protein with structural alterations in acute leukaemia. *Br J Haematol* 1997; 98(1):157-169.
141. Reichel M, Gillert E, Nilson I, Siegler G, Greil J, Fey GH, Marschalek R. Fine structure of translocation breakpoints in leukemic blasts with chromosomal translocation t(4;11): the DNA damage-repair model of translocation. *Oncogene* 1998; 17:3035-3044.
142. Roth DB, Proctor GN, Stewart LK, Wilson JH. Oligonucleotide capture during end joining in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 1991; 19(25):7201-7205.
143. Roth DB, Porter TN, Wilson JH. Mechanisms of nonhomologous recombination in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1985; 5(10):2599-2607.
144. Gillert E, Leis T, Repp R, Reichel M, Hosch A, Breitenlohner I, Angermuller S, Borkhardt A, Harbott J, Lampert F, Griesinger F, Greil J, Fey GH, Marschalek R. A DNA damage repair mechanism is involved in the origin of chromosomal translocations t(4;11) in primary leukemic cells. *Oncogene* 1999; 18:4663-4671.
145. Greaves MF. Aetiology of acute leukaemia. *Lancet* 1997; 349(9048):344-349.
146. Stanulla M, Wang J, Chervinsky DS, Thandla S, Aplan PD. DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region is a specific event which occurs as part of higher-order chromatin fragmentation during the initial stages of apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997; 17 :4070 - 4079.

9 Anhang

9.1 Sequenzen der Fusionsbereiche des MLL-Gens mit den Partnergenen

Angegeben ist neben der Probennummer (P) der verschlüsselte Patientennamen, die jeweilige Translokation, das derivative Chromosom und die Lage des genomischen Bruchpunktes des MLL-Gens. Die Angaben zur Lage des Bruchpunktes beziehen sich auf die Sequenz der MLL-Bruchpunktregion nach Gu et. al. (62). Unter der angegebenen Accession-Nummer (Acc-Nr) sind die Sequenzdaten bei der EMBL-Datenbank zu finden.

Sequenzen des MLL-Gens sind fettgedruckt dargestellt, so daß der Übergang von oder zu fettgedrucktem den genomischen Bruchpunkt des MLL-Gens jeder Probe wiedergibt.

Probe P24 (KG) weist eine eingeschränkte Sequenzqualität auf, nicht sicher zu identifizierende Basen wurden mit „N“ bezeichnet. Die Qualität war aber ausreichend, um die Lage des genomischen Bruchpunktes des MLL-Gens zu ermitteln.

Immunglobulin-Heptamer-Sequenzmotive im Bereich der Partnergensequenzen bei P19 (PI) und bei P25 (VS) sind einfach unterstrichen. Topoisomerase-Erkennungssequenzen bei den Proben P7 (LC), P9 (JT), P13 (KU), P15 (WE) und P22 (CO) sind doppelt unterstrichen.

Die Sequenz der MLL/AFX-Bruchpunktregion der Zelllinie Karpas 45 (P5) ist hier nicht wiedergegeben. Die vollständige Sequenz des 3706 Basenpaare langen AFX-Introns wurde in unserer Arbeitsgruppe ermittelt und 1997 veröffentlicht (108). Die Bruchpunktsequenzen der Zelllinien MV4;11 (P2), THP-1 (P3) und Mono-Mac-6 (P4) wurden von unserer Arbeitsgruppe 1998 publiziert (119). Die Bruchpunktsequenzen der Proben P6 (LA) und P7 (LC) sind bei Gale et. al. veröffentlicht (59).

P1, RS4;11, t(4;11), der 11, Bp 2530/2531, Acc-Nr: AJ000159

TTTAAGGTAA AGGTGTTTCAG TGATCATAAA GTATATTGAG TGTCAAAAGAC
TTCTGCTCCC CTTTTGGAAA ACCTCCTTCC AGTGGCATGC TTGGAGGTGC
CAAGTTGCAC TTTATGAGAC GAGGCAGCCT GTCCTTGTAG ATCTTTCCCT
GTAAACAAAT CCAAAGATC TGTCTTGTAG TTTAAGTGTC TCTAATTAGG
GTGGCGAGAA GAGTGAAGAT GTGAGTCTCA GGTAGATGGA ACATAAAATG
ATCTCATACT ATGCAAACCTT TTCAGTAGCC TCTCTTTTAA ATGTAGGTTT
ACAATGTGTT TTGGTATACA CAAAAGTAT

P2, MV4;11, t(4;11), der 11, Bp 1128/1129, Acc-Nr: AJ000160

GAATTC AAGG CTGTAGTGAG CTATGATTGT ACCACTGCAG TCCAGCCTGG
GTGACAAAGC AAAACACTGT CTCCAAAAAA AATTTAGGCT TGGCAAGGCG
CCAGGAAGCT CTCTTTGGTG CAGTATTGAA ATTCTTTTAA AACTGGACTT
TTAATTAAAA GTTGTAAATGC TTTTAATTTA TTAAGTGCCT TCTGTGCAGT
ATTCATTCAG TACGGTACAT AAAGTACTCT TACAATACTT TGAAAAATAAG
TGGTTCTAGT TTACCTCTTA GTGAGCATTG AGGATTAGGG TTCAAATGAC
TTACTTAGGC TGACATGGCT GGTAAGGATT GGAGTTAGGA TTGCAATCT

