

SEQUENZANALYSE DES HUMANEN GRAF-GENS BEI KINDERN MIT
MYELOYDYSPLASTISCHEM SYNDROM UND AKUTER MYELOISCHER
LEUKÄMIE UND DELETION 5Q

INAUGURALDISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN
DES FACHBEREICHES HUMANMEDIZIN
DER JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIESSEN

VORGELEGT VON DOMINIQUE BARTELHEIMER

AUS MÜNCHEN

GIESSEN 2004

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde
Abteilung Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und Onkologie
Leiter: Prof. Dr. Reiter
Des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen

Gutachter: Prof. Dr. med. A. Borkhardt

Gutachter: Prof. Dr. med. U. Müller

Tag der Disputation: 14. Juli 2004

INHALTSVERZEICHNIS

<u>Verwendete Abkürzungen und Begriffe</u>	3
<u>Verzeichnis der Abbildungen</u>	6
<u>1. Einleitung</u>	7
1.1 Myelodysplastisches Syndrom (MDS) und akute myeloische Leukämie (AML) im Kindesalter.....	7
1.1.1 MDS.....	7
1.1.2 AML.....	8
1.2 Tumorentwicklung.....	9
1.2.1 Funktion von Protoonkogenen.....	9
1.2.2 Funktion der Tumorsuppressorgene.....	11
1.3 Deletion 5q.....	13
1.4 Das MLL-Partnergen GRAF.....	14
<u>2. Problemstellung der Arbeit</u>	16
<u>3. Material und Methoden</u>	17
3.1 Untersuchungsmaterial.....	17
3.2 Isolierung genomischer DNA.....	18
3.3 Isolierung von Plasmid-DNA.....	19
3.4 Isolierung von RNA.....	20
3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	20
3.6 cDNA-Synthese.....	21
3.7 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	22
3.8 Reinigung von PCR-Produkten.....	24
3.9 Agarosegel-Elektrophorese.....	25
3.10 DNA Klonierung.....	26
3.11 DNA Sequenzierung.....	33

<u>4. Ergebnisse</u>	36
4.1 Splicingvarianten.....	37
4.2 Punktmutationen.....	43
4.3 Sequenzierung 12 gesunder Blutspender.....	46
4.4 Splicingvarianten und Punktmutationen, die wichtige Funktionsdomänen des GRAF-Gens betreffen.....	46
<u>5. Diskussion</u>	49
5.1 Diskussion der gefundenen Deletionen und Punktmutationen.....	49
5.1.1 Deletionen.....	49
5.1.2 Punktmutationen.....	50
5.2 Biologische Funktion von GRAF.....	51
5.3 Verlust der SH3-, PH- oder GAP-Domäne	52
5.4 Regulationsmechanismen, die GRAF möglicherweise beeinflussen.....	54
5.4.1 Interaktion zwischen Graf GAP und RhoA.....	54
5.4.2 Graf 2.....	55
<u>6. Zusammenfassung</u>	56
<u>7. Danksagung</u>	60
<u>8. Anhang</u>	61
<u>9. Literatur</u>	67
<u>10. Erklärung</u>	73
<u>11. Lebenslauf</u>	74

Verwendete Abkürzungen und Begriffe

AML	A kute m yeloische L eukämie
AS	A minosäure
CIP	c alf i ntestine p hosphatase
CML	C hronisch m yeloische L eukämie
Deletion	Verlust eines Chromosomen- oder DNA-Abschnitts
del(xq)	Verlust des langen Arms des Chromosoms Nr. x
DNA	d eoxyribonucleid a cid
E	A minosäure G lutaminat
EDTA	e thylene d iamine t etraacetic a cid
FAB	Durch eine F ranzösisch- A merikanisch- B ritische Arbeitsgruppe, nach morphologisch-zytochemischen Kriterien ausgearbeitetes Leukämieklassifikationssystem
FAK	F ocal A dhesion K inase. Thyrosinkinase, die an der Signalübertragung der Zelle mitwirkt
FISH	F luoreszenz- i n- s itu H ybridisierung. Eine Form der in-situ Hybridisierung von Chromosomen, bei der die Nukleinsäuresonde mit einem eingebauten Fluorophor, das unter UV-Lichtbestrahlung fluoresziert, markiert wird
GAP	G uanosin- T riphosphatase- a ktivierendes P rotein
GRAF	G Tase R egulator A ssociated with F AK (humanes GRAF-Gen)

Graf	GTPase regulator associated with FAK (Graf-Gen des Huhns)
Inv	Inversion: Umkehrung eines Chromosomenstücks um 180° mit möglichen Veränderungen im Phänotyp
kb	Kilobasen
MLL	Mixed Lineage Leukemia , oder Myeloid/Lymphoid Leukemia
mRNA	messenger RNA
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
N	Aminosäure Asparagin
nested-PCR	PCR-Verfahren, bei dem die Zielsequenz zunächst durch ein extern und nachfolgend durch ein inter gelegenes Primerpaar amplifiziert wird
PH	Plechstrin Homology
Promotor	Kombination kurzer Sequenzelemente, an die die RNA-Polymerase bindet, um die Transkription eines Gens zu starten
R	Aminosäure Arginin
RACE-PCR	Rapid Amplification of cDNA Ends . Eine auf der PCR basierende Methode unbekannte cDNA-Enden zu isolieren
Ras	rat sarkoma
RNA	ribonucleid acid
RT-PCR	reverse transcriptase-PCR . PCR-Verfahren, bei dem die mRNA zunächst in cDNA umgeschrieben und nachfolgend amplifiziert wird

SH3 **src** homology 3

Spleißen Beim RNA-Spleißen werden die Intronbereiche der RNA von einer Endonuklease herausgeschnitten und entfernt und die Exonsequenzen an ihren Enden miteinander verbunden (gespleißt)

TEMED **Tetramethyl-ethanyldiamin**: Starter bei der Polymerisation des Acrylamidgels

U/min **U**mdrehungen pro **M**inute

V Aminosäure Valin

Western-Blotting-Methode Verfahren zum differentiellen Nachweis von Proteinen nach elektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf Membranen

WHO **W**orld **H**ealth **O**rganization

***** Patient

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN:

Abbildungen Text:

- 1: Mechanismen der Onkogenaktivierung
- 2: Model zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen nach der Hypothese von Knudson
- 3: Chromosom 5
- 4: Funktionell wichtige Domänen der GRAF-Sequenz
- 5: Lokalisation der PCR-Primer
- 6: RT-PCR der GRAF cDNA-Fragmente c1 und c4
- 7: Kontrollgel nach Restriktionsansatz
- 8: Agarplatte mit blauen und weißen Kolonien
- 9: Fragmente aus Abbildung 7 nach Klonierung
- 10: Sequenzierungsdaten Patient 7
- 11: RT-PCR 14 gesunder Blutspender
- 12: AS-Abbruch nach Stop-codon
- 13: Splicingvarianten von GRAF
- 14: AS-Sequenz der GRAF cDNA-Sequenz
- 15: Ras-Signalübertragung

Abbildungen Anhang:

- I: GRAF-cDNA
- II: Plasmid pBluescript

Tabellen Text:

- 1: Patientenliste
- 2: Übersicht der sequenzierten Klone
- 3: Übersicht der nachgewiesenen Punktmutationen
- 4: Punktmutationen und Deletionen in der GRAF GAP-Domäne

Tabellen im Anhang:

- I: PCR-Primer
- II: Sequenzierungsprimer

1. EINLEITUNG

1.1 Myelodysplastisches Syndrom (MDS) und akute myeloische Leukämie (AML) im Kindesalter

1.1.1 MDS

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind eine heterogene Gruppe klonaler Stammzellerkrankungen 1, 2, die vor allem bei älteren Menschen, selten jedoch auch bei Kindern auftreten. Die Ätiologie und Pathogenese des MDS ist unbekannt. Das Knochenmark weist dysplastische Veränderungen in mindestens einer, meist jedoch mehreren myeloischen Zellreihen auf. Es kommt zum Knochenmarkversagen mit Zytopenie im peripheren Blutbild. Das MDS ist durch einen langsam progredienten, oft über Jahre scheinbar stabilen Verlauf gekennzeichnet. Vom primären MDS wird die Gruppe der sekundären MDS nach antineoplastischer oder immunsuppressiver Therapie oder bei genetischer Prädisposition abgegrenzt.

Untersuchungen zur molekularen Pathogenese des MDS haben gezeigt, dass bei etwa der Hälfte der Patienten chromosomale Anomalien, insbesondere numerische Aberrationen wie Monosomie 5 oder 7, Trisomie 8, Verlust des Y-Chromosoms und strukturelle Anomalien, wie Deletion am langen Arm von Chromosom 5 (5q⁻-Syndrom), 7 oder 8³ und 20⁴ auftreten.

Die Inzidenz des MDS liegt bei etwa 3/100.000 Einwohner/Jahr, ist jedoch stark altersabhängig. So liegt die Inzidenz der Patienten unter 49 Jahren zwischen 0,2-0,7/100.000/Jahr⁵, bei Patienten zwischen 50 und 69 Jahren beträgt sie 1,6-15/100.000/Jahr⁶ und steigt schließlich bei Patienten über 70 Jahren auf Werte zwischen 15-89/100.000/Jahr⁷. Sie ist jedoch insgesamt niedriger als für die akuten Leukämien. Dass die Diagnose des MDS zunehmend häufiger gestellt wird, liegt zum einen an der verbesserten Diagnostik, zum anderen aber insbesondere an dem starken Anstieg der Erkrankungshäufigkeit im höheren Lebensalter. Etwa ein Drittel der sekundär myeloischen Leukämien nach Radio- oder Chemotherapien manifestieren sich zunächst als MDS.

Die Erkrankung verläuft progressiv und mündet nach unterschiedlich langem Verlauf in einer akuten Leukämie mit schlechter Prognose. In der Behandlung besitzen supportive Maßnahmen einen hohen Stellenwert, eine kurative Chance besteht heute durch eine allogene Knochenmarkstransplantation.

Die Nomenklatur des MDS richtet sich nach der FAB-(**F**rench-**A**merican-**B**ritish) Klassifikation 8, 9. Dabei werden nach morphologischen Charakteristika (Anzahl der Myeloblasten und Ringsideroblasten im Knochenmark, Anzahl der Blasten und Monozyten im Blut und Anwesenheit von Auerstäbchen) fünf Subgruppen unterschieden: Refraktäre Anämie (RA), Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS), Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuß (RAEB), RAEB in Transformation (RAEB/T) und Chronische myelozytäre Leukämie (CMML).

1.1.2 AML

Die Leukämien bilden mit einem Anteil von 35-40% den größten Anteil aller kindlichen Malignome. Die **akute myeloische Leukämie (AML)** ist mit 18% aller Leukämien die zweithäufigste Leukämie im Kindesalter. Die Inzidenz liegt bei 0,6/100.000 Kindern unter 15 Jahren. Ein Altersgipfel liegt bei Säuglingen und Kinder unter 2 Jahren, Junge erkranken im Verhältnis 1,1:1 häufiger als Mädchen.

Die Ätiologie der Leukämien ist unbekannt. Prädisponierende Faktoren sind chromosomale Abnormalitäten, Immundefekte, radioaktive Strahlung und kanzerogene Substanzen. Es findet sich ein unkontrolliertes Wachstum unreifer hämatopoetischer Zellen, die zu einer Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark führen und unterschiedliche extramedulläre Organe infiltrieren. Hierdurch entwickelt sich neben den Symptomen der Organinfiltration eine Knochenmarksinsuffizienz mit Anämie, Thrombozyto- und Granulozytopenie. Die Klassifizierung erfolgt nach der FAB-Klassifikation der AML¹⁰, bzw. nach der WHO-Klassifikation (http://www.dartmouth.edu/~nlevy/WHO_Classification.html' ACUTE.LEUKEMIAS) und richtet sich nach morphologischen, zytochemischen, immunologischen, biochemischen, zytochemischen und molekulargenetischen Befunden, wodurch eine risikoadaptierte Therapie ermöglicht wird. Die Diagnose wird durch die Untersuchung des Blutbildes und

des Knochenmarks gestellt. Durch Blutung oder Leukostase infolge einer Hyperleukozytose besteht das Risiko eines Fröhrtodes, das bei einer akuten Monoblastenleukämie am höchsten ist.

Die Therapie umfasst supportive Maßnahmen zur Verhinderung hämorrhagischer Komplikationen und der Leukostase und eine Polychemotherapie.

Die AML lässt sich prognostisch in Risikogruppen einteilen. Die wichtigsten Kriterien zur Einteilung sind der Subtyp der AML, die Leukämiezellmasse bei Diagnosestellung, sowie morphologische und zytogenetische Befunde.

Der stärkste prognostische Faktor bei der AML ist das Vorliegen bestimmter Chromosomenveränderungen. Die Translokation t(8;21), t(15;17) und die Inversion inv 16 gelten als prognostisch besonders günstig. Veränderungen am Chromosom 5 und 7 als besonders ungünstig ^{11, 12}. Ungefähr 80% der Patienten erreichen eine komplette Remission. Die Überlebenswahrscheinlichkeit nach 5 Jahren liegt bei 45% ¹³.

1.2 Tumorentwicklung

Chromosomale Anomalien, im Zusammenhang mit hämatologischen Erkrankungen, verändern die normale Struktur und Funktion der für die Kontrolle der Proliferation und Differenzierung der Zellen verantwortlichen Gene.

Man geht davon aus, dass für die Tumorentwicklung zwei Prozesse von entscheidender Bedeutung sind: die Expression und Aktivierung von Onkogenen sowie der Verlust oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen.

1.2.1 Funktion von Protoonkogenen

Protoonkogene sind unter normalen Bedingungen an Wachstum und Differenzierung der Zelle beteiligt. Gemäß ihrer zellulären Funktion können sie in folgende fünf Hauptgruppen unterteilt werden: Wachstumsfaktoren, Zelloberflächenrezeptoren, Bestandteile des intrazellulären Signalübermittlungssystems, Transkriptionsfaktoren und cyclinabhängige Kinasen und Kinaseinhibitoren. Wie in Abbildung 1 dargestellt, können

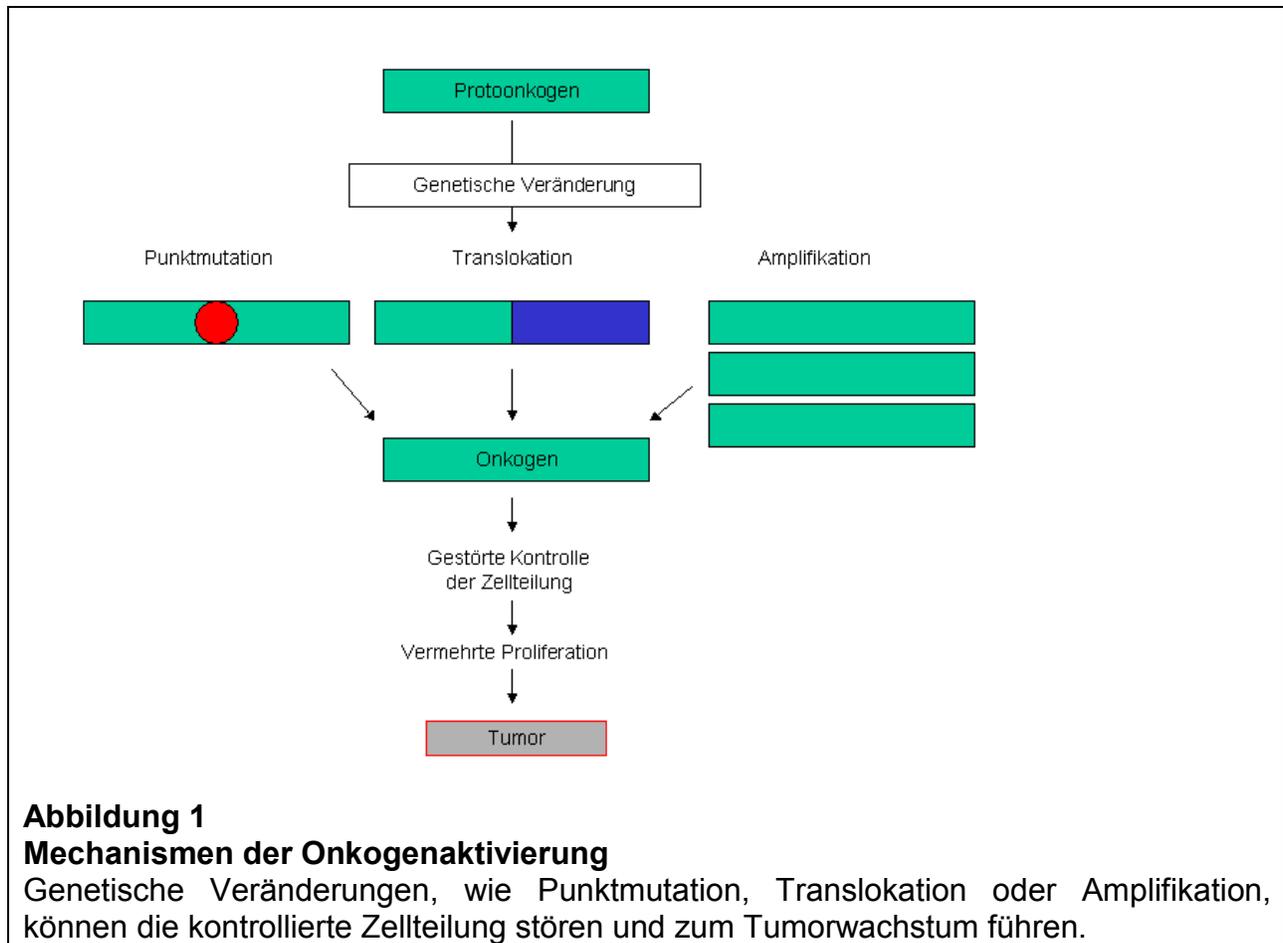
durch Überexpression, Translokation oder eine Mutation Protoonkogene in Onkogene umgewandelt und so die Entstehung eines Tumors begünstigt werden. Seit Ende der 70er Jahre konnten bereits über 250 Onkogene isoliert werden.

Onkogene sind dominante Gene, so dass bereits die Veränderung eines Allels ausreicht, um die normale Zellteilung zu stören und zur Bildung eines neoplastischen Phänotyps zu führen.

Das bekannteste Beispiel einer tumorspezifischen Translokation wurde 1960 von Nowell und Hungerford durch das Philadelphia-Chromosom ¹⁴ beschrieben, welches man bei 90% der Patienten mit CML findet. Hierbei kommt es, durch eine reziproke Translokation von Teilen des langen Arms des Chromosoms 9 auf das Chromosom 22 [t(9q;22q)], zur Expression eines onkogenen Fusionsproteins, Bcr-Abl. Es wird eine Hybrid-mRNA transkribiert, die für eine Proteinkinase kodiert, die durch die Phosphorylierung bestimmter Zielproteine vermutlich für die ungebremste Zellvermehrung der Krebszellen verantwortlich ist.

Auch bei der Ätiologie des Burkitt-Lymphoms spielt die Aktivierung eines Onkogens eine zentrale Rolle. Bei 75-85% der Patienten findet man eine charakteristische chromosomale Translokation, bei der c-myc von Chromosom 8 in die Nähe eines Immunglobulin-Locus, meist auf Chromosom 14, gebracht wird ¹⁵. Dadurch gelangt das Onkogen unter die Kontrolle von Enhancern des Immunglobulin-Locus, was zu einer erhöhten Transkriptionsaktivität/Amplifikation führt.

Ein Beispiel für ein durch Punktmutation aktiviertes Onkogen ist das Protoonkogen Ras. Ras-Proteine sind an der Übermittlung von extrazellulären Signalen, z.B. nach Stimulation von Wachstumsfaktoren beteiligt. Die durch das Protoonkogen Ras kodierten Proteine besitzen eine Schlüsselrolle bei der malignen Transformation zahlreicher hämatologischer Neoplasien und solider Tumoren. Eine mutationsbedingte Aktivierung des Ras-Signalweges ist bei etwa 10-30% der myelodysplastischen Syndrome und der akuten myeloischen Leukämien nachweisbar.



