

Aus der Klinik für Pädiatrie m. S. Onkologie/Hämatologie  
und dem Institut für Humangenetik  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

**Molekulargenetische Analyse des *DNA-Ligase IV-Gens*  
bei Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -  
Universitätsmedizin Berlin

von

Jörn Andrae  
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Dr. h. c. G. Henze  
2. Prof. Dr. med. C. A. Schmidt  
3. Priv.-Doz. Dr. med. D. T. Schneider

Datum der Promotion: 7. 7. 2006

Meinen Eltern gewidmet

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
	1.1 Maligne Erkrankungen bei Kindern	7
	1.1.1 Epidemiologie	7
	1.1.2 Ursachen der ALL	9
	1.2 DNA-Schäden und DNA-Reparatur	11
	1.2.1 Arten von DNA-Schäden	11
	1.2.2 Reparatur von Einzelstrangschäden	13
	1.2.3 Doppelstrangbrüche	13
	1.2.4 Zellzyklus	14
	1.2.5 Homologe Rekombination (HR)	15
	1.2.6 Non-Homologous End Joining (NHEJ)	17
	1.2.7 Defekte der Doppelstrangbruchreparatur	21
	1.2.8 Struktur und Funktion der DNA-Ligasen	22
<b>2</b>	<b>Fragestellung der Arbeit</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>27</b>
	3.1 Proben	27
	3.2 Geräte und Reagenzien	27
	3.2.1 Geräte	27
	3.2.2 Verbrauchsmaterialien	28
	3.2.3 Puffer	29
	3.2.4 Primer	30
	3.2.5 Software	31
	3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
	3.3.1 Grundlagen	32
	3.3.2 Agarosegelelektrophorese	32
	3.3.3 Durchführung	33

3.4	Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC, WAVE™)	34
3.5	Sequenzierung	39
	3.5.1. Grundlagen	39
	3.5.2. Durchführung	39
3.6	Single-Strand-Conformation Polymorphism (SSCP)	41
3.7	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)	42
3.8	Statistik	42
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
4.1	DHPLC-Etablierung	43
4.2	Ergebnisse von DHPLC und Sequenzierung	47
4.3	Single-Strand-Conformation Polymorphism (SSCP)	59
4.4	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)	60
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>63</b>
5.1	Bewertung der verschiedenen Methoden zur Erkennung genetischer Veränderungen	63
	5.1.1 DHPLC (WAVE™)	63
	5.1.2 Sequenzierung	64
	5.1.3 RFLP-Analyse	65
	5.1.4 SSCP-Analyse	65
5.2	DNA-Ligase IV und Leukämogenese	66
	5.2.1 Polymorphismus in Abschnitt 6	66
	5.2.2. Verteilung und Herkunft der Polymorphismen in Abschnitt 1a. Einfluss auf das Leukämierisiko	67
	5.2.3 Möglicher Einfluss der Polymorphismen A3V und T9I auf die Funktion	67
	5.2.4 Bedeutung des NHEJ für die genomische Stabilität	69
	5.2.5 NHEJ und Leukämie	73

	5.2.6	Entstehung unterschiedlicher Phänotypen durch Ausfall verschiedener Komponenten des NHEJ	75
<b>6</b>		<b>Zusammenfassung</b>	<b>77</b>
<b>7</b>		<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
<b>8</b>		<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>88</b>
<b>9</b>		<b>Lebenslauf</b>	<b>90</b>
<b>10</b>		<b>Danksagung</b>	<b>91</b>
<b>11</b>		<b>Erklärung</b>	<b>92</b>

## 6 Zusammenfassung

Jede Zelle ist ständig einer Vielzahl endogener und exogener DNA-schädigender Einflüsse ausgesetzt. Der Erhalt der genomischen Integrität ist folglich nur möglich, wenn es gelingt, DNA-Schäden schnell und effizient zu beheben. Die Zelle verfügt daher über verschiedene DNA-Reparatursysteme. Doppelstrangbrüche stellen die schwerste DNA-Schädigung dar. Ihre Reparatur erfolgt in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase entweder durch Homologe Rekombination (HR) oder durch Non-Homologous End Joining (NHEJ). Ein wichtiger Faktor beim NHEJ ist die DNA-Ligase IV. Die Mutation R278H im *DNA-Ligase IV Gen* führt homozygot zu einer erhöhten Strahlensensibilität. Die enzymatische Aktivität der Ligase ist verringert.