P3, THP-1, t(9;11), der 11, Bp 1806/1807, Acc-Nr: AJ000161

CCCACATGTT CTAGCCTAGG AATCTGCTGA AAGAAGGACC AAAACTGTGA
GAAGAACCTA ATACTTCAGT CAGGCATAAT GAAAAATTGAA CAGAGAAGTA
AATAAAGTGT CCTATATTTG TGTTTTCTTC TTTCATTAGT ATTCATCCAC
AGTCTTTCTG GATATTTGTG AAAGAAGAGA TAATCTTTAT AGCAGGCTCT
AGGTGTTCTT TTTCTAGGTG AGGTTTACAT TTTATGAAAA GTTACATTTT
CGTAATGTAA CTAATGAGGT TACATTTTAT GAAAAGTGTA

P4, Mono-Mac-6, t(9;11), der 11, Bp 6588/6589, Acc-Nr: AJ000162

AGGTCACHTA GCATGTTCTG TTAAATCTTG TATTATATTT ATTTTGTTAC
TTTCTATTTT CACTGGTCTT AGCAAATAAA ATAAACTCTT AATGCCACTG
CCATGATAGT AAATCCAGGT TTCACATTTA ATCGGGAAAA TTCTGTAAAG
TAGTCCAAAG ATTAATAATTA ATACTTCTTG ACATCTGTGT AAATCTGTAA
AGATTATATT GGTGTCAATC AAATGCTTTA TGAACATTTT AAAGTGACAC
ATTTTTTAAA AGGTTAAAGT TAATAAGGAA ATGTAGTTAA ATGTCTTGTC
AAAATAATCT CTTCAGATAT ATATCTTTTA GTTATTTTCA TTCA

P6, LA, t(4;11), der 11, Bp 5703/5704

CAGAGAATTC TAAGTACCCC TCACCCAAAT TCCCTAAGTG TTAATAGACT
TCTGCATCTT AAAAATATCA CTGTTCTGTG AAGTTGTCTG GAGTTTTACC
AATATGAGCT GACATATATT GCTTCCCAGG AAAGAGATTG GAAATTCACC
ATAAACTCT AATTACTTTT TGGTTATCTT ATGTATCTGA ATTTTGTTTG
AGATGTCATG ACATGACAAA ATCGAGTATT CATTTTATAA ATATTAATG
AGTCTAGAAT TATGCTAAGG CCTTGTGAGG AATGCAGAGA TTAATAAACC
CTAGTTCCTG CTTGTGGG

P7, LC, t(4;11), der 4, Bp 4023/4022

GAGCAGACGA CTTCCAAACC GCTTGTAAGA AAGCATGAAG AATAAGTCAC
CTGCACTTCA GAGGCCAAAT TTTAAACCTG AAAAGATTTA AATATAGAAG
TTTTAAAATA GTGACAGGCA GGTTTTTTAG AGCAGAAGCT GTAAACCAGC
AGCCTGAGGG CTAGGTTGGG CCTGCAGACA AATTATTTTG TTTGGCCTGT
AGGGCTTGTT TTCTTTCTTT CTCCCTACCA CCCCCACAC TTTTGCCTC
TACTCAGCCA ATAATGATTT TTTTCCTAAA TTCTCCAGTT TGTAATACT
GGCAGGCGGA TCACAAGGTC AGGAG

P8, ZK, t(4;11), der 11, Bp 3758/3759, Acc-Nr: AJ000171

GGAGGTGAAG GGAGGGTGTC TGTTTTTTTAG CCTCTAGTG ACCAAAAACT
 GGAAATTAATA GCATGATAAA AAAAGAATCC TGAATAAATG GGGACTTTCT
 GTTGGTGGAA AGAAATATAG ATTAGTTACA ATCTTTCTTT CTGAGGGACT
 ATACAGGACC TTGCAAACAT CAAAAATTAT ATTGTATGTG ATCTCAGGAT
 ATATAATGGT AACAAAATCA GTGAATCCAG CATTGTTACT GCTTCTCTCA
 TTATTTGCAT ATTCTTATCA AGTGAGTGT TACAATTATA CATGTGGACA
 ACAACCACTC ATTGTTTTCA TTTTTATTTA AGCC

P9, JT, t(4;11), der 11, Bp 2739/2740, Acc-Nr: AJ000172

AACATACATA ATGAAACATT CCTATCCATC CTGAGCAGTA TCAGAGGAAG
 TAATTCCTTA TATGTACACA TATATACACA CGTATTC AAT ATGTTATATA
 TATATCTCCT ATCTACACGA TATATTAGGC TCTCATTTAT TAAATGAACT
 GGGGTGCCAG CACATCTCTA GCATGATCTT CCAGTGTTTA TCCGTGGAGTA
 TTATTTCTTC ATCTTCTATC TCAAGGAAGC GTACGTACAT CCTTCTTTA
 CCCAACATG CTGCCTGATA TACCTACCT CCCAACCTG ACGTCTGTAT
 GTTACTGTCA TATCTGAAAT TTTGCATTCT GAGAA

P10, SR, t(4;11), der 11, Bp 6523/6524, Acc-Nr: AJ000173

AGTAATGAAT AGGTAATAGG TCAGAATTTA AAAGGTTAAA AAAAGGATAT
 ACATTGAAAA TCTTCCCCCT ATTCTTCCC CCAGCTCCA TTCCCCAGCC
 TTCCTTCTG GAAGTAATTG ATGTTAGGAC TTTCTTGTGT ATCATTCCCA
 GTGGTATTTT ATGCATAGTA AGCAACTCCA TATATATGTT TTCTTCTCAT
 TGATACTTTC TTCATTTATA GAAATGCTGG CATATAATGC ATCTTTTTTT
 AAAAATTTAT TCTTCTAAAC AATGTATCTT GGAGATTACC CCAAATCAAT
 GCAAAAAGAG CATCCTTATT CTTTGTG