1.2.2 Funktion der Tumorsuppressorgene

Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, durch Mutation, Deletion oder Expressionsverlust, spielt bei der Entstehung der meisten menschlichen Neoplasmen eine wichtige Rolle.

Mutationen in Tumorsuppressorgenen sind rezessiv und gehen mit einem Funktionsverlust einher. Es kommt nur durch den Verlust beider Allele zu einem unkontrollierten Zellwachstum. Meist ist ein Allel deletiert, während das zweite Allel durch verschiedene andere Mutationen in seiner Funktion gestört sein kann. Die heutige Vorstellung über die Funktion von Tumorsuppressorgenen geht auf eine Studie von Knudson aus dem Jahr 1971 über das Retinoblastom, einen seltenen, aggressiven Retinatumor des Kindesalters zurück¹⁶. 60% der Fälle treten sporadisch und einseitig

auf, die anderen 40% werden als unvollständig penetrantes autosomales Merkmal vererbt. Beim familiären Retinoblastom sind beidseitige Tumoren häufig und die Nachkommen der überlebenden Patienten weisen ein Risiko von 50% für das gleiche Leiden auf. Knudson beschrieb diesen Vorgang in seiner „Two-hit“-Hypothese ¹⁷. Schematisch wird diese in Abbildung 2 dargestellt. Zunächst kommt es, meist durch eine Mutation oder Deletion eines Allels, zum Verlust eines der Suppressorgene. Findet dieses bereits in den Keimzellen statt, weisen alle Körperzellen diese Genomveränderung auf (konstitutionelle Mutation), ist nur eine Körperzelle betroffen, so handelt es sich um eine somatische Mutation.

Wird nun durch eine Mutation das bislang noch intakte Suppressorgen ausgeschaltet, so kommt es zu einer ungebremsten Zellvermehrung. 1984 wurde Knudsons Hypothese von Cavenee und Mitarbeitern ¹⁸ in einer weiteren Studie über das Retinoblastom bewiesen und wenig später konnte sie auch auf molekularbiologischer Ebene, durch die Klonierung des Retinoblastom-Gens RB1, dem ersten Tumorsuppressorgen, bestätigt werden ¹⁹. Bis heute sind etwa 30 Tumorsuppressorgene auf molekularer Ebene charakterisiert, wobei es durch Punktmutationen, Deletionen unterschiedlichen Ausmaßes oder der Methylierung des Promotors meist zu einem Funktionsverlust von Transkriptionsfaktoren kommt.

Das bekannteste Tumorsuppressorgen ist das Phosphoprotein p53. Es schützt durch zwei unterschiedliche Mechanismen die menschliche DNA. Zum einen kann es bei ausgeprägtem DNA-Schaden die Zellproliferation stoppen und erlaubt somit die Reparatur dieser Schäden noch in der G1-Phase des Zyklus, d.h. bevor die Schäden in der S-Phase als Mutation fixiert werden. Zum anderen kommt es bei einem zu ausgedehnten DNA-Schaden zum programmierten Zelltod, der Apoptose, das unkontrollierte Wachstum entarteter Zellen wird so verhindert. Fallen diese Funktionen durch eine biallelische p53-Inaktivierung aus, so wird ein malignes Tumorwachstum begünstigt.

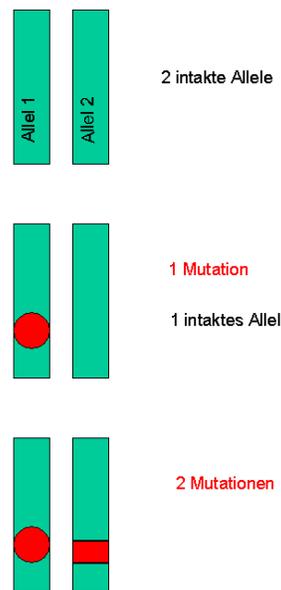


Abbildung 2
Modell zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen nach der Hypothese von Knudson

Die Abbildung veranschaulicht schrittweise den Funktionsverlust eines Tumorsuppressorgens durch Schädigung beider Allele.

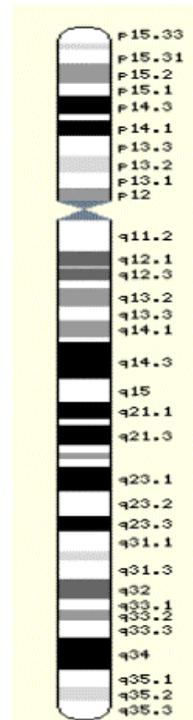
1.3 Deletion (5q)

Die Deletion (5q) war nach dem Philadelphia-Chromosom die zweite strukturelle Chromosomenveränderung, die bei hämatologischen Erkrankungen entdeckt wurde²⁰. In den folgenden 25 Jahren zeigte sich, dass Deletionen des langen Arms des Chromosoms 5 relativ häufig bei Leukämiepatienten nachgewiesen werden können, und dass die chromosomalen Deletionen verschiedene Abschnitte des langen Arms des Chromosoms 5 betreffen können²¹, die zwischen q12 und q34 als telomerer bzw. centromerer Begrenzung liegen²².

In der Region 5q31-33 finden sich zahlreiche Gene für Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren, Hormonrezeptoren und Neurotransmitterrezeptoren²³.

Obwohl sowohl die Größe, als auch die Lage der deletierten Segmente bei an AML/MDS erkrankten Patienten erheblich variieren kann, so geht dennoch in der Mehrheit der Fälle die Bande 5q31 verloren^{23; 24}.

Abbildung 3
Chromosom 5
 Region 5q31-5q33:
 Lokalisation vieler auf die Proliferation hämatologischer Zellen Einfluss ausübender Gene. Einige dieser Gene stehen unter dem Verdacht, als Tumorsuppressorgene zu fungieren.

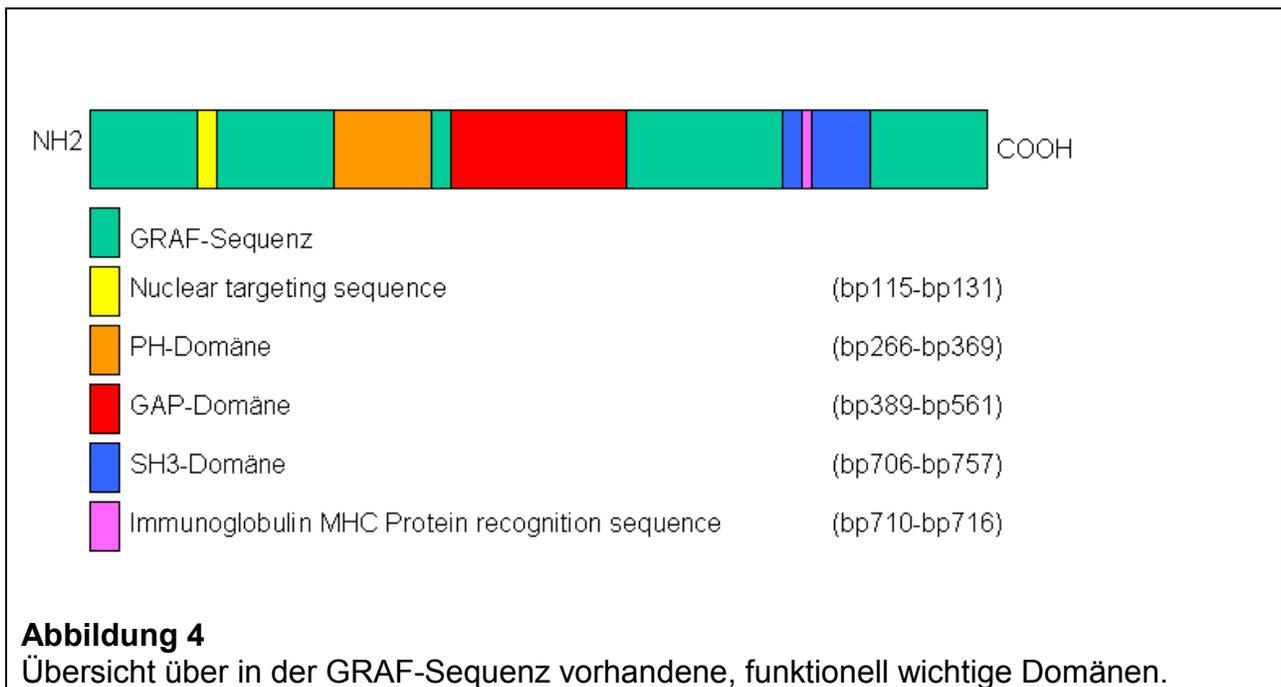


Der Hypothese von Knudson folgend, käme es zunächst zu der Deletion eines Allels. Würde nun im weiteren Verlauf ein Gen in der Region 5q31 durch kleinere Deletionen, Punktmutationen oder die Methylierung des Promotors verändert, so käme es zum biallelischen Verlust eines potentiellen Tumorsuppressorgens auf Chromosom 5q.

1.4 Das MLL-Partnergen GRAF

Mittels RACE-PCR-Technik gelang es Stig Bojesen ein neues MLL-Partnergen auf Chromosom 5q31 zu isolieren ²⁵. Es konnte ein 3163 Basenpaar großes Gen kloniert werden, dessen Protein aus 759 Aminosäuren besteht (accession no. Y10388), siehe Abbildung I im Anhang. Die Sequenz vor dem Startkodon entspricht genau der sogenannten „KOZAK-Sequenz“ CACCATGG, die für eine optimale RNA-Ablesung erforderlich ist ²⁶. Die komplette cDNA-Sequenz wurden mit Hilfe des PROSITE Computerprogramms (EMBL, Heidelberg) analysiert, um bereits vorhandene bekannte

Aminosäuresequenzen aufzudecken. Mit Hilfe dieser Sequenzanalyse war es möglich, vier bekannte Domänen zu identifizieren. Das GRAF-Protein enthält eine Guanosintriphosphat aktivierende Domäne (GAP-Domäne) zwischen den Aminosäuren Nr.389 und Nr.561. Weiterhin wurde am Carboxyterminus eine SH3-Domäne (AS Nr.706-757), eine nukleäre Targetsequenz (AS Nr.115-131) sowie eine Immunglobulin-Erkennungssequenz (AS Nr.710-716) gefunden (siehe Abbildung 4). Die Gesamtlänge der DNA wird auf etwa 120 kb geschätzt.



Es handelt sich also bei diesem neu isolierten MLL-Partnergen um ein zur Familie der GTPase-aktivierenden Proteine (GAP) gehörendes Gen. Mit Hilfe des Programms FASTA konnte gezeigt werden, dass die cDNA dieses Gens zwischen den Aminosäuren Nr.170-759 bis zu 92% mit einem von Hildebrand, Taylor und Parsons isolierten Gen beim Huhn übereinstimmt ²⁷.

Da die Src homology 3 (SH3) Domäne des Proteins beim Huhn ein Bindungsglied zu dem pp125 focal adhesion kinase (pp125 FAK) Protein darstellt, wurde dieses Gen Graf (für GTPase regulator associated with FAK) genannt. Es ist anzunehmen, dass das neu isolierte MLL-Partnergen auf 5q31 dem Graf-Gen beim Huhn entspricht, weshalb es als humanes GRAF-Gen bezeichnet wird.

2. PROBLEMSTELLUNG DER ARBEIT

Die Deletion 5q31 gehört mit 5-10% zu den häufigsten spezifischen Veränderungen bei Patienten mit MDS/AML^{23; 24}.

Die chromosomale Lokalisation von GRAF in der Region 5q31 veranlasste uns, die Rolle des GRAF-Gens bei der Entstehung hämatologischer Erkrankungen bei an MDS/AML erkrankten Patienten, die eine Deletion 5q aufwiesen, weiter zu untersuchen. Durch Klonierung und Sequenzierung des GRAF-Gens bei insgesamt 14 MDS/AML Patienten mit zytogenetisch nachgewiesenen Aberrationen des Chromosoms 5q sollte nach Mutationen, Deletionen und Insertionen des noch vorhandenen GRAF-Gens gesucht werden, die möglicherweise einen Funktionsverlust des Gens nach sich ziehen könnten.

Dazu wurden folgende Schritte durchgeführt:

1. Amplifizierung der GRAF-Sequenz mit Hilfe einer semi-nested PCR
2. „Sticky-end“-Klonierung, da bei einem möglicherweise sehr geringen Tumorzellanteil im Patientenmaterial eine Untersuchung durch direkte Sequenzierung nicht sehr erfolgversprechend wäre
3. Sequenzanalyse der klonierten Fragmente, um gegebenenfalls Punktmutationen, Deletionen und Insertionen nachzuweisen
4. Untersuchung von 15 gesunden Blutspendern, um die GRAF-Mutationen von Genpolymorphismen abzugrenzen

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial dienten Blut- bzw. Knochenmarkspuren von 14 Patienten (Tabelle 1), die an MDS/AML erkrankt waren und in der zytogenetischen Untersuchung eine Deletion des langen Arms eines der Chromosomen Nr.5 aufwiesen, sowie die Zelllinie OHNGM.

PATIENT NR.	GESCHLECHT	ALTER BEI DIAGNOSE	DIAGNOSE
1	w	2 Monate.	JMML
2	m	1 8/12 Jahre	JMML
3	m	10 6/12 Jahre	AML
4	w	5 3/12 Jahre	MDS
5	m	13 11/12 Jahre	MDS
6	w	16 2/12 Jahre	MDS
7	w	2 11/12 Jahre	MDS, CMML
8	w	16 1/12 Jahre	MDS, CMML
9	m	5 5/12 Jahre	AML
10	m	9 2/12 Jahre	AML
11	m	10 3/12 Jahre	AML
12	w	7 8/12 Jahre	AML
13	w	8 5/12 Jahre	AML
14	m	8 1/12 Jahre	AML

Tabelle1

Klinische Daten der 14 untersuchten Patienten

Das potentielle Tumorsuppressorgen GRAF (**G**T**P**ase regulator associated with **FAK**), das sich auf Chromosom 5q31 befindet, wurde unter Verwendung der in Tabelle I im Anhang aufgeführten Primer (Oligonukleotide), in fünf (c0-c4) sich überlappenden Fragmenten amplifiziert. Dazu wurde die mRNA zunächst in cDNA umgeschrieben und anschließend eine RT-PCR durchgeführt. Um die Spezifität zu steigern wurde ein semi-nested-PCR Ansatz verwendet. Die einzelnen Fragmente wurden anschließend kloniert und sequenziert, um gegebenenfalls Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen nachzuweisen.

Um die Ergebnisse von Genpolymorphismen abzugrenzen, wurden im Anschluss Proben von gesunden Blutspendern ebenfalls auf mögliche Abweichungen in der GRAF-Sequenz hin untersucht.

3.2 Isolierung genomischer DNA

Die genomische DNA wurde aus 5×10^6 Leukozyten mittels Aussalzung²⁸ mit dem Kristal Genomic Kit von Cambridge Molecular Technologies, (Cambridge, UK) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Die Zellen wurden bei 1500 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 300µl Puffer Gen I (10mM TrisHCl pH 7,6; 10mM MgCl₂, 2mM EDTA, 2,5% Nonidet P-40) lysiert. Nach Zugabe von 300µl hochkonzentriertem Salzpuffer Gen II (10mM TrisHCl pH 7,6; 10mM KCl, 10mM MgCl₂, 0,4M NaCl, 2mM EDTA, 0,7% SDS) wurden die Proben bei 55° C 30-60 min inkubiert. Waren die Patientenproben sehr koaguliert, was bei Knochenmarkspunktaten häufig der Fall ist, wurde ein Proteinase K Verdau bei 37° C über Nacht durchgeführt: Dazu wurden die Zellen in 10mM Tris-Puffer pH 7,8 mit 0,5% SDS gelöst und Proteinase K bis zu einer Endkonzentration von 2µg/µl zugesetzt. Anschließend wurden durch die Zugabe von 150µl 6M NaCl die Proteine gefällt und durch Zentrifugation (20.000 U/min, 5 min) pelletiert. Die genomische DNA wurde durch Zugabe von 2 Volumen 100% Isopropanol aus dem Überstand gefällt. Nach Zentrifugation (20.000 U/min, 10 min.) wurde das DNA-Pellet mit 200µl 70% Ethanol gewaschen und bei 37° C getrocknet, bevor die DNA in 100µl 10mM TrisHCl pH 7,6 oder Wasser über Nacht gelöst wurde.

3.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmid DNA wurde mit dem Plasmid Mini Kit Quiagen, (Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dazu wurden 4ml der in LB-(Luria-Bertani) Medium über 12-16 Stunden geschüttelten Bakteriensuspension abzentrifugiert (2.600 U/min, 1 min), in 250µl Puffer P1 gelöst (50mM TrisHCl pH 8,0, 10mM EDTA, 100µg/ml RNase A), und durch die Zugabe von 250µl Puffer P2 (200mM NaOH, 1% SDS) für 5 min, lysiert. Durch die Zugabe von 350µl Puffer N3 wird die Bakterien-DNA gefällt und an große Salz-Bindungspartikel gebunden. Die hohe Salzkonzentration bewirkt eine Fällung denaturierter Proteine, chromosomaler DNA sowie von Zelltrümmern, während die kleinere Plasmid-DNA in Lösung bleibt. Nach 10 min Zentrifugieren (10.000 U/min) bildet sich ein weißes Pellet. Der Überstand, in dem die Plasmid-DNA gelöst ist, wird nun in die dafür vorgesehenen QIAprep Säulen überführt, wiederum 1 min bei 10.000 U/min zentrifugiert und die abzentrifugierte Flüssigkeit wird verworfen. Mit 0,75 ml des Puffers PE werden die QIAprep Säulen durch Zentrifugieren gewaschen, die abzentrifugierte Flüssigkeit wird verworfen und durch erneutes Zentrifugieren der noch verbleibende Puffer entfernt (jeweils 10.000 U/min, 1 min). Um die DNA aus den QIAprep Säulen zu lösen, werden 50µl nucleasefreies Wasser in die Mitte der Säulen pipettiert und diese nach einer Minute erneut zentrifugiert (10.000 U/min, 1 min) wobei die gelöste DNA in einem sauberen Cup aufgefangen wird.

3.4 Isolierung von RNA

Die Gesamt-RNA wurde mit Trizol® Gibco (Karlsruhe, Deutschland) aus Leukozyten aus Blut oder Knochenmark nach Angaben des Herstellers isoliert. Diese Methode beruht auf einer Guanidiniumthiozyanat/Phenol Extraktion die von Sacchi und Chomczynski ²⁹ beschrieben wurde. Das Guanidiniumthiozyanat zerstört als denaturierendes Agens die zellulären Membranen und fungiert als Inhibitor von ubiquitären RNAsen.

5-10x10⁶ Zellen aus Zellkulturen oder aus Patientenmaterial wurden in 1ml Trizol® durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren lysiert und 5 min bei 15-30° C inkubiert, um Proteine und RNA voneinander zu trennen. Nach der Zugabe von 0,2ml Chloroform und Zentrifugation (12.000 U/min, 15 min, 2-8° C) wurde die RNA aus der oberen, wässrigen Phase isoliert und mit 0,5ml 100% Isopropanol gefällt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min wurden die Proben erneut zentrifugiert (max. 12.000 U/min, 10 min, 4° C) und das RNA-Pellet anschließend mit 1ml 75% Ethanol gewaschen. Hierzu wurden die Proben durch Vortexen gemischt und abzentrifugiert (7.500 U/min, 5 min, 4° C). Nachdem das Pellet anschließend noch 5-10 min offen trocknete, wurde es in RNase-freiem Wasser durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren und Inkubation bei 60° C für 10 min gelöst.

3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

DNA- und RNA-Konzentrationen entsprechender Lösungen sowie die Reinheit der Proben wurden mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt. Die Messungen erfolgten bei $\lambda=230\text{nm}$, 260nm , 280nm und 320nm in einer kein UV-Licht absorbierenden Quarzküvette mit einer Schichtdicke von $d = 1 \text{ cm}$.

