

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik
- Onkologie, Hämatologie, Knochenmarktransplantation mit der Sektion
Pneumologie -
des Universitätsklinikum Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer

**Identifikation und Charakterisierung neuer *ETV6*-assoziierter
Translokationen bei drei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie**

Promotion

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
vorgelegt von
Hannah Luisa Gorre
Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 15.12.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Professor Dr. Dr. Judith Dierlamm

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. E. Yekebas

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD. Dr. Petra Algenstedt

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	4
1 EINLEITUNG	6
1.1 Chromosomale Veränderungen bei malignen Erkrankungen	6
1.1.1 Geschichtlicher Überblick.....	6
1.1.2 Chromosomale Aberrationen	7
1.2 Veränderungen bei hämatologischen Erkrankungen.....	8
1.3 <i>ETV6</i> -Gen.....	10
1.3.1 Das <i>ETV6</i> -Gen.....	10
1.3.2 Das <i>ETV6</i> -Protein und seine Funktion.....	12
1.3.3 <i>ETV6</i> -Veränderungen und Einfluss auf die Onkogenese.....	13
2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	18
3 MATERIAL UND METHODEN	20
3.1 Patientenkollektiv.....	20
3.2. Reagenzien von FISH.....	22
3.2.1 Verwendete Sonden.....	24
3.2.2 Herstellung der Blockingreagentien	24
3.2.3 Verwendete Antikörper.....	24
3.2.4 Hybridisierungslösungen.....	25
3.2.5 Eindeckungslösung (Mounting medium)	25
3.3. Molekularbiologisches Material.....	25
3.3.1 Extraktion von RNA.....	25
3.3.2 Synthese von cDNA.....	25
3.3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	25

INHALTSVERZEICHNIS

3.3.4 Klonierung	26
3.3.5 Extraktion der DNA Plasmide.....	27
3.3.6 Agarosegel	27
3.3.7 Sequenzierung	28
3.4 Verwendete Geräte	28
3.5 Methoden.....	29
3.5.1 FISH.....	29
3.5.1.1 Vorbereitung und Fixierung der Zellen auf dem Objektträger	30
3.5.1.2 Vorbehandlung der Ziel-DNA.....	31
3.5.1.3 Verwendete DNA-Sonden	32
3.5.1.4 Hybridisierung.....	33
3.5.1.5 Detektion und Signal-Amplifikation	34
3.5.1.6 Auswertung	36
3.5.2 Polymerase-Ketten-Reaktion	37
3.5.2.1 Beschreibung des Verfahrens der Polymerase-Ketten-Reaktion	37
3.5.2.2 RT PCR (Reverse Transkriptase PCR)	39
3.5.2.3 RACE (rapid amplification cDNA ends)-PCR.....	39
3.5.2.4 Extraktion der RNA.....	43
3.5.2.5 Synthese der cDNA	43
3.5.3 KLONIERUNG	44
3.5.3.1 Gewinnung der Plasmid-DNA.....	44
3.5.3.2 Ligation	45
3.5.3.3 Transformation	45
3.5.3.4 Agar Platten.....	46
3.5.3.5 Extraktion der Plasmid-DNA.....	46
3.5.3.6 Agarosegel	46
3.5.3.7 Purifikation der DNA aus dem Agarosegel	46
3.5.3.8 Purifikation der PCR-Produkte.....	47
3.5.4 Sequenzierung	47
4 ERGEBNISSE	49
4.1 Detektion von Veränderungen des <i>ETV6</i> -Gens mittels FISH	49
4.1.1 Nachweis der Deletion des <i>ETV6</i> -Gens mittels FISH	51

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

4.1.2 Nachweis der Additionen des <i>ETV6</i> -Gens mittels FISH.....	51
4.1.3 Nachweis der Translokationen des <i>ETV6</i> -Gens mittels FISH	51
4.2 Molekulare Charakterisierung der neue <i>ETV6</i> -Translokationen	52
4.2.1 Translokation t(3;12)(q21;p13).....	52
4.2.2 Translokation t(2;12)(p21;p13).....	53
4.2.3 Inversion inv(12)(p13;q24)	56
4.2.4 Identifizierung der Partnergene des <i>ETV6</i> -Gens bei der t(2;12) und inv(12)	58
4.2.4.1 inv(12)(p13;q24)	58
4.2.4.2 t(2;12)(p21;p13).....	60
5 DISKUSSION	62
6 ZUSAMMENFASSUNG.....	72
7 LITERATUR.....	74
8 ANHANG	88
8.1 Verwendete Primer	88
8.2 Tabellenverzeichnis	89
8.3 Abbildungsverzeichnis	90
8.4 Danksagung	91
8.5 Lebenslauf	92
8.6 Eidesstattliche Versicherung	94

Abkürzungsverzeichnis

<i>ABL1</i>	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
Add	Addition
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
<i>BCR</i>	Breakpoint cluster region
bp	Basenpaare
cDNA	Copy Desoxyribonukleinsäure
<i>CDX</i>	Caudal type homeobox transcription factor 2
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMML	Chronisch myelo-monozytäre Leukämie
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DNA	Desoxribonukleinsäure
dCTP	Desoxycythintriphosphat
DBD	ETS DNA bindende Domäne
del	Deletion
der	Derivativ
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ETS	E26 transforming specific
ETS-1	Erythroblastosis Virus E 26 oncogene
<i>ETV-6</i>	ETS variant gene 6
<i>EVI-1</i>	Ectropic viral integration site 1
<i>FGFR-3</i>	Fibroblast growth factor receptor 3
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FLI1	Friend Leukemia virus integration 1
g	Gramm
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
h	Stunde
HDAC	Histone-Deacetylasen
HLH	Helix-loop-helix
<i>IGH</i>	Immoglobulin Schwereketten
IL-3	Interleukin 3
Inc	incomplete
inv	Inversion
ISH	In situ Hybridisierung
JAK-2	Januskinase 2
kb	Kilobasen
L	Liter
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MDS-1	Myelodysplasia Syndrome 1 protein
mM	Millimolar
ml	Milliliter
MLL	Mixed lineage Leukemia
<i>MN-1</i>	Meningioma1
min	Minute
M	Molar

1 EINLEITUNG

mm	Millimeter
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
<i>MYC</i>	Myelocytomatosis viral oncogene homologe
NTRK-3	Neurotrophic tyrosine kinase 3
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDGPRS	Platelet derived growth factor
PTK	Proteintyrosinkinase
RNA	Ribonukleinsäure
RUNX1	Runt related transcription factor
RPN-1	Ribophorin 1
rpm	Rounds per minute
SYK	Spleen tyrosine kinase
Tab	Tabelle
<i>TEL</i>	Translokation ETS like Leukemia
dTTP	Desoxytymidintriphosphat
u.a.	unter anderem
µl	Mikroliter
uv	Ultra violett
wt	Wildtyp
YAC	Yeast artificial Chromosome
z.B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

1.1 Chromosomale Veränderungen bei malignen Erkrankungen

1.1.1 Geschichtlicher Überblick

Die Anfänge der Tumorzytogenetik reichen bis in das 19. Jahrhundert zurück. Der Forscher J. Arnold konnte bereits 1879 zum ersten Mal Mitoseanomalien in Tumorzellen beobachten [3]. Bereits 1890 berichtete der deutsche Pathologe David von Hansemann von auffälligen Kernveränderungen und gestörten Teilungsfiguren in Schnittpräparaten von Karzinomen und vermutete, dass zwischen diesen Veränderungen und der Entstehung von malignen Tumoren ein Zusammenhang bestehen könnte [3;43]. Ein Vierteljahrhundert später griff der deutsche Zoologe Theodor Boveri diese Vorstellungen auf und formulierte unter Hinzunahme eigener Beobachtungen in seiner Arbeit „Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren“ die sogenannte "Chromosomenhypothese" der Tumorentstehung [12]. In dieser Arbeit stellte er 1914 die These auf, dass Veränderungen im Chromosomensatz einer Zelle die Voraussetzung für den Übergang von normalem Wachstum zu maligner Proliferation seien. Bis die technischen Voraussetzungen geschaffen waren, um die "Chromosomenhypothese" der Tumorentstehung zu überprüfen, mussten erst einige Jahrzehnte vergehen. Ein neues Verfahren stellte die hypothetische Behandlung der Zellen dar, dadurch konnte 1956 erstmals durch Tjio und Levan die korrekte Chromosomenzahl des Menschen bestimmt werden [129]. Ein entscheidender Fortschritt in der Zytogenetik wurde 1960 durch Nowell und Hungerford mit dem sogenannten "Philadelphia-Chromosom" erreicht. Nowell und Hungerford fanden mit dem "Philadelphia-Chromosom" die erste Chromosomenanomalie, die für eine menschliche Leukämie als charakteristisch gelten konnte [80;129]. Der Name wurde nach dem Ort gewählt, in dem die amerikanischen Forscher ihre bahnbrechende Entdeckung gemacht hatten. Sie beschrieben zum ersten Mal eine spezifische Chromosomenveränderung bei einer malignen Erkrankung. Sie entdeckten, dass in Knochenmarkszellen von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) sehr häufig ein kleines Chromosom auftrat, das normalerweise im menschlichen Chromosomensatz nicht zu finden war. Das Philadelphia-Chromosom blieb recht lange das einzige Beispiel für eine charakteristische Chromosomenanomalie, die bei

1 EINLEITUNG

einer menschlichen Tumorerkrankung so regelmäßig auftrat, dass man sie mit der Entstehung der Erkrankung in Verbindung bringen konnte. Ein weiterer Fortschritt in der Zytogenetik wurde 1970/71 durch die Einführung der Bänderungstechnik erreicht. Die Anwendung der Bänderungstechniken, die eine Identifizierung einzelner Chromosomen und Chromosomenabschnitte ermöglicht, führte dazu, dass Janet Rowley 1973 das Philadelphia-Chromosom als ein verkürztes Chromosom 22 identifizierte [105]. Dabei zeigte sich aber auch, dass das am Chromosom 22 fehlende Stück nicht verloren ging, sondern an den langen Arm eines Chromosoms 9 transloziert wurde. Im Laufe der Jahre wurden mit verbesserten Bänderungstechniken eine Vielzahl von spezifischen Chromosomenaberrationen entdeckt, die mit der Entstehung und Entwicklung von Tumoren beim Menschen in Zusammenhang stehen [105;106].

1.1.2 Chromosomale Aberrationen

Der Zusammenhang zwischen bestimmten chromosomalen Translokationen und Subtypen der Leukämie und Lymphome führte zu der Entwicklung von Techniken, die eine genauere Identifikation von chromosomalen Veränderungen erlauben [73;112]. Zu den bei der Tumorgenese massgeblich beteiligten genetischen Strukturen gehören die Protoonkogene und die Tumorsuppressorgene. Tumorzellen unterscheiden sich von ihren normalen Vorläuferzellen durch genetische Aberrationen, die vor allem Wachstumsregulatoren betreffen. Dazu gehören Protoonkogene, die an der Regulation des Zellzyklus, der Zellteilung und Zelldifferenzierung wesentlich beteiligt sind. Protoonkogene kodieren u.a. für Zytokine, Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren und Transkriptionsfaktoren. Onkogene sind die entsprechend genetisch veränderten Äquivalente zu Protoonkogenen. Onkogene begünstigen über eine Steigerung ihrer Aktivität („gain of function“) die Proliferation von Zellen. Tumorsuppressorgene sind ebenfalls an einer Vielzahl von zellulären Prozessen, wie Zellzyklus, Zelldifferenzierung, Apoptose oder Reparatur der DNA beteiligt. Tumorsuppressorgene wirken aber durch negative Wachstumsregulierung auf die Zellen, sodass die Proliferation der Zellen bei Verlust der Tumorsuppressorgene, durch einen Funktionsverlust („loss of function“) der hemmenden Wirkung induziert wird [13;131].

1 EINLEITUNG

Auf chromosomaler Ebene werden verschiedene Mechanismen unterschieden, die innerhalb der malignen Transformationen von Bedeutung sind und die genannten Genklassen involvieren. Im Folgenden sollen einige Beispiele genannt werden:

Deletionen:

Deletionen beschreiben den Verlust von chromosomalem Material. Deletionen verursachen häufig den Verlust von Tumorsuppressorgenen [109].

Inversionen:

Bei der Inversion kommt es zu einem Bruch eines Chromosomenabschnittes mit anschließender Drehung um 180°.

Translokationen:

Verlagerung eines Chromosomenabschnittes von seinem ursprünglichen Ort auf ein anderes Chromosom oder eine andere Stelle des gleichen Chromosoms.

Insertionen:

Bei der Insertion wird genetisches Material eines Chromosomenabschnittes an anderer Stelle des Genoms integriert.

Amplifikationen/Duplikationen:

Amplifikationen bzw. Duplikationen beschreiben den Zuwachs bzw. die Verdopplung von Chromosomen oder von chromosomalen Regionen.

Inzwischen haben molekulare Studien erwiesen, dass chromosomale Veränderungen spezifische Ereignisse auf molekularer Ebene widerspiegeln und eine grosse Rolle bei der Onkogenese spielen [98].

1.2 Veränderungen bei hämatologischen Erkrankungen

Chromosomale Aberrationen können sowohl die Genexpression als auch das Genprodukt beeinflussen. Die Aktivierung von Protoonkogenen kann als Folge von oben genannten Rearrangierungen, wie Translokationen oder Inversionen, unter dem Einfluss regulatorischer Sequenzen anderer Gene verstärkt oder inadäquat

1 EINLEITUNG

verändert werden. Die ersten Gene, die auf molekularer Ebene charakterisiert wurden, waren das humane *MYC*- Onkogen und das Immunglobulinschwerketten-Lokus-Gen (*IGH*) in der Translokation t(8;14)(q24;q32). Diese Translokation charakterisiert das Burkitt-Lymphom, eine Subentität innerhalb der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome [61;126;143].

Ein weiterer Mechanismus, der zur Pathogenese hämatopoetischer Erkrankungen beiträgt, stellt die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen dar. Der Funktionsverlust oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen sind für die Initiation oder die Progression malignen Wachstums von Bedeutung. Translokationen, Deletionen sowie Inversionen können in einem weiten Spektrum von hämatopoetischen Malignitäten (myeloischen und lymphatischen) gefunden werden.

Während lymphatische Leukämien eher durch Überexpression von strukturell normalen Genen, wie z.B. Juxtaposition von hoch rekombinogenen „enhancer“ Elementen, wie der *IGH*-Lokus, charakterisiert sind, sind myeloide Leukämien eher die Folge von chimerischen Proteinen, hervorgerufen durch chromosomale Translokationen.

Die Folgen der verschiedenen genetischen Aberrationen sind eine veränderte Expression und/oder eine veränderte Funktion der betroffenen Gene. Dies verursacht einen Überschuss von Genprodukten oder führt umgekehrt zu einer Abnahme oder zum Fehlen eines Genproduktes, was eine veränderte Menge oder eine veränderte Aktivität eines Proteins verursacht. Die betroffenen Gene kodieren häufig für Proteine, die für wichtige Zellfunktionen wie Wachstum, Differenzierung oder Apoptose verantwortlich sind. Daraus resultiert eine Fehlregulation der Differenzierung, der Proliferation sowie der Apoptose maligner Zellen [70;98;109].

Es ist interessant, dass chromosomale Veränderungen häufig mit einem bestimmten Tumorphänotyp assoziiert sind [98]. Die Liste der auf molekularer Ebene charakterisierten Translokationen ist umfangreich und nimmt weiterhin zu. Es sind jedoch eine begrenzte Zahl rekurrenter Gene, die Ziel dieser Veränderungen sind.

Beispielsweise werden bei akuter myeloischer Leukämie, die durch Translokationen t(8;21)(q22;q22.3), t(3;21)(q26;q22) und inv(16)(p13;q22) charakterisiert sind, Teile des „transcription factor core binding“-Komplexes verändert [28;65;72;82;83;98].

Ähnlich verhält es sich bei Translokationen, in die die Chromosomenbande 11q23 involviert ist. In den meisten Fällen ist ein einziges Intron des *MLL*-Gens (mixed

1 EINLEITUNG

lineage leukemia) Ziel der Veränderungen, was vermuten lässt, dass die Dysregulation der *MLL*-Funktion Folge all dieser Rearrangements ist [128].

Ein weiteres Beispiel ist das *ETV6*-Gen, welches auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 lokalisiert ist.

Veränderungen des kurzen Arms von Chromosom 12 treten bei 4-8% der Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML) auf und betreffen zumeist das *ETV6*-Gen (ETS-variant gene 6). Veränderungen dieses Gens treten häufig bei sekundären AML auf und zeigen eine ungünstige Prognose an. Die mediane Überlebenszeit von Patienten mit zytogenetischen Veränderungen der Region 12p liegt bei nur 14 Monaten [16;42;68].

Unterschiedliche Bruchpunkte und verschiedene Abnormalitäten, wie balanzierte und unbalanzierte Translokationen, Deletionen, Verdopplungen, Dicentrics und Inversionen, spielen eine Rolle. Beispielsweise kann mit konventioneller zytogenetischer Analyse in 5% der AML und in 10% der ALL Fälle chromosomale Veränderungen auf 12p nachgewiesen werden [99;122]. Zusätzlich konnte durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) auf normal erscheinenden G-Banden kryptische Veränderungen auf Chromosom 12 sichtbar gemacht werden [2].

1.3 *ETV6*-Gen

1.3.1 Das *ETV6*-Gen

1994 wurde von Golub *et al.* das *ETV6*-Gen, auch bekannt als *TEL*-Gen (Translokation ETS like Leukemia), auf 12p13 als Fusionspartner des *PDGFR β* im Fall einer balancierten Translokation, t(5;12)(q33;p13), bei einem Patienten mit einer chronisch myelomonocytärer Leukämie (CMML) entdeckt [35].

Das *ETV6*-Gen gehört zu der großen Familie von Transkriptionsfaktoren, die als ETS-Familie (E26 transforming specific) bekannt sind, und liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 (12p13). Diese Gruppe von Proteinen ist durch eine konservierte, 85 Aminosäuren lange, gewundene Helix-loop-helix (HLH) DNA-Bindedomäne (DBD), die sogenannte ETS-Domäne, gekennzeichnet [84;85].

Baens *et al.* konstruierten 1996 eine detaillierte Karte der genomischen Region, die das *ETV6*-Gen enthält [4]. Demnach besteht das *ETV6*-Gen aus 240 Kilobasen (kb) und enthält acht Exons. Wie in Abbildung 1 aufgezeigt, kann sich ein alternatives Exon 1 (Exon 1B) 12 Kilobasenpaare (kb) vorgelagert von Exon 3 befinden. Es ist

1 EINLEITUNG

aber nicht geklärt, ob aus dieser alternativen „splice“ Form ein Protein exprimiert wird. Die Transkription erfolgt vom Telomer zum Centromer. Das Gen kodiert für eine 1356 kb cDNA (copyDNA).

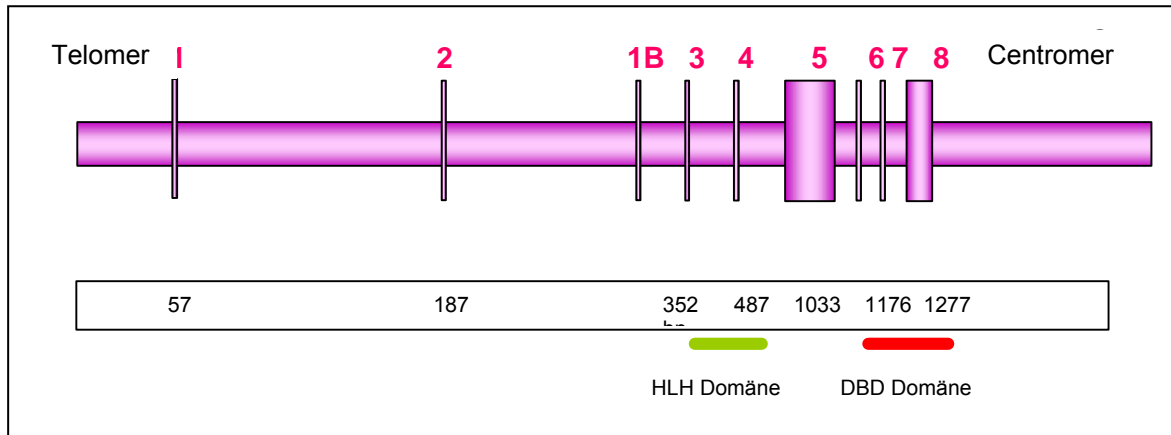


Abbildung 1: Exon Struktur des *ETV6*-Gens. Das *ETV6*-Gen hat 8 Exons (vertikale Linien). Unter den Exons ist die Grösse in Basenpaaren (bp) angegeben. Die HLH Domäne ist grün, die DBD Domäne ist rot dargestellt.

Auf der cDNA-Ebene finden sich drei verschiedene Transkripte (2.400, 4.300, 6.200 Nukleotide), die möglicherweise durch differentielle Polyadenylierungs-Reaktionen am 3'-Ende entstehen. Die cDNA des *ETV6*-Gens kodiert für zwei nukleäre Proteine, ein aus 452 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, das in die Unterklasse der ETS-Proteine eingeordnet werden kann, und ein weiteres Protein, das 409 Aminosäuren lang ist, welches exprimiert wird, wenn ein alternatives Startcodon auf Position 43 genutzt wird. Diese Proteine enthalten alle eine Helix-loop-helix-Dimerisations-Domäne am amino-terminalen Ende (5' Region) und eine ETS-DNA-bindenden Domäne am carboxy-terminalen Ende (3' Region). Das HLH-Motiv wird von den Exons 3 und 4 kodiert und ist auch als „pointed“ oder „steril alpha motif“ Domäne (SAM) bekannt. Diese Domäne ist verantwortlich für Hetero- und Homodimerisationen mit anderen *ETV6*-Proteinen und möglicherweise auch anderen ETS-Familienmitgliedern wie FLI1 [17;34;35;38;52]. Die ETS-DNA-bindende Domäne wird von den Exons 6 bis 8 kodiert. Die DBD-Domäne ist positiv geladen, sodass sie an purinreiche DNA-Segmente binden kann. Es existiert zudem noch eine zentrale Domäne, die zwischen der HLH- und der DBD-Domäne liegt.

1 EINLEITUNG

1.3.2 Das ETV6-Protein und seine Funktion

Eine wichtige Rolle haben die ETS-Transkriptionsfaktoren vor allem bei der Regulierung der Entwicklung und Funktion von Zellen der verschiedenen hämatopoetischen Zellreihen und des Immunsystems. Außerdem sind ETS-Proteine wichtig für die Regulierung der Expression von Genen, die an der Zellzyklusprogression und der Apoptose beteiligt sind [135]. Die Rolle der ETS-Faktoren bei der Hämatopoese ist von besonderer Bedeutung, da einige ETS-Proteine bevorzugt Expressionen in hämatopoetischem Gewebe zeigen und aberrante Expressionen bei der Entwicklung von Leukämien bei Mäusen und Hühnern gefunden wurden [84]. Wang et al. konnten zeigen, dass, obwohl *ETV6* nicht für die Proliferation oder Differenzierung der Hämatopoese im Dottersack oder der fetalen Leber benötigt wird, *ETV6* sehr wohl für die Etablierung der Hämatopoese im Knochenmark essentiell ist und schon bei der Transformation von der Leber- zur Knochenmarkhämatopoese eine kritische Rolle spielt [134].

Wie in 1.3.1 beschrieben, ist das Charakteristische der ETS-Transkriptionsfaktorenfamilie die konservierte ETS-DNA-bindende Domäne, die aus 85 Aminosäuren besteht [135]. Diese Domäne ist hauptsächlich für die Bindung an spezifische Sequenzen über ein GGAAT-Kernmotiv verantwortlich, sie vermittelt aber auch Protein-Protein-Interaktionen [39;48]. Elektrophoretische Untersuchungen zeigen, dass *ETV6* an dieses Motiv DNA bindet [34;84;97].

Eine Reihe von Proteinen, die der ETS-Familie zugerechnet werden, besitzen neben der ETS-DNA-bindenden Domäne die HLH-Protein-Dimerisations-Domäne. Die *ETV6*-HLH-Domäne besteht aus einer 67 Aminosäuren langen Region, der eine benachbarte Basisdomäne fehlt, was für HLH-Transkriptionsfaktoren wie *MYC* und *MYO-D* charakteristisch ist [116]. Die HLH-Domäne spielt keine direkte Rolle bei der DNA-Bindung. Sie ist vor allem in Protein-Protein-Interaktionen involviert, die zu Homodimerisation und Heterodimerisation mit anderen Mitgliedern der ETS-Familie führen [17;36-38;52]. ETS-Transkriptionsfaktoren sind in vieler Hinsicht in die normale Entwicklung und Differenzierung des hämatopoetischen Systems involviert [7]. *ETV6* funktioniert als ein sequenzspezifischer DNA-bindender Transkriptionsregulator [97].

Studien, die sich mit den Transkriptionseigenschaften von *ETV6* befassen, zeigen, dass *ETV6* auch ein starker Transkriptionsrepressor ist [21;44]. Die

1 EINLEITUNG

Repressionsaktivität von ETV6 kann auf zwei Regionen lokalisiert werden, die HLH-Domäne und eine zentrale Region zwischen der HLH- und der ETS-Domäne.

Chakrabarti et al. fanden heraus, dass die zentrale Region eine von der HLH-Domäne unabhängige Repressoraktivität ausübt [21]. Die Vermittlung über die zentrale Region kann durch inhibierende Histon-Deacetylasen (HDAC) erleichtert werden, ebenso interagiert diese Domäne mit Korepressoren, die HDACs rekrutieren [21;41]. Neuere Studien belegen, dass auch die Repression durch die HLH-Domäne höchst wahrscheinlich durch den Korepressor L3MBTL, ein polycomb-group-Protein, das auch eine HLH-Domäne enthält, vermittelt wird [10].

Abgesehen von den Korepressoren konnten noch mehrere Proteine identifiziert werden, die mit ETV6 interagieren. Kwiatkowski et al. zeigten, dass ETV6 an sich selbst und an FLI1 über die HLH-Domäne bindet [60]. Dies führt zu einer Reduktion der Transkriptionsaktivität von FLI1. In „transient transfection assays“ transaktiviert FLI1 megakaryozytenspezifische Promotoren, ETV6 inhibiert diesen Effekt. In Transaktivierungsstudien, die deletierte Gene von *ETV6* und vom ETV6-AML1-Fusionsprotein nutzten, konnte man feststellen, dass die HLH-Domäne von ETV6 die Transaktivierung nur teilweise inhibiert und die komplette Hemmung die volle Länge des *ETV6*-Moleküls, inklusive der DNA-bindenden Domäne, benötigt.

Fears et al. bestätigten, dass das ETV6-Protein als starker Repressor der Transkriptionsaktivierung des Promotors des M-CSF-Rezeptors (colony stimulating factor) durch ein komplexes Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren wie AML1, C/EPB α und PU.1 wirkt [30].

1.3.3 ETV6-Veränderungen und Einfluss auf die Onkogenese

Bis jetzt sind mehr als 40 Translokationen, die das *ETV6*-Gen involvieren, bekannt [86]. Annähernd 20 verschiedene Fusionspartner, darunter Tyrosinkinase, Transkriptionsfaktoren oder Proteine mit unbekannter Funktion, konnten auf molekularer Ebene identifiziert werden.

Tabelle 1 zeigt die Beteiligung des ETV6-Gens an verschiedenen malignen Erkrankungen sowie die entsprechenden Transformationsmechanismen.