Es sind verschiedene Syndrome bekannt, bei denen ein Defekt der DNA-Reparatur mit einem erhöhten Risiko für Malignome des lymphatischen Systems einhergeht. Hierzu zählen z. B. die Ataxia telangiectasia (AT) und das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS). In der vorliegenden Arbeit wurde geklärt, ob Mutationen im Gen für DNA-Ligase IV einen Risikofaktor für die ALL-Entstehung im Kindesalter darstellen könnten.

In dieser Arbeit wurde die DNA von 107 Kindern mit Ersterkrankung einer ALL sowie von 104 Kontrollpersonen auf Mutationen oder Polymorphismen im DNA-Ligase IV-Gen untersucht. Dabei wurde die Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC) als Methode für diese Untersuchung etabliert.

Für die PCR und DHPLC-Analyse wurde das DNA-Ligase IV-Gen in 11 Abschnitte eingeteilt. Es zeigte sich, dass das sichere Erkennen und Unterscheiden der beiden im ersten Abschnitt gelegenen Polymorphismen A3V und T9I nicht immer möglich war. Die Bedingungen hierfür ließen sich jedoch nicht weiter optimieren. Der Polymorphismus D568D hingegen war immer sicher erkennbar. Auch die für verschiedene weitere Abschnitte zur Verfügung stehenden Positivkontrollen waren i. A. gut erkennbar. Für die Analyse des ersten Abschnittes wurde daher die Sequenzierung der DHPLC-Analyse vorgezogen.

Außer einem Polymorphismus in Position 1977, der nicht zu einem Aminosäureaustausch führt (D568D), wurden nur die beiden Polymorphismen A3V und T9I gefunden, wobei ersterer nur in Verbindung mit letzterem auftrat. Während in der Kontrollgruppe 34,62% der Proben mindestens einen der beiden Polymorphismen aufwiesen, lag der Anteil bei den ALL-Patienten nur bei 20,56%. Dieser Unterschied ist

statistisch signifikant ( $p < 0,025$ ). Die Hypothese, dass derartige DNA-Veränderungen einen Risikofaktor für die ALL-Entstehung im Kindesalter darstellten, muss folglich verworfen werden.

Bei 12 von 22 Proben mit Polymorphismus konnte in Kontrollproben mit einem Blastenanteil unter 2% jeweils derselbe Polymorphismus nachgewiesen werden. Es handelt sich offensichtlich um Keimbahnveränderungen.

Das signifikante seltenere Auftreten dieser Polymorphismen bei ALL-Patienten wirft die Frage auf, ob diese Veränderungen eine protektive Wirkung haben können. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits beim Multiplen Myelom beschrieben. NHEJ ist zwar ein wichtiger Mechanismus zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen, ist jedoch potentiell fehlerhaft. So führt eine Prozessierung der Bruchenden zum Verlust von DNA. Dies kann sowohl zu Leserasterverschiebungen als auch zum Verlust wichtiger genetischer Informationen z. B. in Tumorsuppressorgenen führen. Darüber hinaus kann es fälschlicherweise zur Verbindung von Bruchenden verschiedener Doppelstrangbrüche oder von Telomeren und damit zur Entstehung von Translokationen kommen. Diese sind bei ALL häufig, und es gibt zunehmend Hinweise auf eine Beteiligung des NHEJ an diesen Prozessen. In vitro konnte die gezielte Ausschaltung der ebenfalls am NHEJ beteiligten DNA-PKcs die Entstehung bestimmter Translokationen nach Bestrahlung verhindern.

Somit könnte NHEJ zur Krebsentstehung beitragen. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die beiden Polymorphismen A3V und T9I kombiniert und in homozygoter Form die enzymatische Aktivität der DNA-Ligase IV um den Faktor zwei bis drei verringern. Ob diese Veränderungen einzeln und heterozygot Einfluss auf die Funktion haben, ist bisher unbekannt. Es scheint somit möglich, dass diese Polymorphismen durch eine Verringerung der Aktivität der DNA-Ligase IV die Entstehung von Translokationen verhindern können. Funktionelle Untersuchungen hierzu liegen bisher nicht vor.