Für die Konzentrationsbestimmung wurde folgende Formel³⁰ herangezogen:

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = \text{OD}_{260} \times n \times f$$

c	Konzentration der Ausgangslösung
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei $\lambda=260\text{nm}$
n	Eichfaktor: 50 für dsDNA, 40 für ssRNA
f	Verdünnungsfaktor

Der bei $\lambda=230\text{nm}$ gemessene Wert gibt Aufschluss über den Salzgehalt der Lösung, die Extinktion bei $\lambda=280\text{nm}$ gibt den Proteingehalt wieder, der Wert bei $\lambda=320\text{nm}$ weist auf sonstige Verunreinigungen hin.

Bei einem Quotienten $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ zwischen 1,6-1,8 ist die DNA-Lösung ausreichend gereinigt.

3.6 cDNA-Synthese

Zur Herstellung von cDNA als PCR-Template wurde das Superscript First Strand Synthese-System der Firma Gibco (Karlsruhe, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Für alle RT-PCR Reaktionen wurden 1-2 μg der isolierten Gesamt-RNA unter Verwendung des folgenden Ansatzes in komplementäre cDNA transkribiert.

4 μl	5 x First Strand Buffer
5 μl	dNTPs, 2mM von jedem dNTP, insgesamt 8mM
2 μl	Dithiothreitol, 100mM (DTT)
1 μl	RNAsin, 33 U/ μl , Promega, Mannheim
1 μl	Random hexamer Primer, 100 μM , Roche Mannheim
1 μl	Superscript, 200 U/ μl (reverse Transkriptase)
Wasser ad 20 μl	

Zur Verringerung von RNA-Sekundärstrukturen wurde die isolierte RNA vor Einsatz in die cDNA Synthese für 5 min bei 65° C inkubiert, anschließend wurden die Proben 60 min bei 37° C inkubiert und 5 min auf 95° C erhitzt, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren. 1-5µl der so hergestellten cDNA wurden als Template in die RT-PCR eingesetzt.

3.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein zyklisches Verfahren zur exponentiellen in-vitro-Vermehrung eines beliebigen DNA-Abschnitts. Voraussetzung ist, dass die Sequenzen an beiden Enden des DNA-Abschnitts bekannt sind, da zu Beginn der PCR zwei Oligonukleotide mit dem DNA-Molekül hybridisieren müssen. Die PCR besteht aus 3 temperaturabhängigen Reaktionsschritten³¹. Nach initialer Denaturierung der doppelsträngigen Ausgangs-DNA bei 94° C zu Einzelsträngen werden die zwei („sense“ und „antisense“), meist 18-30 Basenpaare langen Oligonukleotide (Primer) an die Einzelstrang-DNA angelagert („Annealing“). Die Annealingtemperatur liegt meist zwischen 50° C und 72° C und richtet sich nach Länge und G/C-Gehalt der Primer. Sie wurde für alle PCR-Protokolle empirisch bestimmt. Im 3. Reaktionsschritt der PCR initiieren die Primer bei 72° C die Neusynthese des jeweils komplementären DNA-Stranges, unter Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase, die von dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird. Die Verwendung dieses hitzestabilen Enzyms ermöglicht das mehrmalige Durchlaufen aller 3 Reaktionsabschnitte, ohne dass die Enzymaktivität durch die Hitzedenaturierung bei 94° C entscheidend verringert wird. Der Kreislauf aus Denaturierung, Hybridisierung und Synthese wird in der Regel 25-30 mal wiederholt. Bei geringer Produktmenge in den ersten Zyklen der PCR und hoher Polymerase-Enzymaktivität resultiert eine Verdoppelung der Ausgangsmenge der DNA in jedem PCR-Zyklus (exponentielle Phase der PCR). Es ergibt sich damit ein theoretischer Vermehrungsfaktor von 2^n , wobei n die Anzahl der durchlaufenen Zyklen angibt. Nach dem Durchlaufen mehrerer PCR-Zyklen kommt es jedoch durch zunehmende Anhäufung von PCR-Produkten, Enzymaktivitätsverlust der Polymerase und komplizierter Interaktion zwischen sich akkumulierenden DNA-Fragmenten nur noch zu

einer linearen Amplifikation, bzw. letztlich zu einer Plateauphase ohne nennenswerte Neusynthese von DNA-Fragmenten.

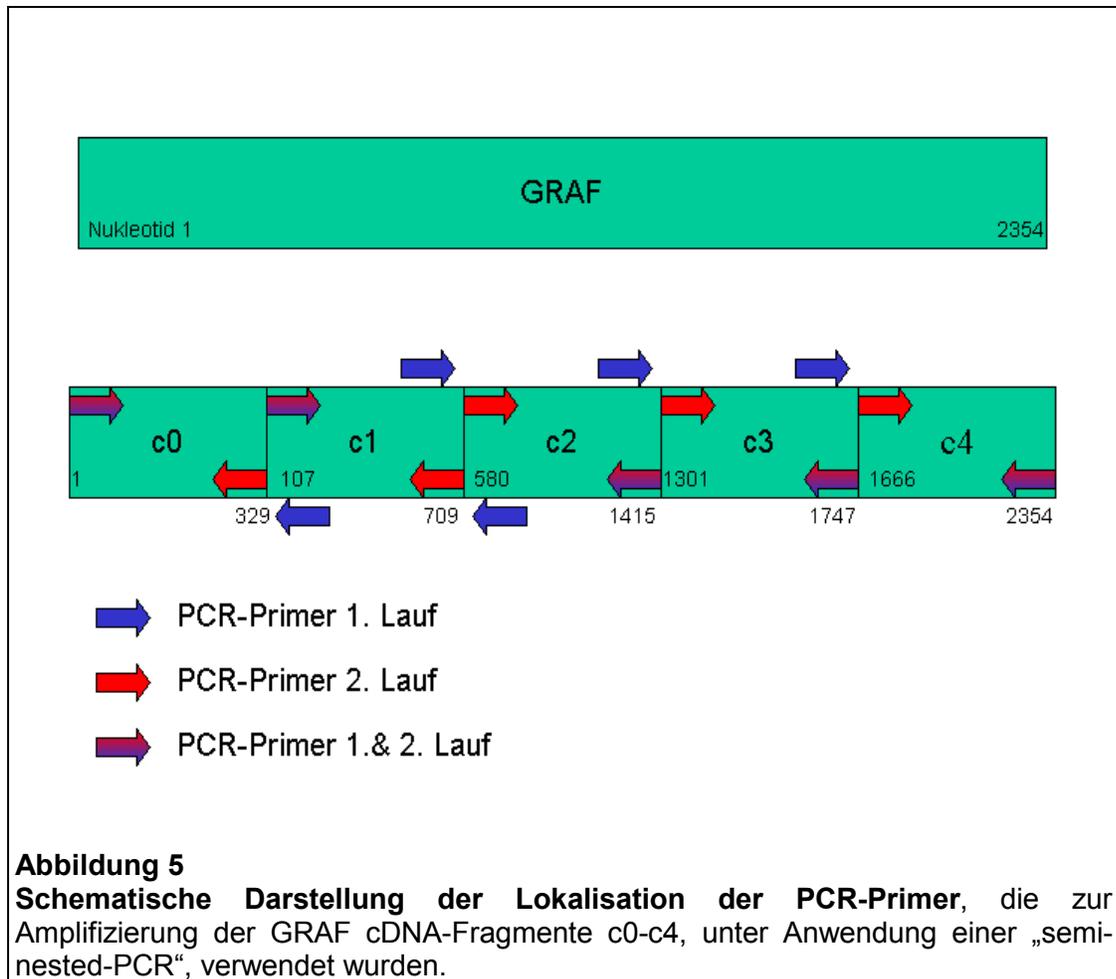
Ein üblicher PCR-Ansatz von 50µl setzt sich wie folgt zusammen:

5,0µl 10 x Reaktionspuffer (200mM Tris HCl pH 8,4; 500mM KCl,
50mM MgCl₂)
1,5µl MgCl₂ (50mM)
5,0µl dNTPs, jeweils 2mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, insgesamt
8mM
1,0µl sense Primer (20µM)
1,0µl antisense Primer (20µM)
0,5µl Taq-Polymerase (5U/µl)
1-5µl DNA als Ausgangstemplate (1-100ng/µl)
Wasser ad 50µl

Durch das Hintereinanderschalten von 2 PCR-Läufen („nested-PCR“), lässt sich die Sensitivität und Spezifität der PCR deutlich erhöhen. Hierzu müssen die PCR-Primer des 2. Laufs innerhalb der im 1. Lauf amplifizierten DNA-Sequenz liegen (Abbildung 5). In den 2. Lauf wird dabei meist 1µl (4-20pmol) des Reaktionsgemisches aus Lauf 1 als Ausgangstemplate eingesetzt.

Temperaturprofil:

94° C - 1 min
(94° C - 15 sec; 60° C - 30 sec; 72° C - 1 min) 1.Lauf: 25 Zyklen
2. Lauf: 30 Zyklen
72° C - 10 min
4° C - Lagerungstemperatur



3.8 Reinigung von PCR-Produkten

Um PCR-Produkte zu klonieren oder direkt zu sequenzieren, wurden sie mit Hilfe des QIAquick Spin Kits Qiagen (Hilden, Deutschland) nach den Richtlinien des Herstellers gereinigt. Die DNA wurde in 50µl H₂O gelöst und entsprechend genomischer DNA quantifiziert. Das PCR-Produkt kann auch nach einem Gel-Lauf isoliert werden, indem die DNA aus dem Agarosegel extrahiert wird.

Dazu wurde die gewünschte Bande zunächst unter UV-Licht bei $\lambda=320\text{nm}$ mit einem scharfen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und ge-wogen. Nach der Zugabe von QG-Puffer (3 Anteile Puffer auf einen Anteil Gel, siehe Anhang), der die Bedingungen schafft, unter denen sich die DNA später an die Silika-Membran des QIAquick Systems bindet, wurde das Agarosegel etwa 10 min bei 50° C inkubiert, bis es sich vollständig gelöst hatte. Bei der Reinigung von DNA-Fragmenten zwischen 500bp

und 4kb konnte durch die Zugabe von Isopropanol (1 Anteil Isopropanol auf einen Anteil Agarosegel), die Ausbeute an DNA gesteigert werden. Um die DNA zu binden, wurde die Probe in eine QIAquick Säule überführt und zentrifugiert (10.000 U/min, 1 min). Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen und durch die erneute Zugabe von 0,5ml QG-Puffer auf die Säule wurden alle Spuren des Agarosegels entfernt. Durch Hinzufügen von 0,75ml PE-Puffer (siehe Anhang) und zweimaliges Zentrifugieren (10.000 U/min, 1 min), wurde die DNA gewaschen. Dabei ist es wichtig, den Durchfluss vor der zweiten Zentrifugation zu entfernen, da sonst das zurückbleibende Ethanol des Puffers PE nicht vollständig entfernt wird. Um die DNA zu lösen, wurden 50µl H₂O in die Mitte der Säule pipettiert und diese eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und die gelöste DNA in einem sauberen Cup aufgefangen. Das zur Lösung verwendete Wasser soll einen pH-Wert zwischen 7,0 und 8,5 aufweisen, da in diesem Bereich die Elutionseffizienz am höchsten ist.

3.9 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse und Auftrennung sowie zur preparativen Isolierung von DNA-Fragmenten wurden native Agarosegele eingesetzt. Die Agarose wurde hierzu in 1xTAE (siehe Anhang) aufgeköcht, wobei sich die Agarosekonzentration nach der zu erwartenden Fragmentlänge (1,5% bzw. 2,0%) richtete. Für die Analyse von PCR-Produkten wurden im allgemeinen 8µl PCR-Produkt mit 2µl Blaumarker (0,0625mg Bromphenol blue, 28,7ml Glycerol, 25g SDS, 5ml 0,5M EDTA pH 8,0; 16,3ml H₂O) gemischt. Als DNA-Längenstandard wurde der Marker VI (Roche, Mannheim, Deutschland) in die erste Bahn jedes Gels pipettiert, um eine Abschätzung der Fragmentlänge zu ermöglichen. Die Elektrophorese wurde bei 80-150 V / 25 mA, abhängig von der Größe des Gels und der gewünschten Auflösung, in mit 1xTAE-Puffer gefüllten Flachbettgelkammern durchgeführt. Die Färbung der DNA-Fragmente erfolgte für 10-15 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (10mg/l), woraufhin analytische Gele auf einem UV-Transilluminator bei $\lambda=254\text{nm}$, preparative Gele bei $\lambda=320\text{nm}$ betrachtet und fotografiert wurden.

3.10 DNA-Klonierung

Die zu klonierenden DNA-Fragmente (Inserts) wurden mittels PCR amplifiziert (Abbildung 6), wobei an dem sense- und antisense-PCR-Primer jeweils unterschiedliche Erkennungssequenzen für eine Restriktionsendonuklease, Not I und Sac II (siehe Anhang), am 5`Ende integriert wurden. Als Vektor wurde der prokaryontische Plasmidvektor pBluescript SK (Stratagene, Heidelberg, Deutschland; siehe Anhang Abbildung II) verwendet, der mit den gleichen in der „multiple cloning site“ schneidenden Enzymen geschnitten wurde. Die so entstandenen klebrigen Enden wurden dephosphoryliert (CIP, Roche, Mannheim, Deutschland), wodurch die Möglichkeit einer Rezirkulation des Vektors ohne Insert während der Ligation minimiert werden sollte.

Die Inserts wurden nach der PCR mit dem PCR purification Kit Qiagen, Hilden (siehe 3.8 Reinigung von PCR-Produkten) gereinigt, mit der ersten Restriktionsendonuklease geschnitten, erneut gereinigt, mit der zweiten Restriktionsendonuklease geschnitten und wiederum gereinigt.

Es wurde folgender Restriktionsansatz verwendet:

10µl	10U/µl Restriktionspuffer
5µl	10U/µl Restriktionsenzym
35µl	H ₂ O
50µl	Template (1-10µg DNA)

Für Restriktionsenzym NotI (10U/µl) Verwendung von Puffer 3 (siehe Anhang)

Für Restriktionsenzym SacII (20U/µl) Verwendung von Puffer 4 (siehe Anhang)

Dieser Ansatz wurde bei 37° C für 3-5 Stunden inkubiert. Das Plasmid wurde auf die gleiche Weise behandelt und anschließend dephosphoryliert.

Dephosphorylierungsansatz:

50µl	pBluescript geschnitten
10µl	10 x Dephosphorylierungspuffer
2µl	CIP (1U/µl)
38µl	H ₂ O

Ansatz 60 min bei 37° C inkubieren.

Nach der Reinigung wurden Inserts und Plasmid quantifiziert und auf ein Agarosegel aufgetragen (Abbildung 7). Der dephosphorylierte Vektor wurde mit dem Insert unter Verwendung von T4-DNA Ligase (Roche, Mannheim, Deutschland) und ATP bei 16° C über Nacht ligiert.

Ligaseansatz:

2µl 10 x Ligasepuffer, Roche Mannheim

1µl ATP (100mM), Roche Mannheim

1µl T4-DNA Ligase (5U/µl), Roche Mannheim

Xng Insert ($X = A \times B \times C / D$)

X = Insertmenge in ng

A = Menge des Vektors in ng

B = gewünschtes Molares Verhältnis Insert/Vektor

C = Insertlänge in bp

D = Plasmidlänge in bp

100ng Vektor (geschnitten und dephosphoryliert)

H₂O ad 20µl

Die Klonierungen wurden mit einem molaren Verhältnis Insert : Vektor von 5 : 1 erfolgreich durchgeführt.

Empfängerorganismus war in allen Fällen der apathogene Laborstamm JM 101 E.coli (Stratagene, Heidelberg, Deutschland). 20µl JM 101 E.coli wurden in 20ml Luria-Bertani (LB)- Medium (siehe Anhang) über Nacht bei 37° C und 250 U/min geschüttelt. 100µl dieser Vorkultur wurden zu 20ml LB-Medium gegeben und bei 37° C, 250 U/min für etwa 2 1/2 Stunden inkubiert, bis die Lichtabsorption der Kultur bei einer Wellenlänge von $\lambda=600\text{nm}$ einen Wert zwischen 0,3 und 0,6 erreicht hatte. Anschließend wurde die Bakteriensuspension abzentrifugiert (2.500 U/min, 20 min, 4° C) und der Überstand verworfen. Um die bakteriellen Empfängerorganismen kompetent zu machen, wurden

diese in 10ml, eisgekühlter 0,1M CaCl₂ -Lösung gelöst und weitere 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren (1.500 U/min, 20 min, 4° C) wurde das Bakterienpellet in 2ml 0,1M CaCl₂ gelöst und weitere 24 Stunden auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch Mischen des 20µl Ligaseansatzes mit 100µl der kompetenten Zellen und 30-minütiges Lagern auf Eis. Durch bisher noch ungeklärte Mechanismen bewirkt eine Erhitzung auf 42° C für 90 sec, gefolgt von einer Abkühlung auf 4° C für 10 min eine Aufnahme der zirkularisierten fremden DNA in die Zelle. Im Normalfall wird in jede einzelne Wirtszelle nur ein rekombiniertes DNA-Molekül eingeschleust, so dass später jeder einzelne Klon nur ein Molekül in vielen Kopien beherbergt.

Um die Klone, die das rekombinierte Plasmid enthalten, zu identifizieren, macht man sich zwei Mechanismen zu Nutze. Zum einen besitzt pBlueskript ein Gen für Ampicillinresistenz, welches eine Selektion der transformierten Bakterien ermöglicht. Zum anderen liegt die „multiple cloning site“ von pBlueskript im LacZ'-Gen, welches für eine Untereinheit des Enzyms β-Galactosidase codiert. Rekombinante weisen somit ein inaktiviertes LacZ'-Gen auf, so dass sie keine β-Galaktosidase mehr synthetisieren können.

Der für die Klonierung verwendete E.coli Stamm JM 101 besitzt ein verändertes LacZ-Gen, dem der Abschnitt LacZ' fehlt. Bakterien dieses Stammes können das Enzym β-Galaktosidase also nur dann bilden, wenn sie ein Plasmid, wie beispielsweise pBluescript tragen, welches den fehlenden LacZ'-Teil des Gens enthält.

Setzt man nun dem Agar X-Gal (Promega, Madison, USA), ein Lactoseanalogon, das von der Galactosidase zu einem blauen Reaktionsprodukt abgebaut wird und einen Induktor für das Enzym (IPTG) sowie Ampicillin zu, sind die Kolonien, die keine Rekombinanten enthalten, blau gefärbt. Klone die ein Insert tragen und somit die LacZ'-Region zerstört wurde können keine β-Galactosidase bilden, ihre Kolonien sind weiß (Abbildung 8).



Abbildung 8
Agarplatte mit JM 101
E. coli Klonen

Weiße Kolonien bestehen aus Klonen, die das rekombinierte Plasmid pBluescript enthalten.

Blaue Kolonien bestehen aus Klonen, die kein rekombiniertes Plasmid pBluescript und somit kein Insert enthalten.

Nach der Transformation erfolgte die Zugabe von 200µl LB-Medium ohne Ampicillin und eine erneute Inkubation der Zellen für 45 min bei 37° C. Während dessen wurden die Agarplatten durch das Ausstreichen von je 87,5µl X-Gal (50mg/ml) und 2,0µl IPTG (200mg/ml) behandelt. Anschließend wurden 100µl der Bakterien auf diese LB-Agarplatten mit Ampicillin (60µg/ml) ausplattiert. Diese wurden über Nacht bei 37° C inkubiert, wobei, um eine Vermischung der Kolonien durch vom Deckel herabtropfendes Kondenswasser zu vermeiden, die Petrischalen umgedreht wurden. Die auf den Agarplatten gewachsenen Einzelkolonien wurden in 5ml LB-Medium mit Ampicillin (60mg/ml) über Nacht bei 37° C und 250 U/min vermehrt und anschließend die Plasmid-DNA mit dem Plasmid Mini Kit Qiagen, Hilden isoliert. 600µl der Kultur wurden mit 400µl Glycerin gemischt und bei -20° C aufbewahrt. Um die Länge der Inserts beurteilen zu können, wurden die isolierten Plasmide mit den für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzymen bei 37° C für 3 Stunden geschnitten und auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen (Abbildung 9).