1 EINLEITUNG

Fusionspartner	Translokation	Bruchpunkt <i>ETV6</i>	Erkrankung	Transformations- mechanismus
<i>RUNX1</i>	t(12;21)(p13;q22)	Intron 5	ALL	Repression von <i>RUNX1</i> Zielgenen, „loss of function von <i>ETV6</i> ?“
<i>MN1</i>	t(12;22)(p13;q11)	Intron 2 oder 3	AML/MDS	Repression von <i>MN1</i> Zielgenen?
<i>MDS1/EVI1</i>	t(3;12)(q26;p13)	Intron 2	MDS,CML	Überexpression von <i>EVI1</i> ?
<i>BTL</i>	t(4;12)(q11-q12;p13)	Intron 1 oder 2	AML-M0	<i>GSH2</i> Überexpression?
<i>CDX2</i>	t(12;13)(p13;q12)	Intron 2	AML	nicht Fusionsgen abhängig.
<i>MDS2</i>	t(1;12)(p36;p13)	Intron 2	MDS	Protein mit unbekannter Funktion, Überexpression eines Nachbargenes?
<i>PDGFRB</i>	t(5;12)(q31;p13)	Intron 4	CMML	Aktivierung der Proteintyrosinkinase (PTK) Domäne
<i>ABL1</i>	t(9;12)(q34;p13)	Intron 4 und 5	AML,ALL	Aktivierung der PTK Domäne
<i>JAK2</i>	t(9;12)(p24;p13)	Intron 4 oder 5	Pre-B cell ALL, T-ALL	Aktivierung der PTK Domäne

Tabelle 1: Beispiele für die Beteiligung des *ETV6*-Gens an malignen Erkrankungen

Es ist besonders interessant, dass in einigen Translokationen, wie z.B. bei der *ETV6/PDGFR β* -Fusion, das aminoternale Ende von *ETV6* mit der HLH-Domäne kritisch für die Leukämogenese ist [17;35;37;52], während in anderen Fällen, wie bei der *MN1/ETV6* Fusion, die DNA-Binde-Domäne von *ETV6* relevant ist, wobei die HLH-Domäne zerstört sein kann [14]. Im Folgenden sollen die bisher bekannten vier potentiellen Mechanismen, die bei einer Translokation unter Beteiligung von *ETV6* zu einer Transformation führen können, näher erläutert werden.

1. t(5;12) *ETV6/PDGFR β* und t(9;12) *ETV6/ABL*

In den meisten Fällen kodieren *ETV6*-Translokationen für Fusionsproteine bei denen die HLH-Domäne mit Phosphotyrosinkinasen (PTK) fusioniert sind. Bei der Translokation t(5;12) ist das aminoternale Ende von *ETV6*, welches die HLH-Domäne enthält, mit der Tyrosinkinase-Domäne des *PDGFR β* -Rezeptors fusioniert. Diesem Fusionsprodukt fehlt die ETS-DNA-Binde-Domäne [35]. Diese Struktur, die HLH-Domäne in der aminoternalen Hälfte von *ETV6* und die Tyrosinkinase in der carboxyterminalen Hälfte von *ETV6/PTK*-Fusionen, ist charakteristisch und wird in den Fusionen mit *ABL1*, *ABL2*, *JAK2*, *NTRK3*, *FGFR3* und *SYK* gefunden [19;46;54;59;63;89;92;140]. Der Mechanismus der *ETV6/PTK*-Fusion ist gut

1 EINLEITUNG

verstanden. Viele Studien haben gezeigt, dass die HLH-Domäne von *ETV6* als Dimerisationsmodul für das Fusionsprotein dient. Dimerisation führt zu Aktivierung der PTK-Domäne und zur Autophosphorylierung der Fusionsproteine und der zellulären Proteine [17;37;52;119]. Expression von solchen *ETV6/PTK* Fusionen in Interleukin 3 (IL-3) abhängigen Zellen führen zu faktorunabhängigem Wachstum [17;47;62;120;138].

Ebenso verhält es sich bei der Translokation t(9;12), deren Folge eine Fusion des aminoterminalen Endes von *ETV6* mit dem *ABL1*-Gen, einer non-Tyrosinkinase, ist [37;89]. Die *ABL*-Kinase ist bekannt durch die Beteiligung an der Translokation t(9;22), durch die Fusion mit *BCR*, auch bekannt als das oben erwähnte Philadelphia-Chromosom. Die identische *ABL*-Sequenz ist bei der Fusion *ETV6/ABL* betroffen. Wie bei der Fusion *ETV6/PDGFR β* wird eine Aktivierung der *ABL*-Kinase durch die HLH-Domäne erhöht. Auch hier ist die ETS-Domäne nicht beteiligt. Die aktivierten PTKs sind direkt für die transformierende Aktivität dieser Proteine in vitro und in vivo verantwortlich.

2. *ETV6/EVI1/MDS1*

Die HLH-Domäne ist ebenfalls in einigen Fusionen mit Transkriptionsfaktoren, wie *RUNX1 (AML1)*, *MDS1/EVI1* und *CDX2*, präsent [22;35;92;104]. Die *MDS1/EVI1*- und *CDX2*-Fusionen enthalten den Transkriptions/Translationsstart von *ETV6*. Es wird angenommen, dass durch diese Fusionen ektope Expressionen der Transkriptionsfaktoren *EVI1* und *CDX2* repräsentiert werden, welche normalerweise im hämatopoetischen System keine Expression finden. Bei der Translokation t(3;12)(q26;p13) wird *ETV6* nach 3q26 zu dem *MDS1/EVI1*-Lokus transloziert. Fusionstranskripte mit *MDS1/EVI1* und mit *EVI1* wurden beschrieben [78;93]. Es ist unklar, ob die Formation des Fusionsproteins kritisch für die Leukämogenese ist oder ob eine Überexpression von *EVI1* allein zu einer malignen Veränderung führt. Es konnte gezeigt werden, dass eine *EVI1*-Überexpression die normale hämatopoetische Differenzierung unterbrechen kann und zu einem größeren Vorkommen von Megakaryozyten führt [118].

Die Translokation t(12;13)(p13;q12) wurde in wenigen Fällen von AML gefunden, in einem Fall führte es zur Fusion mit dem Homeobox-Gen *CDX2*. Rawat et al. konnten zeigen, dass eine Überexpression von *CDX2* und nicht das Fusionsprotein von *ETV6*

1 EINLEITUNG

und CDX2 entscheidend für die Entwicklung von Leukämien in Modellen von Knochenmarkstransplantaten bei Mäusen sind.

Die Fusion von *ETV6* und *RUNX1* ist die am häufigsten beschriebene reziproke chromosomale Translokation bei Leukämien im Kindesalter [104]. Golub et al. beschrieben 1995 als erste die Fusion von *ETV6* mit dem Transkriptionsfaktor *RUNX1*. Das Fusionsprotein enthält die HLH-Domäne von *ETV6* und die DNA-Bindedomäne und Transaktivierungsdomäne von *RUNX1*. Das Fusionsprotein kann weiterhin an die Promotor- und Enhancer-Region der *RUNX1* Zielgene binden. Doch anstatt diese zu aktivieren, werden sie durch *ETV6/RUNX1* unterdrückt. Diese Repressionsfunktion ist von der HLH- und der zentralen Domäne von *ETV6* abhängig, die beide an der Fusion beteiligt sind. Es wird vermutet, dass *ETV6/RUNX1* den normalen Weg der Genaktivierung durch *RUNX1* in dem hämatopoetischen System stören [31;44]. Interessant ist, dass das nicht dislozierte *ETV6* Allel ebenfalls an dem Transformationsprozess beteiligt zu sein scheint. Sogar in Fällen, bei denen keine Deletion nachgewiesen werden kann, ist eine Expression des Wild-Typ *ETV6*-Allels nicht vorhanden, was auf eine wichtige Rolle der „loss of function“ Funktion des *ETV6*-Allels als ein sekundäres Event bei ALL spricht und zur Progression der ALL beiträgt [101;115].

3. *ETV6/MN1*

Bei der Fusion von *MN1* und *ETV6* ist dagegen die DNA-Binde-Domäne enthalten, wobei die HLH-Domäne bei einigen Fällen zerstört ist [14]. Die *MN1/ETV6*-Fusion ist das Ergebnis der Translokation t(12;22)(p13;q11). Das *MN1/ETV6*-Fusionsprotein enthält transkriptionsaktiverende Regionen aus *MN1* und die ETS-Domäne aus *ETV6*. *MN1* ist vermutlich eher ein Transkriptionsaktivator als ein Transkriptionsfaktor. Dies ist das einzige Beispiel, bei dem ein Transfusionsprodukt, das die ETS-Domäne enthält, Transkriptionsaktivität zu haben scheint [14;35].

4. *ETV6/CHIC2*

Cools et al. beschrieben eine Fusion von *ETV6* mit *CHIC2* bei Patienten mit AML bei einer Translokation t(4;12)(q11-12;p13). Bei diesem Transfusionsprodukt sind sowohl die HLH- als auch die ETS-Domäne enthalten und mit dem *CHIC2* Promotor fusioniert [23;23;118]. Relevant für die Leukämogenese ist nicht das Fusionprodukt

1 EINLEITUNG

an sich, sondern wahrscheinlich eine ektope Expression des Homeobox-Gens *GSH2*, welches in der Nähe des Bruchpunktes auf Chromosom 4 liegt [25].

Dieser Deregulationsmechanismus wurde auch bei Patienten mit einer Translokation t(5;12) beobachtet. In Abwesenheit eines funktionellen *ACS2/ETV6*-Fusionsprodukts könnte die ektope Expression von Genen nahe des Bruchpunkts auf Chromosom 5, z.B. *IL-3* pathogenetisch bedeutend sein [25;139].

Dieser Mechanismus zeigt sich auch bei der Translokation t(1;12)(p36.1;p13), bei der das *MDS2*-Gen mit *ETV6* fusioniert ist. Hierbei würde das Fusionsprotein 54 Aminosäuren des *ETV6* Gens enthalten, aber lediglich 4 Aminosäuren des *MDS2*-Gens, das normalerweise für ein 140 Aminosäuren langes Protein kodiert. Deshalb ist in diesem Fall sehr wahrscheinlich, dass die maligne Transformation durch Upregulation von Nachbargenen hervorgerufen wird [87].

2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Leukämien spielen Genveränderungen, die infolge von Chromosomentranslokationen entstehen. Diese Veränderungen resultieren entweder in der Entstehung von neuen Fusionsgenen oder in der deregulierten Expression von Genen in der Nähe der Chromosomenbruchpunkte. Es konnte in verschiedenen, oben genannten Arbeiten für einige Fusionsgene gezeigt werden, daß sie eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Leukämien haben.

Wie beschrieben spielen Veränderungen, die das *ETV6*-Gen betreffen, bei dem Pathomechanismus zur Entstehung von Leukämien eine wichtige Rolle.

Daher ist die Detektion dieser Aberrationen für die Einschätzung der Prognose des Patienten und die Wahl einer geeigneten Therapie wichtig. Da es sich oft um kryptische, also mit herkömmlichen Verfahren nicht nachweisbare Veränderungen des *ETV6*-Gens, welches sich im terminalen Bereich des kurzen Arms von Chromosom 12 (12p13) befindet, handelt, sind Translokationen oder Deletionen teilweise durch die klassische zytogenetische Analyse nicht nachweisbar. Erst die Anwendung spezifischer DNA-Sonden in der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) oder die Anwendung molekulargenetischer Verfahren können die Veränderungen darstellen.

Angeregt durch diese Erkenntnisse, wurde Gewebe von 25 Patienten mit unterschiedlichen hämatologischen Erkrankungen, die karyotypisch ersichtlichen chromosomalen Veränderungen des kurzen Arms auf Chromosom 12 aufwiesen, auf das Vorhandensein einer *ETV6*-Genrekombination molekularbiologisch gescreent. Das Gewebe dieser Patienten wurde zwischen 1997- 2003 in dem zytogenetischen Labor der Abteilung II Medizinischen Klinik und Poliklinik Onkologie, Hämatologie, Knochenmarktransplantation des Universitätsklinikums Eppendorf untersucht. Aus dem beschriebenen Zeitraum sind archivierte Knochenmark- und Blutproben vorhanden, so dass die heutzutage übliche PCR zum Nachweis eines Fusionstranskriptes neben Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) Anwendung finden konnte. Ziel der Arbeit war daher, das FISH-Screening mit spezifischen Sonden für das *ETV6*-Gen bei allen 25 Patienten, um mögliche Translokationspartner sichtbar zu machen sowie die Auswahl der Patienten mit entsprechend neuen chromosomalen Veränderungen, um deren mögliche Detektion eines

2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Transfusionskripts mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) weiter zu analysieren.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Patientenkollektiv

Es wurden Proben, von 25 Patienten mit unterschiedlichen hämatologischen Erkrankungen, die zwischen 1990- 2003 in dem zytogenetischen Labor der Abteilung II Medizinischen Klinik und Poliklinik Onkologie, Hämatologie, Knochenmarktransplantation des Universitätsklinikums Eppendorf untersucht wurden analysiert.

Bei den hämatologischen Erkrankungen handelte es sich bei 13 Fällen um eine AML, bei 5 Fällen um ein MDS (myelodysplastisches Syndrom), bei 3 Fällen um ein MPS (myeloproliferatives Syndrom) und bei 4 Fällen um eine CML. In der konventionellen zytogenetischen Analyse wiesen alle Fälle eine oder mehrere strukturelle Veränderung auf Chromosom 12p auf, wobei 16 mal eine Deletion, viermal eine Addition, zweimal ein Derivat und achtmal eine Translokation gesehen werden konnte.

Die Untersuchungen wurden an peripherem Blut oder Knochenmark durchgeführt. Die Zellen waren in Methanol-Eisessig konserviert oder kryokonserviert.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die analysierten Patientenproben.

3 MATERIAL UND METHODEN

Fall	Erkrankung	Karyotyp
1	AML	46,XX 43-45,XX,del(5)(q15q33),del(7)(q22),del(11)(p14), del(12)(p12) , -16,-17,-18, -19,-20,+1-3mar,1-6dmin[cp23]
2	AML	47,XX,del(2)(p?21), del(12)(p?12) ,+mar[2]
3	AML	45-47,XY,del(1)(q41)[3], -7,t(8;17)(q13;p13), der(12)del(12)(p11)ins(12;?)(q13;?) ,+17,-18,+mar[cp13]
4	AML	42-44,XY,del(5)(q14q32),del(6)(q?22),-7,-8,-10, del(12)(p12) , -17,+2-3mar[cp6]
5	AML	I.44-45,XY,-4,-5,-7, del(12)(p11) , -16,-21[6],-22,+4mar[cp8] II.46,XY,?der(2),-4,-5,+2mar[4] III.46,XY[13]
6	AML	45-47,XX,del(5)(q12q33), del(12)(p12) ,del(12)(p13),-13,-13,?der(16), -18,+21,+22,+2mar[cp15]
7	AML	46,XY, del(12)(p11)
8	AML	46-48,XY,+8,+21, t(3;12)(q21;p13) ,der(17) t(12;17)(p13;q25)
9	AML	46,XY,add(2)(p12),del(2)(p12),-4[2],t(6;11)(p24;q23),del(8)(q22), add(9)(q12),?del(12)(p13),?add(13)(p13),+mar[cp12]
10	AML	48-50,XY, t(3;12)(q26;p13)[22] , -7[6],+9[5],+16[2],-17[3],+18[2],+21[22], +22[22][cp22]
11	AML	I.45,XY,dic(16;17)(q11;p11)[14] II.45,XY, del(12)(p13) ,dic(16;17)(q11;p11)[7] III.46,XY[4]
12	AML	49,XX,+6,+8, add(12)(p13) ,+19[9]
13	AML	61-65,XXX,-1,-2,-3,-4,-5,-7,-7,+8,+9, ?add(12)(q23) , ?del(12)(p11) , -16,-17,-17, -18,+add(19)(?q13),-21,-22,+2mar[cp25]
14	MDS	44-45,XY,add(2)(p11)[9],del(5)(q13q33)[6],del(7)(q22)[8],-9[8], del(12)(p11)[9] , -22[9],+mar1[8],+mar2[6][cp12]
15	MDS	I.44-46,XX,del(5)(q12q34), add(12)(p12) ,add(19)(q13),+r,+mar[cp14] II.46,XX[1]
16	MDS	t(4;12)(q12;p13) ,inc
17	MDS	I.43-46,XY, del(12)(p11p13)[6] II.46,XY[8]
18	MDS	44-46,XY,del(1)(p21),+del(1)(q12)[7],del(3)(q26),+del(3)(q21)[7], del(5)(q12q34),-6,-7,-9, add(12)(p13)[7] , -14,+1-3mar [cp3]
19	MPS	I.46,XY, del(12)(p11p13)[22] II.46,XY[3]
20	MPS	der(12)t(12;?) ,inc
21	MPS	t(X;12)(q28;p11) ,inc
22	CML	43-46,XX,-2[6],-4,-5[14],t(9;22)(q34;q11),-10[4], del(12)(p12) ,del(13) (q11;q14),-15[3],-16[14],-19[13],-20[14],+der(22)t(9;22)[2], -22[3],+3mar[cp15]
23	CML	48-49,X,-Y[8],der(3)add(3)(p21)add(3)(q25)[7],del(3)(p13)[7],-4[8],+6[7] ,+8[8],t(9;22;?)(q34;q11;?) [25],+10[6], del(12)(p12)[8] , -15[7],add(17) (p13)[6],?del(19)(p13)[6],add(19)(q13),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[23], +2mar[8][cp25]
24	CML	46,XX,t(9;22)(q34;q11), t(X;12)(q;p) ,inc
25	CML	46,XY, t(9;12;22)(q34;p13;q24)

Tabelle 2: Darstellung der 26 hämatologischen Patienten mit den jeweiligen Erkrankungen und den entsprechenden Karyotypen

3 MATERIAL UND METHODEN

3.2. Reagenzien von FISH

Methanol (Merck)

Eisessig

20X SSC (1L, pH = 7,0)

- 88,2g $C_6H_5Na_3O_7 \times 2 H_2O$ (Merck)
- 175,3g NaCl (J.T.Baker)

4X SSC Tween 20, 0,5% (Aldrich Sigma)

- 200ml 20X SSC
- 800ml H_2O
- 500 μ l Tween 20 (Aldrich Sigma)

10X PBS (1L)

- Lösung I
 - 16,02g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ (Merck)
 - 73,84g NaCl
- Lösung II
 - 2,76g $Na_2HPO_4 \times H_2O$
 - 16,36g NaCl
- Lösung II in Lösung I hinzufügen bis zu einem pH von 7,0

10X TNT (1L, pH = 7,5)

- 121,4g Tris-base (Aldrich Sigma)
- 87,4g NaCl

6M HCl

- 100ml 37% HCl (Merck)
- 100ml H_2O

37% entspricht 440,30g/L, was mit 12,08N korrespondiert

0,5M $MgCl_2 \times 6H_2O$ (500ml) (Merck)

- 50,82g $MgCl_2 \times H_2O$

1M $MgCl_2$ (100ml) (Merck)

3 MATERIAL UND METHODEN

- 20,33g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

Puffer TE 1/10 (1L) (pH = 7,5)

- 10ml Tris- HCl 1M
- 2ml 0,5M EDTA

0,5M EDTA (40ml) (pH = 7,5) (Aldrich Sigma)

- 8,04g EDTA

3M Natriumacetat (pH = 5,6) (Merck)

- 24,61g NaAc

50% Formamid 100ml 20X SSC (pH = 7,0)

- 500ml 99% Formamid (Merck)
- 400ml aqua dest.

70% Formamid (pH = 7,0)

- 70ml reines Formamid (Invitrogen)
- 10ml 20X SSC
- 20ml aqua dest

RNAse (10mg/ml) (Roche)

Pepsin (100mg/ml) (Aldrich Sigma)

Human Cot-1 DNA (1mg/ml) (Invitrogen)

3 MATERIAL UND METHODEN

3.2.1 Verwendete Sonden

Sonde 50F4

- Markierung Biotin

Sonde 148B6

- Markierung mit Digoxigenin

Sonde 163E7

- Markierung mit Digoxigenin

Sonde179A6

- Markierung mit Biotin

Sonde YAC 760G1

- Markierung mit Biotin

Sonde YAC 839F6

- Markierung mit Digoxigenin

3.2.2 Herstellung der Blockingreagentien

Blocking reagent 50g (Roche)

Für die Detektion mit Biotin

- zu 0,5g Blocking reagent 100ml 4X SSC zugeben
- bei 70°C 1-2h lösen

Für die Detektion mit Digoxigenin

- zu 0,5g Blocking reagent 100ml 1X TNT zugeben
- bei 70° 1-2h lösen

3.2.3 Verwendete Antikörper

Avidin-FITC=Fluorescein Avidin D (5mg/ml) (Vector Laboratories)

Anti-Avidin=Biotinylated Anti-Avidin D (0,5mg/ml) (Vector Laboratories)

Anti-Digoxigenin-Rhodamin (0,2mg/ml) (Vector Laboratories)

Donkey anti sheep Texas Red=Texas Red conjugated donkey anti sheep Ig (1,25mg/ml) (Jackson Immuno Research Laboratories)

3 MATERIAL UND METHODEN

3.2.4 Hybridisierungslösungen

- 10ml deionisiertes Formamid
- 2ml 20X SSC
- 4ml Dextransulfat 50% (Aldrich Sigma)
 - 1-2 h bei 70°C lösen
 - pH auf 7,0 justieren und 4ml aqua dest hinzufügen
 - Konzentration von 50% Formamid, 10% Dextransulfat und 2X SSC

3.2.5 Eindeckungslösung (Mounting medium)

DAPI counterstain (4'6- Diamidin-2-fenilindol dihydrochlorid) (Roche)

- Lösung I: 1ml aqua dest zu 10mg DAPI Pulver geben → Konzentration 10mg/ml
- Lösung II: 2µl der Lösung I auf 18µl aqua dest → Konzentration 1mg/ml
- Arbeitslösung: 0,5µl der Lösung II auf 1ml Vectrashield (Vector Laboratories)

3.3. Molekularbiologisches Material

3.3.1 Extraktion von RNA

RNeasy miniKit (250) (Qiagen)

RNase-free DNase Set (50) (Qiagen)

Weitere Chemikalien:

- β-Mercaptoethanol 14,5M (Aldrich Sigma)
- Ethanol 100%
- Diethylpirocarbonat (DEPC)
- Aqua-DEPC

3.3.2 Synthese von cDNA

Superskript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Invitrogen)

Primer 412 (3' RACE) (MWG-Biotech AG)

Aqua DEPC

3.3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Taq DNA Polymerase, recombinant (Invitrogen)

3 MATERIAL UND METHODEN

dNTPs, solution stock (Invitrogen)

- dCTP, Desoxycythydin Triphosphat (10mM)
- dATP, Desoxyadenosin Triphosphat (10mM)
- dGTP, Desoxyguanosin Triphosphat (10mM)
- dTTP, Desoxytymidin Triphosphat (10mM)

Primer ETV6-F1a (MWG-Biotech AG)

Primer 467

Primer ETV6-F1b

Primer 468`

Primer Exon-2A

Primer M13 forward

Primer M13 reverse

Primer 440P5-f1

Primer 440P5-f2

Primer 440P5-r1

QIAquick PCR Purification Kit (50) (Qiagen)

QIAquick Gel Extraction Kit (50) (Qiagen)

Die Primer werden im Anhang nochmals detaillierter aufgeführt

3.3.4 Klonierung

pGEM – T Easy Vector System II (Promega)

(LB) Medium (1L, pH = 7,0)

- 10g Trypton (Difco Laboratories)
- 5g Hefeextrakt (Difco Laboratories)
- 10g NaCl (J.T.Baker)

SOC Medium (100 ml) (pH = 7,0)

- 2,0g Tryptan
- 0,5g Hefeextrakt
- 1ml 1M NaCl

3 MATERIAL UND METHODEN

- 0,25ml 1M KCl (Merck)
- 2M Glucose (Merck), durch Filtration sterilisiert
- 1ml 2M Mg₂ stock, durch Filtration sterilisiert

2M Mg₂ stock

- 20,33g MgCl x 6H₂O (Merck)
- 24,65g MgSO₄ x 7H₂O

IPTG solution stock (0,1M) (Apotheke des UKE)

X-GAL (50mg/ml) in N,N-dimethyl-formamid (Apotheke des UKE)

Ampicillin 100mg/ml (Boehringer- Mannheim)

Agar-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml)

- 1L LB Medium
- 15g Agar (Difco Laboratories)

Agar-Platten mit Ampicillin/IPTG/X-Gal

- 100µl von 0,1M IPTG und 20µl von 50mg/ml X-Gal auf die Ampicillin LB Platten geben
- Auf der Oberfläche der Platten verteilen und 30 min bei 37°C einziehen lassen

3.3.5 Extraktion der DNA Plasmide

QIAGEN Plasmid Mini Kit (25) (Qiagen)

3.3.6 Agarosegel

Tris- Acetat (TAE): 50X

- 242g Tris base
- 57.1ml Eisessig (Merck)
- 100ml 0,5M EDTA (pH8,0)

3 MATERIAL UND METHODEN

6X Ladepuffer II

- 0,25% Bromophenolblau (Aldrich Sigma)
- 0,25% Xylencyanol FF (Merck)
- 15% Ficoll (Typo 400; Pharmacia) in Wasser

Agarose 1,3 % (p/v)

- Ultra Pure, Agarose Electrophoresis Grade (Invitrogen)
- TAE Puffer: 1X
- Ethidiumbromid (0,5µg/ml) (Invitrogen)

Größenmarker, 100bp DNA Ladder (Invitrogen)

3.3.7 Sequenzierung

Markierung der Proben

- Big Dye
- 2.5X Half Term Puffer
- Primer (15pm)

Primer ETV6- F1a

Primer ETV6- F1b

Primer M13for

Primer M13rev

3.4 Verwendete Geräte

Analysenwaage (Mettler Toledo, München)

Auflicht-Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioplan

Autoklav 2540 EL (Systec GmbH, Wettenberg)

BD Microlance 3 Einmalkanülen 20G (Becton Dickinson, Meylan, Frankreich)

Brutschrank Cytoperm (Heraeus GmbH, Osterode)

Deckgläser 24x60 und 13mm Ø (Marienfeld laboratory Glassware, Lauda-königshofen)

Eismaschine Scotsman AF-10 (Scotsman Ice Systems, Vernon Hill, IL, USA)

Elisaplatte (Invitrogen, Karlsruhe)

Gefrierschrank (Liebherr, Ochsenhausen)

3 MATERIAL UND METHODEN

Gelkammer (Horizon 11.14, Biometra)
Heizplatte (Medax Nagel GmbH, Kiel)
Heto vac Vakuumzentrifuge Typ VR-1 (Heto Lab, Wiesloch)
Immersionsöl Immersol 518 F (Carl Zeiss GmbH, Jena)
Kühlzentrifuge Biofuge 13R (Heraeus GmbH, Osterode)
Mikrowelle (Sharp)
Multifuge 3s Zentrifuge (Heraeus GmbH, Osterode)
Objektträger Superfrost Color (Menzel, Braunschweig)
Petrischalen (Durchmesser 85mm) (Eppendorf, Hamburg)
pH-Meter CG 811 (Schott Geräte GmbH, Hofheim)
PCR master cycler gradient (Eppendorf, Hamburg)
Pipettenspitze (Eppendorf, Hamburg)
Pipetus-Akku (Hirschmann Laborgeräte GmbH&Co. KG, Eberstadt)
Rubber Cement-Fixogum (Marabu GmbH, Hamm)
Schüttler KM-2 (Edmund Bühler, Hechingen)
Sterilwerkbank Typ Laminair HB 2448 (Heraeus GmbH, Hanau)
UV-Lampe (eagle eye II, Stratagene)
Vortexer REAX 2000 (Heidolph, Schwabach)
Wasserbäder (Memmert, Schwabach und GFL, Burgwedel)
Zentrifuge 5415 (Eppendorf, Hamburg)

Mikroskop-System für die FISH-Analyse:

Phasenkontrastmikroskop Model Axioplan (Carl Zeiss GmbH, Jena)
CCD-Kamera SenSys™ (Photometrics GmbH, München)
Monitor ViewSonic
Vorschaltgerät HBO 100 W Zeiss, (Carl Zeiss GmbH, Jena)

Software:

Computerprogramm „Quips™ FISH“ (Vysis, Bergisch Gladbach)

3.5 Methoden

3.5.1 FISH

Die Technik der in situ Hybridisierung (ISH) geht anfänglich sowohl auf Gall & Pardue als auch auf John et al. zurück (1969) [49;90]. Sie konnten in den 60er

3 MATERIAL UND METHODEN

Jahren unabhängig voneinander radioaktiv markierte Nukleinsäure mit dieser Methode darstellen.