P11, SM, t(4;11), der 4, Bp 6783/6782, Acc-Nr: AJ000175

ACTCATATTG GACAGGAATG TGGAGCTTTG AATTGAAGTG CATGAATTAA
 GAAAGGAAGG CATTCTATGT TATGTATATT TCTTCGAGGT ATTCTTAACA
 ACCCCACACT ATATTATAGA TTCCCTTTTT CCTTAGAGCT CAATTTTTAA
 AATACCCCGA AGCAAGTATT TGCTGTTGCA TTTTAGAAAA ATTTAAAATA
 GAATTCTATG GTATAATTAG AATGTATGTT ACTTCCAACA TTTTTTCATG
 CTCGAGAACA TGGGAACCTG TGAAAAAATT TTTTCTTATT AAATAATCTG
 AACATTCTTA CAAAATGTTT **TATAGTTTGT GT**

P12, DC, t(4;11), der 4, Bp 2557/2556, Acc-Nr: AJ000174

TTAGAAACTG ACATTAGTCA AGTAATCACT CAGATCCATG TATAAGAAGC
 TTTGACAAGT GCTATAAGGG AAATAACAAG CTATTCTAAG AGCTATAAGA
 GGGGATTGTG ACTTAGAACT AAGGAGCTGA GGAAGGCTTC TCTGAGGAAG
 TACTATTTGA ATGAGAGCTG AAGGTGAGTA GGAGTGCCC AAGTGAGGGG
 TGTTGGGGCT TAAGCAGTGT CGGGTGTGTA **AAGAGGAAAT CAGCACCAAC**
TGGGGGAATG AATAAGAACT CCCATTAGCA GGTGGGTTA GCGCTGGGAG
AGCTTTGGTC

P13; KU, t(4;11), der 4, Bp 2681/2680, Acc-Nr: AJ000166

CTGTTTTAGT TTTACGTCAA CTGGAAGATG TCTAGCAGTG TGAAGTGACC
 AATCTGAGGC CAGGCCGAGA ACTCCGCGAT CTCACGTGGA TCCCGTCCAG
 CTGCAGAGTT GCCACATCAG AGGTGGACCT GCCCAATAAC ATACATAATG
 AAACATTCTT ATCCATCTTG AGCAGTATCA GAGGAAGTAA TTCTTCCACA
 TGGAAAGTAT CAAACCATGA TGATTCTTGG AGTCAGCAA ACTGTAAGAG
 AAATTC AATC CCAGTGTATT TTCGCAATAT ATTCAATATG AATTGAACAA
 CTAGGTGAGC CTTTTAATAG TCCGTGTCTG AGATTAAAAC TTTTTAAA

P14, TI, t(4;11), der 11, Bp 6627/6628, Acc-Nr: AJ000167

ACAACCTGTTT CGTATATTAC AGAAAAACGTT TAAACCCTCC CTATTTCCCC
 CACCCCACTC CTTTATATTC CCATAGCTCT TTGTTTATA CACTCTTAGG
 TCACCTAGCA TGTTCTGTTA AATCTTGTAT TATATTTATT TTGTTACTTT
 CTATTTCCAC TGGTATTACC ACTTTAGTAC TCTGAATCTC CCGCAATGTC
 CAACCCATGT CCAGGCAGGC ACTCTCTGCA ACATAGAATT AAACATGCTT
 CCTGAACATT GTTTGCACCT TCATTTGACA GAGAGCAGAA ATACAGGTTT
 ATGTATCCAT AAATCCTGTC ATGGTTGACA AAGT

P15, WE, t(4;11), der 11, Bp 764/765, Acc-Nr: AJ000168

GCAGTGGAAAT TAGATTCCAA ATAAATTATT GAAAAACATA AGGGTGATGT
 TTTTCAGATAC CTTCTCAATT AATTATTACA TGTTTTTGTG TTGTAACATT
 ATAATGGTTC TGTGCCTTAA AGTATTACCA AGTAAATAAA ACAGCAGGAA
GCTCTCTTTG GTGCAGTATT GAAATTCTTT TAAAACTGGA CTTTTAATTA
 AAAGTTGTAA TGCTTTTAAT TTATTAAGTG CCTTCTGTGC AGTATTCATT
 CAGTACGGTA CATAAAGTAC TCTTACAATA CTTTGAAAAT AAGTGTTCT
 AGTTTACCTC TTAGTGAGCA TTGA

P16, GE, t(4;11), der 11, Bp 6348/6349, Acc-Nr: AJ000169

TGAAACCCAT CTCTACTAAA AATACAAAAA ATTAGCCAGG TGTGGTGGCA
 CGCGCCTGTG ATCCAGCTA CTCAGGAGAC TGAGGCTGGA GAATCGCTTG
 AACCCAGGAG GCGGAGGTTG CAGTGAGTCG AGATCGCACC ACTGCACCCC
 AGCCTGGGCG ACAGCGAGAC TCCGTTTTTA GAAATCTTTC CTTCAACTGA
 GAAATTGTAA AAAATTAAGC TTCTCAATGG AAAAGAAAGG TAATTTTAAG
 CTCCTCTCCT TCAAAAAAGT TCTTACTTGC TAATA