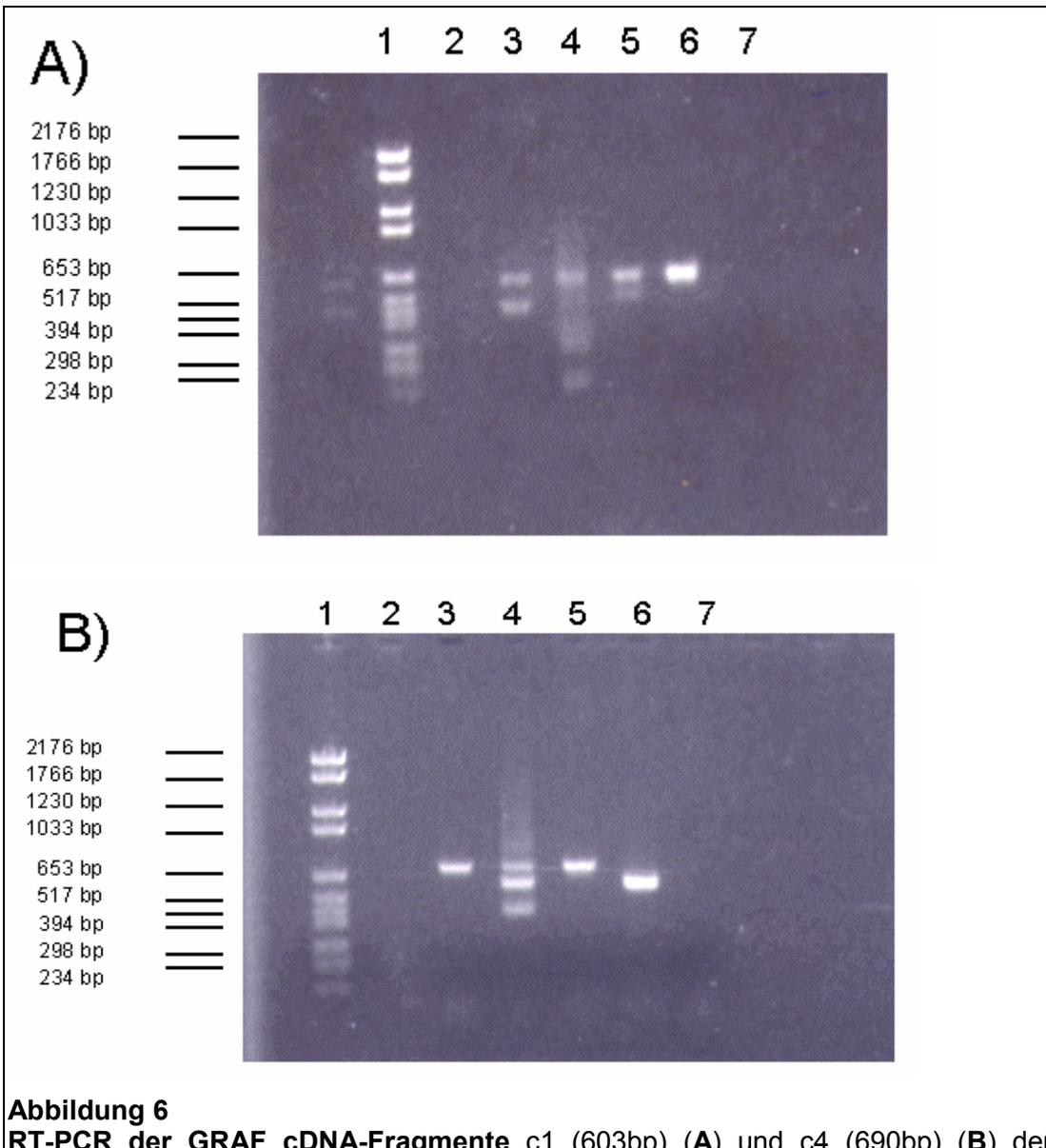
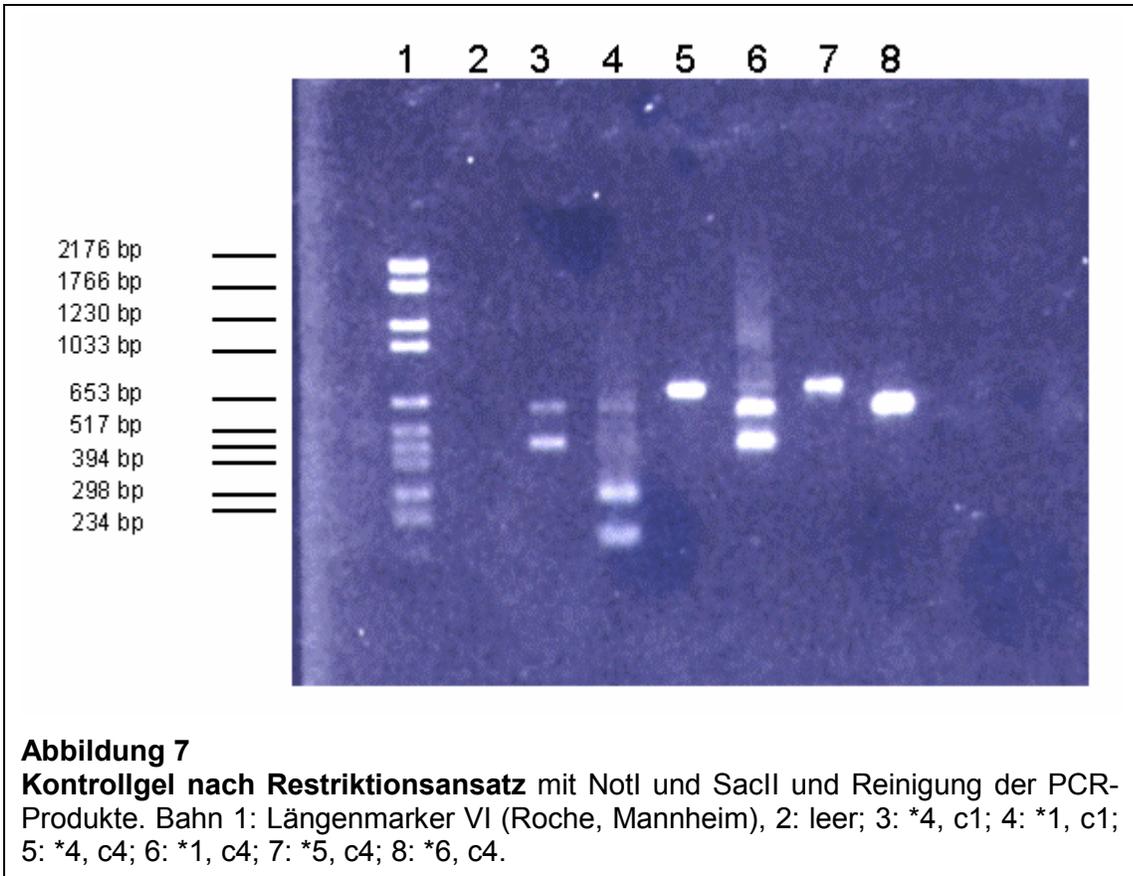


Abbildung 6

RT-PCR der GRAF cDNA-Fragmente c1 (603bp) (A) und c4 (690bp) (B) der Patienten *1, 4, 5 und 6. PCR-Produkte normaler Länge und durch alternativ gespleißte mRNA verkürzte PCR-Produkte.

(A): Bahn 1: Längenmarker VI (Roche, Mannheim); 2:leer; 3: *4; 4: *1; 5: *5; 6: *6; 7: Negativkontrolle.

(B): Bahn 1: Längenmarker VI (Roche, Mannheim); 2: leer; 3: *4; 4: *1; 5: *5; 6: *6; 7: Negativkontrolle.



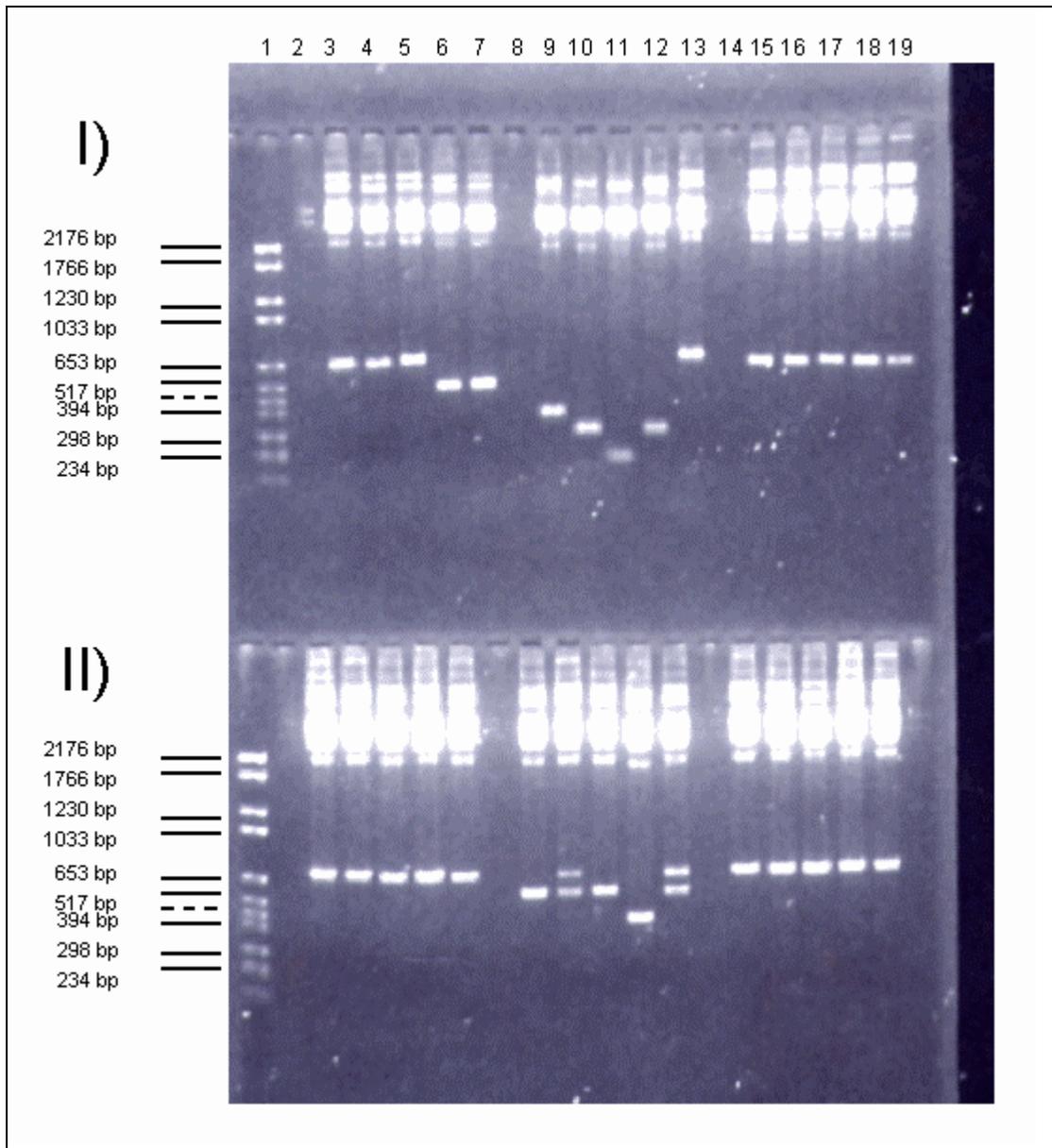


Abbildung 9

Fragmente aus Abbildung 7 nach der Klonierung. Die Plasmid-DNA wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen NotI und SacII geschnitten und auf das Agarosegel aufgetragen. Bahn I- und II-1: Längenmarker VI (Roche, Mannheim); I- und II-2 + 8 + 14: leer; I-3 bis 7: *4, c1; I-9 bis 13: *1,c1; I-15 bis 19: *6, c4; II-3 bis 7: *4, c4; II-9 bis 13: *1, c4; II-15 bis 19: *5, c4.

3.11 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit Hilfe der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger, Nicklen und Coulson ³². Das Grundprinzip dieser Methode besteht darin, dass während einer Polymerisationsreaktion am Matrizenstrang neben den 4 Desoxynukleotiden dATP, dTTP, dGTP und dCTP auch Didesoxynukleotide ddATP, ddTTP, ddGTP und ddCTP zugesetzt werden, denen die 3'-OH-Gruppe des Zuckeranteils fehlt. Da diese Gruppe jedoch für die Anheftung des nächsten Nukleotids benötigt wird, kommt es nach dem Einbau eines Didesoxynukleotids zum Abbruch der DNA-Polymerisation. Der Einbau der jeweiligen Nukleotide geschieht nach dem Zufallsprinzip und richtet sich nach dem Konzentrationsverhältnis von Desoxynukleotiden zu Didesoxynukleotiden im Reaktionsansatz. Auf diese Weise entstehen DNA-Stränge von unterschiedlicher Länge. Das letzte Nukleotid eines jeden DNA-Fragmentes ist dabei immer ein Didesoxynukleotid, welches zum Kettenabbruch geführt hat. Die DNA-Fragmente werden durch ein hochauflösendes Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, so dass man Fragmente, die sich durch nur ein Nukleotid in ihrer Länge unterscheiden, differenzieren kann. Da die 4 Didesoxynukleotide mit 4 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, ist eine Bestimmung der Basenpaarabfolge (DNA-Sequenz) möglich. Die Sequenzierungsreaktion wurde als „Cycle-Sequenzierung“ mit dem Prism Ready Reaction Dye Terminator Kit (Perking Elmer, Langen, Deutschland) durchgeführt. Der enthaltene „Premix“ bestand aus 4µl 5x TACS-Puffer (siehe Anhang), 1µl dNTP-Mix, 900pmol DyeDeoxy A, 450pmol DyeDeoxy T, 15pmol DyeDeoxy G, 4pmol DyeDeoxy C und 4U Taq-Polymerase, eine hitze-stabile DNA-Polymerase von *Thermus aquaticus*, so dass ein zur PCR analoges 3-Temperaturverfahren mit DNA-Doppelstrangdenaturierung, Sequenzprimeranlagerung und Polymerisationsreaktion durchgeführt werden konnte.

Die verwendeten Sequenzierungsprimer finden sich im Anhang in Tabelle II.

Ein 20µl Sequenzierungsansatz setzte sich zusammen aus:

6,0µl	Dye Terminator Ready Reaction Mix
1,0µl	Sequenzierungsprimer (4 bzw. 5µM)
300-500ng	Plasmid-DNA

H₂O ad 20µl

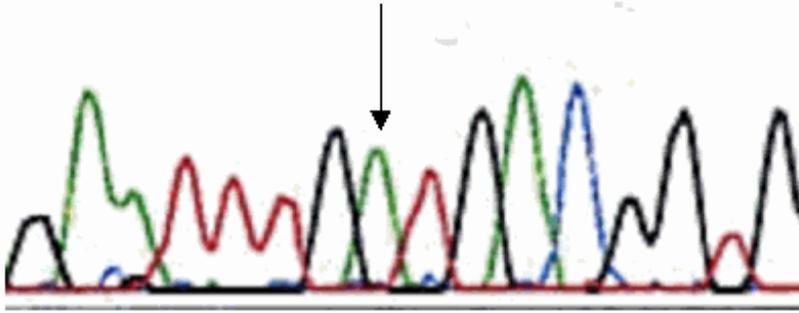
und wurde nach folgendem Temperaturprofil amplifiziert:

(96° C – 10sec; 50° C bzw. 60° C – 5sec; 60° C – 4min) insgesamt 25 Zyklen
4° C – Lagerungstemperatur

Die verwendete Annealingtemperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur des Primers.

Nach der abgelaufenen Sequenzreaktion wurde die DNA durch 2µl NaAcetat (3M, pH 4,6) und 50µl 95%-igem Ethanol gefällt und anschließend mit 70%-igem Ethanol, nach Anleitung des Herstellers gewaschen und das DNA-Pellet anschließend in einer Vakuumzentrifuge für 5 min getrocknet. Vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel wurden die Proben in Formamid mit 5mM EDTA und 10mg/ml Blue Dextran (Perkin Elmer) gelöst und für 2 min bei 95° C denaturiert. Das Gel besteht aus 30g Harnstoff, 9ml 40%-ige Acrylamidlösung, 6ml 10xTBE-Puffer (siehe Anhang) und 23,5ml H₂O. Bevor das Gel zwischen zwei Glasplatten gegossen wurde, wurden noch 180µl 10%-ige Ammoniumpersulfatlösung sowie 24µl TEMED (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugesetzt, so dass das Gel innerhalb von 2 Stunden polymerisierte. Der Harnstoff diente dabei der Denaturierung der DNA. Die vertikale Elektrophorese wurde mit einem ABI 373A DNA Sequencer System der Firma Perkin Elmer/Applied Biosystems durchgeführt und benötigte eine Laufzeit von 12 Stunden. Dabei wurden die fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide mit einem Argonlaser, dessen Hauptemission bei 488nm und 514nm liegt, angeregt. Die Sekundärstrahlung der markierten DNA-Fragmente wurde über einen Photomultiplier an ein angeschlossenes Computersystem geleitet und direkt in DNA-Sequenzdaten umgesetzt. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit Hilfe des Computerprogramms OMIGA (Oxford Molecular, Oxford, GB) analysiert und ausgewertet (Abbildung 10).

A) GAATTTGATGACGGTG
390



B) GAATTTGGTGACGGTG
390 400

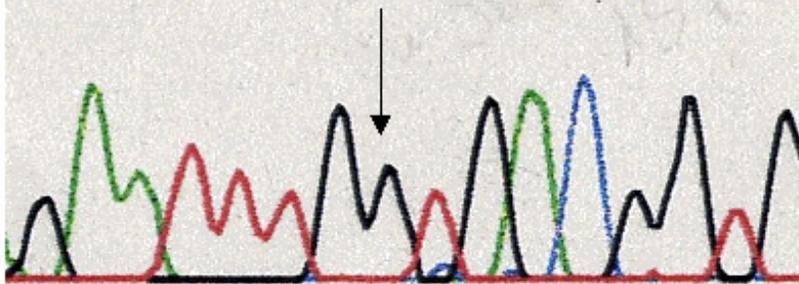


Abbildung 10

Sequenzierungsdaten des Patienten 7:

Klon (A): Basen Nr. 1565 - 1580 (GAATTTGATGACGGTG)

Klon (B): Basen Nr. 1566 - 1578 (GAATTTGGTGACGGTG), Base Nr. 1572:

Punktmutation A→G mit Änderung der Aminosäuresequenz (Met→Val).

4. ERGEBNISSE

Es wurde die DNA von 14 MDS/AML Patienten, die eine Deletion eines GRAF-Allels aufwiesen sowie die Zelllinie OHNGM untersucht. Die Zelllinie OHNGM stammt von einem Patienten, der nach einer Chemotherapie bei M. Hodgkin entstandenen MDS eine AML entwickelte. In der Karyotypisierung konnte eine del(5q) nachgewiesen werden³³.

Die nach der Isolierung der genomischen DNA aus Leukozyten in cDNA umgeschriebene DNA wurde mittels PCR amplifiziert. Dazu wurde die 3163 Basenpaar umfassende cDNA in 5 etwa gleich lange, sich teilweise überlappende Fragmente (c0-c4) unterteilt.

Diese cDNA-Fragmente wurden zunächst mit Hilfe des Vektors pBluescript in E.coli-Zellen transformiert und kloniert.

Anschließend wurden die Plasmid-DNA Klone sequenziert. Klone, die in der Sequenzierung eine Abweichung von der GRAF Wildtypsequenz zeigten, wurden erneut kloniert und sequenziert, um einen durch die Taq Polymerase verursachten Fehleinbau von Nukleotiden auszuschließen. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Anzahl der jeweils sequenzierten Fragmente.