1981 ermöglichten Langer et al. nichtradioaktive Markierungstechniken von DNA. Die FISH-Technik findet vor allem auch im Rahmen der Tumorgenetik eine breite Anwendung, da sie den Nachweis numerischer und struktureller chromosomaler Aberrationen ermöglicht. Das Prinzip der FISH beruht im Wesentlichen auf der spezifischen Bindung von DNA/RNA-Einzelstrangfragmenten (Sonden) an komplementäre DNA-Zielsequenzen der zu untersuchenden Zelle. Die Sonde wird durch den Einbau modifizierter Nukleotide markiert, die ein kovalent gebundenes Reporter-molekül tragen, das nach der Hybridisierungsreaktion mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes detektiert wird. Bei der hier angewendeten indirekten Methode wird das Reporter-molekül, Biotin bzw. Digoxigenin, indirekt durch den Einsatz spezifischer Fluoreszenz-gekoppelter Antikörpersysteme detektiert [130]. (Langer et al., 1981). Die bei FISH verwendeten Sonden werden mittels Klonierungsvektoren sowie mit Hilfe von künstlichen Hefechromosomen (YACs) oder künstlichen Bakterienchromosomen (BACs) generiert. Es gibt Sonden, die sowohl mit kompletten Chromosomen hybridisieren als auch spezifische Sonden, die mit Chromosomenabschnitten hybridisieren [79]. FISH stellt im Bereich der Tumorzytogenetik eine wichtige Ergänzung zur konventionellen zytogenetischen Analyse dar. Zytogenetische Aberrationen können bei FISH nicht nur in Metaphasezellen, sondern auch in Interphasezellen nachgewiesen werden, was ein entscheidender Vorteil ist, da die Interphasezytogenetik nicht von einer mitotisch aktiven Zelle abhängig ist. Eine Einschränkung FISH ist jedoch, dass die zu analysierende Region bekannt sein muss.

Die FISH-Technik setzt sich aus drei Teilen zusammen:

1. Vorbehandlung der Zellen und der Sonden (Denaturierung)
2. Präparation der Sonden und Hybridisierung (Hybridisierung und Detektion)
3. Auswertung der Ergebnisse (Analyse)

3.5.1.1 Vorbereitung und Fixierung der Zellen auf dem Objektträger

Das Patientenmaterial wurde aus dem Archiv des zytogenetischen Labors des UKE rekrutiert.

3 MATERIAL UND METHODEN

Als Material konnten bei -20° gelagerte fixierte Nuklei von B-Lymphozyten sowie in flüssigem Stickstoff gelagerte B-Lymphozyten aus Blut oder Knochenmark verwendet werden. Für die FISH-Analyse wurden die bei -20°C gelagerten Kernsuspensionen aus der konventionellen zytogenetischen Analyse auf Raumtemperatur erwärmt und auf fettfreie saubere Objektträger getropft.

- 5min bei 1000 rpm zentrifugieren, den Überstand abpipettieren und verwerfen,
- mit frischem Fixativ (Verhältnis 3:1) waschen und wiederum
- 5min bei 1000 rpm zentrifugieren, den Überstand bis auf einen kleinen Rest abschütten,
- die Kerne in diesem Rest resuspendieren und
- auf die Objektträger tropfen und über Nacht trocknen lassen.

3.5.1.2 Vorbehandlung der Ziel-DNA

Das Prinzip der Vorbereitung der Proben vor der Hybridisierung ist eine Denaturierung mit einer anschließenden Dehydrierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe.

- die auf dem Objektträger fixierten Zellkerne in 2X SSC stellen,
- 1ml RNase vorbereiten (0,01mg/ml), 10 μ l RNase (10mg/ml) mit 1ml 2X SSC mischen, 100 μ l der Lösung auf die Deckgläschen (24 x 60mm) auftragen und auf die Objektträger geben,
- eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubieren,
- 0,1M HCL und aqua dest. (10ml HCl+ 90ml aqua) auf 37°C erwärmen,
- 70% Formamid auf 70°C vorwärmen,
- während der Stunde Inkubation werden die Proben 5min in 2xSSC und in1xPBS unter Bewegung gewaschen.
- 150 μ l Pepsinlösung zu der erwärmten HCl Lösung hinzufügen und die Objektträger in dieser Lösung für 10min bei 37°C unter Bewegung inkubieren,
- Objektträger mit 1xPBS für 5min in Bewegung waschen,
- in einer Lösung aus 68,3ml PBS, 3,7ml MgCl₂, 2ml 37% Formaldehyd für 10 min ohne Bewegung fixieren,
- 5min mit 1xPBS in Bewegung waschen,
- 5min mit 2xSSC in Bewegung waschen,
- Objektträger 5 min mit 70% Formamid bei 75°C denaturieren,
- 3min mit eiskaltem 2xSSC in Bewegung waschen,

3 MATERIAL UND METHODEN

- Objektträger jeweils 3 min in Bewegung in einer aufsteigenden Ethanolreihe von 70%,80% und 100% waschen,
- Objektträger an der Luft trocknen lassen.

3.5.1.3 Verwendete DNA-Sonden

Als spezifische DNA-Sonden, die das *ETV6*-Gen flankieren, wurden zwei Kosmid-Klone verwendet. Der Kosmid-Klon 179A6 repräsentiert DNA-Sequenzen, die im Exon 1 und Teilen des Intron 1 des *ETV6*-Gens lokalisiert sind. Entsprechend der Markierung mit Biotin stellt sich 179A6 bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse als grünes Fluoreszenzsignal dar. Der Kosmid-Klon 148B6 hingegen enthält DNA-Sequenzen des Exons 8 sowie Teile der „untranslated region“. Die Markierung erfolgte mit Digoxigenin und ergibt ein rotes Fluoreszenzsignal.

Normale Zellen zeigen zwei Fusions- oder Kolokalisationssignale der beiden Sonden. Eine veränderte Signalkonstellation ergibt sich hingegen im Fall einer Translokation mit einem Bruchpunkt innerhalb des *ETV6*-Gens. Während 148B6 auf Chromosom 12 verbleibt, wird das 179A6 tragende Chromosomenbruchstück auf das Partnerchromosom transloziert. Die Folge ist eine Auftrennung des Fusionssignals in ein rotes und ein grünes Signal. Deletionen zeigen sich in Form von einem oder mehreren Fusionsignalen.

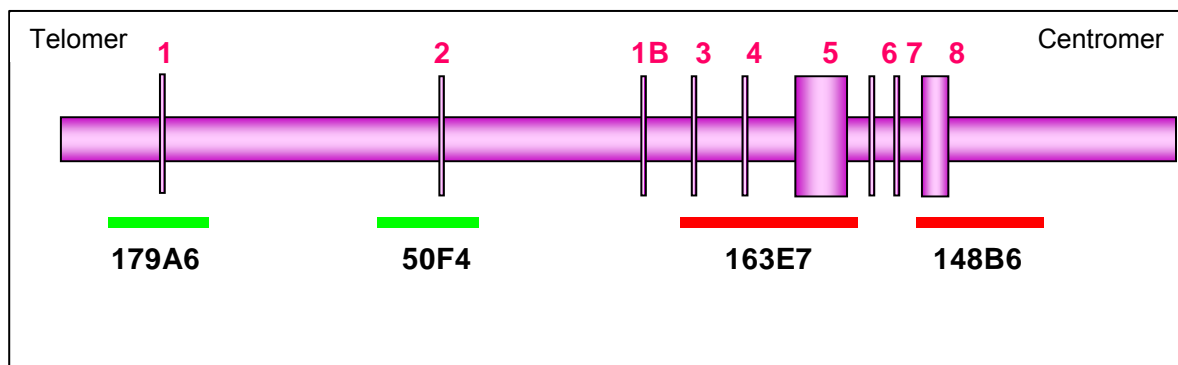


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Lokalisation der *ETV6*-Sonden im FISH-Experiment. Das Hybridisierungssignal ist in der jeweiligen Farbe dargestellt.

Zur weiteren Eingrenzung der Bruchpunkte bei ausgewählten Translokationen fanden die Sonde 50F4, die mit Biotin markiert ist und dementsprechend ein grünes Signal gibt und die DNA-Sequenzen des Exon 2 repräsentiert, und die Sonde 163E7, die mit Digoxigenin markiert ist und dementsprechend ein rotes Signal gibt und die DNA-Sequenzen der Exons 3,4 und 5 repräsentiert, Anwendung.

3 MATERIAL UND METHODEN

Für die Bestätigung nachgewiesener Translokationen wurden weiterhin die biotinmarkierte Sonde YAC 760G1 und die digoxigeninmarkierte Sonde 839F6 verwendet, wobei YAC 760G1 DNA-Sequenzen von 12q22 repräsentiert und ein grünes Signal gibt, und YAC 839F6 DNA Sequenzen von 12q24 repräsentiert und ein rotes Signal gibt.

3.5.1.4 Hybridisierung

Im Folgenden werden die Methoden der FISH-Experimente anhand der Sonden 179A6 und 148B6 beschrieben. Die Experimente mit den anderen Sonden verliefen nach gleichem Protokoll.

Die Hybridisierung ist der Prozess der spezifischen Aneinanderlagerung einander komplementärer Sequenzen von Ziel-DNA und Sonden-DNA zu einem neuen DNA-Doppelstrang. Dafür müssen zunächst die Sonden-DNA als auch die Ziel-DNA als Einzelstränge vorliegen. Die Vorbehandlung der Ziel-DNA wurde vorhergehend bereits beschrieben, im Folgenden werden die Aufbereitung und Denaturierung der Sonden-DNA beschrieben. Bei den DNA-Sonden müssen zunächst die unspezifischen repetitiven Sequenzen „abgesättigt“ werden. Hierzu wird der markierten Sonde unmarkierte, sogenannte Konkurrenz-DNA zugesetzt. Dafür wurden die mit Biotin und Digoxigenin markierten Sonden vor dem Gebrauch mit Human-COT-1-DNA behandelt.

Die Sonden werden jeweils in 1,5ml Eppendorf-Tubes pipettiert:

- Sonde 179A6 3µl + 2µl COT-1
- Sonde 148B6 3 µl + 5µl COT-1
- 5 min in der Vakuumzentrifuge trocknen lassen,
- 5µl des Hybridisierungsansatzes 10/10 hinzufügen, sehr gut mischen (Vortex) und 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubieren,
- während der Inkubation 2x mischen (Vortex),
- 5min bei 75°C im Wasserbad denaturieren (Hitzedenaturierung),
- 1min auf Eis stellen,
- 1 Stunde bei 37°C stehen lassen („preanealing“).

Während diesem Prozess lagert sich die Cot-1-DNA, die aus menschlicher Plazenta gewonnen wird und aus einer Fraktion repetitiver DNA-Sequenzen besteht, als

3 MATERIAL UND METHODEN

unmarkierte sogenannte Konkurrenz-DNA an passende unspezifische Sequenzen der Sonden-DNA an.

Im Fall der kombinierten Verwendung von digoxigenin- und biotinmarkierten Sonden, wurden die Sonden, die bei der Hybridisierung zusammen benutzt werden, zusammen pipettiert:

- Sonden 179A6 + 148B6 sehr gut mischen (Vortex) und unter Vermeidung von Blasenbildung auf die Objektträger geben,
- mit Deckgläschen (18/18) bedecken und mit Kleber verkleben (Fixogum, Marabu),
- einige Minuten auf eine Wärmeplatte geben,
- in einer Kammer bei 37°C über Nacht inkubieren.

3.5.1.5 Detektion und Signal-Amplifikation

Nach der Hybridisierung werden zunächst nicht oder nur schwach gebundene DNA-Sequenzen der eingesetzten Sonden abgewaschen. Dann erfolgt die Detektion des Hybridmoleküls. An das Hybridmolekül werden entsprechende fluorochromgekoppelte Moleküle angelagert und können dann fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden. Biotin wird mit fluorochromgekoppeltem Avidin detektiert, Digoxigenin mit fluorochromgekoppeltem Antidigoxigenin-Antikörpern. Um das Hybridisierungssignal zu amplifizieren, werden nach Biotinmarkierung an die fluorochromgekoppelten Moleküle Anti-Avidin-Antikörper und an diese wiederum Avidin angelagert. Nach Digoxigenin-markierungen werden nacheinander zwei passende Antikörper angelagert, von denen der zweite mit Fluorochrom markiert ist.

Arbeitsschritte:

- den Bereich, wo das Deckgläschen war, mit einem Diamantenschreiber markieren und sorgfältig den Kleber entfernen,
- 50% Formamid und 2xSSC auf 43°C vorwärmen, 0,1xSSC auf 60°C vorwärmen,
- die Objektträger werden mit 50% Formamid bei 43°C 5 min unter Bewegung gewaschen, dreimal wiederholen,
- dreimal mit 2X SSC bei 43°C 5 min unter Bewegung waschen,
- dreimal mit 0,1X SSC bei 60°C 5 min unter Bewegung und in Dunkelheit waschen,
- mit 4X SSC + Tween RT 5 min unter Bewegung und in Dunkelheit waschen.

Gleichzeitig werden die Fluoreszenz-markierung und Antikörper vorbereitet:

3 MATERIAL UND METHODEN

Im ersten Schritt fand die Biotin-Detektion mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat) konjugiertem Avidin statt, welches sich als passender Antikörper an die Biotin-moleküle anlagert:

- Antikörper 1: Avidin-FITC: 1ml Bio- Blocking reagent + 1µl Avidin- FITC

Im zweiten Schritt wurden zum einen Anti-Avidin-Antikörper an das biotungebundene Avidin-FITC angelagert, zum anderen fand die Detektion der mit Digoxigenin markierten Sonde statt.

- Antikörper 2: Anti-Avidin/ Anti-Digoxigenin-Rhodamin: 1ml Dig-Blocking Reagent + 10µl Anti-Digoxigenin-Rhodamin + 10µl Anti-Avidin

Der dritte Schritt diente der Amplifikation der Signale. Dies geschah unter erneuter Verwendung von Avidin-FITC, welches sich an die mit Biotin konjugierten Anti-Avidin-Antikörper anlagerte. Um eine Signalverstärkung der mit Digoxigenin markierten Sonden zu erreichen, wurde Texas Red verwendet, welches eine Verbindung mit dem im zweiten Schritt verwendeten Anti-Digoxigenin-Rhodamin eingeht.

- Antikörper 3: Texas-Red: 1ml Bio-Blocking-Reagenz + 1µl Avidin-FITC + 10µl Texasred

Bevor die Ansätze auf die Objektträger gebracht werden, werden sie durch Inversion gemischt und 30 min bei 13.000 rpm und bei 4°C zentrifugiert. Die Tubes sollen ohne Lichteinwirkung sein, um eine Beschädigung des Fluoreszenz zu vermeiden.

Arbeitsschritte:

Auftragen der Antikörper auf die Deckgläschen:

- Schicht 0: bio blocking reagent (ohne Antikörper)
 - 100µl auf jeden Objektträger
 - bei 37°C für 25min inkubieren,
 - kurz in 4xSSC+Tween waschen.
- Schicht 1: Antikörper 1
 - 100µl pro Objektträger
 - bei 37°C für 35min inkubieren,
 - 2x5min in 4xSSC+Tween unter Bewegung waschen,

3 MATERIAL UND METHODEN

- 2x5min in 1xTNT unter Bewegung waschen.

- Schicht 2: Antikörper 2
 - 100µl pro Objektträger
 - bei 37°C für 35min inkubieren,
 - 4x5min in 1xTNT unter Bewegung waschen.

- Schicht 3: Antikörper 3
 - 100µl pro Objektträger
 - bei 37°C für 35min inkubieren,
 - 4x5min in 1xTNT unter Bewegung waschen,
 - 1x3min in 1xPBS unter Bewegung waschen.

Die Objektträger werden mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70%,80% und 100%igem kaltem Ethanol dehydriert und im Dunkeln an der Luft getrocknet.

Zur Gegenfärbung der Chromosomen und zur Konservierung der Hybridisierungsfläche werden zuletzt noch 29µl DAPI pro Objektträger aufgebracht und mit einem 24x60 Deckgläschen abgedeckt.

3.5.1.6 Auswertung

Die FISH-Technik verbindet zytogenetische und molekulargenetische Techniken und ermöglicht durch die Hybridisierung ausgewählter DNA Sonden eine farbige Darstellung ganzer Chromosomen und chromosomaler Subregionen im Fluoreszenzmikroskop. Die Auswertung der FISH-Experimente erfolgt über hochsensitive Kamerasysteme und Computerprogramme für die digitale Bildbearbeitung, die selbst schwache Fluoreszenzsignale zuverlässig nachweisen können und damit die mikroskopische Auswertung deutlich vereinfachen. Vorteile gegenüber den klassischen Bänderungsanalysen sind die höhere Sensitivität sowie der Nachweis chromosomaler Veränderungen direkt im Zellkern. Durch Hitzedenaturierung wird der DNA-Doppelstrang eines Chromosoms und einer markierten DNA-Sonde zum Einzelstrang aufgeschmolzen. Durch Temperaturerniedrigung kann die DNA-Sonde an die komplementäre Basensequenz

3 MATERIAL UND METHODEN

der chromosomalen Ziel-DNA hybridisieren. Die Hybridisierungsstelle wird anschließend im Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar gemacht.

Zur Bildaquirierung wurde der mit DAPI behandelte Objektträger unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Für die Auswertung der FISH-Experimente wurde ein Auflicht-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan) verwendet. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung erfolgte zuerst eine Durchsichtung des Präparats auf in der Metaphase befindliche Zellen, zur Überprüfung der Signalmarkierung und zur Einschätzung des Sonden-hintergrundsignals .

Ausschlaggebend für die Bewertung „homozygot bzw. heterozygot deletiertes Gen“ war das Verhältnis von aberranten zu normalen Zellen beim einzelnen Patienten und das Verhältnis zu den gesunden Kontrollen. Zellen, in denen nur die beiden *Zentromersignale* nachweisbar waren, wiesen auf eine homozygote Deletion des betreffenden Tumorsuppressorgens hin. Konsekutiv sprach das Vorkommen von zwei Zentromersignalen und einem einzelnen Gensondensignal für eine heterozygote Deletion. Eine nichtmutierte (normale Signalkonstellation) Zelle mußte zwei Signale für die Zentromersonden und zwei Signale für die beiden Allele des untersuchten Gens aufweisen. Um Doppelzählungen zu vermeiden, wurde jedes Präparat mäandrierend durchsucht, bis 200 Zellen mit je zwei und zwei Signalen gefunden worden waren. Es wurden die Signale an 200 repräsentativen Interphasekernen ausgezählt und die prozentuale Verteilung der Signale mit aus gesundem Material ermittelten Grenzwerten verglichen. Im Falle einer Separierung der Hybridisierungssignale wurden die Objektträger auf Metaphasen gescreent. Die aufgenommenen Metaphasen wurden karyotypisiert.

3.5.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

3.5.2.1 Beschreibung des Verfahrens der Polymerase-Ketten-Reaktion

Das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion, kurz PCR genannt, dient der Replikation der DNA in den Zellen. Eine DNA-Polymerase synthetisiert neue DNA an einer vorhandenen Nukleinsäure-Matrize. Das besagte Verfahren wurde in den 80er Jahren von Mullis et al. entwickelt [76]. In den Zellen benötigt das Enzym dafür einen Initiator der RNA, eine molekulare Nukleinsäure, die mit der DNA-Matrize hybridisiert und die als Anfang für die Synthese verwendet wird. Im Labor werden synthetische

3 MATERIAL UND METHODEN

Oligonukleotide benutzt, die an die DNA, die amplifiziert werden soll, angelagert werden. Diese dienen als Primer für die DNA-Polymerase.

Folgende Komponenten sind für die Amplifikation von DNA in der PCR nötig: DNA, DNA-Polymerase, Primer (Oligonukleotide mit 15-30 Basen, die komplementär zu den Enden der definierten DNA-Sequenz sind, die amplifiziert werden soll) und ein Gemisch von dNTPs (Desoxyribonukleotidtriphosphate) als Bausteine der zu synthetisierenden DNA. Das Prinzip der PCR ist eine vielfache Hintereinanderreihung dreier Reaktionen, die sich nur in ihrer Inkubationstemperatur unterscheiden. Im ersten Schritt wird die DNA denaturiert, so dass Einzelstränge vorliegen. Beim zweiten Schritt, auch „Annealing“ genannt, lagern sich zugegebene Oligonukleotide, die als Primer fungieren, an die komplementären DNA-Sequenzen. Der dritte und letzte Schritt im Zyklus der PCR ist die Synthese eines komplementären DNA-Stranges durch die DNA-Polymerase. Das Enzym synthetisiert vom 3'-Ende der angelagerten Primer ausgehend einen zur Ursprungs-DNA komplementären DNA-Strang. In jedem weiteren Zyklus dienen die an der Ursprungs-DNA synthetisierten DNA-Stränge wiederum als Matrize zur weiteren Amplifikation von DNA durch die Polymerase. So kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung des zwischen den Primern gelegenen DNA-Abschnittes. Durch die Verwendung der hitzestabilen Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* ist die Automatisierung der Temperaturzyklen möglich, da nicht bei jeder Hitzedenaturierung der DNA das Enzym zerstört wird und anschließend neu hinzugefügt werden muß.

Die Tabelle 3 stellt einen üblichen PCR-Ansatz dar, Tabelle 4 zeigt ein standardisiertes Programm.

Reagenzien	Endvolumen 50µl	Endvolumen 100µl
10x Puffer	5µl	10µl
50mM MgCl ₂	2,5µl	5µl
dNTPs Lösungsvorrat 10mM	1µl	2µl
5'Primer (10pm/µl)	1µl	2µl
3'Primer (10pm/µl)	1µl	2µl
Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0,2µl	0,4µl
DNA	2µl	2µl
Aqua dest	37,3µl	76,6µl

Tabelle 3: Standardisierte Parameter einer PCR Reaktion

3 MATERIAL UND METHODEN

Temperatur	Zeit in min	Anzahl der Zyklen
92°C	3	1
92°C 50°C 72°C	1 1 1	30
72°C 4°C	10 15	1

Tabelle 4: Standardisiertes Programm einer PCR

3.5.2.2 RT PCR (Reverse Transkriptase PCR)

Zur Identifizierung der Translokationspartner wurde das Verfahren der RT-PCR angewendet. Dazu wird die gesamte RNA aus den archivierten tiefgefrorenen Leukozytenproben mit dem Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anschliessend das erwünschte Fragment mittels PCR amplifiziert. Dieses Verfahren erfolgte nach dem Protokoll „Superskript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis“. Bei der cDNA handelt es sich um eine Einzelstrang-DNA, die dann als Matritze für die RT-PCR dient.

Um Fehlpaarungen der Primer mit der DNA zu reduzieren, wurde der Reaktionsansatz auf Eis gemacht. Zudem wurde der Reaktionsansatz in die auf Denaturierungstemperatur vorgeheizte PCR-Maschine gestellt.

3.5.2.3 RACE (rapid amplification cDNA ends)-PCR

Die RACE-PCR dient insbesondere der Charakterisierung von Translokationen, bei denen eines der involvierten Gene bekannt und das andere unbekannt ist, da sowohl unvollständige als auch seltene cDNA Klone in 3' bzw in 5' Richtung vervollständigt werden können. Je nach den gewünschten Enden des Transkripts wird eine für das Transkript spezifische cDNA (5'RACE) oder eine allgemein für die mRNA spezifische cDNA (3'RACE) durch Verwendung eines Oligo(dT)-Primers oder eines Universalprimers synthetisiert. Die RACE-Produkte können vor der anschliessenden Klonierung entweder in einer „nested“ PCR mit zwei für das Produkt spezifischen Primern oder in einer „heminested“ PCR mit nur einem weiteren spezifischen Primer eingesetzt werden, um die quantitative Ausbeute zu erhöhen.

3 MATERIAL UND METHODEN

Ein spezifisches RACE-Produkt ist kein DNA-Fragment distinkter Länge, sondern ein mehr oder weniger heterogenes Gemisch aus Wildtyp-DNA des bekannten Gens und der DNA des rearrangierten Gens. Daher wird an die RACE-PCR eine Agarosegel-Purifizierung angeschlossen, nachdem die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht wurden. Die Banden werden ausgeschnitten und mittels einem DNA-Purifizierungs-Kit gereinigt

Mit der 3`RACE-PCR kann eine 3`-terminal unvollständige cDNA-Information vervollständigt werden. Als Substrat für die 3`RACE fungiert eine allgemein für tRNAs durch die Verwendung eines Universalprimers synthetisierte cDNA. Für die exponentielle Amplifikation werden am 3`Ende ein transkriptspezifischer Primer und am 5`Ende ein Adapterprimer benötigt.

Für die folgenden Aberrationen wurden unten genannte Ansätze gewählt:

Inversion inv(12)(p13;q24)

1. Amplifikation:

- Reaktionsansatz mit den Primern ETV6-F1a und 467 mit einer Konzentration von 0,2pm/μl und einem Endvolumen von 100μl vorbereiten.

2. Amplifikation

- mit dem Produkt der ersten Amplifikation wird eine nested PCR mit den Primern ETV6- F1b und 468 zu einer Konzentration von 0,2pm/μl und einem Endvolumen von 100μl durchgeführt.

Die 2. Amplifikation wird mit 1μl Produkt aus einer 1/50 Verdünnung aus der 1.Runde durchgeführt.

t(2;12)(p21;p13)

1. Amplifikation

- Reaktionsansatz mit den Primern ETV6-5f1 und 467 zu einer Konzentration von 0,2pm/μl und einem Endvolumen von 100μl vorbereiten.

2. Amplifikation

- mit dem Produkt der ersten Amplifikation wird eine nested PCR mit den Primern ETV6-5f2 und 468 zu einer Konzentration von 0,2pm/μl und einem Endvolumen von 100μl durchgeführt.

3 MATERIAL UND METHODEN

Die 2. Amplifikation wird mit 1µl Produkt aus einer 1/50 Verdünnung aus der 1. Runde durchgeführt.

Durch den Einsatz einer 5`RACE-PCR kann eine unbekannte 5`-terminale Information gezielt amplifiziert werden. Das setzt voraus, dass der zu amplifizierende Bereich für die Primeranlagerung von bekannten Regionen flankiert ist. Dafür wird das 3`-Ende mit einem Poly-A-Tail versehen. Somit kann in der PCR mit einem für das Transkript spezifischen Primer und einem am Poly-A-Tail hybridisierenden Oligo(dT)-Primer die Amplifikation erfolgen (Tab. 5).

Reagenzien	Endvolumen
10x Puffer	1µl
MgCl ₂	0,4µl
5mM dATP	0,4µl
Taq. Polymerase	1µl
gereinigte cDNA	1µl
steriles H ₂ O	0,2µl

Tabelle 5: Poly-A Tailing

Die Reaktion inkubiert mit einem Endvolumen von 10µl 30min bei 37°C, anschliessend wird das Enzym bei 70°C 10min inaktiviert.

inv(12)(q24p13)

1. Amplifikation:

- Reaktionsmischung mit den Primern ETV6-3Rb und 467 mit einer Konzentration von 0,2pm/µl und einem Endvolumen von 100µl vorbereiten.

2. Amplifikation:

- ausgehend von 1µl Produkt der ersten Amplifikation wird eine nested PCR mit den Primern ETV6-2A und 468 mit einer Konzentration von 0,2pm/µl und einem Endvolumen von 100µl durchgeführt.

Die 2. Amplifikation wird mit 1µl Produkt aus einer 1/50 Verdünnung aus der 1. Runde durchgeführt.

3 MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 6 soll die Parameter zur Durchführung der 3'- und 5'RACE PCR, die erste Amplifikation und zweite Amplifikation veranschaulichen.

Temperatur	Zeit in min	Anzahl der Zyklen
92°C	3	1
92°C	1	5
62°C	1,5	
72°C	1,5	
92°C	1	30
57°C	1,5	
72°C	1,5	
72°C	10	1
4°C	15	1

Tabelle 6: Standard Programm für die 3'RACE-PCR- und 5'RACE-PCR-Verfahren im Fall der inv(12)(q24;p13)

Durch zwei hintereinander geschaltete PCR-Reaktionen, auch „nested“ PCR genannt, kann man sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität erhöhen. Dafür muss man die Primer für die zweite Amplifikation innerhalb der in der ersten Amplifikation erhaltenen DNA-Sequenzen legen. Als Template für die zweite Amplifikation dient das PCR-Produkt aus der ersten Amplifikation. Von einer „heminested“ PCR spricht man, wenn nur ein Primer bei der zweiten Amplifikation ersetzt wird, der andere entspricht dem aus der ersten Amplifikation.

