

**Der nichtradioaktive Protein Truncation Test:
Eine Methode zum Screenen auf translationsterminierende
Mutationen in putativen Tumorsuppressorgenen.
Untersuchungen des GRAF-Gens bei Kindern mit akuter
myeloischer Leukämie.**

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

vorgelegt von

Heike Mettal

aus Braunfels

Gießen, 2005

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin

Abteilung Pädiatrische Hämatologie und Onkologie

Leiter: Prof. Dr. Reiter

Des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Borkhardt

Gutachter: Prof. Dr. Pralle

Tag der Disputation: 30.11.2005

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	Seite	i
Abkürzungen		iv
1 Einleitung		1
1.1 Leukämien		1
1.2 AML		2
1.3 Tumorsuppressorgene und Protoonkogene		4
1.4 <i>MLL</i>		7
1.5 <i>GRAF</i>		9
1.6 Nicht radioaktiver Protein Truncation Test (PTT)		12
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit		16
2 Material		17
2.1 Patienten		17
2.2 Zelllinien		17
3 Methoden		21
3.1 Isolierung mononukleärer Zellen		21
3.2 RNA-Isolation		21
3.3 Reverse Transkription		22
3.4 Genomische DNA		22
3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)		23
3.6 PCR-Modifikationen		24
3.6.1 Nested-PCR		24
3.6.2 “Long distance“ PCR		25
3.6.3 Hot start-PCR		25
3.7 Agarosegelelektrophorese		27
3.8 Reinigung von PCR-Produkten		27
3.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen		28
3.10 DNA-Klonierung		28

3.10.1	Restriktionsverdau	29
3.10.2	Dephosphorylierung	29
3.10.3	Ligaseansatz	29
3.10.4	Transformation	30
3.10.5	Plasmidpräparation und Glycerinkulturen	30
3.11	TA Klonierung mit Topoisomerase	31
3.12	Mutagenese	33
3.13	Protein Truncation Test (PTT)	36
3.13.1	In vitro Transkription und Translation	36
3.13.2	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	38
3.13.3	Western-Blot	39
3.13.4	Chemilumineszens	40
3.14	Sequenzierung	41
4	Ergebnisse	43
4.1	Methodik	43
4.2	Patientenanalytik	50
5	Diskussion	56
5.1	Mutationsdetektion mittels PTT	56
5.2	<i>GRAF</i>	60
6	Zusammenfassung	65
7	Literatur	66
8	Erklärung	78
9	Danksagung	79
10	Anhang	80
10.1	<i>GRAF</i> -Sequenz	80
10.2	<i>GRAF</i> -Protein	81
10.3	Puffer, Lösungen und Medien	82

10.4 Oligonukleotide	83
10.5 Plasmide	84
10.5.1 pcDNA3	84
10.5.2 pCRII-Topo	85
10.6 Bakterienstämme	86
10.7 Kits	86
10.8 Sonstiges	86
11 Lebenslauf	87

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Adenomatosis Polyposis Cancer
ARMS	Amplification refractory mutation system
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BRCA1	Breast Cancer Gen 1
BRCA2	Breast Cancer Gen2
Cdc42	Cell divisioncycle 42 protein (GTP bindendes Protein)
CDGE	Constant denaturing gel elektrophoresis
cDNA	(zu RNA) komplementäre DNA
Da	Dalton
DGGE	Denaturierende Gradientengelelektrophorese
DMD	Duchenne Muskeldystrophie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTPs	Desoxynukleotide
ds	double strand
ECL	"enhanced chemiluminescence"
EMC	Enzyme mismatch cleavage
FAK	fokale Adhäsionskinase
g	Gravitationskonstante
GAP	Guanidintriphosphat aktivierendes Protein
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GDI	Guanin Nukleotiddissoziationsinhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin Nukleotidaustauschfaktor
GRAF	GTPase-Regulator assoziiert mit der fokalen Adhäsionskinase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HMLH1	humanes mismatch Reparaturgen MutL-homolog
HMSH2	humanes mismatch Reparaturgen MutS-homolog

kb	Kilobase
kD	Kilodalton
l	Liter
m	Milli-
M	molar; Mol/Liter
MCS	multiple cloning site
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
min	Minuten
MLL	mixed lineage leukemia-Gen
n	Nano
NF1	Neurofibromatose Typ 1
OD	optische Dichte
p21	Protein 21
p53	Protein 53
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PTT	Protein Truncation Test
Ras	Rat sarcoma virus, GTP bindendes Protein
RB	Retinoblastom
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
rpm	rounds per minute
RT-PCR	PCR nach reverser Transcription
s	Sekunde
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
SH3	src homology 3
SSCP	Single strand conformation polymorphism
t	Translokation
Tab.	Tabelle
TTGE	Temporal temperature gradient electrophoresis
U	Unit (Einheit)
WT	Wildtyp
μ	Mikro-

1 Einleitung

1.1 Leukämien

Der Begriff Leukämien = „weißes Blut“ wurde 1844 von Rudolf Virchow geprägt. Er bezieht sich auf eine erhebliche Vermehrung von Leukozyten im Blut. Dies kann beispielsweise durch Zentrifugieren der Blutprobe sichtbar gemacht werden. Die sich über der Erythrozytensäule ansammelnde Leukozytenmanschette (= buffy coat) ist in diesem Fall verbreitert ¹.

Der Leukämie liegt eine klonale autonome Proliferation einer hämatopoetischen Vorläuferzelle zugrunde. Prinzipiell können alle Zellen des Stammzell- und des Proliferationspools maligne entarten. Das Wachstum dieser Zellen erfolgt unabhängig der normalen Regulationsmechanismen, und die Zelldifferenzierung bzw. Reifung ist gestört oder aufgehoben. Die Abb. 1.1 veranschaulicht die Hämatopoese.

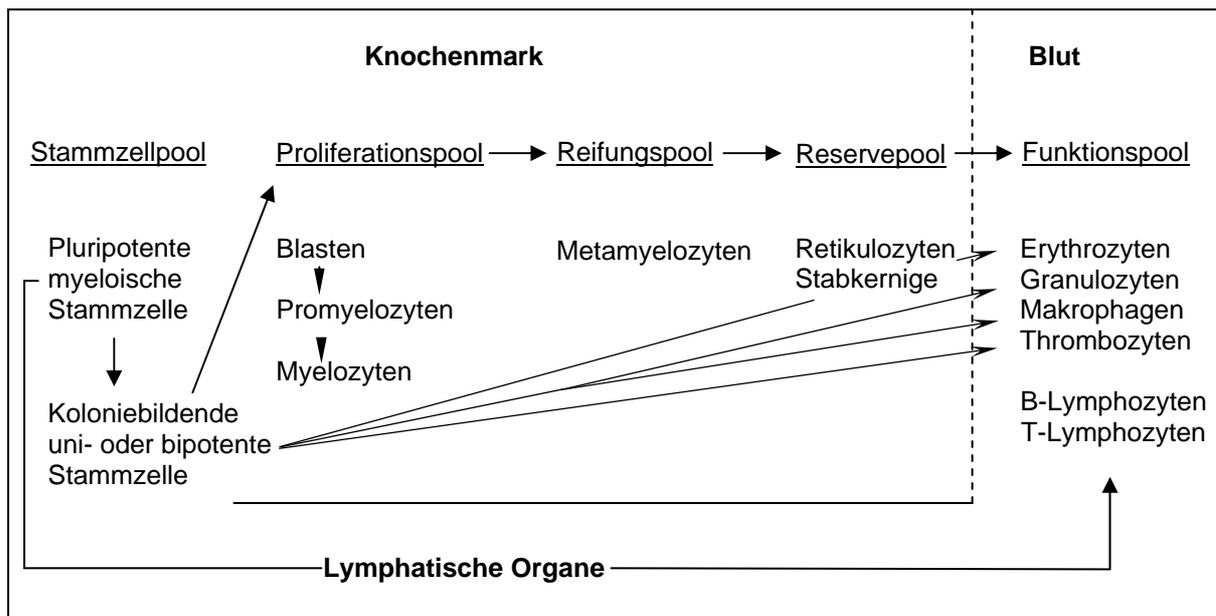


Abb. 1.1: Hämatopoese ¹

Die autonome Proliferation führt dann zur Verdrängung der normalen Hämatopoese. Die Anzahl der Leukozyten kann normal, vermindert oder erhöht sein ².

Die Klassifikation der Leukämien erfolgt nach verschiedenen Kriterien. Anhand morphologischer Merkmale der malignen Zellen unterscheidet man zwischen myeloischen und lymphatischen Leukämien. Der klinische Verlauf teilt sie in akute und chronische Formen. Als sekundäre akute Leukämien bezeichnet man therapieinduzierte und aus

chronischen hämatologischen Erkrankungen (alle myeloproliferativen Erkrankungen und myelodysplastischen Syndrome) entstandene Leukämien³.

34,4% aller Malignome im Kindesalter sind Leukämien. Bei 80% der Leukämien im Kindesalter handelt es sich um akute lymphatische Leukämien. 18% der Leukämien, bzw. 4,9% aller Malignome im Kindesalter sind akute myeloische Leukämien. Chronisch myeloische Leukämien sind mit einem Anteil von 2% an allen Leukämien im Kindesalter sehr selten⁴. Chronisch lymphatische Leukämien existieren bei Kindern praktisch nicht³.

1.2 AML

Die Ursache der AML ist meist nicht bekannt. Es existieren aber eine Reihe prädisponierender Faktoren. Dazu zählen ionisierende Strahlung und Chemikalien wie Benzol. Aber auch Substanzen, die zur Therapie maligner Erkrankungen eingesetzt werden, können das Risiko, an einer AML zu erkranken, deutlich erhöhen. Hierzu gehören alkylierende Substanzen und Topoisomerase II-Inhibitoren. Nach Therapie eines metastasierten Ewing-Sarkoms mit Bestrahlung und hohen Dosen Ifosamid und Cyclophosphamid erkranken 23% der Patienten an einer AML^{5,16}. Therapieinduzierte AML nach vorangegangener Therapie mit alkylierenden Substanzen geht oft einher mit Veränderungen / Deletionen der Chromosome 5 und 7^{6,7,8}. Von den Patienten, die mit Topoisomerase II-Inhibitoren therapiert werden, erkranken 2-3% ca. 2 Jahre nach Exposition an einer therapieinduzierten AML. In diesen Fällen liegen oft chromosomale Translokationen vor, die den Bereich 11q23 betreffen⁹.

Für einige hereditäre Erkrankungen besteht ebenfalls ein erhöhtes Erkrankungsrisiko. Bei dem relativ häufig vorkommenden Down-Syndrom beträgt das Erkrankungsrisiko 1 : 200. Ca. 10% aller an AML erkrankter Kinder leidet an M. Down^{10,11}. Neurofibromatose Typ 1, das Kostmann-Syndrom, Fanconi-Anämie und das Bloom-Syndrom gehen ebenfalls mit einem erhöhten AML-Risiko einher. Für die Fanconi-Anämie und das Bloom-Syndrom ist eine generelle DNA-Brüchigkeit bekannt^{12,13}. Beim Kostmann-Syndrom kommt es zur Synthese eines eingeschränkt funktionsfähigen G-CSF-Rezeptors¹⁴, und bei der Neurofibromatose Typ 1 kommt es aufgrund des biallelischen Verlustes des als Tumorsuppressorgen fungierenden *NFI*-Gens zur ungehemmten Proliferation myeloischer Zellen¹⁵.

Die Klassifikation der AML erfolgt nach den French-American-British (FAB)- Kriterien, die im wesentlichen auf morphologischen und zytochemischen Kriterien beruhen.

Zusatzinformationen können mit Hilfe der Immunzytologie gewonnen werden. Prognostische Aussagekraft hat neben dem Patientenalter vor allem der zytogenetische Befund ¹⁶.

Tab. 1.1: Klassifikation der AML mit häufigen Chromosomenaberrationen ¹⁶⁻¹⁹

FAB	Morphologischer Subtyp	Aberration	Gene	Prognose
M0	Akute undifferenzierte myeloische Leukämie			
M1	Akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung	t(9;22)(q34;q11) auch bei M2	<i>BCR/ABL</i>	
M2	Akute myeloische Leukämie mit Ausreifung	t(8;21)(q22;q22) auch bei M4	<i>ETO / AML1</i>	variabel
M3	Akute Promyelozytenleukämie	t(15;17)(q25;q21)	<i>PML / RARA</i>	gut
M3v	Akute Promyelozytenleukämie hypogranuläre Variante			
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie			
M4eo	Akute myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie	inv(16)(p13q22)	<i>MYHA11 / CBFβ</i>	gut
M5	Akute Monozytenleukämie	t(9;11)(p22;q23) 11q23 Rearrangements auch bei M4	<i>MLL / AF9</i> <i>MLL / ...</i>	variabel
M5a	Akute Monoblastenleukämie			
M5b	Akute promonozytäre-monozytäre Leukämie			
M6	Akute Erythroblastenleukämie			
M7	Akute Megakaryoblastenleukämie			
	Oft mit Basophilie	t(6;9)(p23;q34)	<i>DEK / CAN</i>	schlecht
	Assoziiert mit Thrombozytose	3q21 Rearrangements		schlecht
		del (20q), +8, del (5q), del (7q), 12p Rearrangements		

Von den ersten Symptomen bis zur Diagnosestellung liegt bei der AML aufgrund des akuten Verlaufs meist nur eine relativ kurze Zeitspanne. Die Symptome sind durch die Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark charakterisiert, die zu einer Verminderung reifer funktionsfähiger Zellen im peripheren Blut führt. Dies begünstigt die Entstehung schwerer Infektionen. Petechien, Hämatome und Schleimhautblutungen treten auf. Die Anämie geht mit Blässe, Müdigkeit und ggf. Dyspnoe einher. Unspezifische Symptome sind eine Erhöhung der Körpertemperatur, Bauchschmerzen, Thorax-, Knochen-

und Gelenkschmerzen. Die leukämischen Zellen können in extramedulläre Organe infiltrieren. Klinisch äußert sich dies als Splenomegalie, Hepatomegalie, Lymphadenopathie, Hautinfiltrate und Gingivahyperplasie (überwiegend AML M4 und M5). Eine Infiltration des ZNS bzw. der Meningen wird als Meningeosis leucaemica bezeichnet.

1.3 Tumorsuppressorgene und Protoonkogene

An der Induktion und Proliferation von Malignomen sind zahlreiche Gene beteiligt. Es handelt sich dabei um Gene, die das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung regulieren. Man unterscheidet zwei große Gengruppen: die wachstumsfördernden Protoonkogene und die wachstumshemmenden Tumorsuppressorgene. Zur Entstehung und Proliferation maligner Zellen kommt es durch die Akkumulation von genetischen Veränderungen in diesen beiden Gengruppen^{20,21}. Bei den Protoonkogenen handelt es sich um evolutionär hoch konservierte Gene, die an der Regulation des Zellzyklus, der Zellteilung und Zelldifferenzierung wesentlich beteiligt sind. Protoonkogene kodieren im Einzelnen Zytokine, Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren, second messenger und Transkriptionsfaktoren²². Kommt es in einem Protoonkogen zu einer Mutation durch die das Genprodukt die Zellproliferation in unphysiologischer Weise fördert, so spricht man von einem Onkogen. Diese Aktivierung kann durch eine Punktmutation im betreffenden Gen, die Fusion zweier Gene (beispielsweise durch Translokation), oder durch die Amplifikation von Protoonkogenen geschehen.

Unter Amplifikation versteht man hier die Vermehrung des normalerweise in einfacher Kopie vorhandenen Gens. Der zugrundeliegende Mechanismus ist nicht gänzlich verstanden. Alle amplifizierten Protoonkogene führen zu einem erhöhten Gehalt an korrespondierender RNA bzw. an Protein. Bekanntes Beispiel ist das mit Neuroblastomen assoziierte *N-MYC*-Gen, bei dem es durch die Amplifikation zur Überexpression eines Transkriptionsfaktors kommt^{1,3}. Die erhöhte Anzahl des Protoonkogens korreliert mit fortgeschrittenen Krankheitsstadien und einer schlechten Prognose²². Mutationen der *RAS*-Gene beruhen auf Punktmutationen, und führen zur Synthese veränderter GTP-bindender Proteine²². *K-RAS*-Mutationen kommen unter anderem gehäuft bei akuten myeloischen Leukämien vor²². Chromosomale Translokationen, die zu einem Fusionsgen führen, können ebenfalls die Malignomentstehung begünstigen. Bekanntestes Beispiel ist wohl die Translokation (9;22), die bei 95% aller CML-Patienten als sog. Philadelphia-Chromosom

nachgewiesen werden kann. Durch die Translokation des *ABL*-Protoonkogens von Chromosom 9 zu Chromosom 22 in die Region des *BCR*-Gens kommt es zur Bildung des *BCR-ABL*-Fusionsgens und damit zur Aktivierung des Protoonkogens.

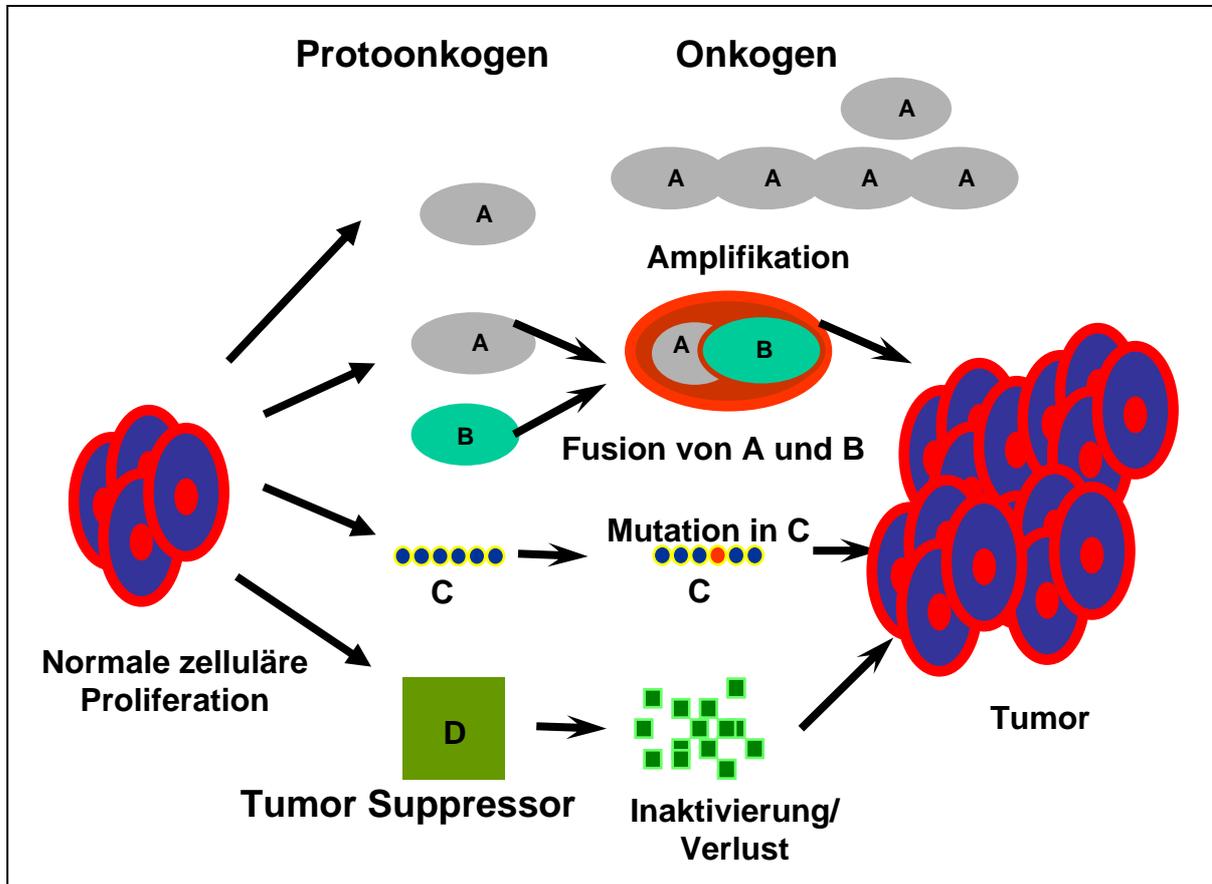


Abb. 1.2: Molekulare Mechanismen der Tumorentstehung ²³

Während Onkogene über eine Steigerung ihrer Aktivität (gain of function) die Proliferation begünstigen, geschieht dies bei Tumorsuppressorgenen durch den Verlust ihrer proliferationshemmenden Wirkung (loss of function). Zum Verlust der proliferationshemmenden Wirkung kommt es erst durch die Mutation beider Allele eines Tumorsuppressorgens. Ein intaktes Allel reicht zur Erfüllung der regulatorischen Aufgaben aus. Bei Onkogenen genügt hingegen die Mutation eines Allels, um malignes Zellwachstum zu induzieren ²⁴. Von dieser Regel gibt es Ausnahmen, wie beispielsweise das *p27/KIP1*-Tumorsuppressorgen ²⁵. In diesem Fall reicht ein intaktes Allel nicht aus, um die Proteinmenge bereitzustellen, die zur Aufrechterhaltung der Funktion notwendig ist. Dies wird als Haploinsuffizienz bezeichnet. Gelegentlich wird im Zusammenhang mit Tumorinduktion noch eine dritte, eher indirekt beteiligte Gengruppe genannt, die sog. DNA-

Reparaturgene. Da diese Gene durch ihren Funktionsverlust malignes Zellwachstum begünstigen werden sie auch als Untergruppe der Tumorsuppressorgene eingeordnet ²⁶. Zur Zeit sind etwa 30 Tumorsuppressorgene bekannt ²³. Die Proteine der Tumorsuppressorgene sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt. Sie kontrollieren den Zellzyklus, regulieren die Zelldifferenzierung, Interzellularkontakte, Apoptose und tragen durch DNA-Reparaturgene zum Erhalt der genetischen Unversehrtheit bei. Tumorsuppressorgene greifen meist in hoch konservierte Signalwege ein und interagieren mit Protoonkogenen und weiteren Tumorsuppressorgenen ²⁶. Für das Verständnis der Tumorsuppressorgene sind die Untersuchungen des Retinoblastomgens durch A.G. Knudson von entscheidender Bedeutung. Er beobachtete ein in einigen Familien gehäuftes Auftreten von Retinoblastomen. Im Gegensatz zu sporadischen Formen treten diese familiären Fälle häufig bilateral bzw. multifokal auf und das Erkrankungsalter ist deutlich geringer. Aufgrund seiner Untersuchungen stellte er die Two Hit-Hypothese auf, in der er postulierte, daß zur Entwicklung der malignen Zellen zwei voneinander unabhängige Mutationen in den beiden Allelen eines Tumorsuppressorgens notwendig sind.

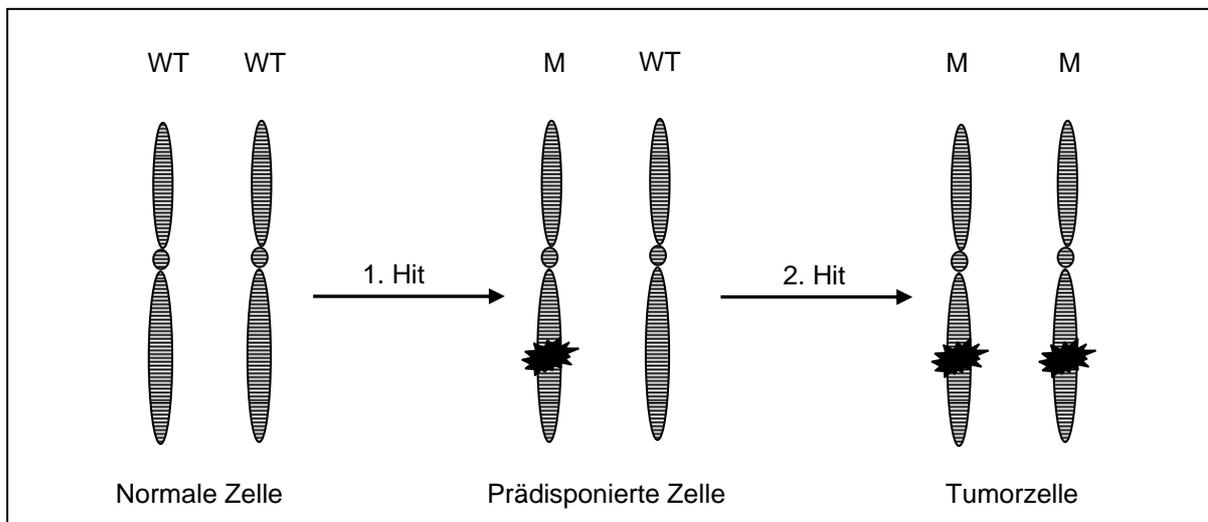


Abb. 1.3: „Two Hit“-Hypothese nach Knudson ²⁴
M: Mutante ; WT: Wildtyp

Bei den familiären Formen handelt es sich bei dem ersten Mutationsereignis um eine Keimbahnmutation, die also alle Körperzellen betrifft. Zum Funktionsverlust des Gens kommt es aber erst durch eine zusätzliche somatische Mutation. Bei den sporadischen Formen müssen diese beiden Mutationen in einer Zelle stattfinden. Zum Funktionsverlust der Tumorsuppressorgene kann es durch Punktmutationen, Deletionen oder

Expressionsverlust bedingt durch Hypermethylierung der Promoterregion kommen²⁷. Befinden sich solche Veränderungen auf einem Allel in der Keimbahn, wird ein erhöhtes Krebsrisiko an die Nachkommen weitergegeben. Die meisten dieser Tumordispositionen folgen einem autosomal-dominanten Erbgang. Im Gegensatz zu sporadischen Erkrankungen treten diese Tumore früher auf²⁸.

Weitere Beispiele sind das Li-Fraumeni-Syndrom mit Keimbahnmutationen von p53 und Mutationen der Tumorsuppressorgene *BRCA1* und *BRCA2* für das erbliche Mammacarcinom. Mutationen im p53 Gen kommen nicht nur beim Li-Fraumeni-Syndrom vor, sondern finden sich bei über 50% aller menschlichen Tumore²⁶. Neben dieser Häufigkeit sind Korrelationen mit der Prognose für Mutationen im p53 Gen beschrieben²⁹. Zur Zeit wird versucht funktionsloses p53 mit sogenannten Small molecular drugs zu reaktivieren^{30, 31} bzw. mit einer Adenovirusmutante p53-defiziente Zellen gezielt zu lysieren^{32,33}.

Die bei Leukämien häufig vorkommenden Deletionen haben zu der Annahme geführt, daß Tumorsuppressorgene an der Pathogenese beteiligt sein können^{34,35,36}. Dabei könnte ein Allel des Tumorsuppressorgens deletiert sein, während das andere Allel durch eine andere Mutation funktionsunfähig ist. Bei AML und MDS wurde gehäuft ein Verlust von Chromosom 5 bzw. des langen Armes von Chromosom 5 festgestellt^{37,38,39}. Als konstant von Deletionen betroffene Region wurde 5q31 identifiziert⁴⁰. In diesem Bereich wird daher ein Tumorsuppressorgen vermutet, dessen Funktionsverlust eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von AML und MDS spielt⁴¹.

1.4 *MLL*

Sowohl bei akuten lymphatischen als auch bei akuten myeloischen Leukämien liegen häufig chromosomale Translokationen vor, an denen Chromosom 11 (11q23) beteiligt ist. Bei Kindern unter einem Jahr, die an ALL leiden, liegt diese Translokation in 70% der Fälle vor, bei Kindern mit AML in 60% der Fälle⁴² und bei sekundärer AML nach Chemotherapie mit Epipodophyllotoxinen (Etoposid, Tenoposid), die Topoisomerase II inhibieren, in 80% der Fälle⁴³.

Als das in der Mehrzahl dieser Translokationen betroffene Gen wurde *MLL* (myeloid-lymphoid leukemia bzw. mixed-lineage leukemia) identifiziert⁴⁴, das auch als *HRX*⁴⁵, *HTRX1*⁴⁶ oder *ALL-1*⁴⁷ bezeichnet wird. Ungewöhnlich ist die Vielzahl an unterschiedlichen Genen, mit denen das *MLL*-Gen fusioniert⁴⁸. Bei all diesen

1.5 GRAF

Durch die Entdeckung der seltenen Translokation $t(5;11)(q31;q23)$ mit *MLL*-Rearrangement bei einem 4 Monate alten Jungen mit juveniler myelomonozytärer Leukämie bestand die Möglichkeit, ein weiteres *MLL*-Fusionsgen zu identifizieren und zu untersuchen. Als *MLL*-Partnergen wurde das humane *GRAF*-Gen entdeckt. Es weist auf Proteinebene 90% Homologie zum Hühner *graf*-Gen auf. Die Abkürzung steht für GTPase Regulator assoziiert mit fokaler Adhäsionskinase pp125^{FAK}.⁵³

GRAF umfaßt 24 Exons und kodiert in Leukozyten ein 759 AS umfassendes Protein mit einem Molekulargewicht von 86 kD⁵⁴. Die verschiedenen funktionellen Bereiche können der Abbildung 1.5 entnommen werden.

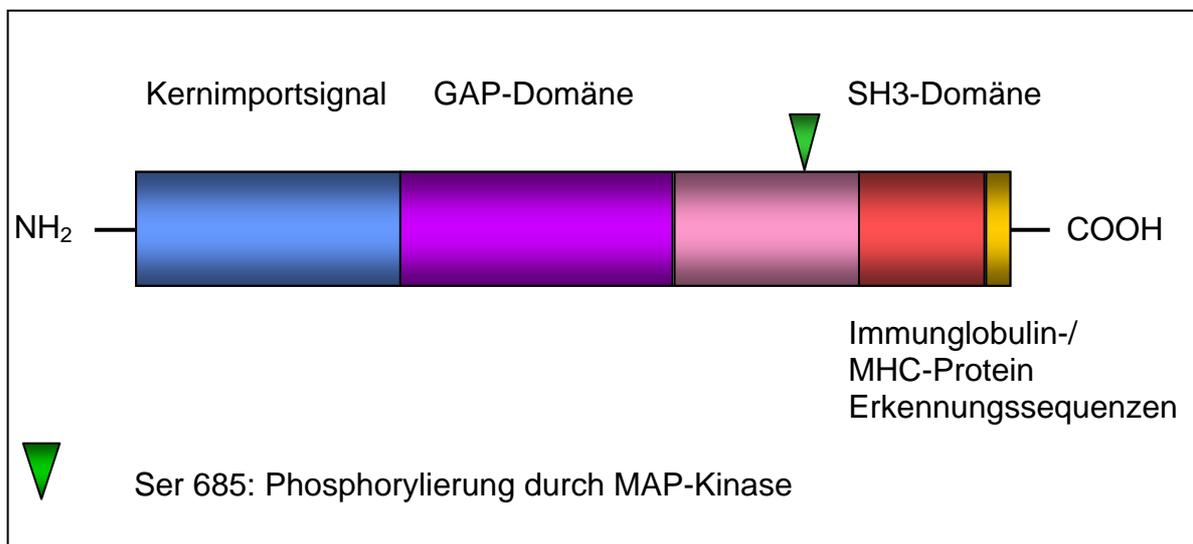


Abb.1.5: Struktur des GRAF-Proteins⁵⁴

Trotz Kernimportsignal ist das GRAF-Protein überwiegend im Zytoplasma lokalisiert. Es wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, besonders in Hirn, Herz, Plazenta und epithelialen Geweben, aber nur schwach in myelo-poetischen und lympho-poetischen Zellen⁵⁴.