P17, PR, t(4;11), der 11, Bp 2812/2813, Acc-Nr: AJ000178

GCAGAACATA CATAATGAAA CATTCCCTATC CATCCTGAGC AGTATCAGAG
 GAAGTAATTC CTTACATGG NAAAGTATCA AACCATGATG ATTCCTTGAG
 TCAGCAAAAC TGTAAGAGAA ATTCAATCCC AGTGTATACC TACCCCTCCC
 AACCTGACGT TCTGATGTTA CTGTCATATC TGAAATTTTG CATTCTGAGA
 AATTTATGTC CCCAACTGC ATTTAGGCAA CTA CTCTTAT AGGTGAAAAAC
 ATCTGATTAG GTGGTAGTGG TTGATGGATT ATAGTCACAA GATAATACTT
 CTTTAAAATT TGAAGACTTC TGCATCTTAA AAATATCACT GT

P18, BN, t(4;11), der 4, Bp 6418/6417, Acc-Nr: AJ000176

AAGTGCCTTA ATTTCTTATG GAGGGTGCTG TTCCCCTCG TCCTCCAGGG
 CTCTGTCCCTC AACCATCTTT TTTCATTCTG CAGCCTTTCA GAATGAGACC
 TTACAACCTGT TTCGTATATT ACAGAAAAACG TTTAAACCCT CCTTATTTCC
 CCCACCC

P19, PI, t(4;11), der 4, Bp 3018/3017, Acc-Nr: AJ000177

CTTGTGGCCT CTTGTGACAT CATGTTAGGA ACGTTTTGTT GCCAGATGCT
 TGCATTTAAT TTCCAAGACC CAAGTGATCA TTCATTGTTG GACCACTTTG
 ATTCATTGCA GCTCTTAAAT TGAGCCTCCT ATTTTCAATA AACTACCAGC
 CTAACAACCTG CATGAATTAA CCCACAGTGG AAAACTGTAT TCTCTCTCCA
CAGGAGGATT GTGAAGCAGA AAATGTGTGG GAGATGGGAG GCTTAGGAAAT
 CTTGACTTCT GTTCCCTATAA CACCCAGGGT GGTTTGCTTT

P20, EY, t(4;11), der 11, Bp 6051/6052, Acc-Nr: AJ000179

CCTATATCAA TATGAAAATA ACTTAAATAC CTCATCGTGG ACTCCAAAAG
 CATGTCTCCT CGTTTTAAAA ACTGGCATAA TACCTACCAC AAAGGTTGAT
 GTGAGAATTA AATAGACTTT TATACAGAAT TCCCTCAGGC ATTTTTAAGT
 TTATGTAATA GGGATGTATC TTACAGTTGA TGGGTACATT TAGTGTAGTC
 CCCCTACCTC CCAAGCTAAT AATGGTGCGT CGTACAATTG ATGGTACCAA
 ATTGAGGTGA TAATAACATA GAAAGAGTTT AATGCAACGT GAAGTACAAA
 ATGCATTCAA TAAGT

P21, KT, t(4;11), der 11, Bp 2301/2302, Acc-Nr: AJ000800

TGCATTATTA TCTGTTGCAA ATGTTCACTC TTCTCGCCAC CCTAATTAGA
 GACACTTAAA CTACAAGTCT CAGGTAGATG GAACATAAAA TGATCTCATA
 CTATGCAAAC TTTTCAGTAG CCTCTCTTTT AAATGTAGGT TTACAATGTG
 TTTTGGTATA CACAAAAGTA TTTAGGGATA GGGGGACATT AACTCTCTAA
 CTTACTCTTA AACAGTTCAA AATGTAGGTG AGCAGAAGAG AAAAAATAT

P22, CO, t(9;11), der 9, Bp 3544/3543, Acc-Nr: AJ000163

CTGCCACGTT GTTAGAAGCA TATGGAAAGT ATGGAGGAAC ACAAAGACAG
 GAAGGGGCTG GATTCCCTGAT TCTTGACCTT GTAGAGCTGC CATGCTGATC
 CTGTCTGTCA TATTGGGTTT CTCATTTAAT GAAAAATACA ATGTTAGTTC
 ATGATGTATA CATTAGTGCC AGGTGGGCAT ACTCCCTAAC TGATTTGGCT
 GTACCCATTA TCCCAAAACA CGAAAATAGG CAAAAGACAG **AAATAGATAA**
TTCACAAAAT T

P23, WX, t(9;11), der 11, Bp 1040/1041, Acc-Nr: AJ000165

GAATTCAAGG CTGAACGCTC CCAGCCGATG ATATTTTTTAA ATCCAACCTA
 GGCATATTTT AGCTTGATTT CTGTATCCAG TGGGTGGTAT ATGAAAGCTA
 CAATACGTCA TGGGCACAGC AGTGGCAGGG CCAGGAGTGT AGGGCATTAG
 GCTCTGCTTT TGTGCCCTC ACTCATCTCC TTCAATATCT CTCCCAATCA
 TAGTGAAAAG TGGGCTTGCT AGGGAATGCA ACTCCAGCAA GCACCTTTCA
 TGCCCTTCAA ACCTTATGGC TTCACTTAAG CCCTTCCTGA ATGGGCAGTC
 TTGAACAGAC CTTGGCTTTA GGGAA