Die Primer, die für dieses Verfahren Anwendung fanden, wurden kommerziell erworben und sind im Anhang aufgelistet.

t(2;12)(p21;p13)

Ausgehend von 2µl cDNA, die durch das Kit „SuperScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis“ erhalten wurde, wird die erste Amplifikation mit den Initiatoren ETV6-5f1 und 440P5-r1 (0,2pm/µl), 2µl dNTPs und 0,4µl *Taq* DNA Polymerase mit einem Endvolumen von 50µl durchgeführt.

Die heminested PCR wird mit den Initiatoren ETV6- 5f2 und 440P5-r1 (0,2pm/µl) mit einem Endvolumen von 50µl durchgeführt.

Mit der Plasmid-DNA, die nach der Klonierung mit den 3'- und 5'RACE-PCR-Produkten erhalten wurde, wurde zunächst eine Amplifikation mit den Primern M13 rev und M13 for durchgeführt, die komplementär zu Sequenzen des Vektors sind und

3 MATERIAL UND METHODEN

sich ausserhalb des Inserts befinden, um herauszufinden, ob die Plasmid-DNA ein Insert enthält, und wie gross es gegebenenfalls ist.

Bei der Amplifikation werden die Standardparameter einer PCR benutzt, 1µl der Plasmid-DNA und die Primern mit einer Konzentration von 10pm/µl (Tab. 7).

Temperatur	Zeit in min	Anzahl der Zyklen
92°C	3 min	1 Zyklus
92°C 48°C 72°C	1 min 0:30 min 0:30 min	30 Zyklen
72°C 4°C	10 min 15 min	1 Zyklus

Tabelle 7: Programm der M13 PCR

3.5.2.4 Extraktion der RNA

Für die Extraktion der RNA wurde das Protokoll des Kits „RNeasy miniKit (250)“ verwendet.

Nach diesem Schritt wird zusätzlich das „RNase-Free-DNase-Set“ Protokoll angewendet, um jegliche Spuren von DNA zu entfernen.

3.5.2.5 Synthese der cDNA

Um zur RNA komplementäre DNA (cDNA) zu gewinnen, die dann in die PCR eingesetzt werden kann, wurde die RNA dem im Folgenden angeführten Reaktionsansatz nach dem Protokoll der „SuperScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis“ unterzogen.

Das Verfahren wird verwendet, um 1 bis 5µg RNA in cDNA umzuwandeln.

Es gibt zwei verschiedene Vorgehensweisen:

- Einerseits können Initiatoren verwendet werden, die „*random hexamers*“ heißen. Bei dieser Methode dient die gesamte RNA einer Population als Schablone für die cDNA Synthese. Allerdings ist dies unspezifisch
- Andererseits kann mit Initiatoren gearbeitet werden, die Oligo(dT)₁₂₋₁₈ heißen und die mit dem 3`Poly-A Ende hybridisieren, welche sich in der Mehrheit der eukaryontischen RNA finden. Dies ist wesentlich spezifischer.

3 MATERIAL UND METHODEN

Hier wurde das Verfahren mit den „random hexamers“-Primern angewandt. Vor der weiteren Verwendung der cDNA muß diese nach dem Protokoll des „QIAquick Purification“ Kit gereinigt werden.

3.5.3 KLONIERUNG

3.5.3.1 Gewinnung der Plasmid-DNA

Trotz der Anwendung einer „nested“-PCR zur Amplifizierung spezifischer PCR-Produkte findet sich, z.B. bei der RACE-PCR, eine Mischung aus Wildtyp- und rearrangierten Genprodukten, die eine direkte Sequenzierung erschwert. Daher werden die PCR-Produkte kloniert, wozu das „pGEM-T Easy Vector System II Kit“ Verwendung findet. Das DNA-Fragment, welches das zu klonierende Gen enthält, z.B. ein RACE-PCR-Produkt, wird in ein zirkuläres DNA-Molekül, den sogenannten Vektor, eingeschleust, um ein rekombinantes DNA-Molekül zu erhalten. Durch die Aktivität der Bacteriophage-T4-Ligase können Fremd-DNA-Fragmente an die komplementären Enden des linearisierten Plasmidvektors angelagert werden. Dieser Vorgang wird Ligation genannt. Das Ergebnis der Ligation nennt man Plasmid. Plasmide sind extrachromosomal vorkommende, ringförmige DNA-Moleküle.

Bei der nachfolgenden Transformation wird der Vektor in eine Wirtszelle, meist ein modifiziertes Bakterium, in unserem Fall *E.coli*, eingebracht. Bei der Teilung der Wirtszelle werden auch die Kopien der rekombinanten DNA-Moleküle weitergegeben, somit finden weitere Plasmid-Vektor-Replikationen statt. Nach einer großen Anzahl von Zellteilungen entsteht eine Kolonie identischer Wirtszellen, ein Klon. Jede Zelle des Klons enthält eine oder mehrere Kopien der rekombinanten DNA-Moleküle. Es erfolgt eine zweifache Selektion der Bakterienkolonien. Der Klonierungsvektor enthält die Gensequenz für Antibiotikaresistenz gegen Ampicillin. Die Agarmedien für die Bakterienkolonien enthalten eines dieser beiden Antibiotika. Somit können sich nur diejenigen *E.coli*- Stämme, die das Plasmid enthalten und damit antibiotikaresistent sind, vermehren. Um Bakterienkolonien zu unterscheiden, die einen leeren Vektor oder einen Vektor mit dem zu klonierenden DNA-Produkt enthalten, enthält der Vektor die genetische Information der ersten 146 Aminosäuren des β -Galaktosidasegens. In dieser Sequenz liegt die Insertionsstelle für das zu klonierende DNA-Produkt. Solche Vektoren werden für Wirtszellen benutzt, welche für das carboxy-terminale Ende der β -Galaktosidase kodieren. In einem Prozess, der als α -Komplementierung bezeichnet wird, ergeben die Proteinfragmente des β -

3 MATERIAL UND METHODEN

Galaktosidasegens sowie die der Wirtszelle ein enzymatisch aktives Enzym, welches in Anwesenheit von 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktosidase (X-Gal) zur Blaufärbung der Bakterienkolonien führt. Kommt es zu einer Insertion des zu klonierenden DNA-Produktes, so verhindert diese die α -Komplimentierung und die Bakterienkolonien erscheinen weiß.

3.5.3.2 Ligation

Mit Hilfe des pGEM Cloning® Kits können cDNA-Fragmente innerhalb weniger Minuten in den Klonierungsvektor inseriert werden. Die Ligation erfolgte nach dem entsprechenden Protokoll.

3.5.3.3 Transformation

- für jede Ligationsreaktion werden eine LB/Ampicillin/IPTG/X-Gal Platte vorbereitet.
 - Die Röhrrchen mit der Reaktion werden zentrifugiert und 2 μ l davon werden in ein steriles 0,5ml Röhrrchen, das auf Eis steht, pipettiert.
 - JM109 High Efficiency Competent Cells werden aus -70°C ungefähr 5 min auf Eis aufgetaut und direkt zu den 2 μ l zupipettiert (25 μ l Zellen),
 - vorsichtig mischen (nicht vortexen) und 20 min auf Eis inkubieren,
 - exakt 45 sek in einem Wasserbad bei genau 42°C schockerhitzen,
 - danach sofort 2 min auf Eis.
 - 950 μ l SOC Medium in jedes Röhrrchen geben.
 - 1,5 Stunden bei 37°C in Bewegung bei 150 rpm inkubieren,
 - danach 10 min bei 1000 rpm zentrifugieren, 800 μ l Überstand abpipettieren und das Pellet in den verbleibenden 200 μ l SOC Medium resuspendieren,
 - 100 μ l davon auf die LB Platten pipettieren und sorgfältig verteilen.
- Dieser Schritt sollte steril unter Zuhilfenahme eines Bunsenbrenners durchgeführt werden, um Kontaminationen mit anderen Keimen zu vermeiden.
- Über Nacht bei 37°C inkubieren,
 - die weißen Kolonien enthalten ein Insert
 - die Kolonien werden in Elisa-Platten pipettiert, die jeweils 200 μ l LB Medium und Ampicillin enthalten und wiederum über Nacht bei 37°C und 150 rpm inkubiert werden.
 - Die Zellen werden durch „up and down“ pipettieren gemischt und ~1 μ l werden in 20 μ l HPLC Wasser resuspendiert. Aus diesem Ansatz kann dann die Plasmid- DNA isoliert werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.5.3.4 Agar Platten

- 16g Agar in einem Liter LB Medium lösen,
- autoklavieren,
- auf 50°C abkühlen lassen und Ampicillin in einer Konzentration von 100µg/ml zugeben,
- 30-35ml in die Petrischalen (85mm Durchmesser) geben und den Agar hart werden lassen,
- 0,5mM IPTG und 80µg/ml X-GAL auf die Platten verteilen und trocknen lassen,
- von den Bakterien, die den Vektor enthalten, 100µl auf die Platten geben und über Nacht bei 37°C wachsen lassen.

3.5.3.5 Extraktion der Plasmid-DNA

Für die Extraktion der Plasmid-DNA fand das Qiagen Plasmid Mini Kit (25) Protokoll Anwendung

3.5.3.6 Agarosegel

Um die PCR Produkte sichtbar zu machen, wird ein Agarosegel (1%) benötigt.

- 1g Agarose werden in 100ml 1X TAE Puffer gelöst und zum Kochen erhitzt,
- etwas abkühlen lassen und 2µl Ethidiumbromid zugeben. Das Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und macht sie unter UV- Licht sichtbar.
- Das Gel in eine Elektrophoresekammer schütten,
- ist das Gel polymerisiert, können die Proben in vorgefertigte Öffnungen pipettiert werden, dafür werden 15-25µl PCR Produkt mit 3-4µl 6X Träger Puffer IV gemischt.
- Um die Größe bestimmen zu können, werden 7µl DNA-Ladder-Marker benötigt.
- 1 Stunde bei 110 Volt und 0,2 Ampère laufen lassen,
- unter UV- Licht anschauen und dokumentieren.

Die Produkte der zweiten Amplifikation der 3`RACE PCR werden mit einem solchen Gel sichtbar gemacht. Mit einem sterilen Skalpell werden die entsprechenden Fragmente mit einer Größe von 100-500bp, die purifiziert und kloniert werden sollen, ausgeschnitten.

3.5.3.7 Purifikation der DNA aus dem Agarosegel

Für die Purifikation der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel wird das QIAquick-Gel-Extraction-Kit (Qiagen) verwendet und nach entsprechendem Protokoll vorgegangen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.5.3.8 Purifikation der PCR-Produkte

Um die PCR-Produkte in einer Größenordnung zwischen 10 bp und 10 kb von den Resten der Reaktion zu reinigen, das sind nicht gebundene Nukleotide und Primer, Polymerase und Salze, wird das QIAquick-PCR-Purifikation-Kit verwendet und nach entsprechendem Protokoll vorgegangen.

3.5.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde mit BigDye durchgeführt. BigDye-Mix (BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems, Weiterstadt) enthält Puffer, AmpliTaq-DNA-Polymerase, dNTPs und fluoreszenzmarkierte ddNTPs. In Abhängigkeit von der zu sequenzierenden DNA wurden entsprechende Primer eingesetzt, die bei PCR-Produkten der Sequenz des Produktes entsprachen. Für die Amplifikation und den Einbau der markierten ddNTPs wurde das in Tabelle 8 dargestellte PCR-Programm verwendet.

Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurden die Produkte von überschüssigen nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt.

- es werden zwei Reaktionsmischungen vorbereitet. Eine mit dem Initiator M13 for, eine mit dem Initiator M13 rev, jeweils in einem 0,5ml Röhrchen, mit einer Konzentration von 0.75µM.
- 2µl Big Dye Enzym und 6µl 2,5X Puffer zugeben,
- die Probe zugeben und mit Aqua dest. auf ein Volumen von 20µl auffüllen,
- danach die Proben in einer DNA-Fällung reinigen,
- die Proben in ein neues 1,5ml Tube pipettieren,
- 80µl 75% Isopropanol dazugeben, mischen und 15min bei Raumtemperatur inkubieren,
- 20min bei 4°C mit maximaler Umdrehung zentrifugieren,
- sofort vorsichtig den Überstand abpipettieren, ohne das Pellet zu berühren,
- 250µl 70% Ethanol zugeben und 10min bei 4°C mit maximaler Umdrehung zentrifugieren,
- sofort sorgfältig den Überstand abpipettieren, ohne das Pellet zu berühren.
- Die Proben werden an der Luft getrocknet und in dem Institut für Pathologie des UKE mit dem Programm Applied Biosystems Prism (ABI) sequenziert (Tab. 8).

3 MATERIAL UND METHODEN

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
94°C	4 min	1
95°C	30 sec	1
50°C	10 sec	1
60°C	4 min	1
95°C	30 sec	29
50°C	10 sec	
60°C	4 min	
4°C	15 min	1 Zyklus

Tabelle 8: Programm der Sequenzierung mit BigDye

4 ERGEBNISSE

4 ERGEBNISSE

4.1 Detektion von Veränderungen des *ETV6*-Gens mittels FISH

Als erstes wurde ein Kollektiv von 25 Patienten mit zytogenetisch beschriebenen Aberrationen des Chromosoms 12 mittels FISH und spezifischer Sonden für das *ETV6*-Gen untersucht. Das *ETV6*-Gen liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 und ist ein häufiges Ziel-Gen bei Aberrationen, die Chromosom 12 betreffen. Daher wurde in dieser Arbeit dieses Patientenkollektiv mit FISH-Sonden, die das *ETV6*-Gen flankieren, nach *ETV6* Alterationen untersucht. Die ausgewählten Sonden, 179A6 und 148B6, hybridisieren auf Exon 1 bzw. Exon 8 des *ETV6*-Gens (s. 3.5.1), die uns freundlicherweise von Professor P. Marynen von der Universität Leuven in Belgien zur Verfügung gestellt wurden. Im Normalfall würde sich auf beiden Chromosomen 12 ein Fusionssignal beider Sonden zeigen. Durch eine Trennung der Fusionssignale wäre eine Translokation unter Beteiligung des *ETV6*-Gens auf 12p13 gezeigt. Im Falle nur eines Fusionssignals beider Sonden würde dies eine Deletion einer Kopie des *ETV6*-Gen bedeuten. Das Screening mittels FISH mit den spezifischen Sonden für *ETV6* ergab wie Tabelle 9 aufzeigt, folgende Resultate.

Fall	Erkrankung	Karyotyp	FISH	<i>ETV6</i> Gen Status
1	AML	I.46,XX II.4345,XX,del(5)(q15q33),del(7)(q22),del(11)(p14), del(12)(p12) ,-16,-17,-18,-19,-20,+1-3mar,1-6dmin[cp23]	1 Fusionssignal	Deletion
2	AML	47,XX,del(2)(p?21), del(12)(p?12) ,+mar[2]	1 Fusionssignal	Deletion
3	AML	45-47,XY,del(1)(q41)[3],7,t(8;17)(q13;p13), der(12)del(12)(p11)ins(12;?)(q13;?) ,+17,-18,+mar[cp13]	1 Fusionssignal	Deletion
4	AML	42-44,XY,del(5)(q14q32),del(6)(q?22),-7,-8,-10, del(12)(p12) ,-17,+2-3mar[cp6]	1 Fusionssignal	Deletion
5	AML	I.44-45,XY,-4,-5,-7, del(12)(p11) ,-16,-21[6],-22,+4mar[cp8] II.46,XY,?der(2),-4,-5,+2mar[4] III.46,XY[13]	1 Fusionssignal	Deletion
6	AML	45-47,XX,del(5)(q12q33), del(12)(p12) ,del(12)(p13),-13,-13,?der(16),-18,+21,+22,+2mar[cp15]	1 Fusionssignal	Deletion
7	AML	46,XY, del(12)(p11) ,[10]inc	1 Fusionssignal	Deletion
8	AML	46-48,XY,t(3;12)(q21;p13),+8,+21	getrennte Signale	Neue Translokation t(3;12;17)(q21;p13;q2?5)
9	AML	46,XY,add(2)(p12),del(2)(p12),-4[2],t(6;11)(p24;q23),del(8)(q22),add(9)(q12),? del(12)(p13) ,?add(13)(p13),+mar[cp12]	getrennte Signale	Neue Translokation t(2;12)(p21;p13)

4 ERGEBNISSE

Fall	Erkrankung	Karyotyp	FISH	<i>ETV6</i> Gen Status
10	AML	48-50,XY,t(3;12)(q26;p13)[22],-7[6],+9[5],+16[2],-17[3],+18[2],+21[22],+22[22][cp22]	1 Fusionssignal + getrennte Signale	Bekannte Translokation t(3;12)(q26;p13)/ <i>EVI1-ETV6</i>
11	AML	I.45,XY,dic(16;17)(q11;p11)[14] II.45,XY,del(12)(p13),dic(16;17)(q11;p11)[7] III.46,XY[4]	Getrennte Signale und 1 Fusionssignal	Neue Inversion inv(12)(p13q24)
12	AML	49,XX,+6,+8,add(12)(p13),+19[9]	2 Fusionssignale	Normal
13	AML	61-65,XXX,-1,-2,-3,-4,-5,-7,7,+8,+9,add(12)(q23),?del(12)(p11),-16,-17,-17,-18,+add(19)(?q13),-21,-22,+2mar[cp25]	1 Fusionssignal	Deletion
14	MDS	44-45,XY,add(2)(p11)[9],del(5)(q13q33)[6],del(7)(q22)[6],-9[8],del(12)(p11)[9],22[9],+mar1[8],+mar2[6][cp12]	1 Fusionssignal	Deletion
15	MDS	I.44-46,XX,del(5)(q12q34),add(12)(p12),add(19)(q13),+r,+mar[cp14] II.46,XX[1]	1 Fusionssignal	Deletion
16	MDS	t(4;12)(q12;p13),inc	getrennte Signale	Bekannte Translokation t(4;12)(q12;p13) <i>CHIC2-ETV6</i>
17	MDS	I.43-46,XY,del(12)(p11p13)[cp6] II.46,XY[10]	2 Fusionssignale	Normal
18	MDS	44-46,XY,del(1)(p21),+del(1)(q12)[7],del(3)(q26),+del(3)(q21)[7],del(5)(q12q34),-6,-7,-9,+add(12)(p13)[7],-14,+1-3mar [cp3]	1 Fusionssignal	Deletion
19	MPS	I.46,XY,del(12)(p11p13)[22] II.46,XY[3]	1 Fusionssignal	Deletion
20	MPS	der(12)t(12;?),inc	2 Fusionssignale	Normal
21	MPS	t(X;12)(q28;p11),inc	1 Fusionssignal	Deletion
22	CML	43-46,XX,-2[6],-4,-5[14],t(9;22)(q34;q11),-10[4],del(12)(p12),del(13)(q11;q14),-15[3],-16[14],-19[13],-20[14],+der(22)t(9;22)[2],-22[3],+3mar[cp15]	1 Fusionssignal	Deletion
23	CML	48-49,X,Y[8],der(3)add(3)(p21)add(3)(q25)[7],del(3)(p13)[7],-4[8],+6[7],+8[8],t(9;22;?)(q34;q11;?)[6],+10[6],del(12)(p12)[8],-15[7],add(17)(p13)[6],?del(19)(p13)[6],add(19)(q13),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[23],+2mar[8][cp25]	2 Fusionssignale	Normal
24	CML	46,XX,t(9;22)(q34;q11),t(X;12)(q;p),inc	2 Fusionssignale	Normal
25	CML	46,XY,t(9;12;22)(q34;p13;q24)	2 Fusionssignale	Normal

Tabelle 9: Ergebnisse der FISH-Analyse. Die Tabelle zeigt die Fusionssignalkonstellationen, die bei FISH gefunden wurden. Der Genstatus des *ETV6*-Gens ist ebenfalls aufgelistet. Deletion meint, dass eine der beiden Kopien des *ETV6*-Gens deletiert ist. Es handelt sich bei allen beschriebenen Deletionen um heterozygote Deletionen.

4 ERGEBNISSE

4.1.1 Nachweis der Deletion des *ETV6*-Gens mittels FISH

Die konventionelle Zytogenetik beschrieb in 15 Fällen des Patientenkollektivs Deletionen von 12p, dabei handelte es sich in zehn Fällen um eine AML, in zwei Fällen um ein MDS, in einem Fall um ein MPS und in zwei Fällen um eine CML. Mittels FISH konnte in elf Fällen bei den durch konventionelle Zytogenetik nachgewiesenen Deletionen von 12p eine gleichzeitige Deletion des *ETV6*-Gens aufgezeigt werden. In allen beschriebenen Fällen handelt es sich um heterozygote Deletionen. Bei weiteren zwei der 15 zytogenetisch beschriebenen Deletionen konnte keine Deletion des *ETV6*-Gens festgestellt werden, das *ETV6*-Gen war in diesen beiden Fällen ein Wildtyp und zeigte in der Signalkonstellation zwei Signale. Darüber hinaus erwiesen sich zwei weitere Fälle, die zytogenetisch eine Deletionen von 12p beschrieben, als neue Translokationen mit Bruchpunkt innerhalb des *ETV6*-Gens. Diese werden in einem weiter unten aufgeführten Abschnitt separat beschrieben (s. 4.2).

4.1.2 Nachweis der Additionen des *ETV6*-Gens mittels FISH

Des weiteren wurden in drei Fällen zytogenetisch Additionen an Chromosom 12 [add(12p)] beschrieben, wobei zwei Patienten ein MDS aufwiesen und ein Patient eine AML. Mittels FISH konnten bei den zytogenetisch beschriebenen Additionen in zwei Fällen eine Deletion des *ETV6*-Gens nachgewiesen werden. In diesen zwei Fällen führt die Addition von chromosomalem Material an Chromosom 12 zu einer Deletion von DNA-Sequenzen zentromer vom Bruchpunkt, so dass das *ETV6*-Gen involviert und damit deletiert wird.

Bei dem dritten Fall konnte eine normale Signalkonstellation der zwei *ETV6*-Kopien gezeigt werden, so dass in diesem Fall die Addition an Chromosom 12 mehr telomer als bei den beiden anderen Fällen scheint, so dass die Region des *ETV6*-Gens intakt bleibt.

4.1.3 Nachweis der Translokationen des *ETV6*-Gens mittels FISH

Weitere sieben Patienten wiesen zytogenetisch eine Translokation mit Beteiligung des Chromosoms 12 auf. Zwei dieser Patienten litten an einer CML, zwei an einer AML, zwei an einem MPS und einer an einem MDS.

Mittels FISH konnte bei einem der AML- und einem der MDS-Fälle, die bereits bekannten Translokationen t(3;12)(q26;p13) und t(4;12)(q12;p13) mit Bruchpunkt im *ETV6*-Gen bestätigt werden. Die zwei CML-Fälle und der MPS-Fall zeigten keine

4 ERGEBNISSE

Alterationen des *ETV6*-Gens. Bei diesen Fällen ist zwar das Chromosom 12 in die Translokation involviert, der Bruchpunkt liegt aber nicht innerhalb des *ETV6*-Gens. Bei einem vierten Fall kam es bei einem MPS-Patient durch eine Translokation des Chromosoms 12 zu einer Deletion des *ETV6*-Gens. Interessanterweise konnte zudem bei einem AML-Fall eine neue Translokation mit Bruchpunkt im Bereich des *ETV6*-Gens aufgezeigt werden. Dieser Fall wird ebenfalls in einem weiter unten aufgeführten Abschnitt charakterisiert.

4.2 Molekulare Charakterisierung der neue *ETV6*-Translokationen

4.2.1 Translokation t(3;12)(q21;p13)

Bei Fall acht (Tab. 2 u. 9) handelte es sich um einen männlichen Patient, Jahrgang 71, mit einer AML. Leider konnten bei diesem Fall keine weiteren klinischen Daten eruiert werden. Der Karyotyp zeigte eine Translokation t(3;12)(q21;p13). Die zytogenetischen Untersuchungen wurden zum Zeitpunkt des dritten Rezidivs erstellt:

46-48,XY,t(3;12)(q21;p13),+8+21

FISH auf Metaphasen des Patienten mit den *ETV6* spezifischen Sonden 179A6 und 148B6 deckte eine neue Translokation des *ETV6*-Gens auf, an der überraschenderweise auch das Chromosom 17 beteiligt ist. Die Sonde 179A6, die die DNA-Sequenzen des Exon 1 von *ETV6* auf 12p13 repräsentiert, wurde auf dem langen Arm des Chromosoms 17 detektiert. Die Sonde 148B6, die die DNA-Sequenzen des Exon 8 von *ETV6* repräsentiert, blieb auf dem derivativen Chromosom 12 der(12p).

4 ERGEBNISSE

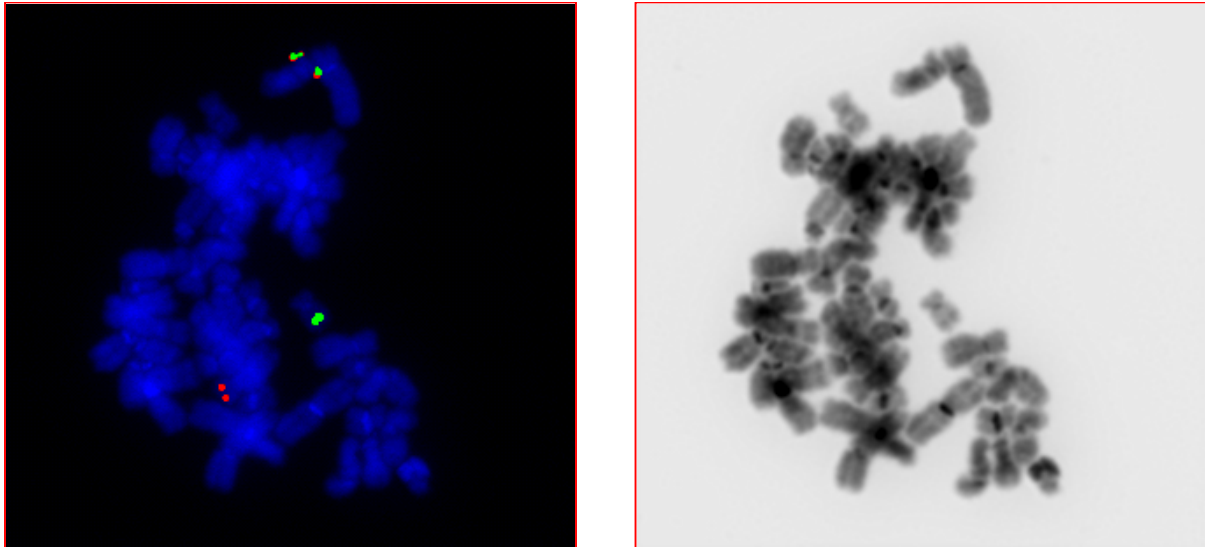


Abbildung 3: FISH-Analyse der $t(3;12)(q21;p13)$ unter Gebrauch der *ETV6* spezifischen Sonden 179A6 (grün) und 148B6 (rot). Hybridisierungssignale können auf dem normalen Chromosom 12, dem derivaten Chromosom 12 und dem derivaten Chromosom 17 gesehen werden.