Funktionell sind die GAP und die SH3 Domäne besonders wichtig. SH3 Domänen sind verantwortlich für Protein-Protein-Interaktionen⁵⁵. Die SH3 Domäne von GRAF bindet an eine prolinreiche Region im C-terminalen Bereich der fokalen Adhäsionskinase (FAK)⁵⁶. FAK gehört zu den Tyrosinkinase, die im Integrin Signalweg eine wichtige Komponente darstellen⁵⁶. Sie verknüpfen das Aktinzytoskelett mit der extrazellulären Matrix, und stellen so eine Verbindung zwischen Intra- und Extrazellularraum her. Bei in vitro Untersuchungen

der GRAF GAP Domäne wurde eine Stimulation der intrinsischen GTPase Aktivität von RhoA und Cdc42 festgestellt ⁵⁶. Untersuchungen zur Funktion von GRAF in vivo zeigen jedoch, daß sich diese GAP Aktivität auf RhoA beschränkt ⁵⁷. RhoA ist Bestandteil der Rho Familie, die Teil der RAS Superfamilie ist. Es handelt sich dabei um niedermolekulare GTP bindende Proteine, die als molekulare "Schalter" fungieren ^{57,58,59}. RAS nimmt bei der Regulation der Zellform, der Motilität und dem Zellwachstum eine Schlüsselrolle ein ²².

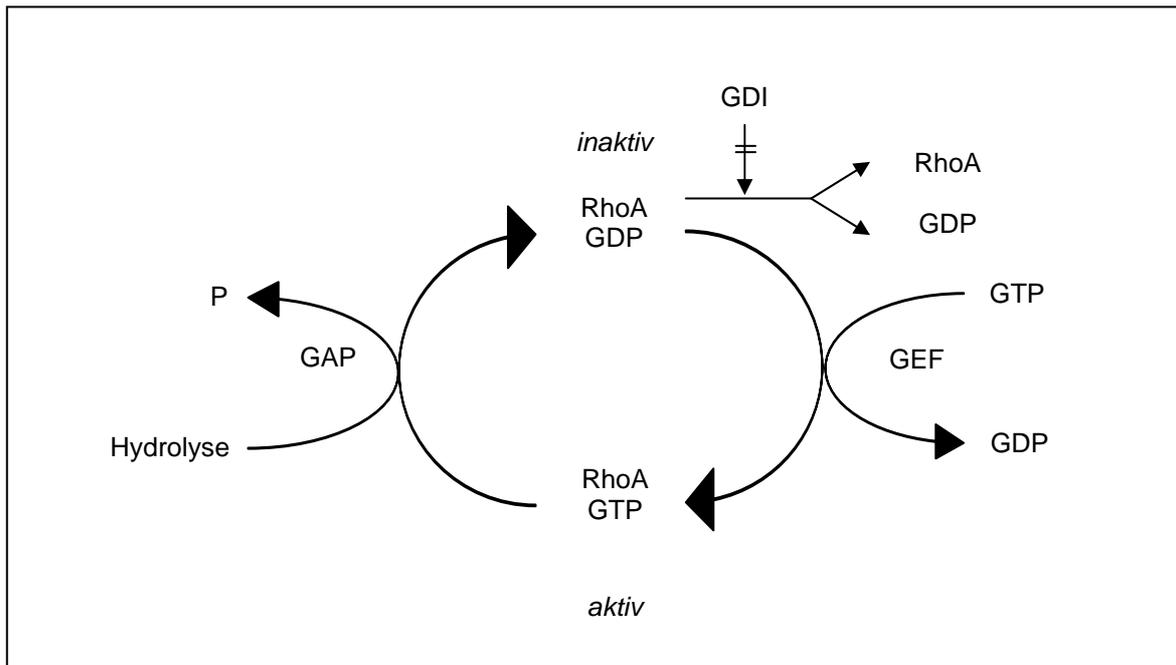


Abb. 1.6: RhoA-Regulation

Das Verhältnis zwischen GDP und GTP gebundenen niedermolekularen G-Proteinen wird beeinflusst durch Guanin Nukleotiddissoziationsinhibitoren (GDIs), Guanin Nukleotidaustauschfaktoren (GEFs) und GTPase aktivierende Proteine (GAPs). GDIs hemmen die Dissoziation von GDP, GEFs beschleunigen den Austausch von GDP durch GTP und GAPs verstärken die Hydrolyse von GTP durch Steigerung der GTPase Aktivität. Da GRAF als RhoGAP wirkt, erhöht sich der Anteil an GDP gebundenem Rho und damit auch der Anteil an GDI gebundenem Rho. Somit verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen den GDI gebundenen G-Proteinen, und die von GDI befreiten Proteine können aktiv werden ⁶⁰. Auf diese Weise beeinflusst GRAF niedermolekulare G-Proteine. Durch die verstärkte GTPase Aktivität von Rho wird Rho herabreguliert ⁵⁷. Rho ist neben anderen Proteinen an der Regulation des Actin-Zytoskeletts, der Genexpression und der Zellzyklusregulation beteiligt ⁶¹. Unter Rho-, Rac- und Cdc42-Einfluß können Swiss 3T3

Zellen in die S-Phase eintreten⁶². Des Weiteren wurde gezeigt, daß RhoA den Zellzyklusinhibitor p21 unterdrückt⁶³. Durch die fehlende Herabregulation von Rho könnte funktionsloses GRAF dazu beitragen, daß p21 unterdrückt, und somit der Zellzyklus aktiviert wird⁵³.

Bei der beschriebenen Translokation t(5;11)(q31;q23) wird nur das *MLL* / *GRAF*-Fusionsgen, nicht jedoch das reziproke *GRAF* / *MLL*-Gen exprimiert. Das chimäre Protein enthält AT-Haken als DNA-Bindedomäne und DNA-Methyltransferasemotive von seinem *MLL*-Anteil und die SH3 Domäne von *GRAF*. Die GAP Domäne von *GRAF* fehlt⁶⁴.

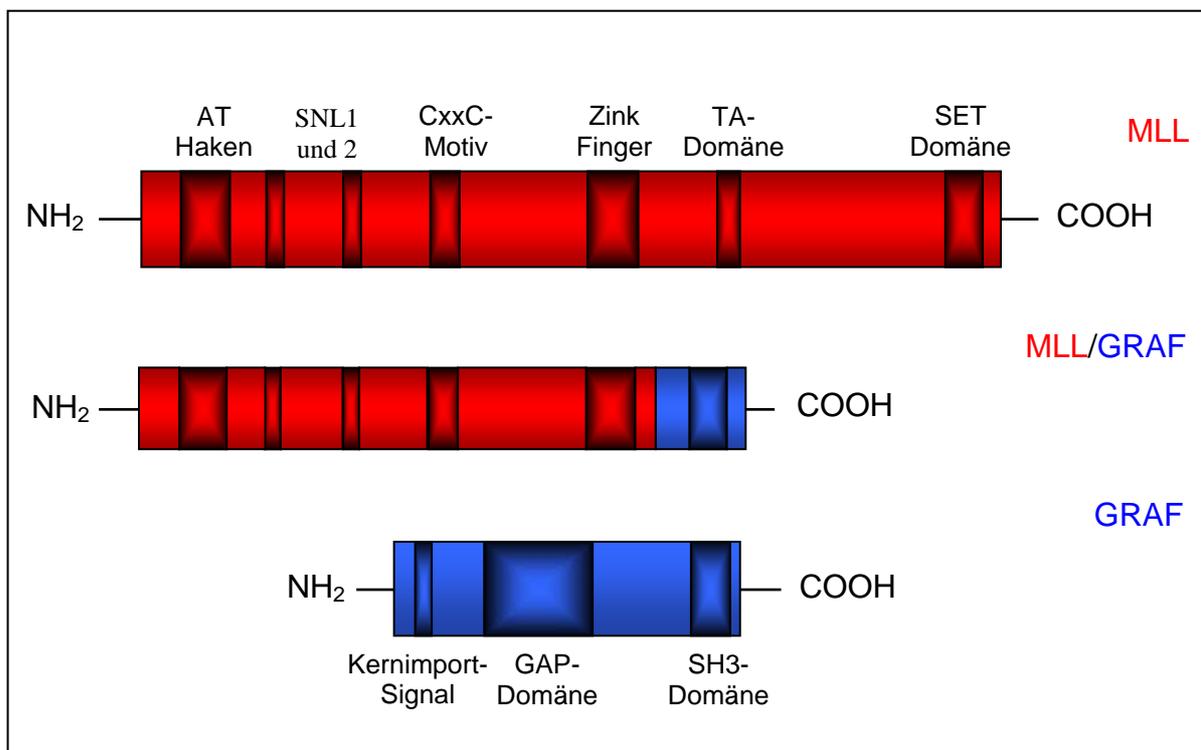


Abb. 1.7: MLL/GRAF-Fusionsprotein im Vergleich zu MLL- und GRAF-Wildtyp-Protein⁶⁴

Myeloische Vorläuferzellen von Mäusen wurden mit dem *MLL* / *GRAF*-Fusionsgen transfiziert, um über die Anzahl an Kolonien nach mehrmaligem Ausplattieren Informationen über das onkogenetische Potential des Fusionsgens zu erhalten. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt, daß das Vorhandensein eines *MLL*-*GRAF*-Gens zur Malignominduktion nicht ausreicht. Dazu sind vermutlich zusätzliche Veränderungen notwendig⁶⁵.

Aufgrund der Lokalisation von *GRAF* auf 5q31 und dem dort vermuteten Tumorsuppressorgen wurden Untersuchungen an AML / MDS Patienten mit 5q Deletionen

durchgeführt, um mögliche Veränderungen des zweiten Allels zu entdecken. Bei zwei Patienten wurden Insertionen von *GRAF*-Intronsequenz entdeckt, die ein Verschieben des Leserasters und ein vorzeitiges Stopcodon zur Folge haben. Den verkürzten Proteinen fehlt die für die Interaktion mit der fokalen Adhäsionskinase notwendige SH3 Domäne bzw. zusätzlich die für die Beeinflussung von RhoA notwendige GAP-Domäne. Bei einem weiteren Patienten liegt eine Punktmutation innerhalb der GAP Domäne vor. An Position 1255 befindet sich ein G an Stelle eines A, was einen AS-Austausch von Asparagin zu Serin zur Folge hat⁵³. Asparagin an dieser Position innerhalb der GAP Domäne wurde als eine an der Erkennung und somit auch an der Beeinflussung von niedermolekularen G-Proteinen (RhoA und Cdc42) wesentlich beteiligte Region identifiziert⁵⁹.

1.6 Nicht-radioaktiver Protein Truncation Test (PTT)

Eine Vielzahl von Erkrankungen beruht auf Mutationen in bestimmten Genen. Bei Tumoren handelt es sich dabei meist um Protoonkogene oder Tumorsuppressorgene. Zur Untersuchung von Mutationen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Eine ideale Methode sollte mehrere Anforderungen erfüllen. Sie sollte über eine hohe Sensitivität und Spezifität verfügen, Mutationsort und Mutationsart sollten exakt bestimmbar sein, mit einer Reaktion sollte ein großer Bereich von mehreren kb untersuchbar sein, des weiteren sind ein hoher Probendurchsatz, zuverlässig reproduzierbare Ergebnisse, geringer Zeitaufwand und geringe Kosten wünschenswert. Eine Methode, die uneingeschränkt alle Anforderungen erfüllt, existiert bisher nicht.

Die meisten Methoden beruhen auf der Untersuchung von DNA. Lediglich durch die DNA-Sequenzierung werden alle Sequenzabweichungen inklusive exakter Lokalisation dargestellt. Eine Aussage über die Bedeutung der gefundenen Mutation ist allerdings nicht immer möglich, da eine Unterscheidung zwischen Missense-Mutationen und Polymorphismen schwierig ist. Weitere Nachteile sind ein hoher Arbeitsaufwand, bzw. hohe Kosten⁶⁶.

Nicht alle Verfahren zur Untersuchung von Mutationen sind universell einsetzbar. Die Analyse des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) ist nur bei größeren Deletionen oder Insertionen geeignet⁶⁶. Mit dem amplification refractory mutation system (ARMS) sind nur Untersuchungen bereits bekannter Mutationen möglich⁶⁶. Die Methode des enzyme mismatch cleavage (EMC) ist aufgrund schlechter Signale oft ungeeignet⁶⁶. Eine Reihe von Mutationsanalysen beruht auf der Untersuchung von DNA mittels

Elektrophorese. Hierzu gehören die Analyse des single strand conformation polymorphism (SSCP), die denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE), die constant denaturing gel electrophoresis (CDGE) und die temporal temperature gradient electrophoresis (TTGE). All diese Verfahren haben Nachteile, die ihre Anwendung deutlich einschränken (siehe Tab. 5.1 auf Seite 58).

Lediglich die in dieser Arbeit durchgeführte Methode des Protein Truncation Test (PTT), die Mutationen nicht auf DNA, sondern auf Proteinebene sichtbar macht, ist in der Lage, die Forderungen an ein ideales Mutationsanalyseverfahren annähernd zu erfüllen. Zur Durchführung des PTT wird RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Bei vorhandener Promotorsequenz kann die DNA in vitro transkribiert und translatiert werden. Das erhaltene Protein wird mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Membran übertragen, und die Proteinbanden anschließend sichtbar gemacht ⁶⁶.

Der ursprünglich für die Untersuchung des DMD Gens entwickelte Protein Truncation Test (PTT) ⁶⁷ deckt ausschließlich Mutationen die zu einem verkürzten Protein führen auf. Dies umfaßt nonsense Mutationen, alle Mutationen die zu einem frameshift führen, und teilweise auch Deletionen. Diese Mutationen sind nahezu ausschließlich pathogenetisch relevant ⁶⁸. Weitere Vorteile sind die hohe Sensitivität, eine geringe Rate falsch positiver Ergebnisse und die gute Abschätzbarkeit der Lokalisation der Mutation auf DNA-Ebene ^{68, 69}. Ein bis zu 4-5kb großes DNA-Fragment kann mit einer einzigen Reaktion untersucht werden. Beste Ergebnisse werden bei Verwendung von genomischer DNA mit bis zu 2kb-Fragmenten, und bei Verwendung von cDNA mit 1,3-1,6 kb umfassenden Fragmenten beschrieben ⁷⁰. Als Template können Exonbereiche genomischer DNA oder cDNA eingesetzt werden. Voraussetzung ist, daß sich am 5'-Ende die Promotersequenz der zum Einsatz kommenden RNA Polymerase, eine Kozak Sequenz und ein mit dem Leseraster übereinstimmendes Startcodon befindet.

Für die spätere Detektion werden die Proteine während ihrer Synthese markiert. Dies kann durch den Einbau radioaktiv markierter AS wie beispielsweise ³⁵S Methionin, oder mit einer nicht radioaktiven Biotinmarkierung erfolgen. In dieser Arbeit wurden die Proteine durch Verwendung von biotinylierter Lysin-tRNA markiert und anschließend mittels Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat und Chemilumineszenzreaktion detektiert. Die Sensitivität entspricht der, die bei radioaktiver Markierung erreicht wird ⁷¹. Der wesentliche Vorteil dieser Methode ist der Verzicht auf radioaktive Substanzen. Im Gegensatz zum radioaktiven Marker bleibt die Biotinmarkierung 12 Monate stabil, und die Detektion der Proteinbanden

dauert unter Einsatz der Chemilumineszenzreaktion nur Minuten im Vergleich zu Stunden bei radioaktiver Markierung⁷².

Für die Auftrennung der Proteine sind die SDS-PAGE-Bedingungen und hier besonders die Konzentration des Trenngels entscheidend, um sowohl translationsterminierende Mutationen im N-terminalen Bereich, als auch im C-terminalen Bereich aufzudecken. Mutationen im N-terminalen Bereich führen zur Synthese extrem kleiner Proteine, die im Trenngel evtl. nicht mehr zurückgehalten werden, oder nicht bzw. kaum mit Biotin markiert sind (der Lysin-Gehalt eines Proteins beträgt im Durchschnitt 6,6%⁷³; in ein Protein mit 4-6 Lysin-AS werden ca. 25-33% biotinyliertes Lysin eingebaut⁷⁴). Liegt die Mutation im C-terminalen Bereich, so ist das Protein nur unwesentlich kleiner als das Wildtypprotein und kann nur schwer davon unterschieden werden. Dies ist auch der Fall bei kleineren Deletionen, die nicht zu einem frameshift, sondern lediglich zur Synthese eines um bis zu 4kD kleineren Proteins führen⁷⁰.

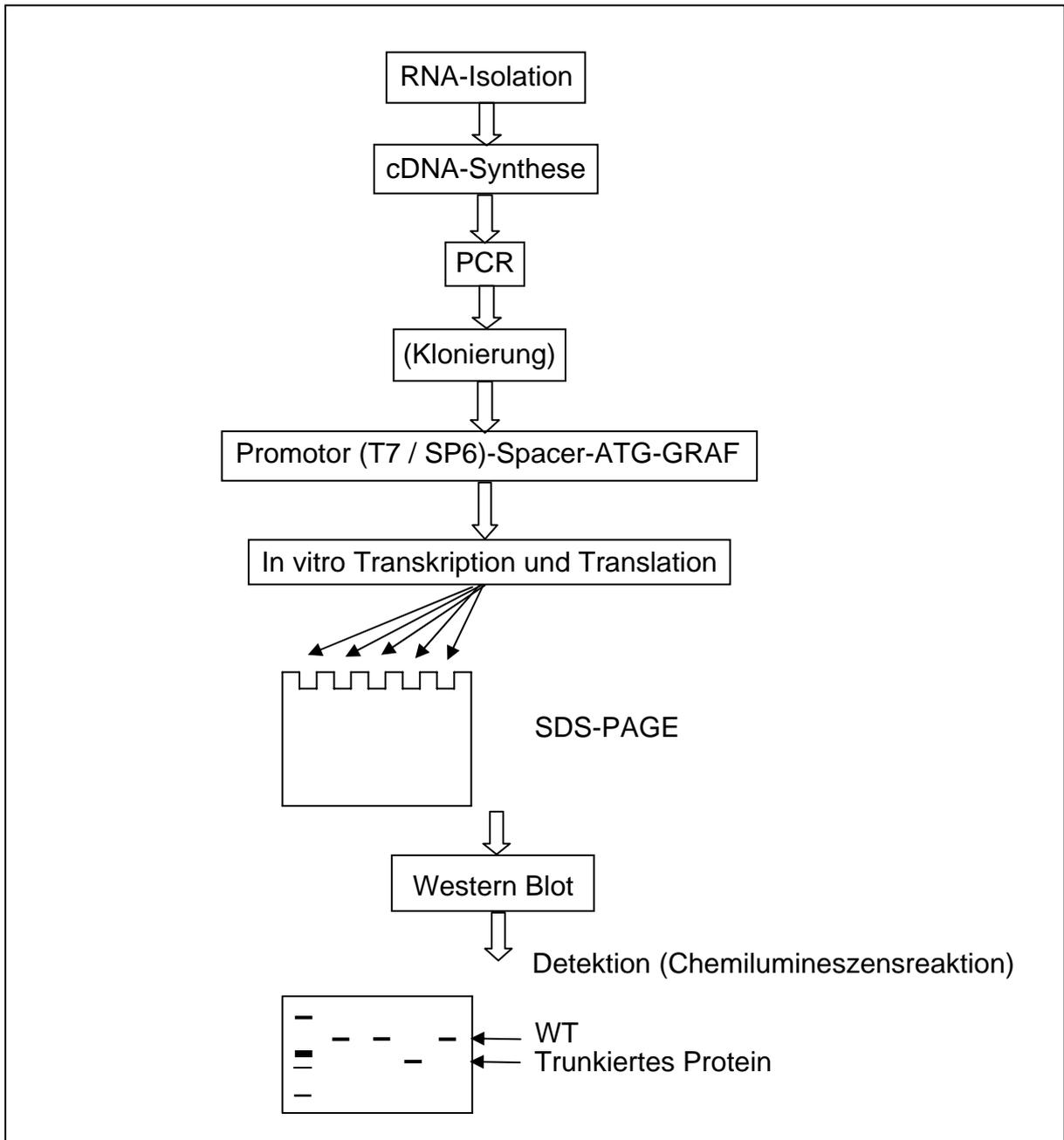


Abb. 1.8: Schema des Protein Truncation Test

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Der nichtradioaktive Protein Truncation Test (PTT) sollte etabliert werden, um ohne Verwendung radioaktiver Substanzen schnell und effektiv eine große Anzahl von Patienten auf pathogenetisch relevante Mutationen zu screenen. Im Gegensatz zur radioaktiven Variante kann diese Methode auch in Laboren, die nicht für die Arbeit mit Isotopen zugelassen sind, angewendet werden.

Anschließend sollte anhand von Knochenmark- oder Blutproben von Kindern mit AML das *GRAF*-Gen mittels nicht-radioaktivem PTT auf translationsterminierende Mutationen untersucht werden, da es sich bei *GRAF* vermutlich um ein Tumorsuppressorgen handelt, dessen Funktionsverlust eine Rolle bei der Entstehung von AML und MDS spielen könnte. Bei Patienten, die im PTT ein verkürztes Protein zeigen, sollte der entsprechende Bereich zur exakten Analyse der Mutation sequenziert werden.

2 Material

2.1 Patienten

Im Rahmen vorliegender Arbeit wurden Knochenmark- bzw. Blutproben von Patienten mit AML untersucht. Auswahlkriterium war ein Blastenanteil über 80%.

Tab. 2.1: Patientenliste

Nr.	Patient	Alter *	Diagnose	Karyotyp
1	F.C.	7,8	AML-Rez.	46,XX,t(6;11)(q13;p 15)[4]/46,XX[4]
2	G.J.	9,6	AML; M2	45,XY,-7
3	G.J.	2,0	AML; M0,b. M. Down	48,XX,del(5)(p14),+8,+21c
4	H.D.	9,7	V.a. sek. AML	45,XY,-7
5	H.J.	11,6	AML; M4	46,XY,del(7)(q?32),inv(16)(p13q22)
6	K.An.	14,1	AML; M4Eo	46,XX,del(7)(q32)inv(16)(p13q22)[3]/47,idem,+21[2]
7	T.S.	13,6	AML; M5	47,XX,+8
8	R.S.	14,0	AML; M4	46,XX
9	L.V.	9,0	AML-Rez.	46,XX
10	B.M.	9,0	AML; M6	46,XY
11	N.A.	2,5	AML; M6	48~51,XX,der(1)(q31),der(3)(p24),der(4),+6,-8,-11,-11, der(12)(p?12),-13,+15,+21,+21,+2~4mar[cp8]
12	P.H.	15,0	AML; M1	48,XY,+8,+13
13	S.J.	8,0	AML; M1	Keine Angaben
14	M.S.	14,4	AML; M5	46,XY,t(6;9)(p23;q34)
15	T.K.	16,6	AML; M2	47,XX,+8
16	W.A.	3,0	AML; M2	45,X,-X
17	T.S.	15,0	AML; M2	46,XY
18	G.C.	11,9	AML; M4	46,XY
19	Z.K.	18,5	AML; M4	46,XX
20	S.E.	7,4	AML; M5	46,XX
21	R.C.	14,4	AML; M4	46,XY
22	K.L.	13,4	V.a. AML; M1	46,XX
23	K.A.	15,5	AML; M2	46,XY
24	G.C.	10,1	AML; M1	46,XX

(*: Alter in Jahren bei Diagnose)

2.2 Zelllinien

Zur Etablierung des nicht-radioaktiven PTT wurde mit Zelllinien gearbeitet. Sie wurden im jeweils empfohlenen Medium bei 37° C und 5% CO₂ kultiviert.

Tab. 2.2: Zelllinien (Alle Angaben bezogen über <http://www.dsmz.de>)

HL-60 ⁷⁵	
Zelltyp	Akute myeloische Leukämie
Beschreibung	Isoliert aus dem peripheren Blut einer 35ig jährigen Frau mit AML (M2).
Genotyp	82 (78-88) <4n> XX, -X, -X, -2, -3, -4, -5, -8, -9, -10, -14, -16, -17, -17, +3m, der(6)t(6;?)(q25;?)/dup(6)(q23;qter)x2, del(9)(p22), del(11)(q22/23), der(16)t(16;17)(q22/23;q21-22)x2
Depositor	E. Porfiri, London, U.K.
JOSK-I ⁷⁶	
Zelltyp	Histiozytisches Lymphom
Beschreibung	Derivat der Zelllinie U-937
Genotyp	56 (52-56) <2n> Xder(X), +2, +4, +6, +7, +8, +12, -15, +17, +19, +20, +mar, der(X)t(X;3)(q11;p13)t(1;3)(q11;p25), del(1)(p11p22), t(1;5)(p21.1;q23), t(2;18)(p17;q23), del(4)(q22), add(6)(p23), del(7)(q21)/der(7)t(7;18)(q11.23;p11),der(10)t(10;11)(p14;q22.3)/der(10)t(10;11)(p14;q22.3)dup(10)(q25.1),der(11)t(10;11)(p14;q22.3), add(13)(p13), der(17)t(17;18)(p11;q12)
Depositor:	J. Minowada, Okayama, Japan
K-562 ⁷⁷	
Zelltyp	Chronisch myeloische Leukämie, Blastenkrise
Beschreibung	Isoliert aus dem Pleuraerguß einer 53ig jährigen Frau mit CML während der Blastenkrise.
Genotyp	61-68 <3n> XX, -X, -3, +7, -13, -18, +3mar, del(9)(p11/13),der(14)t(14;?)(p11;?), der(17)t(17;?)(p11/13;?),der(?18)t(15;?18)(q21;?q12), del(X)(p22)
Depositor	J. Minowada, Okayama, Japan
KASUMI-1 ⁷⁸	
Zelltyp	Akute myeloische Leukämie
Beschreibung	Isoliert aus dem peripheren Blut eines siebenjährigen Jungen (Japaner) mit AML (M2), Rezidiv nach Knochenmarktransplantation.
Genotyp	45 <2n> X, -Y, -9, -13, -16, +3mar, t(8;21)(q22;q22), der(9)t(9;?)(p22;?), der(15)t(?9;15)(?q11;?p11)
Depositor	N. Kamada, Hiroshima, Japan
ML-2 ⁷⁹	
Zelltyp	Akute myelomonozytäre Leukämie
Beschreibung	Isoliert aus dem peripheren Blut eines 25ig jährigen Mannes mit AML (M4) nach vorangegangenem T-Zell NHL und T-ALL.
Genotyp	92 (84-94) <4n> XX, -Y, -Y, -7, -9, -10, -10, +11, +12, +12, +13, +13, -15, -16, -17, -17, +18, +18, -20, -20, +4mar, der(1)t(1;?)(p21;?)x2, del(6)(q23)x2, der(6)t(6;11)(q27;?q23)x2, ?der(11)t(6;11)(q27;?q23)/ del(11)(q23)x2, der(11)t(11;?)(?->11p11->11q23:)x2, der(11)t(11;?)(q11-13;?),

	dup(13)(q32->qter)x2,der(18) t(15;?18)(q21;?;q11)x2
Depositor	J. Minowada, Okayama, Japan
MONO-MAC-6 ⁸⁰	
Zelltyp	Akute monozytäre Leukämie
Beschreibung	Isoliert aus dem peripheren Blut eines 64ig jährigen Mannes mit akuter monozytärer Leukämie
Genotyp	84-90 <4n> XX/XXX, -Y, +6, +7, -12, -13, -13, -16, -16, +2mar, t(9;11)(p22;q23)x2, add(10)(p11)x2, add(12)(q21),del(13)(q13q14) der(13)t(13;14)(p11;q12)x2, der(17)t(13;17)(q21;p11)x2
Depositor	H. W. L. Ziegler-Heitbrock, München, Deutschland
MUTZ-1 ⁸¹	
Zelltyp:	Myelodysplastisches Syndrom
Beschreibung:	Isoliert aus dem peripheren Blut eines fünfjährigen (türkischen) Mädchens mit myelodysplastischem Syndrom (refraktäre Anämie mit Blastenüberschuß) und Fanconi Anämie.
Genotyp:	68 (68-73) <3n> X, der(X), -X, add(1)(p11), der(2)t(2;?11)(q22;q23), der(3)t(3;5)(q27;q14)t(5;22)(q35;q12)x2, del(3)(p11), del(3)(q11), del(5)(q13/q33)x1-2, der(6) t(3;6)(p23;p21.2)x2, der(7)t(7;11)(q35;q13), der(8)t(1;8)(q11;q24), add(9)(q34), del(9)(p13), der(14)t(14;?)(q23;?), der(14) t(14;?)(p11;?)t(1;?)(q11;?), add(14)(p11), der(15) t(5;15)(p13;p11)x2, der(16)t(7;16)(q21.1;q24), add(18)(p11), add(21)(p11)
Depositor:	K. Steube, Braunschweig, Deutschland
MV4-11 ⁸²	
Zelltyp	Akute monozytäre Leukämie
Beschreibung	Isoliert von einem zehnjährigen Jungen mit AML (M5)
Genotyp	48 (46-48) <2n> XY, +8, +18, +19, -21, t(4;11)(q21;q23)
Depositor	H. G. Drexler, Braunschweig, Deutschland
THP-1 ⁸³	
Zelltyp	Akute monozytäre Leukämie
Beschreibung	Isoliert aus dem peripheren Blut eines einjährigen Jungen mit akuter monozytärer Leukämie
Genotyp	94 (88-96) <4n> XY/XXY, -Y, +1, +3, +6, +6, -8, -13, -19, -22, -22, +2mar, add(1)(p11), del(1)(q42.2), i(2q), del(6)(p21)x2-4, i(7p), der(9)t(9;11)(p22;q23)i(9)(p10)x2, der(11)t(9;11)(p22;q23)x2, add(12)(q24)x1-2, der(13)t(8;13)(p11;p12), add(?18)(q21)
Depositor	J. Minowada, Okayama, Japan
RS4;11 ⁸⁴	
Zelltyp	B-Vorläufer ALL
Beschreibung	Isoliert aus dem Knochenmark einer 32ig jährigen Frau mit ALL (L2) während des ersten Rezidivs.
Genotyp	47/48 <2n> X/XX, +8, +18, t(4;11)(q21;q23), i(7q)
Depositor	H. G. Drexler, Braunschweig, Deutschland

REH ⁸⁵	
Zelltyp	Prä-B-Vorläufer ALL
Beschreibung	Isoliert aus dem peripheren Blut eines fünfzehnjährigen Mädchen mit ALL.
Genotyp	46 (44-47) <2n> X, -X, -5, +16, +2mar, del(3)(p22), t(12;14)(p11;q11), der(16)t(16;?)(q22;?)
Depositor	J. Minowada, Okayama, Japan

3 Methoden

3.1 Isolierung mononukleärer Zellen

Bei dem verwendeten Patientenmaterial handelte es sich um bei -70°C gelagerte mononukleäre Zellen. Zur Herstellung dieser mononukleären Zellsuspensionen wurde heparinisiertes Knochenmark oder Blut 8 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Plasma wurde entfernt und die Zellen mit ca. 5ml PBS (130mM NaCl, 7mM Na_2HPO_4 , 3mM NaH_2PO_4) gemischt. Diese Suspension wurde vorsichtig auf 5ml NycoPrep™ der Dichte 1,077g/ml (Nycomed) geschichtet und 20 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Die sich dadurch in Form eines weißen Ringes sammelnden Leukozyten wurden vorsichtig abpipettiert, zweimal mit jeweils 10ml PBS gewaschen, 8 Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert und schließlich in 0,5ml PBS resuspendiert. 20 μl dieser Zellsuspension wurde zur Zellzählung mittels Cellcounter verwendet. Die restliche Zellsuspension wurde auf zwei Kryoröhrchen, bzw. Cups aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich bei -70°C gelagert.