P24, KG, t(9;11), der 11, Bp 1025/1026, Acc-Nr: AJ000164

TAGTCCCAGG TACTCAGGAG GCTGAGATAG AAGGATTGTC TTGAGCCCGG
 GAGACTGCGN NANGCCTTCT TTTCAAACC AACCTGGGCT TCATGCCACN
 GACCCTGNCT TTATTTCCAC GTTTCACATT TAANCNNNAA AANN CNNTT
 TNACCNGGNC GGGGATTAAA ATTAATACTT CTTGACATCT GTGTAAATCT
 GTAAAGATTA TATTGGTGTC AATCAAATGC TTTATGAACA TTTTAAAGTG
 ACACATT

P25, VS, t(9;11), der 11, Bp 4663/4664, Acc-Nr: AJ000170

TAGCACAATT TTAAATAGGA AGCAGTAGTT TGTCATTTAT AAGGGACAGT
 ATATATTACC TTATTTAAAAT ATACCTTGTT GCCAGAAATG CTTACAATTT
 TCTTGGCCTT CAGCTAGTCA TAGTCTTTTTT GCTGGTAGAA GTTCTCGCCC
 AGATGCTGAT GACTACTTAT CGATTGGAGT GCTGAAGATA TGAGTGGCTG
 TGGCAATTTT TGAAAATAAG ACAATGCAGG CCAGGCGTGG TGGCTCATGC
 CTGTAATCCC AGCACTTTGG GAGGCCAAGG CGGGTGGATC ACGAGGTCAG
 GAGATCGAGA CCATCCTGGC TAACACAGTG AA

9.2 Oligonukleotide

Tabelle 15: Long-PCR-Primer-Oligonukleotide

Primer	Sequenz	Gen	Orientierung	extern/intern	Position
MLL-1	5'-TCATCCCGCCTCAGCCACCTACTACAGGACCG	MLL	sense	extern	3911-3942 (162-193)
MLL-2	5'-CAAGAAAAGAAAATCCCAAAAACCACTCCTAGTGAG	MLL	sense	intern	3944-3978 (195-229)
MLL-3	5'-CACTGTGCATCCCACTCCCTTTGCCCTGGAGTTG	MLL	antisense	extern	4646-4616 (8374-8344)
MLL-4	5'-TGGATCCACAGCTCTTACAGGAAACACACTTGG	MLL	antisense	intern	4615-4583 (8343-8311)
AF4-1	5'-GAAAACCACTGCCGGAGGACTATCGACAGCAG	AF4	sense	extern	1350-1380
AF4-2	5'-CAAGCTCACCAAACTGAAGATGCCCTTCTCAG	AF4	sense	intern	1419-1449
AF4-3	5'-CTCACTGTCACTGAGCTGAAGGTCGTCTTCG	AF4	antisense	extern	1719-1689
AF4-4	5'-CATGGATGACGTTCCCTTGCTGAGAAATTTGAGTG	AF4	antisense	intern	1686-1654
AF4-5	5'-CAGAATCTTCAACACAAATGGACTTCATTGG	AF4	antisense	extern	1500-1469
AF4-6	5'-TCTTCAACACAATGGACTTCATTGGAGTAGG	AF4	antisense	intern	1493-1463
AF9-1	5'-AAAAGTCAAAAATGAAAAGTGAGACATCAGAGAAG	AF9	sense	extern	1203-1236
AF9-2	5'-AAATCAACGTTACCGCCATTTGATGATATTTGTTGG	AF9	sense	intern	1240-1273
AF9-3	5'-CTTTGCACATTCACCACTTTTATTTGCTTATCTGTG	AF9	antisense	extern	1698-1664
AF9-4	5'-ATTTGCTTTGCTTTTATTTGGACTTTTCACTTCAAG	AF9	antisense	intern	1663-1630
AF9-5	5'-CCTCAAAGGACCTTTGTCCTGGTCTGGGATGG	AF9	antisense	extern	1407-1375
AF9-6	5'-TGAAGCTGGAGCTGGAGCTGGAGCTGGAGCTGG	AF9	antisense	intern	1372-1340
AF9-7	5'-CCTCACCTAGAAAAAAGAACACCTAGAGCCCTG	AF9	antisense	extern	AF9-Intron
AF9-8	5'-GCCTGACTGAAGTATTAGGTTCTTCTCACAG	AF9	antisense	intern	AF9-Intron
AFX-1	5'-ACCTTCGGGTGGAGCTGGCAGCACAGATGG	AFX	antisense	extern	845-816
AFX-2	5'-CGGAGCAGCTTGCTGTGCTATCCATGGAG G	AFX	antisense	intern	787-757

Positionen von MLL-1 bis MLL-4 beziehen sich auf die MLL-mRNA-Sequenz (15;16), in Klammern Positionen in der MLL-BCR nach Gu et. al. (62). MLL-3 grenzt unmittelbar an das 3'-Ende der MLL-BCR. Positionen von AF4-1 bis AF4-6 und AF9-1 bis AF9-6 entsprechend der mRNA-Sequenzen des AF4-Gens bzw. des AF9-Gens nach Nakamura et. al. (26). AF9-7 und AF9-8 wurden anhand der bei der Sequenzierung des Bruchpunktes der Zelllinie THP-1 gewonnenen AF9-Intronsequenz ausgemittelt (119). Positionen von AFX-1 und AFX-2 entsprechend der mRNA-Sequenz des AFX-Gens nach Borkhardt et. al. (108). „Extern-Primer“ wurden im ersten, „Intern-Primer“ im zweiten Lauf der Nested-Long-PCR eingesetzt.