Weitere FISH-Experimente mit den Sonden 50F4 und der Sonde 163E7 konnten den Bruchpunkt innerhalb des *ETV6*-Gens distal zu Exon 2 eingrenzen. Die Sonde 50F4 enthält Sequenzen des Exon 2 von *ETV6* und wurde auf dem derivativen Chromosom 17, der(17), gesehen. Die Sonde 163E7, die Sequenzen von Exon 3, 4 und 5 enthält, blieb auf der(12). Die FISH-Experimente beschreiben eine mögliche Drei-Wege-Translokation, die die Chromosome 3, 12 und 17 involviert. Die Bestätigung, dass Material von Chromosom 17 auf den langen Arm von Chromosom 3 transloziert wurde, konnte aus Mangel an Patientenmaterial nicht durchgeführt werden. So konnte nach den FISH-Experimenten ein neuer überarbeiteter Karyotyp definiert werden, der wie folgt beschrieben ist:

46-48,XY,t(3;12;17)(q21;p13;q2?5),+8+21

4.2.2 Translokation $t(2;12)(p21;p13)$

Der Patient Nummer neun (Tab. 2 u. 9), ebenfalls männlich, Jahrgang 1934, aus unserem Kollektiv litt an einer AML, FAB M1. Die Erstdiagnose wurde 1996 gestellt. Ein erstes AML-Rezidiv wurde mit einer Polychemotherapie behandelt. Aus der daraufhin aufgetretenen Knochenmarksaplasie resultierte keine Regeneration der normalen Hämatopoese, sondern ein zweites Rezidiv. Daher wurde auf eine weitere aggressive Chemotherapie verzichtet und supportiv mit Thrombozyten- und

4 ERGEBNISSE

Erythrozytentransfusionen therapiert. Der Patient verstarb 1997 an einer Gastrointestinalblutung bei persistierender Thrombozytopenie.

Der Karyotyp wurde im Juli 1997 erstellt. Die zytogenetischen Untersuchungen zeigten eine Deletion des kurzen Armes von Chromosom 12, in 12 von 12 analysierten Metaphasezellen (s. Abb.4):

46,XY,add(2)(p12),del(2)(12),-4[2],t(6;11)(p24;q22),del(8)(q22),add(9)(q12),
?del(12)(p12),?add(13)(p13),+mar[cp12]

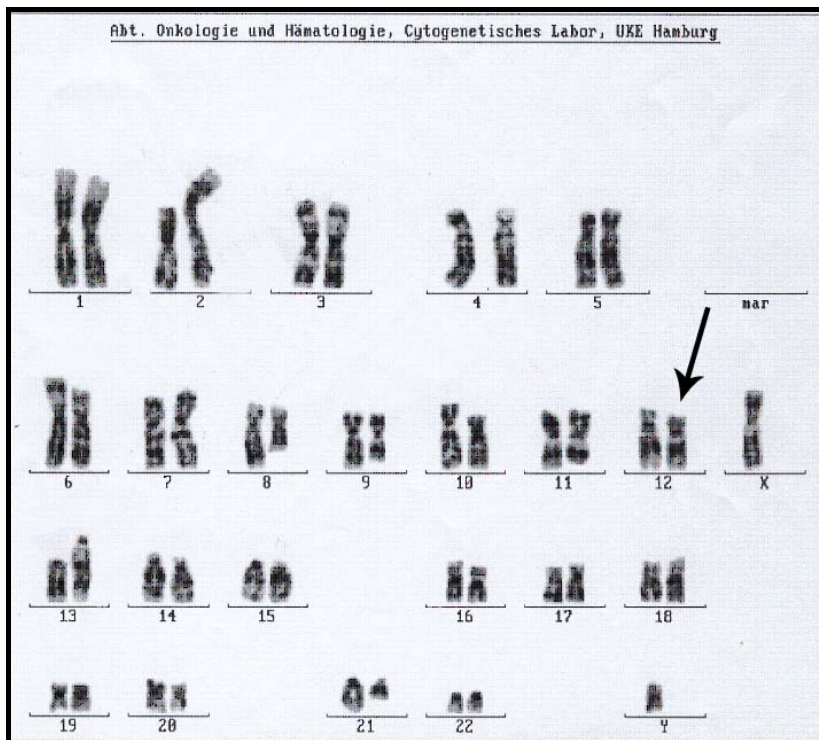


Abbildung 4: Der Giemsa-gebänderte Karyotyp des Patienten 9 zeigt eine del(12)(p12) (siehe Pfeil)

Bei der ersten FISH-Analyse mit den Sonden 179A6 und 148B6 konnte, wie im vorherigen Kapitel 4.1.1 bereits beschrieben, eine Translokation mit Beteiligung des *ETV6*-Gens nachgewiesen werden.

Bei dieser neuen Translokation t(2;12)(p21;p13) konnte das Signal der Sonde 179A6 auf dem Partnerchromosom 2 aufgewiesen werden. Die Sonde 148B6, die auf Sequenzen des Exons 8 von *ETV6* hybridisiert, verblieb auf dem derivativen Chromosom 12 (s. Abb.5).

4 ERGEBNISSE

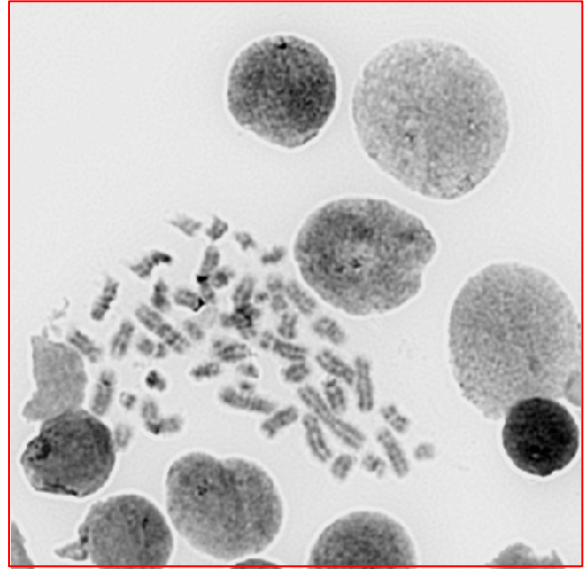
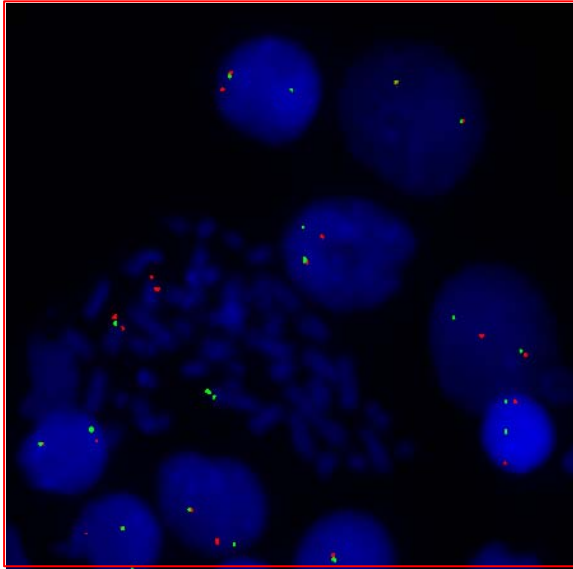


Abbildung 5: FISH-Analyse der $t(2;12)(p21;p13)$ unter Gebrauch der *ETV6* spezifischen Sonden 179A6 (grün) und 148B6 (rot). Hybridisierungssignale können auf dem normalen Chromosom 12, dem der(12), und dem der(2) gesehen werden.

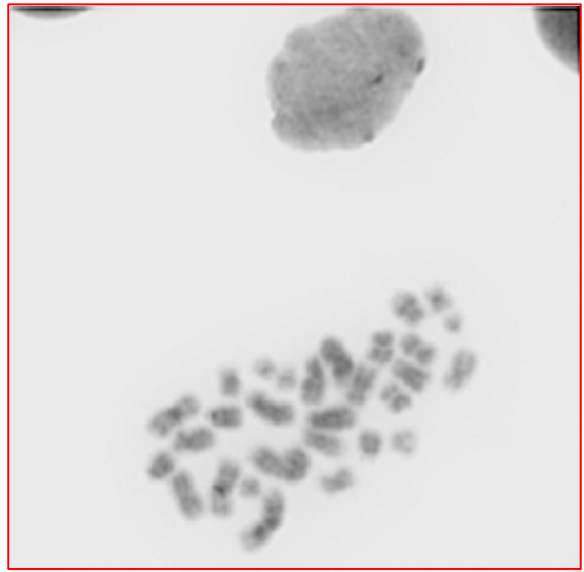
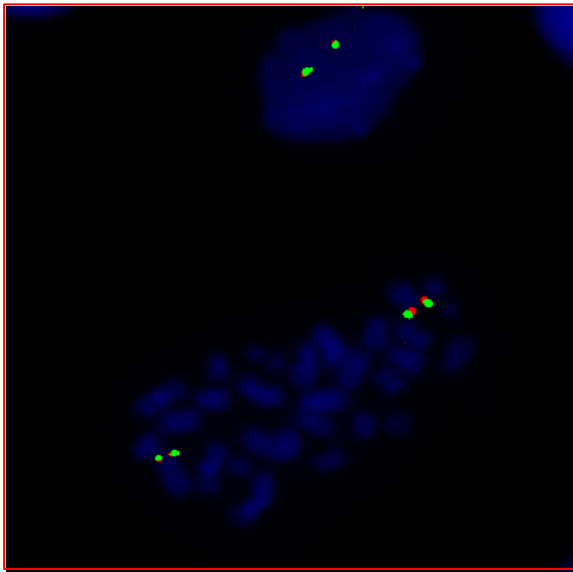


Abbildung 6: FISH-Analyse unter Gebrauch der *ETV6* spezifischen Sonden 50F4 (grün) und 163E7 (rot). Die Metaphase zeigt Fusionshybridisierungssignale auf dem normalen Chromosom 12 und dem der(2) Chromosom, was den Bruchpunkt distal von Exon 5 aufzeigt.

Wie bei dem in 4.2.1 beschriebenen Fall wurden weitere FISH-Untersuchungen durchgeführt, um die Bruchpunkte weiter einzugrenzen. Dies wurde ebenfalls mit den Sonden 50F4 und 163E7 gemacht. Die Signale der Sonden 50F4 und 163E7 präsentierten sich auf dem Chromosom 2 wie die Sonde 179A6. Dies stellt ein Bruch im *ETV6*-Gen distal zu Exon 5 dar. Abbildung 6 zeigt die Hybridisierungssignale bei diesem Experiment.

4 ERGEBNISSE

4.2.3 Inversion $inv(12)(p13;q24)$

Fall elf (Tab. 2 u. 9), ebenfalls männlich, Jahrgang 1938, stellte sich der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik für Onkologie, Hämatologie, Knochenmarktransplantation des Universitätsklinikum Eppendorf mit einer Leukozytose von mehr als $20 \times 10^9/l$, moderatem Gewichtsverlust und Nachtschweiß vor. Klinisch konnte eine Splenomegalie festgestellt werden. Eine Knochenmarkpunktion ergab Infiltration von 44% Myeloblasten und eine Myelofibrose. Die Diagnose akute myeloische Leukämie, FAB M4, die aus einer Osteomyelofibrose entstanden ist, konnte gestellt werden.

Zytogenetische Untersuchungen zeigten einen abnormalen Karyotyp in 21 von 25 Metaphasezellen, mit einem dizentrischen Chromosom, bestehend aus Teilen von Chromosom 16 und 17. Zusätzlich zeigten 7 Metaphasezellen eine Deletion auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 (s. Abb.7):

I.45,XY,dic(16;17)(q11;p11)[14]
II.45,XY,del(12)(p12),dic(16;17)(q11;p11)[7]
III.46,XY[4]

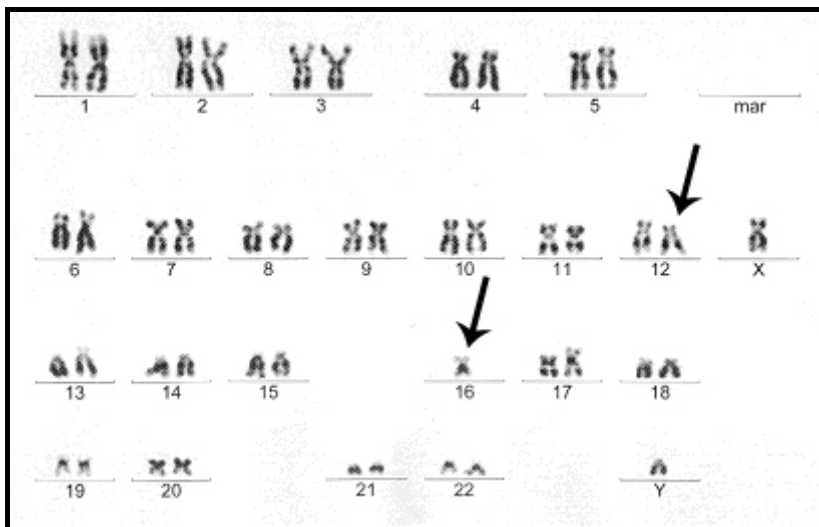


Abbildung 7: Der Giemsa-banded Karyotyp des Patienten 11 zeigt die $del(12)(p12)$ und die $dic(16;17)(q11;p11)$ (siehe Pfeile)

FISH konnte bei diesem Fall die zytogenetisch beschriebenen Deletion als kryptische Inversion $inv(12)(p13;q24)$ aufklären. Bei der Anwendung der Sonden 179A6 und 148B6 konnten in Metaphasezellen des Patienten eine Translokation der Sonde 179A6 auf den langen Arm von Chromosom 12 aufgezeigt werden, während die Sonde 148B6 auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 verblieb. Zusätzlich zu der

4 ERGEBNISSE

Translokation, die in einem 21 % der Zellen gesehen wurde, zeigten 55% der Zellen eine Deletion des *ETV6*-Gens (s. Abb.8).

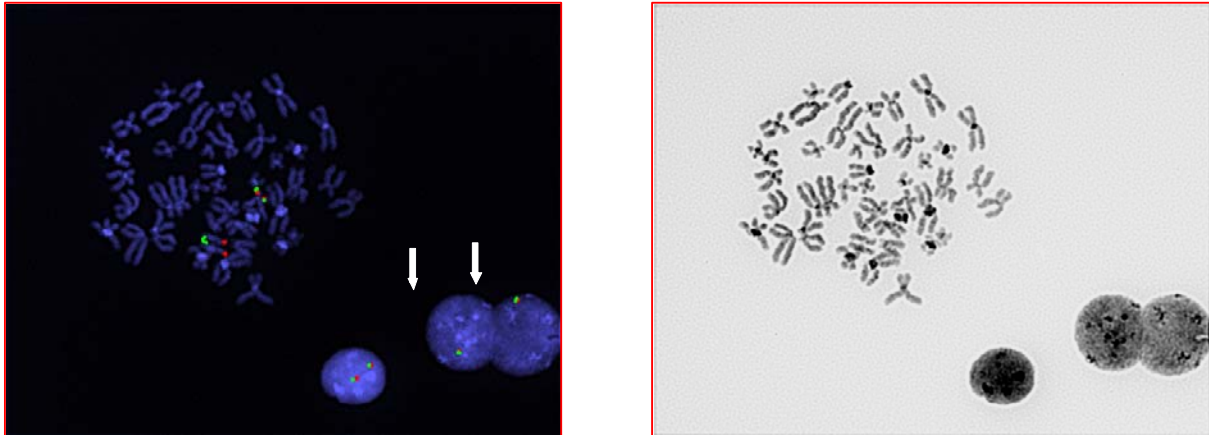
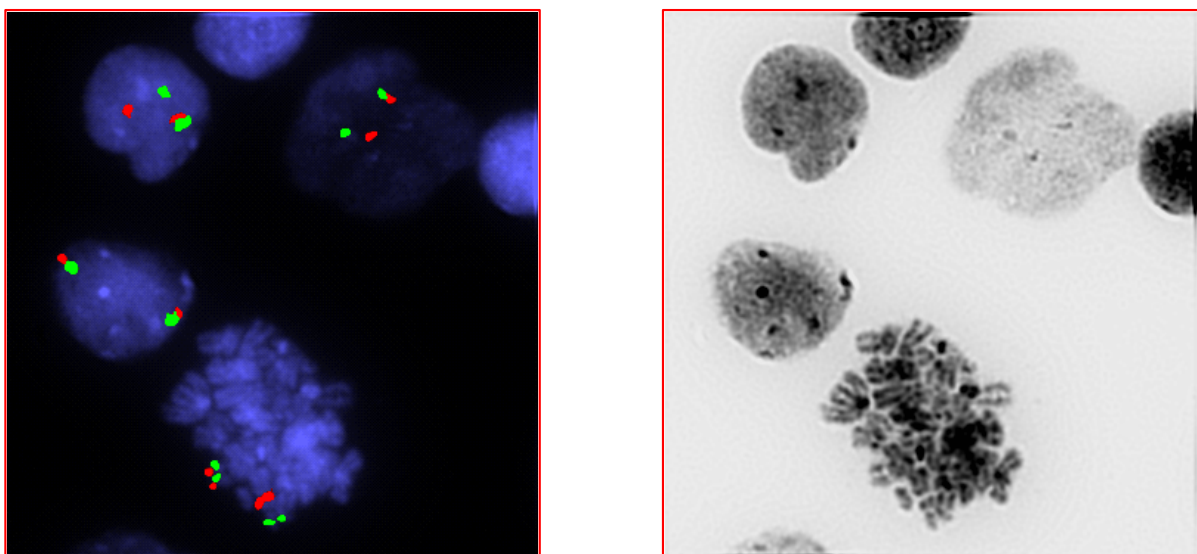


Abbildung 8: FISH-Analyse der *inv(12)* unter Benutzung der *ETV6* spezifischen Sonden 179A6 (grün) und 148B6 (rot). Hybridisierungssignale können auf dem normalen Chromosom 12 und dem derivaten Chromosom 12 gesehen werden. Zwei abnormale Zellen mit einer Deletion *del(12)(p12)*, die ein Fusionssignal zeigen, können ebenso wie eine normale Zelle mit zwei Fusionssignal gesehen werden.

Die nachfolgenden FISH-Untersuchungen zur Eingrenzung des Bruchpunktes mit den Sonden 50F4 und 163E7 ergaben diesen innerhalb des Introns 1 von *ETV6*. Beide Sonden wiesen Fusionssignale auf dem kurzen Arm des Chromosom 12 und dem *der(12)* auf. Um zu bestätigen, dass es sich in diesem Fall um einen balancierten Umtausch von Material zwischen 12p und 12q handelt, wurden die Sonden YAC760G1 und YAC 839F6, die auf 12q22 und 12q24 hybridisieren, angewendet. Dieses Experiment zeigte Hybridisierungssignale der Sonde 839F6 auf 12p, womit die *inv(12p)* verifiziert wurde (s. Abb. 9).



4 ERGEBNISSE

Abbildung 9: FISH-Analyse mit den spezifischen YAC clones 760G1 (12q22) (grün) und 839F6 (12q24) (rot). Die Metaphase zeigt separate Hybridisierungssignale auf dem derivaten Chromosom 12, was die Inversion *inv(12)* bestätigt. Ebenso können separate Signale in zwei Interphasen gezeigt werden.

Folgendes Schema soll die Bruchpunkte der verschiedenen Translokationen darstellen (s. Abb. 10):

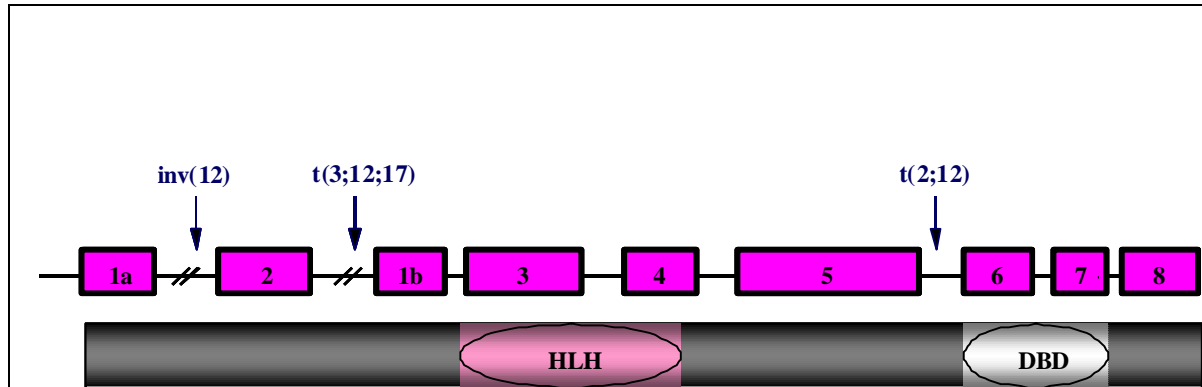


Abbildung 10: Schematische Darstellung des ETV6-Gens mit den Bruchpunkten der neuen Translokationen sowie des ETV6-Proteins.

4.2.4 Identifizierung der Partnergene des *ETV6*-Gens bei der *t(2;12)* und *inv(12)*

Nachdem mittels FISH nachgewiesen werden konnte, dass das ETV6-Gen in drei neue Translokationen involviert ist, sollten in einem weiteren Arbeitsschritt die Partnergene der Fälle *inv(12)* und *t(2;12)* identifiziert werden. Leider war für diesen Schritt bei der Translokation *t(3;12)* nicht genug tiefgefrorenes Material, aus dem die gesamte RNA hätte isoliert werden können, vorhanden.

Um die unbekannt Partnergene zu identifizieren, wurde die RT-PCR-Methode (s. Kap 3.5.4.2) verwendet. Zuvor musste die gesamte Patienten-RNA aus den tiefgefrorenen Leukozyten isoliert werden und in Einzelstrang-cDNA umgeschrieben werden (s. Kap. 3.5.3). Um die Fusionstranskripte zu identifizieren, wurde sowohl die 3'RACE-PCR als auch die 5'RACE-PCR eingesetzt. Im Folgenden werde ich die Ergebnisse für die jeweilige Translokation getrennt beschreiben:

4.2.4.1 *inv(12)(p13;q24)*

Bei diesem Fall fanden sowohl die 3'RACE-PCR als auch die 5'RACE-PCR Anwendung.

Die 3'RACE-PCR- und die 5'RACE-PCR-Produkte sind keine DNA-Fragmente distinkter Länge, sondern ein mehr oder weniger heterogenes Gemisch aus Wildtyp-DNA des bekannten Gens und der DNA des rearrangierten Gens. Deshalb wurden

4 ERGEBNISSE

diese Produkte auf ein Agarose-Gel aufgetragen und Gelstücke ausgeschnitten, aus denen dann die amplifizierte DNA isoliert wurde, um sie für die Klonierung und anschließende Sequenzierung nutzen zu können.

Das in Abbildung 11 gezeigte Gel zeigt die Fragmente der 3'RACE-PCR und der 5'RACE-PCR:

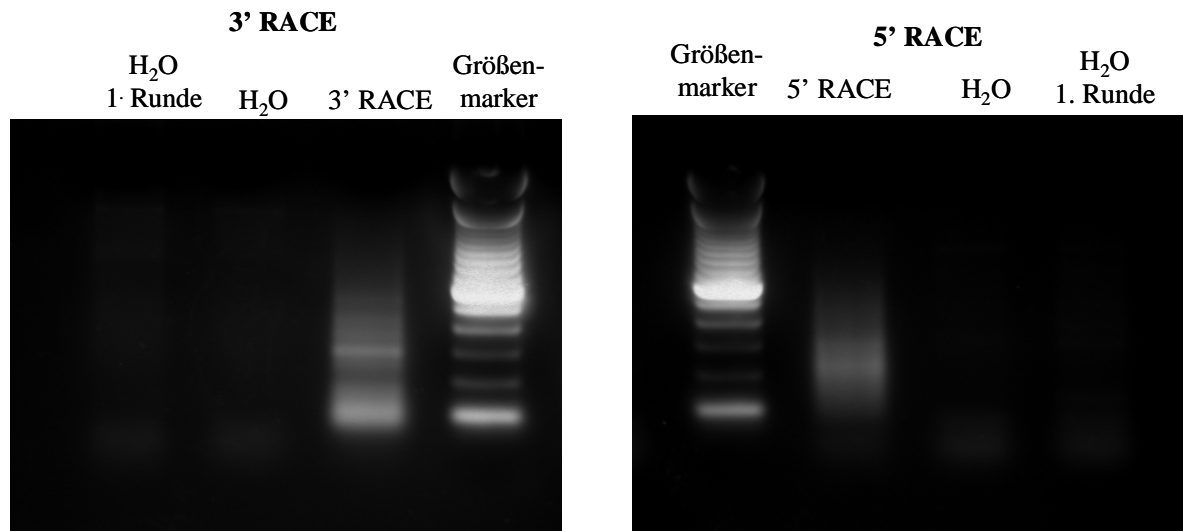


Abbildung 11: 3'RACE-PCR und 5'RACE-PCR zur Isolierung des unbekanntes Partnergens. Das linke Bild stellt die 3'RACE-PCR zusammen mit dem Größenmarker dar, das zweite Bild zeigt das Ergebnis der 5'RACE-PCR zusammen mit dem Größenmarker.

Nach dem in Kapitel 3.5.5 beschriebenen Protokoll wurde die purifizierte DNA aus der 2. Runde der 3'- und 5'RACE-PCR kloniert.

Insgesamt wurden aus den Elisa-Platten mit den klonierten 3'RACE-PCR Produkten 344 Kolonien gepickt, von denen der 5'RACE-PCR Produkte 672 Kolonien.

Da der Bruchpunkt bei der Inversion $inv(12)(p13;q24)$ innerhalb des Introns 1 liegt, konnte durch eine PCR mit den Primern ETV6-F1a und Exon 2-A, die Sequenzen für das Exon 1 und das Exon 2 aufweisen, eventuelle Wildtypen ausgeschlossen werden. Von den insgesamt 1016 gepickten Kolonien ergaben 802 eine Amplifikationsbande bei der obengenannten PCR mit den Primern ETV6-F1a und Exon 2-A. Mit den verbleibenden 214 Kolonien wurde eine PCR mit den Primern M13 rev und M13 for angeschlossen, um festzustellen, welche Kolonie ein Insert hat, und wie groß dieses Insert ist. Von den Produkten der PCR mit den M13 Primern wurden 83 sequenziert. Kriterium für eine Sequenzierung war eine Größe ab 400bp, da allein der Vektor (323bp) und der M13 Primer (83bp) zusammen schon eine Größe von 406bp aufweisen.

4 ERGEBNISSE

Trotz einer grossen Anzahl analysierter Klone konnte ausschliesslich der Wildtyp des *ETV6*-Gen detektiert werden. Deshalb konnten keine Fusionsprodukte des *ETV6*-Gen mit Sequenzen von Chromosom 12q gefunden werden (s. Abb.12).

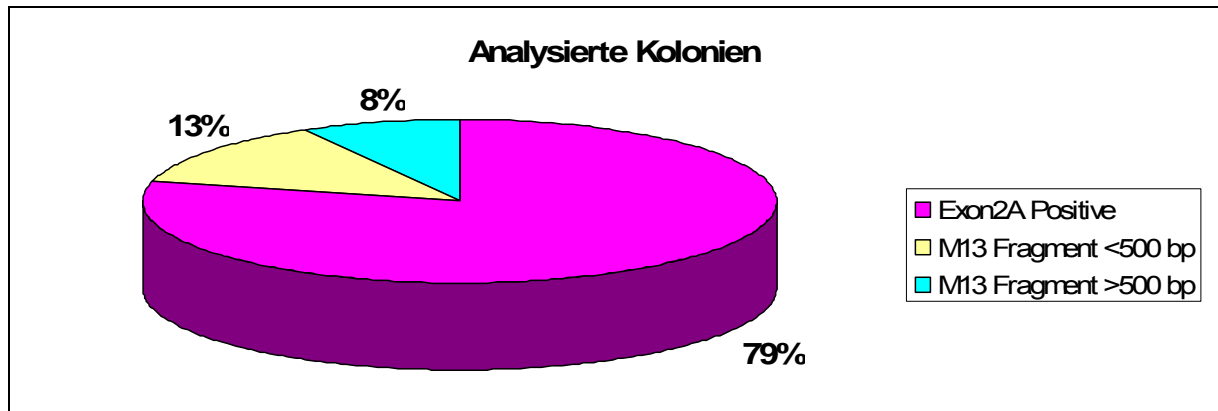


Abbildung 12: Schematische Darstellung der analysierten Kolonien

4.2.4.2 *t(2;12)(p21;p13)*

Bei diesem Fall fand die 3'RACE-PCR Anwendung mit einem Primer, der an das 5'Ende der cDNA-Sequenz von der Region des *ETV6*-Gen bindet, in der sich der Bruchpunkt befindet.