PATIENTEN (NUMMERN)	ANZAHL SEQUENZIERTER KLONE DER FRAGMENTE C0-C4				
	c0	c1	c2	c3	c4
1	3	13	2	3	4
2	2	3	2	3	0
3	3	3	2	1	2
4	2	4	4	3	3
5	0	2	3	2	2
6	0	4	5	2	3
7	3	1	2	2	0
8	2	2	1	2	0
9	0	0	0	2	0
10	0	0	0	2	2
11	0	0	0	2	2
12	0	0	0	2	0
13	0	0	0	2	2
14	0	2	0	2	2
Zelllinie OHNGM	0	0	0	3	2

Tabelle 2

Übersicht über die Anzahl der sequenzierten Klone der Fragmente c0 bis c4 der 14 untersuchten Patienten, sowie der Zelllinie OHNGM.

4.1 Splicingvarianten

Bei 6 Patienten (*1, *3, *6, *11, *13, *14) konnte in 10 der insgesamt 15 sequenzierten Klone eine Deletion von 111bp, die dem Exon 15 von GRAF entspricht, nachgewiesen werden.

Bei einer Deletion von 96bp, die wir bei Patient 1 in 2 von 3 sequenzierten Klonen des Fragmentes c1 nachweisen konnten, kommt es nach der Base Nr. 159, d.h. am Ende des Exon 1, zu einem Sequenzabbruch mit einem Neuanfang der Sequenz bei Base Nr.256, so dass es zu einem teilweisen Verlust des Exon 2 kommt. In einem von 6 untersuchten Klonen des Fragmentes c1 des gleichen Patienten konnten wir eine Deletion von 294bp, mit einem Verlust des Exons 4, sowie dem teilweisen Verlust des Exons 3 und 5 nachweisen.

Der Patient 5 wies bei der Sequenzierung des Fragmentes c1 in einem der 2 sequenzierten Klone eine Deletion von 102bp auf, die zu einem teilweisen Verlust der Exons 3 und 4 führt.

Bei Patient 11 konnte bei der Sequenzanalyse des Fragmentes c4 nicht nur, wie oben beschrieben, eine Deletion von 111bp nachgewiesen werden, sondern in einem weiteren Klon der Verlust von 387bp, so dass in diesem Klon Exon 13 und 15 teilweise, Exon 14 vollständig fehlen.

Der offene Leserahmen der Aminosäuresequenz ändert sich bei den oben beschriebenen Deletionen nicht.

Die Deletion von 111bp, die wir bei 6 von 11 Patienten, bei denen das Fragment c4 sequenziert werden konnte, in insgesamt 10 der 15 sequenzierten Klone nachgewiesen haben (*1:2/4, *3:2/2, *6:3/3, *11:1/2, *13:1/2, *14:1/2), entspricht dem Exon 15 (Basen Nr.1994-2104). In der PCR-Analyse von 14 gesunden Blutspendern zeigten sich bei 6 Proben auf dem Agarosegel deutlich zwei Banden unterschiedlich langer PCR-Produkte (Abbildung 11). Das größere Fragment stimmt in der Länge mit dem 690bp langen Fragment c4 überein. Die Bande des kürzeren Fragmentes entspricht, gemessen an dem Längenmarker VI, höchstwahrscheinlich dem veränderten Fragment c4 mit Deletion des Exon 15.

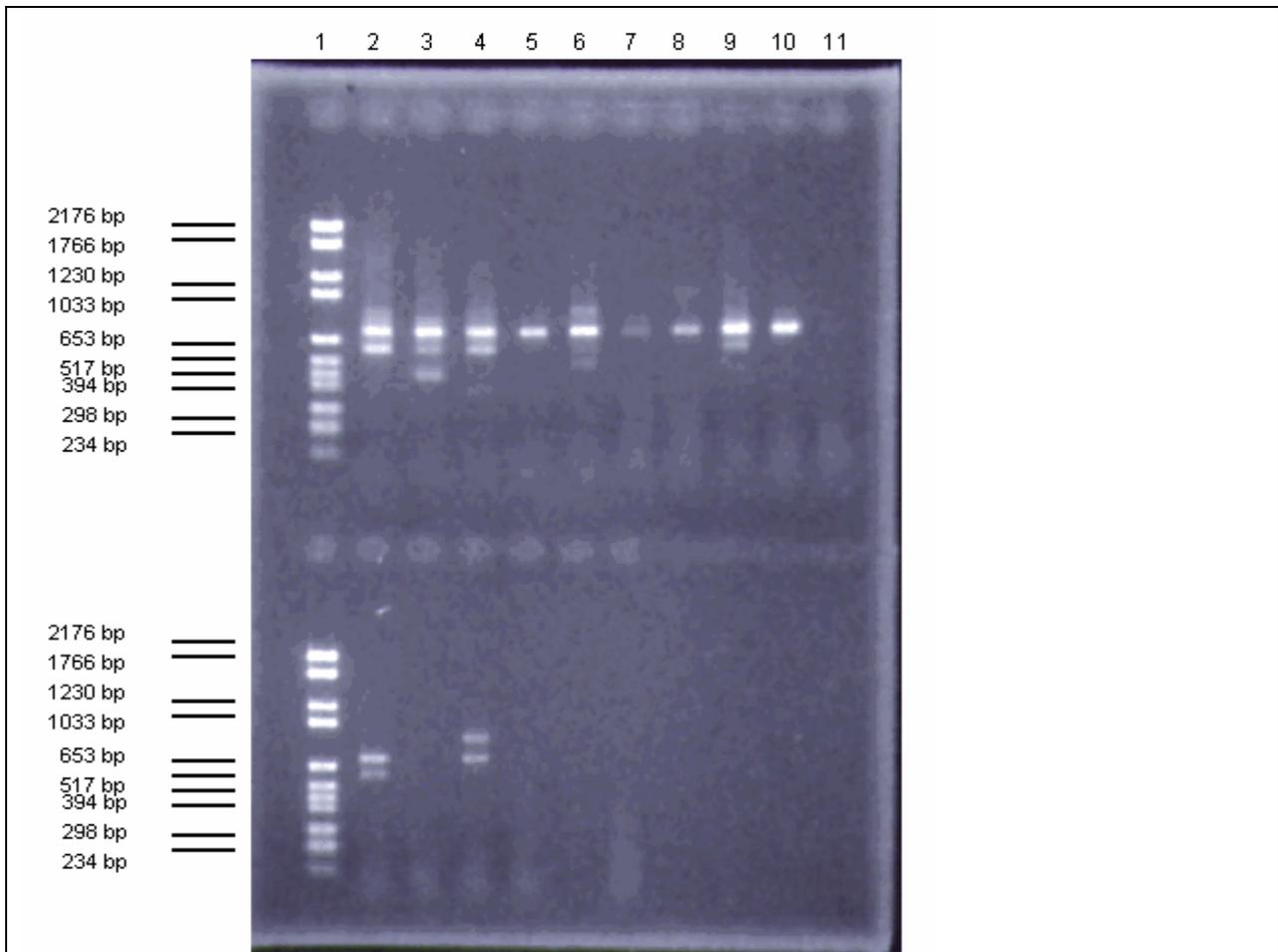


Abbildung 11

RT-PCR 14 gesunder Blutspender. Zur Darstellung kommt das 690bp lange Fragment c4, sowie in den Bahnen I-1,2,3,5,8, und II-1 ein kürzeres Fragment, welches an dem Längenmarker VI gemessen, der Splicingvariante mit Verlust des Exon 15 (111bp) entsprechen könnte.

Bahn I- und II-1: Längenmarker VI (Roche, Mannheim/Deutschland)

Bahn I- 2 bis 11 und II- 2 bis 5: Proben der 14 Blutspender

Bahn II-6: leer; Bahn II-7: Negativkontrolle

Bei folgenden Deletionen kommt es dagegen jeweils zu einer Veränderung des Leserasters und somit zur Bildung eines Stop-codons, wie in Abbildung 12 schematisch dargestellt.

Die Deletion von 332bp, die sich bei Patient 1 in 3 von 11 Klonen aus zwei unterschiedlichen PCR-Ansätzen sowie in 1 von 3 Klonen des Patienten 3 fand, führt im Fragment c1 zu einem Verlust der Exons 2 und 3 sowie teilweise des Exons 4.

Sowohl bei Patient 1 als auch bei Patient 2 kam es bei 1 von 6, bzw. bei 1 von 3 untersuchten Klonen zu einem Sequenzabbruch am Ende des Exon 1 mit einem Fehlen von 443bp und damit dem Verlust der Exons 2, 3, 4 und teilweise Exon 5.

Bei Patient 1 konnten weitere Deletionen nachgewiesen werden. So führte bei 2 von 6 Klonen im Fragment c1 der Verlust von 362bp zu einem Verlust der Exons 3 und 4 sowie einem Teil des Exons 5. Bei 2 von 2 Klonen des Fragmentes c2 hatte der Verlust von 130bp den teilweisen Verlust des Exons 5 und bei 1 von 4 Klonen des Fragmentes c4 der Sequenzabbruch nach Base Nr.1842 mit einem Sequenzneuanfang bei Base Nr. 2104, einen teilweisen Verlust des Exons 13 sowie das vollständige Fehlen der Exons 14 und 15 zur Folge. Einer von 5 sequenzierten Klonen zeigte außerdem im Fragment c1 eine Deletion von 122bp, was den teilweisen Verlust des Exons 5 bedeutet.

Bei Patient 4 konnte bei 2 von 4 Klonen in Fragment c1 ebenfalls ein Sequenzabbruch nach Base Nr.159 mit Neubeginn in Exon 3 nachgewiesen werden.

Der Patient 13 zeigte in der Sequenzierung des Fragments c4 nicht nur die 111bp umfassende Deletion, sondern in einem weiteren Klon eine Deletion von 380bp mit teilweisem Verlust der Exons 14 bis 17.

Bei der Sequenzierung der Fragmente c3 und c4 der Zelllinie OHNGM fanden sich in je 2 von 2 Klonen Deletionen, die 238bp, 287bp und 88bp umfassten. Diese führen zu einem z.T. vollständigen Verlust der Exons 9 bis 15 sowie 17.

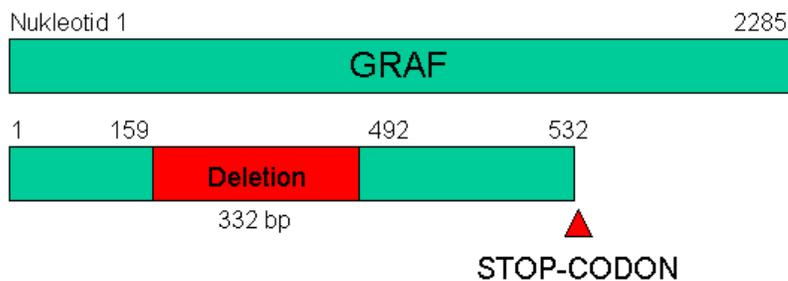


Abbildung 12

Schematische Darstellung der 332bp umfassenden Deletion, die bei *1 und *3 auftritt und nach Nukleotid 532 durch Entstehung eines Stop-codons zum vorzeitigen Aminosäurenabbruch führt.

Abbildung 13 zeigt eine schematische Übersicht der verschiedenen im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Splicingvarianten

SPLICINGVARIANTEN VON GRAF



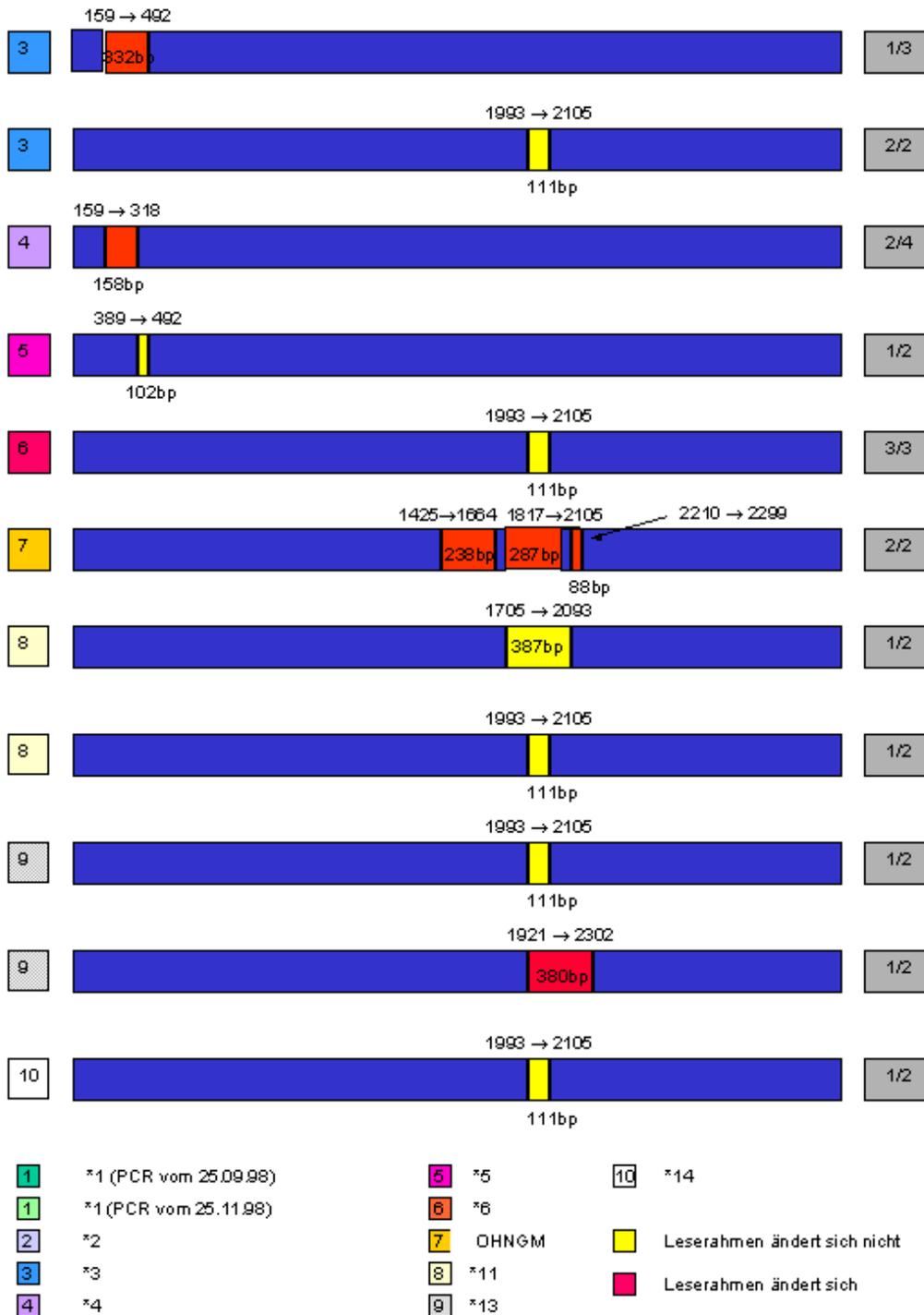


Abbildung 13
Schematische Darstellung der Splicingvarianten von GRAF

Angabe nach welcher Base die cDNA-Sequenz abbricht, bzw. wieder beginnt. Die auf Grund der unterschiedlichen Splicingvarianten fehlenden Sequenzabschnitte sind farblich markiert. In der rechten Spalte sind die Anzahl der sequenzierten Klone, sowie die Anzahl der Klone, die die jeweilige Splicingvariante aufweisen, aufgeführt.

4.2 Punktmutationen

Tabelle 3 zeigt eine Übersicht aller Punktmutationen, die im Rahmen dieser Arbeit gefunden wurden, die Anzahl der untersuchten Klone sowie die Anzahl der Klone, die die entsprechende Mutation aufwiesen. Mutationen, die mit Gelb unterlegt sind, ziehen keinen Austausch der Aminosäuren nach sich, rot markierte Mutationen führen zu einem Austausch der betreffenden Aminosäure. Die Punktmutation der Base Nr.363 bei Patient 6, mit Blau gekennzeichnet, führt zu einem Austausch der Nucleoside Cytosin und Thymidin, wodurch statt der Aminosäure Arginin ein Stop-codon entsteht, so dass das Ablesen der nachfolgenden Proteinsequenz verhindert wird.

Patient	219	257	260	295	363	471	484	592	595
	A→G Ile→Val	A→G Ala bleibt	A→G Arg bleibt	T→C Leu→Pro	C→T Arg→stop	A→G Lys→Glu	T→C Leu→Pro	T→C Phe→Ser	T→C Val→Ala
1	1/16		10/10			1/6			1/9
2				1/5					
3			1/2						
4			3/4						1/4
5			1/4						
6					1/9				
7									
8		1/1							
9									
10									
11									
12									
13									
14							1/2	1/2	

Patient	602	615	616	625	676	742	781	837	862
	C→T Pro bleibt	C→T Leu bleibt	T→C Leu→Pro	T→C Leu→Pro	T→C Phe→Ser	T→C Val→Ala	A→G Glu→Gly	C→G Arg→Gly	A→G Lys→Arg
1	8/9								
2	2/2			4/4	1/2				
3	3/4			1/2	1/2				1/2
4	4/4			4/4					
5	2/2			1/3					
6	4/4		1/5				1/5		
7	1/1			3/3		1/2		1/2	
8	2/2			2/2					
9									
10									

11									
12									
13									
14	1/2	1/2							

Patient	887	906	984	997	1008	1029	1069	1120	1142
	T→G Asp→Glu	G→A Val→Ile	A→G Thr→Ala	A→G Glu→Gly	T→G Cys→Gly	G→A Asp→Asn	G→A Gly→Glu	A→G Asn→Ser	T→C Ser bleibt
1							2/2		
2							2/2		2/2
3	1/2	1/2					2/2		
4						1/4	4/4		4/4
5				1/3	1/3		3/3		1/3
6							5/5		1/5
7			1/2				2/2	1/2	2/2
8							1/1		
9									
10									
11									
12									
13									
14									

Patient	1169	1176	1254	1255	1263	1264	1281	1334	1368
	T→C Ile bleibt	A→G Ser→Gly	A→G Asn→Asp	A→G Asn→Ser	G→A Val→Met	T→C Val→Ala	G→A Val→Ile	A→G Glu bleibt	A→G Thr→Ala
1									
2				2/2				1/2	
3				2/2					
4									
5									
6		1/5		2/5	1/5	1/5			
7			1/2	1/2					
8	1/1		1/1				1/1		
9									
10									
11									
12									
13									1/2
14									

Patient	1390	1409	1442	1447	1459	1463	1464	1496	1552
	G→A Gly→Glu	G→A Gln bleibt	G→A Leu bleibt	A→G Asn→Ser	G→T Arg→Leu	C→T Val bleibt	T→C Ser→Pro	A→G Pro bleibt	A→G Asn→Ser
1									
2		1/2							
3									

4					1/3			
5								
6		2/2	2/2	1/2		2/2		
7							1/2	
8								
9								
10	1/2							
11								
12								
13						1/2		
14								

Patient	1572	1592	1612	1622	1629	1664	1684	1705	1757
	A→G Met→Val	T→C Gly bleibt	T→C Leu→Pro	T→G Pro bleibt	G→A Glu→Lys	G→A Gln bleibt	T→C Leu→Pro	T→C Ile→Thr	T→C Ser bleibt
1									
2									
3									
4							1/3		
5									
6								1/2	
7	1/2								
8									
9					2/2				
10			1/2	1/2		1/2			
11									
12		1/2							
13									1/2
14									

Patient	2051	2070	2136	2184	2264	2278
	A→G Ala bleibt	A→G Thr→Ala	G→A Ala→Thr	G→A Val→Ile	A→G Glu bleibt	T→C Phe→Ser
1			1/3		3/3	
2						
3				1/2	2/2	
4	3/3	1/3			3/3	
5	2/2				2/2	
6					3/3	
7						
8						
9						
10						
11					1/2	
12						
13					1/2	1/2

14					2/2	
----	--	--	--	--	-----	--

	AS ändert sich nicht
	AS ändert sich
	Stop-codon entsteht

Tabelle 3	
Übersicht der nachgewiesenen Punktmutationen bei 14 Patienten, Anzahl der sequenzierten Klone, sowie Anzahl der die entsprechende Mutation aufweisenden Klone.	
Gelb	unterlegte Mutationen → kein Austausch der AS
Rot	unterlegte Mutationen → Austausch der AS
Blau	unterlegte Mutation → Stop-codon entsteht

4.3 Sequenzierung 12 gesunder Blutspender

Bei der Direktsequenzierung 12 gesunder Blutspender konnten bei folgenden Nucleotiden ebenfalls Punktmutationen, die zu einem Austausch der Aminosäure führten, nachgewiesen werden:

Nucleotid-Nr.: 260, 484, 592, 602, 616, 625, 676, 862, 887, 984, 997, 1069, 1120, 1142, 1334, 1442, 1447, 1496, 1552, 1612, 1622, 1629, 1664, 1705, 2051, 2136, 2184, 2264.