Tabelle 16: Sequenzierprimer-Oligonukleotide

Primer	Sequenz	Orientierung	Position
Seq1	5´CTTATCCTTGACTTCTATGTA	sense	729-749
Seq2	5´GTGGCAGTTGCGTGTAGTCCCAGG	sense	964-987
Seq3	5´ATAGAAGGATTGTCTTGAGC	sense	1004-1023
Seq4	5´AAATTAGCCCGGCGAGG	sense	1552-1568
Seq5	5´TCTTCCTTGTTGCTTTTCC	sense	1748-1766
Seq6	5´CAAAGATTATTGTTTATGTTGG	sense	2218-2239
Seq7	5´TTCCAGCAGATGGAGTCC	sense	2444-2461
Seq8	5´GGTCACTGTTTGTGAACTG	sense	2655-2673
Seq9	5´TACATGTTGGGTGGCAGG	sense	3592-3609
Seq10	5´GTACCACCTTTACAATGAG	sense	4586-4604
Seq11	5´TATGTTGACATGATTTCAAC	sense	5614-5634
Seq12	5´ATTCTGGATTATCCTAGTTAG	sense	5993-6013
Seq13	5´GATTGAGACCATCCTCGC	sense	6146-6163
Seq14	5´GAAAGGACAAACCAGACC	sense	6405-6422
Seq15	5´CCTTTATATTCCCATAGCTC	sense	6484-6503
Seq16	5´CAGTTCACAAACAGTGACC	antisense	2673-2655
Seq17	5´CAATGAGTCCAAAATAACTG	antisense	2916-2896
Seq18	5´CTACATGCCCACTACTGG	antisense	3143-3126
Seq19	5´CCTGCCACCCAACATGTA	antisense	3609-3592
Seq20	5´CACTGTGTTAGCCAGGATGGTCTG	antisense	4074-4051
Seq21	5´GAGCTATGGGAATATAAAGG	antisense	6503-6484
Seq22	5´GGCTCACAACAGACTTGG	antisense	6816-6799
Seq23	5´CCTCCACAAACGTGACAG	antisense	6915-6898

Die Positionen der Sequenzierprimer Seq1 bis Seq25 beziehen sich auf die Sequenz der MLL-Bruchpunktregion nach Gu et. al. (62). Kriterien zur Auswahl der Primer siehe Text.

Tabelle 17: Oligonukleotide zur FAM-Adapterligation

Bezeichnung	Sequenz
Tru 91-Linker	5´-Phosphat-TACCAATCCGTGGCTACTTGCGGCCGCTGC
Adapter-5´FAM	5´-FAM-GCAGCGGCCGCAAGTAGCCACGGATTGG

Tabelle 18: Primerkombinationen zur Amplifikation und Sequenzierung

Nr.	Name	Translok.	PCR 1. Lauf	PCR 2. Lauf	Seq.-Primer
	MLL-BCR		MLL-1 + MLL-3	MLL-2 + MLL-4	
P1	RS4;11	t(4;11)	MLL-1 + AF4-5	MLL-2 + AF4-6	Seq 7
P2	MV4;11	t(4;11)	MLL-1 + AF4-3	MLL-2 + AF4-4	Seq 3
P3	THP-1	t(9;11)	MLL-1 + AF9-5	MLL-2 + AF9-6	Seq 4 / Seq 5
P4	Mono-Mac-6	t(9;11)	MLL-1 + AF9-7	MLL-2 + AF9-8	Seq 15
P5	Karpas 45	t(X;11)	MLL-1 + AFX-1	MLL-2 + AFX-2	Seq 10
P6	LA	t(4;11)	MLL-1 + AF4-5	MLL-2 + AF4-6	Seq 11
P7	LC	t(4;11)	AF4-1 + MLL-3	AF4-2 + MLL-4	Seq 20
P8	ZK	t(4;11)	MLL-1 + AF4-5	MLL-2 + AF4-6	Seq 9
P9	JT	t(4;11)	MLL-1 + AF4-5	MLL-2 + AF4-6	Seq 8
P10	SR	t(4;11)	MLL-1 + AF4-5	MLL-2 + AF4-6	Seq 15
P11	SM	t(4;11)	AF4-1 + MLL-3	AF4-2 + MLL-4	Seq 22 / Seq 23
P12	DC	t(4;11)	AF4-1 + MLL-3	AF4-2 + MLL-4	Seq 16
P13	KU	t(4;11)	AF4-1 + MLL-3	AF4-2 + MLL-4	Seq 17
P14	TI	t(4;11)	MLL-1 + AF4-5	MLL-2 + AF4-6	Seq 14
P15	WE	t(4;11)	MLL-1 + AF4-3	MLL-2 + AF4-4	Seq 1
P16	GE	t(4;11)	MLL-1 + AF4-3	MLL-2 + AF4-4	Seq 13
P17	PR	t(4;11)	MLL-1 + AF4-5	MLL-2 + AF4-6	Seq 8
P18	BN	t(4;11)	AF4-1 + MLL-3	AF4-2 + MLL-4	Seq 21
P19	PI	t(4;11)	AF4-1 + MLL-3	AF4-2 + MLL-4	Seq 18
P20	EY	t(4;11)	MLL-1 + AF4-5	MLL-2 + AF4-6	Seq 12
P21	KT	t(4;11)	MLL-1 + AF4-5	MLL-2 + AF4-6	Seq 6
P22	CO	t(9;11)	AF9-1 + MLL-3	AF9-2 + MLL-4	Seq 19
P23	WX	t(9;11)	MLL-1 + AF9-3	MLL-2 + AF9-4	Seq 2 / Seq 3
P24	KG	t(9;11)	MLL-1 + AF9-7	MLL-2 + AF9-8	Seq 2
P25	VS	t(9;11)	MLL-1 + AF9-5	MLL-2 + AF9-6	Seq 10