3.2 RNA-Isolation

Die Isolation der Gesamt-RNA wurde nach einer modifizierten Ein-Schritt-Methode nach Chomczynski und Sacchi ⁸⁶ mit TRIzol® (Invitrogen) durchgeführt. Die mononukleären Zellen wurden auf Eis aufgetaut, bzw. bis zu 5ml Zellkultur-Lösung wurden 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurden die Zellen mit 1ml TRIzol® (für 5×10^6 - 10^7 Zellen), einer monophasischen Lösung bestehend aus Guanidinisothiozyanat und Phenol, gemischt. Das enthaltene Guanidinisothiozyanat ist ein chaotropes Salz, welches die Zellen lysiert, Proteine denaturiert und RNasen inaktiviert. Im Phenol lösen sich Proteine und kleinere DNA-Fragmente. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden 0,2ml Chloroform/1ml TRIzol® dazupipettiert und gemischt. Durch die anschließende Zentrifugation bei $12000 \times g$ und 4°C für 15 Minuten trennt sich die Flüssigkeit in eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, eine weiße Interphase und eine obere wässrige Phase. Die wässrige Phase mit der darin enthaltenen RNA wurde in ein frisches Cup pipettiert. Die RNA wurde gefällt, indem die Probe mit 0,5ml Isopropanol/1ml TRIzol® gemischt, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließende 10 Minuten bei $12000 \times g$ und 4°C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde

entfernt und das Pellet zweimal mit jeweils 1ml 70% Ethanol/1ml TRIzol[®] gewaschen. Nachdem das Ethanol möglichst vollständig entfernt war, wurde das gereinigte Pellet bei 40°C auf dem Heizblock getrocknet und schließlich in 20µl RNase -freiem Wasser gelöst. Die Gesamt-RNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch gemessen. Der Anteil der mRNA an der Gesamt-RNA beträgt ca. 1-3%.

3.3 Reverse Transkription

Mit Hilfe einer reversen Transkriptase wurde von der isolierten RNA komplementäre DNA synthetisiert. Dazu wurde die RNA zunächst 5 Minuten bei 65°C vorinkubiert, um Sekundärstrukturen zu lösen, und wieder auf Eis gestellt. Bis zu 1µg mRNA wurden zu folgendem Mix pipettiert:

- 4µl 5×First Strand Buffer (250mM Tris-HCl, 375mM KCl, 15mM MgCl₂ pH 8,3; Invitrogen)
- 4µl dNTP-Mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP je 2,5 mM)
- 2µl DTT (Dithiotreitol, 100mM, Invitrogen)
- 1µl Random Hexamer, 100µM, (Boehringer Mannheim)
- 1µl RNaseOUT[™], 40U/µl, (Invitrogen)
- 1µl Superscript[™] reverse Transkriptase, (Invitrogen)
- ad 20µl H₂O

Die reverse Transkription wurde bei 37°C innerhalb einer Stunde durchgeführt. Um die reverse Transkriptase am Ende der Reaktion zu inaktivieren wurde die Temperatur für 5 Minuten auf 95°C erhöht.

Superscript[™]MRT ist eine weiterentwickelte reverse Transkriptase aus dem Moloney murine leukemia virus (MMLV-RT). Im Gegensatz zu dieser besitzt Superscript[™]MRT keine intrinsische RNase H-Aktivität und ermöglicht somit längere Transkripte.

3.4 Genomische DNA

Zur Isolierung von genomischer DNA wurde das High Pure PCR Template Preparation Kit von Roche verwendet. Damit ist die Isolierung auch langer DNA-Fragmente von bis zu 50kb möglich. Die bei -70°C aufbewahrten Buffy-Proben wurden auf Eis aufgetaut, abzentrifugiert, die Zellen 2 × mit jeweils 500µl PBS vorsichtig gewaschen und schließlich

in 200µl PBS resuspendiert. In Anwesenheit von 200µl Binding Buffer (6M Guanidin-HCl, 10mM Harnstoff, 10mM Tris-HCl, 20% Triton X-100, pH 4,4) wurden die Zellen mit 0,8mg Proteinase K bei 72°C in 10 Minuten lysiert. Das im Binding Buffer enthaltene Guanidin-HCl inaktiviert Nucleasen. Nach Mischen mit 100µl 70% Isopropanol wurde die Probe auf ein Filter-Sammelröhrchen pipettiert. Die DNA bindet dabei an spezielle Glasfasern des Filters. In der Probe eventuell enthaltene Inhibitoren, wie beispielsweise Heparin, wurden mit 500µl Inhibitor Removal Buffer (5M Guanidin-HCl, 20mM Tris-HCl, 38% Ethanol, pH 6,6) entfernt. Die DNA wurde durch zweimaliges Waschen und Zentrifugieren für 1 Minute bei 8000 rpm mit jeweils 500µl Wash Buffer (20mM NaCl, 2mM Tris-HCl, 80% Ethanol, pH 7,5) gereinigt. Nach einer zusätzlichen Zentrifugation für 10 Sekunden bei 14000 rpm zur vollständigen Entfernung des Wash Buffer, konnte die DNA mit 200µl 70°C warmem Wasser von der Glasfaser eluiert werden.

3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Der von K. Mullis ⁸⁷ geprägte Begriff bezeichnet eine Methode, mit der sich DNA-Sequenzen in vitro vervielfältigen lassen. Das Prinzip der PCR ist die enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnitts zwischen zwei Oligonukleotidprimern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden. Das typische PCR-Programm besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem Annealingschritt und einem Elongationsschritt. Bei der Denaturierung, die bei ca. 94°C durchgeführt wird, trennen sich die beiden Stränge der Template-DNA. Für den anschließenden Annealingschritt muß die Temperatur auf 50-70°C gesenkt werden. Nun können die im Überschuß vorhandenen Primer an die einzelsträngige Template-DNA hybridisieren. Die Annealingtemperatur richtet sich im wesentlichen nach der Länge und dem G/C-Gehalt der verwendeten Primer. Meist werden Primer mit einer Länge von 18-30 Basen und einem Anteil von 40-60% Guanin und Cytosin eingesetzt. Die Elongation, also die Synthese eines komplementären DNA-Stranges ausgehend von den 3'-OH-Primer-Enden, erfolgt in Abhängigkeit von der verwendeten Polymerase bei ca. 72°C. Die Elongationszeit richtet sich nach der Syntheserate der Polymerase und der Länge des erwarteten Produkts. Die drei temperaturabhängigen Reaktionsschritte werden 30-40 mal wiederholt. In jedem Zyklus verdoppelt sich theoretisch die Zahl der Template-DNAs. Da aber nach dem Durchlaufen mehrerer PCR-Zyklen die Polymeraseaktivität trotz Hitzestabilität nachläßt, und die akkumulierenden PCR-Produkte miteinander interagieren, fällt der Vermehrungsfaktor geringer aus als 2^n (n = Anzahl der Zyklen). Während der

Elongation kann es auch zum Einbau eines "falschen" Nukleotids kommen. Die Fehlerrate liegt für Polymerasen mit 3'-5'-Exonucleaseaktivität (Proofreading-Polymerase) bei ungefähr 10^{-6} je angehängtem Nukleotid, für solche ohne Korrekturaktivität um den Faktor 10 höher^{66,88}.

Ein typisches PCR-Protokoll sieht folgendermaßen aus:

- 5µl 10× Puffer (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl; Invitrogen)
- 1,5µl MgCl₂ (50mM; Invitrogen)
- 4µl dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP je 2,5mM)
- 1µl sense Primer (20µM)
- 1µl antisense Primer (20µM)
- 0,5µl Taq-Polymerase 5U/µl (Invitrogen)
- Xµl Template; 5µl cDNA, 300ng genomische DNA
- ad 50µl H₂O

Temperaturprofil:

- 94°C für 1 min.
- 30 × (94°C für 15 s., 60°C für 30 s., 72°C für 1 min.)
- 72°C für 10 min.
- 4°C ∞

durchgeführt mit einem Thermocycler PE-9600 (Perkin Elmer).

3.6 PCR-Modifikationen

Es existieren zahlreiche Modifikationen der klassischen PCR. Die in dieser Arbeit angewandten Methoden werden nun vorgestellt.

3.6.1 Nested-PCR

Mit dieser Methode lassen sich Sensitivität und Spezifität der PCR deutlich erhöhen. Dazu führt man zwei hintereinander geschaltete PCR-Reaktionen durch und setzt ca. 1µl des Produktes aus dem 1. Lauf als Template in den 2. Lauf ein. Die PCR-Primer des 2. Laufes liegen innerhalb der im 1. Lauf amplifizierten Sequenz, wodurch falsche Amplifikationsprodukte im 2. Lauf ausgelektiert werden. Auf diese Weise lassen sich auch geringe Template-mengen nachweisen⁶⁶. Eine semi-nested PCR beruht ebenfalls auf diesem Prinzip, allerdings wird einer der Primer (sense oder antisense) aus dem 1. Lauf auch im 2. Lauf eingesetzt.

3.6.2 "Long-distance" PCR

Da Taq-Polymerase zwar über eine hohe Prozessivität verfügt, ihr aber eine Korrekturaktivität fehlt, kommt es relativ häufig zum Einbau falscher Nukleotide, was zum Syntheseabbruch oder zumindest zu einer deutlich verlangsamten Elongation führt. Im weiteren Verlauf kommt es zu Fehlhybridisierungen und zur Akkumulation falscher Amplifikate. Mit Taq-Polymerase lassen sich daher nur kurze Sequenzen amplifizieren. Polymerasen mit Korrekturaktivität wie beispielsweise Pfu, haben zwar eine geringere Fehlerrate aber auch eine geringere Prozessivität. Für die Amplifikation langer Fragmente sind sowohl eine hohe Prozessivität, als auch eine geringe Fehlerrate notwendig. Durch die Mischung beider Polymerasearten in bestimmtem Verhältnis ist die Amplifikation von Fragmenten bis zu 35kb gelungen, wie W. M. Barnes⁸⁹ und Cheng⁹⁰ 1994 beschrieben.

3.6.3 Hot start-PCR

Aufgrund der exponentiellen Zunahme der DNA-Fragmente während der Polymerasekettenreaktion sind vor allem die ersten Zyklen entscheidend. Problematisch ist, daß es aufgrund der anfänglich noch niedrigen Temperatur zu unerwünschten Effekten, wie Fehlhybridisierungen der Primer oder Primerdimerbildungen kommt, die im weiteren Verlauf zu schlechter Ausbeute oder unspezifischen Produkten führen. Hot start-Technik verhindert einen vorzeitigen Start der Polymerasekettenreaktion bei noch nicht ausreichend hoher Temperatur. Eine Möglichkeit dies zu erreichen, ist die Zugabe von Wachskügelchen. Dabei wird auf einem unteren Mix bestehend aus Puffer, dNTP-Mix und Primern ein Wachskügelchen geschmolzen. Nachdem die Wachsschicht über der Flüssigkeit erstarrt ist wird auf das Wachs der obere Mix mit darin enthaltener Polymerase und Template-DNA pipettiert. Jetzt erst wird die PCR gestartet. Da das Wachs erst bei 55-58°C schmilzt, können sich beide Flüssigkeiten erst jetzt vermischen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das GeneAmp[®] XL PCR Kit von Perkin Elmer verwendet:

In der unteren Schicht wurden die folgenden Komponenten gemischt:

- 6µl H₂O
- 6µl 3,3 × XL Buffer II (enthält Tricine, Kaliumacetat, Glycerol und DMSO)
- 2,4µl Mg(OAc)₂ Lösung (25mM)
- 4µl dNTP-Mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP je 2,5mM)
- 0,8µl sense Primer (2µM im 1., 20µM im 2. Lauf)
- 0,8µl antisense Primer (2µM im 1., 20µM im 2. Lauf)

Darauf wurde ein PCR Gem 50 Wachskügelchen von Perkin Elmer bei 80°C in 5 Minuten komplett geschmolzen. Nachdem das Wachs bei Raumtemperatur wieder erstarrt war, wurde direkt auf das Wachs die obere Schicht pipettiert.

9µl 3,3 × XL Buffer II (siehe oben)

1µl rTth Polymerase (2 U/µl, mit 5-6% Vent_R[®] proof-reading Polymerase)

Xµl Template (5µl cDNA für 1. Lauf, 1µl aus 1. Lauf für 2. Lauf)

ad 30µl H₂O

Temperaturprofil:

94°C für 1 min.

16 × (94°C für 15 s., 68°C für 10 min.)

12 × (94°C für 15 s., 68°C für 10 min. + Δ) (Δ = + 15 s. je Zyklus)

72°C für 10 min.

4°C ∞

Nachteile der hot start-Methode mit Wachs sind die Gefahr der Kontamination durch die Zugabe der Wachskügelchen und der zusätzliche Arbeitsaufwand. Alternativ zu dieser Methode kann hot start auch mit Antikörpern durchgeführt werden ⁹¹. In dieser Arbeit wurde dafür das Advantage[®] cDNA PCR Kit von Clontech verwendet. Darin enthalten ist ein Polymerase-Mix aus KlenTaq-1 DNA-Polymerase, eine geringe Menge einer zweiten Polymerase mit 3'-5'proofreading Aktivität und der monoklonalen TaqStart[™] Antikörper. Der Antikörper inhibiert die Polymerase. Erst ab einer Temperatur von über 70°C werden die Antikörper komplett und irreversibel inaktiviert, wodurch die Polymerase ihre volle enzymatische Aktivität erlangt. Das Protokoll des antikörpervermittelten hot start sieht folgendermaßen aus:

5µl 10 × cDNA PCR Reaktionspuffer (400mM Tricine-KOH pH 9,2, 150mM KOAc, 35mM Mg(Oac)₂, 37,5µg/ml BSA)

1µl sense Primer (2µM im 1., 20µM im 2. Lauf)

1µl antisense Primer (2µM im 1., 20µM im 2. Lauf)

1µl 50 × dNTP-Mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP je 10mM)

1µl 50 × Advantage cDNA Polymerase Mix (enthält KlenTaq-1 DNA Polymerase, TaqStart[™] Antikörper (1,1µg/µl) und Vent_R[™])

Xµl Template (5µl cDNA für 1. Lauf, 1µl aus 1. Lauf für 2. Lauf)

ad 50µl H₂O

Temperaturprofil:

94°C für 1 min.

35 × (94°C für 30 s., 63°C für 3 min.) im 1. Lauf

25 × (94°C für 30 s., 63°C für 3 min.) im 2. Lauf

63°C für 3 min.

15°C ∞

3.7 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe von Agarosegelen lassen sich DNA-Fragmente beispielsweise nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau analysieren. Um ein bestimmtes Fragment von Nebenprodukten zu reinigen, können einzelne Banden aus dem Gel herausgeschnitten werden. Für die verwendeten 1-2%-igen Gele wurde die entsprechende Agarosemenge abgewogen, in 1 × TAE (40mM Tris-acetat, 1mM EDTA) aufgekocht und auf einen horizontalen Gelträger gegossen. Die Proben wurden mit 5 × Blaumarker (62,5µg Bromphenolblau, 28,7ml Glycerin, 25g SDS, 5ml EDTA pH 8,0, 16,3ml Wasser) gemischt und auf das Gel aufgetragen. Das aufzutragende Volumen wurde durch die Wahl des Kammes variiert: 12µl für Analysezwecke, 24µl zur Präparation. Zur Analyse der Fragmentlänge wurde neben den Proben ein kommerziell erhältlicher Längenstandard (Boehringer, MBI Fermentas) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in Flachbettgelkammern unter Verwendung von 1 × TAE-Elektrophoresepuffer bei 85-120 V durchgeführt. Anschließend wurde das Gel 10 Minuten im Ethidiumbromidbad (10mg/l) gefärbt. Das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid wird unter UV-Licht (254nm) sichtbar. Die Gele wurden fotografiert bzw. einzelne Banden wurden unter UV-Licht (360nm) ausgeschnitten.

3.8 Reinigung von PCR-Produkten

Vor der Weiterverwendung der PCR-Produkte im PTT bzw. zur Klonierung wurde eine Reinigung der DNA durchgeführt. War nach der PCR im Agarosegel nur eine Bande der richtigen Länge zu sehen, wurde das PCR-Produkt direkt gereinigt. Andernfalls wurde das zu untersuchende Fragment erst über ein Agarosegel isoliert. Zur Reinigung wurde das GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit von Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Es ist zur Reinigung von DNA aus Lösungen und aus Agarosegel geeignet. Salze, Enzyme, Primer und nicht eingebaute Nukleotide werden entfernt. Zur Reinigung aus

dem Gel wurde im Anschluß an die Elektrophorese die interessierende Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und das Gelstückchen gewogen. Je 10mg Gel wurden mit 10µl Capture Buffer (enthält Acetat und ein denaturierendes Agens) versetzt und das Gel in 5-15 Minuten bei 60°C aufgelöst. Bei der Reinigung aus Lösungen wurde die Probe (bis 100µl) direkt mit 500µl Capture Buffer gemischt. Das im Capture Buffer enthaltene denaturierende Agens löst Agarose auf und denaturiert Proteine. Gibt man nun die Probe auf ein Filtersammelröhrchen, so bindet die dsDNA reversibel an die Glasfasern des Filters⁹². Die Flüssigkeit wurde durch Zentrifugation für eine Minute bei 12000 × g entfernt. Dann wurde die an Glasfasern gebundene DNA mit 500µl Wash Buffer (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA, 80% Ethanol) gereinigt, durch zweimalige Zentrifugation die Flüssigkeit vollständig entfernt und die DNA schließlich mit 30µl Wasser von der Glasfaser gelöst und durch erneute Zentrifugation in einem Cup gesammelt.

3.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Mit einem Spektralphotometer kann durch Messung der Extinktion bei 260nm die Nukleinsäurekonzentration einer RNA- bzw. DNA-Lösung errechnet werden. Eine optische Dichte von eins korreliert mit 50µg/ml dsDNA bzw. mit 40µg/ml RNA⁹³. Die zu messenden Proben wurden in bestimmtem Verhältnis verdünnt und in einer Quarzküvette gegen einen entsprechenden Leerwert bei 260nm gemessen. Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich mit folgender Formel:

$$c \text{ (ng/}\mu\text{l)} = a \cdot b \cdot \text{OD}_{260\text{nm}}$$

c = Nukleinsäurekonzentration der (unverdünnten) DNA-Lösung

a = Verdünnungsfaktor

b = Eichfaktor: 50 für dsDNA, 40 für RNA

OD₂₆₀ = optische Dichte bei 260nm

3.10 DNA-Klonierung

Die Klonierungen des *GRAF*-Fragmentes der Zelllinie K562 wurde als "sticky end cloning" unter Verwendung des Plasmidvektors pcDNA3 von Invitrogen durchgeführt. Transformiert wurde in Epicurian Coli[®] SoloPack[®] Gold supercompetent cells von Stratagene. Für diese Art der Klonierung wurden im 2. PCR-Lauf Primer mit Erkennungssequenzen für EcoRI

und NotI verwendet. Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Restriktionsenzymen erreicht man, daß sich das PCR-Fragment nur in einer bestimmten Richtung in den Vektor einfügt. Innerhalb des PCR-Produkts dürfen sich keine weiteren Erkennungssequenzen dieser beiden Enzyme befinden, da sonst das Insert zerstört wird.

3.10.1 Restriktionsverdau:

Sowohl das PCR-Fragment, als auch der Vektor wurden mit den Restriktionsendonukleasen EcoR I (NEB) und Not I (NEB) geschnitten. Beide Enzyme schneiden doppelsträngige DNA unter Bildung von 5'-Überhängen (sticky ends). Diese Überhänge erleichtern später die Ligation. Um eine vollständige Reaktion zu gewährleisten wurde pro 1µg DNA jeweils 10U Enzym mit entsprechend verdünntem 10 × NEBuffer 3 (100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT; pH 7,9) (geeignet für Not I und EcoR I) und Wasser gemischt und drei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dem Restriktionsverdau wurde die DNA gereinigt.

3.10.2 Dephosphorylierung:

Um die Insertion des PCR-Fragment in den Vektor zu ermöglichen, und um zu verhindern, daß die beiden Vektorenden miteinander religieren, muß der Vektor zusätzlich dephosphoryliert werden. Dazu wurde der Vektor in 10 × NEBuffer 3 mit 1µl CIP (calf intestinal phosphatase, 1U/µl; NEB) inkubiert. Vor der Zugabe zum Ligaseansatz mußte der Vektor erneut gereinigt werden.

3.10.3 Ligaseansatz:

Zunächst wurden Insert und Vektor erneut über ein Agarosegel kontrolliert und die Konzentration spektralphotometrisch bestimmt. Die Ligation wurde mit folgendem Ansatz über Nacht bei 16°C durchgeführt:

2µl 10 × Ligasepuffer (500mM Tris-HCl, 100mM MgCl₂, 100mM DTT, 10mM ATP, 250µg/ml BSA, pH 7,5; NEB)

1µl T4 DNA-Ligase 400U/µl (NEB)

Xng Insert; $X = (A \cdot B \cdot C) : D$;

A = Vektorkonzentration (ng);

B = gewünschtes molares Verhältnis Insert : Vektor (3-10 : 1);

C = Insertlänge (bp);

D = Vektorlänge (bp)

100-400ng Vektor

ad 20µl H₂O

T4 DNA Ligase verknüpft Insert und Vektor unter Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe des einen, und der 3'-OH-Gruppe des anderen DNA-Endes.

3.10.4 Transformation:

Der Ligaseansatz wurde dann mit den auf Eis aufgetauten und mit 1µl XL10-Gold β-Merkaptoethanol (Stratagene) vorbereiteten SoloPack[®] Gold supercompetent cells gemischt. Durch mehrere Inkubationsschritte bei unterschiedlichen Temperaturen (30 Minuten auf Eis, eine Minute bei 54°C und wieder zwei Minuten auf Eis) nehmen die Bakterien die fremde DNA auf. Sie wurden dann mit 175µl Luria-Bertani-Medium für eine Stunde bei 37°C mit 250 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Das verwendete Plasmid pcDNA3 enthält ein Ampicillinresistenzgen. Um ausschließlich Bakterien mit aufgenommenem Plasmid zu erhalten, wurden die Bakterien auf Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen. Die Platten mit den ausgestrichenen Bakterien wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.10.5 Plasmidpräparation und Glycerinkultur:

Über Nacht gewachsene Einzelkolonien wurden mit einer Pipettenspitze in jeweils 5ml Luria-Bertani-Medium mit Ampicillin übertragen und darin über Nacht vermehrt. Von dieser Bakterienlösung wurden zum Anlegen einer Glycerinkultur 600µl mit 400µl autoklaviertem Glycerin gemischt und bei -20°C gelagert. In dieser Form sind Bakterien bis zu einem Jahr haltbar und können bei Bedarf schnell vermehrt werden.

Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde das E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit I von PeqLab verwendet. 4ml Übernachtkultur wurden zentrifugiert (2 × hintereinander 2ml in einem 2ml-Cup für eine Minute bei 10000 × g), um die Bakterien zu pelletieren. Das Bakterienpellet wurde sorgfältig in 250µl RNase A-haltiger Lösung I (50 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA; 100 mg/ml RNase A) resuspendiert. Durch vorsichtiges Mischen mit 250µl alkalischer Lösung II (200 mM NaOH; 1% (w/v) SDS) und einer zweiminütigen Inkubation wurden die Bakterien lysiert. Nach Zugabe von 350µl Lösung III (enthält ein chaotropes Salz, das die Bindung an die Silikamembran ermöglicht) wurde das klare Lysat neutralisiert und es bildeten sich weiße Flocken, die abzentrifugiert wurden (10 Minuten bei 10000 × g). Der Überstand wurde vorsichtig auf eine HiBind[®]-Miniprep-Zentrifugensäule gegeben und für eine Minute mit 10000 × g zentrifugiert, bis das Lysat die in der Säule enthaltene Silikamembran vollständig passiert hatte. Die an die Membran gebundene Plasmid DNA wurde nun durch mehrmaliges Waschen und Zentrifugieren (jeweils eine Minute, 10000 ×

g) zunächst mit 0,5ml HB-Puffer, dann $2 \times$ mit 0,75ml DNA-Waschpuffer (60% Ethanol) von Rückständen wie Enzyminhibitoren und Salzen gereinigt. Um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen wurde eine zusätzliche Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für eine Minute durchgeführt. Erst dann wurde die Plasmid DNA mit 50 μ l Wasser von der Membran gelöst und durch eine Zentrifugation in einem Cup gesammelt.

Um zu untersuchen, ob das isolierte Plasmid das gewünschte Insert enthält, wurde ein Restriktionsverdau mit den zuvor eingesetzten Enzymen EcoRI und NotI durchgeführt. Dadurch wird das Insert aus dem Vektor herausgeschnitten und die Länge des Inserts kann anschließend über ein Agarosegel bestimmt werden.

3.11 TA Klonierung mit Topoisomerase

Alle notwendigen Klonierungen von Patienten-Proben wurden mit dem TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen durchgeführt. Es wurden das Plasmid pCR[®]II-TOPO[®] (Invitrogen), welches sowohl einen Sp6-, als auch einen T7-Promoter enthält, und die chemisch kompetent gemachten Bakterien TOP10F['] (Invitrogen) verwendet. Das Plasmid liegt in linearisierter Form vor. An den beiden 3'- Enden befindet sich jeweils ein Thymidinüberhang, an dem kovalent Topoisomerase I gebunden ist. Da ein freies 3'- OH - Ende fehlt, können die beiden Vektorenden nicht miteinander verknüpft werden. Topoisomerase I hat die Eigenschaft spezifisch an doppelsträngige DNA zu binden. Dabei bildet sich eine Phosphatbrücke zwischen dem Phosphodiesterband einer der beiden DNA-Stränge und einer Tyrosinseitenkette (Tyr-274) im aktiven Zentrum des Enzyms. Dadurch wird der DNA-Strang nach der Sequenz 5'-CCCTT unterbrochen⁹⁴. Die Energie des Strangbruches geht vollständig in die 3'-Phosphotyrosinbindung über. Diese Bindung kann durch ein freies 5'- OH - Ende angegriffen werden. Dadurch schließt sich das Phosphodiesterband der DNA wieder und die Topoisomerase löst sich von der DNA. Diese Eigenschaft kann man für Klonierungszwecke nutzen⁹⁵. Vorteil ist, daß die Reaktion wesentlich schneller abläuft (innerhalb 5 Minuten), als unter Verwendung von T4-Ligase. Wichtig für die Reaktion ist auch die Eigenschaft der Taq-Polymerase keine glatten Enden, sondern einen unspezifischen Überhang zu produzieren. In Abhängigkeit von den 5'-Primerenden handelt es sich dabei meist um ein zusätzliches Adenosin. Solche PCR-Fragmente lassen sich leicht in einen Vektor mit T-Überhang klonieren. Dies wird allgemein als TA-Klonierung bezeichnet. Da bei der PCR auch proofreading - Polymerasen eingesetzt wurden, die Überhänge abbauen, mußte das PCR-Produkt nach der Reinigung aus

dem Agarosegel zunächst für 10 Minuten bei 72°C mit Taq-Polymerase, dATP und Taq-Puffer inkubiert werden. Dadurch wurden die notwendigen 3'-A-Überhänge gebildet. Für die Klonierungsreaktion wurden

4µl gereinigtes PCR-Produkt mit A-Überhang

1µl Salzlösung (1,2M NaCl, 0,06M MgCl)

1µl pCR®II-TOPO®-Vektor

gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Salzlösung sind Inkubationen von über 5 Minuten möglich, da das Salz ein erneutes Binden der Topoisomerase an die DNA verhindert. Die Reaktion wurde dann auf Eis gestellt und 2µl davon wurden zu den auf Eis aufgetauten TOP10F'One Shot® E. coli pipettiert und für 10 Minuten auf Eis belassen. Es folgte ein Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42°C. Die Reaktion wurde sofort wieder für zwei Minuten auf Eis gestellt, mit 250µl auf Raumtemperatur erwärmtem SOC-Medium (Invitrogen) gemischt und für eine Stunde bei 37°C mit 250rpm geschüttelt. Die Bakterienlösung wurde dann kurz abzentrifugiert, um die Bakterien am Boden des Cups zu sammeln. Vom Überstand wurden 150µl abgetragen und die Bakterien in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert. Diese konzentrierte Bakterienlösung wurde vollständig auf eine vorgewärmte und mit X-Gal und IPTG vorbereitete Agarplatte mit Ampicillin ausgestrichen. Die Vorbereitung der Agarplatten mit 87,5µl X-Gal (50 mg/ml; Promega) und 2µl IPTG (200mg/ml) war für die Blau-weiß-Selektion notwendig. Die multiple cloning site von pCR®II-TOPO® befindet sich innerhalb des lacZ'-Gens. LacZ' kodiert für das N-terminale α-Fragment der β-Galaktosidase. Durch die Anwesenheit eines Gens im Bakteriengenom, das den carboxyterminalen Teil des ω-Fragments kodiert, entsteht aktive β-Galaktosidase⁶⁶. Durch β-Galaktosidase wird farbloses X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid) in einen blauen Farbstoff (5-Brom-4-chlor-indigo) umgewandelt. Der Einbau des Inserts in die MCS zerstört das Leseraster des lacZ'-Gens. Die betroffenen Bakterienkolonien bleiben in Gegenwart von X-Gal weiß. Aufgrund der Tatsache, daß TOP10F'- Bakterien den Lac-Repressor exprimieren, muß für die Blau-weiß-Selektion auch der Induktor Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) zugefügt werden. Nach einer Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C wurden die weißen Kolonien analysiert. Dazu wurde ein PCR-Mix angesetzt mit:

5µl 10 × PCR-Puffer (200mM Tris-HCl pH 8,4, 500mM KCl; Invitrogen)

1,5µl MgCl₂ 50 mM (Invitrogen)

4µl dNTP-Mix (je 2,5mM)

1µl upstream Primer T7 oder Sp6 (20µM)

1µl downstream Primer aus 2. PCR-Lauf (20µM)
0,5µl Taq-Polymerase 5U/µl (Invitrogen)
ad 50µl H₂O

Mit einer Pipettenspitze wurde in eine Bakterienkolonie gestochen, die Spitze in den PCR-Mix getaucht, und dann mit der Spitze 5ml LB-Medium mit Ampicillin angeimpft.