4.4 Splicingvarianten und Punktmutationen die wichtige Funktionsdomänen des GRAF-Gens betreffen

Auf Proteinebene kommt es bei 3 Patienten (*1, *2, *3) in insgesamt 9 Klonen durch die beschriebenen Deletionen zu einem vollständigen Verlust, bei einem Patienten (*5) in einem Klon nur zum Verlust der letzten Aminosäure der Nuclear Targeting Sequenz. Bei Patient 1 kommt es außerdem in zwei Klonen zu einem teilweisen Verlust der PH-Domäne, bei Patient 9 fehlt in einem Klon die komplette SH3-Domäne und in der Zelllinie OHNGM konnte in zwei Klonen der teilweise Verlust der GAP- sowie der SH3-Domäne nachgewiesen werden.

Abbildung 14 gibt eine Übersicht aller Punktmutationen, die zu einem Austausch einer Aminosäure führen, und zeigt deren Lage in Beziehung zur Nuclear Targeting Sequenz, PH-, SH3- und GAP-Domäne.

GRAF AS-Sequenz

MGLPALEFSD	CCLDSPHFRE	TLKSHEAELD	KTNKFIKELI	KDGKSLISAL	50
KNLSSAKRKF	ADSLNEFKFQ	CIGDAETDDE	MCIARSLQEF	ATVLRNLEDE	100
RIRMIENASE	VLITPLEKFR	<u>KEQIGAAKEA</u>	KKKYDKETEK	YCGILEKHLN	150
LSSKKKESQL	QEADSQVDLV	RQHFYEVSLE	YVFKVQEVQE	RKMFEFVEPL	200
LAF L QGLFTF	YHHGYELAKD	FGDFKTQITI	SIQNTRNRFE	GTRSEVESLM	250
KKMKENPLEH	KTISPYTMEG	<u>YLYVQEKRHF</u>	<u>GTSWVKHYCT</u>	<u>YORDSKQITM</u>	300
<u>V</u> PFDOKSGGK	GGEDES V ILK	SCTRRK T DSI	<u>E</u> KR F C F DVEA	<u>V</u> DRPGVITMO	350
<u>AL</u> SE G DRRLW	MEAMDGREPV	YNSNKDSQSE	GTAQLDSIGF	<u>S</u> IIRKCIHAV	400
ETRGINEOGL	YRIVGV N SRV	QKLLS V LMDP	KTASETETDI	CAEWEIKTIT	450
SALK T YLRLM	<u>P</u> GPLMMYOFO	RSFIKAAKLE	<u>N</u> OES R VSEIH	SLVHRLPEKN	500
<u>R</u> OMLQLLMNH	LANVAN N NHKQ	NL M TVANLGV	VFGPT L LRPQ	<u>E</u> ETVAAIMDI	550
<u>K</u> FONIVIEIL	<u>I</u> ENHEK I FNT	VPDMPLTNAQ	LHLSRKKSSD	SKPPSCSERP	600
LTLFHTVQST	EKQEQRNSII	NSSLESVSSN	PNSILNSSSS	LQPNMNSSDP	650
DLAVVKPTRP	NSLPPNPSP	SPLSPSWPMF	SAPSSPMP T S	STSSDSSPVS	700
TPFRKAKALY	<u>A</u> CKAEHDSEL	SFTAGT V FDN	VHPSQEPGWL	EGTLNGKTGL	750
<u>I</u> PENYVE F L					800

Abbildung 14

AS-Sequenz der GRAF cDNA-Sequenz (bp6 - bp2282)

Folgende Domänen sind unterstrichen:

Nuclear Targeting sequenz (AS115 - AS131)

PH-Domäne (AS266 - AS369)

GAP-Domäne (AS389 - AS561)

SH3-Domäne (AS706 - AS757)

Punktmutationen, die zu einem Austausch der AS führen, sind rot markiert.

Fünf der acht Patienten, bei denen das Fragment c2 sequenziert werden konnte, wiesen in insgesamt 9 von 14 sequenzierten Klonen Punktmutationen der Basen Nr.1254, bzw. Nr.1255 auf (*2: 2/2, *3: 2/2, *6: 2/5, *7: 2/4, *8: 1/1 Klone). Diese führten zu einem Austausch der Aminosäure Nr.417 Asparagin (N-417) zu Asparaginsäure, bzw. Serin.

Da es sich hierbei um eine Aminosäure der GAP-Domäne handelt, wurde dieser Bereich näher untersucht. Es wurden 15 gesunde Versuchspersonen auf Mutationen in diesem Bereich hin gescreent. Dazu wurde cDNA des c2-Fragments amplifiziert und direkt sequenziert. Es konnte jedoch in keiner der Proben eine Punktmutation der Basen Nr.1254/1255 nachgewiesen werden.

Tabelle 4 gibt eine Übersicht über Punktmutationen, die in der GRAF GAP-Domäne lokalisiert sind und zu einem Austausch einer Aminosäure führen, bzw. Deletionen, die den offenen Leserahmen verändern und durch Bildung eines Stop-Codons zu einem Aminosäuresequenzabbruch mit komplettem oder partiellen Verlust der GRAF GAP-Domäne führen.

AS-Nummer	AS-Austausch	Anzahl sequenzierter Klone mit entsprechender Punktmutation	Gesamtzahl sequenzierter Klone
391	S → G	1	5
417	N → D/S	9	15
420	V → M/A	2	10
426	V → I	1	1
455	T → A	1	2
462	G → E	1	2
481	N → S	2	2
485	R → L	1	2
487	S → P	1	2
516	N → S	1	2
523	M → V	1	2
536	L → P	1	2
542	E → K	2	2
560	L → P	1	3

Basenpaare	Anzahl sequenzierter Klone mit entsprechender Deletion	Gesamtzahl sequenzierter Klone
159 → 492	4	14
159 → 443	2	9
159 → 318	2	4
257 → 620	2	6
557 → 680	1	5
707 → 838	2	2
1452 → 1664	2	2

Tabelle 4
Punktmutationen und Deletionen in der GRAF GAP-Domäne

5. DISKUSSION

5.1 Diskussion der gefundenen Deletionen und Punktmutationen

5.1.1 Deletionen

Bei 7 von 14 Patienten (*1, *3, *5, *6, *11, *13 und *14) fanden sich Deletionen unterschiedlichen Umfangs, die den offenen Leserahmen der Aminosäuresequenz jedoch nicht veränderten (siehe Abschnitt 4.1), so dass es sich hierbei höchstwahrscheinlich um Splicingvarianten des GRAF-Wildtyps handelt.

Die unter 4.1 beschriebene Deletion von 111bp, welche dem Exon 15 entspricht, fand sich ebenfalls bei 6 von 14 untersuchten gesunden Blutspendern in der PCR. Der Verlust dieser Sequenz kann demzufolge ebenfalls als Splicingvariante angesehen werden, die möglicherweise die Funktion des GRAF-Proteins nicht beeinflusst.

Bei 5 von 14 Patienten (*1, *2, *3, *4 und *13) sowie der Zelllinie OHNGM (Abschnitt 4.1) fanden sich jedoch Deletionen unterschiedlicher Länge, die jeweils zu einer Änderung des offenen Leserahmens und somit zu einer Veränderung der nachfolgenden Aminosäuresequenz führten. Dies hatte bei allen Patienten, die eine solche Deletion aufwiesen, die Bildung eines Stop-codons und damit den Abbruch der DNA-Sequenz im jeweiligen Klon zur Folge. Um diese Beobachtung auf Proteinebene nachzuweisen, müsste man als nächstes einen Western-Blot durchführen, um die Genexpression und Genfunktion auf Proteinniveau zu untersuchen.

Da man durch die Amplifizierung mit Hilfe der PCR eine Vielzahl von Splicingvarianten erhält, würde man durch eine Direktsequenzierung der PCR-Produkte Gefahr laufen, die Basensequenz einiger dieser Splicingvarianten, bzw. bei einem sehr geringen Tumorzellanteil im Patientenmaterial, gerade die Basenabfolge dieser veränderten Zellen nicht zu erfassen. Daher wählten wir in dieser Arbeit das aufwendigere Verfahren der Sequenzierung von Einzelklonen, um gezielt in ihrer Länge veränderte Fragmente näher untersuchen zu können. Da AML/MDS Tumorzellen keine spezifischen Oberflä-

chenmarker aufweisen, die sie von normalen Knochenmarksstromazellen unterscheiden, konnten sie nicht durch fluorescence activating cell stroma angereichert werden.

5.1.2 Punktmutationen

Die bei Patient 6 aufgetretene Punktmutation der Base Nr. 363, die zur Bildung eines Stop-codons führte, konnte nur bei einem von neun sequenzierten Klonen nachgewiesen werden, was eher auf einen fehlerhaften Baseneinbau der Taq-Polymerase als auf eine tatsächlich vorliegende Veränderung in diesem Bereich schließen lässt.

Bei 5 Patienten konnte in insgesamt 9 von 14 sequenzierten Klonen eine Punktmutation der Basen Nr.1254/1255 (N-417) nachgewiesen werden (Tabelle 3). Da bei keinem der 15 untersuchten gesunden Blutspender eine Mutation an dieser Stelle nachgewiesen werden konnte, handelt es sich hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit nicht um einen Polymorphismus. Um dieses zu beweise hätten jedoch mehr gesunde Blutspender untersucht werden müssen.

Auf die Mutation 1254/1255 soll in Abschnitt 5.4.1 *Interaktion zwischen GrafGAP und RhoA* noch näher eingegangen werden.

Wie in Abschnitt 4.3 beschrieben, konnten bei insgesamt 12 gesunden Blutspendern 28 Punktmutationen nachgewiesen werden, die an der jeweils gleichen Stelle wie bei den untersuchten Patienten zu einem Austausch der Nukleotide führten, so dass man davon ausgehen kann, dass es sich bei diesen Veränderungen um Polymorphismen im GRAF-Gen handelt.

Bei den anderen in Tabelle 3 dargestellten Veränderungen kann man dagegen davon ausgehen, dass es sich um Mutationen handelt, die möglicherweise einen Einfluß auf die Funktion von GRAF haben, da bei keinem der untersuchten Blutspender eine entsprechende von der GRAF cDNA abweichende Basenfolge gefunden werden konnte.

Diese Mutationen haben wahrscheinlich für die Funktion des mutierten Gens eine unterschiedliche Relevanz, abhängig davon, welche Aminosäure ausgetauscht wurde.

Man unterscheidet basische, saure und neutrale Aminosäuren. Dadurch kommt es beispielsweise durch den Austausch einer neutralen gegen eine saure Aminosäure zu einer Verschiebung des isoelektrischen Punktes und somit eventuell zu einem Funktionsverlust des Proteins.

Diese Mutationen des GRAF-Proteins müssten nun funktionell weiter untersucht werden, z.B. hinsichtlich ihrer Fähigkeit das Molekül RhoA zu dephosphorylieren.

5.2 Biologische Funktion von GRAF

Graf wurde ursprünglich als „GTPase-activating protein for Rho and cdc42 Associated with Focal adhesion kinase“ in Zellen von Hühnerembryonen identifiziert 34. Laut Hildebrand, Taylor et al 27 bindet das Graf Protein des Huhnes SH3-Domänen abhängig an die C-terminale Domäne der pp125 FAK, einer Tyrosinkinase, die möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der ungestörten Signalübertragung in der Zelle spielt. Die Rho- (Ras-homology) Proteine gehören zu der Ras-Superfamilie und setzen sich aus fünf verschiedenen Typen GTPase-bindender Proteine zusammen: RhoA, RhoB, RhoC und RhoD; Rac1 und Rac2; cdc42 und G25K; TC10 und RhoG 34-37. Rho, Rac und cdc42 regulieren eine Reihe von zellulären Prozessen, einschließlich der Genexpression und der Organisation des Zytoskeletts 38. Sie kontrollieren die Zusammensetzung der Aktindehnungsfasern und fokalen Adhensionskomplexe, die das Aktinzytoskelett an der Plasmamembran verankern.

Olson und seine Kollegen haben gezeigt, dass in Zellen, die durch onko-genetisches Ras transformiert wurden, RhoA p21, einen bekannten Inhibitor des Zellzyklus, supprimiert³⁹⁻⁴². Die GAP-Domäne des Graf-Proteins stimuliert die GTPase-Aktivität des GTP-bindenden Proteins RhoA. Demzufolge fungiert Graf als negativer Regulator von RhoA (Abbildung 15). Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass eine Veränderung der GAP-Domäne von GRAF zu einem Funktionsverlust von GRAF hinsichtlich der physiologischen Downregulation von RhoA führen könnte. Demzufolge könnte eine Abschwächung oder Elimination der negativen Regulatorfunktion von GRAF zu einer vermehrten Aktivität von RhoA und somit verminderten Expression von p21 führen. Dieses hätte zur Folge, dass eine Zelle mit defektem GRAF-Gen aus der G1-

Phase in die S-Phase des Zellzyklus überführt würde und es zu einem unkontrollierten Zellwachstum käme. Dies könnte beispielsweise bei MDS-Patienten eine Proliferation der Zellen und den Übergang in eine AML zur Folge haben.

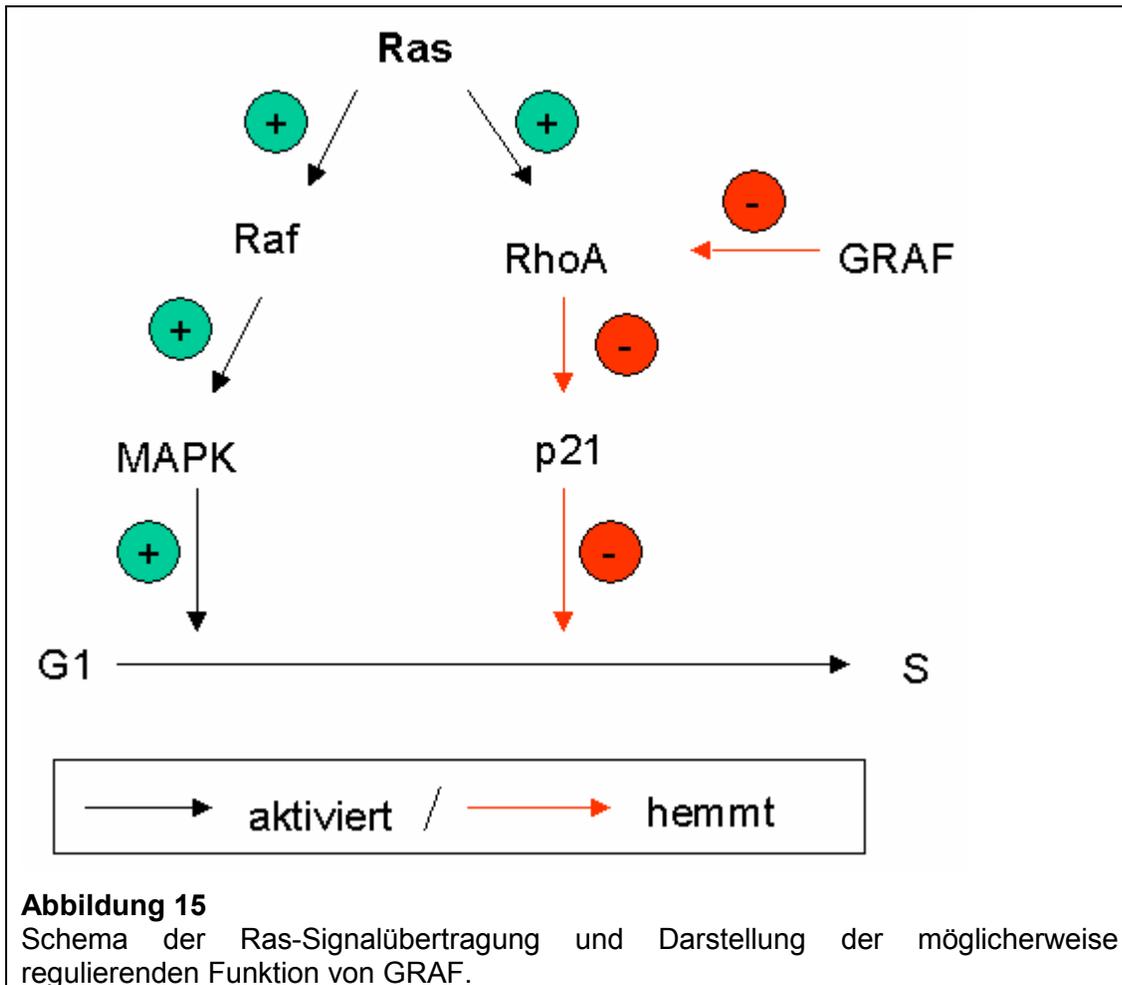


Abbildung 15

Schema der Ras-Signalübertragung und Darstellung der möglicherweise regulierenden Funktion von GRAF.

5.3 Verlust der SH3-, PH- oder GAP-Domäne

Die aus etwa 50-60 Aminosäuren bestehende SH3-Domäne hat eine entscheidende Funktion bei der Regulierung der Protein-Protein-Wechselwirkungen und ist wichtig für die Blockierung der Tyrosinkinaseaktivität, so dass es durch eine Zerstörung der SH3-Domäne zu einer ungebremsen Tyrosinkinaseaktivität und damit zu einem unkontrollierten Verlauf der Signalübertragung kommt. Der PH-Domäne kommen ähnliche Funktionen wie der SH3-Domäne zu. Daraus, und aus der unter 5.2

beschriebenen Funktion der GRAF GAP-Domäne, lässt sich schließen, dass durch eine Veränderung oder den Verlust einer dieser Domänen durch Punktmutationen oder Deletionen der Verlauf der zellulären Signalübertragung erheblich gestört würde.

5.4 Regulationsmechanismen, die GRAF möglicherweise beeinflussen

5.4.1 Interaktion zwischen GrafGAP und RhoA

Das Wissen darüber, wie verschiedene Rho-GTPasen von verschiedenen GAPs erkannt werden, ist eine entscheidende Voraussetzung für das Verständnis von Regulationsmechanismen in der Zelle. Longenecker et al. beschrieben kürzlich neue biochemische Daten hinsichtlich der Substratspezifität der Graf GAP-Domäne beim Huhn ⁴³. Sie zeigten, dass die Aminosäure N-225 der Graf GAP-Domäne (entspricht der AS N-417 = bp1254-56 in humaner GRAF-Sequenz), scheinbar mit E-95 (Cdc42), bzw. E-97 (RhoA) interagiert, in dem sich das negativ geladene Glutamat der GTPase an das N-225 am N-Terminus der Helix A1 von Graf GAP anlagert. Die Mutation Cdc42 E-95-A beispielsweise, verringert ihre Graf GAP-Aktivität gegenüber der Wildtyp-Sequenz um das Vierzigfache. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die Interaktion der Aminosäure an Position 95 der GTPase-bindenden Proteine und der Graf GAP-Domäne eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der zellulären Funktion und bei der Tumorunterdrückung durch Graf GAP spielt.

Da die Graf-Sequenz des Huhnes zu mehr als 95% mit der humanen GRAF-Sequenz übereinstimmt, können diese Beobachtungen auch als eine Basis für das Verständnis der möglicherweise tumorunterdrückenden Funktion von GRAF angesehen werden. So könnten vor diesem Hintergrund, die in Abschnitt 4.4 beschriebenen Punktmutationen, die zu einem Austausch der Aminosäure N-417 führen, als ein zum Funktionsverlust der GRAF-GAP Domäne beitragender Faktor angesehen werden, da sie sich hemmend auf die Verbindung zwischen N-417 GRAF und E-97 RhoA auswirken könnten.