Kombinationen der Primeroligonukleotide zur Amplifikation der MLL-BCR bzw. des chimären Fusionsgens jeder Probe mittels Nested-Long-PCR. Sequenzen der Primeroligonukleotide siehe Tabelle 15.

Angabe der für die jeweiligen Proben verwendeten Sequenzierprimer. Bei den Proben SM (P6), WX (P18) und Mono-Mac-6 (P4) wurden bei nicht ausreichender Qualität der Sequenzdaten mit einem zweiten Primeroligonukleotid nachsequenziert. Sequenzen der Primeroligonukleotide siehe Tabelle 16.

9.3 Fluoreszenzfarbstoffe

Farbstoff	chemische Bezeichnung	Anregung [nm]	Emission [nm]
FAM	6-Carboxy-Fluorescein	488	518
Fluorogreen	11-Fluorescein-dUTP	488	520
TET	Tetrachloro-6-carboxy-Fluorescein	488	538
JOE	2,7-Dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxy-Fluorescein	488	554
TAMRA	6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin	488	582
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin	488	602

9.4 Puffer und Lösungen

Kulturmedium für Zellkulturen	
RPMI 1640	500 ml
Penicillin / Streptomycin (5000 U/ml / 5 mg/ml)	5 ml
L-Glutamin (200 mM)	10 ml
Fetales Kälberserum (FCS)	67,5 ml
Einfriermedium für Zellen	
RPMI 1640 + Penicillin / Streptomycin (s.o.)	70 %
Fetales Kälberserum (FCS)	20 %
DMSO (Dimethylsulfoxid)	10 %
PBS-Puffer (phosphate buffered saline) (Ansatz für 1 Liter)	
KH_2PO_4	0,21 g
NaCl	9,0 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,726 g
Puffer C1 (Ansatz für 1 Liter)	
Saccharose	438,14 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4,06 g
Tris-Base	4,84 g
20% Triton X-100	200 ml
pH mit HCL auf 7,5 einstellen	
Puffer G2 (Ansatz für 1 Liter)	
Guanidin-HCL	76,42 g
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	11,17 g
Tris-Base	3,63 g
20% Tween-20	250 ml
10% Triton X-100	50 ml
pH mit NaOH auf 8,0 einstellen	
Puffer QBT (Ansatz für 1 Liter)	
NaCl	43,83 g
MOPS	10,46 g
Isopropanol	150 ml
10% Triton X-100	15 ml
pH mit NaOH auf 7,0 einstellen	
Puffer QC (Ansatz für 1 Liter)	
NaCl	58,44 g
MOPS	10,46 g
Isopropanol	150 ml
pH mit NaOH auf 7,0 einstellen	

Puffer QF (Ansatz für 1 Liter)		
NaCl	73,05	g
Tris-Base	6,06	g
Isopropanol	150	ml
pH mit HCL auf 8,5 einstellen		
50 x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA) (Ansatz für 1 Liter)		
Tris-HCL	242	g
Eisessig	57,1	ml
Na ₂ EDTA pH 8,0 (0,5M)	100	ml
TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA) (Ansatz für 1 Liter)		
Tris-HCL	108	g
Borsäure	55	g
Na ₂ EDTA	7,4	g
Probenpuffer Agarosegel-Elektrophorese („Blaumarker“)		
Bromphenolblau	62,5	mg
Glycerin	28,7	ml
SDS	250	mg
Na ₂ EDTA pH 8,0 (0,5M)	5	ml
Aqua bidest.	16,3	ml
Restriktionspuffer H (Endkonzentration, 1:10 verdünnt)		
Tris-HCL	50	mM
MgCl ₂	10	mM
NaCl	100	mM
DTE (Dithioerythritol)	1	mM
pH 7,5		
Restriktionspuffer L (Endkonzentration, 1:10 verdünnt)		
Tris-HCL	10	mM
MgCl ₂	10	mM
DTE (Dithioerythritol)	1	mM
pH 7,5		
Restriktionspuffer M (Endkonzentration, 1:10 verdünnt)		
Tris-HCL	10	mM
MgCl ₂	10	mM
NaCl	50	mM
DTE (Dithioerythritol)	1	mM
pH 7,5		
10 x PCR-Puffer		
Tris-HCL (pH 8,4)	200	mM
KCl	500	mM