PCR-Programm:

94°C für 2 min.
35 × (94°C für 30 s., Annealingtemperatur (55-60°C) für 3 min.)
72°C für 10 min.
4°C ∞

Ein Primer hybridisiert an Vektorsequenz, der andere an Insertsequenz. Nur wenn die beiden 3'-Primerenden der beiden komplementären DNA-Stränge aufeinander zuweisen entsteht ein PCR-Produkt. Auf diese Weise kann festgestellt werden, mit welcher Orientierung sich das Insert im Vektor befindet. Dies ist notwendig, da bei der TA-Klonierung die Richtung, mit der das Insert eingebaut wird, nicht vorgegeben werden kann. Das PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel aufgetrennt, und so die Größe des Inserts bestimmt. Die Isolation der Plasmid DNA und das Anlegen der Glycerinkultur wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

3.12 Mutagenese

Mit Hilfe des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene wurden von Frau C. Keller, MTA im Onkologischen Labor der Kinderklinik der JLU Gießen, an definierter Stelle Stopcodons in die *GRAF*-cDNA integriert. Diese Konstrukte dienten im Protein Truncation Test als Positivkontrollen. Als Template für die Mutagenese wurde die doppelsträngige Plasmid-DNA, *GRAF*-Wildtyp in pcDNA3-Vektor, verwendet. Zusätzlich mußten jeweils zwei komplementäre Primer konstruiert werden, die in ihrem Zentrum die gewünschte Mutation, in diesem Fall die Insertion von zwei eng benachbarten Stopcodons (5'- TAA - Wildtyptriple - TGA -3') enthalten. Damit der Primer an das Template hybridisieren kann, muß die homologe Sequenz, welche die Mutation umgibt, ausreichend lang (~10-15 Basen) sein ⁶⁶. Um eine möglichst hohe Annealingtemperatur wählen zu können sollten die Primer 25-45bp lang sein, einen GC-Gehalt von mindestens 40% aufweisen und eine Schmelztemperatur von wenigstens 78°C haben. Zusätzlich müssen die

Primer gereinigt sein. Durch eine PCR unter Verwendung der "mutierten" Primer wurden die Stopcodons eingefügt⁹⁶.

5µl 10 × Reaktionspuffer (100mM KCl, 100mM (NH₄)₂SO₄, 200mM Tris-HCl
pH 8,8, 20mM MgSO₄, 1% Triton[®] X-100, 1mg/ml BSA)

Xµl Plasmid-DNA (5-50ng)

Xµl sense Primer (125ng)

Xµl antisense Primer (125ng)

1µl dNTP-Mix

1µl PfuTurbo[™] DNA-Polymerase (2,5U/µl)

ad 50µl H₂O

Temperaturprofil:

95°C für 30 s.

18 × (95°C für 30 s., 55°C für 1 min., 68°C für 12 min)

4°C ∞

Die Primer mit der enthaltenen Mutation binden komplementär an die gegenläufige Doppelstrang-DNA im zu mutierenden Bereich. PfuTurbo[™] DNA-Polymerase ist eine Proofreading-Polymerase, die mit deutlich geringerer Fehlerrate als Taq-Polymerase die Primer elongiert. Nachteilig ist, daß die Ausbeute an Produkt bei Verwendung von Proofreading-Polymerase häufig niedriger ist und die mutierten Primer als falsch erkannt und "korrigiert" werden können. Daher wird die Verwendung höherer Primerkonzentrationen als sonst üblich empfohlen⁶⁶. Während der PCR wird so die Mutation über die Primer eingebaut. Die PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

Um ausschließlich mutierte DNA in Bakterien zu transformieren, nutzt man die Besonderheiten von Dpn I Endonuklease und die Unterschiede der Template- und neu synthetisierten DNA bezüglich ihrer Modifikation durch Methylierung. Das Template-Plasmid liegt aufgrund des in den meisten Bakterienstämmen vorhandenen dam-Methylierungssystems in methylierter Form vor. Die während der PCR synthetisierte DNA ist dagegen unmethyliert. Dpn I Endonuklease (Zielsequenz: 5'-Gm6ATC-3') schneidet methylierte und hemimethylierte DNA. Für diese Reaktion wurde das PCR-Produkt für eine Stunde bei 37°C mit 1µl Dpn I (10U/µl; Stratagene) inkubiert. Dadurch wird die Template DNA zerstört. Zurück bleibt die in Form zirkulärer dsDNA vorliegende nicht methylierte, mutierte DNA. Jeder der beiden Stränge besitzt eine Lücke. Diese Lücke wird nach der Transformation in Epicurian Coli[®] XL-1 Blue supercompetent cells (Statagene)

geschlossen. Dazu wurden 1-4 μ l Dpn I behandelter DNA mit 50 μ l auf Eis aufgetauten Epicurian Coli[®] XL1-Blue superkompetenten Zellen gemischt, 30 Minuten auf Eis inkubiert und nach einem Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C wieder für zwei Minuten auf Eis gestellt. Dann wurden 0,5ml LB-Medium zugefügt und die Lösung für eine Stunde bei 37°C mit 250rpm geschüttelt. Die Bakterienlösung wurde anschließend auf Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

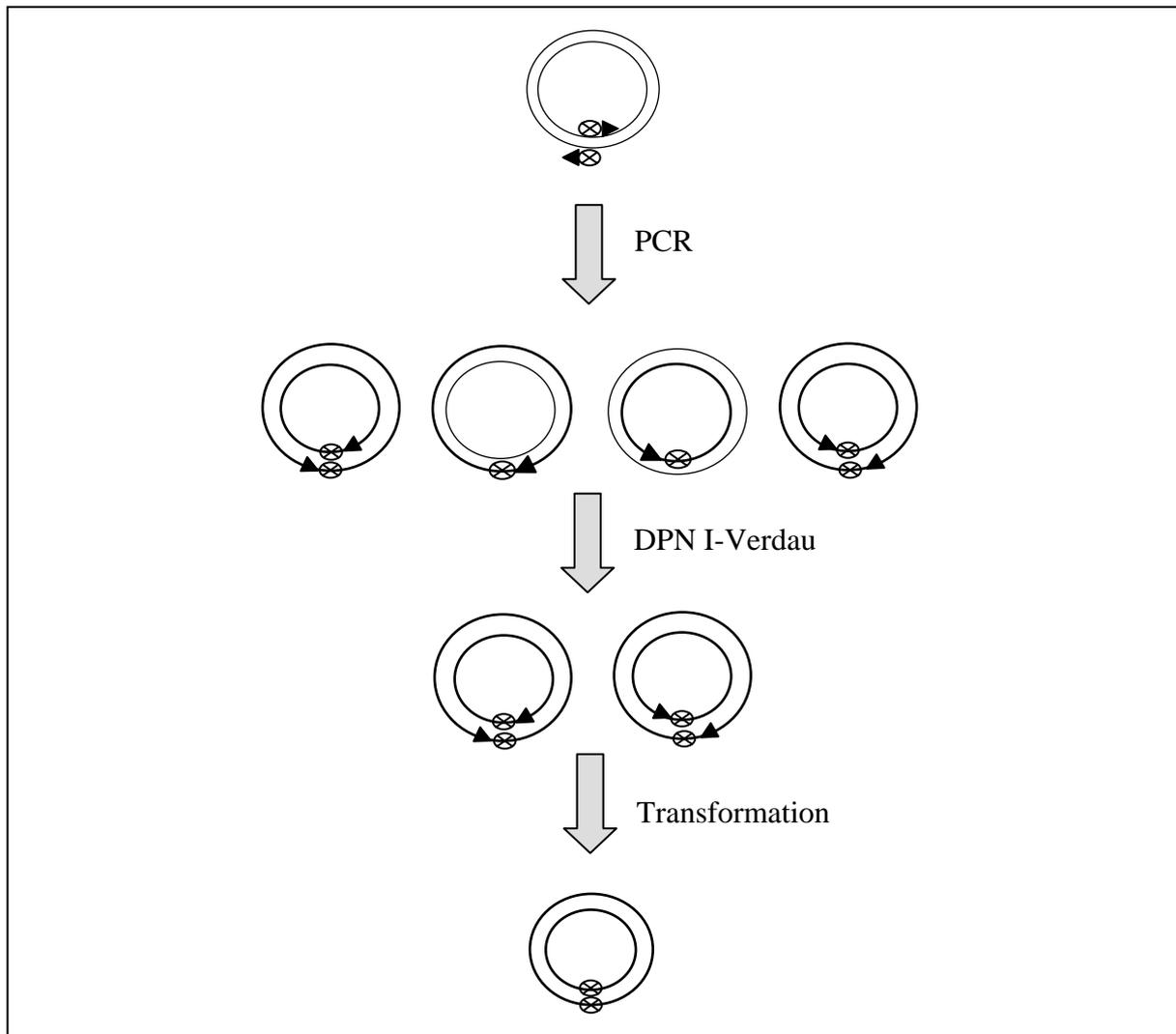


Abb. 3.1: Mutagenese-Schema

Der Erfolg der Mutagenese wurde mittels Sequenzierung überprüft.

3.13 Protein truncation test (PTT)

3.13.1 In vitro Transkription und Translation

Der Protein truncation test ist geeignet, um auf Proteinebene Frameshift und Nonsense-Mutationen aufzudecken. Er wurde von Roest et al 1993 erstmals beschrieben^{67,97}. Als Ausgangsmaterial dienen entweder cDNA oder Exonbereiche genomischer DNA, die mittels PCR amplifiziert werden. Soll das PCR-Produkt direkt zur in vitro Transkription und Translation eingesetzt werden, so müssen die PCR-Primer einige Bedingungen erfüllen:

1. Der in Leserichtung liegende Primer muß an seinem 5'-Ende die Promotorsequenz für die bei der in vitro Transkription verwendete Phagen-RNA-Polymerase (T7, SP6 oder T3) tragen. Damit die RNA-Polymerase diese Bindestelle möglichst bereitwillig annimmt und die DNA effizient transkribiert, wird zusätzlich empfohlen, weitere ca. 20 Nukleotide an das 5'-Ende des Primers anzufügen⁶⁶.
2. Durch eine kurze Spacersequenz vom Promotor getrennt sollte eine Kozak-Sequenz liegen, die eine effiziente Translation gewährleistet⁹⁸.

Kozak-Sequenz: CC RCC ATG G

R = A oder G

3. Das ATG-Initiationscodon muß mit dem offenen Leseraster (ORF) übereinstimmen

Allgemeine Form eines geeigneten Primers:

5'Promotorsequenz - Spacer - Kozak-Sequenz - genspezifische Sequenz 3'

Einen geeigneten Promotor an passender Stelle kann man auch erhalten, indem man die DNA in einen entsprechenden Expressionsvektor kloniert, beispielsweise in pcDNA3.

Zur in vitro Transkription und Translation wurden der Protein Truncation Test, nonradioactive von Boehringer und das TNT[®] Quick Coupled Transcription/ Translation Kit von Promega verwendet. Die Synthese biotinylierter Proteine wird in beiden Fällen mit Retikulozytenlysate und mit Lysin beladener tRNA, welche an der ε-Aminogruppe des Lysins mit Biotin markiert ist, durchgeführt. Die Lysin-tRNA von Promega ist nach einer modifizierten Methode nach Johnson et al⁹⁹ mit Biotin markiert. Biotin ist über einen Spacer an die ε-Aminogruppe des Lysins gebunden.

In das Kit von Boehringer wurde ausschließlich mittels PCR amplifizierte cDNA eingesetzt, im Promega-Kit wurde auch Plasmid DNA verwendet. Entsprechend den Angaben von Promega darf die eingesetzte DNA weder Ethanol noch Calcium enthalten. Calcium reaktiviert eine Nuklease, mit deren Hilfe im Master Mix enthaltene endogene RNA beseitigt wurde. Ethanol hemmt die enzymatischen Reaktionen.

Im Gegensatz zum Promega-Kit laufen Transkription und Translation im Boehringer-Kit in getrennten Reaktionen ab. Für die Transkription wurde der Transkriptionsmix zunächst schnell aufgetaut und sofort wieder auf Eis gestellt.

- 5µl Transkriptionsmix (Boehringer)
- 1µl RNaseOUT™, 40U/µl (Invitrogen)
- Xµl PCR-Produkt (50-500ng)

ad 20µl RNase freies H₂O

wurden gemischt und 15-60 Minuten bei 30°C im Wasserbad inkubiert. 10µl der Transkriptionsreaktion wurden auf einem 1%-igen Agarosegel überprüft. Nach der Transkription sollten zwei klare Banden, eine DNA- und eine RNA-Bande vorliegen.

Für die Translation wurde der Translationsmix schnell aufgetaut und wieder auf Eis gestellt.

- 40µl Translationsmix (Boehringer)
- 9µl Transkriptionsreaktion
- 1µl RNaseOUT™, 40U/µl (Invitrogen)

wurden gemischt und eine Stunde bei 30°C inkubiert.

Für die gekoppelte in vitro Transkription/ Translation bei Verwendung des Promega-Kits wurde zunächst der TNT® Quick Coupled Master Mix ebenfalls schnell aufgetaut und sofort wieder auf Eis gestellt. Der Mix enthält Reaktionspuffer, RNA-Polymerase (T7 oder SP6), Nukleotide, AS-Mix ohne Methionin, RNasin® Ribonuclease Inhibitor und Kaninchen-Retikulozytenlysat.

- 40µl TNT® Quick Master Mix
- 1µl Methionin 1mM
- Xµl DNA 0,2-2µg
- 1µl Transcend™ biotinylierte tRNA

ad 50µl Nukleasefreies Wasser

wurden gemischt und für (60-) 90 Minuten bei 30°C inkubieren. Anschließend wurde die Reaktion auf Eis beendet. Mit Hilfe der biotinylierten Lysin-tRNA wird in die wachsende Proteinkette Biotin integriert, das mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase und Luminol detektiert werden kann.

Promega liefert als Positivkontrolle Luciferase-Plasmid DNA, die direkt in die Reaktion eingesetzt wird. Das Boehringer-Kit enthält humane genomische DNA und zwei Primer mit denen das als Positivkontrolle dienende 1,5 kb-PCR-Fragment zunächst amplifiziert werden muß.

3.13.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Von dem Translationsprodukt wurden 2µl mit 15-20µl SDS-Auftragslösung verdünnt und durch vierminütiges Aufkochen denaturiert. Die denaturierten Proteine wurden auf ein diskontinuierliches SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Dabei binden die denaturierten Proteine SDS unter Ausbildung negativ geladener Komplexe. Die gebundene SDS-Menge ist proportional zum Molekulargewicht der Proteine und unabhängig von der Aminosäuresequenz. Daher unterscheiden sich verschiedene Proteine nach Binden von SDS nur noch in ihrer Größe. Die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe wandern während der Elektrophorese zum Plus-Pol und werden durch den Molekularsiebeffekt der porösen Polyacrylamidmatrix aufgetrennt^{93,100}.

SDS-PAGE wurde mit der Mini-PROTEAN®II Elektrophoresekammer von BIO-RAD durchgeführt. Die Proteine wurden in 0,75mm dicken 7cm × 8cm großen diskontinuierlichen Minigelen aufgetrennt. Die Akrylamidkonzentration des Trenngels richtet sich nach der Größe der zu trennenden Proteine.

Reaktionsansatz für 2 Gele:

Sammelgel (5%) ⁹³			Trenngel (8%) ⁹³		
2,7	ml	H ₂ O	6,9	ml	H ₂ O
0,67	ml	30% Acrylamid	4,0	ml	30% Acrylamid
0,5	ml	1M Tris (pH 6,8)	3,8	ml	1,5M Tris (pH 8,8)
0,04	ml	10% SDS	0,15	ml	10% SDS
0,04	ml	10% APS	0,15	ml	10% APS
0,004	ml	TEMED	0,009	ml	TEMED

Für die ebenfalls verwendeten 10 und 12%-igen Trenngele wurden die Konzentrationen entsprechend dem Protokoll in Sambrook et al.⁹³ angepaßt. Zuerst wurde das Trenngel zwischen zwei in die Gießvorrichtung eingespannte Glasplatten gegossen. Um es unter Luftabsschluß polymerisieren zu lassen wurde es mit Wasser überschichtet. Das Wasser wurde wieder entfernt, und das Sammelgel auf das polymerisierte Trenngel gegossen. Nach Einsetzen eines Kammes zum Auftragen der Proben konnte auch das Sammelgel polymerisieren. Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels wurden die Geltaschen gründlich mit Wasser ausgespült, um nicht polymerisiertes, neurotoxisches Acrylamid zu entfernen. Anschließend wurde die Elektrophoresekammer nach der Anleitung von BIO-RAD aufgebaut und die beiden Pufferkammern mit Tris-Glycine-Elektrophoresepuffer

gefüllt. Der pH-Wert des Puffers darf nicht korrigiert werden, da sonst das Ionensystem gestört wird, was zu unscharfen Banden führt⁹⁷. Mit speziellen Pipetten (Sorensen) wurden bis zu 15µl vorbereitetes, denaturiertes Protein und ein biotinylierter Längenstandard (14-100 kD von Sigma) in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde in ca. 60 Minuten mit 20 mA (bei paralleler Analyse von zwei Gelen 30 mA) durchgeführt. Der Lauf wurde beendet kurz bevor die Bromphenolblaufront das untere Gelende erreichte.

3.13.3 Western Blot

Towbin et al.¹⁰¹ beschrieben 1979 erstmals den Proteintransfer von einem Polyacrylamidgel auf eine Membran mittels Strom.

Zur Durchführung von Western Blots wurde in dieser Arbeit die Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell von BIO-RAD verwendet. Die mit dieser Halbtrockenzelle durchgeführte Blot-Methode geht auf Kyhse-Andersen¹⁰² zurück. Die Proteine wurden auf positiv geladene Nylonmembranen von Boehringer gebロットet. Diese Membranen binden Proteine durch hydrophobe und ionische Wechselwirkungen. Verglichen mit Nitrocellulosemembranen, die ca. 80-100µg Protein pro cm² binden können, verfügen positiv geladene Nylonmembranen über eine wesentlich höhere Kapazität von bis zu 480µg/cm². Dies ermöglicht die Detektion sehr kleiner Proteinmengen. Der Zusatz von 20% Methanol zum Blotpuffer ist bei Verwendung von Nylonmembranen nicht notwendig, wodurch der Proteintransfer schneller und effizienter wird. Um einen zu hohen Hintergrund zu vermeiden müssen die Membranen allerdings besonders gründlich blockiert werden¹⁰⁰.

Zwei Stück dickes Filterpapier (Bio-Rad) und die Nylonmembran wurden auf Gelgröße zurechtgeschnitten und ca. 30 Minuten in gekühltem Blotpuffer eingeweicht. Der pH-Wert des verwendeten Towbin Transferpuffers darf nicht korrigiert werden. In diesem Puffer wurde auch das Gel für 15 Minuten äquilibriert. Auf der Platinanode der Halbtrockenzelle wurden nacheinander Filterpapier, die Membran, dann das Gel und zuletzt nochmals Filterpapier sorgfältig übereinander gelegt. Die Kammer wurde mit der im Deckel enthaltenen Stahlkathode geschlossen. Zwischen den Schichten und den Elektroden dürfen sich keine Luftblasen befinden. In der Halbtrockenzelle ersetzt das in Blotpuffer eingeweichte Filterpapier den Puffertank und dient als Ionenreservoir. Der Blot wurde in 25 Minuten mit konstant 13V durchgeführt. Um übermäßiges Erhitzen zu vermeiden sollte ein Maximum von 5,5mA/cm² nicht überschritten werden. Diese Bedingungen wurden während

des Blotvorgangs kontrolliert. Durch einen im Polyacrylamidgel aufgetrennten, vorgefärbten Marker kann die Effizienz des Blotvorgangs abgeschätzt werden. Die einzelnen Banden sollten deutlich auf der Membran sichtbar und aus dem Gel nahezu verschwunden sein.

3.13.4 Chemilumineszenz

Die biotinylierten Proteine wurden mittels Enhanced Chemiluminescence (ECL)- Reaktion detektiert. Dazu wurde das BM Chemiluminescence Blotting Kit (Biotin/Streptavidin) von Boehringer verwendet. Das Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat bindet an die Biotinmarkierung. In Gegenwart von H_2O_2 katalysiert Peroxidase die Oxidation von Luminol. Das dadurch entstehende energiereiche Zwischenprodukt kehrt durch Aussendung eines Lichtquanten in seinen Grundzustand zurück. Legt man einen Röntgenfilm auf die Membran, wird der Film dort, wo sich auf der Membran biotinyliertes Protein befindet, geschwärzt. Die Reaktion wird durch 4-Iodophenol verstärkt ¹⁰³.

Die Lumineszenzreaktion erreicht nach 1-2 Minuten ihr Maximum, bleibt in den folgenden 20-30 Minuten relativ konstant und beträgt nach einer Stunde noch 60-70% der Maximalaktivität. Die Vorteile der ECL-Reaktion sind die hohe Sensitivität, kurze notwendige Expositionszeit des Röntgenfilms und die Verwendung nicht-radioaktiver Substanzen.

Alle Arbeitsschritte zur Detektion der biotinylierten Proteine wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und die Membran in den angegebenen Lösungen leicht geschwenkt. Die geblottete Membran wurde zunächst $2 \times$ jeweils 10 Minuten in TBS gewaschen. Die 10%-ige Blockierungsstammlösung wurde mit TBS 1:5 verdünnt. Mit dieser 2%-igen Blockierungslösung wurde die Membran für eine Stunde blockiert bevor sie 30 Minuten mit der Streptavidin-Peroxidase-Lösung (50mU/ml) inkubiert wurde. Zur Herstellung der Streptavidin-Peroxidase-Lösung wurde die Streptavidin-Peroxidase-Stammlösung (250 U/ml) zunächst 30 Sekunden mit $12000 \times g$ zentrifugiert, um unlösliche Partikel zu sedimentieren, welche Hintergrund verursachen könnten, und dann 1:5000 in 2%-iger Blockierungslösung verdünnt. Anschließend wurde die Membran $4 \times$ jeweils 15 Minuten in TBST gewaschen. Zur Herstellung der Detektionslösung wurden die Substratlösung (A) und die Startlösung (B) auf $25^\circ C$ vorgewärmt, im Verhältnis 100:1 gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektionslösung wurde auf die Membran pipettiert und eine Minute zwischen zwei transparenten Folien inkubiert. Überschüssige Flüssigkeit und

Luftblasen wurde sorgfältig entfernt, die in Folie eingeschlagene Membran in eine Röntgenkassette eingelegt und ein Röntgenfilm exponiert. Nach ca. einer Minute wurde ein zweiter Film und entsprechend dem erhaltenen Bild eventuell weitere Filme aufgelegt.

3.14 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde nach der Methode von Sanger¹⁰⁴ mit dem ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit von Perkin Elmer durchgeführt. Die zu sequenzierende DNA wird denaturiert und mit einem Primer hybridisiert. Durch die im Terminator Ready Reaction Mix enthaltene AmpliTaq® DNA Polymerase FS wird ein komplementärer Strang synthetisiert. Neben den vier für eine PCR notwendigen Desoxynukleotiden enthält der Mix zusätzlich einen definierten Anteil an fluoreszenzfarbstoffmarkierten Didesoxynukleotiden (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP). Die vier Didesoxynukleotide enthalten jeweils verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe. Da Didesoxynukleotide keine 3'-OH-Gruppe besitzen, kann an sie kein weiteres Nukleotid geknüpft werden. Immer wenn ein Didesoxynukleotid in den wachsenden Komplementärstrang eingebaut wird kommt es zum Kettenabbruch. Dieser Kettenabbruch verteilt sich statistisch über den zu sequenzierenden Bereich.

Ein Sequenzieransatz besteht aus:

- 8µl Terminator Ready Reaction Mix (Tris-HCl (pH 9,0); MgCl₂ 2mM;
Desoxynukleotide: dTTP, dATP, dCTP, dTTP; fluoreszenzfarbstoffmarkierte
Didesoxynukleotide: ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP; thermostabile
Pyrophosphatase; AmpliTaq® DNA Polymerase FS)
- Xµl Template-DNA (300-500ng Plasmid-DNA)
- 1µl Primer (5µM)

ad 20µl H₂O

Temperaturprofil:

25 × (96°C für 10 s., 50-60°C für 5 s., 60°C für 4 min.)

4°C ∞

Die Annealingtemperatur richtet sich nach dem verwendeten Primer.

Die DNA wurde nach Abschluß der Sequenzreaktion durch eine Ethanol-fällung gereinigt. Dazu wurden die gesamten 20µl des Ansatzes mit 2µl 3M Natriumacetat pH 4,6 und 50µl 95% Ethanol gemischt und 20 Minuten mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit 250µl 70% Ethanol gewaschen und nach Entfernen der

Flüssigkeit in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die so vorbereitete DNA wurde in 4µl Formamid mit 5mM EDTA und 10mg/ml Dextranblau gelöst, zwei Minuten bei 90°C denaturiert und auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel pipettiert.

Sequenzgel: 6% Polyacrylamidgel

30	g	Harnstoff
9	ml	40% Acrylamid
6	ml	10 × TBE
23,5	ml	H ₂ O

unter geringer Wärmezufuhr gelöst, filtriert.

Polymerisation erfolgt nach Zugabe von:

180	µl	10% APS
24	µl	TEMED

Der im Gel enthaltene Harnstoff verhindert die Ausbildung von DNA-Sekundärstrukturen, welche die Laufeigenschaften im Gel verändern würden⁶⁶. Die Sequenzierung wurde mit dem Gerät ABI 373 von Perkin-Elmer unter Verwendung von 1 × TBE-Elektrophoresepuffer durchgeführt. Die Fluoreszenzfarbstoffe in den Syntheseprodukten wurden im unteren Drittel des Polyacrylamidgels von einem Laser angeregt. Die freigesetzten Fluoreszenzsignale wurden detektiert und in einem angeschlossenen Computer dem entsprechenden Nukleotid zugeordnet. Die Sequenzen wurden mit dem Programm Omega (Oxford Molecular, Oxford, UK) ausgewertet. Zur Identifizierung *GRAF*-cDNA-fremder Sequenzen wurde mit BLAST (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) gearbeitet.

4 Ergebnisse

4.1 Methodik

Mit dem Protein truncation test (PTT) sollte eine Methode etabliert werden, die es ermöglicht, große DNA-Fragmente (bis zu 5kb) schneller als es mittels Sequenzierung möglich ist, auf translationsterminierende Mutationen zu untersuchen. Zur Etablierung der Methode wurde mit Zelllinien (siehe Tab. 2.2) gearbeitet. Um eine ausreichende Template-Menge zu erhalten mußte das DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert werden. Aufgrund des regulär 2277bp umfassenden offenen Leserasters von *GRAF*-cDNA ist die Amplifikation des kompletten Fragments mit Taq Polymerase nur schwer und mit geringer Effizienz möglich (siehe 3.6.2). Das gesamte Gen sollte daher in zwei Etappen mittels PTT analysiert werden. Mit Taq Polymerase und 1% DMSO im 1. Lauf der Nested-PCR wurde zunächst das erste *GRAF*-Segment von Nukleotid 2 bis 1455 (bezogen auf Accession no. Y10388, siehe Anhang) der Zelllinien HL-60, Mono-Mac-6, KASUMI-1, THP-1, ML-2 und RS4;11 amplifiziert.

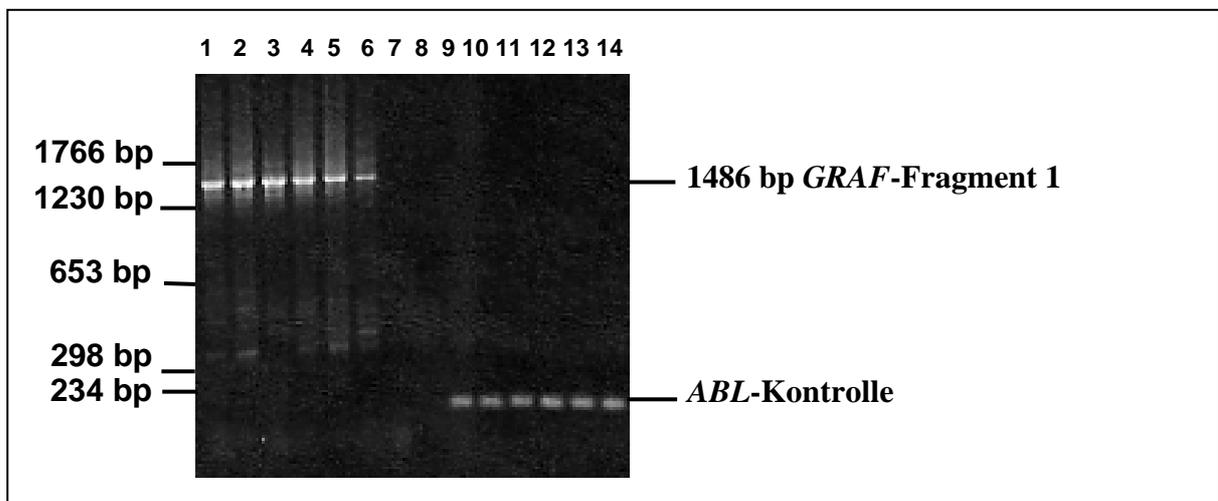


Abb. 4.1: Agarosegelelektrophorese, Ethidiumbromid gefärbte PCR-Produkte
Spur 7: Negativkontrolle; Spur 8: leer;
Spur 1 + 9: HL60; Spur 2 + 10: MM6; Spur 3 + 11: Kasumi-1;
Spur 4 + 12: THP1; Spur 5 + 13: ML-2; Spur 6 + 14: RS 4-11.

Für den anschließenden Einsatz in den PTT wurden die 1486bp *GRAF*-Fragmente der Zelllinien HL 60 und MM6 ausgewählt, da die DNA-Konzentration hier besonders hoch und die PCR-Banden besonders deutlich waren.

Als Positivkontrolle wurde die im Protein Truncation Test nonradioactive-Kit von Boehringer enthaltene Kontroll-DNA mit den Kontroll-Primern ebenfalls mit Taq Polymerase amplifiziert. Das amplifizierte 1500bp Kontroll-Fragment und die *GRAF*-Fragmente der Zelllinien HL-60 und Mono Mac 6 wurden transkribiert. Das Resultat zeigt die Abb. 4.2.