Die Geschwindigkeit der GTP zu GDP-Hydrolyse kann durch rhoGAP, ein GTPase-aktivierendes Protein, welches rho-family Proteine stimuliert, um das 10⁵-fache gesteigert werden ⁴⁴. Demzufolge spielt rhoGAP eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der rho-vermittelten Signalübertragung. Die Annahme, dass R-85 und N-194, Aminosäuren, die im hydrophilen Kern der p50rhoGAP-Domäne liegen, G-Proteine binden und die GTPase-Aktivität steigern ⁴⁵, veranlasste Taylor et al. Mutanten dieser Aminosäuren in der GAP-Domäne von Graf, und dadurch ein Gen mit funktionsloser

GAP-Domäne, herzustellen⁴⁶. Sie mutierten R-236 des Graf-Gens beim Huhn zu Q (entspricht R-85 rhoGAP, bzw. R-412 GRAF), sowie N-351 zu V (entspricht N-194 rhoGAP, bzw. N-527 GRAF), woraufhin keine GTPase-Aktivität gegenüber rho in-vitro mehr nachgewiesen werden konnte. Auch Rittinger et al. stellten eine Mutante der Aminosäure N-194_{GAP} (N-194-V) her, die zu einer 50-fachen Verringerung der RhoA-vermittelten GTP-Hydrolyse gegenüber dem Wildtyp führte⁴⁴.

Wir konnten zwar bei keinem der von uns untersuchten Patienten eine Punktmutation nachweisen, die zu einer Mutation der Aminosäuren R-412, bzw. N-527 führte, fanden aber bei 2 von 2 sequenzierten Klonen der Zelllinie OHNGM eine Deletion, die zum Verlust der Aminosäure N-527 führte.

5.4.2 Graf 2

Vor kurzem gelang es Shibata et al. ein neues GRAF verwandtes Protein, Graf 2, zu isolieren⁴⁷, das eine mutmaßliche PH-Domäne, eine RhoGAP- und eine SH3-Domäne aufweist, die denen von GRAF sehr ähnlich sind. Graf 2 zeigt, ebenso wie GRAF, eine GTPase-aktivierende Wirksamkeit gegenüber RhoA und Cdc42. PKN β , eine Proteinkinase, interagiert mit der SH3-Domäne von GRAF und Graf 2 und phosphoryliert GRAF und Graf 2 in vitro. Es ist möglich, dass die Wechselwirkungen zwischen PKN β und den GAP-Proteinen GRAF und Graf 2 Einfluss auf die Regulierung des Gleichgewichtes zwischen GDP- und GTP-Rho haben und somit einen neuen Mechanismus für die Regulierung der durch Rho vermittelten Signale darstellen.

Demzufolge könnte ein GRAF-Protein, das durch eine Deletion seine SH3-Domäne verloren hat, durch PKN β nicht mehr phosphoryliert werden und würde dadurch in seiner Aktivität verändert werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

GRAF - möglicherweise ein Tumorsuppressorgen für MDS/AML?

Die häufigste strukturelle Veränderung bei MDS und AML ist die Deletion des langen Arms des Chromosoms 5^{21, 48, 49, 50}. Obwohl sowohl die Größe als auch die Lage der deletierten Segmente erheblich variieren kann, so ist dennoch in der Mehrheit der Fälle die Bande 5q31 verloren^{23, 24}. Diese Erkenntnis führte zu dem Schluss, dass diese kritische Region ein Tumorsuppressorgen beherbergen muss, dessen Verlust oder Inaktivierung eine entscheidende Rolle bei der Entstehung maligner myeloischer Erkrankungen spielt. Die Variabilität der Deletionen und die große Anzahl der möglicherweise in Frage kommenden Gene innerhalb dieser Region haben die Identifikation und Isolation solch eines Gens erheblich erschwert.

Durch die molekulargenetische Untersuchung von Knochenmarks- bzw. Blutproben von 14 MDS/AML Patienten, die in der zytogenetischen Untersuchung eine Deletion 5q aufwiesen, sollte in Anlehnung an die two-hit-Hypothese von Knudson gezeigt werden, dass ein Ausfall beider Allele des GRAF-Gens bei Patienten mit MDS/AML vorkommt. Dabei kann es sich entweder um eine größere Deletion oder eine Punktmutation handeln.

Für die Hypothese, dass es sich bei GRAF um ein Tumorsuppressorgen handelt, spricht die in der Literatur beschriebene Funktion von Graf, Rho, welches als Stimulator der Ras vermittelten DNA-Synthese angesehen wird, zu deaktivieren.

Auch die Tatsache, dass wir bei 8 der 14 untersuchten Patienten, die eine Deletion eines Allels aufwiesen, funktionell wichtige Sequenzveränderungen (Deletion bei *1, *2, *3, *4, *7 und *9, Punktmutationen der Basen 1254/1255 bei *2, *3, *6, *7 und *8) in dem verbleibenden Allel gefunden haben, lässt vermuten, dass Deletionen und Mutationen des GRAF-Gens eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und dem Verlauf hämatologischer Erkrankungen spielen und lässt auf einen möglicherweise tumorunterdrückenden Effekt von GRAF schließen.

Es werden jedoch noch weitere Experimente nötig sein, um die Beziehung zwischen RhoA, p21 und GRAF im Zusammenhang mit der Entwicklung von Leukämien und möglicherweise anderer Tumoren klären zu können. Aufgrund der Tatsache, dass die

Mehrzahl der von uns untersuchten Patienten die GRAF-Wildtypsequenz in dem verbliebenen Allel aufwiesen, kamen wir zu dem Schluss, dass neben GRAF auch der Verlust anderer Gene bei der Entwicklung von Leukämien mit Deletion 5q eine Rolle spielen muss.

GRAF – probably a tumor suppressor gene of AML/MDS

The deletion of the long arm of chromosome 5 is the most frequent structural abnormality in MDS and AML ^{21,48,49,50}.

Although the size and position of the deleted segment may vary considerably, band 5q31 is lost in most cases ^{23, 24}.

This finding led to the notion that the critical region must harbor a tumor suppressor gene whose loss or inactivation is critical for the development of these malignant myeloid disorders.

The variability of the deletions and the large number of attractive candidate genes within this region has hampered the identification and isolation of such a gene.

By molecular analysis of blood and bone marrow samples in 14 MDS/AML patients with a deletion 5q it was to be shown, in reference to the two-hit hypothesis of Knudson, that a loss of both alleles of the GRAF (GTPase regulator associated with the focal adhesion kinase pp125 FAK) gene is found in MDS/AML patients, which can either be a deletion or a point mutation.

The chicken Graf gene, which is to 90% homologous to the human GRAF gene, acts as a negative regulator of Rho. Olson et al. found recently that Rho suppresses p21 ⁴¹, a well-known inhibitor of the cell cycle. The loss of function of Graf prevents the physiologic down-regulation of Rho. Thus, the mitigation or elimination of the negative regulatory function of Graf may lead to the repression of p21. This observation leads to the hypothesis that GRAF may be a tumor suppressor gene.

In 8 of 14 patients with a deletion of one allele we found functional important changes of the sequence (deletion in *1, *2, *3, *4, *7 and *9, point mutation in the nucleotides 1254/1255 in *2, *3, *6, *7 and *8) in the remaining allele. This leads to the supposition that deletions and mutations in the GRAF gene play an important role in the development and course of haematological diseases and that GRAF may have a tumor suppressor function.

Further experiments are needed to clarify the relationship between RhoA, p21 and GRAF in the context of development of leukemias and probably other malignant diseases.

However, based on the fact that most of our patients displayed the GRAF wild-type sequences within the second GRAF allele we conclude that apart from GRAF also the loss of other genes play an important role in the development of leukemias with deletion 5q.

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Arndt Borkhardt, für die umfassende Betreuung und Unterstützung bei der Entstehung meiner Arbeit.

Ich danke außerdem Frau Dr. Uta Fuchs und Frau Claudia Keller, die mir bei der Erlernung der verschiedenen Methoden stets sehr hilfreich und geduldig zur Seite standen.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meinem Freund Carsten Vocke und meiner Tochter Luca für ihre liebevolle Unterstützung bedanken.

8. ANHANG

Zur Isolierung genomischer DNA verwendete Puffer:

GenI: 10mM Tris-HCl pH 7,6, 10mM KCl, 10mM MgCl₂, 2mM EDTA,
2,5% Nonidet P-40

GenII: 10mM Tris-HCl pH 7,6, 10mM KCl, 10mM MgCl₂, 0,4M NaCl,
2mM EDTA, 0,7% SDS

GenIII: 6M NaCl₂

Zur Isolierung von Plasmid-DNA verwendete Puffer:

Puffer P1: 50mM Tris-HCl pH 8,0, 10mM EDTA, 100µg/ml RNase A

Puffer P2: 200mM NaOH, 1% SDS

Puffer N3: nach Rückfrage keine Angaben des Herstellers

Puffer PE: nach Rückfrage keine Angaben des Herstellers

LB-(Luria-Bertani)-Medium:

10,0g Bacto-tryptone

5,0g Bacto-yeast extract

10,0g NaCl₂ 1M

in 1000 ml H₂O lösen

mit NaOH pH=7,0 austitrieren

LB-Medium autoklavieren

cDNA-Synthese:

5x First Strand Buffer: 250mM Tris-HCl pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂

Reinigung von PCR-Produkten:

QG-Puffer: von Firma Qiagen nicht veröffentlicht

DNA-Klonierung:

Puffer3: von New England Biopros (NEB):

50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 100mM
NaCl, 1mM dithiothreitol pH 7,9 bei 25°C

Puffer4: (NEB):

20mM Tris-acetate, 10mM magnesium acetate,
50mM potassium acetate, 1mM dithiothreitol pH 7, 9 bei 25°C

Dephosphorylierungspuffer: entspricht Puffer3 (NEB)

Ligasepuffer: (1xT4 DNA Ligase Reaction Buffer):

50mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM MgCl₂, 10mM dithiothreitol,
1mM ATP, 25µg/ml bovine serumalbumin

NotI von Boehringer Mannheim: Recognition sequence: GCGGCCGC

SacII von Boehringer Mannheim: Recognition sequence: CCGCGG

DNA-Sequenzierung:

TACS-Puffer: keine Angaben des Herstellers

10xTBE-Puffer: 108,0g Tris Base

55,0g Borsäure

8,3g EDTA

auf 1Liter H₂O

Blue Dextran/EDTA: 25mM EDTA (pH 8,0)

50mg/ml Blue dextran

Agarosegel-Elektrophorese:

50xTAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA): 242g Trisbase
57ml Eisessig
100ml 0,5M EDTA pH8
auf 1Liter dest. H₂O
pH7,6-7,8 austitrieren

cDNA GRAF

1	GCACCATGGG GCTCCAGCG CTC GAGTTCA GCGACTGCTG CCTCGATAGT CCGCACTTCC
61	GAGAGACGCT CAAGTCGCAC GAAGCAGAGC TGGACAAGAC CAACAA ATTC ATCAAGGAGC
121	TCATCAAGGA CGGGAAG TCA CTCATAAGCG CGCTCAAGAA TTTGTCTTCA GCGAAGCGGA
181	AGTTTGCAGA TTCCTTAAAT GAATTTAAAT TTCAGTGCAT AGGAGATGCA GAAACAGATG
241	ATGAGATGTG TATAGCAAGG TCTTTGCAGG AGTTTGCCAC TGCCTCAGG AATCTTGAAG G
301	ATGAACGGAT ACGGATGATT GAGAATGCC A GCGAGGTGCT CATCACTCCC TTGGAGAAGT
361	TTCGAAAGGA ACAGATCGGG GCTGCCAAG G AAGCCAAAA GAAGTATGAC AAAGAGACAG
421	AAAAGTATT G TGGCATCTTA GAAAA CACT TGA TTTGTCTTCCAAAAAG AAAGAATCTC
481	AGCTTCAGGA GGCAGACAGC CAAGTGGACC TGGTCCGGCA GCATTTCTAT GAAGTATCCC
541	TGGA ATATGT CTTCAAGGTG CAGGAAGTCC AAGAGAGAA A GATGTTTGAG TTTGTGGAGC
601	CTCTGCTGG C CTTCTGCAA GGACTCTTCA CTTTCTATCA CCATGGTTAC GAACTGGCCA
661	AGGATTTCCG GGACTTCAAG AC ACAGTTAA CCATTAGCAT ACAGAACAC A AGAAATCGCT
721	TTGAAG GCAC TAGATCAGAA GTGGAATCAC TGATG AAAAA GATGAAGGAG AATCCCCTTG
781	AGCACAAGAC CATCA GTCCC TACACC ATGG AGGGATACCT CTACGTGCAG GAGAAACGTC
841	ACTTTGGAAC TTCTTGGGTG AAGCACTACT GTACATATCA ACGGGATTCC AAACAAATCA
901	CCATGGTACC ATTTGACCAA AAGTCAGGAG GAAAAGGGGG AGAAGATGAA TCAGTTATCC
961	TCAAATCCTG CACACGGCGG AAAACAGACT CCATTGAGAA GAGGTTTTGC TTTGATGTGG
1021	AAGCAGTAGA CAGGCCAGGG GTTATCACCA TGCAAGCTTT GTCGGAAGGG GACCGGAGGC
1081	TCTGGATGGA AGCCATGGAT GGCCGGGAAC CTGTCTACAA CTCGAACAAA GACAGCCAGA
1141	GTGAAGGGAC TGCGCAGTTG GACAGCATTG GCTTCAGCAT AATCAGGAAA TGCATCCAT G
1201	CTGTGGAAC CAGAGGGATC AACGAGCAAG GGCTGTATCG AATTGTGGGG GTCAAC TCCA
1261	GAGTGCAGAA GTTGCTGAGT GTCCTGATGG ACCCCAAGAC TGCTTCTGAG ACAGAAACAG
1321	ATATCTGTGC TG AATGGGAG ATAAAGACCA TCACTAGTGC TCTGAAGACC TACCTAAGAA
1381	TGCTTCC AGG ACCACTCATG ATGTACCAGT TTCAA AGAAG TTTCATCAAA GCAGCAAAAC
1441	TGGAGAACCA GGAGTCTCGG GTCTCTGAAA TCCACAGCCT TGTTTCATCGG CTCCCAGAGA
1501	AAAATCGGCA GATGTTACAG CTGCTCATGA ACCACTTGGC AAATGTTGCT AACAAACCACA

1561 AGCAGAATTT GATGACGGTG GCAAACCTTG GTGTGGTGT TGGACCCACT CTGCTGAGGC
 1621 CTCAGGAAGA AACAGTAGCA GCCATCATGG ACATCAAATT TCAGAACATT GTCATTGAGA
 1681 TCCTAATAGA AAACCACGAA AAGATATTTAACACCGTGCC CGATATGCCT CTCACCAATG
 1741 CCCAGCTGCA CCTGTCTCGG AAGAAGAGCA GTGACTCCAA GCCCCCCTCC TGCAGCGAGA
 1801 GGCCCTGAC GCTCTTCCAC ACCGTTTCAGT CAACAGAGAA ACAGGAACAA AGGAACAGCA
 1861 TCATCAACTC CAGTTTGGAA TCTGTCTCAT CAAATCCAAA CAGCATCCTT AATTCCAGCA
 1921 GCAGCTTACA GCCCAACATG AACTCCAGTG ACCCAGACCT GGCTGTGGTC AAACCCACCC
 1981 GGCCCAACTC ACTCCCCCG AATCCAAGCC CAACTTCACC CCTCTCGCCA TCTTGGCCCA
 2041 TGTCTCGGC ACCATCCAGC CCTATGCCCA CCTCATCCAC GTCCAGCGAC TCATCCCCCG
 2101 TCAGCACACC GTTCCGGAAG GCAAAGCCT TGTATGCCTG CAAAGCTGAA CATGACTCAG
 2161 AACTTTCGTT CACAGCAGGC ACGGTCTTCG ATAATGTTCA CCCATCTCAG GAGCCTGGCT
 2221 GGTGGAGGG GACTCTGAAC GGAAAGACTG GCCTCATCCC TGAAAATTAC GTGGAGTTCC
 2281 TCTAACCGTG GGCCCCAGCA GAACTGCTGA GCTTTACATG GTATCCATGA CAACTGCTGA
 2341 TTCCAGTGTC GAGGCCATTT CTCTTTGCCA CTGAGAAATG CAGCGTGACT GACTCTGTTG
 2401 CTACCTGTCA ACATGAATGT TTCTGTGAGC TCTGGTGTCA CTCATCTCCA TGATCATCTC
 2461 AGCCAACATG CATCAGTACT GCAAGAAAAG AAGTCAATCA GCAGAGGAGA GCATTTGATA
 2521 ACTAAGAGGA AGACTTGCAA AGCCGTTTTTTC TCATGAGTAC CCTGAATAGG GGGCACTCAT
 2581 TTTGTTTCAA CGGTCCAAAC GCCCAACCTT CAGAAAGAGG AAGTCAGATA GAAATAGTCC
 2641 CTGAGAGCAC ACTGTGTAGC TAAGCCTGCT GGGGCTGGGT GAAGAAATTG GCGCTGAGAT
 2701 CCAGGCTGGA TCCATTGCTT TTGTTTACAA TAGGCACTCT CTCTACCCCA CCTCTCAGTA
 2761 ATTGAGAATT AAAGTGCTAC AGGCAGCTGG ATATGTTTGC ATGCAGGATG AAGAGGGTTA
 2821 AAACACTGTT TATATAAGAT CCAATTTTTTTC ACCATTTTTTA AAGCAGCCGT TGGCCTGTCA
 2881 TCAGTGAGAT ACAATCCAGT TTTTTCATGC ACGGGAACAC ACACACCCTG CGTTTTTCCC
 2941 TCCCAGGTTA GGAACTTTTTTC TGCCACCAAG GGCTGCCATC CATCGCTTAG TAACCACGGC
 3001 AACCCAACCT ACTCTAAAAC CAAACCAAAA AAATAAAATA ACACATCCTC TTTGCATGAC
 3061 ACATTTTTTTT TCTCCCCTTT TTGGTACACT TTTTTTGAAT GGTTTTCTAA CAACTTGAAG
 3121 CACAGGATCA AGGAATTAGG GTGGTCTACT TGAGGCAGAT GGG

Abbildung I

CDNA-Sequenz GRAF

PCR-Primer markiert:

interne Primer:

externe Primer: _____

up-stream: rot

down-stream: blau

Sequenzierungs-Primer markiert:

up-stream: grün

down-stream: lila

Start und Stop-codon durch **Fettdruck** markiert

Fragment	PCR-Primer	bp	Sequenz 5'><3'
c1 329 bp	Graf start Not1	1.-.23	GCACCATGGGGCTCCCAGCGCTC
	S 18 KSP1	419 - 389	TGTCTCTTTTGTACATACTTCTTTTTGGCTTCC
	S 18 A do Ksp1	329 - 300	GGCATTCTCAATCATCCGTATCCGTTTCATC
c0 603 bp	S 12 B Not1	107 - 137	ATTCATCAAGGAGCTCATCAAGGACGGGAAG
	S 21 ex do	755 - 727	CATCAGTGATTCCACTTCTGATCTAGTGC
	S 20 int do Ksp1	709 - 683	GTGTTCTGTATGCTAATGGTTAACTGT
c2 836 bp	S 5 ex up	545 - 570	ATATGTCTTCAAGGTGCAGGAAGTCC
	Graf 1400 Not1 do	1415 - 1388	TTGAAACTGGTACATCATGAGTGGTCCT
	S 6 int up Ksp1	580 - 609	AGATGTTTGAGTTTGTGGAGCCCCTGCTGG
c3 447 bp	G 5 up	1257 - 1290	TCCAGAGTGCAGAAGTTGCTGAGTGTCCCTGATGG
	AF 5 int do Ksp1	1747 - 1710	AGCTGGGCATTGGTGAGAGGCATATCGGGCACGGTGT
	G 6 up Not1	1301 - 1332	TGCTTCTGAGACAGAAACAGATATCTGTGCTG
c4 690 bp	AF 5 - 3 up ex	1632 - 1664	ACAGTAGCAGCCATCATGGACATCAAATTTTCAG
	Graf Poststop Ksp1 do	2354 - 2325	CCTCGACACTGGAATCAGCAGTTGTCATGG
	AF 5 - 4 up int Not1	1666 - 1698	ACATTGTCATTGAGATCCTAATAGAAAACCACG

Tabelle I

Auflistung der verwendeten PCR-Primer.