Das Produkt der 3'RACE-PCR wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, die DNA-Produkte nach Grösse aufgetrennt und verschiedene Banden aus dem Gel ausgeschnitten, woraus die DNA isoliert und anschliessend kloniert wurde. Insgesamt wurden 384 Kolonien gepickt und in 4 Elisa-Platten kultiviert. Mit der DNA aus 379 Kolonien wurde eine PCR mit den M13 Primern for und M13 rev angeschlossen. Eine Exon-2A-PCR mit den Primern *ETV6*-F1a und Exon 2-A, um den *ETV6*-Wildtyp auszuschliessen, wurde hier nicht durchgeführt, da sich der Bruchpunkt nicht wie im oben beschriebenen Fall innerhalb des Introns 1 befand. Die FISH-Ergebnisse lokalisierten in diesem Fall den Bruchpunkt distal von Exon 5.

Aus den 379 M13 Produkten wurden 26 Klone sequenziert und analysiert, die eine Grösse von mehr als 400bp (s. Kap. 4.2.4.2) aufwiesen. Die Auswertung erfolgte mittels der BLAST Algorithm (www.ncbi.nih.nlm.gov) (s.Kap. 3.5.6).

Von den 26 analysierten Sequenzen wiesen 23 ein *ETV6*-Wildtyp-Produkt auf. Drei Sequenzen jedoch zeigten einen Verlust der Homologie des *ETV6*-Gens distal zu Exon 7 von *ETV6*. Das zeigt, dass diese drei Sequenzen den Translokationsbruchpunkt enthielten. Der Vergleich dieser neuen Sequenzen, die nicht zu dem *ETV6*-Gen gehörten, mit der human genome sequence

4 ERGEBNISSE

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) zeigte, dass sich diese Sequenzen von Chromosom 2p16.1, BAC Klon RP11-440P5, ableiten (s. Abb. 13).

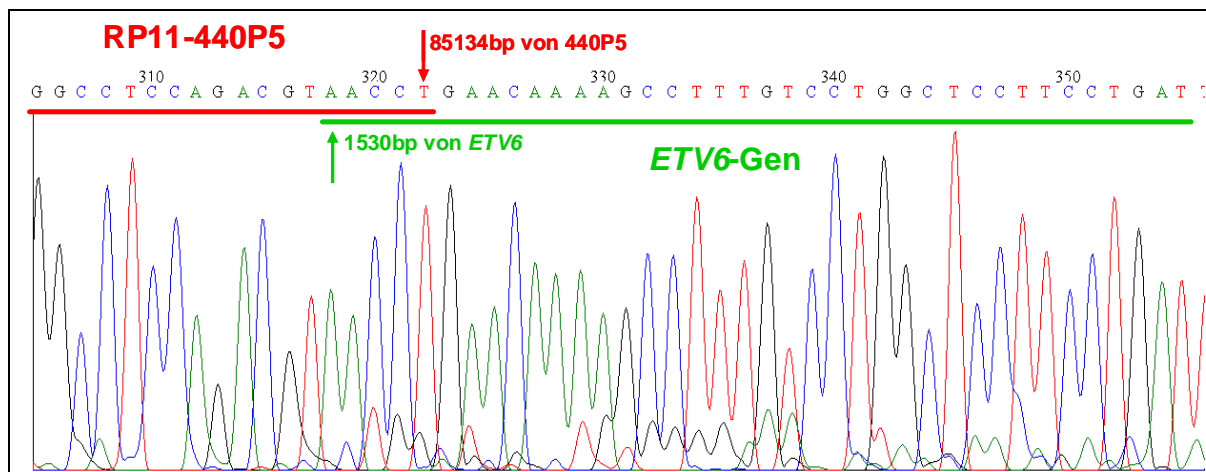


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Sequenzierungsergebnisses der Analyse eines Klon mit der Translokation $t(2;12)(p21;p13)$

Das Fusionsprodukt *ETV6/BAC440P5* wurde mittels RT-PCR mit spezifischen Primern für *ETV6* und solchen für die Region in der Nähe des Bruchpunktes auf Chromosom 2 bestätigt. Die *ETV6*-Primer, *ETV6-5f1* und *ETV6-5f2*, die schon bei der RACE-PCR angewendet wurden, wurden mit einem anti-sense 440P5-Primer (440P5-r1) in zwei Amplifikationsrunden kombiniert. Die RT-PCR-Produkte der 2. Amplifikationsrunde wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und zeigten, wie erwartet, eine Bande von einer Größe von ca. 400bp.

An dieser Stelle ist es wichtig zu erwähnen, dass der Vergleich mit der DATABASE-Suchmaschine eine Fusion des *ETV6*-Gens mit dem Antisensestrang von 440P5 ergeben hat. Dies bedeutet eine sehr komplexe Aberration. Dass die konventionelle zytogenetische Analyse kein Material von Chromosom 2 auf Chromosom 12 ergeben hat, unterstreicht diese Ergebnisse.

Die weitere Charakterisierung dieser komplexen Translokation konnte mit den in dieser Arbeit angewendeten Methoden nicht weiter verfolgt werden.

5 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit zeigt die Identifizierung und Charakterisierung dreier neuer Translokationen mit Beteiligung des *ETV6*-Gens bei AML Patienten. Obwohl die Zytogenetik in allen drei Fällen 12p Abnormalitäten zeigte, deckten die FISH-Experimente neue und unerwartete Veränderungen auf.

Bei einer AML FAB M1 konnte eine Translokation $t(2;12)(p16.1;p13)$, bei einer AML FAB M4 eine $inv(12)(p13;q24)$ und bei einer AML eine $t(3;12;17)(q21;p13;q?25)$ gefunden werden. Bei der weiteren Charakterisierung der Translokationspartner konnte bei der $t(2;12)(p21;p13)$ die BAC RP11-440P5-Sequenz auf Chromosom 2p21 als *ETV6*-Fusionspartner ausgemacht werden, in dessen Region sich das *BCL11A* und das *REL* Gen befinden. Bei den anderen Translokationen konnten keine Fusionspartner aufgezeigt werden (Abb. 14).

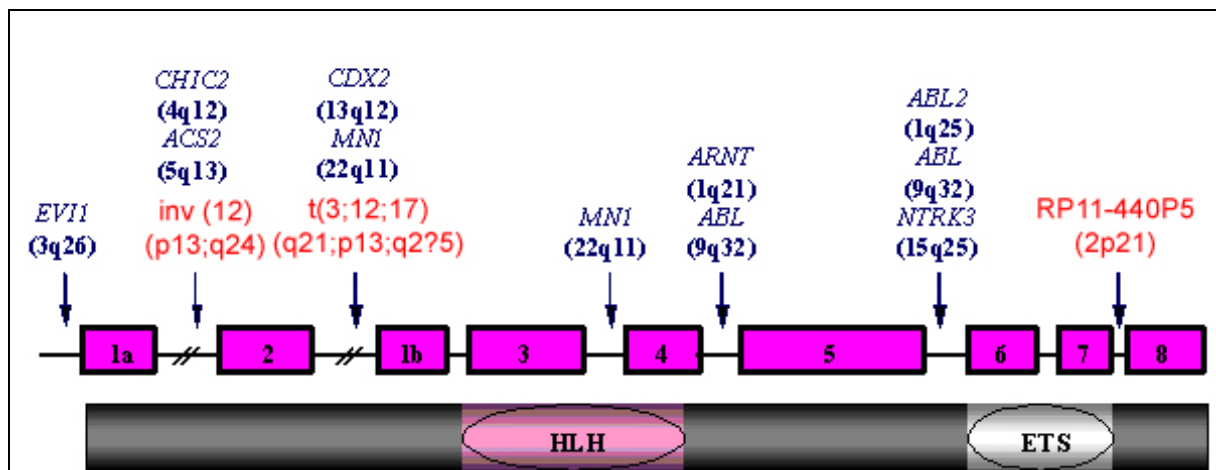


Abbildung 14: Darstellung unterschiedlicher Bruchpunkte innerhalb des *ETV6*-Gens mit den jeweiligen Translokationspartnern, neu sind die Bruchpunkte in Intron 1 und Intron 7, hier rot dargestellt.

Durch FISH konnten in dieser Arbeit bei 15 Fällen mit zytogenetisch beschriebenen Deletionen von 12p in elf Fällen eine gleichzeitige Deletion von *ETV6* nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass FISH eine sehr sensitive und spezifische Methode für molekulare Veränderungen, die das *ETV6*-Gen betreffen, darstellt, was durch eine alleinige zytogenetische Untersuchung nicht möglich ist. Durch einfache Screeninguntersuchungen lässt sich mittels spezifischen Sonden eine Beteiligung des *ETV6*-Gens leicht nachweisen.

5 DISKUSSION

Neben Translokationen, die zu einer Formation von Fusionsgenen oder zu einer Aktivierung von Protoonkogenen führen, in die das *ETV6*-Gen involviert ist, gibt es Hinweise, dass das *ETV6*-Gen als Tumorsuppressorgen dient. In vielen Fällen, in denen das *ETV6*-Gen rearrangiert ist, gibt es eine begleitende Deletion des nicht-rearrangierten Allels von *ETV6*. Dies ist mitunter der Fall in bis zu 70% der Fälle von ALL bei Kindern mit der Translokation t(12;21), die eine *ETV6/RUNX1* Fusion mit sich bringt [18]. Weitere Hinweise, dass *ETV6* als ein Tumorsuppressorgen dienen kann, liefern in vivo und in vitro Studien zu der physiologischen Funktion des *ETV6* Proteins. Ein Verlust dieser Funktion müsste durch weitere Experimente der Proteinexpression des verbliebenen Allels geprüft werden, jedoch ist die Inaktivierung des *ETV6*-Gens durch Deletion, Punktmutation oder „transcriptional silencing“ einer der möglichen Mechanismen für die Ursache von Leukämien.

Diese Erkenntnisse unterstreichen die Wichtigkeit der Veränderungen des *ETV6*-Gens für die Leukämogenese. Daher ist es von grosser Bedeutung, bei AML Patienten ein Screening für mögliche *ETV6*-Deletionen mit spezifischen FISH-Sonden, wie sie in dieser Arbeit verwendet worden sind, durchzuführen.

Bei der Drei-Wege-Translokation (3;12;17)(q21;p13;q2?5), die bei Fall acht, einem Patienten mit einer AML, gefunden wurde, zeigte sich der Bruchpunkt auf Chromosom 12 distal des Intron 2 von *ETV6*, wobei das 5`Ende mit Exon 1 und Exon 2 von *ETV6* auf Chromosom 17q2?5 transloziert wurde und der restliche Teil des Gens, einschliesslich der HLH und ETS Domäne, auf dem der(12) verblieb. Diese Translokation unterscheidet sich von der bisher bekannten Translokation t(12;17)(p13;p12-p13), die durch Murga et al. kloniert wurde und in einer Fusion des *ETV6*-Gens mit dem *PER1*-Gen resultiert [95]. In beiden Fällen ist die Promotorregion von *ETV6* beteiligt, die Zielregion auf Chromosom 17 ist jedoch unterschiedlich. Ungenügendes Material erlaubten jedoch nicht die Identifizierung des Zielgens auf dem langen Arm von Chromosom 17. Potentielle Zielgene auf Chromosom 17q2?5, die möglicherweise durch die Promotorregion von *ETV6* angeregt werden können, sind *SEPT-6* und *SEPT-9*. Diese Gene sind vor allem aus AML-Fällen mit Translokationen t(11;17) bekannt, die das *MLL*-Gen auf Chromosom 11q23 involvieren. Das *MLL*-Gen auf 11q23, das häufig bei akuten Leukämien rearrangiert ist, gehört ähnlich wie das *ETV6*-Gen zu den meist promiskuen Genen und wurde mit mehr als 50 verschiedenen Partnern fusioniert [71;74]. Translokationen, die *SEPT-9* auf 17q25 betreffen, sind bisher in 7 AML-Fällen

5 DISKUSSION

[67;88;121;125;142] und einem MDS-Fall [58] beschrieben. *SEPT-9* gehört zur Septin-Familie von Genen, die eine essentielle Rolle in unterschiedlichen zellulären Prozessen wie Zytokinese, Exozytose, Endozytose, zelluläre Morphogenese und Vesikeltransfer spielen [66]. Die Identifizierung von 5 Septin-Familienmitgliedern, *SEPT-2*, *SEPT-4*, *SEPT-6*, *SEPT-9* und *SEPT-11* als *MLL*-Partnergene, deutet auf einen möglichen Mechanismus bei der Leukemogenese hin [11;20;55;69;125]. Möglicherweise spielen das *SEPT-9* oder das *SEPT-6* Gen dieser Familie auch eine Rolle in der hier beschriebenen Translokation $t(3;12;17)(q26;p13;q27)$. Im Falle dieser komplexen Translokation wurde zudem zytogenetisch beschrieben, dass q21 vom langen Arm von Chromosom 3 auf den kurzen Arm von Chromosom 12 transloziert wurde. Diese Translokation unterscheidet sich von der bereits bekannten $t(3;12)(q26;p13)$, welche in einer Fusion von *ETV6* und *EVI-1* resultiert [78;93]. Hier wurde die Promotorregion von *ETV6* auf Chromosom 3 transloziert. Bei der Translokation dieser Arbeit wurde 3q21 auf Chromosom 12 transloziert. Der Bruchpunkt auf Chromosom 3 liegt in einer Region, die bereits in verschiedene Translokationen bei allen FAB-Subtypen von AML [9;127], MDS [108] und CML [8] involviert ist. Bei der AML sind das vor allem $inv(3)(q21;q26)$ und $t(3;3)(q21;q26)$ [107]. Eine Anzahl von Bruchpunkten im Bereich von 3q21 befindet sich innerhalb einer 30- kb „break point cluster region“ in der Nähe des „Enhancers“ des *RPN-1*-Gens [110;124]. Weitere Bruchpunkte befinden sich in unterschiedlichen Abständen (10-60 kb) zentromer davon [137].

Das *RPN-1*-Gen ist vor allem bekannt durch seine Beteiligung bei dem sogenannten 3q21q26-Syndrom [81;94;124]. Dieses Syndrom, welches bei AML Patienten Dysmegakaryopoiese, Thrombozytose und Mikromegakaryozytose bedingt [32], verursacht diese hämatologische Erkrankungen durch die Induktion der Transkription des *EVI-1*-Gens auf 3q26 durch den „Enhancer“ des *RPN-1*-Gens auf 3q21. Leider konnte wegen ungenügendem Patientenmaterial bei dieser Arbeit das Zielgen auf Chromosom 3 nicht näher identifiziert werden. Jedoch besteht auch in diesem Fall eine mögliche Beteiligung des *RPN-1*-Gens an dem pathologischen Mechanismus.

Da bei der Inversion 12 $inv(12)(p13;q24)$ im Fall elf dieser Arbeit, bei der die Gen-Region 12q24 auf den kurzen Arm von Chromosom 12 transloziert wurde und Intron 1 des *ETV6*-Gens auf den langen Arm von Chromosom 12, kein Fusionstranskript gefunden werden konnte, stellt sich auch hier die Frage nach dem Mechanismus der leukämogenen Transformation. Chromosomale Inversionen sind

5 DISKUSSION

balancierte Rearrangements, die definiert sind als zwei Brüche, bei denen sich das chromosomale Segment nach einer 180° Drehung reinseriert. Eine Inversion kann perizentrisch sein, das heisst, die zwei Bruchpunkte befinden sich jeweils auf der Gegenseite des Zentromers, oder sie kann parazentrisch sein, was bedeutet, die Bruchpunkte befinden sich auf einem Chromosomenarm. In der in dieser Arbeit vorgestellten Inversion $inv(12)(p13;q24)$ handelt es sich um eine perizentrische Inversion. Chromosomale Inversion sind ungewöhnlich bei hämatopoetischen Erkrankungen, sie machen 0,5% der chromosomalen Aberrationen aus, die im Mitelman Katalog gelistet sind [73]. Vor allem sind Inversionen, die Chromosom 12 betreffen, selten. In einer Studie von Welborn et al. wurden 46 Fälle mit verschiedenen hämatologischen Erkrankungen, myeloiden und lymphatischen, vorgestellt, die alle eine Inversion 12 aufwiesen [136].

Es konnten sowohl perizentrische als auch parazentrische Bruchpunkte gefunden werden. Die am häufigsten betroffenen Regionen waren p13 und q24. Die chromosomalen Banden p13 und q24 sind unter den genreichsten Regionen des menschlichen Genoms [77;111].

Ähnlich wie bei dem Fall der $inv(12)(p13;q24)$ Fall wurden in der Literatur *ETV6*-Translokationen beschrieben, unter anderem bei den Translokationen $t(6;12)(q23;p13)$ [123] und $t(5;12)(p31;p13)$ [139], bei denen ebenfalls keine funktionell signifikanten Fusionen identifiziert werden. Auch in der von Cools et al. beschriebenen Translokation $t(4;12)(q11-q12;p13)$, bei der *ETV6* mit einem neuen Gen, *CHIC2(BTL)*, einem palmitoylated membran-associated Protein, fusioniert ist, bleibt die onkogene Funktion zu klären [23;24]. Interessanterweise konnte bei zwei weiteren Fällen mit $t(4;12)(q11-q12;p13)$, bei denen die Bruchpunkte ebenfalls in der Region des *CHIC2* locus waren, keine *ETV6/CHIC2* Fusion gefunden werden. Auch andere Fusionen konnten nicht aufgezeigt werden [25]. Es konnte lediglich eine Fusion zwischen *ETV6* und *HSG2*, das Anti-sense-Gen von *GSH2* gezeigt werden, was aber kein Fusionsprotein hervorbrachte. Ebenso konnte in der von Yagasaki et al. beschriebenen Fusion von *ETV6* und *ACS2* bei der $t(5;12)$ kein funktionierendes Fusionstranskript aufgedeckt werden. Dies wirft die Frage auf, durch welche leukemogenen Mechanismen in diesen Fällen die jeweilige Erkrankung ausgelöst worden ist.

Cools et al. stellten die Hypothese auf, dass in diesen Fällen die Deregulation der Expression von Protoonkogenen, die in der Nachbarschaft der Bruchpunkte auf den

5 DISKUSSION

Partnerchromosomen liegen, einen leukemogenen Mechanismus darstellen, vor allem bei Translokationen, die das 5'Ende von *ETV6* involvieren und wo kein funktionsgemäßes Fusionstranskript vorhanden ist [25]. Dieser Mechanismus wird auch „position effect“ genannt. Dafür wurden von Cools et al. die genomischen Regionen telomer zum Bruchpunkt nach potentiellen Protoonkogenen molekular analysiert. Hierbei wurden für die Bruchpunkte bei 4q11-q12 das Homeoboxgen *GSH2* und für den Bruchpunkt bei 5q31 die Wachstumsfaktorgene *IL-3* und *CSF2* entdeckt. Ebenso konnte die ektope Expression sowohl von *GSH2* in allen Fällen der t(4;12), mit und ohne *ETV6/CHIC2* Fusion, als auch von *IL-3* im Fall der t(5;12) nachgewiesen werden [25].

Zudem konnten von Cools et al. gezeigt werden, dass die Überexpression von *GSH2* NIH3T3 Zelllinien transformiert [25], was den onkogenen Charakter des Gens unterstreicht. Der exakte Mechanismus, durch den die Expression von *GSH2* und *IL-3* aktiviert wird, ist noch nicht klar. Generell ist die Transkriptionsebene eines Gens abhängig von verschiedenen Faktoren und der kombinierten Aktivierung von regulatorischen Sequenzen, die entweder positiv oder negativ sind, sowie der Zugänglichkeit dieser Sequenzen, die wiederum durch die Chromatinstruktur und die Kernarchitektur bestimmt sind [26;53]. Es wird angenommen, dass regulatorische Sequenzen, wie „Enhancer“ von *ETV6* und/oder „Silencer“ des Partnerchromosoms, mit zusätzlichen Effekten, die durch Veränderungen der Chromatinstruktur im Umkreis des Bruchpunktes auftreten, dazu beitragen. Beispielsweise resultieren die Juxtaposition von Protoonkogenen zu dem *RPN1*-Lokus, den *IGH*-Lokus und den *TCR*-Lokus in der deregulierten Expression dieser Onkogene [64;75;98]. Diese Studien haben auch gezeigt, dass der Bruchpunkt bis zu 200bp von dem deregulierten Protoonkogen entfernt lokalisiert sein kann. Zusätzlich zu den Effekten der „Enhancer“ und „Silencer“, sind Translokationen sehr wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass die lokale Chromatinstruktur und Kernarchitektur im Ganzen verändert werden, was auch mit veränderter Genexpression assoziiert sein kann. Diese Ergebnisse lassen auf eine ektope Expression von *GSH2* und *IL-3* schliessen, was als grundlegender leukemogener Mechanismus bei den Translokationen t(4;12)(q11-q12;p13) und t(5;12)(q13;p13), unabhängig von der Präsenz eines Fusionstranskriptes, in Frage kommt.

Da in dem Fall der Inversion inv(12)(p13;q24) bei dieser Arbeit ebenfalls das 5'Ende des *ETV6*-Gens in die Translokation verwickelt ist, und es ebenfalls kein ersichtliches

5 DISKUSSION

Fusionstranskript gab, könnte der oben beschriebene Mechanismus auch in diesem Fall eine Rolle spielen. Hier wäre vor allem das Gen *IGF1* auf q22-q24.1 interessant. *IGF1*, was für die hämatopoetische Zellproliferation von Bedeutung ist, ist in Lymphoblasten überexprimiert und fördert das Wachstum durch einen endokrinen Mechanismus [102;132]. Wie das *IGF1*-Gen könnten auch alle anderen, in Tabelle 10 erwähnten Gene auf 12q in Betracht kommen.

Gene, die auf dem langen Arm von Chromosom 12 (12q) lokalisiert sind, sind in die Hämatopoese und in hämatologische Erkrankungen verwickelt. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die potentiell betroffenen Gene auf 12q.

Chromosom 12	Gene	Aberration	Referenz
12q13.2-q13.3	<i>GLI</i>	amplifiziert in fortgeschrittenem NHL	[100]
12q14	<i>CDK4</i>	amplifiziert bei B-CLL und NHL	[27;56]
12q14.3—q15	<i>MDM2</i>	amplifiziert in refraktärer ALL und AML	[29;40]
12q15	<i>HMGA2</i>	veränderte Expression bei CLL und ALL	[57;113]
12q22-q24.1	<i>IGF1</i>	Expression in Lymphoblasten	[102;133]

Tabelle 10: Chromosomale Bruchpunkte auf 12q und deren Beteiligung an hämatologischen Erkrankungen.

Bei dem Fall neun mit der Translokation t(2;12)(p21;p13) handelt es sich um eine bisher noch nicht beschriebene neue Translokation, die das *ETV6*-Gen betrifft. In dieser Arbeit konnte mittels FISH gezeigt werden, dass der distale *ETV6*-Kosmid Klon 148B6 auf Chromosom 12 blieb, während alle drei andere Klone, 179A6, 50F4 und 163E7, auf dem derivativen Chromosom 2 aufgewiesen wurden. Diese FISH-Signalkonstellation deutet auf einen Bruchpunkt distal zu Exon 5 hin wie in den Translokationen t(1;12)(q25;p13), t(9;12)(q34;p3) und t(12;15)(p13;q25). Diese Translokationen führen jeweils zu einer Fusion der Tyrosinkinase *ABL1*-, *ABL2*- und *NTRK3*-Gene mit dem *ETV6*-Gen und dadurch zu einer Deregulation/Überexpression dieser Partnergene [19;46;89].

Bei dieser Arbeit konnte durch die Sequenzierung ein Fusionsprodukt zwischen *ETV6* und Sequenzen des BAC Klon 440P5 auf Chromosom 2 gesehen werden. Diese Ergebnisse zeigen zum ersten Mal einen Bruchpunkt des *ETV6*-Gens innerhalb des Introns 7, was durch die PCR-Ergebnisse ersichtlich wurde. Die Bruchpunkte bei den *ETV6* Translokationen wurden auf vielen Introns gefunden, nicht aber innerhalb der Introne 6 und 7 (Abb. 13). Ein Zielgen auf Chromosom 2 konnte bei dieser Translokation nicht identifiziert werden.

5 DISKUSSION

Der Pathomechanismus dieser Translokation ist nicht klar, weil solche Brüche innerhalb von *ETV6* noch nicht beschrieben und keine Translokationspartner identifiziert wurden.

Hier könnten alle vier beschriebenen Mechanismen eine Rolle spielen, wobei der Mechanismus der ektopten Expression durch den Einfluss der 5' Region von *ETV6* weniger in Frage kommt, da sich der Bruchpunkt im *ETV6*-Gen am 3' Ende befindet. Ebenfalls scheint der Mechanismus, der bei der Translokation *MN1/ETV6* vordergründig ist, bei dem die ETS-Domäne eine wesentliche Rolle spielt, eher unwahrscheinlich, da der Bruchpunkt in dem Fall neun dieser Arbeit distal der ETS-Domäne liegt [15]. Eine Beteiligung der HLH-Domäne des *ETV6*-Gens als Pathomechanismus ist auch nicht denkbar, da sich der Bruchpunkt dafür wie bei der Fusion von *ETV6/RUNX1* im Bereich des 5' Endes befinden müsste [117].

Vor Kurzem wurde ein vierter Pathomechanismus für *ETV6*-assoziierte Translokationen beschrieben. Wie oben bei der *inv(12)(p13q24)* erklärt ist, können Gene in der Nähe des Bruchpunktes, die kein Fusionsprotein generieren, welches onkogene Eigenschaften aufweisen kann, durch ein „position effect“ dereguliert werden. Auf der anderen Seite könnte das Fusionsprodukt, welches die HLH-Domäne und die Promotorregion enthält zu einer Modulation von Transkriptionsfaktoren oder von Kinasen führen. Ebenso wäre diese Modulation auch für entsprechende Gene in der Nähe des Bruchpunktes möglich.

Leider kodierte das Fusionsprodukt nicht für ein bestimmtes bis jetzt bekanntes Gen. Die BAC 440P5 Sequenz ist 137009 bp gross und enthält die Sequenzen des *BCL11A1*-Gens (73517-81044bp). Es ist erwähnenswert, dass sich möglicherweise im Bruchpunkt ein unbekanntes Gen befindet und dass die beschriebene Translokation doch zu einem Fusionsprodukt führt. Das *BCL11A*-Gen wurde bei der Analyse von Fällen mit B-Zell-Erkrankungen, die eine Translokation *t(2;14)(p13;q32.3)* aufwiesen, entdeckt [114]. *BCL11A* liegt in einer Region, die in rekurrente zytogenetische Abnormalitäten bei lymphoiden Erkrankungen involviert ist [6;33;45;50;51;100;100]. Amplifikationen von 2p13 wurden nicht nur in Subtypen von B-NHL aufgefunden, sondern auch in bis zu 50% der Erstfälle von Hodgkin-Lymphomen. Es wurde vermutet, dass das in der betroffenen Region liegende *REL*-Gen, ein *NF-κB*-Gen-Mitglied, Ziel der Veränderung ist. Analysen von drei Fällen mit aggressiven B-Zell CLL/Immunozytom durch Satterwhite et al. mit *t(4;12)(q32.3;p12)* zeigte Bruchpunkte, die ungefähr 300bp telomer von dem *REL*-Gen lokalisiert waren [114].

5 DISKUSSION

Dieser Bruchpunkt war mit einem Krüppel-Zinkfinger-Gen assoziiert, *BCL11A*, was normalerweise nur in fötalem Hirn und im Keimzentrum von B-Zellen exprimiert wird. Es gibt drei RNA-Isoformen des *BCL11A*-Gens, die sich in der Anzahl der carboxy-terminalen Zinkfinger unterscheiden. Alle drei Isoformen waren als Konsequenz der t(2;14)(q32.3;p13) dereguliert.

Dadurch wird das Gen als Ziel für Amplifikationen auf Chromosom 2p13 interessant. Zusammen mit der Tatsache, dass das Gen bei den Translokationen t(4;12)(p13;q32.3) involviert ist, und der nahen Verbindung zu dem *REL*-Gen auf Chromosom 2p13, lassen darauf schliessen, dass die deregulierte Expression von *BCL11A* eine Rolle in der Pathogenese verschiedener Subtypen von B-NHL und Hodgkin-Lymphomen spielen kann.

Abgesehen von der ektopen Expression benachbarter Protoonkogene durch die Translokation von *ETV6* oder Teilen des *ETV6*-Gens, gibt es noch zwei weitere interessante und relevante Überlegungen, wie es durch Veränderungen auf 12p zu Transformationen kommen kann. Dies soll im Folgenden dargestellt werden.

In vielen Fällen, in denen *ETV6* rearrangiert ist, fällt eine begleitende Deletion des nicht-rearrangierten Allels auf. Die *ETV6*/ *RUNX1* (*AML1*) Fusion, als Ergebnis der Translokation t(12;21)(p13;q22), ist die häufigste genetische Aberration in kindlicher ALL [117]. Diese Translokation wird in 25-30% gefunden und ist oft mit einer zusätzlichen kompletten oder teilweisen Deletion des nicht rearrangierten *ETV6*-Allels assoziiert [103;104;117].

Die Deletion des Wild-typ-Allels (wt-Allel) führt zu einem Verlust der *ETV6*-Expression, was zu der Pathogenese der Erkrankung beitragen kann. Einige Studien konnten zeigen, dass die Deletion des wt-Allels in Fällen mit t(12;21)(p13;q22) nicht der einzige Mechanismus ist, der zum Funktionsverlust von *ETV6* führt [91;96].

Der Verlust von wt-Allel-Expression konnte auch als Folge von kleinen strukturellen Abnormalitäten oder epigenetischen Modifizierungen gefunden werden [91]. *ETV6*-Abnormalitäten sind nicht auf Translokationen oder Deletionen begrenzt. Bis zu 23% aller ALL-Patienten, die keine t(12;21)(p13;q22) aufwiesen, zeigten ein abnormales Expressionsmuster von *ETV6* [1]. So kann eine abnormale Expression oder die Mutation des *ETV6*-Gens zu der Pathogenese der Krankheit beitragen.

Barjesteh et al. untersuchten 300 Fälle mit de novo AML auf somatische heterozygote Mutationen des *ETV6*-Gens. Die Mutationen betrafen sowohl die HLH-Domäne als auch die DNA-Binde-Domäne. Die Proteine, die aus diesen Mutationen

5 DISKUSSION

hervorgingen, waren unfähig, Transkriptionen zu unterdrücken und zeigten dominant-negative Effekte. Zusätzlich wurden in einem Drittel von 77 untersuchten AML-Fällen abnormale Expressionen von *ETV6* beobachtet, wobei kein Zusammenhang mit dem mRNA-Expressionslevel bestand [5].

Yamagata et al. wiesen in einer kürzlich erschienenen Studie nach, dass Deletionen der HLH- oder der DNA-Binde-Domäne von *ETV6* zu einem partiellen Verlust seiner apoptoseinduzierenden Fähigkeiten führt [141]. Die Studie von Yamagata et al. zeigt, dass der antionkogene Effekt von *ETV6* teilweise mit der Aktivierung eines p53-abhängigen Mechanismus zusammenhängt. Interaktionen mit der HLH-Domäne von *ETV6*, die für die Heterodimerisierung mit dem wt-*ETV6* wichtig ist, durch Fusionspartner können die normale Funktion von *ETV6* inhibieren und somit zu der Entwicklung einer Leukämie beitragen.

Diese Ergebnisse könnten auch eine Erklärung für die leukämogenen Mechanismen der in dieser Arbeit vorgestellten Fälle darstellen.

Im Fall elf der inv12(p13;q24) lassen sich sowohl eine Deletion des *ETV6*-Gens finden als auch eine Inversion des Introns 1 mit dem Translation/Transkriptionsstart von *ETV6* auf q24.

Die klinische Bedeutung der Veränderung von *ETV6* mag eher gering sein, die weitere Charakterisierung der Translokation bzw. Inversion kann jedoch Aufschlüsse über den Mechanismus der *ETV6* initiierten Leukämogenese geben.

Um definitiv sagen zu können, ob der pathogene Mechanismus durch ein Funktionsverlust von *ETV6* oder durch eine ektope Stimulation benachbarter Protoonkogene zustande kommt, müssen weitere Experimente durchgeführt werden. Dabei ist es erforderlich, die Expression von *ETV6* oder den in Frage kommenden benachbarten Genen zu prüfen. Weitere Untersuchungen dieser *ETV6*-assoziierten Translokationen, welche nicht zu einer Expression eines funktionsfähigen Fusionsproteins führen, können mögliche allgemeine molekulare Signalwege identifizieren, die durch die Translokationen dereguliert werden. Es müssen weitere genetische Charakterisierungen der erstbeschriebenen Translokationen t(2;12)(p21;p13), t(3;12)(p21;p13) und inv(12)(p13q24) durchgeführt werden, um das Gen oder die Gene zu identifizieren, die durch die genannten Translokationen dereguliert werden. Die Identifikation der deregulierten Kandidatengene kann mittels real-time-RT-PCR erfolgen. Weiterhin kann der Effekt der Kandidatengen-Überexpression auf Proteinebene mittels Westernblot-Analysen untersucht werden.

5 DISKUSSION

Um die Rolle der Kandidatengene in der Leukämogenese zu untersuchen, können „tagged“-Konstrukte der deregulierten Kandidatengene generiert werden. Diese Konstrukte können nachfolgend in Maus NIH3T3- oder BaF3-Zelllinien, welche im Hinblick auf Proliferation, Apoptose und Transformationsfähigkeit gut charakterisiert sind, transfiziert werden.

Im Allgemeinen ist die konventionelle Zytogenetik ausreichend, um zugrunde liegende molekulare Veränderungen zu identifizieren. In bestimmten Fällen, die kryptische Veränderungen einschließen, die möglicherweise mehr als ein spezifisches Gen involvieren, ist die Diagnostik auf der Ebene der Chromosomenbande nicht genug.

FISH und molekulare Techniken ergänzen die klassische Zytogenetik und erlauben eine Identifizierung von Leukämie spezifischen Läsionen mit größerer Präzision.

Andererseits decken solche molekularen Techniken Fusionsgene auf, die der Kenntnis der Partnergene bedürfen und somit eine Heterogenität der Bruchpunkte und folglich aller potentiellen Fusionstranskriptvarianten voraussetzen.

Darüber hinaus erlaubt die molekulare Charakterisierung spezifischer Fusionsgene bis zu einem gewissen Ausmaß die Voraussage der Proteindomäne, die für die maligne Transformation relevant ist.

Diese Arbeit unterstreicht die hohe Beteiligung von *ETV6* an kryptischen Translokationen und die Wichtigkeit von FISH, um diese Rekombinationen aufzudecken und zu charakterisieren.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde ein Kollektiv von Patienten mit myeloischen Neoplasien untersucht. Hierbei wurden neue *ETV6*-Gen-Rearrangierungen identifiziert und mögliche beteiligte Gene auf molekularer Ebene charakterisiert. Dazu wurde die konventionelle zytogenetische Analyse und die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit *ETV6*-spezifischen Sonden bei Patienten mit genetischen Veränderungen der chromosomalen Region 12p13 als Screeningmethode eingesetzt. Die beteiligten Gene wurden anschließend durch Rapid-Amplification-of-cDNA-Ends (RACE)-PCR identifiziert.

Zunächst wurde ein Kollektiv von 25 Patienten mit zytogenetisch beschriebenen Aberrationen des Chromosoms 12p mittels FISH und spezifischer Sonden für das *ETV6*-Gen untersucht. In 15 Fällen zeigte die zytogenetische Analyse Deletionen von 12p, wobei mittels FISH in 11 Fällen eine Beteiligung von *ETV6* aufgezeigt werden konnte. In zwei Fällen war das *ETV6*-Gen nicht beteiligt. Zwei weitere Analysen bei Patienten mit AML ergaben neue Translokationen. Des Weiteren wurden in drei Fällen zytogenetisch Additionen an Chromosom 12 [add(12p)] beschrieben, wobei mittels FISH in zwei Fällen eine Deletion des *ETV6*-Gens nachgewiesen werden konnten. Bei dem dritten Fall konnte eine normale Signalkonstellation der zwei *ETV6*-Kopien gezeigt werden, so dass in diesem Fall die Addition an Chromosom 12 mehr telomerisch als bei den beiden anderen Fällen scheint, so dass die Region des *ETV6*-Gens intakt bleibt.

Weitere sieben Patienten wiesen zytogenetisch eine Translokation mit Beteiligung des Chromosoms 12 auf.

Mittels FISH konnten bei zwei Fällen die bereits bekannten Translokationen t(3;12)(q26;p13) und t(4;12)(q12;p13) mit Bruchpunkt im *ETV6*-Gen bestätigt werden. Drei Fälle zeigten keine Alterationen des *ETV6*-Gens. Bei diesen Fällen ist zwar das Chromosom 12 in die Translokation involviert, der Bruchpunkt liegt aber nicht innerhalb des *ETV6*-Gens. Bei einem vierten Fall kam es bei einer Translokation des Chromosoms 12 zu einer Deletion des *ETV6*-Gens. Interessanterweise konnte zudem bei einem AML-Fall eine neue Translokation mit Bruchpunkt im Bereich des *ETV6*-Gens aufgezeigt werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit zeigt insgesamt die Identifizierung und Charakterisierung dreier neuer Translokationen mit Beteiligung des *ETV6*-Gens bei AML Patienten, die in der Literatur bisher nicht beschrieben wurden.

Bei einer AML FAB M1 konnte eine Translokation t(2;12)(p16.1;p13), bei einer AML FAB M4 eine inv(12)(p13;q24) und bei einer AML eine t(3;12;17)(q21;p13;q2?5) gefunden werden.

Bei der t(2;12)(p16.1;p13) konnte bei den FISH-Analysen ein Bruch im *ETV6*-Gen distal zu Exon 5 dargestellt werden.

Bei der inv(12)(p13;q24) konnte FISH die zytogenetisch beschriebenen Deletion als kryptische Inversion inv(12)(p13;q24) aufklären. Bei der Anwendung der FISH-Sonden konnten in Metaphasezellen des Patienten eine Inversion mit einem Bruchpunkt innerhalb des Intron 1 aufgezeigt werden. Zusätzlich zu der Inversion, die in einem 21 % der Zellen gesehen wurde, zeigten 55% der Zellen eine Deletion des *ETV6*-Gens. Um zu bestätigen, dass es sich in diesem Fall um einen balancierten Umtausch von Material zwischen 12p und 12q handelt, wurden die Sonden YAC760G1 und YAC 839F6, die auf 12q22 und 12q24 hybridisieren, angewendet. Dieses Experiment zeigte Hybridisierungssignale der Sonde 839F6 auf 12p, womit die inv(12p) verifiziert wurde.

Bei der t(3;12;17)(q21;p13;q2?5) konnte mit FISH auf Metaphasen des Patienten mit den *ETV6* spezifischen Sonden eine neue Translokation des *ETV6*-Gens aufgedeckt werden, an der überraschenderweise auch das Chromosom 17 beteiligt ist. Die FISH-Experimente konnten den Bruchpunkt innerhalb des *ETV6*-Gens distal zu Exon 2 eingrenzen.

Bei der weiteren Charakterisierung der Translokationspartner mittels PCR, konnte bei der t(2;12)(p21;p13) die BAC RP11-440P5-Sequenz auf Chromosom 2p21 als *ETV6*-Fusionspartner ausgemacht werden, in dessen Region sich das *BCL11A* und das *REL* Gen befinden. Bei den anderen beiden Translokationen konnten keine Fusionspartner aufgezeigt werden. Bei der inv(12)(p13;q24) konnten bei der weiteren Charakterisierung ausschliesslich Wildtypen des *ETV6*-Gens detektiert werden, bei der t(3;12;17)(q21;p13;q2?5) war nicht ausreichend tiefgefrorenes Material vorhanden um weitere Analysen durchzuführen.

Die genauen leukämogenen Mechanismen sind noch nicht bekannt. Um diese aufzuklären, bedarf es weiterer Analysen.

7 LITERATUR

- (1) Agape P, Gerard B, Cave H, Devaux I, Vilmer E, Lecomte MC, Grandchamp B. Analysis of ETV6 and ETV6-AML1 proteins in acute lymphoblastic leukaemia
1. Br J Haematol 1997 July;98(1):234-9.
- (2) Andreasson P, Johansson B, Arheden K, Billstrom R, Mitelman F, Hoglund M. Deletions of CDKN1B and ETV6 in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes without cytogenetic evidence of 12p abnormalities. Genes Chromosomes Cancer 1997 June;19(2):77-83.
- (3) Arnold, J. Beobachtung über Kernteilung in den Zellen der Geschwülste. 1879. Virchows Arch:(PatholAnat.)78:279(1879).
Ref Type: Generic
- (4) Baens M, Peeters P, Guo C, Aerssens J, Marynen P. Genomic organization of TEL: the human ETS-variant gene 6. Genome Res 1996 May;6(5):404-13.
- (5) Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, Spensberger D, de KY, Tang M, Lowenberg B, Delwel R. Somatic heterozygous mutations in ETV6 (TEL) and frequent absence of ETV6 protein in acute myeloid leukemia. Oncogene 2005 June 9;24(25):4129-37.
- (6) Barth TF, Dohner H, Werner CA, Stilgenbauer S, Schlotter M, Pawlita M, Lichter P, Moller P, Bentz M. Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in primary large B-cell lymphomas of the gastrointestinal tract
2. Blood 1998 June 1;91(11):4321-30.
- (7) Bassuk AG, Leiden JM. The role of Ets transcription factors in the development and function of the mammalian immune system. Adv Immunol 1997;64:65-104.
- (8) Bernstein R, Bagg A, Pinto M, Lewis D, Mendelow B. Chromosome 3q21 abnormalities associated with hyperactive thrombopoiesis in acute blastic transformation of chronic myeloid leukemia
1. Blood 1986 September;68(3):652-7.
- (9) Bitter MA, Neilly ME, Le Beau MM, Pearson MG, Rowley JD. Rearrangements of chromosome 3 involving bands 3q21 and 3q26 are associated with normal or elevated platelet counts in acute nonlymphocytic leukemia
1. Blood 1985 December;66(6):1362-70.
- (10) Boccuni P, MacGrogan D, Scandura JM, Nimer SD. The human L(3)MBT polycomb group protein is a transcriptional repressor and interacts physically and functionally with TEL (ETV6). J Biol Chem 2003 April 25;278(17):15412-20.
- (11) Borkhardt A, Teigler-Schlegel A, Fuchs U, Keller C, Konig M, Harbott J, Haas OA. An ins(X;11)(q24;q23) fuses the MLL and the Septin 6/KIAA0128 gene in

7 LITERATUR

- an infant with AML-M2
4. *Genes Chromosomes Cancer* 2001 September;32(1):82-8.
- (12) Bovari T. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. 1914. Verlag Gustav Fischer Jena.
Ref Type: Generic
- (13) Budillon A. Molecular genetics of cancer. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer* 1995 November 15;76(10):1869-73.
- (14) Buijs A, Sherr S, van BS, van BS, van der PD, Geurts van KA, Riegman P, Lekanne DR, Zwarthoff E, Hagemeijer A, . Translocation (12;22) (p13;q11) in myeloproliferative disorders results in fusion of the ETS-like TEL gene on 12p13 to the MN1 gene on 22q11. *Oncogene* 1995 April 20;10(8):1511-9.
- (15) Buijs A, Van RL, Molijn AC, Davis JN, Vertegaal AC, Potter MD, Adams C, van BS, Zwarthoff EC, Roussel MF, Grosveld GC. The MN1-TEL fusion protein, encoded by the translocation (12;22)(p13;q11) in myeloid leukemia, is a transcription factor with transforming activity. *Mol Cell Biol* 2000 December;20(24):9281-93.
- (16) Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, Pettenati MJ, Patil SR, Rao KW, Watson MS, Koduru PR, Moore JO, Stone RM, Mayer RJ, Feldman EJ, Davey FR, Schiffer CA, Larson RA, Bloomfield CD. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461)
2. *Blood* 2002 December 15;100(13):4325-36.
- (17) Carroll M, Tomasson MH, Barker GF, Golub TR, Gilliland DG. The TEL/platelet-derived growth factor beta receptor (PDGF beta R) fusion in chronic myelomonocytic leukemia is a transforming protein that self-associates and activates PDGF beta R kinase-dependent signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 December 10;93(25):14845-50.
- (18) Cave H, Cacheux V, Raynaud S, Brunie G, Bakkus M, Cochaux P, Preudhomme C, Lai JL, Vilmer E, Grandchamp B. ETV6 is the target of chromosome 12p deletions in t(12;21) childhood acute lymphocytic leukemia
1. *Leukemia* 1997 September;11(9):1459-64.
- (19) Cazzaniga G, Tosi S, Aloisi A, Giudici G, Daniotti M, Pioltelli P, Kearney L, Biondi A. The tyrosine kinase abl-related gene ARG is fused to ETV6 in an AML-M4Eo patient with a t(1;12)(q25;p13): molecular cloning of both reciprocal transcripts. *Blood* 1999 December 15;94(12):4370-3.
- (20) Cerveira N, Correia C, Bizarro S, Pinto C, Lisboa S, Mariz JM, Marques M, Teixeira MR. SEPT2 is a new fusion partner of MLL in acute myeloid leukemia with t(2;11)(q37;q23)
4. *Oncogene* 2006 October 5;25(45):6147-52.

7 LITERATUR

- (21) Chakrabarti SR, Nucifora G. The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 November 2;264(3):871-7.
- (22) Chase A, Reiter A, Burci L, Cazzaniga G, Biondi A, Pickard J, Roberts IA, Goldman JM, Cross NC. Fusion of ETV6 to the caudal-related homeobox gene CDX2 in acute myeloid leukemia with the t(12;13)(p13;q12). *Blood* 1999 February 1;93(3):1025-31.
- (23) Cools J, Bilhou-Nabera C, Wlodarska I, Cabrol C, Talmant P, Bernard P, Hagemeijer A, Marynen P. Fusion of a novel gene, BTL, to ETV6 in acute myeloid leukemias with a t(4;12)(q11-q12;p13). *Blood* 1999 September 1;94(5):1820-4.
- (24) Cools J, Mentens N, Marynen P. A new family of small, palmitoylated, membrane-associated proteins, characterized by the presence of a cysteine-rich hydrophobic motif. *FEBS Lett* 2001 March 16;492(3):204-9.
- (25) Cools J, Mentens N, Odero MD, Peeters P, Wlodarska I, Delforge M, Hagemeijer A, Marynen P. Evidence for position effects as a variant ETV6-mediated leukemogenic mechanism in myeloid leukemias with a t(4;12)(q11-q12;p13) or t(5;12)(q31;p13). *Blood* 2002 March 1;99(5):1776-84.
- (26) Cremer C, Munkel C, Granzow M, Jauch A, Dietzel S, Eils R, Guan XY, Meltzer PS, Trent JM, Langowski J, Cremer T. Nuclear architecture and the induction of chromosomal aberrations. *Mutat Res* 1996 November;366(2):97-116.
- (27) Decker T, Schneller F, Hipp S, Miething C, Jahn T, Duyster J, Peschel C. Cell cycle progression of chronic lymphocytic leukemia cells is controlled by cyclin D2, cyclin D3, cyclin-dependent kinase (cdk) 4 and the cdk inhibitor p27. *Leukemia* 2002 March;16(3):327-34.
- (28) Erickson P, Gao J, Chang KS, Look T, Whisenant E, Raimondi S, Lasher R, Trujillo J, Rowley J, Drabkin H. Identification of breakpoints in t(8;21) acute myelogenous leukemia and isolation of a fusion transcript, AML1/ETO, with similarity to Drosophila segmentation gene, runt. *Blood* 1992 October 1;80(7):1825-31.
- (29) Faderl S, Kantarjian HM, Estey E, Manshouri T, Chan CY, Rahman EA, Kornblau SM, Cortes J, Thomas DA, Pierce S, Keating MJ, Estrov Z, Albitar M. The prognostic significance of p16(INK4a)/p14(ARF) locus deletion and MDM-2 protein expression in adult acute myelogenous leukemia. *Cancer* 2000 November 1;89(9):1976-82.
- (30) Fears S, Gavin M, Zhang DE, Hetherington C, Ben-David Y, Rowley JD, Nucifora G. Functional characterization of ETV6 and ETV6/CBFA2 in the regulation of the MCSFR proximal promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 March 4;94(5):1949-54.

7 LITERATUR

- (31) Fenrick R, Amann JM, Lutterbach B, Wang L, Westendorf JJ, Downing JR, Hiebert SW. Both TEL and AML-1 contribute repression domains to the t(12;21) fusion protein. *Mol Cell Biol* 1999 October;19(10):6566-74.
- (32) Fonatsch C, Gudat H, Lengfelder E, Wandt H, Silling-Engelhardt G, Ludwig WD, Thiel E, Freund M, Bodenstern H, Schwieder G, . Correlation of cytogenetic findings with clinical features in 18 patients with inv(3)(q21q26) or t(3;3)(q21;q26)
1. *Leukemia* 1994 August;8(8):1318-26.
- (33) Goff LK, Neat MJ, Crawley CR, Jones L, Jones E, Lister TA, Gupta RK. The use of real-time quantitative polymerase chain reaction and comparative genomic hybridization to identify amplification of the REL gene in follicular lymphoma
1. *Br J Haematol* 2000 November;111(2):618-25.
- (34) Golub TR. TEL gene rearrangements in myeloid malignancy. *Hematol Oncol Clin North Am* 1997 December;11(6):1207-20.
- (35) Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* 1994 April 22;77(2):307-16.
- (36) Golub TR, Barker GF, Stegmaier K, Gilliland DG. Involvement of the TEL gene in hematologic malignancy by diverse molecular genetic mechanisms. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;211:279-88.
- (37) Golub TR, Goga A, Barker GF, Afar DE, McLaughlin J, Bohlander SK, Rowley JD, Witte ON, Gilliland DG. Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the Ets protein TEL in human leukemia. *Mol Cell Biol* 1996 August;16(8):4107-16.
- (38) Golub TR, McLean T, Stegmaier K, Carroll M, Tomasson M, Gilliland DG. The TEL gene and human leukemia. *Biochim Biophys Acta* 1996 August 8;1288(1):M7-10.
- (39) Graves BJ, Petersen JM. Specificity within the ets family of transcription factors. *Adv Cancer Res* 1998;75:1-55.
- (40) Gu L, Findley HW, Zhou M. MDM2 induces NF-kappaB/p65 expression transcriptionally through Sp1-binding sites: a novel, p53-independent role of MDM2 in doxorubicin resistance in acute lymphoblastic leukemia
4. *Blood* 2002 May 1;99(9):3367-75.
- (41) Guidez F, Petrie K, Ford AM, Lu H, Bennett CA, MacGregor A, Hannemann J, Ito Y, Ghysdael J, Greaves M, Wiedemann LM, Zelent A. Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein. *Blood* 2000 October 1;96(7):2557-61.
- (42) Haferlach T, Kern W, Schoch C, Schnittger S, Sauerland MC, Heinecke A, Buchner T, Hiddemann W. A new prognostic score for patients with acute myeloid leukemia based on cytogenetics and early blast clearance in trials of

7 LITERATUR

- the German AML Cooperative Group
5. *Haematologica* 2004 April;89(4):408-18.
- (43) Hansemann D. Über asymmetrische Karyogenese in Krebszellen. *Archiiv für Physiologie*:366-367. 1890.
Ref Type: Generic
- (44) Hiebert SW, Sun W, Davis JN, Golub T, Shurtleff S, Buijs A, Downing JR, Grosveld G, Rousell MF, Gilliland DG, Lenny N, Meyers S. The t(12;21) translocation converts AML-1B from an activator to a repressor of transcription. *Mol Cell Biol* 1996 April;16(4):1349-55.
- (45) Houldsworth J, Mathew S, Rao PH, Dyomina K, Louie DC, Parsa N, Offit K, Chaganti RS. REL proto-oncogene is frequently amplified in extranodal diffuse large cell lymphoma
3. *Blood* 1996 January 1;87(1):25-9.
- (46) Iijima Y, Ito T, Oikawa T, Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Kamada N, Kishi K, Asano S, Sakaki Y, Sato Y. A new ETV6/TEL partner gene, ARG (ABL-related gene or ABL2), identified in an AML-M3 cell line with a t(1;12)(q25;p13) translocation. *Blood* 2000 March 15;95(6):2126-31.
- (47) Iijima Y, Okuda K, Tojo A, Tri NK, Setoyama M, Sakaki Y, Asano S, Tokunaga K, Kruh GD, Sato Y. Transformation of Ba/F3 cells and Rat-1 cells by ETV6/ARG. *Oncogene* 2002 June 27;21(28):4374-83.
- (48) Janknecht R, Nordheim A. Gene regulation by Ets proteins. *Biochim Biophys Acta* 1993 December 23;1155(3):346-56.
- (49) John HA, Birnstiel ML, Jones KW. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 1969 August 9;223(206):582-7.
- (50) Joos S, Kupper M, Ohi S, von BF, Mechttersheimer G, Bentz M, Marynen P, Moller P, Pfreundschuh M, Trumper L, Lichter P. Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells
9. *Cancer Res* 2000 February 1;60(3):549-52.
- (51) Joos S, Otano-Joos MI, Ziegler S, Bruderlein S, du MS, Bentz M, Moller P, Lichter P. Primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma is characterized by gains of chromosomal material including 9p and amplification of the REL gene 13. *Blood* 1996 February 15;87(4):1571-8.
- (52) Jousset C, Carron C, Boureux A, Quang CT, Oury C, Dusanter-Fourt I, Charon M, Levin J, Bernard O, Ghysdael J. A domain of TEL conserved in a subset of ETS proteins defines a specific oligomerization interface essential to the mitogenic properties of the TEL-PDGFR beta oncoprotein. *EMBO J* 1997 January 2;16(1):69-82.
- (53) Kadonaga JT. Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell* 1998 February 6;92(3):307-13.

7 LITERATUR

- (54) Knezevich SR, McFadden DE, Tao W, Lim JF, Sorensen PH. A novel ETV6-NTRK3 gene fusion in congenital fibrosarcoma. *Nat Genet* 1998 February;18(2):184-7.
- (55) Kojima K, Sakai I, Hasegawa A, Niiya H, Azuma T, Matsuo Y, Fujii N, Tanimoto M, Fujita S. FLJ10849, a septin family gene, fuses MLL in a novel leukemia cell line CNLBC1 derived from chronic neutrophilic leukemia in transformation with t(4;11)(q21;q23)
1. *Leukemia* 2004 May;18(5):998-1005.
- (56) Korz C, Pscherer A, Benner A, Mertens D, Schaffner C, Leupolt E, Dohner H, Stilgenbauer S, Lichter P. Evidence for distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes
2. *Blood* 2002 June 15;99(12):4554-61.
- (57) Kottickal LV, Sarada B, Ashar H, Chada K, Nagarajan L. Preferential expression of HMGI-C isoforms lacking the acidic carboxy terminal in human leukemia
1. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 January 14;242(2):452-6.
- (58) Kreuziger LM, Porcher JC, Ketterling RP, Steensma DP. An MLL-SEPT9 fusion and t(11;17)(q23;q25) associated with de novo myelodysplastic syndrome
1. *Leuk Res* 2007 August;31(8):1145-8.
- (59) Kuno Y, Abe A, Emi N, Iida M, Yokozawa T, Towatari M, Tanimoto M, Saito H. Constitutive kinase activation of the TEL-Syk fusion gene in myelodysplastic syndrome with t(9;12)(q22;p12). *Blood* 2001 February 15;97(4):1050-5.
- (60) Kwiatkowski BA, Bastian LS, Bauer TR, Jr., Tsai S, Zielinska-Kwiatkowska AG, Hickstein DD. The ets family member Tel binds to the Fli-1 oncoprotein and inhibits its transcriptional activity. *J Biol Chem* 1998 July 10;273(28):17525-30.
- (61) Ia-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982 December;79(24):7824-7.
- (62) Lacronique V, Boureux A, Monni R, Dumon S, Mauchauffe M, Mayeux P, Gouilleux F, Berger R, Gisselbrecht S, Ghysdael J, Bernard OA. Transforming properties of chimeric TEL-JAK proteins in Ba/F3 cells. *Blood* 2000 March 15;95(6):2076-83.
- (63) Lacronique V, Boureux A, Valle VD, Poirel H, Quang CT, Mauchauffe M, Berthou C, Lessard M, Berger R, Ghysdael J, Bernard OA. A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science* 1997 November 14;278(5341):1309-12.
- (64) Levy ER, Parganas E, Morishita K, Fichelson S, James L, Oscier D, Gisselbrecht S, Ihle JN, Buckle VJ. DNA rearrangements proximal to the EVI1

7 LITERATUR

- locus associated with the 3q21q26 syndrome. *Blood* 1994 March 1;83(5):1348-54.
- (65) Liu P, Tarle SA, Hajra A, Claxton DF, Marlton P, Freedman M, Siciliano MJ, Collins FS. Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science* 1993 August 20;261(5124):1041-4.
- (66) Macara IG, Baldarelli R, Field CM, Glotzer M, Hayashi Y, Hsu SC, Kennedy MB, Kinoshita M, Longtine M, Low C, Maltais LJ, McKenzie L, Mitchison TJ, Nishikawa T, Noda M, Petty EM, Peifer M, Pringle JR, Robinson PJ, Roth D, Russell SE, Stuhlmann H, Tanaka M, Tanaka T, Trimble WS et al. Mammalian septins nomenclature
5. *Mol Biol Cell* 2002 December;13(12):4111-3.
- (67) Maroc N, Morel A, Beillard E, De La Chapelle AL, Fund X, Mozziconacci MJ, Dupont M, Cayuela JM, Gabert J, Koki A, Fert V, Hermitte F. A diagnostic biochip for the comprehensive analysis of MLL translocations in acute leukemia
1. *Leukemia* 2004 September;18(9):1522-30.
- (68) Mauritzson N, Albin M, Rylander L, Billstrom R, Ahlgren T, Mikoczy Z, Bjork J, Stromberg U, Nilsson PG, Mitelman F, Hagmar L, Johansson B. Pooled analysis of clinical and cytogenetic features in treatment-related and de novo adult acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes based on a consecutive series of 761 patients analyzed 1976-1993 and on 5098 unselected cases reported in the literature 1974-2001
1. *Leukemia* 2002 December;16(12):2366-78.
- (69) Megonigal MD, Rappaport EF, Jones DH, Williams TM, Lovett BD, Kelly KM, Lerou PH, Moulton T, Budarf ML, Felix CA. t(11;22)(q23;q11.2) In acute myeloid leukemia of infant twins fuses MLL with hCDCrel, a cell division cycle gene in the genomic region of deletion in DiGeorge and velocardiofacial syndromes
2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 May 26;95(11):6413-8.
- (70) Metcalf D. The molecular control of proliferation and differentiation in hemopoietic cells. *C R Acad Sci III* 1993 September;316(9):860-70.
- (71) Meyer C, Schneider B, Jakob S, Strehl S, Attarbaschi A, Schnittger S, Schoch C, Jansen MW, van Dongen JJ, den Boer ML, Pieters R, Ennas MG, Angelucci E, Koehl U, Greil J, Griesinger F, Zur SU, Eckert C, Szczepanski T, Niggli FK, Schafer BW, Kempinski H, Brady HJ, Zuna J, Trka J et al. The MLL recombinome of acute leukemias
5. *Leukemia* 2006 May;20(5):777-84.
- (72) Mitani K, Ogawa S, Tanaka T, Miyoshi H, Kurokawa M, Mano H, Yazaki Y, Ohki M, Hirai H. Generation of the AML1-EVI-1 fusion gene in the t(3;21)(q26;q22) causes blastic crisis in chronic myelocytic leukemia. *EMBO J* 1994 February 1;13(3):504-10.

7 LITERATUR

- (73) Mitelman F. Chromosomes, genes, and cancer. *CA Cancer J Clin* 1994 May;44(3):133-5.
- (74) Mitterbauer-Hohendanner G, Mannhalter C. The biological and clinical significance of MLL abnormalities in haematological malignancies
1. *Eur J Clin Invest* 2004 August;34 Suppl 2:12-24.
- (75) Mochizuki N, Shimizu S, Nagasawa T, Tanaka H, Taniwaki M, Yokota J, Morishita K. A novel gene, MEL1, mapped to 1p36.3 is highly homologous to the MDS1/EVI1 gene and is transcriptionally activated in t(1;3)(p36;q21)-positive leukemia cells. *Blood* 2000 November 1;96(9):3209-14.
- (76) Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986
2. *Biotechnology* 1992;24:17-27.
- (77) Musio A, Mariani T, Vezzoni P, Frattini A. Heterogeneous gene distribution reflects human genome complexity as detected at the cytogenetic level
1. *Cancer Genet Cytogenet* 2002 April 15;134(2):168-71.
- (78) Nakamura Y, Nakazato H, Sato Y, Furusawa S, Mitani K. Expression of the TEL/EVI1 fusion transcript in a patient with chronic myelogenous leukemia with t(3;12)(q26;p13). *Am J Hematol* 2002 January;69(1):80-2.
- (79) Nederlof PM, van der FS, Wiegant J, Raap AK, Tanke HJ, Ploem JS, Van der PM. Multiple fluorescence in situ hybridization. *Cytometry* 1990;11(1):126-31.
- (80) Nowell PC. The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Blut* 1962 April;8:65-6.
- (81) Nucifora G. The EVI1 gene in myeloid leukemia
19. *Leukemia* 1997 December;11(12):2022-31.
- (82) Nucifora G, Begy CR, Erickson P, Drabkin HA, Rowley JD. The 3;21 translocation in myelodysplasia results in a fusion transcript between the AML1 gene and the gene for EAP, a highly conserved protein associated with the Epstein-Barr virus small RNA EBER 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 August 15;90(16):7784-8.
- (83) Nucifora G, Begy CR, Kobayashi H, Roulston D, Claxton D, Pedersen-Bjergaard J, Parganas E, Ihle JN, Rowley JD. Consistent intergenic splicing and production of multiple transcripts between AML1 at 21q22 and unrelated genes at 3q26 in (3;21)(q26;q22) translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 April 26;91(9):4004-8.
- (84) Nunn MF, Seeburg PH, Moscovici C, Duesberg PH. Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature* 1983 November 24;306(5941):391-5.
- (85) Nye JA, Petersen JM, Gunther CV, Jonsen MD, Graves BJ. Interaction of murine ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif. *Genes Dev* 1992 June;6(6):975-90.

7 LITERATUR

- (86) Odero MD, Carlson K, Calasanz MJ, Lahortiga I, Chinwalla V, Rowley JD. Identification of new translocations involving ETV6 in hematologic malignancies by fluorescence in situ hybridization and spectral karyotyping. *Genes Chromosomes Cancer* 2001 June;31(2):134-42.
- (87) Odero MD, Vizmanos JL, Roman JP, Lahortiga I, Panizo C, Calasanz MJ, Zeleznik-Le NJ, Rowley JD, Novo FJ. A novel gene, MDS2, is fused to ETV6/TEL in a t(1;12)(p36.1;p13) in a patient with myelodysplastic syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 2002 September;35(1):11-9.
- (88) Osaka M, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ. MSF (MLL septin-like fusion), a fusion partner gene of MLL, in a therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;17)(q23;q25)
1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 May 25;96(11):6428-33.
- (89) Papadopoulos P, Ridge SA, Boucher CA, Stocking C, Wiedemann LM. The novel activation of ABL by fusion to an ets-related gene, TEL. *Cancer Res* 1995 January 1;55(1):34-8.
- (90) Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations
2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969 October;64(2):600-4.
- (91) Patel N, Goff LK, Clark T, Ford AM, Foot N, Lillington D, Hing S, Pritchard-Jones K, Jones LK, Saha V. Expression profile of wild-type ETV6 in childhood acute leukaemia
1. *Br J Haematol* 2003 July;122(1):94-8.
- (92) Peeters P, Raynaud SD, Cools J, Wlodarska I, Grosgeorge J, Philip P, Monpoux F, Van RL, Baens M, Van den BH, Marynen P. Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia. *Blood* 1997 October 1;90(7):2535-40.
- (93) Peeters P, Wlodarska I, Baens M, Criel A, Selleslag D, Hagemeyer A, Van den BH, Marynen P. Fusion of ETV6 to MDS1/EVI1 as a result of t(3;12)(q26;p13) in myeloproliferative disorders. *Cancer Res* 1997 February 15;57(4):564-9.
- (94) Pekarsky Y, Rynditch A, Wieser R, Fonatsch C, Gardiner K. Activation of a novel gene in 3q21 and identification of intergenic fusion transcripts with ecotropic viral insertion site I in leukemia
1. *Cancer Res* 1997 September 15;57(18):3914-9.
- (95) Penas EM, Cools J, Algenstaedt P, Hinz K, Seeger D, Schafhausen P, Schilling G, Marynen P, Hossfeld DK, Dierlamm J. A novel cryptic translocation t(12;17)(p13;p12-p13) in a secondary acute myeloid leukemia results in a fusion of the ETV6 gene and the antisense strand of the PER1 gene
1. *Genes Chromosomes Cancer* 2003 May;37(1):79-83.

7 LITERATUR

- (96) Poirel H, Lacronique V, Mauchauffe M, Le CM, Raffoux E, Daniel MT, Erickson P, Drabkin H, MacLeod RA, Drexler HG, Ghysdael J, Berger R, Bernard OA. Analysis of TEL proteins in human leukemias
3. *Oncogene* 1998 June 4;16(22):2895-903.
- (97) Poirel H, Oury C, Carron C, Duprez E, Laabi Y, Tsapis A, Romana SP, Mauchauffe M, Le CM, Berger R, Ghysdael J, Bernard OA. The TEL gene products: nuclear phosphoproteins with DNA binding properties. *Oncogene* 1997 January 23;14(3):349-57.
- (98) Rabbitts TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994 November 10;372(6502):143-9.
- (99) Raimondi SC, Shurtleff SA, Downing JR, Rubnitz J, Mathew S, Hancock M, Pui CH, Rivera GK, Grosveld GC, Behm FG. 12p abnormalities and the TEL gene (ETV6) in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997 December 1;90(11):4559-66.
- (100) Rao PH, Houldsworth J, Dyomina K, Parsa NZ, Cigudosa JC, Louie DC, Popplewell L, Offit K, Jhanwar SC, Chaganti RS. Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998 July 1;92(1):234-40.
- (101) Raynaud S, Cave H, Baens M, Bastard C, Cacheux V, Grosgeorge J, Guidal-Giroux C, Guo C, Vilmer E, Marynen P, Grandchamp B. The 12;21 translocation involving TEL and deletion of the other TEL allele: two frequently associated alterations found in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996 April 1;87(7):2891-9.
- (102) Reiss K, Porcu P, Sell C, Pietrzkowski Z, Baserga R. The insulin-like growth factor 1 receptor is required for the proliferation of hemopoietic cells
23. *Oncogene* 1992 November;7(11):2243-8.
- (103) Romana S, Poirel H, Della V, V, Mauchauffe M, Busson-Le CM, Berger R, Bernard OA. Molecular analysis of chromosomal breakpoints in three examples of chromosomal translocation involving the TEL gene. *Leukemia* 1999 November;13(11):1754-9.
- (104) Romana SP, Mauchauffe M, Le CM, Chumakov I, Le PD, Berger R, Bernard OA. The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. *Blood* 1995 June 15;85(12):3662-70.
- (105) Rowley JD. Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Ann Genet* 1973 June;16(2):109-12.
- (106) Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973 June 1;243(5405):290-3.
- (107) Rowley JD, Potter D. Chromosomal banding patterns in acute nonlymphocytic leukemia
2. *Blood* 1976 May;47(5):705-21.

7 LITERATUR

- (108) Rubin CM, Larson RA, Anastasi J, Winter JN, Thangavelu M, Vardiman JW, Rowley JD, Le Beau MM. t(3;21)(q26;q22): a recurring chromosomal abnormality in therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia
1. Blood 1990 December 15;76(12):2594-8.
- (109) Rubnitz JE, Look AT. Molecular basis of leukemogenesis. Curr Opin Hematol 1998 July;5(4):264-70.
- (110) Rynditch A, Pekarsky Y, Schnittger S, Gardiner K. Leukemia breakpoint region in 3q21 is gene rich
2. Gene 1997 July 1;193(1):49-57.
- (111) Saccone S, Federico C, Solovei I, Croquette MF, Della VG, Bernardi G. Identification of the gene-richest bands in human prometaphase chromosomes
6. Chromosome Res 1999;7(5):379-86.
- (112) Sandberg AA. Chromosome abnormalities in human cancer and leukemia. Mutat Res 1991 April;247(2):231-40.
- (113) Santulli B, Kazmierczak B, Napolitano R, Caliendo I, Chiappetta G, Rippe V, Bullerdiek J, Fusco A. A 12q13 translocation involving the HMGI-C gene in richter transformation of a chronic lymphocytic leukemia
1. Cancer Genet Cytogenet 2000 May;119(1):70-3.
- (114) Satterwhite E, Sonoki T, Willis TG, Harder L, Nowak R, Arriola EL, Liu H, Price HP, Gesk S, Steinemann D, Schlegelberger B, Oscier DG, Siebert R, Tucker PW, Dyer MJ. The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. Blood 2001 December 1;98(12):3413-20.
- (115) Seeger K, Buchwald D, Peter A, Taube T, von SA, Schmitt G, Henze G. TEL-AML1 fusion in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 1999 July 1;94(1):374-6.
- (116) Seth A, Papas TS. The c-ets-1 proto-oncogene has oncogenic activity and is positively autoregulated. Oncogene 1990 December;5(12):1761-7.
- (117) Shurtleff SA, Buijs A, Behm FG, Rubnitz JE, Raimondi SC, Hancock ML, Chan GC, Pui CH, Grosveld G, Downing JR. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. Leukemia 1995 December;9(12):1985-9.
- (118) Sitailo S, Sood R, Barton K, Nucifora G. Forced expression of the leukemia-associated gene EVI1 in ES cells: a model for myeloid leukemia with 3q26 rearrangements. Leukemia 1999 November;13(11):1639-45.
- (119) Spiekermann K, Pau M, Schwab R, Schmieja K, Franzrahe S, Hiddemann W. Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is induced by leukemic fusion proteins with protein tyrosine kinase activity and is sufficient for transformation of hematopoietic precursor cells. Exp Hematol 2002 March;30(3):262-71.

7 LITERATUR

- (120) Sternberg DW, Tomasson MH, Carroll M, Curley DP, Barker G, Caprio M, Wilbanks A, Kazlauskas A, Gilliland DG. The TEL/PDGFBetaR fusion in chronic myelomonocytic leukemia signals through STAT5-dependent and STAT5-independent pathways. *Blood* 2001 December 1;98(12):3390-7.
- (121) Strehl S, Konig M, Meyer C, Schneider B, Harbott J, Jager U, von Bergh AR, Loncarevic IF, Jarosova M, Schmidt HH, Moore SD, Marschalek R, Haas OA. Molecular dissection of t(11;17) in acute myeloid leukemia reveals a variety of gene fusions with heterogeneous fusion transcripts and multiple splice variants
11. *Genes Chromosomes Cancer* 2006 November;45(11):1041-9.
- (122) Streubel B, Sauerland C, Heil G, Freund M, Bartels H, Lengfelder E, Wandt H, Ludwig WD, Nowotny H, Baldus M, Grothaus-Pinke B, Buchner T, Fonatsch C. Correlation of cytogenetic, molecular cytogenetic, and clinical findings in 59 patients with ANLL or MDS and abnormalities of the short arm of chromosome 12. *Br J Haematol* 1998 March;100(3):521-33.
- (123) Suto Y, Sato Y, Smith SD, Rowley JD, Bohlander SK. A t(6;12)(q23;p13) results in the fusion of ETV6 to a novel gene, STL, in a B-cell ALL cell line. *Genes Chromosomes Cancer* 1997 April;18(4):254-68.
- (124) Suzukawa K, Parganas E, Gajjar A, Abe T, Takahashi S, Tani K, Asano S, Asou H, Kamada N, Yokota J, . Identification of a breakpoint cluster region 3' of the ribophorin I gene at 3q21 associated with the transcriptional activation of the EVI1 gene in acute myelogenous leukemias with inv(3)(q21q26)
1. *Blood* 1994 October 15;84(8):2681-8.
- (125) Taki T, Ohnishi H, Shinohara K, Sako M, Bessho F, Yanagisawa M, Hayashi Y. AF17q25, a putative septin family gene, fuses the MLL gene in acute myeloid leukemia with t(11;17)(q23;q25)
1. *Cancer Res* 1999 September 1;59(17):4261-5.
- (126) Taub R, Kirsch I, Morton C, Lenoir G, Swan D, Tronick S, Aaronson S, Leder P. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982 December;79(24):7837-41.
- (127) Testoni N, Borsaru G, Martinelli G, Carboni C, Ruggeri D, Ottaviani E, Pelliconi S, Ricci P, Pastano R, Visani G, Zaccaria A, Tura S. 3q21 and 3q26 cytogenetic abnormalities in acute myeloblastic leukemia: biological and clinical features
1. *Haematologica* 1999 August;84(8):690-4.
- (128) Thirman MJ, Gill HJ, Burnett RC, Mbangkollo D, McCabe NR, Kobayashi H, Ziemin-van der PS, Kaneko Y, Morgan R, Sandberg AA, . Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *N Engl J Med* 1993 September 23;329(13):909-14.
- (129) Tjio JH. The chromosome number of man. *Am J Obstet Gynecol* 1978 March 15;130(6):723-4.

7 LITERATUR

- (130) Van Prooijen-Knegt AC, Van Hoek JF, Bauman JG, Van DP, Wool IG, Van der PM. In situ hybridization of DNA sequences in human metaphase chromosomes visualized by an indirect fluorescent immunocytochemical procedure. *Exp Cell Res* 1982 October;141(2):397-407.
- (131) Vogt PK. Cancer genes. *West J Med* 1993 March;158(3):273-8.
- (132) Vorwerk P, Wex H, Hohmann B, Mohnike K, Schmidt U, Mittler U. Expression of components of the IGF signalling system in childhood acute lymphoblastic leukaemia
5. *Mol Pathol* 2002 February;55(1):40-5.
- (133) Vorwerk P, Wex H, Hohmann B, Mohnike K, Schmidt U, Mittler U. Expression of components of the IGF signalling system in childhood acute lymphoblastic leukaemia
11. *Mol Pathol* 2002 February;55(1):40-5.
- (134) Wang LC, Swat W, Fujiwara Y, Davidson L, Visvader J, Kuo F, Alt FW, Gilliland DG, Golub TR, Orkin SH. The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev* 1998 August 1;12(15):2392-402.
- (135) Wasylyk B, Hahn SL, Giovane A. The Ets family of transcription factors. *Eur J Biochem* 1993 January 15;211(1-2):7-18.
- (136) Welborn J, Jenks H, Taplett J, Walling P. Inversion of chromosome 12 and lineage promiscuity in hematologic malignancies
1. *Cancer Genet Cytogenet* 2004 January 15;148(2):91-103.
- (137) Wieser R, Schreiner U, Pirc-Danoewinata H, Aytakin M, Schmidt HH, Rieder H, Fonatsch C. Interphase fluorescence in situ hybridization assay for the detection of 3q21 rearrangements in myeloid malignancies
1. *Genes Chromosomes Cancer* 2001 December;32(4):373-80.
- (138) Wilbanks AM, Mahajan S, Frank DA, Druker BJ, Gilliland DG, Carroll M. TEL/PDGFBetaR fusion protein activates STAT1 and STAT5: a common mechanism for transformation by tyrosine kinase fusion proteins. *Exp Hematol* 2000 May;28(5):584-93.
- (139) Yagasaki F, Jinnai I, Yoshida S, Yokoyama Y, Matsuda A, Kusumoto S, Kobayashi H, Terasaki H, Ohyashiki K, Asou N, Murohashi I, Bessho M, Hirashima K. Fusion of TEL/ETV6 to a novel ACS2 in myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia with t(5;12)(q31;p13). *Genes Chromosomes Cancer* 1999 November;26(3):192-202.
- (140) Yagasaki F, Wakao D, Yokoyama Y, Uchida Y, Murohashi I, Kayano H, Taniwaki M, Matsuda A, Bessho M. Fusion of ETV6 to fibroblast growth factor receptor 3 in peripheral T-cell lymphoma with a t(4;12)(p16;p13) chromosomal translocation. *Cancer Res* 2001 December 1;61(23):8371-4.
- (141) Yamagata T, Maki K, Waga K, Mitani K. TEL/ETV6 induces apoptosis in 32D cells through p53-dependent pathways
3. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 August 25;347(2):517-26.

8 ANHANG

- (142) Yamamoto K, Shibata F, Yamaguchi M, Miura O. Fusion of MLL and MSF in adult de novo acute myelomonocytic leukemia (M4) with t(11;17)(q23;q25) 1. *Int J Hematol* 2002 June;75(5):503-7.
- (143) Zech L, Haglund U, Nilsson K, Klein G. Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* 1976 January 15;17(1):47-56.

8 ANHANG

8.1 Verwendete Primer

Primer 412 5`CCA GTG AGC AGA GTG ACG AGG ACT CGA GCT CAA GC
(AGCT) (AGCT) (AGCT) (AGCT) (AGCT) (AGCT)-3`

Primer 467 5`- CCA GTG AGC AGA GTG ACG-3`

Primer 468 5`- GAG GAC TCG AGC TCA AGC-3`

Primer ETV6-F1a 5`-TGA GAC ATG TCT GAG ACT CCT GCT-3`

Primer ETV6-F1b 5` ACT CCT GCT CAG TGT AGC ATT-3`

Primer Exon 2-A 5`- ACT GGA ACA TGA AGT GGC GT-3`

Primer M13 forward 5`- GTA AAA CGA CGG CCA G-3`

Primer M13 reverse 5`- CAG GAA ACA GCT ATG AC-3`

Primer 440P5-f1 5`-GGC TCA TAC TTC ATA CCG AAA ACT ACT-3`

Primer 440P5-f2 5`-CTC TAA AAA TAC GGT GGG TTT C-3`

Primer 440P5-r1 5`-GAA ACC CAC CGT ATT TTT AGA G-3`

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Beispiele für die Beteiligung des ETV6-Gens an malignen Erkrankungen ...	14
Tab. 2: Darstellung der 26 hämatologischen Patienten	21
Tab. 3: Standardisierte Parameter einer PCR-Reaktion.....	38
Tab. 4: Standardisiertes Programm einer PCR	39
Tab. 5: Poly-A-Tailing	41
Tab. 6: Standard Programm für die 3'RACE-PCR und 5'RACE-PCR	42
Tab. 7: Programm der M13-PCR.....	43
Tab. 8: Programm der Sequenzierung mit BigDye	48
Tab. 9: Ergebnisse der FISH-Analyse.	50
Tab. 10: Chromosomale Bruchpunkte auf 12q.....	67

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Exon Struktur des <i>ETV6</i> -Gens.....	11
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Lokalisation der <i>ETV6</i> -Sonden	32
Abbildung 3: FISH-Analyse der <i>t(3;12)(q21;p13)</i>	53
Abbildung 4: Der Giemsa-gebänderte Karyotyp des Patienten 9 zeigt eine	
<i>del(12)(p12)</i>	54
Abbildung 5: FISH-Analyse der <i>t(2;12)(p21;p13)</i>	55
Abbildung 6: FISH-Analyse unter Gebrauch der <i>ETV6</i> spezifischen Sonden 50F4.....	
(grün) und 163E7 (rot)	55
Abbildung 7: Der Giemsa-banded Karyotyp des Patienten 11 zeigt die	
<i>del(12)(p12)</i> und die <i>dic(16;17)(q11;p11)</i>	56
Abbildung 8: FISH-Analyse der <i>inv(12)</i> unter Benutzung der <i>ETV6</i> spezifischen.....	
Sonden 179A6 (grün) und 148B6 (rot)	57
Abbildung 9: FISH-Analyse mit den spezifischen YAC clones 760G1 (12q22) (grün) ..	
und 839F6 (12q24) (rot)	58
Abbildung 10: Schematische Darstellung des <i>ETV6</i> -Gens mit den Bruchpunkten der .	
neuen Translokationen sowie des <i>ETV6</i> -Proteins	58
Abbildung 11: 3`RACE-PCR und 5`RACE-PCR zur Isolierung des unbekanntes	
Partnergens.	59
Abbildung 12: Schematische Darstellung der analysierten Kolonien.....	60
Abbildung 13: Schematische Darstellung des Sequenzierungsergebnisses der	
Analyse eines Klons mit der Translokation <i>t(2;12)(p21;p13)</i>	61
Abbildung 14: Darstellung unterschiedlicher Bruchpunkte innerhalb des <i>ETV6</i> -Gens .	
mit den jeweiligen Translokationspartnergenen.....	62

8.4 Danksagung

Frau Prof. Dr. Dr. med. Judith Dierlamm danke ich für die freundliche Überlassung des anspruchsvollen und interessanten Promotionsthemas und die Möglichkeit, in ihrem Arbeitskreis meine Arbeit anfertigen zu dürfen. Ganz besonders gilt mein Dank Frau Dr. rer. nat. Eva-Maria Murga-Penas für die großartige, zuverlässige und geduldige Betreuung der Dissertation, den vielen fruchtbaren und anregenden Gesprächen und der steten Hilfsbereitschaft. Des Weiteren danke ich dem Laborteam des zytogenetischen Labors der II. Medizinischen Klinik des UKE für die wertvolle Unterstützung und die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre. Meinen Eltern danke ich für die Ermöglichung des Studiums, die unablässige Motivation und die Unterstützung in der Kinderbetreuung. An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank auch meiner Schwester Mara, die ebenfalls durch ihren unermüdlichen Einsatz dazu beigetragen hat, daß ich mein Studium und die Promotion abschließen konnte. Meiner Familie, meinen beiden Söhnen und meinem Mann, danke ich von Herzen für die Geduld und das Verständnis.

8.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geboren am 02.02.1979 in Scherzingen, CH

Nationalität: deutsch

Familienstand: verheiratet,

Sohn Jona Linus Gorre, geboren am 10.05.05 in Hamburg,

Sohn Jasper Henrik geboren am 17.11.07 in Münsterlingen, CH

Eltern: Mutter Dr.phil. Renate Gorre, Historikerin

Vater Wolfgang Hartung-Gorre, Dipl.-Mathematiker, Gymnasiallehrer

Schulbildung

1986-1989 Grund-und Hauptschule Dettingen- Wallhausen

1989-1998 Heinrich-Suso-Gymnasium Konstanz, Abschluss Abitur, Note 2,0

Studium:

Frühjahr 2000- 2007: Humanmedizin an der Universität Hamburg

Frühjahr 2002 Physikum

Frühjahr 2003 1. Staatsexamen

Sommer 2005 2. Staatsexamen,

Frühjahr 2007 Abschluss des Medizinstudiums mit dem 3. Staatsexamen in Hamburg, Gesamtnote 1,8

Berufliche Erfahrungen und Tätigkeiten

1998-1999: Praktikum bei Dr. med. vet. Heinrich Preiss in Konstanz

1999-2000: Ausbildung zur Rettungssanitäterin beim Deutschen Roten Kreuz in Konstanz mit anschliessender Tätigkeit beim DRK in Konstanz

Februar 2002: Famulatur in der Anästhesie im Allgemeinen Krankenhaus Altona, Hamburg

August 2002: Famulatur bei Dr. U. Sonnemann, Praxis für HNO, Elmshorn

Feb/März 2003: Famulatur in der Chirurgie des Kantonsspital Chur, Graubünden, CH

Feb 2004: Famulatur in der Hämatologie/Onkologie, Labor UKE Hamburg

März-Juni 2006: PJ 1.Tertial: Chirurgie, Kantonsspital Chur, Graubünden, CH

8 ANHANG

August-November 2006: PJ 2.Tertial: Innere Medizin Kantonsspital Münsterlingen, Thurgau CH

Dezember 2006-Februar 2007: PJ 3.Tertial: Gynäkologie Kantonsspital Münsterlingen, Thurgau, CH

Mai 2007-bis heute: Assistenzärztin der Akutpsychiatrie in der Psychiatrischen Klinik Münsterlingen, Thurgau, CH

8.6 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den

Hannah Gorre