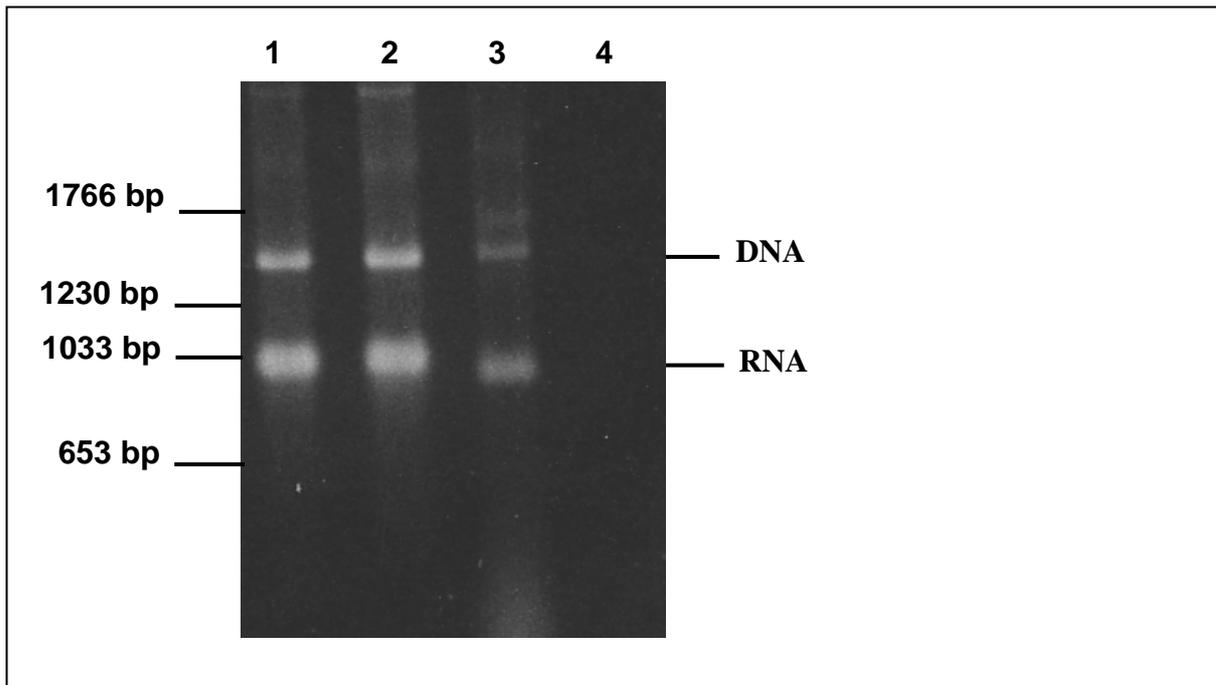


Abb. 4.2: Agarosegelelektrophorese nach Transkription
Spur 1: Transkriptionsansatz der Zelllinie HL 60;
Spur 2: Transkriptionsansatz der Zelllinie MM 6;
Spur 3: Positivkontrolle; Spur 4: Negativkontrolle

Sowohl bei der Positivkontrolle, als auch bei den beiden Zelllinien erkennt man eine obere DNA-Bande (Template) und eine untere RNA-Bande, d.h. die Transkription war gelungen. In den Translationsmix wurden 9 μ l Transkriptionsreaktion eingesetzt. Allerdings ließ sich lediglich der auf das Gel aufgetragene Marker (Boehringer) detektieren. Weder bei den Zelllinien, noch bei der Positivkontrolle die für ein 50kD großes Protein kodiert, war ein biotinyliertes Protein zu erkennen.

Da nach der Transkription eine deutliche RNA-Bande zu erkennen war, und der Proteinmarker gut aufgetrennte klare Banden aufwies, wurde die Ursache des mißlungenen Versuches im Bereich der Translation vermutet. Es wurde ein vorzeitiger Abbau der RNA in Betracht gezogen. Es ist bekannt, daß der mRNA-Abbau an die Translation gekoppelt

ist⁸⁸. Für die Stabilität der mRNA sind Poly-A-Sequenzen wichtig. Sie spielen eine Rolle bei der Translationsinitiation (unter Verwendung von Kaninchenretikulozytenlysate)¹⁰⁵. Deshalb wurde bei der darauffolgenden PCR ein neuer interner downstream Primer mit einem Überhang von 17 Thymidin-Nukleotiden am 5'-Ende verwendet. Dadurch entsteht während der Transkription eine Poly-A-Sequenz. Diese Poly-A-Sequenz am 3'-Ende stellt eine Art natürlichen Schutz gegen den RNA-Abbau dar⁸⁸.

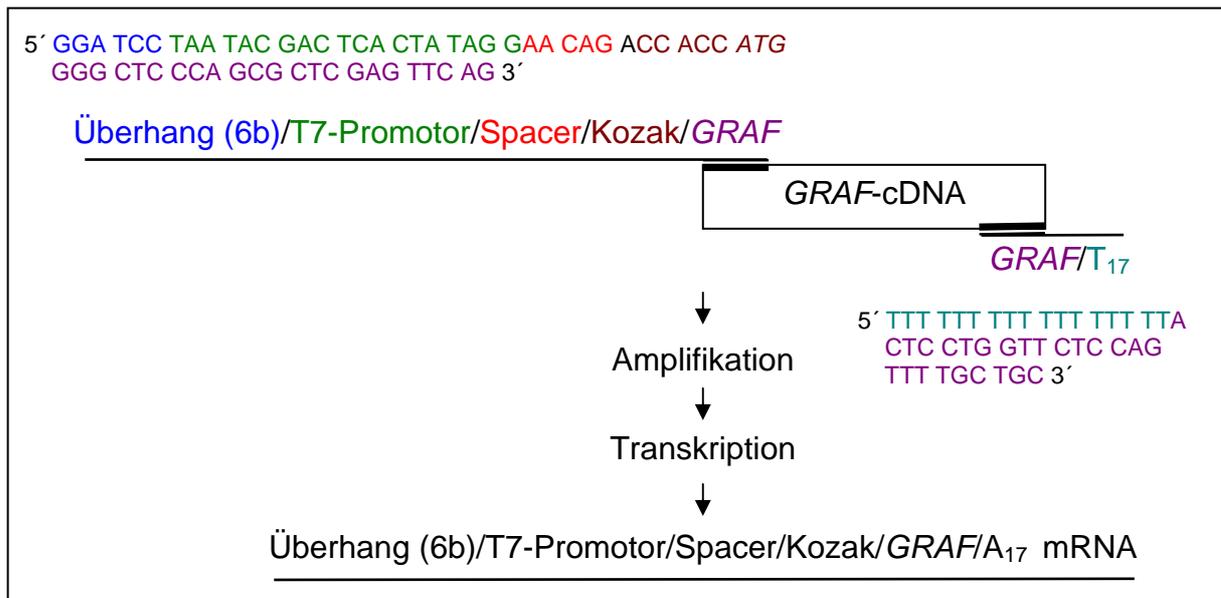


Abb. 4.3: PCR-Schema 1

Das mit diesem Primer amplifizierte Fragment wurde in das TNT[®] Quick Coupled Transcription/ Translation Kit von Promega eingesetzt. Das Kit von Boehringer wurde nicht mehr verwendet, da auch nach mehreren Versuchen selbst die Boehringer-Positivkontrolle nie eine Proteinbande zeigte. Im Kit von Promega wurde die enthaltene Luciferase-Plasmid-DNA als Positivkontrolle mitgeführt. Die Abbildung 4.4 zeigt das Blot-Ergebnis.

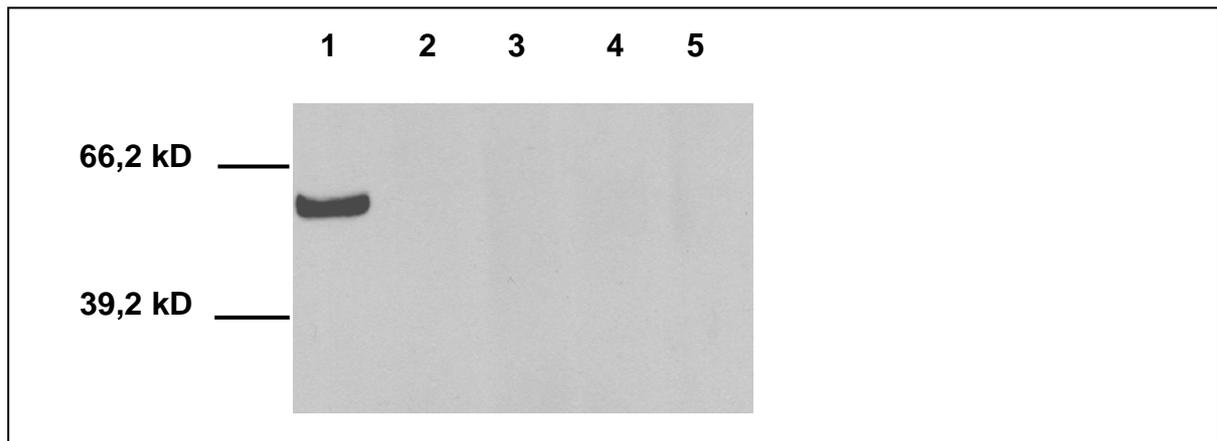


Abb. 4.4: Western Blot

Spur 1: Luciferase; Spur 2 + 3: GRAF-Fragment 1 der Zelllinie HL 60; Spur 4: 50 kD-Kontrolle (Boehringer); Spur 5: Negativkontrolle; Transkription und Translation mit TNT-Kit durchgeführt.

Neben dem Marker ist eine kräftige Luciferasebande zu sehen, von der eingesetzten PCR-DNA wurde auch im Promega-Kit kein Protein synthetisiert. Eine Aussage über die Transkription kann bei Verwendung dieses Kits nicht gemacht werden, da Transkription und Translation parallel in einem Cup ablaufen. Es wurde versucht, das Problem durch die Verwendung zweier neuer Primer zu lösen. An das 5'-Ende der T7-Promoterregion des upstream Primers wurden an Stelle der bisherigen 6 Nukleotide insgesamt 21 Nukleotide angehängt, um eine bessere Bindung der T7-Polymerase an die Promoterregion zu ermöglichen, und an das 5'-Ende der sequenzspezifischen Region des downstream Primers wurden 21 Thymidin-Nukleotide angefügt.

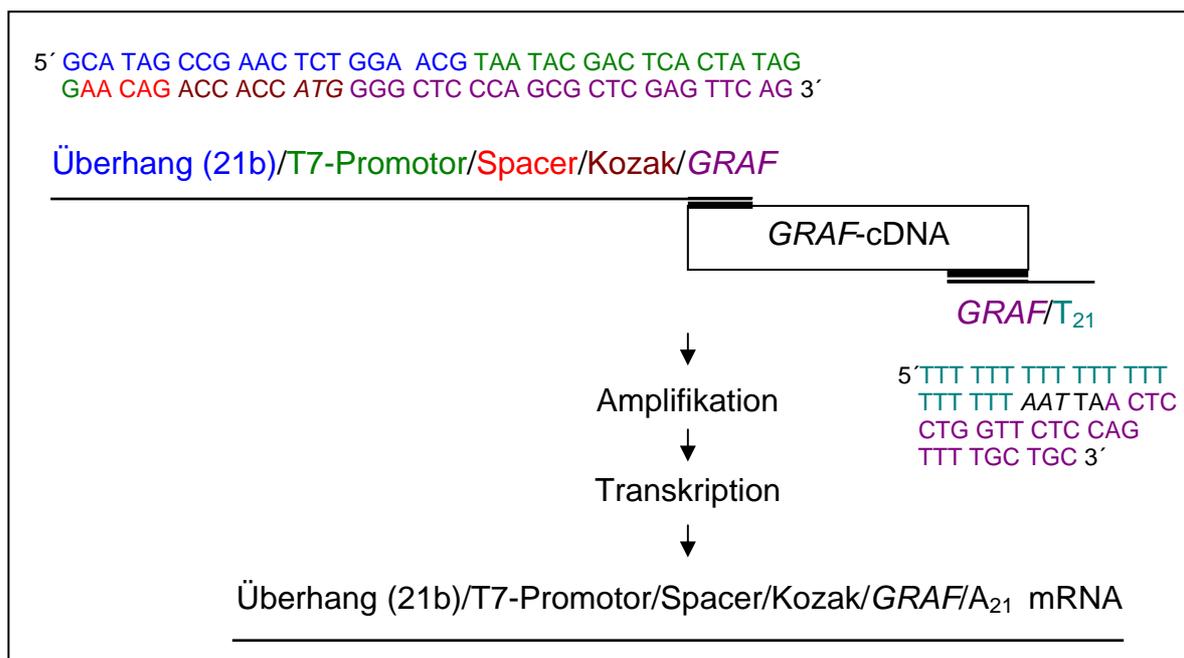


Abb. 4.5: PCR-Schema 2

Die PCR mit diesen Primern gestaltete sich ausgesprochen schwierig. Auch nach mehreren Versuchen, das Temperaturprofil und die Magnesiumkonzentration zu optimieren, zeigte sich im Agarosegel nur eine schwache Bande von 1518bp und mehrere Nebenprodukte. Daher mußte das Fragment vor der *in vitro* Transkription und Translation aus dem Gel ausgeschnitten und gereinigt werden. Doch auch mit diesem PCR-Produkt war kein detektierbares Protein zu synthetisieren. Der Blot zeigte nicht den gewünschten Erfolg.

Zur Problemlösung sollte geklärt werden, ob unter Verwendung von Plasmid-DNA ein Protein synthetisiert wird. Dazu wurde ein Expressionsplasmid (pcDNA3) das die kodierende Sequenz des GRAF-Wildtyps und einen T7-Promotor enthält, eingesetzt. Unter Verwendung dieser Plasmid-DNA gelang erstmals die *in vitro* Transkription und Translation von *GRAF*. Daher sollte nun im Anschluß an die PCR das *GRAF*-Gen in einen Vektor mit T7- bzw. SP6-Promotor kloniert werden. Die Amplifikation des gesamten offenen Leserasters von *GRAF* wurde als Nested-PCR mit den Primern Stig c 16 up Not I bzw. Graf Start EcoR I neu II und Graf PostStop Ksp I do bzw. G9 downstream Not I (siehe Anhang 10.4) und dem Gene Amp[®] XL PCR-Kit von Perkin Elmer durchgeführt.

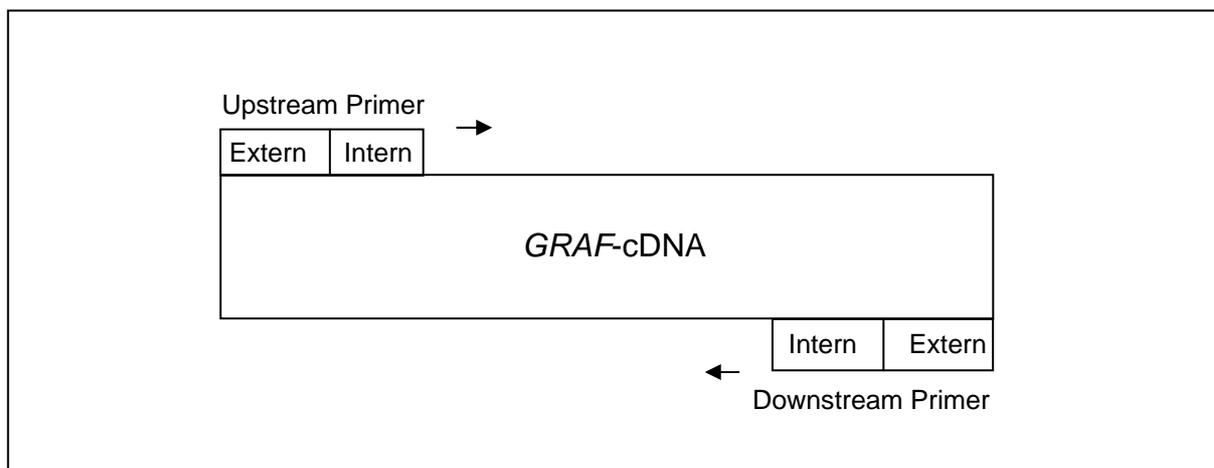


Abb. 4.6: Schema der durchgeführten Nested-PCR

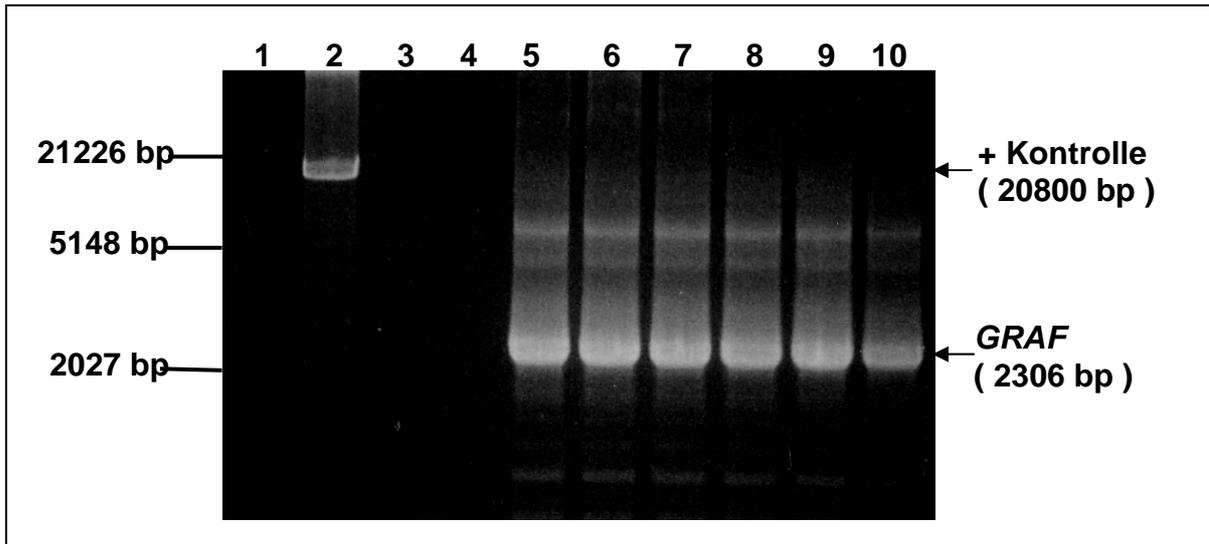


Abb. 4.7: Gelelektrophorese, PCR durchgeführt mit dem XL PCR Kit
 Spur 1: Negativkontrolle; Spur 2: XL-PCR-Positivkontrolle;
 Spur 3 und 4: leer;
 Spur 5-10: *GRAF*-Gen der Zelllinie K562.

Das so gewonnene 2306bp-Fragment der Zelllinie K562 wurde in pcDNA3 kloniert und verschiedene Klone wurden in den PTT eingesetzt. Um Nonsense-Mutationen im offenen Leseraster von *GRAF* besser lokalisieren zu können, wurden mit Hilfe des Mutagenesekits von Stratagene *GRAF*-Mutanten konstruiert, und im PTT mitgeführt. Bei der Mutante "1896" sollte die Proteinsynthese nach 1905bp abbrechen, bei der Mutante "1611" bereits nach 1605bp. Die Abbildung 4.8 zeigt das Ergebnis:

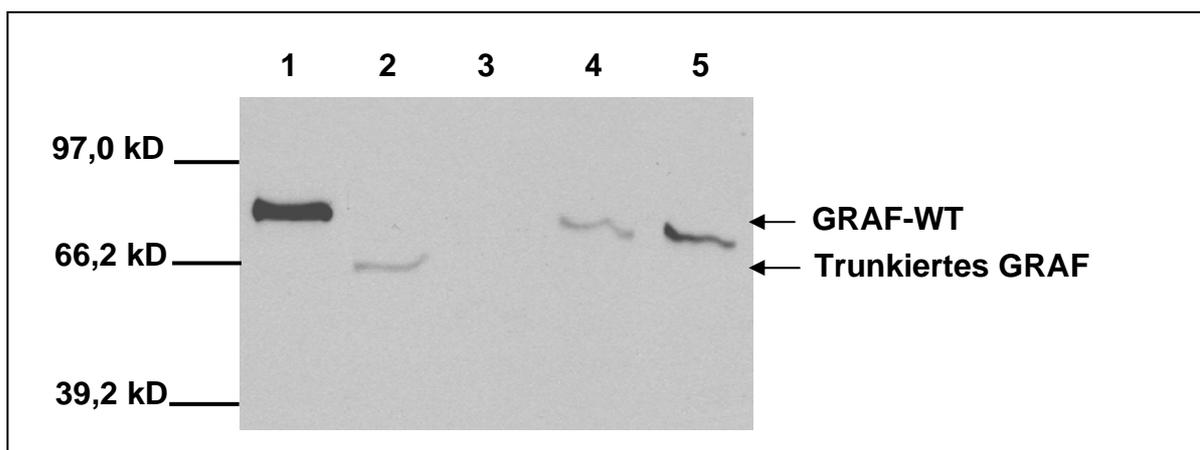


Abb. 4.8: Western Blot
 Spur 1: *GRAF*-WT;
 Spur 2: *GRAF*-Mutante 1896;
 Spur 3: *GRAF*-Mutante 1611;
 Spur 4 und 5: *GRAF*-Protein der Zelllinie K562.

Bei der Mutante "1611" war kein Protein nachweisbar. Mutante "1896" codiert für ein deutlich sichtbar kleineres Protein. Die beiden Klone mit dem von K562 amplifizierten *GRAF*-Insert liefern das komplette Protein, wie man im Vergleich mit *GRAF*-WT erkennen kann.

Mit der *GRAF*-WT Plasmid-DNA und der Plasmid-DNA der *GRAF*-Mutante 1896 wurde zusätzlich eine Verdünnungsreihe angefertigt. Dazu wurde die DNA im Verhältnis 1:1, 5:1, 10:1, 50:1 und 100:1 gemischt und in den PTT eingesetzt. Die Gesamtmenge an DNA betrug immer 1µg. Die Abbildung 4.9 zeigt, daß selbst bei einer Verdünnung von 10:1 noch immer die Bande des mutierten Proteins deutlich zu erkennen ist. Diese Bande entspricht einer Konzentration von 100ng Plasmid-DNA.

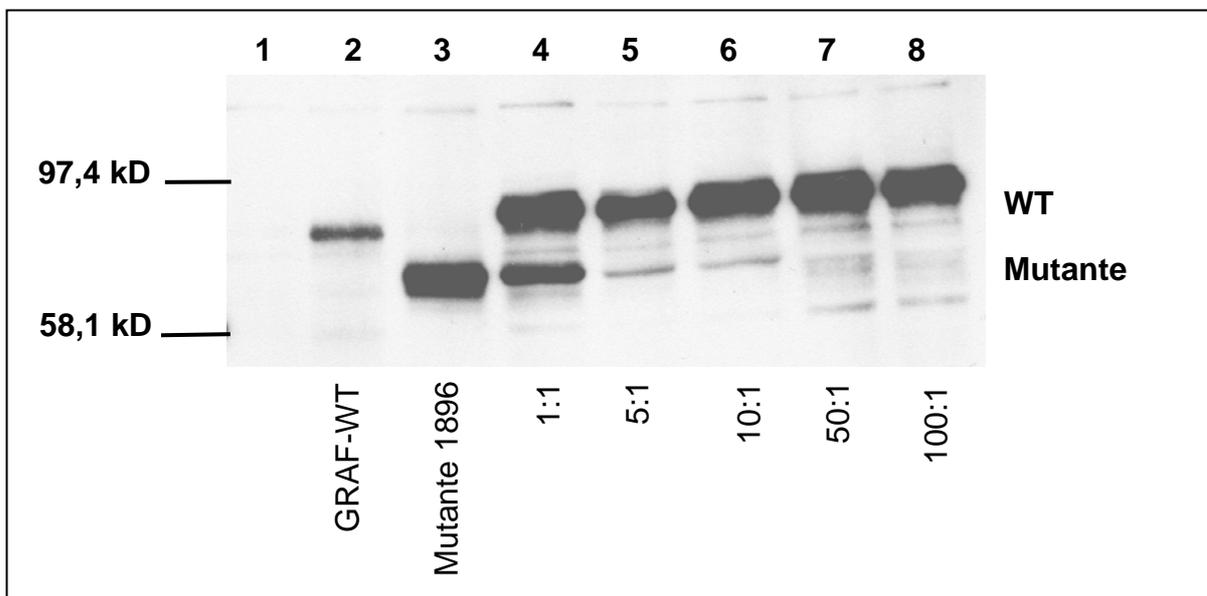


Abb. 4.9: Western Blot, Verdünnungsreihe
Spur 4-8: pcDNA 3.4 (= *GRAF*-WT) : Mutante 1896;
Spur 1: Negativkontrolle.

Der Protein Truncation Test konnte also nach anfänglichen Schwierigkeiten etabliert werden, allerdings nur unter Verwendung von Plasmid-DNA. Die konstruierte Mutante ermöglicht es, ein vorzeitiges Stop-Codon besser zu lokalisieren. Der durch die zusätzlich notwendige Klonierung erhöhte Arbeits- und Zeitaufwand konnte durch Verwendung des Topo-TA-Cloning-Kits von Invitrogen deutlich reduziert werden. Die Klonierung mit Topoisomerase statt Ligase erfordert weniger Arbeitsschritte und erfolgt deutlich schneller. Durch die TA-Klonierung können bei der PCR Primer ohne

Restriktionsenzymkennungssequenz verwendet werden, wodurch die Anlagerung der Primer an das Template verbessert wird.

4.2 Patientenanalytik

Zur Untersuchung des *GRAF*-Gens bei AML-Patienten wurde die PCR ausschließlich mit Primern ohne Restriktionsenzymkennungssequenz durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte mit dem Gene Amp[®]XL PCR Kit von Perkin Elmer, bzw. mit dem Advantage[®]cDNA PCR Kit von Clontech. Die PCR-Produkte wurden überwiegend durch Ausschneiden der DNA-Banden aus dem Agarosegel gereinigt und schließlich in pCR[®]II-TOPO-Vektor kloniert. Danach wurde mittels PCR überprüft, mit welcher Orientierung sich das Insert im Vektor befindet.

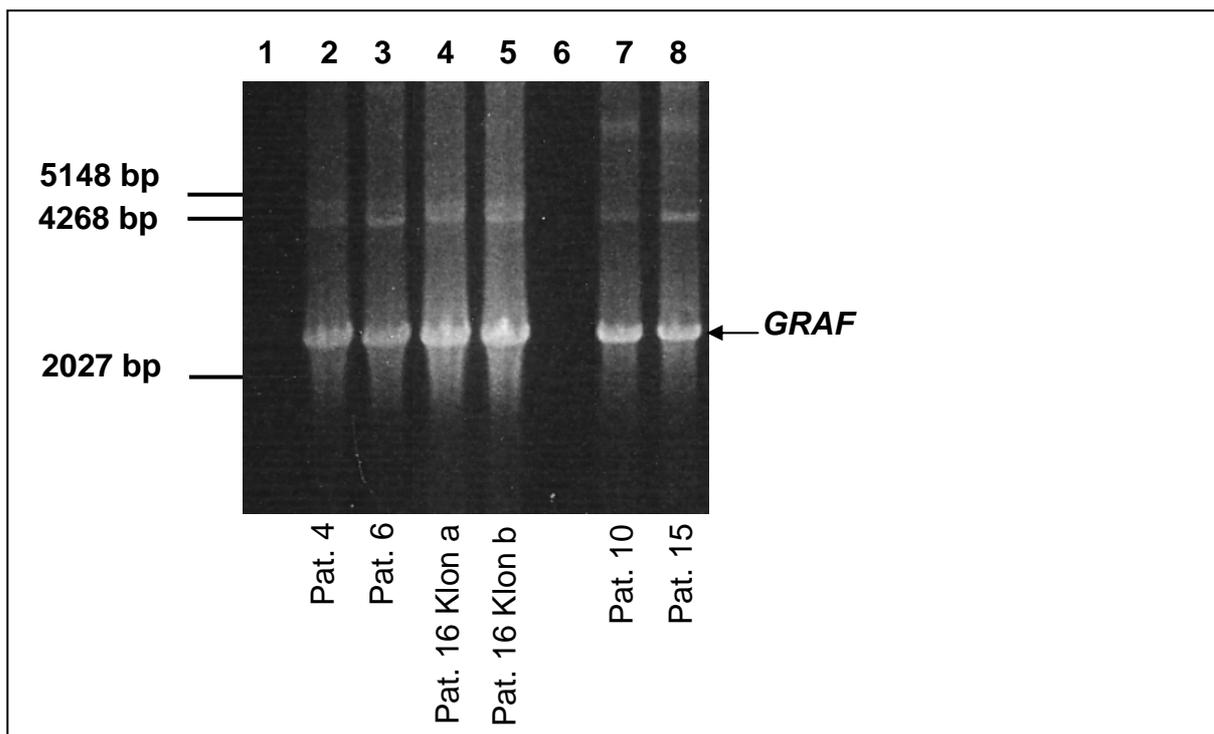


Abb. 4.10: Agarosegelelektrophorese nach PCR mit Plasmid DNA
Spur 1-5 PCR mit T7seq- Primer;
Spur 6-8 PCR mit SP6seq- Primer;
Spur 1 + 6: Negativkontrollen.

Dem Ergebnis dieser PCR entsprechend wurde dann der TNT-Mix mit T7- oder SP6-Polymerase gewählt, und die Plasmid-DNA in vitro transkribiert und translatiert.

Die Abb. 4.11 zeigt die Ergebnisse des PTT-Assays für die Patienten 2, 7, 8 und 10.

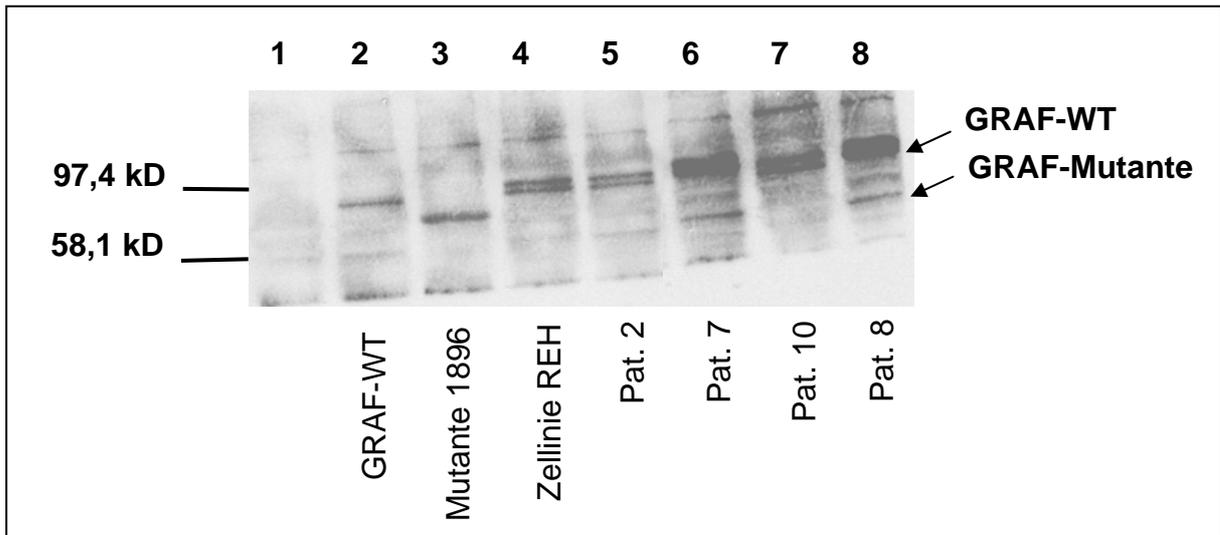


Abb. 4.11: Western Blot; 10%-iges Trenngel
Spur 1: Negativkontrolle.

In der Abbildung 4.11 erscheint die Proteinbande von Patient Nr. 10 nahezu auf der gleichen Höhe wie die von GRAF-WT. Die Proteine wurden hier über ein 10%-iges Trenngel aufgetrennt. Erst bei Verwendung eines 8%-igen Trenngels wird deutlich, daß bei diesem Patienten ein kleineres Protein synthetisiert wurde.

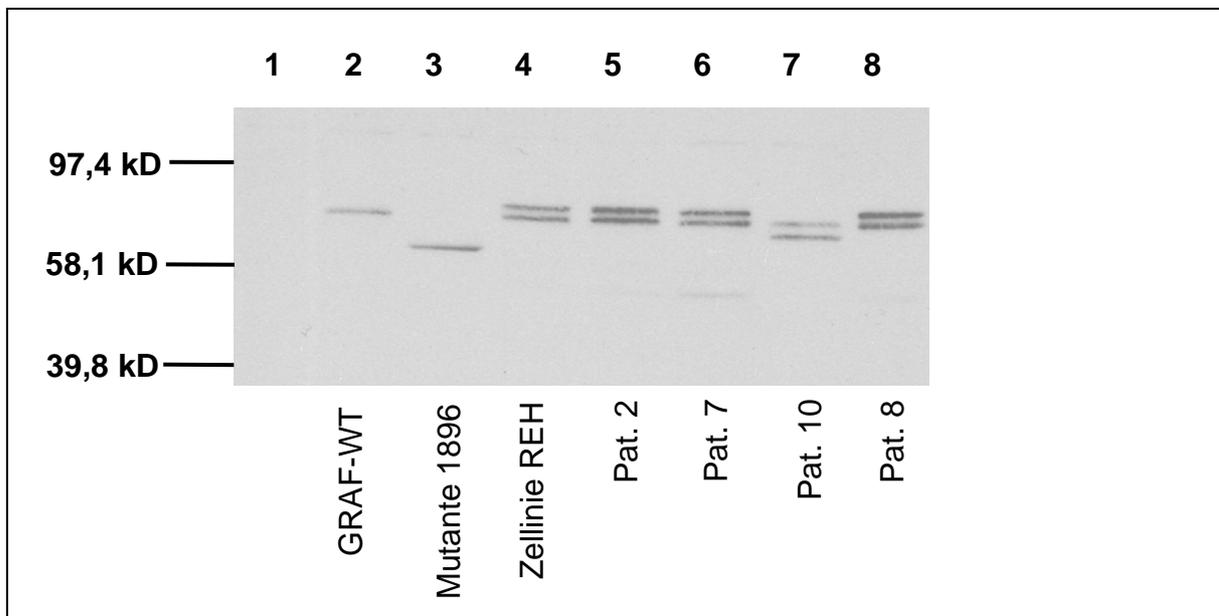


Abb. 4.12: Western Blot; 8%-iges Trenngel
Spur 1: Negativkontrolle.

Ähnliche Banden, wie bei Patient Nr. 10 zeigten sich auch bei den Patienten Nr. 6, 11, 13, 15 und 16.

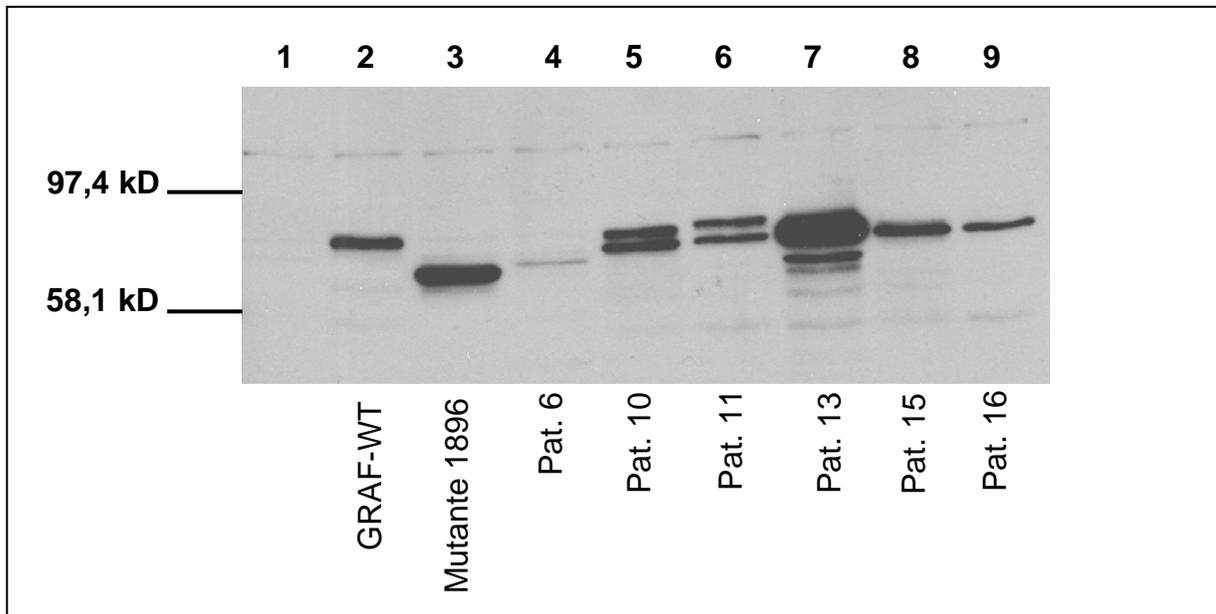


Abb. 4.13: Western Blot; 8%-iges Trenngel
Spur 1: Negativkontrolle.

Auffällig in den Abbildungen 4.12 und 4.13 sind die bei einigen Patienten und der Zelllinie REH entstandenen Doppelbanden. Mit Hilfe eines immunologischen Proteinnachweises nach Western Blot konnten diese Doppelbanden als GRAF identifiziert werden.

Bei Patient Nr. 17 war es nach Auftrennung der Proteine über ein 8%-iges Gel nicht gelungen, eine Proteinbande zu detektieren. Aufgrund der Vermutung, das Protein könne so stark verkürzt sein, daß es in einem 8%-igen Gel nicht mehr zurückgehalten wird, wurden diese Proteine erneut über ein 12%-iges Gel aufgetrennt.

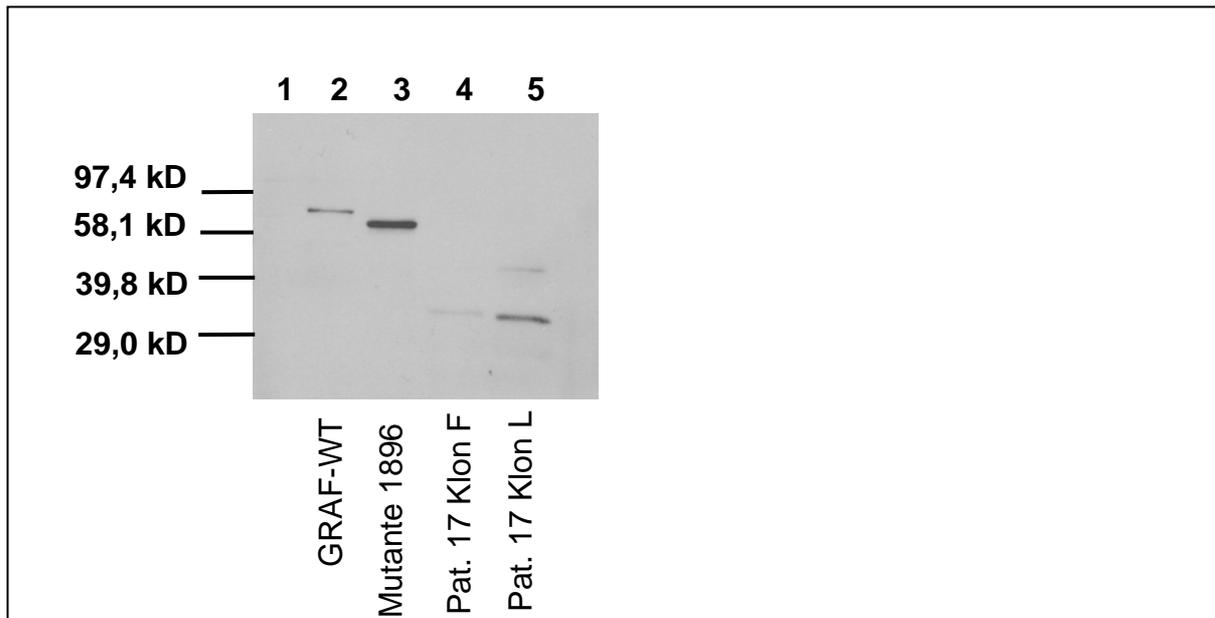


Abb. 4.14: Western Blot; 12%-iges Trenngel
Spur 1: Negativkontrolle.

Die Abbildung 4.14 zeigt eine schwache Bande bei ca. 34kD. Durch die Größe des synthetisierten Proteins kann der Bereich, in dem sich das Stopcodon befindet, abgeschätzt werden. Die Mutante "1896" erleichtert diese Abschätzung. Bei den Patienten Nr. 6, 10, 11, 13, 15 und 16 wurde ein Stopcodon im Bereich zwischen 1905 und 2277bp vermutet. Bei Patient Nr. 17 wurde ein Stopcodon im Bereich zwischen 818bp (=~ 30kD) und 1036bp (=~ 38kD) erwartet. Diese Bereiche wurden gezielt sequenziert.

Bei den Patienten Nr. 10, 13, 15 und 16 fanden sich statt des erwarteten Stopcodons jeweils Deletionen von Exon 21. Exon 21 erstreckt sich von Base 1989 bis einschließlich Base 2099, also über 111 Basen. bzw. über 37 AS. Der Verlust von Exon 21 führt zu einem um 4070Da kleineren Protein. Es kommt nicht zu einem Verschieben des Leserasters.

Bei Patient Nr. 6 lag ebenfalls eine Deletion der Basen 1989-2099 (Exon 21) vor, zwischen den Basen 1988 und 2100 (Exon 20 und 22) befand sich aber zusätzlich eine Insertion von 71bp. Dadurch entstand nach insgesamt 2046bp (noch innerhalb der Insertionssequenz) ein Stopcodon (TGA). Dieses Protein ist dadurch um 77 AS (~ 8470Da) kleiner als das GRAF-Wildtypprotein. Mit Hilfe von BLAST konnte festgestellt werden, daß es sich bei der Insertionssequenz um eine *GRAF*-Intronregion handelt. Zur Untersuchung, warum diese Sequenz nicht als Intron erkannt wurde, wurde von dem Patienten und von drei gesunden Blutspendern genomische DNA isoliert, der interessierende Bereich amplifiziert und sequenziert. Bei der Patientensequenz konnten im Bereich um die 71bp-Sequenz allerdings

keinerlei Sequenzabweichungen gefunden werden. Daraufhin wurde mit der vorhandenen Patienten cDNA eine erneute Amplifikation des 2282bp-Fragments durchgeführt, in den PTT eingesetzt und sequenziert. Zwei der Klone mit dem erneut amplifizierten Fragment wurden sequenziert. Alle nun sequenzierten Klone zeigten lediglich die Deletion des Exons 21, aber keine Insertion.

Bei der Sequenzierung des *GRAF*-Gens von Patient Nr. 11 zeigte sich eine Deletion, die einen Teil von Exon 20 und einen Teil von Exon 21 umfaßte. Die Deletion beinhaltete die Basen 1931 bis einschließlich 2035 (105bp) und hat somit kein Verschieben des Leserasters zur Folge. Mit der vorhandenen Patienten cDNA wurde dieser Bereich mittels Nested-PCR erneut amplifiziert. Die Sequenzierung mehrerer Klone zeigte nun aber immer die Wildtypsequenz.

Die *GRAF*-Sequenzen zweier Klone von Patient Nr. 17 wurden komplett sequenziert. In beiden fand sich an Position 913 ein T an Stelle eines C, was ein Stopcodon zur Folge hat (TAA). Daraufhin wurde aus einer zweiten Probe RNA isoliert und dieser Bereich mittels Nested-PCR amplifiziert. In den untersuchten 13 Klonen konnte die Punktmutation nicht bestätigt werden, es lag die Wildtypsequenz vor.

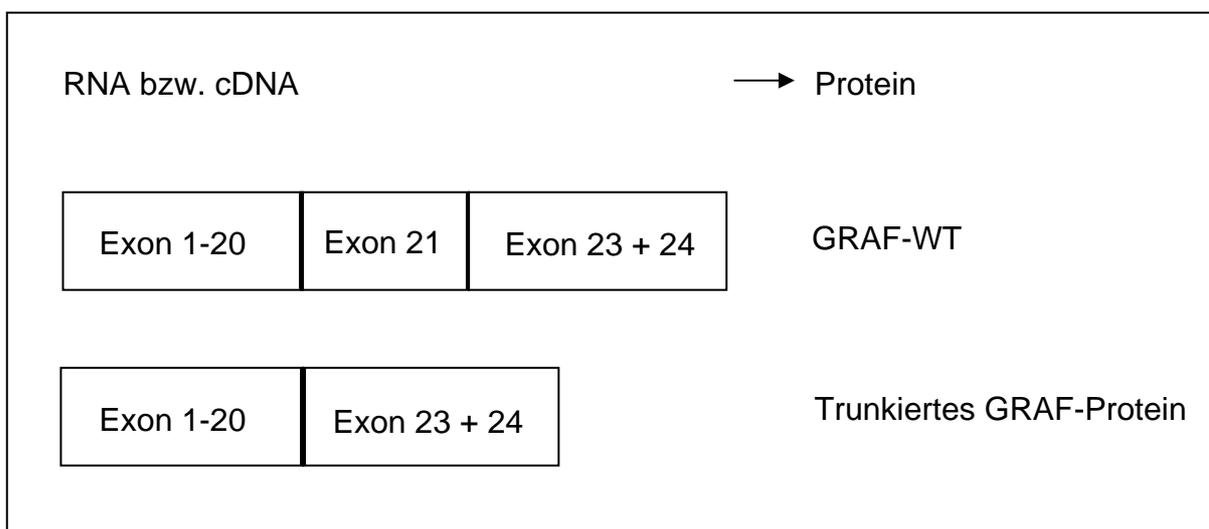


Abb. 4.15: Exon 21-Deletion;
Anmerkung: Exon 22 wird in Leukozyten nicht exprimiert.

Bei insgesamt 5 der untersuchten 24 Patienten liegt eine Deletion von Exon 21 vor. In der Abbildung 4.15 ist diese Deletion schematisch dargestellt. Die Teildeletionen von Exon 20 und 21 bei Patient Nr. 11 haben sich im Wiederholungsexperiment nicht bestätigt, ebenso wie die Punktmutation bei Patient Nr. 17. In beiden Fällen handelt es sich um die

Wildtypsequenz. Bei Patient Nr. 6 hat sich lediglich die Deletion von Exon 21, nicht aber die Insertion bestätigt. Alle anderen Patienten zeigten im PTT eine Bande, die der des GRAF-Wildtyp-Proteins entsprach. Sie wurden nicht weiter analysiert. Die Tabelle 4.1 gibt die Ergebnisse der Patientenuntersuchungen bezüglich Mutationen des *GRAF*-Gens wieder.

Tab. 4.1: Patientenergebnisliste

Patient Nr	PTT-Ergebnis	Sequenzierung
1	WT	
2	WT	
3	WT	
4	WT	
5	WT	
6	Trunkiertes Protein	1.:Del. Exon 21 + Ins. 71bp Intronseq. 2.:Deletion Exon 21
7	WT	
8	WT	
9	WT	
10	Trunkiertes Protein	Deletion Exon 21
11	Trunkiertes Protein	1.: Teildeletion Exon 20 + 21 2.: WT
12	WT	
13	Trunkiertes Protein	Deletion Exon 21
14	WT	
15	Trunkiertes Protein	Deletion Exon 21
16	Trunkiertes Protein	Deletion Exon 21
17	Trunkiertes Protein	1.: Nonsense-Mutation 2.: WT
18	WT	
19	WT	
20	WT	
21	WT	
22	WT	
23	WT	
24	WT	

5 Diskussion

5.1 Mutationsdetektion mittels PTT

Der Protein Truncation Test deckt auf Proteinebene alle Mutationen auf, die zu einem vorzeitigen Stopcodon und damit zur Synthese eines verkürzten Proteins führen. Mit einer einzigen in vitro Transkription / Translation kann ein auf DNA-Ebene bezogener Bereich von mehreren kb untersucht werden. Von der Größe eines verkürzten Proteins kann auf die Lokalisation des Stopcodons geschlossen und dieser Bereich zur Untersuchung der dem Stopcodon zugrundeliegenden Mutation gezielt sequenziert werden.

Wenn Informationen über die Funktion der verschiedenen Proteindomänen vorliegen, können Aussagen über die Auswirkung von translationsterminierenden Mutationen auf die Funktion des synthetisierten Proteins gemacht werden. Neben Nonsense-Mutationen und Mutationen, die die Gengröße verändern, aber nicht das Leseraster, wie beispielsweise Deletionen oder Insertionen, werden mit dem PTT keine weiteren Mutationen aufgedeckt, also auch keine Missense Mutationen, die allerdings durchaus pathogenetisch relevant sein können.

Die Unterscheidung zwischen translationsterminierenden Mutationen und non-frameshift Deletionen ist prinzipiell durch die Agarosegelelektrophorese des PCR-Produkts möglich, da das PCR-Produkt des Gens mit der Deletion eine kleinere Bande aufweist. Hierbei ist allerdings das Verhältnis zwischen der Größe des DNA-Fragments und der Größe der Deletion von Bedeutung. Das in dieser Arbeit amplifizierte ~2300 bp *GRAF*-Gen konnte nach Elektrophorese über ein 1%-iges Agarosegel nicht von *GRAF*-Fragmenten unterschieden werden, die eine Deletion von Exon 21 (111bp) aufwiesen. Möglicherweise wäre die Verwendung 0,8%-iger Agarosegele aufschlußreicher gewesen.

Mutationen, die lediglich zu einer geringen Größenänderung gegenüber dem Wildtypprotein führen, wie z.B. kleine in frame Deletionen und Insertionen, sowie translationsterminierende Mutationen im carboxyterminalen Bereich sind generell schwierig zu detektieren, da solche Proteine im PTT zu Banden führen, die von Wildtypproteinbanden kaum unterschieden werden können. Wenn sich eine translationsterminierende Mutation im N-terminalen Bereich nahe am Startcodon befindet kann das synthetisierte, sehr kleine Protein evtl. mittels PTT nicht nachgewiesen werden, weil es im Polyacrylamidgel nicht zurückgehalten wird, oder weil es zu schwach mit Biotin (oder anderem Marker) markiert ist.

Voraussetzung für die Anwendung des PTT ist die Amplifikation des interessierenden DNA-Fragments mittels PCR. Mutationen, die diese Amplifikation unmöglich machen, wie beispielsweise Mutationen im Primerbereich, große Insertionen, Inversionen oder Duplikationen können so nicht erkannt werden. Ebenso bleiben Mutationen, welche die Menge an mRNA beeinflussen oder zu instabiler mRNA führen, unerkannt⁷⁰.

Dies liegt allerdings nicht am PTT, sondern hierbei handelt es sich um ein generelles Problem der Mutationsdetektion. Allerdings kann das Ausbleiben des erwarteten DNA-Fragments nach Durchführung einer PCR ein Hinweis auf eine derartige Mutation sein. Vergleicht man Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden zur Mutationsanalyse, so schneidet der PTT sehr gut ab.

Ein so großer Bereich wie mittels PTT kann sonst nur noch mit Hilfe des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus untersucht werden. Diese Methode hat den entscheidenden Nachteil, daß mit ihr Punktmutationen nur in seltenen Ausnahmen aufgedeckt werden. Die Methode ist nur zur Detektion von Deletionen und Insertionen geeignet. Die Lokalisation einer Mutation kann auch mittels enzyme mismatch cleavage geschätzt werden, allerdings sind bei diesem Verfahren die Signale oftmals sehr schlecht. Bei der Sequenzierung werden zwar alle Mutationen unmittelbar sichtbar gemacht, aber es ist nicht immer eine Aussage über die Bedeutung dieser Mutation möglich. Eine Unterscheidung zwischen Missensemutationen und Polymorphismen ist schwierig. Im Gegensatz dazu sind alle im PTT entdeckten Mutationen höchst wahrscheinlich pathogenetisch relevant, da die Mutation zur Synthese eines veränderten Proteins führt. Diesen Vorteil bietet keine der anderen Methoden, wie aus Tabelle 5.1 ersichtlich ist.

Tab. 5.1: Methoden zur Mutationsanalyse ⁶⁶

Methoden	Vorteile	Nachteile
Sequenzierung	Unmittelbarer Mutationsnachweis, exakte Mutationsbestimmung, exakte Lokalisation	Hoher Arbeitsaufwand bzw. hohe Kosten, gefundene Mutation ggf. nicht pathogenetisch relevant, Lesebereich 500-1000bp
RFLP	Großer untersuchbarer Bereich (mehrere kb)	Punktmutationen werden kaum erfaßt
SSCP	Großer Probendurchsatz möglich	Kleiner untersuchbarer Bereich (250bp), schwierige / zeitaufwendige Temperaturoptimierung, Wahrscheinlichkeit der Mutationsdetektion 60-85%, Reproduzierbarkeit 80%
DGGE	Hohe Wahrscheinlichkeit der Mutationsdetektion	Geringer Probendurchsatz bzw. extrem hoher Arbeitsaufwand
CDGE	Im Vergl. Zu DGGE höherer Probendurchsatz bzw. geringerer Arbeitsaufwand	Im Vergl. Zu DGGE geringere Sensitivität
TTGE	Hohe Erfolgsrate, mehrere Proben pro Gel	Extra Apparatur und Software notwendig
ARMS		Nur zum Nachweis bekannter Mutationen geeignet
EMC	Mutationsort kann abgeschätzt werden	Signale ggf. sehr schwach, Hintergrund ggf. sehr hoch
PTT	Großer untersuchbarer Bereich (mehrere kb), Mutationsort kann abgeschätzt werden, gefundene Mutation wahrscheinlich pathogenetisch relevant, hohe Sensitivität, hohe Spezifität	Kleine Insertionen, kleine Deletionen und missense-Mutationen werden nicht erkannt

Weitere Vorteile des hier eingesetzten PTT sind die relativ schnell erzielbaren Ergebnisse, und der Verzicht auf radioaktive Substanzen. Die Sensitivität des nicht-radioaktiven PTT mit biotinylierter tRNA entspricht der der radioaktiven Marker ⁷¹. Die Handhabung ist einfach und der Röntgenfilm muß nur wenige Minuten exponiert werden.

Das Verfahren eignet sich besonders für Untersuchungen an Genen bzw. bei Erkrankungen bei denen eine Häufung translationsterminierender Mutationen bekannt sind oder vermutet wird. Bekannte Beispiele, für die ein PTT-Screening existiert, sind das *APC*-, *BRCA1*- / *BRCA2*- und das *DMD*-Gen ⁷⁰.

Wie bei anderen mutationsdetektierenden Verfahren muß auch eine im PTT aufgedeckte Mutation durch eine erneute Untersuchung verifiziert werden, um einen auf der Taq Polymerase beruhenden fehlerhaften Nukleotideinbau auszuschließen.

Die Frage, warum bei Verwendung von PCR-Produkt als Template kein Protein synthetisiert wurde, bleibt unbeantwortet. Mögliche Ursachen könnten eine unzureichende Bindung der RNA-Polymerase an die mittels PCR integrierte Polymerase-Erkennungssequenz, oder die Ausbildung von Sekundärstrukturen im PCR-Produkt sein, welche eine effektive Transkription verhindern. Da allerdings bei Verwendung des Boehringer-Kits nach der Transkription eine deutliche RNA-Bande detektiert werden konnte sind diese Ursachen als Grund des Problems eher unwahrscheinlich. Es kann aber sein, daß ein vorzeitiger RNA-Abbau stattgefunden hat, so daß es nicht mehr zur Translation kommen konnte. Die Stabilität der mRNA wird unter anderem durch die 3'-untranslatierte Region bestimmt. Kurzlebige mRNAs sind durch Abschnitte mit vielen Adenin- und Uracilnukleotiden, auch als AU-reiche Elemente oder Destabilisierungssequenzen bezeichnet, gekennzeichnet⁸⁸.

Aussagen zur Translation sind schwierig, da die genaue Zusammensetzung des Translationsmixes von den Firmen nicht bekannt gegeben wird. In vivo wird an das erste Nukleotid der 5'-untranslatierten Region eine 7-Methylguanosin-Kappe geknüpft. An diese Kappe bindet dann ein Komplex aus eukaryotischen Initiationsfaktoren und leistet so einen Beitrag zur Einleitung der Translation⁸⁸. Von Bedeutung ist auch die 3'-untranslatierte Region, die aus mehreren hundert Nukleotiden besteht und am Ende oft eine poly-A-Sequenz aufweist. Kappe und poly-A-Ende gelten als eine Art von natürlichem Schutz gegen den Abbau cytoplasmatischer mRNA. An das poly-A-Ende bindet das sogenannte poly-A-Bindeprotein (PABP), welches zusätzlich mit der 5'Kappe in Kontakt tritt. Ein positiver Einfluß von PABP auf die Einleitung der Translation ist bekannt⁸⁸.

Die Effizienz der Translation wird auch durch die Sequenzumgebung des Start-Codons beeinflusst. Hier befindet sich die sogenannte Kozak-Sequenz: CCRCCATGG (R=A oder G). Abweichungen von dieser Sequenz verringern die Effizienz der Translation. Die Ausbildung von Sekundärstrukturschleifen der mRNA besonders in der Nähe des 5'Endes hemmt ebenfalls die Translation⁸⁸.

Für die Translation sind also die 5' und 3'untranslatierten Regionen von entscheidender Bedeutung. Die in den PTT eingesetzte PCR- und Plasmid-DNA unterscheidet sich in genau diesen Bereichen. Die PCR-DNA enthielt zwar immer eine Kozak-Sequenz, und es wurde durch Modifikation des Downstreamprimers eine poly-A-Sequenz angefügt, aber beides führte nicht zur Proteinsynthese. Möglicherweise sind die 5' und 3'untranslatierten Regionen der PCR-DNA zu kurz, um die Anlagerung der Proteine des Translationsmixes zu ermöglichen, oder Sekundärstrukturen der mRNA verhindern dies.

In dieser Arbeit wurde immer ca. 1 µg Plasmid-DNA eines Klon in den PTT eingesetzt. Nachteile des Einsatzes von Plasmid-DNA in den PTT sind zum einen der erhöhte Arbeitsaufwand durch die Klonierung, zum anderen entspricht die Plasmid-DNA eines Bakterien-Klons nur einer Kopie der PCR. Damit ist nur eine Aussage über ein Allel möglich. Möchte man (potentielle) Tumorsuppressorgene untersuchen, benötigt man Informationen über beide Allele. Man hätte also von jedem Patient Plasmid-DNA mehrerer Klone transkribieren und translatieren müssen, um mit gewisser Wahrscheinlichkeit auch eine Aussage über das zweite Allel machen zu können. Damit hierdurch nicht der Probendurchsatz reduziert wird (mit einem Gel können fünf Proben analysiert werden) bzw. der Arbeitsaufwand zu hoch wird, kann man auch ein Plasmid-DNA-Gemisch verschiedener Klone eines Patienten in einen Reaktionsansatz pipettieren und gemeinsam in vitro transkribieren und translatieren. Wie in der Verdünnungsreihe (Abb. 4.9, Seite 49) zu erkennen ist, reichen 100ng Plasmid-DNA aus, um eine deutlich sichtbare Proteinbande zu erzeugen. Daher sollte es auch möglich sein, unter Verwendung von jeweils mindestens 100ng Plasmid-DNA mehrere Klone in einer Reaktion in vitro zu transkribieren und translatieren. Sollte ein Klon eine translationsterminierende Mutation beinhalten, so ist anhand der Verdünnungsreihe davon auszugehen, daß das synthetisierte verkürzte Protein als deutliche Bande sichtbar wird.

5.2 *GRAF*

Bei den mittels PTT untersuchten 24 Patienten konnten im *GRAF*-Gen keine translationsterminierenden Mutationen festgestellt werden. Die bei der ersten Untersuchung von Patient Nr. 17 entdeckte Nonsense-Mutation ist am ehesten auf einen fehlerhaften Nukleotideinbau durch die Taq-Polymerase zurückzuführen, da das Ergebnis bei der zweiten Untersuchung nicht bestätigt werden konnte. Ebenso liegt die Ursache der zunächst bei Patient Nr. 6 gefundenen Insertion, bzw. der Deletion bei Patient Nr. 11 vermutlich in einem Taq- oder Klonierungsfehler. Auffällig ist aber die bei fünf der 24 untersuchten Patienten gefundene Deletion von Exon 21. Das Exon 21 umfaßt die Basenpaare 1989 bis einschließlich 2099. Bei der Deletion kommt es zum Verlust der Aminosäuren 664 bis einschließlich 700. In nicht-leukämischen Zellen ist eine solche Splicevariante bisher nicht beschrieben. Die Ursache für den Verlust von Exon 21 ist nicht bekannt. In Betracht kommen Mutationen, die zu aberrierendem Spleißen führen, also Regionen betreffen, die für einen korrekten Spleißvorgang notwendig sind. Einige solcher Regionen sind bekannt,

wie die hoch konservierte 5'-Donorregion (GT), die 3'-Akzeptorregion (AG) und die 10-50bp vor der Akzeptorregion liegende Verzweigungsstelle (A) mit der Sequenz CTRAY (R= A oder G; Y= T oder C). Mutationen die den Spleißapparat betreffen sind keine Seltenheit. 9,6% der in der Human Gene Mutation Database enthaltenen Mutationen gehören zu dieser Gruppe¹⁰⁶. 62,8% dieser Mutationen betreffen Punktmutationen von nur vier Nukleotiden, nämlich die Donor- und die Akzeptorregion¹⁰⁶. Mutationen der 5'-Donorregion führen dazu, daß das vorausgehende Exon übersprungen wird, Mutationen der 3'-Akzeptorregion führen zum Verlust des nachfolgenden Exons.

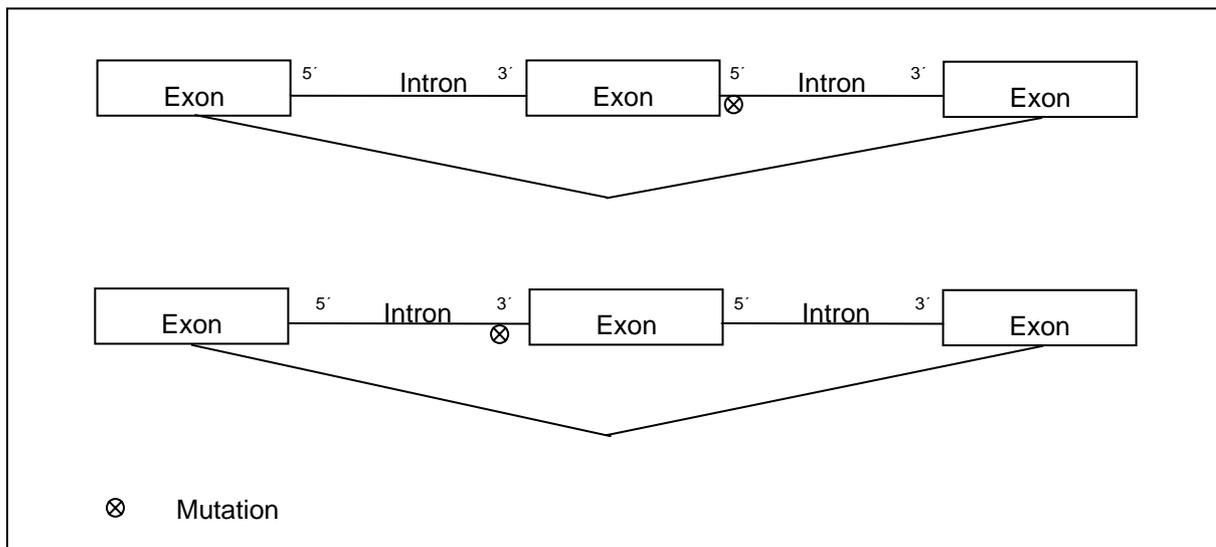
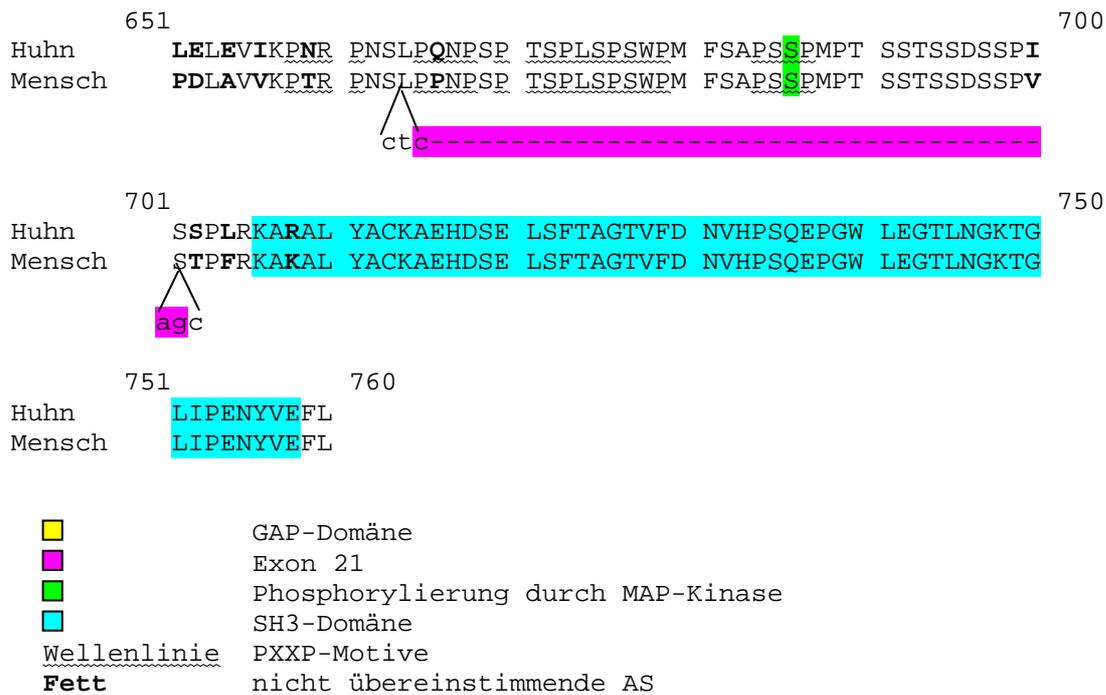


Abb. 5.1: „Exon-skipping“ durch Mutationen der Akzeptor- bzw. Donorregion¹⁰⁶.

Zum Überspringen des Exons kommt es durch die gestörte Erkennung bzw. Bindung von für den Spleißvorgang notwendigen niedermolekularen Ribonukleoproteinen an die mutierten Regionen. Ebenso können Mutationen im Bereich der Verzweigungsstelle, welche verantwortlich ist für die Ausbildung der Lariatform während des Spleißens, zum Exonverlust führen. Mutationen in anderen Intronbereichen können ebenfalls zur Destabilisierung von bestimmten Sekundärstrukturen, und damit zum Exonverlust führen. Auch Nonsense-Mutationen innerhalb eines Exons werden mit Exonverlust in Verbindung gebracht. Der zugrundeliegende Mechanismus ist bisher nicht bekannt¹⁰⁶. Die Klärung des Exon-21-Verlustes im *GRAF*-Gen bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Diese müssen anhand von genomischer DNA durchgeführt werden und die Exon 21- umgebenden Introns beinhalten. Mutmaßungen zur Beeinflussung der Funktion des Proteins durch den Exonverlust sind auch ohne genaue Kenntnis der zugrundeliegenden Mutation möglich.

Exon 21 kodiert einen Bereich der weder Anteil an der GAP-Domäne, noch an der SH3-Domäne hat, sondern einen Teil der zwischen diesen beiden Domänen liegenden Prolin-Serin reichen Region bildet. Ein Vergleich der GRAF-AS-Sequenz von Mensch und Huhn zeigt, daß der Exon 21 Bereich bis auf zwei AS identisch ist.

	1				50
Huhn
Mensch	MGLPALEFS	CCLDSPHFRE	TLKSHEAELD	KTNKFIKELI	KDGKSLISAL
	51				100
Huhn
Mensch	KNLSSAKRKF	ADSLNEFKFQ	CIGDAETDDE	MCIARSLQEF	ATVLRNLEDE
	101				150
Huhn
Mensch	RIRMIENASE	VLITPLEKFR	KEQIGAAKEA	KKKYDKETEK	YCGILEKHLN
	151				200
HuhnMFEFVEPL
Mensch	LSSKKKESQL	QEADSQVDLV	RQHFYEVSLE	YVFKVQEVQE	RKMFEFVEPL
	201				250
Huhn	LAF L QGLFTF	YHHGYELAKD	F S DFKTE L TI	SIQNTRNRFE	GTRSEVESLM
Mensch	LAF L QGLFTF	YHHGYELAKD	F G DFKT Q LTI	SIQNTRNRFE	GTRSEVESLM
	251				300
Huhn	KKMKENP H EH	KNISPYTMEG	YLYVQEKRFH	GTSWVKHYCT	YQ R ESKRITM
Mensch	KKMKENP L EH	KTISPYTMEG	YLYVQEKRFH	GTSWVKHYCT	YQ R DSKQITM
	301				350
Huhn	V P FDQKSGGK	GGEDE A VILK	SCTRRKTDSI	EKRFCFDVEA	VDRPGVITMQ
Mensch	V P FDQKSGGK	GGEDE S VILK	SCTRRKTDSI	EKRFCFDVEA	VDRPGVITMQ
	351				400
Huhn	ALSE E DRRLW	MEAMDGREPV	YNSNKDNQSE	GTAQLDSI G F	SIIKKCIHAV
Mensch	ALSE G DRRLW	MEAMDGREPV	YNSNKDSQSE	GTAQLDSI G F	SIIRKCIHAV
	401				450
Huhn	ETRGINEQGL	YRIVGVNSRV	QKLLSILMDP	KTATETETEI	CAEWEIKTIT
Mensch	ETRGINEQGL	YRIVGVNSRV	QKLLSVLMDP	KTASETETDI	CAEWEIKTIT
	451				500
Huhn	SALKTYLRML	PGPLMMYQFQ	RSFIKAAKLE	NQESRVSEIH	SLVHRLPEKN
Mensch	SALKTYLRML	PGPLMMYQFQ	RSFIKAAKLE	NQESRVSEIH	SLVHRLPEKN
	501				550
Huhn	RQMLHLLMNH	LAKVADNHKQ	NLMTVANLGV	VFGPTLLRPQ	EETVAAIMDI
Mensch	RQMLQLLMNH	LANVANNHKQ	NLMTVANLGV	VFGPTLLRPQ	EETVAAIMDI
	551				600
Huhn	KFQNIVIEIL	IENHEKIFNT	VPETPPSNSQ	LLLSRKKSTD	SKPPSCSERP
Mensch	KFQNIVIEIL	IENHEKIFNT	VPDMPLTNAQ	LHLSRKKSSD	SKPPSCSERP
	601				650
Huhn	LTLFHTA Q PN	EKQESRNSII	NSSLESVISS	NANSFLNSNS	APQSNLNSSD
Mensch	LTLFHTV Q ST	EKQEQRNSII	NSSLESVSS.	NPNSILNSSS	SLQPNMNSSD



Dies ist zunächst nicht verwunderlich, da für beide Proteine eine 90%ige Homologie bekannt ist⁵³. Auffällig ist allerdings, daß sich die Unterschiede in der AS-Sequenz nicht gleichmäßig über das Protein verteilen, sondern sich in den Exon 21 umgebenden Bereichen (die nicht zur GAP- oder SH3-Domäne gehören) konzentrieren. Diese Aussparung von Exon 21 von einer Sequenzvariabilität deutet darauf hin, daß der Exon 21 Bereich für die Funktion des gesamten Proteins ähnlich bedeutsam sein könnte, wie die GAP- oder die SH3-Domäne.

Western Blot Untersuchungen zeigten, daß GRAF in zwei verschiedenen Formen existiert, die unterschiedlich schnell und damit unterschiedlich weit im Polyacrylamidgel wandern. Bei dem langsamer wandernden Protein liegt die im Exon 21 kodierte AS Ser⁶⁸⁵ (Mensch), bzw. Ser⁵¹⁰ (Huhn; Sequenz nach Hildebrand) phosphoryliert vor. Die Phosphorylierung wird (in vitro) durch MAP Kinase katalysiert. Die unterschiedliche Wandergeschwindigkeit spricht dafür, daß die Phosphorylierung zu einer Konformationsänderung des Proteins führt⁵⁸. Ob Konformationsänderungen die Ursache der in einigen Abbildungen sichtbaren Doppelbanden sind bleibt unbeantwortet. Eine andere mögliche Erklärung für die Doppelbanden könnte eine unvollständige Translation sein, die entweder auf der Nutzung eines "falschen" Start-Codons, oder einem vorzeitigen Abbruch der Translation beruht.

Innerhalb des Exon 21 Bereiches befinden sich fünf PXXP Motive, davon sind drei überlappend. Diese Motive bilden die für die Bindung von SH3-Domänen wichtigen Sequenzen^{55,56,57}. Innerhalb der Prolin-Serin reichen Domäne befinden sich insgesamt sieben dieser Motive. Es wird vermutet, daß sich zwischen den PXXP Motiven und der

SH3-Domäne möglicherweise intramolekulare Bindungen ausbilden, die zu einer "geschlossenen" GRAF-Konformation führen. Derartige intramolekulare Bindungen zwischen einer SH3-Domäne und PXXP-Motiven wurden auch bei anderen Proteinen beschrieben¹⁰⁷. Die Phosphorylierung von Ser⁶⁸⁵ / Ser⁵¹⁰ könnte diese intramolekularen Interaktionen auflösen und so eine "offene" GRAF-Konformation mit exponierter SH3-Domäne bilden⁵⁸. Hierdurch könnte die Bindung von GRAF an SH3- bindende Proteine, wie FAK, reguliert werden⁵⁸. Auf die GAP-Aktivität hingegen hat die Phosphorylierung von Ser⁶⁸⁵ / Ser⁵¹⁰ keine signifikanten Auswirkungen^{57,58}. Aufgrund dieser Tatsachen und Überlegungen ist es durchaus denkbar, daß eine Deletion von Exon 21 Auswirkungen auf die Funktion der SH3-Domäne, und damit auf das gesamte GRAF-Protein hat. Ob dadurch Protein-Protein-Interaktionen begünstigt, erschwert oder unmöglich werden kann nur spekuliert werden. Auswirkungen auf die GAP-Aktivität erscheinen unwahrscheinlicher. Es wäre lediglich eine Beeinflussung der GAP-Domäne aufgrund der der Deletion zugrunde liegenden Konformationsänderung des Proteins möglich.

6 Zusammenfassung

Der zum Screenen von translationsterminierenden Mutationen geeignete Protein Truncation Test konnte in dieser Arbeit unter Verwendung von Plasmid-DNA als nicht-radioaktiver Protein Truncation Test etabliert werden. Verschiedene Ansätze, PCR-amplifizierte DNA ohne Klonierung direkt mittels PTT zu untersuchen, scheiterten.

Mit dem nicht-radioaktiven Protein Truncation Test wurde das *GRAF*-Gen untersucht, das möglicherweise als Tumorsuppressorgen fungiert und eine Rolle bei der Entstehung von AML und MDS spielt. Bei den 24 untersuchten Proben von Patienten mit AML wurde einmal ein vorzeitiges Stop-Codon entdeckt, das sich allerdings als Fehlinkorporation eines Nukleotids durch die Taq-Polymerase herausstellte. Bei fünf Patienten zeigte sich eine Deletion von Exon 21. In nicht-leukämischen Zellen ist eine solche Splicevariante bisher nicht beschrieben. Es liegen noch keine Daten über einen möglichen Einfluss dieser Deletion auf die Entstehung von AML / MDS, bzw. andere Erkrankungen vor. Die Klärung dieser Frage bleibt weiteren Studien vorbehalten.

Summary

In this study the Protein Truncation Test (PTT), suitable for screening translation terminating mutations, could be established as nonradioactive PTT by using plasmid-DNA. Different attempts to analyse PCR-amplified DNA directly with PTT without cloning failed. The nonradioactive PTT was used to investigate the *GRAF*-gene, which possibly acts as a tumor-suppressor gene and is supposed to be of importance in the development of AML and MDS. In 24 samples of patients with AML one premature stop-codon was discovered. However, this turned out to be a misincorporation of a nucleotide due to the Taq-polymerase. Five patients showed a deletion of exon 21. Hitherto, such a splice variant in non-leukemic cellc has not been described. As yet there is no information available concerning a possible influence of this deletion in the development of AML / MDS or other diseases. The answer to this problem has to be reserved to further studies.

7 Literatur

- 1 H. Tesch: Pathophysiologie der Hämatopoese, S. 157-160;
P. Staib, B. Lathan, V. Diehl: Leukämien, S. 165-176
In: Classen, Diehl, Kochsiek: Innere Medizin
Urban & Schwarzenberg. 1998; 4. Auflage
- 2 G. Henze: Erkrankungen des leukozytären Systems - Leukämien, S. 364-367
In: Niessen K.-H.: Pädiatrie
Chapman & Hall. 1996; 4. Auflage
- 3 T. Radaszkiewicz, M. Vesely: Blut und Knochenmark - Akute myeloische Leukämie (AML), S. 477-480;
J. Briner: Tumoren im Kindesalter - Leukämien und maligne Lymphome, S. 1034
In: Böcker, Denk, Heitz: Pathologie
Urban & Schwarzenberg. 1997
- 4 Deutsches Kinderkrebsregister
<http://www.kinderkrebsregister.de>
- 5 Paulussen M, Ahrens S, Lehnert M, Taeger D, Hense HW, Wagner A, Dunst J, Harms D, Reiter A, Henze G, Niemeyer C, Gobel U, Kremens B, Folsch UR, Aulitzky WE, Zoubek A, Jurgens H.
Second malignancies after ewing tumor treatment in 690 patients from a cooperative German/ Austrian/ Dutch study.
Ann. Oncol. 2001 Nov; 12 (11): 1619-1630.
- 6 Greene MH, Harris EL, Gershenson DM, Malkasian GD Jr, Melton LJ 3rd, Dembo AJ, Bennett JM, Moloney WC, Boice JD Jr.
Melphalan may be a more potent leukemogen than cyclophosphamide.
Ann. Intern. Med. 1986 Sep; 105 (3): 360-367.
- 7 Kaldor JM, Day NE, Pettersson F, Clarke EA, Pedersen D, Mehnert W, Bell J, Host H, Prior P, Karjalainen S, et al.
Leukemia following chemotherapy for ovarian cancer.
N. Engl. J. Med. 1990 Jan 4; 322 (1):1-6.
- 8 Pedersen-Bjergaard J, Ersball J, Sorensen HM, Keiding N, Larsen SO, Philip P, Larsen MS, Schultz H, Nissen NI.
Risk of acute nonlymphocytic leukemia and preleukemia in patients treated with cyclophosphamide for non-Hodkin´s lymphomas. Comparison with results obtained in patients treated for Hodgkin´s disease and ovarian carcinoma with other alkylating agents.
Ann. Intern. Med. 1985 Aug; 103 (2):195-200.

- 9 Smith MA, Rubinstein L, Anderson JR, Arthur D, Catalano PJ, Freidlin B, Heyn R, Khayat A, Krailo M, Land VJ, Miser J, Shuster J, Vena D. Secondary leukemia or myelodysplastic syndrome after treatment with epipodophyllotoxins. *J. Clin. Oncol.* 1999 Feb; 17 (2):569-577.
- 10 Fong CT, Brodeur GM. Down's syndrome and leukemia: epidemiology, genetics, cytogenetics and mechanisms of leukemogenesis. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1987 Sep; 28 (1):55-76.
- 11 Avet-Loiseau H, Mechinaud F, Harousseau JL. Clonal hematologic disorders in Down syndrome. A review. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 1995 Feb; 17 (1):19-24.
- 12 Alter BP, Young NS. Chapter 7-The bone marrow failure syndromes. In: Nathan DG, Orkin SH, (eds): *Hematology of Infancy and Childhood*, fifth edition. Philadelphia 1998: WB Saunders Company, pp. 237-335.
- 13 Alter BP. Fanconi's anemia and malignancies. *Am. J. Hematol.* 1996 Oct; 53 (2):99-110.
- 14 Ward AC, van Aesch YM, Schelen AM, Touw IP. Defective internalization and sustained activation of truncated granulocyte colony-stimulating factor receptor found in severe congenital neutropenia / acute myeloid leukemia. *Blood.* 1999 Jan 15; 93 (2):447-458.
- 15 Side L, Taylor B, Cayouette M, Conner E, Thompson P, Luce M, Shannon K. Homozygous inactivation of the NF1 gene in bone marrow cells from children with neurofibromatosis type 1 and malignant myeloid disorders. *N. Engl. J. Med.* 1997 Jun 12; 336 (24):1713-1720.
- 16 Beverly J. Lange: Acute myeloid leukemia in children and adolescents. In: Edward S. Henderson, T. Andrew Lister, Mel F. Greaves: *Leukemia*, 7th edition; pp. 519-527 W. B. Saunders, 2002
- 17 Deutsche Krebsgesellschaft: Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinie 2002, 3. Auflage 2002 http://www.kinderkrebsinfo.de/e1664/e1676/e4842/e5254/index_ger.html

- 18 Borkhardt A.
Molekulargenetische Untersuchungen chromosomaler Aberrationen bei hämatologischen Neoplasien im Kindesalter.
Habilitation JLU Gießen 1998
- 19 http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/IntroItems/hempat_de.html
- 20 Fearon ER, Vogelstein B.
A genetic model for colorectal tumorigenesis.
Cell. 1990 Jun 1; 61 (5):759-767.
- 21 Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL.
Genetic alterations during colorectal-tumor development.
N. Engl. J. Med. 1988 Sep 1; 319 (9):525-532.
- 22 Morag Park: Oncogenes.
In: Bert Vogelstein, Kenneth W. Kinzler:
The genetic basis of human cancer, 2nd edition; pp. 177-196
McGraw-Hill Professional, 2002
- 23 Borkhardt A.
Tumorsuppressorgene
Sonderdruck aus "Die gelben Hefte" Jg. 42, Heft 3 p. 81-90 (2002)
- 24 Knudson AG Jr
Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1971 Apr; 68 (4):820-823.
- 25 Fero ML, Randel E, Gurley KE, Roberts JM, Kemp CJ.
The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumor suppression.
Nature. 1998 Nov 12; 396 (6707):177-180.
- 26 Eric R. Fearon: Tumor-suppressor genes.
In: Bert Vogelstein, Kenneth W. Kinzler:
The genetic basis of human cancer, 2nd edition; pp. 197-206
McGraw-Hill Professional, 2002
- 27 Ammerpohl O
Mechanismen der Repression durch die CpG-Methylierung der DNA und deren Bedeutung für die gewebespezifische Genexpression in Säugern
Dissertation JLU Gießen, Juli 2000
- 28 <http://www.stiftung-behindertes-Kind.de/images/stuerz.pdf>

- 29 Soussi T, Beroud C.
Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome.
Nat. Rev. Cancer. 2001 Dec; 1 (3):233-240.
- 30 Foster BA, Coffey HA, Morin MJ, Rastinejad F.
Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function.
Science. 1999 Dec 24; 286 (5449):2507-2510.
- 31 Bykov VJ, Issaeva N, Shilov A, Hultcrantz M, Pugacheva E, Chumakov P, Bergman J, Wiman KG, Selivanova G.
Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound.
Nat. Med. 2002 Mar; 8 (3):282-288.
- 32 Nemunaitis J, Khuri F, Ganly I, Arseneau J, Posner M, Vokes E, Kuhn J, McCarty T, Landers S, Blackburn A, Romel L, Randlev B, Kaye S, Kirn D.
Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer.
J. Clin. Oncol. 2001 Jan 15; 19 (2):289-298.
- 33 Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, Arseneau J, Tannock IF, Romel L, Gore M, Ironside J, MacDougall RH, Heise C, Randlev B, Gillenwater AM, Brusco P, Kaye SB, Hong WK, Kirn DH.
A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer.
Nat. Med. 2000 Aug; 6 (8):879-885.
- 34 Mitelman F, Kaneko Y, Berger R.
(1994) in: Human Gene Mapping 1993, eds. Cuticchia AJ, Pearson PL (Johns Hopkins Univ Press, Baltimore, MD), pp 773-812
- 35 Johansson B, Mertens F, Mitelman F.
Cytogenetic deletion maps of hematologic neoplasms: circumstantial evidence for tumor suppressor loci.
Genes Chromosomes Cancer. 1993 Dec; 8 (4):205-218.
- 36 Pedersen-Bjergaard J, Rowley JD.
The balanced and the unbalanced chromosome aberrations of acute myeloid leukemia may develop in different ways and may contribute differently to malignant transformation.
Blood. 1994 May 15; 83 (10):2780-2786.
- 37 The Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia:
A prospective study of acute nonlymphocytic leukemia.
Chicago, Illinois, USA, September 2-7, 1982.
Cancer Genet. Cytogenet. 1984 Mar; 11 (3):249-360.

- 38 Samuels BL, Larson RA, Le Beau MM, Daly KM, Bitter MA, Vardiman JW, Barker CM, Rowley JD, Golomb HM.
Specific chromosomal abnormalities in acute nonlymphocytic leukemia correlate with drug susceptibility in vivo.
Leukemia. 1988 Feb; 2 (2):79-83.
- 39 Nimer SD, Golde DW.
The 5q- abnormality.
Blood. 1987 Dec; 70 (6):1705-1712.
- 40 Le Beau MM, Espinosa R 3rd, Neuman WL, Stock W, Roulston D, Larson RA, Keinanen M, Wetsbrook CA.
Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993 Jun 15; 90 (12):5484-5488.
- 41 Zhao N, Stoffel A, Wang PW, Eisenbart JD, Espinosa R 3rd, Larson RA, Le Beau MM.
Molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases to 1-1,5 Mb and preparation of a PAC-based physical map.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997 Jun 24; 94 (13):6948-6953.
- 42 Thirman MJ, Gill HJ, Burnett RC, Mbangkollo D, McCabe NR, Kobayashi H, Ziemer-van der Poel S, Kaneko Y, Morgan R, Sandberg AA, et al.
Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations.
N. Engl. J. Med. 1993 Sep 23; 329 (13): 909-914.
- 43 Hunger SP, Tkachuk DC, Amylon MD, Link MP, Carroll AJ, Welborn JL, Willman CL, Cleary ML.
HRX involvement in de novo and secondary leukemias with diverse chromosome 11q23 abnormalities.
Blood. 1993 Jun 15; 81 (12):3197-3203.
- 44 Ziemer-van der Poel S, McCabe NR, Gill HJ, Espinosa R 3rd, Patel Y, Harden A, Rubinelli P, Smith SD, Le Beau MM, Rowley JD, et al.
Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991 Dec 1; 88 (23):10735-10739.
- 45 Tkachuk DC, Kohler S, Cleary ML.
Involvement of a homolog of *Drosophila trithorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias.
Cell. 1992 Nov 13; 71 (4):691-700.

- 46 Djabali M, Selleri L, Parry P, Bower M, Young BD, Evans GA.
A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukaemias.
Nat. Genet. 1992 Oct; 2 (2):113-118.
- 47 Gu Y, Nakamura T, Alder H, Prasad R, Canaani O, Cimino G, Croce CM, Canaani E.
The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to Drosophila trithorax, to the AF-4 gene.
Cell. 1992 Nov 13; 71 (4):701-708.
- 48 Ayton PM, Cleary ML.
Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins.
Oncogene. 2001 Sep 10; 20 (40):5695-5707.
- 49 Rowley JD.
Rearrangements involving chromosome band 11q23 in acute leukemia.
Semin. Cancer Biol. 1993 Dec; 4 (6):377-385.
- 50 Schichman SA, Caligiuri MA, Gu Y, Strout MP, Canaani E, Bloomfield CD, Croce CM.
ALL-1 partial duplication in acute leukemia.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994 Jun 21; 91 (13):6236-6239.
- 51 Lochner K, Siegler G, Fuhrer M, Greil J, Beck JD, Fey GH, Marschalek R.
A specific deletion in the breakpoint cluster region of the ALL-1 gene is associated with acute lymphoblastic T-cell leukemias.
Cancer Res. 1996 May 1; 56 (9):2171-2177.
- 52 Caligiuri MA, Strout MP, Schichman SA, Mrozek K, Arthur DC, Herzig GP, Baer MR, Schiffer CA, Heinonen K, Knuutila S, Nousiainen T, Ruutu T, Block AW, Schulman P, Pedersen-Bjergaard J, Croce CM, Bloomfield CD.
Partial tandem duplication of ALL1 as a recurrent molecular defect in acute myeloid leukemia with trisomy 11.
Cancer Res. 1996 Mar 15; 56 (6):1418-1425.
- 53 Borkhardt A, Bojesen S, Haas OA, Fuchs U, Bartelheimer D, Loncarevic IF, Bohle RM, Harbott J, Repp R, Jaeger U, Viehmann S, Henn T, Korth P, Scharf D, Lampert F.
The human GRAF gene is fused to MLL in a unique t(5;11)(q31;q23) and both alleles are disrupted in three cases of myelodysplastic syndrome/ acute myeloid leukemia with deletion 5q.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000 Aug 1; 97 (16):9168-9173.

- 54 Bojesen SE, Borkhardt A.
GRAF (GTPase activating protein for Rho associated with FAK).
Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. November 2000
URL: <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/GRAFID291.html>
- 55 Cohen GB, Ren R, Baltimore D.
Modular binding domains in signal transduction proteins.
Cell. 1995 Jan 27; 80 (2):237-248.
- 56 Hildebrand JD, Taylor JM, Parsons JT.
An SH3 domain-containing GTPase-activating protein for Rho and Cdc42 associates with focal adhesion kinase.
Mol. Cell Biol. 1996 Jun; 16 (6):3169-3178.
- 57 Taylor JM, Macklem MM, Parsons JT.
Cytoskeletal changes induced by GRAF, the GTPase regulator associated with focal adhesion kinase, are mediated by Rho.
J. Cell Sci. 1999 Jan; 112 (Pt 2):231-242.
- 58 Taylor JM, Hildebrand JD, Mack CP, Cox ME, Parsons JT
Characterization of graf, the GTPase-activating protein for rho associated with focal adhesion kinase
J. Biol. Chem. 1998 Apr 3; 273 (14):8063-8070.
- 59 Longenecker KL, Zhang B, Derewenda U, Sheffield PJ, Dauter Z, Parsons JT, Zheng Y, Derewenda ZS.
Structure of the BH domain from graf and its implications for Rho GTPase recognition.
J. Biol. Chem. 2000 Dec 8; 275 (49):38605-38610.
- 60 Boguski MS, McCormick F.
Proteins regulating Ras and its relatives.
Nature. 1993 Dec 16; 366 (6456):643-654.
- 61 Ridley AJ, Hall A.
The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors.
Cell. 1992 Aug 7; 70 (3):389-399.
- 62 Olson MF, Ashworth A, Hall A.
An essential role for Rho, Rac and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1.
Science. 1995 Sep 1; 269(5228):1270-1272.
- 63 Olson MF, Paterson HF, Marshall CJ.
Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1.
Nature. 1998 Jul 16; 394 (6690):295-299.

- 64 Fuchs U.
Charakterisierung der 11q23/MLL-Fusionspartnergene GRAF und FBP17.
Dissertation JLU Gießen 2002
- 65 Fuchs U, Rehkamp G, Haas OA, Slany R, König M, Bojesen S, Bohle RM, Damm-Welk C, Ludwig WD, Harbott J, Borkhardt A.
The human formin-binding protein 17 (FBP17) interacts with sorting nexin, SNX2, and is an MLL-fusion partner in acute myelogenous leukemia.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001 Jul 17; 98 (15):8756-8761.
- 66 Mülhardt C.
Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics.
Spektrum, Akad. Verl. 2002; 3. Auflage
- 67 Roest PA, Roberts RG, van der Tuijn AC, Heikoop JC, van Ommen GJ, den Dunnen JT.
Protein truncation test (PTT) to rapidly screen the DMD gene for translation terminating mutations.
Neuromuscul. Disord. 1993 Sep-Nov; 3 (5-6):391-394.
- 68 Den Dunnen JT, van Ommen GJ.
The protein truncation test: A review.
Hum. Mutat. 1999; 14 (2):95-102.
- 69 Kirchgesser M, Albers A, Vossen R, den Dunnen J, van Ommen GJ, Gebert J, Dupont C, Herfarth C, von Knebel-Doerberitz M, Schmitz-Agheguian G.
Optimized non-radioactive protein truncation test for mutation analysis of the adenomatous polyposis coli (APC) gene.
Clin. Chem. Lab. Med. 1998 Aug; 36 (8):567-570.
- 70 Hogervorst FBL.
The Protein Truncation Test (PTT)
http://www.promega.com/pnotes/62/7807_07/7807_07_core.pdf
- 71 Hoeltke HJ, Ettl I, Strobel E, Leying H, Zimmermann M, Zimmermann R.
Biotin in vitro translation, nonradioactive detection of cell-free synthesized proteins.
BioTechniques. 1995 May; 18 (5):900-904, 906-907.
- 72 Promega Technical Bulletin No. 182
Transcend™ Non-Radioactive Translation Detection Systems
<http://www.promega.com/tbs/tb182/tb182.pdf>
- 73 Dayhoff MO.
Atlas of Protein Sequence and Structure, Suppl. 2,
National Biomedical Research Foundation, Washington (1978)

- 74 Crowley KS, Reinhart GD, Johnson AE.
The signal sequence moves through a ribosomal tunnel into a noncytoplasmatic aqueous environment at the ER membrane early in translocation.
Cell. 1993 Jun 18; 73 (6):1101-1115.
- 75 Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE.
Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture.
Nature. 1977 Nov 24; 270 (5635):347-349.
- 76 Ohta M, Furukawa Y, Ide C, Akiyama N, Utakoji T, Miura Y, Saito M.
Establishment and characterization of four human monocytoid leukemia cell lines (JOSK-I, -S, -M and -K) with capabilities of monocyte-macrophage lineage differentiation and constitutive production of interleukin 1.
Cancer Res. 1986 Jun; 46 (6):3067-3074.
- 77 Lozzio CB, Lozzio BB.
Cytotoxicity of a factor isolated from human spleen.
J. Natl. Cancer Inst. 1973 Feb; 50 (2):535-538.
- 78 Asou H, Tashiro S, Hamamoto K, Otsuji A, Kita K, Kamada N.
Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation.
Blood. 1991 May 1; 77 (9):2031-2036.
- 79 Herrmann R, Han T, Barcos MP, Lok MS, Henderson ES.
Malignant lymphoma of pre-T-cell type terminating in acute myelocytic leukemia. A case report with enzymic and immunologic marker studies.
Cancer. 1980 Sep 15; 46 (6):1383-1388.
- 80 Ziegler-Heitbrock HW, Thiel E, Futterer A, Herzog V, Wirtz A, Riethmuller G.
Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes.
Int. J. Cancer. 1988 Mar 15; 41 (3):456-461.
- 81 Steube KG, Gignac SM, Hu ZB, Teepe D, Harms D, Kabisch H, Gaedicke G, Hansen-Hagge T, Macleod RA, Quentmeier H, Drexler HG.
In vitro culture studies of childhood myelodysplastic syndrome: establishment of the cell line MUTZ-1.
Leuk. Lymphoma. 1997 Apr; 25 (3-4):345-363.
- 82 Lange B, Valtieri M, Santoli D, Caracciolo D, Mavilio F, Gemperlein I, Griffin C, Emanuel B, Finan J, Nowell P, et al.
Growth factor requirements of childhood acute leukemia: establishment of GM-CSF-dependent cell lines.
Blood. 1987 Jul; 70 (1):192-199.

- 83 Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K.
Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1).
Int. J. Cancer. 1980 Aug; 26 (2):171-176.
- 84 Stong RC, Korsmeyer SJ, Parkin JL, Arthur DC, Kersey JH.
Human acute leukemia cell line with the t(4;11) chromosomal rearrangement exhibits B lineage and monocytic characteristics.
Blood. 1985 Jan; 65 (1):21-31.
- 85 Rosenfeld C, Goutner A, Choquet C, Venuat AM, Kayibanda B, Pico JL, Greaves MF.
Phenotypic characterization of a unique non-T, non-B acute lymphoblastic leukaemia cell line.
Nature. 1977 Jun 30; 267 (5614):841-843.
- 86 Chomczynski P, Sacchi N.
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction.
Anal. Biochem. 1987 Apr; 162 (1):156-159.
- 87 Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H.
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.
Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1986; 51 Pt 1:263-273.
- 88 Knippers R.
Molekulare Genetik.
Georg Thieme Verl. 2001; 8. Auflage
- 89 Barnes WM.
PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994 Mar 15; 91 (6):2216-2220.
- 90 Cheng S, Fockler C, Barnes WM, Higuchi R.
Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994 Jun 7; 91 (12):5695-5699.
- 91 Kellogg DE, Rybalkin I, Chen S, Mukhamedova N, Vlasik T, Siebert PD, Chenchik A.
TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase.
BioTechniques. 1994 Jun; 16 (6):1134-1137.
- 92 Vogelstein B, Gillespie D.
Preparative and analytical purification of DNA from agarose.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979 Feb; 76 (2):615-619.

- 93 Sambrook J, Russel DW.
Molecular cloning: A laboratory manual. Third edition.
Cold Spring Harbor 2001
- 94 Shuman S.
Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991 Nov 15; 88 (22):10104-10108.
- 95 Shuman S.
Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase.
J. Biol. Chem. 1994 Dec 23; 269 (51):32678-32684.
- 96 Weiner MP, Costa GL, Schoettlin W, Cline J, Mathur E, Bauer JC.
Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction.
Gene. 1994 Dec 30; 151 (1-2):119-123.
- 97 Roest PA, Roberts RG, Sugino S, van Ommen GJ, den Dunnen JT.
Protein truncation test (PTT) for rapid detection of translation-terminating mutations.
Hum. Mol. Genet. 1993 Oct; 2 (10):1719-1721.
- 98 Kozak M.
Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation.
J. Biol. Chem. 1991 Oct 25; 266 (30):19867-19870.
- 99 Johnson AE, Woodward WR, Herbert E, Menninger JR.
Nepsilon-acetyllysine transfer ribonucleic acid: a biologically active analogue of aminoacyl transfer ribonucleic acids.
Biochemistry. 1976 Feb 10; 15 (3):569-575.
- 100 Rehm H.
Der Experimentator: Proteinbiochemie
G. Fischer Verl. 1997; 2. Auflage
- 101 Towbin H, Staehelin T, Gordon J.
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979 Sep; 76 (9):4350-4354.
- 102 Kyhse-Andersen J.
Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.
J. Biochem. Biophys. Methods. 1984 Dec; 10 (3-4):203-209.

- 103 Thorpe GH, Kricka LJ, Moseley SB, Whitehead TP.
Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence-monitored enzyme immunoassays.
Clin. Chem. 1985 Aug; 31 (8):1335-1341.
- 104 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977 Dec; 74 (12):5463-5467.
- 105 Jackson RJ, Standart N.
Do the poly(A)tail and 3' untranslated region control mRNA translation?
Cell. 1990 Jul 13; 62 (1):15-24.
- 106 Stylianou E, Antonarakis, Michael Krawczak, David N. Cooper: The nature and mechanisms of human gene mutation.
In: Bert Vogelstein, Kenneth W. Kinzler:
The genetic basis of human cancer, 2nd edition; pp. 7-41
McGraw-Hill Professional, 2002
- 107 Mayer BJ
SH3 domains: complexity in moderation.
J. Cell Sci. 2001 Apr; 114 (Pt 7): 1253-1263.

8 Erklärung

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

Heike Mettal

9 Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben eine Reihe von Personen beigetragen, bei denen ich mich nun herzlich bedanken möchte.

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Arndt Borkhardt für die Bereitstellung des Themas und der dafür notwendigen Mittel, sowie seine Unterstützung bei der Umsetzung dieser Arbeit danken.

Die Versuche wurden im onkogenetischen Labor des Zentrums für Kinderheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. In meiner täglichen Laborarbeit wurde ich durch Rat und Tat unterstützt von Dr. Christine Damm-Welk, Dr. Monika Wilda, Dr. Susanne Viehmann, Dr. Gönni Rehkamp, Cathrin Link und Dr. Dominique Bartelheimer. Besonderer Dank gilt Frau Claudia Keller für die gute Einarbeitung und die Durchführung der Mutagenesearbeiten, Frau Irmgard Klose für die konstruktive Kritik und ihre Anregungen bei der schriftlichen Ausarbeitung, und schließlich Frau Dr. Uta Fuchs, die immer mit kompetentem Rat zur Seite stand.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. W.-D. Ludwig für die Zusendung einer zweiten Patientenprobe, die es ermöglichte, die Ergebnisse der ersten Untersuchung bei Patient Nr. 17 zu überprüfen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern für ihre umfangreiche Unterstützung und Geduld, und meinen Schwestern für die Hilfe bei der Bewältigung von EDV-Problemen.

10 Anhang**10.1 GRAF-Sequenz**

GenBank Accession Y10388.

```
1   gcaccatggg gctcccagcg ctcgagttca gcgactgctg cctcgatagt ccgcacttcc
61  gagagacgct caagtgcac gaagcagagc tggacaagac caacaaattc atcaaggagc
121 tcatcaagga cgggaagtca ctcataagcg cgctcaagaa tttgtcttca gcgaagcgga
181 agtttgcaga ttccttaaat gaatttaaat ttcagtgcac aggagatgca gaaacagatg
241 atgagatgtg tatagcaagg tctttgcagg agtttgcac tgtcctcagg aatcttgaag
301 atgaacggat acggatgatt gagaatgcca gcgaggtgct catcactccc ttggagaagt
361 ttcgaaagga acagatcggg gctgccaagg aagccaaaaa gaagtatgac aaagagacag
421 aaaagtattg tggcatctta gaaaaacact tgaatttgtc ttccaaaaag aaagaatctc
481 agcttcagga ggcagacagc caagtggacc tggtcgggca gcatttctat gaagtatccc
541 tggaaatatgt cttcaaggtg caggaagtcc aagagagaaa gatgtttgag tttgtggagc
601 ctctgctggc cttcctgcaa ggactcttca ctttctatca ccatggttac gaactggcca
661 aggatctcgg ggacttcaag acacagttaa ccattagcat acagaacaca agaaatcgct
721 ttgaaggcac tagatcagaa gtggaatcac tgatgaaaaa gatgaaggag aatccccttg
781 agcacaagac catcagtccc tacacatgag agggatacct ctacgtgcag gagaaacgtc
841 actttggaac ttcttggtg aagcactact gtacatatca acgggattcc aaacaaatca
901 ccatggtacc atttgaccaa aagtcaggag gaaaaggggg agaagatgaa tcagttatcc
961 tcaaactctg 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 tgcatccatg
1201 ctgtggaaac cagagggatc aacgagcaag ggctgtatcg aattgtgggg gtcaactcca
1261 gagtgcagaa gttgctgagt gtctctgatg accccaagac tgcttctgag acagaaacag
1321 atatctgtgc tgaatgggag ataaagacca tcactagtgc tctgaagacc tacctaagaa
1381 tgcttccagg accactcatg atgtaccagt ttcaaagaag tttcatcaaa gcagcaaac
1441 tggagaacca ggagtctcgg gtctctgaaa tccacagcct tgttcatcgg ctcccagaga
1501 aaaatcggca gatgttacag ctgctcatga accacttggc aaatgttgct aacaaccaca
1561 agcagaatth gatgacggtg gcaaacctg gtgtggtggt tggaccact ctgctgaggc
1621 ctcaggaaga aacagtagca gccatcatgg acatcaaatt tcagaacatt gtcattgaga
1681 tcctaataga aaaccacgaa aagatattta acaccgtgcc cgatatgctt ctaccaatg
1741 ccagctgca cctgtctcgg aagaagagca gtgactccaa gccccgtcc tgcagcgaga
1801 ggcccctgac gctcttccac accgttcagt caacagagaa acaggaacaa aggaacagca
1861 tcatcaactc cagtttggaa tctgtctcat caaatccaaa cagcatcctt aattccagca
1921 gcagettaca gccaacatg aactccagtg acccagacct ggctgtggtc aaaccacc
1981 ggccaactc actcccccg aatccaagcc caacttcacc cctctcgcca tcttggcca
2041 tgttctcggc accatccagc cctatgcca cctcatccac gtccagcgac tcatccccg
2101 tcagcacacc gttccggaag gcaaaagcct tgtatgcctg caaagctgaa catgactcag
2161 aactttcggt cacagcaggc acggtcttcg ataatgttca cccatctcag gagcctggct
```

2221 ggttgagg gactctgaac ggaaagactg gcctcatccc tgaaaattac gtggagttcc
2281 tctaaaccgtg ggccccagca gaactgctga gctttacatg gtatccatga caactgctga
2341 ttccagtgtc gaggccattt ctctttgcca ctgagaaatg cagcgtgact gactctgttg
2401 ctacctgtca acatgaatgt ttctgtgagc tctgggtgtca ctcatctcca tgatcatctc
2461 agccaacatg catcagtact gcaagaaaag aagtcaatca gcagaggaga gcatttgata
2521 actaagagga agacttgcaa agccgttttc tcatgagtac cctgaatagg gggcactcat
2581 tttgtttcaa cgggtccaaac gcccaacctt cagaaagagg aagtcagata gaaatagtcc
2641 ctgagagcac actgtgtagc taagcctgct ggggctgggt gaagaaattg gcgctgagat
2701 ccaggctgga tccattgctt ttgtttacaa taggcactct ctctacccca cctctcagta
2761 attgagaatt aaagtgtac aggcagctgg atatgtttgc atgcaggatg aagagggtta
2821 aaacactgtt tatataagat ccaatttttc accattttta aagcagccgt tggcctgtca
2881 tcagtgagat acaatccagt tttttcatgc acgggaacac acacaccctg cgtttttccc
2941 tcccagggtta ggaacttttc tgccaccaag ggctgcatc catcgcttag taaccacggc
3001 aaccaacct actctaaaac caaaccaaaa aaataaaata acacatcctc tttgcatgac
3061 acattttttt tctccccttt ttggtacact ttttttgaat ggttttctaa caacttgaag
3121 cacaggatca aggaattagg gtggtctact tgaggcagat ggg

Kodierende Sequenz: 6-2285

10.2 GRAF-Protein

GenBank Accession: CAA71414.

1 mglpalefsd cldspfhre tlksheaeld ktnkfikeli kdgkslial knlssakrkf
61 adslnefkfq cigdaetdde mciarslqef atvlrnlede rirmienase vlitplekfr
121 keqigaakea kkkydketek ycgilekhln lsskkkesql qeadsqvdlv rqhfyevsle
181 yvfkvqevqe rkmfefvepl laflqglftf yhhgyelakd fgdfktqkti siqntrnrfe
241 gtrseveslm kkmkenpleh ktispytmeg ylyvqekrhf gtswvkhycy yqrdskqitm
301 vpfdqksggk ggedesvilk sctrrktdsi ekrfcfdvea vdrpgvitmq alsegdrllw
361 meamdgrepv ynsnkdsqse gtaqldsigf siirkcihav etrgineqgl yrivgvnsrv
421 qkllsvlmdp ktasetetdi caeweiktit salktylrml pgplmmyqfq rsfikaakle
481 nqesrvseih slvhrlopekn rqmlqlmnh lanvannhkq nlmtvanlgv vfgptllrpq
541 eetvaaimdi kfqnivieil ienheki fnt vpdmpltnaq lhlsrkkssd skppscserp
601 ltlfhtvqst ekqeqrnsii nsslesvssn pnsilnssss lqpnmnsdp dlavvkptrp
661 nslppnpspt splspswpmf sapsspmpst stssdsspvs tpfrkakaly ackaehdsel
721 sftagtvfdn vhpsqepgwl egtlngktgl ipenyvefl

10.3 Puffer, Lösungen und Medien

PBS	137mM NaCl 2,7mM KCl 10mM Na ₂ HPO ₄ 2mM KH ₂ PO ₄	Roth Sigma Merck Sigma
1 × TAE	40mM Tris-acetat 1mM EDTA	Roth Sigma
5 × Blaumarker	62,5µg Bromphenolblau 28,7ml Glycerin 25g SDS 5ml 0,5M EDTA pH 8,0 16,3ml H ₂ O	Sigma Sigma Sigma Sigma
Luria-Bertani-Medium	10g Bacto-Trypton 5g Bacto-Hefeextrakt 10g NaCl auf 1000ml H ₂ O, pH 7,0 mit NaOH autoklaviert	Sigma Sigma Roth Merck
Agarplatten	500ml LB-Medium 7,5g Bacto-agar 0,6ml Ampicillin (50mg/ml)	Roth Sigma
SDS-Auftragslösungen	a) b) 62,5mM Tris-HCl, pH 6,8 25% Glycerin 2% SDS 0,01% Bromphenolblau 5% β-Mercaptoethanol	Boehringer Roth Sigma Sigma Sigma Sigma
Tris-Glycine- Elektrophoresepuffer	25mM Tris 250mM Glycine 0,1% SDS pH 8,3	Roth Sigma Sigma
Towbin Transferpuffer	25mM Tris 192mM Glycine pH 8,3 autoklaviert	Roth Sigma
TBS	50mM Tris base 150mM NaCl pH 7,5 mit HCl autoklaviert	Roth Roth Merck
TBST	TBS mit 0,1% Tween [®] 20	Sigma

10 × TBE	0,9M Tris	Roth
	0,9M Borsäure	Merck
	20mM EDTA	Sigma

10.4 Oligonukleotide (5' → 3')

Heike-G up-Prom	GGA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAA CAG ACC ACC ATG GGG CTC CCA GCG CTC GAG TTC AG
Heike-G up-Prom-Neu	GCA TAG CCG AAC TCT GGA ACG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAA CAG ACC ACC ATG GGG CTC CCA GCG CTC GAG TTC AG
S18A do KSP 1 int	GGC ATT CTC AAT CAT CCG TAT CCG TTC ATC
S20 do KSP 1 int	TGT GTT CTG TAT GCT AAT GGT TAA CTG T
Graf 1400 Not 1 do	TTT GAA ACT GGT ACA TCA TGA GTG GTC CT
Graf-Heike do ex	GAA CAA GGC TGT GGA TTT CAG AGA C
Graf-Heike do int	ACT CCT GGT TCT CCA GTT TTG CTG C
Heike-Neu down int	TTT TTT TTT TTT TTT TTA CTC CTG GTT CTC CAG TTT TGC TGC
Heike-2 neu dow-int	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT AAT TAA CTC CTG GTT CTC CAG TTT TGC TGC
Stig c16 up Not I	GCA GCG GCC GCA TGG GGC TCC CAG CGC TCG AGT TCA GCG
Graf Start EcoR I neu II	GCA GAA TTC GGC ACC ATG GGG CTC CCA GCG CTC
Graf Poststop Ksp I do	GCA CCG CGG CCT CGA CAC TGG AAT CAG CAG TTG TCA
G9 downstream Not I	GCA GCG GCC GCT TAG AGG AAC TCC ACG TAA TTT TCA
Stig 16 up	ATG GGG CTC CCA GCG CTC GAG TTC AGC G
GrafpostStop do	CCT CGA CAC TGG AAT CAG CAG TTG TCA TGG
G9 down	GGT TAG AGG AAC TCC ACG TAA TTT TCA
K.up ex	TTC TGA GTA CGA CGA ACA GTT CC
K. down ex	GAT CTG AGG GTG TCC AAC AGG TC
K. up int	TTG CCC TCT ATA AGC CTC ATC TG
K. down int	TGA TGA AAT TGT GGG CTC TTC CGG
T. up ex	TAC ACC ATG GAG GGA TAC CTC TAC
T. down ex	ATA ACC CCT GGC CTG TCT ACT GC
T. up int	GTG CAG GAG AAA CGT CAC TTT GG
T. down int	CAA AAC CTC TTC TCA ATG GAG TCT G
N. up ex	CTC TTC CAC ACC GTT CAG TCA ACA G
N. down ex	TTG CCT TCC GGA ACG GTG TGC TG
N. up int	GAA ACA GGA ACA AAG GAA CAG CAT C
N. down int	GCT GGA CGT GGA TGA GGT GGG C
Stop 1611 up	GTG TTT GGA CCC ACT TAA CTG TGA CTG AGG CCT CAG
Stop 1611 do	CTG AGG CCT CAG TCA CAG TTA AGT GGG TCC AAA CAC
1896 up	CCA AAC AGC ATC CTT TAA AAT TGA TCC AGC AGC AGC
1896 do	GCT GCT GCT GGA TCA ATT TTA AAG GAT GCT GTT TGG
M 13 forward (-20)	GTA AAA CGA CGG CCA G
M 13 reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
SP6	GAT TTA GGT GAC ACT ATA G
Useq 474 up	GAA TCT CAG CTT CAG GAG GCA G
Useq 866 up	CTA CTG TAC ATA TCA ACG GGA TTC C
AF5-4 int up	ACA TTG TCA TTG AGA TCC TAA TAG AAA ACC ACG
ABL ex up	CCA GTA GCA TCT GAC TTT GAG CCT
ABL int up	TGA GTG AAG CCG CTC GTT GGA ACT
ABL ex down	CCA GAC TGT TGA CTG GCG TGA TGT
ABL int down	TTC ACA CCA TTC CCC ATT GTG ATT

10.5 Plasmide

10.5.1 pcDNA3: 5446 Nukleotide

CMV Promotor: Basen 209-863

T7 Promotor: Basen 864-882

Multiple Klonierungsstelle: Basen 889-994

SP6 Promotor: Basen 999-1016

BGH Poly A: Basen 1018-1249

SV40 Promotor: Basen 1790-2115

SV40 Replikationsstartpunkt: Basen 1984-2069

Neomycinresistenz offenes Leseraster: Basen 2151-2945

SV40 Poly A: Basen 3000-3372

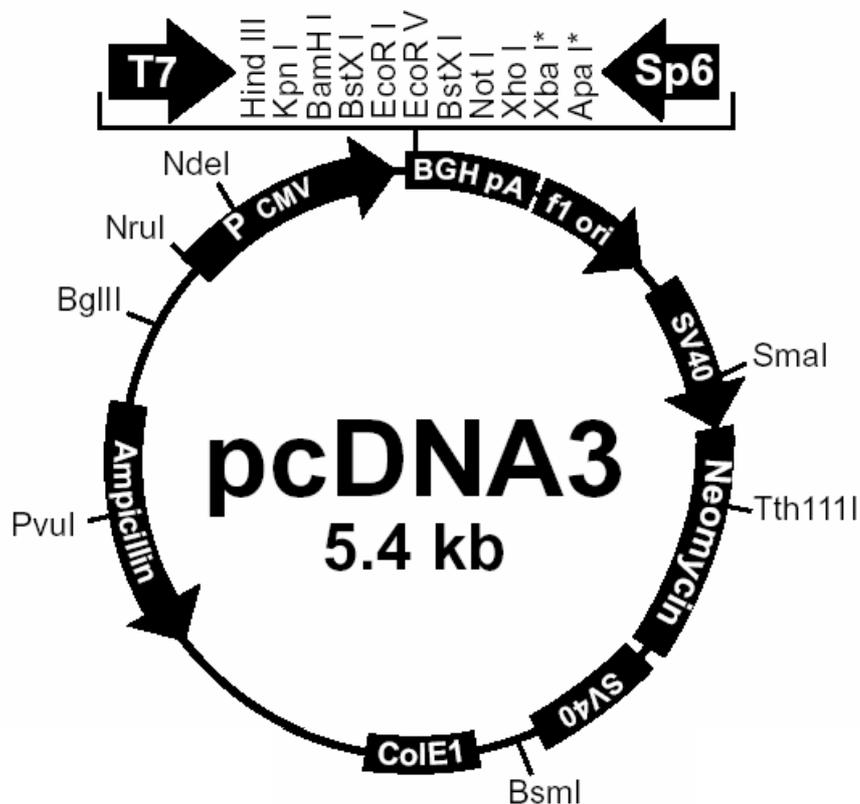
ColE1 Replikationsstartpunkt: Basen 3632-4305

Ampicillinresistenz offenes Leseraster: Basen 4450-5310

* ATG upstream von *Xba* I

Abbildung und Informationen bezogen über:

[www://invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcdna3.pdf](http://www.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcdna3.pdf)



10.5.2 pCR®II-Topo®: 3950 Nukleotide

LacZ α Gen: Basen 1-588

M13 Reverse Primerregion: Basen 205-221

SP6 Promotor: Basen 239-256

Multiple Klonierungsstelle: Basen 269-399

T7 Promotor: Basen 406-425

M13 (-20) Forward Primerregion: Basen 433-448

M13 (-40) Forward Primerregion: Basen 453-468

f1 Replikationsstartpunkt: Basen 590-1004

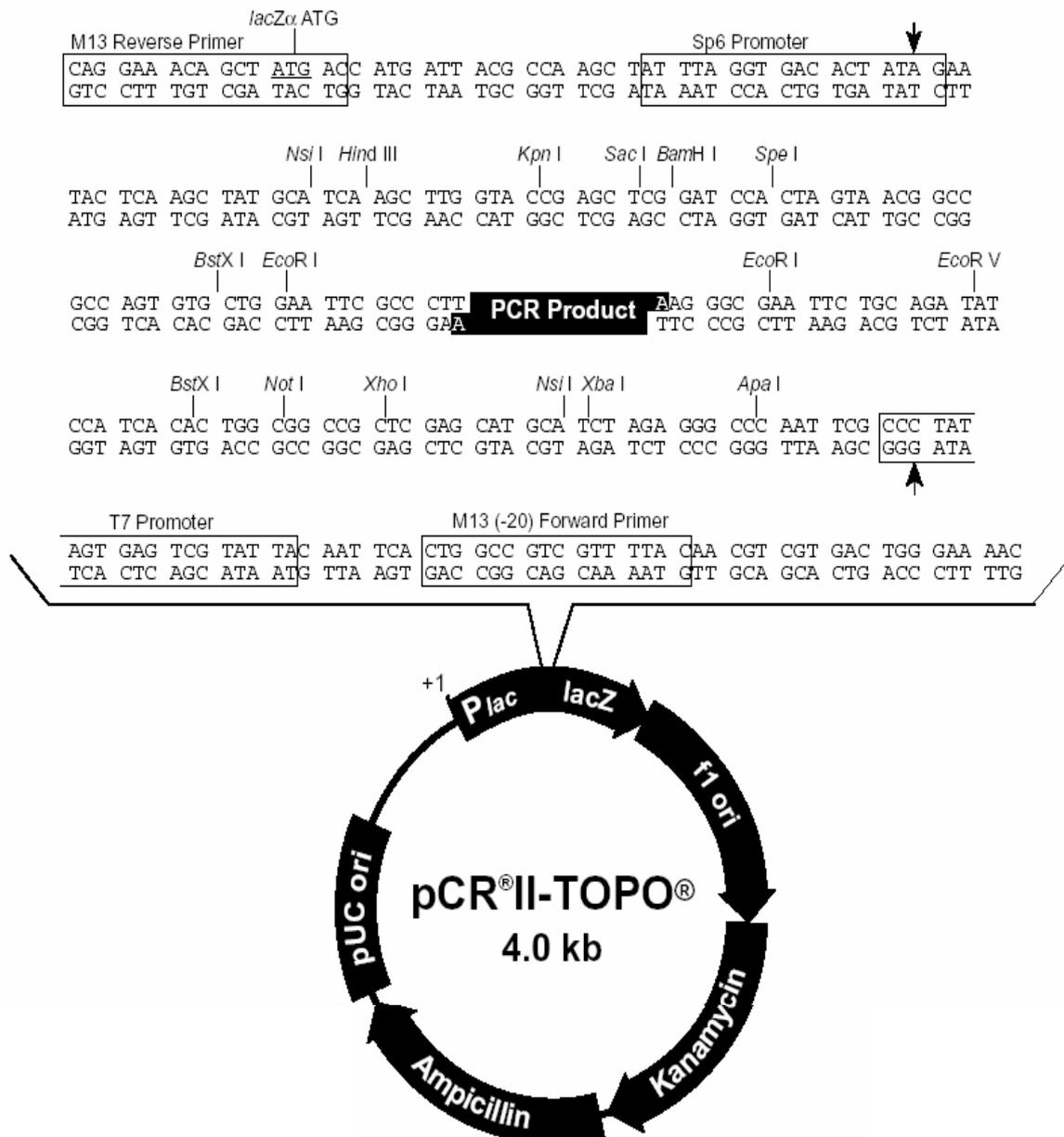
Kanamycinresistenz offenes Leseraster: Basen 1338-2132

Ampicillinresistenz offenes Leseraster: Basen 2150-3010

pUC Replikationsstartpunkt: Basen 3155-3828

Abbildung und Angaben bezogen über:

[www:// invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcriitopo_map.pdf](http://www.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcriitopo_map.pdf)



10.6 Bakterienstämme

Epicurian Coli[®] SoloPack[®] Gold supercompetent cells
 Genotyp: *Tet^R Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F'proAB lac^qZΔM15 Tn10 (Tet^R) Amy Cam^R]* Stratagene

Epicurian Coli[®] XL-1 Blue supercompetent cells
 Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'pro AB lac^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)f]* Stratagene

TOP10F'cells
 Genotyp: *F' {lacI^q Tn10 (Tet^R) } mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG* Invitrogen

10.7 Kits

High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche
GeneAmp [®] XL PCR Kit	Perkin Elmer
Advantage [®] cDNA PCR Kit	Clontech
GFX [™] PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham
E.Z.N.A. [®] Plasmid Miniprep Kit I	PeqLab
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen
QuikChange [™] Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Protein Truncation Test, nonradioactive	Boehringer
TNT [®] Quick Coupled Transcription/ Translation Kit	Promega
BM Chemiluminescence Blotting Kit (Biotin/ Streptavidin)	Boehringer
ABI PRISM [™] Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer

10.8 Sonstiges

TRIzol [®]	Invitrogen
SOC-Medium	Invitrogen

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Mettal
Vorname: Heike
Geburtsdatum: 18.02.1976
Geburtsort: Braunfels
Eltern: Helmut und Gudrun Mettal, geb. Habiger

Schulbildung

1982-1986 Grundschule in Oberbiel
1986-1992 Eichendorff-Gesamtschule in Wetzlar-Dalheim
1992-1995 Goetheschule, gymnasiale Oberstufe in Wetzlar
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

10/1995-2002 Studium der Medizin an der
Justus-Liebig-Universität in Gießen
09/1997 Ärztliche Vorprüfung
Note: befriedigend
08/1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Note: gut
09/2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Note: gut
04/2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Note: sehr gut

Praktische Erfahrungen

1998 Famulatur Chirurgie, Universitätsklinikum Gießen
1998 Famulatur Innere Medizin, Universitätsklinikum Gießen
1999 Famulatur Anästhesiologie, Krankenhaus Ehringshausen
2000 Praxisfamulatur Pädiatrie in Wetzlar
04/2001-03/2002 Praktisches Jahr im Klinikum Wetzlar-Braunfels
Wahlfach: Anästhesiologie

Ärztliche Tätigkeit

Seit 10/2002 Klinik für Anästhesiologie und Transfusionsmedizin
Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin
Universitätsklinikum Tübingen
Seit 04/2004 approbierte Ärztin