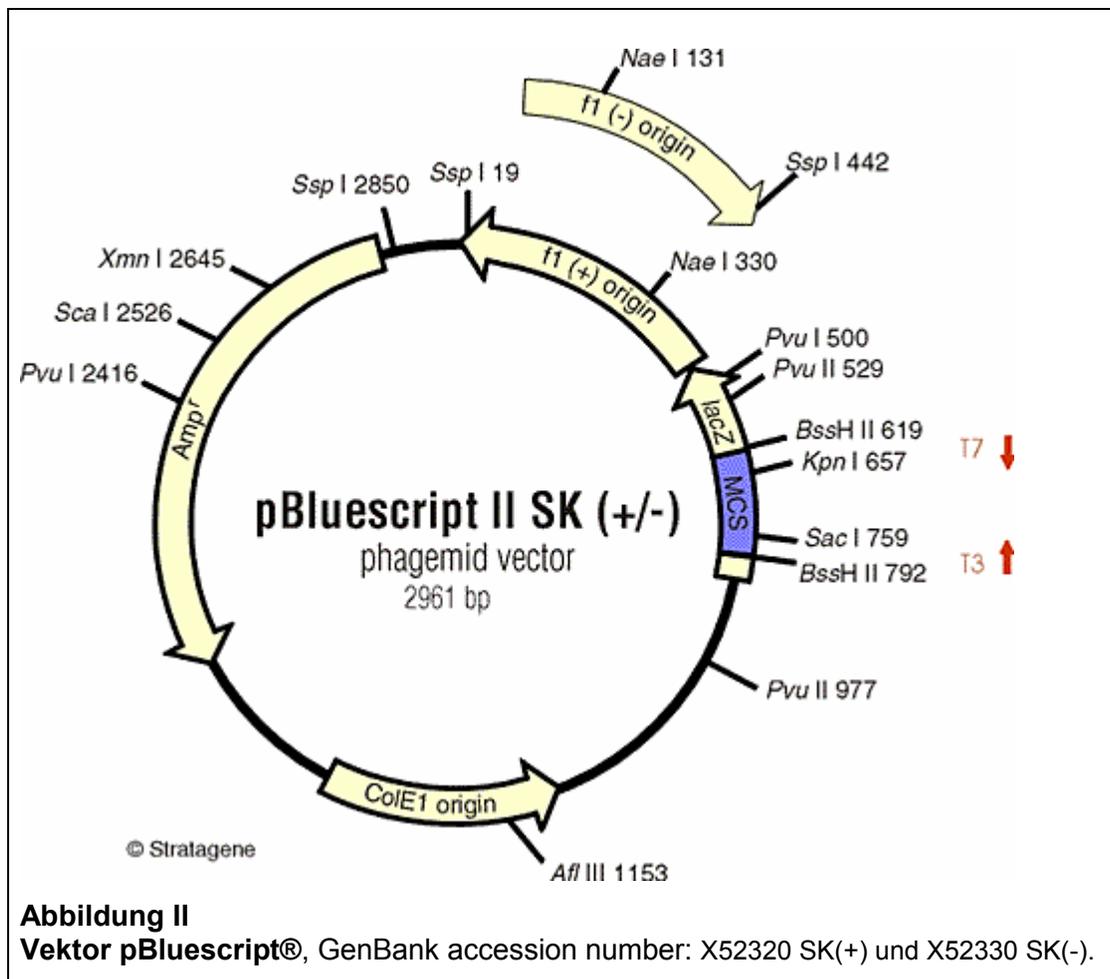
1. Spalte: Länge der Fragmente c0-c4 in Basenpaaren (bp); 2. Spalte: Bezeichnung der Primer; 3. Spalte: Lage der Primer; 4. Spalte: Basenfolge der Oligonukleotide in 5'><3' Richtung.

Fragment	Sequenzierungsprimer	bp	Sequenz 5'><3'
c1	Dom-1-c1-up	267-290	CAGGAGTTTGCCACTGTCTCAGG
	Dom-2-c1-do	454-430	TTCAAGTGTTTTTCTAAGATGCCAC
c4	Dom-3-c4-uo	1850-1873	AAGGAACAGCATCATCAACTCCAG
	Dom-4-c4-do	2171-2146	GAACGAAAGTTCTGAGTCATGTTTCAG
c2	S11	796-819	GTCCCTACACCATGGAGGGATACC
	S17q	1223-1200	GTTGATCCCTCTGGTTTCACAGC
c0-c4	m13	Sequenz liegt in pBluescript	GTAAAACGACGGCCAGT
	m13 rc		AGCGGGATAACAATTTTCACACAGGA

Tabelle II

Auflistung der verwendeten Sequenzierungsprimer.

1. Spalte: Sequenziertes Fragment; 2. Spalte: Bezeichnung der Primer;
3. Spalte: Lage der Primer; 4. Spalte: Basenfolge der Oligonukleotide in 5'><3' Richtung.



9. LITERATUR

1. Raskind,W.H., Tirumali,N., Jacobson,R., Singer,J., and Fialkow,P.J. (1984) Evidence for a multistep pathogenesis of a myelodysplastic syndrome. *Blood*, 63,1318-1323.
2. Janssen,J.W., Buschle,M., Layton,M., Drexler,H.G., Lyons,J., van den,B.H., Heimpel,H., Kubanek,B., Kleihauer,E., Mufti,G.J., and . (1989) Clonal analysis of myelodysplastic syndromes: evidence of multipotent stem cell origin. *Blood*, 73,248-254.
3. Haase,D., Fonatsch,C., and Freund,M. (1992) Karyotype instability in myelodysplastic syndromes--a specific step in pathogenesis preceding clonal chromosome anomalies. *Leuk.Lymphoma*, 8,221-228.
4. Boulwood,J., Fidler,C. (1995) Chromosomal deletions in myelodysplasia. *Leuk.Lymphoma*, 17,71-78.
5. Williamson,P.J., Kruger,A.R., Reynolds,P.J., Hamblin,T.J., and Oscier,D.G. (1994) Establishing the incidence of myelodysplastic syndrome. *Br.J.Haematol.*, 87,743-745.
6. Aul,C., Gattermann,N., and Schneider,W. (1995) Epidemiological and etiological aspects of myelodysplastic syndromes. *Leuk.Lymphoma*, 16,247-262.
7. Radlund,A., Thiede,T., Hansen,S., Carlsson,M., and Engquist,L. (1995) Incidence of myelodysplastic syndromes in a Swedish population. *Eur.J.Haematol.*, 54,153-156.
8. Bennett,J.M., Catovsky,D., Daniel,M.T., Flandrin,G., Galton,D.A., Gralnick,H.R., and Sultan,C. (1982) Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br.J.Haematol.*, 51,189-199.
9. Kouides,P.A., Bennett,J.M. (1999) Advances in the therapy of the myelodysplastic syndromes. *Cancer Treat.Res.*, 99,335-362.
10. Bennett,J.M., Catovsky,D., Daniel,M.T., Flandrin,G., Galton,D.A., Gralnick,H.R., and Sultan,C. (1985) Proposed revised criteria for the

- classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann.Intern.Med.*, 103,620-625.
11. Grimwade,D., Walker,H., Oliver,F., Wheatley,K., Harrison,C., Harrison,G., Rees,J., Hann,I., Stevens,R., Burnett,A., and Goldstone,A. (1998) The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*, 92,2322-2333.
 12. Bloomfield,C.D., Lawrence,D., Byrd,J.C., Carroll,A., Pettenati,M.J., Tantravahi,R., Patil,S.R., Davey,F.R., Berg,D.T., Schiffer,C.A., Arthur,D.C., and Mayer,R.J. (1998) Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res.*, 58,4173-4179.
 13. Creutzig, U. et al. « The childhood AML studies BFM-78 and -83 : Treatment results and risk faktor analysis. " *Haematology and Blood Transfusion* 30 (1987):71-75.
 14. Nowell,P.C., Hungerford,D.A. (1960) A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, 132,1497.
 15. Gelmann,E.P., Psallidopoulos,M.C., Papas,T.S., and Dalla-Favera,R. (1983) Identification of reciprocal translocation sites within the c-myc oncogene and immunoglobulin mu locus in a Burkitt lymphoma. *Nature*, 306,799-803.
 16. Knudson,A.G., Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 68,820-823.
 17. Knudson,A.G., Hethcote,H.W., and Brown,B.W. (1975) Mutation and childhood cancer: a probabilistic model for the incidence of retinoblastoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 72,5116-5120.
 18. Cavenee,W.K., Dryja,T., Philips,A., Benedict,W.F., Godbout,R., Gallie,B., Murph,A., Strong,L., and White,R. (1984) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastom. *Nature*, 305,779-784.
 19. Friend,S.H., Bernards,R., Rogelj,S., Weinberg,R.A., Rapaport,J.M., Albert,D.M., and Dryja,T.P. (1986) A human DNA segment with properties

- of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, 323,643-646.
20. Van den Berghe,H., Cassiman,J.J., David,G., Fryns,J.P., Michaux,J.L., and Sokal,G. (1974) Distinct haematological disorder with deletion of the long arm of no. 5 chromosome. *Nature*, 251,437.
 21. Van den Berghe,H., Michaux,L. (1997) 5q-, Twenty-five years later: A synopsis. *Cancer Genet.Cytogenet.*, 94,1-7.
 22. Pedersen,B., Jensen,I.M. (1991) Clinical and prognostic implications of chromosome 5q deletions: 96 High resolution studied patients. *Leukemia*, 5,566-573.
 23. Pedersen,B. (1996) Anatomy of the 5q- deletion: different sex ratios and deleted 5q bands in MDS and AML. *Leukemia*, 10,1883-1890.
 24. Zhao,N., Stoffel,A., Wang,P.W., Eisenbart,J.D., Espinosa,R., III, Larson,R.A., and Le Beau,M.M. (1997) Molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases to 1-1.5 Mb and preparation of a PAC-based physical map. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 94,6948-6953.
 25. Borkhardt,A., Bojesen,S., Haas,O.A., Fuchs,U., Bartelheimer,D., Loncarevic,I.F., Bohle,R.M., Harbott,J., Repp,R., Jaeger,U., Viehmann,S., Henn,T., Korth,P., Scharr,D., and Lampert,F. (2000) The human GRAF gene is fused to MLL in a unique t(5;11)(q31;q23) and both alleles are disrupted in three cases of myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia with a deletion 5q. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97,9168-9173.
 26. Kozak,M. (1991) Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J.Biol.Chem.*, 266,19867-19870.
 27. Hildebrand,J.D., Taylor,J.M., and Parsons,J.T. (1996) An SH3 domain-containing GTPase-activating protein for Rho and Cdc42 associates with focal adhesion kinase. *Mol.Cell.Biol.*, 16,3169-3178.
 28. Lahiri,D.K., Nurnberger,J.I., Jr. (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.*, 19,5444.

29. Chomczynski,P., Sacchi,N. (1987) Single-step method of RNA isolation by guanidium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.*, 162,156-159.
30. Sambrock,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor University Press, Cold Spring Harbor.
31. Saiki,R.K., Gelfand,D.H., Stoffel,S., Scharf,S.J., Higuchi,R., Horn,G.T., Mullis,K.B., and Erlich,H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239,487-491.
32. Sanger,F., Nicklen,S., and Coulson,A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 74,5463-5467.
33. Nagai,M. et al (1997) Alterations of p53 and Rb genes in a novel human GM-CSF-dependent myeloid cell line (OHN-GM) established from therapy-related leukaemia. *Br.J.Haematol.*, 98.2,392-98
34. Taylor,J.M., Hildebrand,J.D., Mack,C.P., Cox,M.E., and Parsons,J.T. (1998) Characterization of Graf, the GTPase-activating protein for Rho associated with focal adhesion kinase - Phosphorylation and possible regulation by mitogen-activated protein kinase. *J.Biol.Chem.*, 273,8063-8070.
35. Hotchin,N.A., Hall,A. (1996) Regulation of the actin cytoskeleton, integrins and cell growth by the Rho family of small GTPases. *Cancer Surv.*, 27,311-322.
36. Macara,I.G., Lounsbury,K.M., Richards,S.A., McKiernan,C., and Bar-Sagi,D. (1996) The Ras superfamily of GTPases. *FASEB J.*, 10,625-630.
37. Murphy,G.A., Solski,P.A., Jillian,S.A., De la Ossa,P.P., D'Eustachio,P., Der,C.J., and Rush,M.G. (1999) Cellular functions of TC10, a Rho family GTPase: regulation of morphology, signal transduction and cell growth. *Oncogene*, 18,3831-3845.
38. Kaibuchi,K., Kuroda,S., and Amano,M. (1999) Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu.Rev.Biochem.*, 68,459-486.

39. Cai,K., Dynlacht,B.D. (1998) Activity and nature of p21WAF1 complexes during the cell cycle. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 95,12254-12259.
40. Mercer,W.E. (1998) Checking on the cell cycle. *J.Cell.Biochem.*, 50-54.
41. Olson,M.F., Paterson,H.F., and Marshall,C.J. (1998) Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. *Nature*, 394,295-299.
42. Yang,Z.Y., Perkins,N.D., Ohno,T., Nabel,E.G., and Nabel,G.J. (1995) The p21 cyclin-dependent kinase inhibitor suppresses tumorigenicity in vivo. *Nature Med.*, 1,1052-1056.
43. Longenecker,K.L., Zhang,B., Derewenda,U., Sheffield,P.J., Dauter,Z., Parsons,J.T., Zheng,Y., and Derewenda,Z.S. (2000) Structure of the BH domain from graf and its implications for Rho GTPase recognition. *J.Biol.Chem.*, 275,38605-38610.
44. Rittinger,K., Walker,P.A., Eccleston,J.F., Nurmahomed,K., Owen,D., Laue,E., Gamblin,S.J., and Smerdon,S.J. (1997) Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP. *Nature*, 388,693-697.
45. Barrett,T., Xiao,B., Dodson,E.J., Dodson,G., Ludbrook,S.B., Nurmahomed,K., Gamblin,S.J., Musacchio,A., Smerdon,S.J., and Eccleston,J.F. (1997) The structure of the GTPase-activating domain from p50rhoGAP. *Nature*, 385,458-461.
46. Taylor,J.M., Macklem,M.M., and Parsons,J.T. (1999) Cytoskeletal changes induced by GRAF, the GTPase regulator associated with focal adhesion kinase, are mediated by Rho. *J.Cell Sci.*, 112,231-242.
47. Shibata,H., Oishi,K., Yamagiwa,A., Matsumoto,M., Mukai,H., and Ono,Y. (2001) PKNbeta interacts with the SH3 domains of Graf and a novel Graf related protein, Graf2, which are GTPase activating proteins for Rho family. *J.Biochem.(Tokyo)*, 130,23-31.
48. Boulwood,J., Fidler,C., Lewis,S., MacCarthy,A., Sheridan,H., Kelly,S., Oscier,D., Buckle,V.J., and Wainscoat,J.S. (1993) Allelic loss of IRF1 in myelodysplasia and acute myeloid leukemia: retention of IRF1 on the 5q-

chromosome in some patients with the 5q- syndrome. *Blood*, 82,2611-2616.

49. Pedersen,B. (1993) 5q-: pathogenetic importance of the common deleted region and clinical consequences of the entire deleted segment. *Anticancer Res.*, 13,1913-1916.
50. Willman,C.L., Sever,C.E., Pallavicini,M.G., Harada,H., Tanaka,N., Slovak,M.L., Yamamoto,H., Harada,K., Meeker,T.C., List,A.F., and . (1993) Deletion of IRF-1, mapping to chromosome 5q31.1, in human leukemia and preleukemic myelodysplasia. *Science*, 259,968-971.

ERKLÄRUNG

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

LEBENS LAUF

DOMINIQUE BARTELHEIMER

PERSÖNLICHE ANGABEN:

Familienstand:	Ledig, 1 Tochter (Luca Carlotta, *22.09.2002)
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Geburtsdatum, -ort:	08.12.1973 in München
Eltern:	Hans Peter Bartelheimer; Hochschullehrer Liese Lotte Bartelheimer, geb. Leis; Oberstudienrätin

AUSBILDUNG:

1984-1993	Abitur am Willy-Graf-Gymnasium	München
09/1993-03/1994	Freiwilliges Soziales Jahr im Kinderzentrum	München
04/1994-2001	Medizinstudium an der Justus-Liebig-Universität	Giessen
▪ 04/1996	Physikum (Note befriedigend)	
▪ 09/1996	1. Famulatur HNO, Praxis Dr. Leis	Ingolstadt
▪ 04/1997	Erstes Staatsexamen (Note ausreichend)	
▪ 09/1997	2. Famulatur Pädiatrie, Kinderklinik Lachnerstraße	München
▪ 03/1998	3. Famulatur Innere Medizin, Lago Maggiore, Mendoza	Argentinien
▪ 04/1998	4. Famulatur Innere Medizin, Lago Maggiore, Mendoza	Argentinien
▪ 10/1999	Zweites Staatsexamen (Note gut)	
08/1999-07/2000	Praktisches Jahr:	
	Innere Medizin – Zentrum für Innere Medizin an der JLU	Giessen
	Pädiatrie – Zentrum für Kinderheilkunde an der JLU	Giessen
	Chirurgie – Hospita Naval, Vina del Mar	Chile
▪ 05/2001	Drittes Staatsexamen (Note gut)	
09/2001-9/2003	Ärztin im Praktikum – Kinderklinik des Diakoniekrankenhauses, akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Göttingen (wegen Schwangerschaft und Elternzeit unterbrochen von August 2002-März 2003)	Rotenburg/ Wümme
Seit 11/2003	Assistenzärztin – Kinderklinik des Diakoniekrankenhauses, akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Göttingen	Rotenburg/ Wümme

VERÖFFENTLICHUNGEN

Im Rahmen der Promotionsarbeit (Titel: Sequenzanalyse des humanen GRAF-Gens bei Kindern mit myelodysplastischem Syndrom und akuter myeloischer Leukämie und Deletion 5q) in der Hämatologisch-Onkologischen Abteilung am Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen, Betreuung: PD Dr. A. Borkhardt

SPRACHKENNTNISSE

Spanisch, Englisch und Französisch

TÄTIGKEITEN VOR/NEBEN DEM STUDIUM

1990/91 Jahrgangsstufensprecherin 11. Klasse

08/1995-08/1997 Pflegetätigkeit im Psychiatrischen Landeskrankenhaus Licher Straße,
Giessen

04/1998-
08/1999 Pflegetätigkeit in der Neurologischen Klinik der Justus-Liebig-Universität,
Giessen

AUSLANDSAUFENTHALTE

08/1997-03/1998 Auslandssemester an der Universidad de Mendoza, Argentinien
Praktikum in Innere Medizin (8 Wo.)
Praktikum in Pädiatrie (4 Wo.)
Praktikum in Gynäkologie u. Geburtshilfe (6 Wo.)

12/2000-04/2001 Auslandstertial im Praktischen Jahr an der Universidad Valparaiso, Chile
Allgemein- und Unfallchirurgie, Hospital Naval (Lehrkrankenhaus)

ZUSÄTZLICHE QUALIFIKATIONEN

- Teilnahme am Seminar „Ethische Konflikte im ärztlichen Alltag“ (20./21.06.1997)
- Teilnahme am Praktikum „Möglichkeiten der Schmerzbehandlung durch Akupunktur, therapeutische Lokalanästhesie und Hautausleitungsmethoden“ (SS1996, WS1996/97)
- Teilnahme an der „Tagung für Hämatologie und Onkologie“ der Kind-Phillips-Stiftung, Wilsede (18.-20.08.1998)
- Mitarbeit in der Diabetes-Ambulanz für Kinder und Jugendliche der Kinderklinik des Diakoniekrankenhauses Rotenburg/Wümme

DOMINIQUE BARTELHEIMER

SEPTEMBER 2004