9.5 Chemikalien

Produkt	Hersteller
ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit With AmpliTaq® DNA Polymerase, FS	PE-Biosystems, Weiterstadt
Acrylamid 40%	Gibco BRL, Paisley, Schottland
Agarose	Gibco BRL, Paisley, Schottland
Alconox	Alconox, New York, USA
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
AmpliWax PCR Gem 100	Perkin Elmer, Überlingen
ATP	Roche Molecular Systems, Mannheim
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
DNA-Längenstandard I, II, III, VI	Roche Molecular Systems, Mannheim
dNTP	Perkin Elmer, Überlingen
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Ethanol, Riedel de Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Fetales Kälberserum	Life Technologies
Fluorescein-dUTP (Fluorogreen)	Amersham Life Science, England
Fluoro-dUTP Labelling Mix	Pharmacia Biotec
Formamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
GeneAmp XL PCR Kit	Perkin Elmer, Überlingen
Genescan-Standard 2500 ROX	PE-Biosystems, Weiterstadt
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco BRL, Paisley, Schottland
Lymphodex	Fresenius, Bad Homburg
M-MLV Reverse Transkriptase	Gibco BRL, Paisley, Schottland
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
PBS-Puffer	Gibco BRL, Paisley, Schottland
PCR-Puffer 10 x	Gibco BRL, Paisley, Schottland
Penicillin / Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Proteinase K	Roche Molecular Systems, Mannheim
QIAquick Nucleotide Removal Kit	QIAGEN GmbH, Düsseldorf
Restriktionsenzymen Tru91, Dde1	Roche Molecular Systems, Mannheim
Restriktionspuffer H, L, M	Roche Molecular Systems, Mannheim
RPMI 1640	Life Technologies
SDS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
T4-DNA-Ligase	Roche Molecular Systems, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Gibco BRL, Paisley, Schottland
TEMED	BIO-RAD
Tris-HCL	USB, Cleveland, USA

9.6 Geräte

Produkt	Hersteller
Elektrophoresekammer	Keutz, Reiskirchen
GeneAmp PCR System 9600 Thermocycler	Perkin Elmer, Überlingen
Pipetten	Abimed, Langenfeld
Pipettenspitzen	Costar, Bodenheim
Reaktionsgefäße	Fischer
Sequenzierautomat 373A	PE-Biosystems, Weiterstadt
Sofortbildkamera Polaroid MP-4	Polaroid, Cambridge, USA
Spektralphotometer	UV-DU 64, Beckmann, München
Ultrafree [®] -MC 100.000 NMWL Filter Unit	Millipore, Eschborn
UV-Transilluminator	UVP Inc.
Vortexer	Janke und Kunkel
Zellkulturflaschen	Costar, Bodenheim
Zentifugen Hettich EBA 12 R, Rotanta IP	Hettich

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Repp für die Überlassung des Themas und für die ausgezeichnete Betreuung der Arbeit. Die zahlreichen Anregungen und förderlichen Diskussionen gaben mir kritische Begleitung und Anleitung aber auch Raum zur selbstständigen Arbeit.

Die wirtschaftliche Absicherung während der Erstellung dieser Arbeit verdanke ich einem Stipendium zur Förderung von Nachwuchswissenschaftlern, das mir vom Präsidenten der Justus-Liebig-Universität Gießen, Herrn Prof. Dr. H. Bauer, zur Verfügung gestellt wurde.

Prof. Dr. F. Lampert danke ich für die großzügigen Arbeitsbedingungen in seinem Labor. Als Pionier der onkologischen Genetik hat er in Gießen einzigartige Strukturen geschaffen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Prof. Dr. J. Harbott danke ich für die Überlassung der Patientenproben und für die zytogenetischen und molekularbiologischen Voruntersuchungen.

Weiterhin danke ich allen, die den Fortgang der Arbeit durch fachliche Zusammenarbeit und hilfreiche Unterstützung bei der Laborarbeit gefördert haben. Hervorheben möchte ich dabei besonders Herrn PD Dr. A. Borkhardt für die ständige Bereitschaft zur Diskussion und Hilfestellung sowie Frau Claudia Keller für die hervorragende Anleitung und technische Unterstützung bei der Einarbeitung in die molekularbiologischen Methoden.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Pabst vom Institut für Biomathematik der Justus-Liebig-Universität Gießen und Herrn Dr. Land vom Institut für medizinische Informatik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg für die Hilfestellung und Beratung bei der statistischen Auswertung.

Ich bedanke mich bei meiner Lebensgefährtin und Partnerin, die das Wachsen dieser Arbeit mit tatkräftiger Unterstützung und wohlwollender Kritik erst ermöglicht hat.

Lebenslauf

Name	Thomas Leis
Geburtsdatum	22.03.1966
Geburtsort	Gelnhausen
Eltern	Friedhelm Leis, Postbeamter in Pension Henni Leis, geb. Gast, Hausfrau
Familienstand	ledig
Wohnort	Sudetenstr. 27, 91088 Bubenreuth
1972 - 1976	Grundschule Brachttal
1976 - 1982	Additive Gesamtschule Wächtersbach
1982 - 1985	Grimmelshausengymnasium Gelnhausen
06.1985	Abitur
09.1985 - 07.1988	Ausbildung zum Fernmeldeelektroniker, Fa.Standard Elektrik Lorenz AG, Frankfurt/M.
10.1988 - 04.1995	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
04.1995	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
05.1995 - 01.1997	Doktorand im molekulargenetischen Labor der Abteilung für Hämatologie und Onkologie des Zentrums für Kinderheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen
02.1997 - 07.1998	Arzt im Praktikum: interdisziplinäre Intensivstation des Zentrums für Kinderheilkunde der Justus-Liebig- Universität Gießen
seit 08.1998	Assistenzarzt an der Klinik mit Poliklinik für Kinder und Jugendliche der Friedrich- Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg