

Aus der Medizinischen Klinik m. S. Hämatologie und Onkologie der Medizinischen
Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Mutationen und aberrantes alternatives Spleißen von Ten-
Eleven Translocation 2 (TET2) in myeloproliferativen
Neoplasien

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Heiner Zimmermann

aus Oldenburg

1. Gutachter:	Prof. Dr. med. P. T. Daniel
2. Gutachter:	Priv.-Doz. Dr. F. Eßmann
3. Gutachter:	Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. K. Seeger
Datum der Promotion:	25.07.2013

Inhalt

Inhalt.....	2
Danksagung	6
1. Einleitung.....	7
1.1 Myeloproliferative Neoplasien (MPN)	7
1.2 Tyrosinkinase-Mutationen in myeloproliferativen Neoplasien.....	8
1.2.1 BCR-ABL in der chronischen myeloischen Leukämie	8
1.2.2 JAK2-Mutationen in MPN.....	8
1.3 TET2 (4q24) - Mutationen in myeloproliferativen Neoplasien.....	10
1.3.1 Ten-Eleven Translocation (TET).....	10
1.3.2 TET2-Mutationen in MPN	11
1.3.3 TET2 katalysiert DNA-Demethylierung und steuert die epigenetische Regulation.....	12
1.3.4 TET2: Exons und Domänen.....	13
1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	14
2. Material und Methoden.....	16
2.1 Zelllinien.....	16
2.2 Patienten.....	16
2.2.1 BCR/ABL Gruppe.....	16
2.2.2 JAK2-Gruppe	17
2.3 Molekularbiologische Methoden	19
2.3.1 RNA-Isolierung.....	19
2.3.2 cDNA-Synthese	21
2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion.....	21
2.3.4 Agarosegelelektrophorese	23
2.3.5 Geextraktion.....	23
2.3.6 DNA-Sequenzierung	24
2.3.7 Sequenzauswertung	27
2.3.8 Oligonukleotide	28
2.4 Statistische Methoden	29
2.5 Chemikalien	29
2.6 Puffer	30
2.7 Enzyme.....	30
2.8 Kits.....	30
2.9 Laborgeräte	31
2.10 Verbrauchsmaterialien.....	32
2.11 Software.....	33
2.12 Websites	33
3. Ergebnisse.....	34
3.1 Ablaufplan des Sequenzierungsprojekts	34
3.2 TET2-Mutationsanalyse.....	34

3.2.1	Interpretation.....	35
3.2.2	Ergebnisse der TET2-Mutationsanalyse in Zelllinien.....	36
3.2.3	Ergebnisse der TET2-Mutationsanalyse in Patientenproben.....	37
3.2.4	Vergleich der TET2-Mutationsfrequenzen in den verschiedenen Patientengruppen	39
3.3	TET2-Spleißanalyse	40
3.3.1	Unerwartete Variationen in der Länge der PCR-Produkte in JAK2V617F- positiven Proben	40
3.3.2	Identifikation eines zuvor nicht beschriebenen TET2-Exons in JAK2V617F- positiven Proben	41
3.3.3	Expression von Exon 3b in den verschiedenen Patientengruppen.....	43
3.3.4	Alternatives Spleißen von Exon 4	46
3.3.5	Alternatives Spleißen von Exon 6 – ein häufiges Ereignis in allen untersuchten Gruppen	46
4.	Diskussion	49
4.1	Kapillarsequenzierung von cDNA zur Detektion von TET2-Mutationen in myeloischen Neoplasien.....	49
4.2	Frequenz von pathologischen TET2-Mutationen.....	50
4.2.1	Zelllinien.....	50
4.2.2	Patientenproben	50
4.3	Alternatives Spleißen führt zur Inaktivierung von TET2.....	52
4.3.1	Grenzen der vorliegenden Analyse alternativen Spleißens von TET2	53
4.4	Alternatives Spleißen in hämatologischen Erkrankungen	53
4.5	TET2: Viele Wege zur Inaktivierung eines Tumorsuppressors.....	54
4.6	Multiple Ebenen der Transkriptionskontrolle in Tumorzellen	54
5.	Zusammenfassung	56
6.	Zitate.....	58
	Erklärung	63

Liste der verwendeten Abkürzungen

AML	Akute myeloische Leukämie
5mC	5-Methylcytosin
c-abl	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
CGH	Komparative genomische Hybridisierung
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CML	Chronische myeloische Leukämie
CNL	Chronische neutrophile Leukämie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES	Embryonale Stammzellen
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
ET	Essentielle Thrombozythämie
FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1
hmC	5-Hydroxymethylcytosin
JAK2	Janus Kinase 2
JAK2V617F	Janus Kinase 2 V617F Mutation
LOH	Loss of heterozygosity
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MMLV	Moloney murine leukemia virus
MPN	Myeloproliferative Neoplasie
mRNA	Messenger RNA (Boten-RNA)
OMF	Osteomyelofibrose
Ph	Philadelphia-Chromosom
PCR	Polymerase chain reaction
PDGFRA	Platelet-derived growth factor receptor α
PDGFRB	Platelet-derived growth factor receptor β
Pfu	Pyrococcus furiosus
PV	Polycythämia vera
RNA	Ribonukleinsäure

SNP	Single nucleotide polymorphism
sAML	Sekundäre akute myeloische Leukämie
TAE	Tris-EDTA-Acetat
Taq	Thermus aquaticus
TET	Ten-Eleven Translocation

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. med. Peter T. Daniel für die Überlassung des Themas und die Betreuung dieser Doktorarbeit bedanken. Dipl. Biol. Thomas Pretzsch danke ich für die gründliche Einarbeitung sowie die freundschaftliche Zusammenarbeit. Bei Gábor Egervári möchte ich mich für die Überlassung der Zelllinienpellets bedanken. Den MTAs des „Routinelabors“, B. Pawlaczyk-Peter, R. Schleede, A. Cablitz und M. Seiffert danke ich für die Durchführung von JAK2-Schmelzkurvenanalysen und BCR/ABL-Diagnostik.

Des Weiteren danke ich PD Dr. med. Ralf U. Trappe für seine Unterstützung, insbesondere die Einarbeitung in (und Bereitstellung von) SPSS.

Ebenso zu Dank verpflichtet bin ich Dr. Christopher W.J. Smith für seine einprägsame Vorlesungsreihe “Regulation of Gene Expression by pre-RNA Splicing & Editing” im Februar 2003 im Rahmen des Natural Science Tripos Part II Biochemistry der Cambridge University.

Und natürlich gilt mein ganz besonders herzlicher Dank meinen Eltern, Margret und Dr. Herbert Zimmermann, für ihre langjährige Unterstützung.

1. Einleitung

1.1 Myeloproliferative Neoplasien (MPN)

Myeloproliferative Neoplasien sind klonale Erkrankungen der hämatopoetischen Stammzellen. Sie sind durch die Proliferation einer oder mehrerer myeloischer Linien charakterisiert und treten vor allem in der fünften bis siebten Lebensdekade auf. Allen Erkrankungen dieser Gruppe gemein ist das Potential zu einer schrittweise Progression, die in Knochenmarksversagen durch Myelofibrose, ineffektiver Hämatopoese oder Transformation in eine akute Blastenphase terminieren kann.¹ Ihre Inzidenz beträgt insgesamt 6-10/100 000 pro Jahr. Die Gruppe der myeloproliferativen Erkrankungen umfasst unter anderem die chronische myeloische Leukämie^{2,3}, die Polyzythämia vera⁴, die Osteomyelofibrose⁵ und die essentielle Thrombozythämie⁶ (siehe auch Abbildung 1).

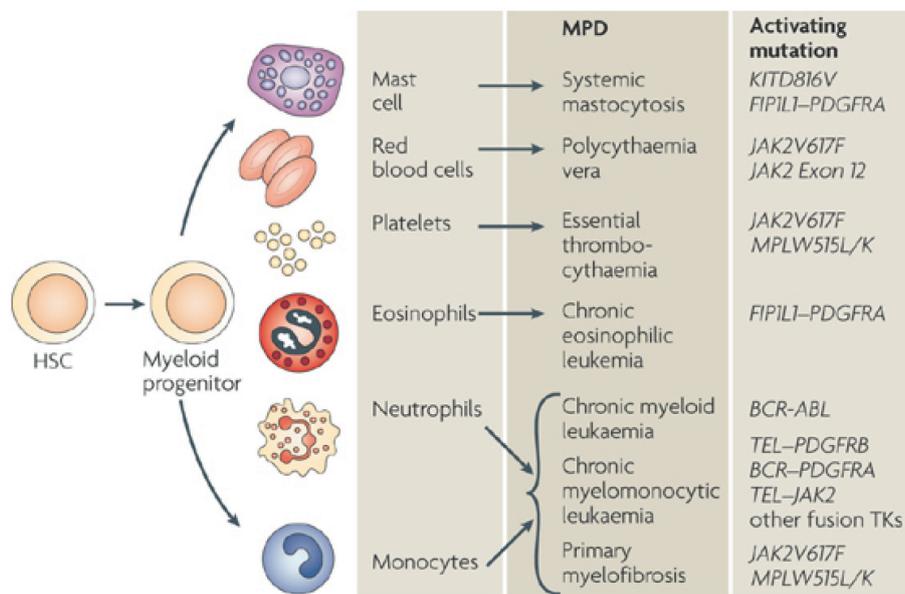


Abbildung 1. Übersicht über die myeloische Zelllinien, die entsprechenden myeloproliferativen Neoplasien und assoziierte Tyrosinkinase Mutationen (aus: Levine et al., 2007⁷).

William Dameshek schlug 1951 vor, diese Gruppe morphologisch und klinisch verwandter aber nicht identischer Erkrankungen zusammenzufassen, und vermutete:

„It is possible that these various conditions – „myeloproliferative disorders“ – are all somewhat variable manifestations of proliferative activity of the bone marrow cells, maybe due to a hitherto undiscovered stimulus.“⁸

Dieser postulierte proliferative Stimulus sind klonale Veränderungen, die Gene betreffen, welche zytoplasmatische oder Rezeptor-Tyrosinkinasen kodieren.

1.2 Tyrosinkinase-Mutationen in myeloproliferativen Neoplasien

1.2.1 BCR-ABL in der chronischen myeloischen Leukämie

Für alle Erkrankungen aus der Gruppe der MPN wurden klonale Veränderungen von Rezeptortyrosinkinasen beschrieben. Dies begann mit der Charakterisierung des Fusionsproteins BCR-ABL, einer konstitutiv aktivierten Tyrosinkinase, in der chronischen myeloischen Leukämie (CML): Die charakteristische zytogenetische Auffälligkeit der CML, das Philadelphia-Chromosom (Ph)⁹, entsteht durch die Translokation t(9;22)(q34;q11)¹⁰, wodurch aus dem 5'-Ende des Gens BCR (breakpoint cluster region) auf Chromosom 22¹¹ und dem 3'-Ende von ABL1 auf Chromosom 9¹² das Fusionsgen *BCR-ABL* entsteht. Den Beweis für die kausale Rolle dieses Fusionsgens und des zugehörigen Fusionsproteins in der CML erbrachten *BCR-ABL* transgene Mäuse, die Leukämie entwickelten¹³ und die Induktion von MPN in Mäusen durch Implantation von retroviral *BCR-ABL*-transfizierten murinen Knochenmarkszellen.¹⁴

Die klinische Signifikanz dieser Entdeckungen liegt in der Entwicklung spezifischer Tyrosinkinasehemmer zur Therapie der CML und der molekularen Quantifizierung der *bcr-abl*-Last zur Therapieüberwachung. Die Sicherheit und Wirksamkeit von Imatinib konnte erstmals 2001 im Rahmen einer Phase I – Studie gezeigt werden.¹⁵ Inzwischen stehen neben Imatinib weitere Tyrosinkinasehemmer (Nilotinib, Dasatinib) für die Therapie der CML zur Verfügung (für eine aktuelle Übersicht zu Behandlung und Monitoring siehe v. Bubnoff & Duyster).¹⁶

1.2.2 JAK2-Mutationen in MPN

Die drei häufigsten Ph-negativen MPN sind die Polyzythämia vera (PV), die Essentielle Thrombozythämie (ET) und die Primäre Myelofibrose (OMF). Nachdem

1974 gezeigt werden konnte, dass erythroide Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von Patienten mit PV in der Abwesenheit von Erythropoietin wachsen können¹⁷, wurde als Ursache dieses Effekts 2005 durch verschiedene Arbeitsgruppen eine konstitutiv aktivierende Punktmutation (V617F) der Janus-Kinase 2 (JAK2) identifiziert.^{18–21} JAK2 ist eine intrazelluläre Tyrosinkinase, die an Zytokinrezeptoren (unter anderem für Erythropoietin, Thrombopoietin, Granulocyte-Colony Stimulating Factor und Interleukin-3) bindet und als Reaktion auf eine Interaktion des Rezeptors mit dem passenden Liganden intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden durch Phosphorylierung aktiviert (siehe auch die Übersicht von Sandberg et al²²). Aktivierung dieser Signalkaskaden resultiert – abhängig von Rezeptor und Ligand – in der Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen (siehe Abbildung 2, Campbell & Green²³).

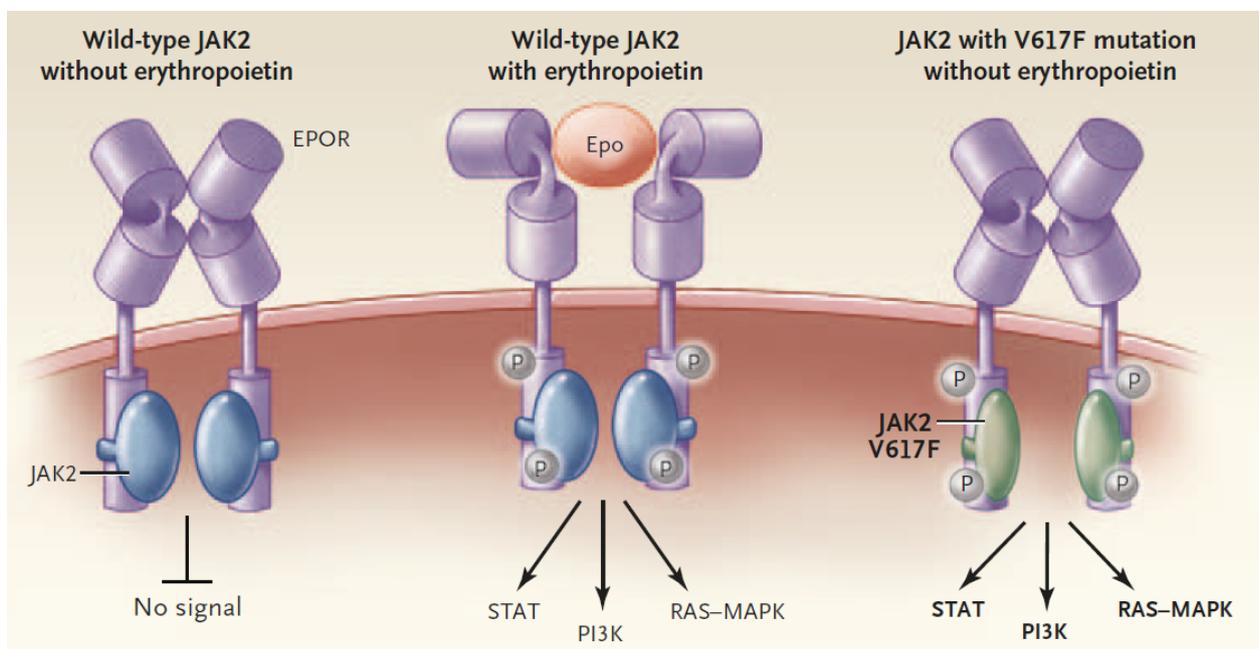


Abbildung 2. Schematische Darstellung der physiologischen und pathologischen Signaltransduktion über einen Zytokinrezeptor (hier des Erythropoietinrezeptors [EPOR]) und die intrazelluläre Janus-Kinase 2 (JAK2) (aus Campbell & Green, 2006)²³: Links und in der Mitte die physiologische Situation: Erst die Interaktion des Liganden (Mitte, hier Erythropoietin [EPO]) mit dem Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, der Phosphorylierung von JAK2 und der Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden (hier STAT, PI3K und RAS-MAPK). Im Falle der Mutation JAK2V617F (rechts) sind die Signalkaskaden konstitutiv, das heißt, auch in der Abwesenheit einer Interaktion von Ligand und Rezeptor aktiviert.

Die Mutation V617F inaktiviert die Pseudokinasedomäne, welche wiederum die Kinasedomäne negativ reguliert, was in der Summe zu konstitutiver Aktivierung von JAK2 und damit zu Zytokin-Hypersensitivität und Erythrozytose führt.¹⁹ JAK2^{-/-} Knockout-Mäuse sind aufgrund fehlender Erythropoese embryonal letal²⁴, was die

Bedeutung von JAK2 für die Erythropoese eindrucksvoll unterstreicht. Allerdings legen mehrere Beobachtungen nahe, dass JAK2-Mutationen nicht allein für die bei BCR/ABL-negativen MPN auftretenden Erkrankungsphänotypen verantwortlich sein konnten. Neben der Vielzahl von Phänotypen (PV, ET, MPN), waren dies insbesondere Klonalitätsanalysen, welche nahelegten, dass es sich bei der JAK2-Mutation um ein sekundäres genetisches Ereignis handelt^{25,26}, sowie die Beobachtung von JAK2V617F-negativer sekundärer akuter myeloischer Leukämie (sAML), welche aus JAK2V617F-positiven MPN hervorgegangen war.²⁷

1.3 TET2 (4q24) - Mutationen in myeloproliferativen Neoplasien

1.3.1 Ten-Eleven Translocation (TET)

Bereits im Jahr 2002 hatten zwei unabhängige Arbeitsgruppen TET1 als Fusionspartner von MLL bei Patienten mit AML mit der Translokation t(10;11)(q22;q23) identifiziert.^{28,29} Ausgehend von dem bereits bekannten Translokationspartner MLL wandten beide Gruppen PCR-Methoden an, die durch enzymatischen Verdau, Ligation und Denaturierung der Nukleinsäure über den Zwischenschritt eines monomeren zirkulären cDNA-Fragments die Amplifikation einer angrenzenden, aber unbekanntes cDNA-Sequenz ermöglichen. Ono et al.²⁸ nutzten bei einem 67-jährigen Patienten mit AML M2 mit trilinearer Dysplasie das Verfahren der Panhandle-PCR (erstmalig 1992 beschrieben³⁰ und bereits zuvor zur Identifikation von MLL-Translokationspartnern genutzt³¹) und identifizierten aus einer cDNA-Bibliothek TET1 unter dem Namen LCX (leukaemia-associated protein with a CXXC domain). Aufgrund der Zink-bindenden CXXC-Domäne des Proteins spekulierten die Autoren bereits über dessen mögliche Rolle bei der Unterscheidung zwischen methylierter und unmethylierter DNA. Lorsch et al.²⁹ verwendeten bei einem 8-jährigen Jungen mit AML das Verfahren der long-distance, inverse PCR^{32,33}, beschrieben ebenfalls dieses Gen und benannten es nach der Translokation von Chromosom 10 zu Chromosom 11 TET1. Darüber hinaus identifizierten sie im Rahmen einer Datenbankanalyse TET2 und TET3, welche zwei stark konservierte Regionen gemeinsam haben, als weitere Mitglieder dieser neuen Proteinfamilie und charakterisierten die Expression der drei Gene in adultem und fötalem humanem Gewebe, wobei nur für TET2 eine Expression im Knochenmark nachgewiesen werden konnte.

1.3.2 TET2-Mutationen in MPN

TET2 erfuhr erneute Aufmerksamkeit, als Delhommeau et al.³⁴ ein gemeinsames frühes genetisches Ereignis bei MDS, MPN und AML vermuteten und bei je drei Patienten mit AML und MDS eine Deletion auf Chromosom 4q24 identifizierten, welche nur ein einziges Gen, nämlich TET2, betraf. Des Weiteren konnten die Autoren mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH) und SNP-arrays bei zwei Patienten mit JAK2V617F-positiven MPN einen Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity – LOH) von Chromosom 4q24 nachweisen. Im Rahmen der Sequenzierung von TET2 in einem Kollektiv von 309 Patienten mit diversen myeloischen Neoplasien zeigten sich schließlich bei 46 Patienten (15%) somatische, meist trunkierende Mutationen.

Tabelle 1. Prävalenz von TET2-Mutationen in verschiedenen myeloischen Neoplasien.

	MDS	MDS/ MPN	MPN (JAK2V617F positiv)	MPN (JAK2V617F negativ)	AML	sAML	CMML	Systemische Mastozytose	CML
Delhommeau et al, NEJM 2009³⁴	15/81 19%	n.u.	21/181 11%	2/11 18%	n.u.	5/21 24%	2/9 22%	n.u.	n.u.
Jankowska et al, Blood 2009³⁵	2/14 14%	11/30 37%	1/5 20%	n.u.	n.u.	6/14 (MDS/MPN) 0/7 (MDS)	6/17 35%	n.u.	n.u.
Langemeijer et al, Nature Genetics, 2009³⁶	27/102 26%	n.u.	n.u.	n.u.	6/32 19%	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
Abdel-Wahab et al, Blood, 2009³⁷	n.u.	n.u.	27/354 8%	n.u.	12/119 10%	n.u.	29/69 42%	n.u.	n.u.
Kosmider et al, Haematologica, 2009³⁸	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	44/88 50%	n.u.	n.u.
Tefferi et al, Leukemia, 2009³⁹	n.u.	n.u.	32/239 13%	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
Tefferi et al, Leukemia, 2009⁴⁰	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	12/42 29%	n.u.
Makishima et al, Blood, 2011⁴¹	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	6/54 11%
Roche-Lestienne et al, Leukemia, 2011⁴²	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	2/91 2%

n.u.: nicht untersucht

Delhommeau et al. schlossen aus ihren Beobachtungen auf eine Rolle von TET2 als Tumor-Suppressor-Gen in myeloischen Neoplasien. In weiteren Experimenten wiesen sie darüber hinaus TET2-Mutationen in CD34+ hämatopoetischen Stammzellen der Patienten nach. Im Rahmen klonaler Analysen unreifer Progenitorzellen konnten sie bei Patienten, die sowohl eine TET2-Mutation als auch die JAK2V617F-Mutation aufwiesen, letztere Mutation niemals vor dem Auftreten der ersteren nachweisen. Schließlich transplantierten sie CD34+ Zellen von fünf Patienten mit JAK2V617F-

positiver MPN mit oder ohne TET2-Mutationen in NOD-SCID Mäuse und zeigten, dass nur Zellen mit TET2-Mutationen eine langfristige hämatopoetische Rekonstitution erreichten. Im Anschluss konnten TET2-Mutationen auch in einer Reihe anderer myeloischer Erkrankungen nachgewiesen werden. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der Prävalenz von TET2-Mutationen in myeloischen Neoplasien. Darüber hinaus wiesen Quivoron et al. 2011 nach, dass TET2-Mutationen auch in lymphatischen Neoplasien (sowohl in B- als auch in T-Zell-Lymphomen) auftreten.⁴³

1.3.3 TET2 katalysiert DNA-Demethylierung und steuert die epigenetische Regulation

Die Funktion der Proteine der TET-Familie war lange unbekannt. Zunächst konnte 2009 gezeigt werden, dass humanes TET1 die Konversion von 5-Methylcytosin (5mC) zu 5-Hydroxymethylcytosin (hmC) in Säuger-DNA in Zellkulturen und in vitro katalysiert, was eine Rolle im Rahmen der epigenetischen Expressionskontrolle nahelegte.⁴⁴ Eine entsprechende Aktivität konnte auch für alle drei murinen Homologen der TET-Familie nachgewiesen werden.⁴⁵ Darüber hinaus zeigte die Gruppe um Ito eine Rolle von TET1 bei der Selbst-Erneuerung von murinen embryonalen Stammzellen (ES).⁴⁵ Schließlich konnten Ko et al. die Konversion von 5mC zu hmC durch humanes TET2 in Zellkulturen nachweisen.⁴⁶ Diese katalytische Aktivität wurde durch die in myeloischen Neoplasien auftretenden *TET2*-Mutationen eingeschränkt. Genetische Maus-Modelle (*TET2*^{-/-}) hatten eine gestörte Hämatopoese, einen kompetitiven Wachstumsvorteil der hämatopoetischen Vorläuferzellen sowie eine Neigung zu hämatologischen Neoplasien.^{43,47}

Im Jahr 2011 schließlich konnte in vitro und in Zellkulturmodellen demonstriert werden, dass die Proteine der TET-Familie auch die weitere Oxidierung von 5hmC zu 5-Formylcytosin und 5-Carboxylcytosin katalysieren können⁴⁸⁻⁵⁰, und dass diese Reaktionsprodukte der Thymin-DNA-Glykosylase (TDG) durch Basenexzisionsreparatur aus der DNA entfernt werden können⁵⁰. Damit konnte erstmals ein mechanistisches Modell für die Demethylierung von DNA etabliert werden.⁵¹ Einige (aber nicht alle) klinische Studien zeigen auch eine prognostische Relevanz des *TET2*-Mutationsstatus bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie.^{52,53}

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass TET2 in DNA die Oxidation von 5mC katalysiert, was zu einer DNA-Demethylierung führt. Die Methylierung von Cytosin in DNA ist eine evolutionär konservierte Möglichkeit zur epigenetischer Regulierung in Eukaryoten, die zum Silencing, d.h. zur Unterdrückung der Expression des betroffenen Genes führt (Übersicht von Law & Jacobsen⁵⁴). Genetische Tiermodelle, funktionelle Daten aus Zellkultur-Experimenten, und klinische Daten zur Inzidenz von *TET2*-Mutationen in hämatologischen Neoplasien und zur Prognose bei der AML unterstreichen die wichtige Rolle von *TET2* in der normalen wie auch der pathologischen Hämatopoese sowie bei der Entwicklung myeloischer Neoplasien.

1.3.4 *TET2*: Exons und Domänen

TET2^{55,56} verfügt über (mindestens) 11 Exons und aufgrund alternativen Spleißens über multiple mRNA Isoformen (siehe Abbildung 3A für eine schematische Exonstruktur). Auf der Website Ensembl.org⁵⁵ findet sich ein Überblick mit aktuell 12 mRNA-Isoformen (Stand 21.11.2011). Die bisher publizierten Daten zu *TET2*-Mutationen beziehen sich auf *TET2* mRNA variant 1^{57,58} (6009bp kodierende RNA) und das resultierende Protein *TET2* isoform a (2002 aa)^{59,60}.

Pathologische *TET2*-Mutationen lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Missense und nonsense Mutationen finden sich innerhalb der zwischen *TET1*, *TET2* und *TET3* sowie Homologen in anderen Spezies konservierten Domänen^{29,34} (homeobox 1 und 2, siehe Abbildung 3B). Dagegen sind frameshift-Mutationen über den gesamten open reading frame hinweg verteilt.³⁴⁻³⁹

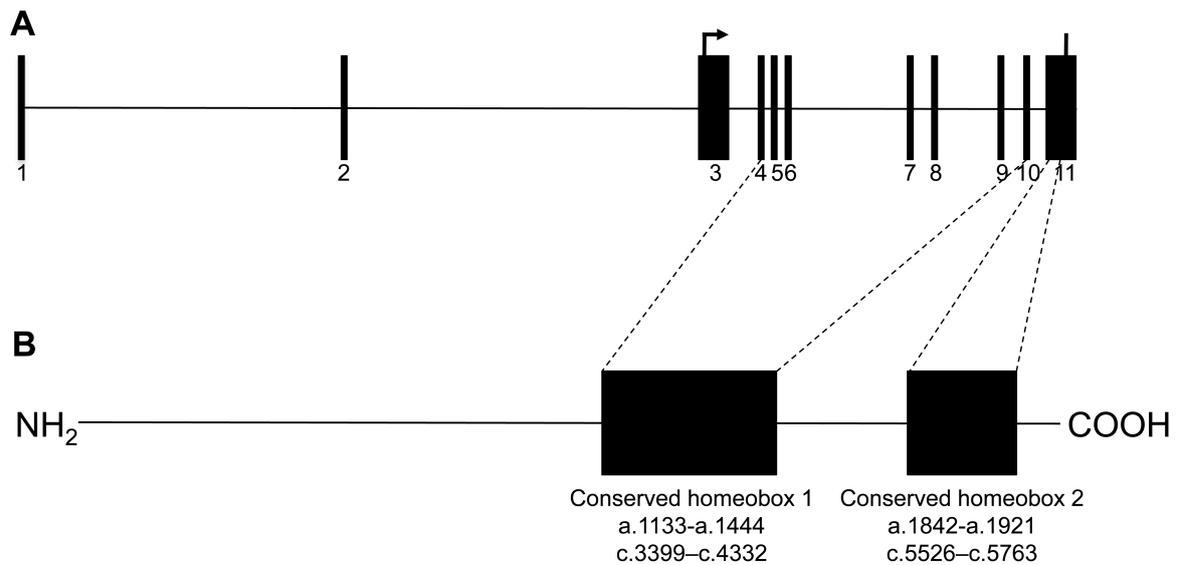


Abbildung 3. A: Schematische Exonstruktur des Gens TET2 (nicht maßstabsgetreu, Pfeil und Strich zeigen Start- und Stopcodon der TET2 mRNA variant 1 an). B: Schematische Domänenstruktur des Proteins TET2 isoform a, (nach Jankowska et al, 2009³⁵). Von TET1-TET3 konservierte Domänen sind als homeoboxes 1 und 2 markiert (nicht maßstabsgetreu); gestrichelte Linien zeigen an, auf welchen Exons die homeoboxes kodiert werden.

1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer schnellen und kostengünstigen Methode zur TET2-Mutationsanalyse für die klinische Praxis. Da sich frameshift-Mutationen, die zu einem Funktionsverlust des Proteins führen können, über die gesamte Länge von 6009 bp auf 8 Exons (teils nur 100 bp lang) verteilen können, entschied ich mich zur Sequenzierung von cDNA, um die zu sequenzierenden Fragmente unabhängig von der Exonlänge und damit ökonomischer einteilen zu können.

Nach der Etablierung der Methode anhand von AML-Zellkulturen war die TET2-Mutationsanalyse aus dem Knochenmark von *BCR/ABL*-positiven Patienten (2010 waren TET2-Mutationen in der CML noch nicht untersucht worden) sowie von JAK2V617F-positiven Patienten geplant. Da in einem Knochenmarksaspirat neben dem malignen Klon auch somatische Zellen und damit somatische DNAs vorliegen und die Sensitivität der Kettenabbruchsequenzierung zur Mutationsdetektion abnimmt, je mehr somatische DNA in einer untersuchten Probe vorhanden ist, erfolgte die Auswahl von in der JAK2V617F-Schmelzkurvenanalyse hochpositiven Proben unter der Annahme, dass in diesen Proben der Anteil des JAK2-mutierten Klons relativ zum

somatischen Hintergrund hoch ist. Zum Vergleich wurden auch Proben mit einem niedrigpositiven Ergebnis der JAK2V617F-Schmelzkurvenanalyse untersucht.

Im Rahmen der Mutationsanalyse fiel unerwartetes alternatives Spleißen von TET2 auf. Dadurch erweiterte sich die Zielsetzung um die Charakterisierung dieser Spleißvarianten.

2. Material und Methoden

2.1 Zelllinien

Die humanen Zelllinien (Tabelle 2) sind in der Arbeitsgruppe etabliert. Weitere Informationen zu den einzelnen Zelllinien finden sich auf der Website der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH⁶¹ und für die Zelllinie HT93 bei Kishi et al.⁶²

Tabelle 2. *Verwendete humane Zelllinien. Neben AML- und CML-Zelllinien wurden auch MOLM-20 (Chronische neutrophile Leukämie) und U-937 (Hystiozytisches Lymphom) untersucht (hier unter „Andere“ zusammengefasst).*

AML	CML	Andere
EOL-1	K-562	MOLM-20
HEL	KCL-22	U-937
HL-60	KU-812	
HT93	LAMA-87	
Kasumi-1		
KG-1		
MOLM-13		
MV4-11		
NB-4		
OCI-AML2		
OCI-AML3		
PL-21		

2.2 Patienten

Knochenmarksaspirate von Patienten unserer Klinik waren nach Aufklärung und Einwilligung der Patienten zur tumorgenetischen Untersuchung in unser Labor übersandt worden. Zellpellets wurden nach Zentrifugation bei -80°C gelagert.

2.2.1 BCR/ABL Gruppe

Insgesamt wurde Knochenmark von 10 Patienten mit per Polymerasekettenreaktion nachgewiesener Translokation *BCR/ABL*⁶³ auf TET2-Mutationen untersucht (Tabelle 3). Die Proben wurden auf eine hohe *BCR/ABL*-Positivität selektiert, um die Detektion von Mutationen durch Sequenzierung vor einem somatischen Hintergrund zu vereinfachen. Das mediane Alter der Patienten betrug 41 Jahre (28 bis 79) und acht von zehn

Patienten waren männlich. Sieben Patienten befanden sich in der chronischen Phase der CML, zwei in der akzelerierten Phase und nur bei einem der Patienten in der Blastenphase (C3) handelte es sich nicht um die Probe bei Erstdiagnose. Die M-Bcr-Abl-Expression der Patienten, gemessen durch RT-PCR und ausgedrückt in Prozent des Mittelwertes eines Kollektivs von Patienten bei Erstdiagnose, reichte von 59% bis 493%, bei einem Mittelwert von 180%.

Tabelle 3. Patientencharakteristika der BCR/ABL-Gruppe. CP: chronische Phase; AP: akzelerierte Phase; BP: Blastenphase. M-Bcr-Abl RT-PCR in % des Mittelwerts eines Kollektivs von Patienten bei Erstdiagnose.

	Alter	Geschlecht m/w	Monate seit Diagnose	Phase	M-Bcr-Abl %
C1	39	m	0	CP	59
C2	28	m	0	CP	60
C3	79	m	142	BP	493
C4	61	m	0	CP	271
C5	38	m	0	CP	154
C6	49	m	0	AP	105
C7	69	w	0	AP	248
C8	34	w	0	CP	218
C9	42	m	0	CP	61
C10	35	m	0	CP	136

2.2.2 JAK2-Gruppe

Darüber hinaus wurde auch Knochenmark von 34 Patienten mit per Schmelzkurvenanalyse nachgewiesener Mutation *JAK2V617F*⁶⁴ (siehe auch Abbildung 4) und damit einer nachgewiesenen MPN untersucht. Diese Proben wurden, basierend auf einer visuellen Einschätzung der Schmelzkurven, zum einen Teil auf eine besonders hohe *JAK2V617F* Positivität (*JAK2H*, 24/34, Tabelle 4) und zum Vergleich auf eine besonders niedrige Positivität selektiert (*JAK2L*, 10/34, Tabelle 5). Ziel war es, die Sequenzierung vor einem somatischen Hintergrund zu vereinfachen.

Das mediane Alter der Patienten betrug 64 Jahre (28 bis 89, Tabelle 4) in der *JAK2H*-Gruppe und 67 (35 bis 72, Tabelle 5) in der *JAK2L*-Gruppe. 17/24 bzw. 4/10 Patienten waren männlich. Die Zeit seit Diagnosestellung betrug im Median 4 (0 bis 174) bzw. 0 (0 bis 148) Monate.

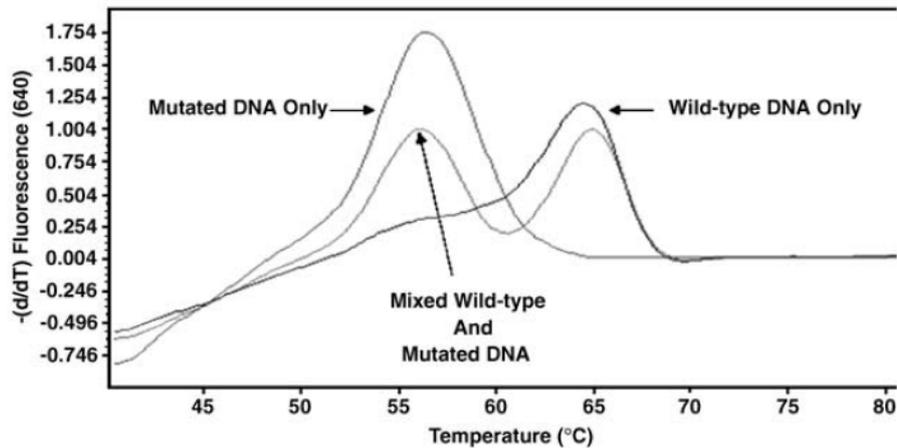


Abbildung 4. Repräsentatives Beispiel für das Ergebnis einer Schmelzkurvenanalyse zur Detektion der Mutation JAK2V617F (aus: McClure et al., 2006⁶⁴). Proben mit einem Verlauf nahe der als „mutated DNA only“ markierten Kurve wurden als hochpositiv eingeordnet, solche mit einem Verlauf zwischen Negativkontrolle („wild-type DNA only“) und „mixed wild-type and mutated DNA“ als niedrigpositiv.

Tabelle 4. Patientencharakteristika der JAK2-Gruppe (hochpositiv).

	Alter	m/w	Monate seit Diagnose	Diagnose
H1	48	w	174	PV
H2	84	w	0	PV
H3	55	m	0	OMF
H4	62	w	0	PV
H5	60	m	108	OMF aus PV
H6	80	m	22	MPN
H7	64	w		
H8	71	w		MPN
H9	34	m	0	PV
H10	28	m	4	OMF
H11	68	w	0	PV
H12	64	m	132	PV
H13	47	m	0	ET
H14	66	m	0	ET
H15	45	m		PV
H16	66	m	120	PV
H17	54	m	76	sAML aus MPN
H18	82	m		PV
H19	65	m	0	PV
H20	89	m	0	MPN
H21	64	m		OMF
H22	56	w	33	sAML aus ET
H23	54	m	35	ET
H24	64	m	110	OMF aus PV

Tabelle 5. Patientencharakteristika der JAK2-Gruppe (niedrigpositiv).

	Alter	m / w	Monate seit Diagnose	Diagnose
L1	72	w	0	AML
L2	48	w	0	ET
L3	54	m	148	OMF aus PV
L4	69	w	0	V.a. MPN
L5	39	w		PV
L6	68	w		SM mit OMF
L7	69	m	32	OMF aus PV
L8	35	w		
L9	68	m	0	ET
L10	66	m		

2.3 Molekularbiologische Methoden

Bei allen molekularbiologischen Arbeitsschritten wurde Wert auf Arbeitssicherheit und die Vermeidung von Kontaminationen sowie der enzymatischen Degeneration von Zwischenprodukten gelegt. Vor- und Nach-PCR Bereiche waren räumlich getrennt und alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. DNA wurde bei -20°C und RNA bei -80°C gelagert. Beim Umgang mit Ethidiumbromid wurden Nitrilhandschuhe getragen.

2.3.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA aus kultivierten Zellen und Patientenzellen erfolgte entweder mittels des TRIzol-Reagenz oder des NucleoSpin RNA II-Kits. Die entscheidenden Reaktionsschritte bei beiden Verfahren sind die Lyse der Zellen und die Inaktivierung von RNasen, gefolgt von der Isolierung der RNA aus dem Lysat. Die Bestimmung der RNA-Konzentration in ng/µl erfolgte in beiden Fällen nach Verdünnung von 4 µl RNA in 96 µl H₂O durch Messung der optischen Dichte bei $\lambda=260$ nm in einem Photometer. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.3.1.1 TRIzol-Reagenz

Das Verfahren basiert auf der single-step-Methode⁶⁵, bei der die Lyse der Zellen und die Inaktivierung von RNasen als erster Schritt durch Zugabe und Mischen mit 1 ml chaotropem Guanidinisothiocyanat (TRIzol®) erfolgt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden zur Entfernung von Protein und DNA 200 µl Chloroform

zugegeben, für 30 s durch Vortexen gemischt und die Proben für 3 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 8°C und 13.500 g. Die obere, wässrige Phase wurde abpipettiert und mit der darin enthaltenen RNA zur Fällung in ein Reaktionsgefäß mit 500 µl 2-Propanol überführt. Nach Vortexen und einer weiteren Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine Zentrifugation (10 min, 8°C, 13.500 g), wonach der Überstand abpipettiert und verworfen wurde. Das RNA-Pellet wurde mit 800 µl 75% Ethanol gewaschen (Zentrifugation 10 min, 8°C, 13.500 g), der Überstand nochmals verworfen und das Pellet bei geöffnetem Deckel für 30 min auf Eis getrocknet. Schließlich wurde das RNA-Pellet in 100 µl DEPC-Wasser gelöst.

2.3.1.2 Nucleo Spin RNA II Kit

Die RNasen werden auch hier durch das im Lysepuffer enthaltene Guanidinisothiocyanat inaktiviert. Zusätzlich wird 2-Merkaptoethanol zur Lyse verwendet. Die Isolierung der RNA erfolgt durch eine Ethanol-fällung und Ionenaustauscher-Säulen. Die Verwendung entsprach den Vorgaben des Herstellers. Alle Zentrifugationsschritte wurden in einer Tischzentrifuge bei 11.000 g und 20°C durchgeführt. Zusammengefasst wurden die Zellen zunächst in 350 µl des mitgelieferten Lysepuffers mit 1% 2-Merkaptoethanol lysiert. Das Lysat wurde durch eine NucleoSpin-Filtereinheit filtriert (Zentrifugation für 1 min). Nach Zugabe von 350 µl 70% Ethanol (Fällung) wurde das Gemisch zur Bindung der RNA auf die ebenfalls mitgelieferte NucleoSpin RNA II Säule geladen und wiederum zentrifugiert (30 s), worauf der Durchfluss verworfen wurde. Nach Entsalzung der Säule durch 350 µl des mitgelieferten Membrane Desalting Buffer, gefolgt von erneuter Zentrifugation (1 min) und Verwerfen des Durchflusses, erfolgte ein DNase-Verdau durch 95 µl der mitgelieferten rDNase (verdünnt 1:10 im ebenfalls mitgelieferten Reaktionspuffer) für 15 min bei Raumtemperatur. Danach wurden die folgenden Waschschriffe durchgeführt, bei denen jeweils nach der Zentrifugation der Durchfluss verworfen wurde:

1. 200 µl Puffer RA2 30 s 11.000 g
2. 600 µl Puffer RA3 30 s 11.000 g
3. 250 µl Puffer RA3 2 min 11.000 g

Abschließend erfolgte die Eluierung durch 40 µl RNase-freies Wasser für 1 min bei 11.000 g.

2.3.2 cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA erfolgte unter Benutzung eines cDNA Synthesis Kits (Bioline, Luckenwalde), welches BioScript, eine modifizierte RNA-abhängige DNA-Polymerase aus MMLV (Reverse Transkriptase), enthält. Alle Reaktionsschritte wurden, soweit nicht anders erwähnt, in einem PCR-Block durchgeführt. Zunächst wurde die RNA nach Zugabe von DEPC-behandeltem Wasser und zufälligen Hexamer-Primern (Tabelle 6, links) bei 70°C (5 min) denaturiert und die Primer wurden bei 25°C hybridisiert (10 min). Nach jedem der beiden Temperaturschritte wurde die Mischung kurz auf Eis gekühlt.

Tabelle 6. Reaktionsansätze für cDNA-Synthese. Links: Reaktionsansatz für die Hybridisierung der zufälligen Hexamer-Primer. Rechts: Zugegebene Reagenzien für die eigentliche reverse Transkription.

RNA	3000 ng
Zufällige Hexamer-Primer 50 ng/μl	9 μl
DEPC-H ₂ O	auf 36 μl

	μl pro Ansatz
Puffer x 5	12
dNTPs 10 mM	12
RNase-inhibitor 40 U/μl	0,75
Bioscript RT 200 U/μl	0,75

Danach wurden der Reaktionspuffer, der RNase-Inhibitor, die Reverse Transkriptase sowie die dNTPs zugegeben (Tabelle 6, rechts). Für die reverse Transkription wurde für 1 h bei 42°C inkubiert. Abschließend folgte eine weitere Denaturierung bei 70°C für 10 min. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA *in vitro*.⁶⁶ Neben der Ausgangs-DNA sind eine thermostabile, DNA-abhängige, bakterielle DNA-Polymerase, ein entsprechender Reaktionspuffer, Magnesiumionen, Oligonukleotide (primer) zur Definition der beiden Enden des zu amplifizierenden DNA-Fragments sowie dNTPs als Bausteine der zu produzierenden DNA erforderlich. Die eigentliche Reaktion erfolgt in einem PCR-Block, der die Temperatur des Reaktionsgemisches, wie für die einzelnen Reaktionsschritte erforderlich, steuern kann.

Zunächst werden die DNA-Doppelstränge durch Hitze denaturiert. Daraufhin erfolgt die Hybridisierung (annealing) von zwei komplementären Oligonukleotiden auf den (-)-Strang am Anfang und auf den (+)-Strang am Ende des zu amplifizierenden Segments. Im anschließenden Elongationsschritt produziert die DNA-Polymerase beginnend an den Primern in 5'-3'-Richtung aus den zugegebenen dNTPs zu den denaturierten Einzelsträngen komplementäre Doppelstränge. Danach beginnt der Zyklus durch erneute Denaturierung von vorne. Auf diese Weise ist eine massive Amplifikation der ursprünglichen DNA-Menge möglich. Im Rahmen dieser Arbeit diente die PCR zwei verschiedenen Zwecken: Zum einen zur Bestimmung von Fragmentlängen – hierfür wurde aufgrund der hohen Syntheserate Taq-DNA-Polymerase eingesetzt; zum anderen zur Amplifikation von cDNA für die Sequenzierung, wofür trotz der deutlich geringeren Syntheserate Pfu-Polymerase verwendet wurde, weil sie aufgrund ihrer zusätzlichen 3'-5' – Exonukleaseaktivität über eine geringere Fehlerquote verfügt. Die jeweils verwendeten Reaktionsansätze und Zyklusbedingungen sind im Folgenden tabellarisch (Tabelle 7, Tabelle 8) aufgeführt. Zum Primerdesign siehe das Kapitel zu Oligonukleotiden.

Tabelle 7. Zyklusbedingen (links) und Reaktionsansatz (rechts) für Taq-PCR.

Denaturierung	95°C	5'	34x
Denaturierung	95°C	30"	
Annealing	60°C	30"	
Elongation	72°C	30"	
Elongation	72°C	10'	
	8°C	∞	

	µl pro Ansatz	Konzentration
Puffer x 10	1	1x
Magnesium, 50 mM	0,25	1,25 mM
dNTPs, 10 mM	0,8	0,8 mM
Forward primer, 10 mM	0,25	0,25 mM
Reverse primer, 10 mM	0,25	0,25 mM
Taq Polymerase, 5 U/µl	0,1	0,5 U
Template	1	
H ₂ O	6,35	

Tabelle 8. Zyklusbedingen (links) und Reaktionsansatz (rechts) für Pfu-PCR.

Denaturierung	95°C	2'30"	34x
Denaturierung	95°C	30"	
Annealing	60°C	30"	
Elongation	72°C	7'30"	
Elongation	72°C	7'30"	
	8°C	∞	

	µl pro Ansatz	Konzentration
Puffer x 10	4	1x
Magnesium, 25 mM	6,4	4 mM
dNTPs, 10 mM	6,4	0,4 mM each
Forward primer, 10 mM	1	0,25 mM
Reverse primer, 10 mM	1	0,25 mM
Pfu Polymerase 2, 5U/µl	0,6	1,5 U
Template	4	
H ₂ O	16,6	

2.3.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten abhängig von ihrer Länge. Die zu untersuchende DNA wird zunächst mit einem Gelladepuffer gemischt – die enthaltene Saccharose erhöht die Dichte der Lösung. Diese und der Farbstoff des Gelladepuffers erlauben ein leichtes Beladen der Geltaschen. Im Prinzip wirkt das Gel aus Agarosepolymeren wie ein Netz, durch das die negativ geladenen Nukleinsäuren abhängig von ihrer Größe verschieden schnell in Richtung der Anode wandern – je kleiner, desto schneller. Durch Zugabe von Ethidiumbromid, welches in DNA interkaliert und danach unter UV-Licht fluoresziert, werden die DNA-Bänder sichtbar, so dass ihre Länge und grobe Menge relativ zu einem bekannten Marker bestimmt werden kann. Darüber kann durch das Ausschneiden eines Bands auf dem UV-Leuchttisch mit nachfolgender Gelextraktion DNA einer bestimmten Länge aufgereinigt werden.

Zur Herstellung von 2%-Agarose-Gelen wurden 3 g Agarose in 150 ml TAE-Puffer in einem Mikrowellenofen aufgekocht. Vor dem Gießen des Gels wurden 1,5 µl Ethidiumbromid zugegeben. Zu ladende DNA wurde mit 1/10 Volumen Gelladepuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer als Laufpuffer unter einer Spannung von 130 V. Die Gele wurden unter UV-Licht in einer Photokammer digital abfotografiert und die Bilder wurden digital gespeichert.

2.3.5 Gelextraktion

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde unter Zuhilfenahme eines QIAquick Gel Extraction Kits (QIAGEN GmbH, Hilden) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in einer Tischzentrifuge bei 11.000 g und 20°C. Prinzipiell wird das Gelstück ausgeschnitten, aufgelöst und die DNA in einer chaotropen Hochsalzumgebung an die Silika-Matrix einer Aufreinigungssäule gebunden. Nach mehreren Waschschritten wird die DNA aus der Matrix eluiert und bei -20°C gelagert.

Das gewünschte Band, durch Ethidiumbromid und UV-Licht sichtbar gemacht, wurde auf dem UV-Leuchttisch mit dem Skalpell ausgeschnitten, gewogen und mit dem dreifachen Volumen eines Puffers (QG) versetzt. Das Gel wurde durch zehnmündigige Inkubation in einem Schüttler bei 50°C gelöst. Im Anschluss wurde ein Gelvolumen

Isopropanol hinzugefügt, gemischt und die Lösung durch die Aufreinigungssäule zentrifugiert, wodurch die DNA an die enthaltene Silika-Matrix gebunden wurde. Nach zwei weiteren Waschschritten (Puffer QG und Puffer PE) durch Zentrifugation wurde die Membran durch erneute Zentrifugation getrocknet, bevor mit 50 µl Puffer EB eluiert wurde. Die Bestimmung der dsDNA-Konzentration in ng/µl erfolgte nach Verdünnung von 4 µl DNA in 96 µl H₂O durch Messung der optischen Dichte bei $\lambda=260$ nm in einem Photometer. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.3.6 DNA-Sequenzierung

Die hier angewandte Methode zur Sequenzanalyse von cDNA basiert auf der 1977 von Sanger et al. vorgestellten Kettenabbruchmethode⁶⁷ – automatisiert durch den Einsatz fluoreszierender Marker und einer Kapillare.⁶⁸ Die zu untersuchende DNA wird dazu im Rahmen der Sequenzierreaktion mit DNA-Polymerase, einem Primer (Sequenzierprimer) und Nukleotiden inkubiert. Ähnlich wie bei der Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion werden durch einen mehrfachen Zyklus von Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation multiple DNA-Stränge synthetisiert. Allerdings werden neben den zur DNA-Synthese notwendigen Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) auch 2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) zugesetzt. Aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe führt deren Inkorporation zu einem Kettenabbruch – an genau den Stellen, wo das korrespondierende dNTP hätte inkorporiert werden sollen. Ursprünglich wurden vier parallele Reaktionen mit jeweils einem ddNTP (ddGTP, ddATP, ddTTP oder ddCTP) durchgeführt. Die mit ³²P radioaktiv markierten Produkte konnten nebeneinander auf einem Agarosegel nach Größe getrennt werden. Jedes Band aus der (beispielsweise) mit ddGTP versetzten Reaktion markiert somit die Position eines Guanins in der DNA-Sequenz. Wie in Abbildung 5 beispielhaft an einer Abbildung aus Sangers Publikation demonstriert, kann die Sequenz von unten (dem kürzesten Fragment) nach oben abgelesen werden.

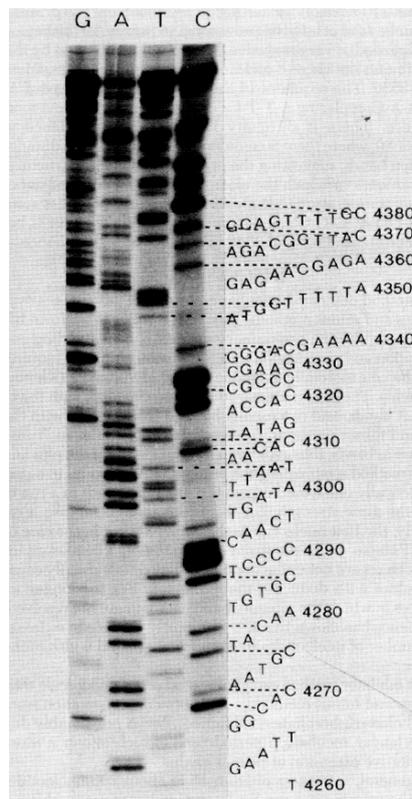


Abbildung 5. Kettenabbruchsequenzierung des Bakteriophagen Φ X174 unter Benutzung ^{32}P -markierter Didesoxynukleotide (aus: Sanger et al, 1977⁶⁷). Die Produkte vier separater Sequenzierreaktionen mit jeweils einem markierten ddNTP (G: ddGTP; A: ddATP; T: ddTTP; C: ddCTP) sind parallel auf einem Gel aufgetrennt. Da ein ddNTP nur an der Position des korrespondierenden dNTPs inkorporiert wird, kann die Sequenz vom kürzesten (untersten) Fragment nach oben von Band zu Band abgelesen werden, wie am rechten Rand dargestellt.

Diese Methode wurde beschleunigt und automatisiert, indem die Zahl der Reaktionen durch die gleichzeitige Verwendung von vier verschiedenen fluoreszierenden ddNTPs auf eine reduziert, das Gel durch eine gelgefüllte Kapillare ersetzt und die Erfassung der Reihenfolge der von einem Laser angeregt fluoreszierenden DNA-Fragmente („peaks“) von einer Photozelle übernommen wurde (siehe Abbildung 6).⁶⁸ Der Aufbau des für die vorliegende Untersuchung verwendeten ABI 310 ist in Abbildung 7 dargestellt. Im Einzelnen wurden die Proben wie folgt untersucht: Template-DNA (ca. 1400 bp Fragmentlänge, ca. 50 ng/ μl) wurde nach Gelextraktion mit DNA-Polymerase, dNTPs und fluoreszierend markierten ddNTPS (fertig als Big Dye Kit), dem dazugehörigen Puffer sowie einem Sequenzierprimer als Startpunkt der Reaktion in einem PCR-Block inkubiert (Zyklusbedingungen und Reaktionsansatz, siehe Tabelle 9).

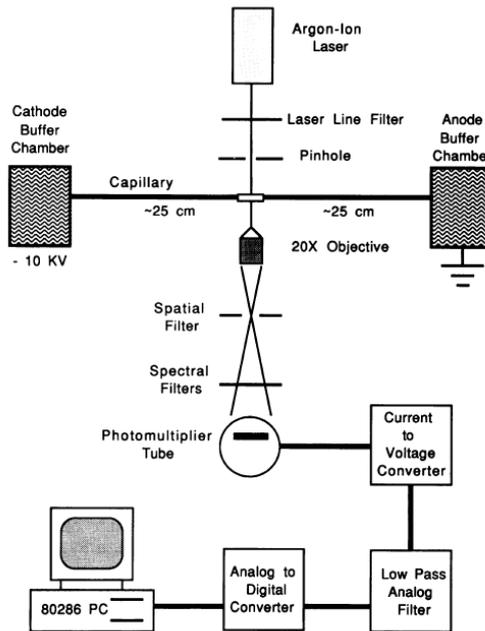


Abbildung 6. Kapillarsequenzierung – schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus (aus: Swerdlow et al, 1990⁶⁸). Die Produkte der Sequenzierreaktion werden in einer gelgefüllten Kapillare (Capillary) elektrophoretisch nach Größe aufgetrennt und beim Passieren des Objektivs (Objective) von einem Laser (Argon-Ion Laser) zur Fluoreszenz angeregt. Diese wird durch einen Photoelektronenvervielfacher (Photomultiplier Tube) registriert und das Signal wird digital weiterverarbeitet.

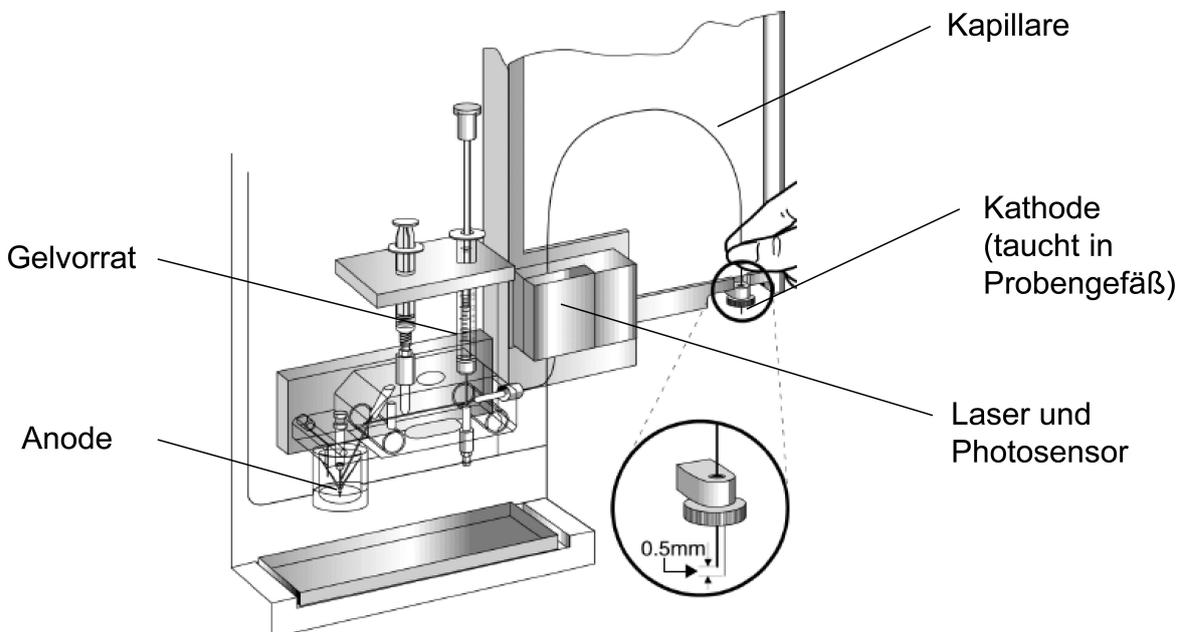


Abbildung 7. Kapillarsequenzierer ABI Prism 310 (aus: ABI Prism 310 User's Manual⁶⁹). Diese Zeichnung zeigt den tatsächlichen experimentellen Aufbau (siehe auch das Schema in Abbildung 6).

Tabelle 9. Zyklusbedingungen (links) und Reaktionsansatz (rechts) für die Sequenzierreaktion.

Denaturierung	95°C	10''	30x
Annealing	50°C	5''	
Elongation	60°C	4'00''	
	8°C	∞	

	µl pro Ansatz	Konzentration
Sequenzierpuffer x 5	2	1x
Big Dye Terminator Kit v1.1	2	1x
Sequenzierprimer, 10 mM	0,5	0,5 mM
Template	2	Ziel: 100 ng
H ₂ O	3,5	

Zur Entfernung der nicht in DNA-Produkte inkorporierten Fluoreszenz-markierten ddNTPs wurden die Reaktionsprodukte durch eine Ethanolfällung aufgereinigt: Nach Zugabe von 90 µl DEPC-Wasser wurde das Reaktionsprodukt in ein Gefäß mit 10 µl Natriumacetat (3 M) überführt. Zusätzlich wurden pro Gefäß 250 µl absolutes Ethanol sowie 1 µl Dextranblau zugegeben. Nach dem Mischen folgte eine zehninütige Inkubation bei Raumtemperatur und im Anschluss die Zentrifugation für 20 min bei 11.000 g und 20°C. Hiernach wurde der Überstand abpipetiert und verworfen und das Pellet wurde für 10 min bei 50°C getrocknet. Zwischen allen weiteren Reaktionsschritten wurden die Reaktionsgefäße auf Eis gelagert. Nach der Trocknung wurde das Pellet in 20 µl Hi-Di Formamid gelöst (10 min, 37°C, Schüttler). Schließlich wurden die Proben für 2 min bei 90°C denaturiert und bei 4°C in 0,5 ml Gefäße überführt, mit Septen bedeckt und bis zur Beladung des Sequenzierers gelagert. Die Wartung des ABI Prism 310 (insbesondere Wechsel von Kapillaren, Polymer, Puffer, wöchentliche Reinigung und Kalibrierung des Probenautomaten) wurde entsprechend den Herstellervorgaben durchgeführt. Pro Lauf wurden 48 Proben geladen (davon jeweils eine bereits mit gutem Ergebnis sequenzierte Probe als Positivkontrolle). Die Sequenzierung erfolgte nach Beladung der Kapillare für 30 s (Spannung 2 kV) für 36 min (15 kV) bei einer Temperatur von 50 °C.

2.3.7 Sequenzauswertung

Die Erfassung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe von Sequencing Analysis 3.4.1. Die so gewonnenen Sequenzen wurden mit Sequencher 3.0 an der Sequenz *TET2* mRNA variant 1^{57,58} ausgerichtet und peak für peak manuell ausgewertet. Zunächst wurde nur in die Vorwärtsrichtung sequenziert, bei Verdacht auf eine Mutation oder bei unklaren peaks auch in die Gegenrichtung. Durch überlappende Primerpaare wurde die gesamte Länge der mRNA erfasst.

2.3.8 Oligonukleotide

Primer wurden mit Hilfe von Primer3plus entworfen (Vorgaben: Länge 21-25bp, Annealing Temperatur 59-65°C, 20-80% GC-Anteil). Durch einen Abgleich in BLAST gegen humane DNA- und cDNA-Bibliotheken wurden multiple komplementäre Regionen ausgeschlossen. Alle Oligonukleotide wurden von TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH hergestellt. Tabelle 10 zeigt die Sequenzen der zur PCR und zur Sequenzierung verwendeten Primer.

Tabelle 10. Liste der verwendeten Primer für die Polymerasekettenreaktion und Sequenzierung

Primerpaar	Forward	Reverse	Amplikon (bp)
PCR Primer (1400bp)			
TET2cDNA1o	TTTGCTCCTGTTGAGTTACAACG	GGGAGAAAGAAGCAATTGTGATG	1369
TET2cDNA1i	CCTGTTGAGTTACAACGCTTGG	CCTGTTGAGTTACAACGCTTGG	1358
TET2cDNA2o	GTGAAGAATTCTGTTCCAGTTCCA	ACCTGTATTTTGCATGCACTTGA	1450
TET2cDNA2i	GAATTCTGTTCCAGGTTCCAGCAG	CATGCACTTGATTTTCATGGTCTG	1433
TET2cDNA3o	AAGGATCATTCTTTGGCCAGACT	CACCAGGATGAGAATCACAAATCA	1416
TET2cDNA3i	TTCTTTGGCCAGACTAAAGTGA	ATCACAACTCACTGCAGCCTCAC	1361
TET2cDNA4o	TGGACAGAAGGGTAAAGCTATTAGG	CAGCTTGAGATGAGGTGGAATAG	1310
TET2cDNA4i	TGGTAAAGAAGGCAAAGTTCTCA	GAAGTTCATAGGGCTGGTGCTT	1243
TET2cDNA5o	CCACATCACCCCTCAGACAGAGTC	AATACTGTGACCTTTCCCCACTG	1466
TET2cDNA5i	TGTCAACTCTTATTCTGCTTCTGGA	ACTGCCACGTCATGAGAACTAT	1424
Sequenzierprimer			
TET2cDNAS1	AAGAGCAGTAAGGGACTGAGCTG	CTCACACGACTATTCTGGCTTCC	296
TET2cDNAS2	GAGACACCAAGTGGCACTCTTTC	ATTTTCAGGCCCACTGCAGTTAT	380
TET2cDNAS3	GCCCAAGAAAATGCAGTTAAAGA	AGTTAGAGGTCTGTGCGGAATTG	397
TET2cDNAS4	GAGATCACTCACCCATCGCATA	TCCTTAGTGAACACTGAGCTTTGC	383
TET2cDNAS5	GTGGCAGCTCTGAACGGTATTTA	CATTGTCCCTGCAGTCTGTATGT	398
TET2cDNAS6	AAGGCCTCAGAATAATTGTGTGAA	TCCAGTGTATTGTTTGGAGGTCA	388
TET2cDNAS7	CATCACTGCCATCAATTCTTCAG	AGCCTGTTGATTCAAGTGCTGTT	371
TET2cDNAS8	GAGCAGATTCCCAAAGTAAAAA	TCTGTACTTCTCCAGTCCCATT	375
TET2cDNAS9	ATTCAAAATCAAGCGAGTTTCGAG	CGCAGCTTGTTGACCAGACATA	365
TET2cDNAS10	GCAGAAGTCACAACAAGCTTCAG	TGCAGGTGGATTCTCTTGCTTA	382
TET2cDNAS11	ACCACCAGAAAACAAAACATGGA	TTGAGTCTTGACAGGTGATCCAA	394
TET2cDNAS12	AAGACACCAACAAAAGAACAGC	CACCAAACACAGTAGCTTCTTCA	372
TET2cDNAS13	AAGTTCTCAGGGATGTCCTATTGC	AAACTTCTTGGGATCTTGCTTC	364
TET2cDNAS14	CCTTCTCTTTTGGTTGTTTCATGG	CCTCAGGTTTTCTCCAAATTCT	384
TET2cDNAS15	GCACATTGGTATGCACTCTCACT	GTCTGAAAGTCGAAAAGTTCT	384
TET2cDNAS16	CAAAACAAACTGAAAACGCAAGC	TTGGATAAGGACTAACTGGATTGG	246
TET2cDNAS17	CTTCTGGATCCACCAATCCATAC	AACTCTGGCTATTTCCAAACCTTG	381
TET2cDNAS18	TAAGCTCAGTCTACCACCCATCC	ATTAGCTGTGTGGGAAAGCATGT	382
TET2cDNAS19	TGCATCTCCAAAACAAGGAGAAT	ATGTTTTGGCTCATTTCATGCTCT	398
TET2cDNAS20	AGGATCTCCCTCGTCTTTTACCA	GACAGGTTGGTTGTGGTCTTTTC	377

2.4 Statistische Methoden

Exploratorische statistische Analysen wurden mit Fisher's Exact Test für kategoriale Variablen mit SPSS 17.0 durchgeführt. Das beidseitige Signifikanzniveau betrug $p < 0.05$.

2.5 Chemikalien

2-Merkaptoethanol, 98%	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
2-Propanol, 99,7%	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Absolutes Ethanol, 99,9%	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Agarose für DNA Elektrophorese	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Chloroform, mindestens 99%	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
DEPC-behandeltes Wasser	Bioline GmbH, Luckenwalde
dNTP Mix, 10 mM	Bioline GmbH, Luckenwalde
Dextranblau	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol, 70%	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid, 1% in Wasser	Merck KGaA, Darmstadt
Hi-Di Formamid	Applied Biosystems, Foster City, USA
High-Throughput Ladder I	Bioline GmbH, Luckenwalde
LiChrosolv Water for chromatography	Merck KGaA, Darmstadt
Propidiumiodid, 95%	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
POP-6	Applied Biosystems, Foster City, USA
Tris Ultra	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
TRizol	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.6 Puffer

TE-Puffer	10 mM Tris HCl 1 mM EDTA pH 8 mit HCL
TAE-Puffer (50x), pH 8,5	AppliChem GmbH, Darmstadt Tris 242,28 g/L Eisessig 60,05 g/L EDTA 18,61 g/L
Gelladepuffer (5x)	0,05% Bromphenolblau 40% Saccharose 0,1 M EDTA, pH 8,0 0,5% SDS

2.7 Enzyme

Pyrococcus furiosus DNA Polymerase	Pfu DNA Polymerase 2,5 U/ μ l (nativ)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Thermus aquaticus DNA Polymerase	Platinum Taq DNA Polymerase 5 U/ μ l (rekombinant)	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.8 Kits

RNA-Isolierung	NucleoSpin [®] RNA II	MACHEREY- NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
cDNA-Synthese	cDNA Synthesis Kit	Bioline GmbH, Luckenwalde
Gelextraktion	QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Sequenzierreaktion	Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA

2.9 Laborgeräte

Gelkammer	Agagel Midi-Wide	Biometra, Göttingen
Gelphotokammer	Universal Hood II	Bio-Rad, Hercules, USA
Kapillarsequenzierer	ABI Prism 310	Applied Biosystems, Foster City, USA
Mikrowellenofen	Continent MW800	
PCR-Block	iCycler Thermal Cycler GeneAmp PCR System 9700	Bio-Rad, Hercules, USA Applied Biosystems, Foster City, USA
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten	Einkanalpipette Labmate (0,5 -10 µl, 2-20 µl, 10- 100 µl, 20-200 µl, 100- 1000 µl) Elektronische Einkanalpipette (5-100 µl, 10-500 µl, 50-1000 µl) PIPETBOY acu	P.Z. HTL S.A., Warschau, Polen Biohit Oyj, Helsinki, Finland INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Schüttler	Thermomixer 5436 Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg Eppendorf AG, Hamburg
Spannungsquelle	Power-Pac 300	Bio-Rad, Hercules, USA
UV-Leuchttisch	ECX-20.M	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Zentrifugen	Centrifuge 5415 C Centrifuge 5415 R Centrifuge 5417 R SPROUT (Mini- Zentrifuge)	Eppendorf AG, Hamburg Eppendorf AG, Hamburg Eppendorf AG, Hamburg Heathrow Scientific LLC, Vernon Hills, USA

2.10 Verbrauchsmaterialien

Gefäße für Kapillarsequenzierer	0,5 ml Sample tubes Septa for 0,5 ml Sample tubes	Applied Biosystems, Foster City, USA Applied Biosystems, Foster City, USA
Küvette für Photometer	UVette	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Biosphere Filter tips 1000 µl blue	Sarstedt AG, Nürnberg
	Biosphere Filter tips 200 µl	Sarstedt AG, Nürnberg
	Sterile aerosol pipet tips 100 µl	VWR, West Chester, USA
	Biosphere Filter Tipps 20 µl	Sarstedt AG, Nürnberg
	Filterspitze PP natur 10 µl	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe
Reagiergefäße 1,5 ml	Safeseal Reagiergefäße 1,5 ml	Sarstedt AG, Nürnberg
Reagiergefäße für PCR	Multiply-µStrip Pro 8er Kette	Sarstedt AG, Nürnberg
Sequenzierkapillaren	310 Genetic Analyzer Capillaries 5-47 cm x 50 µm	Applied Biosystems, Foster City, USA
Skalpell	Neox Steriles Einmalskalpell	Maersk Medical, Sheffield, UK

2.11 Software

Gelphotographie	Quantity One v4.6	Bio-Rad, Hercules, USA
Sequenzanalyse	Sequencing Analysis 3.4.1	Applied Biosystems, Foster City, USA
Sequenzauswertung	Sequencher 3.0	Gene Codes, Ann Arbor, MI, USA
Statistik	SPSS 17.0	SPSS Inc, USA

2.12 Websites

Blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=9606
dbSNP	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP
Ensembl	http://www.ensembl.org/
Eukaryotic GeneMark.hmm	http://opal.biology.gatech.edu/GeneMark/eukhmm.cgi
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
NetGene2	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2
Primer3plus	http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi

3. Ergebnisse

3.1 Ablaufplan des Sequenzierungsprojekts

Aufgrund der Leistung des zur Verfügung stehenden Kapillarsequenzierers (max. 400-500 bp pro Sequenzierreaktion, d.h. pro Stunde) und der Tatsache, dass sich frameshift-Mutationen, die zu einem Funktionsverlust des Proteins führen können, über die gesamte Länge von *TET2* mRNA variant 1^{57,58} (6009bp auf acht teils nur 100 bp langen Exons) verteilen können, entschied ich mich zur Sequenzierung von cDNA, um die zu sequenzierenden Fragmente unabhängig von der Exonlänge und damit ökonomischer einteilen zu können. Zur Gewinnung einer ausreichenden Menge an DNA für die Sequenzierung (100 ng pro Ansatz) wurde eine PCR von fünf überlappenden 1400 bp - Fragmenten mit Pfu Polymerase durchgeführt (Abbildung 8, Primerpaare TET2cDNA1o, -2o etc., siehe Tabelle 10). Falls die Menge der in diesem ersten Schritt gewonnenen DNA nicht ausreichend war (~50 ng/µl), erfolgte eine erneute PCR mit dem Produkt des ersten Schritts und einem knapp nach innen versetzten Primerpaar („nested PCR“, Primerpaare TET2cDNA1i, -2i etc., siehe Tabelle 10).

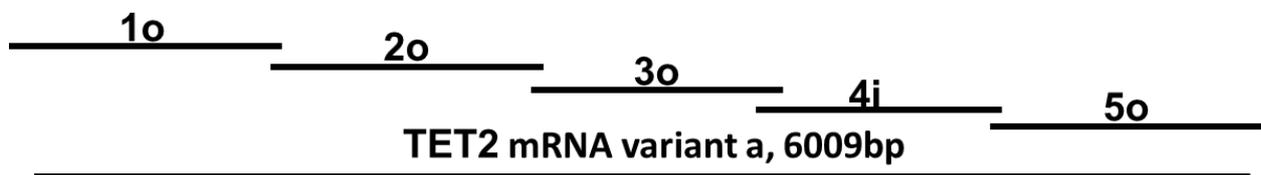


Abbildung 8. Überlappende 1400 bp-Fragmente als Template zur Sequenzierung. Hier wurde beispielweise für Fragment vier eine zusätzliche nested-PCR durchgeführt.

3.2 TET2-Mutationsanalyse

Für jedes der 5 überlappenden Fragmente von ca. 1400 bp Länge wurden Sequenzierreaktionen mit den Primern von 4 wiederum überlappenden Primerpaaren (Sequenzierprimer, Tabelle 10) von ca. 400 bp Abstand durchgeführt – zunächst nur mit den Forwardprimern. Bei schwer auswertbaren Sequenzen oder Verdacht auf Mutationen wurde zusätzlich mit den Reverseprimern in die Gegenrichtung sequenziert.

3.2.1 Interpretation

Die Beschreibung der Sequenzvariationen folgte der Nomenklatur von den Dunnen & Antonarakis.⁷⁰ Mutationen wurden mit einer SNP-Datenbank abgeglichen (dbSNP). Alle trunkierenden Mutationen (also frameshift- und nonsense- Mutationen) wurden als pathologisch gewertet, ebenso wie alle missense-Mutationen im Bereich der konservierten homeoboxes 1 und 2 (Abbildung 3, c.3399–c.4332 und c.5526–c.5763). Andere bisher nicht als SNPs beschriebene Punktmutationen außerhalb der homeoboxes wurden als unklar eingeordnet. Abbildung 9 zeigt Sequenzbeispiele für die genannten Mutationstypen.

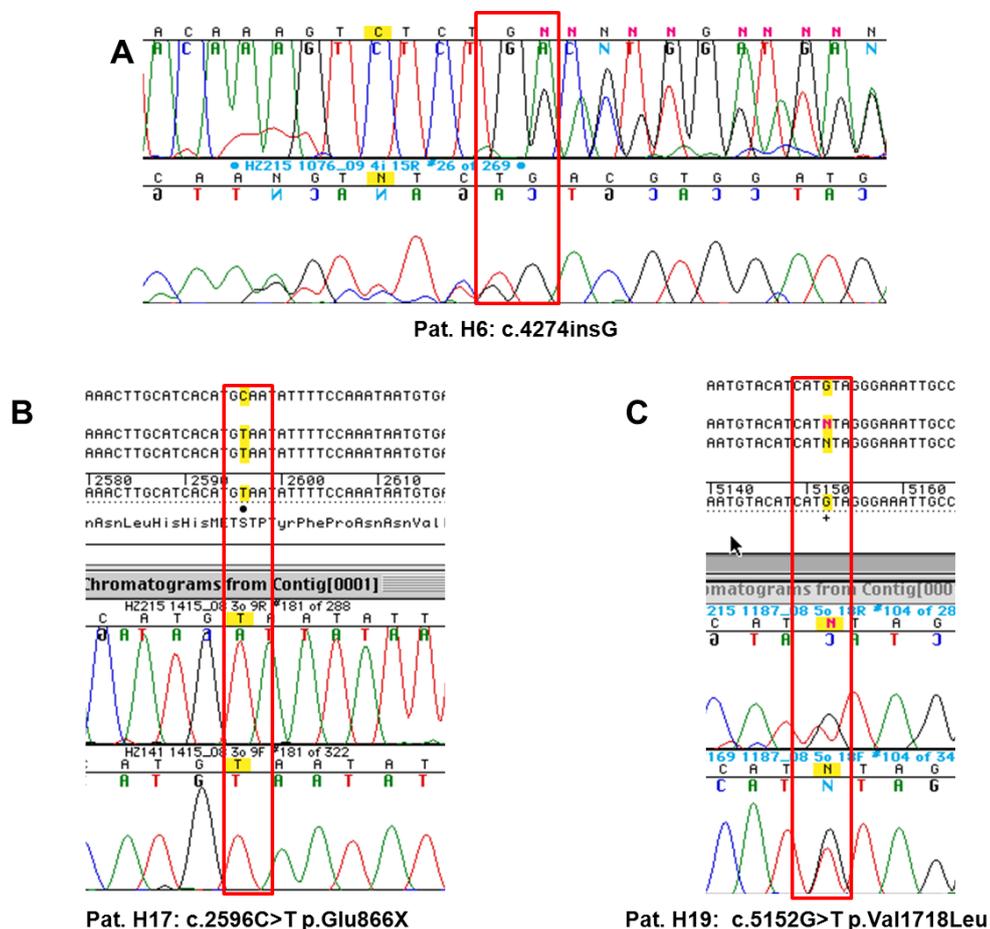


Abbildung 9. Beispiele für Chromatogramme mit pathologischen TET2-Mutationen: A: Frameshift (Insertion): Beginnend nach Base c.4274 (roter Rahmen) findet sich in beide Richtungen eine Überlagerung der Wildtypsequenz durch eine exakt um eine Base verschobene Sequenz als Resultat einer Insertion an dieser Position. B: Nonsense: Anstatt des erwarteten blauen peaks (C) an Position c.2596 (roter Rahmen) ein roter Peak (T) – diese homozygote Mutation resultiert in einem Stopkodon (TAA). C: Missense-Mutation in einer homeobox: Anstelle des erwarteten peaks für G (schwarz) finden sich an Position c.5152 zwei peaks: der zusätzliche rote (T) peak ist auf eine heterozygote Mutation zurückzuführen, die zu einem Austausch der Aminosäure in einem konservierten Bereich des Proteins führt.

3.2.2 Ergebnisse der TET2-Mutationsanalyse in Zelllinien

Aufgrund der einfachen Verfügbarkeit großer Mengen RNA wurden zur Etablierung der Methode zunächst eine Reihe von im Labor der AG Daniel verfügbaren humanen Zelllinien auf TET2-Mutationen untersucht. In den zwölf untersuchten AML-Zelllinien fanden sich keine pathologischen TET2-Mutationen; neun der untersuchten Zelllinien enthielten SNPs (Tabelle 11). In den vier untersuchten CML-Zelllinien konnten ebenfalls keine pathologische Mutationen festgestellt werden (Tabelle 12).

Tabelle 11. Ergebnisse der TET2-Mutationsanalyse in AML-Zelllinien.

Zelllinie	TET2-Mutationen	
	SNPs	Pathologisch
EOL-1	c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206	
HEL	c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206	
HL-60		
HT93		
Kasumi-1	c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206	
KG-1		
MOLM-13	c.652G>A p.Val218Met rs6843141 c.3117G>A p.Ser1039= rs3796927 c.4140T>C p.His1380= rs3733609 c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206	
MV4-11	c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206	
NB-4	c.86C>G p.Pro29Arg rs12498609	
OCI-AML2	c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206	
OCI-AML3	c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206	
PL-21	c.86C>G p.Pro29Arg rs12498609	
Gesamt	9/12	0/12

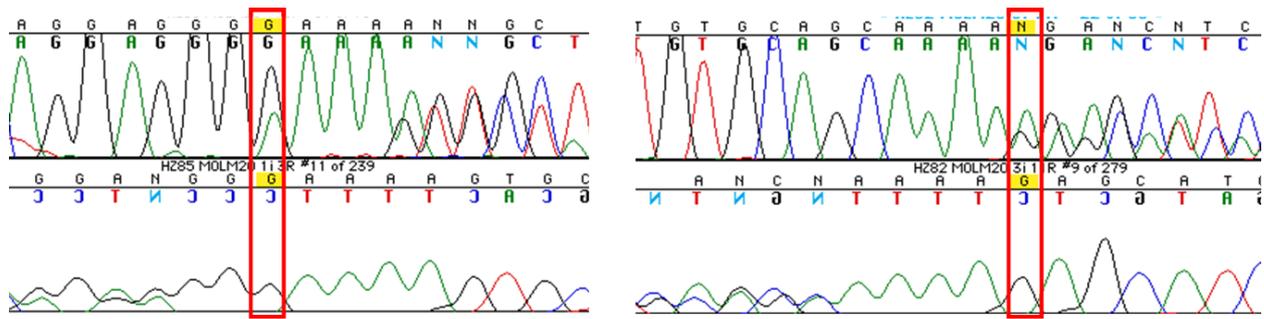
Tabelle 12. Ergebnisse der TET2-Mutationsanalyse in CML-Zelllinien.

Zelllinie	TET2-Mutationen	
	SNPs	Pathologisch
K-562	c.5162T>G p.Trp1721Leu rs3440254	
KCL-22	c.86C>G p.Pro29Arg rs12498609 c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206	
KU-812	c.86C>G p.Pro29Arg rs12498609 c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206	
LAMA-87	c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206	
Gesamt	4/4	0/4

Darüber hinaus wurden zwei weitere Zelllinien untersucht: In MOLM-20, einer Schwesterzelllinie von CNLBC1, welche aus dem peripheren Blut einer 63-jährigen Frau mit chronischer neutrophiler Leukämie (CNL)⁷¹ etabliert worden war, zeigten sich zwei pathologische TET2-Mutationen (Tabelle 13, Abbildung 10).

Tabelle 13. Ergebnisse der TET2-Mutationsanalyse in weiteren Zelllinien: MOLM-20 (Chronische neutrophile Leukämie) und U-937 (Hystiozytisches Lymphom).

Zelllinie	TET2 Mutationen	
	SNPs	Pathologisch
MOLM-20	c.86C>G p.Pro29Arg rs12498609	c.561delG c.3066insA
U-937		
Gesamt	1/2	1/2



MOLM-20 c.561delG

MOLM-20 c.3066insA

Abbildung 10. Chromatogramme mit pathologischen Mutationen (frameshift) der CNL-Zelllinie MOLM-20. Beginnend an den durch rote Rahmen gekennzeichneten Basen finden sich in beide Richtungen Überlagerungen der Wildtypsequenz durch eine exakt um eine Base verschobene Sequenz als Resultat einer Deletion (c.561) bzw. Insertion (c.3066).

3.2.3 Ergebnisse der TET2-Mutationsanalyse in Patientenproben

In keiner der zehn BCR/ABL-positiven Proben fanden sich pathologische Mutationen (0/10, Tabelle 14). Eine missense-Mutation (c.521C>A) war bisher nicht als SNP beschrieben und wurde daher als unklar eingeordnet.

Tabelle 14. Ergebnisse der TET2-Mutationsanalyse in der BCR/ABL-Gruppe.

Patient	TET2 Mutationen		
	SNPs	Pathologisch	Unklar
C1	c.1088C>T p.Pro163Leu rs17253672 c.5162T>G p.Leu1721Trp rs34402524		
C2	c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206		
C3			
C4	c.1064G>A p.Gly355Asp rs61744960 c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206		
C5	c.100C>T p.Leu34Phe rs111948941 c.652G>A p.Val218Met rs6843141 c.5333A>G p.His1778Arg rs62621450		
C6	c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206		
C7			
C8	c.5162T>G p.Leu1721Trp rs34402524 c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206		
C9	c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206		c.521C>A p.Pro174His
C10			
Gesamt	7/10	0/10	1/10

Im Gegensatz dazu fanden sich in 11/34 (32%) JAK2V617F–positiven Proben pathologische TET2-Mutationen (Tabelle 15; Beispiele Abbildung 9). In einer Probe fand sich eine unklare Mutation (c.5030C>G).

Tabelle 15. Ergebnisse der TET2-Mutationsanalyse in der JAK2-Gruppe.

Patient	TET2-Mutationen		
	SNPs	Pathologisch	Unklar
H1	c.1064G>A p.Gly355Asp rs61744960 c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206		
H2			
H3	c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206	c.3129insA	
H4	c.652G>A p.Val218Met rs6843141 c.3117G>A p.Ser1039= rs3796927 c.4140T>C p.His1380= rs3733609		
H5	c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206	c.3721G>A p.Ala1241Thr	
H6	c.1088C>T p.Pro363Leu rs17253672 c.5162T>G p.Leu1721Trp rs34402524	c.4274insG	
H7	c.1088C>T p.Pro363Leu rs17253672 c.5162T>G p.Leu1721Trp rs34402524		
H8	c.1088C>T p.Pro163Leu rs17253672 c.5162T>G p.Leu1721Trp rs34402524 c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206		
H9	c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206		
H10			
H11	c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206		
H12	c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206		
H13	c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206		
H14	c.5162T>G p.Leu1721Trp rs34402524	c.1388insT	
H15	c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206		
H16	c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206		
H17	c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206	c.2596C>T p.Glu866X	
H18	c.5162T>G p.Leu1721Trp rs34402524 c.5650A>G p.Thr1884Ala rs76428136		
H19		c.4553C>G p.Ser1518X c.5152G>T p.Val1718Leu	
H20	c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206		
H21	c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206		
H22	c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206		
H23	c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206		
H24	c.1064G>A p.Gly355Asp rs61744960	c.3989C>T p.Ser1330Phe	
L1		c.1630C>T p.Arg544X	c.5030C>G p.Thr1677Arg
L2			
L3	c.5162T>G p.Leu1721Trp rs34402524		
L4	c.100C>T p.<Leu34Phe rs111948941 c.652G>A p.Val218Met rs6843141		
L5		c.5152G>T p.Val1718Leu	
L6	c.1064G>A p.Gly355Asp rs61744960 c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206	c.787G>T p.Glu263X c.5626G>A p.Ala1876Thr	
L7			
L8	c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206	c.5885C>T p.Pro1962Leu	
L9	c.5162T>G p.Leu1721Trp rs34402524		
L10	c.5284A>G p.Ile1762Val rs2454206		
Gesamt	27/34	11/34	1/34

3.2.4 Vergleich der TET2-Mutationsfrequenzen in den verschiedenen Patientengruppen

Es bestand ein signifikanter Unterschied ($p=0.046$, Abbildung 11) in der Frequenz von pathologischen TET2-Mutationen zwischen den JAK2V617F-positiven Proben (11/34, 32%) und den BCR/ABL-positiven Proben (0/10).

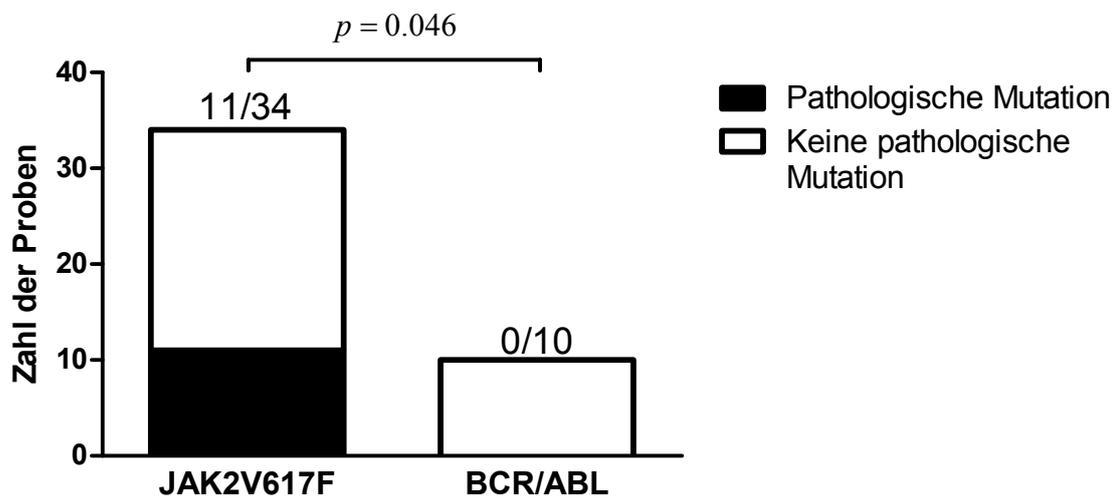


Abbildung 11. Frequenz von pathologischen TET2-Mutationen in JAK2V617F-positiven Proben und BCR/ABL-positiven Proben.

Im Gegensatz dazu bestand kein signifikanter Unterschied zwischen hoch- und niedrig JAK2V617F-positiven Proben (7/24 vs. 4/10, $p=0.692$).

3.3 TET2-Spleißanalyse

3.3.1 Unerwartete Variationen in der Länge der PCR-Produkte in JAK2V617F-positiven Proben

Die oben beschriebene Sequenzierungsstrategie funktionierte in den Zelllinien sowie den BCR/ABL-positiven Proben komplikationslos. Im Gegensatz dazu fielen bei einigen JAK2V617F-positiven Proben unerwartete Variationen der Länge der 1400bp-PCR-Fragmente auf. Darüber hinaus zeigten sich in diesen Proben in der Sequenzierung multiple, übereinanderliegende Sequenzen im Anschluss an Exon 3 (Abbildung 12).

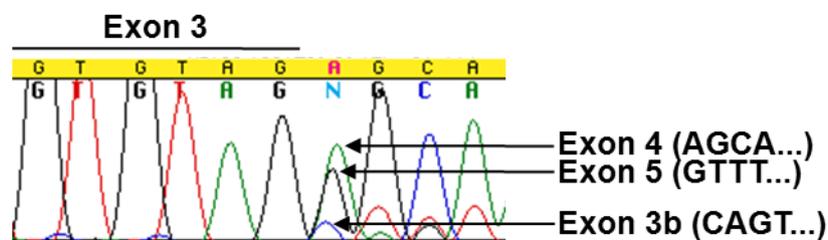


Abbildung 12. Chromatogramm der Sequenzierreaktion mit Sequenzierprimer 12F in Probe H7: Multiple Sequenzen im Anschluss an Exon 3. Die drei überlagerten Sequenzen sind durch Pfeile markiert: der Beginn von Exon 4 und Exon 5 (erwartet aufgrund des bekannten alternativen Spleißens von Exon 4) sowie eine unbekannte Exonsequenz (CAGT...).

Eine Analyse der Länge der mit dem Sequenzierprimerpaar S12 aus der cDNA JAK2V617F-positiver Proben gewonnenen PCR-Fragmente ergab in einigen Fällen neben den erwarteten Bändern für alternatives Spleißen von Exon 4 (281bp [ENSEMBL ENST00000545826⁵⁵] und 372bp [*TET2* mRNA variant 1^{57,58}]) auch ein zusätzliches Band >500bp (Abbildung 13).

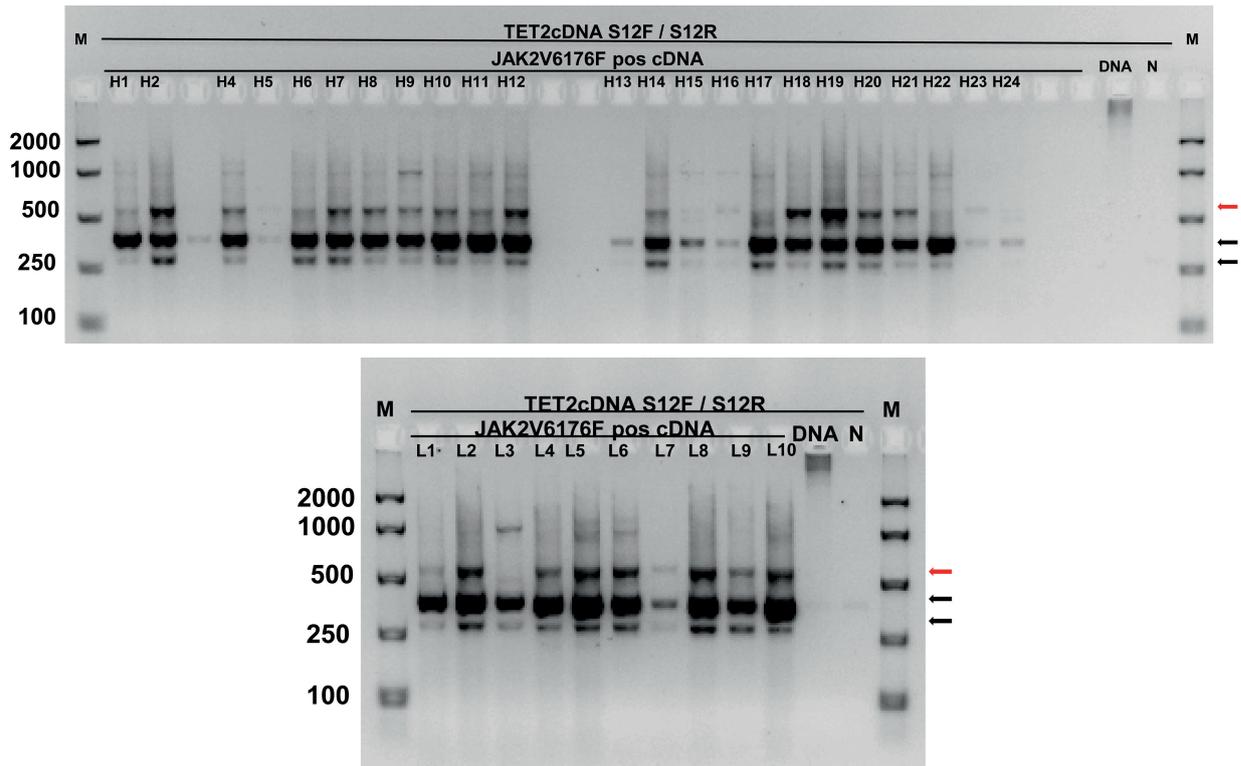


Abbildung 13. Agarosegelelektrophorese der Produkte einer Taq-PCR mit Primerpaar S12 aus cDNA JAK2V6176F-positiver Proben. Die Beschriftung der einzelnen Geltaschen entspricht den Patienten in Tabelle 4 und Tabelle 5. Unbeschriftete Taschen sind nicht beladen. M: Marker, Fragmentlängen am linken Rand in bp. DNA: humane DNA (Kontrolle), N: Negativkontrolle (keine Template zugegeben). Die schwarzen Pfeile am rechten Rand zeigen die Bänder für die erwarteten Produktlängen (281bp und 372bp), der rote Pfeil das unerwartete Fragment >500 bp.

3.3.2 Identifikation eines zuvor nicht beschriebenen TET2-Exons in JAK2V6176F-positiven Proben

In einer der Proben gelang die komplette Sequenzierung eines zuvor nicht beschriebenen 200 bp langen Exons zwischen Exon 3 und Exon 4 aus cDNA (Exon 3b, Abbildung 14).

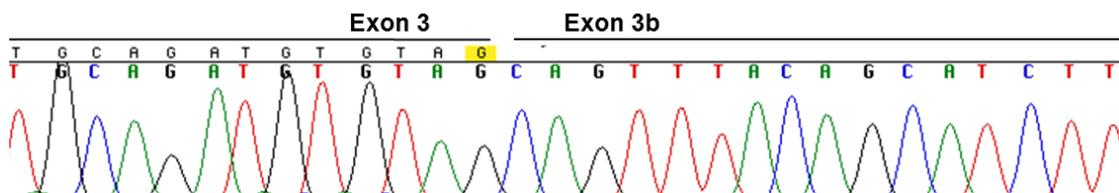


Abbildung 14. Kapillarsequenzierung mit Primer S12 von der Pfu-template 3i in Probe H5: Eine zuvor nicht beschriebene Exonsequenz (Exon 3b) findet sich im Anschluss an Exon 3.

Dieses Exon 3b (contig NT016354.19, ab bp 106,159,672) enthält an Position 170 ein in-frame Stopkodon, führt also zu einer Trunkierung des Proteins. Die Sequenz von Exon 3b (rot) mit den Intronsequenzen upstream und downstream (schwarz) ist folgende:

```
TTTTCCATTACAAAAGATTTCTCTGTAGCATGCAATGCTGTTTGATAGCATTTAACCACAGCAGAA
TTTCTTTGAAAATTGGACTCAGTCCTCTCAAACGTGCTGCTGCTTTTATCAACTAAGTTTTTGTAATTTT
CTGAATCCTTTGTTGTCATTTTCAGCAGTTTACAGCATCTTCATTGGAAGTATATTCCATCTCAAACATTC
TTTGTTTCATCCATAAGAAGCAACTTCTTATCAAGTTTTTTTCATGACATTGCAGTAACTCAGCCCCATCTT
CAGGCTCTACTTCTAATTCTGGTTCTCTTGCTACATCTCCCTCATCTGCAGTGAACCTCTCCACGGAAGTC
TTGAACTCCTCAAAGTAATCCATGAGGGTTGGAATCAACTTCTAAACTCCTGTTAATGTTGATATATTGA
CCCCCTCCCATGAATTATGAATGTTCTTAATAACTTCTAAATGGTGATACCTTCCAGAAGGCTTTCAAT
GTACTTTGCCCGGATCCATCAGAAGACTATCTTGGCAGCT
```

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses untersuchte ich diese Sequenz in silico: NetGene⁷² identifizierte das 5'-Ende von Exon 3b mit einer Konfidenz von 0.14 als splice site und Eukaryotic GeneMark.hmm⁷³ bestätigte dieses Ergebnis (terminales Exon vom 5'-Ende bis zum Stopkodon an Position 170). All diese Beobachtungen lasen sich am einfachsten durch das in Abbildung 15 dargestellte Modell des alternativen Spleißens zwischen Exon 3 und 6 erklären.

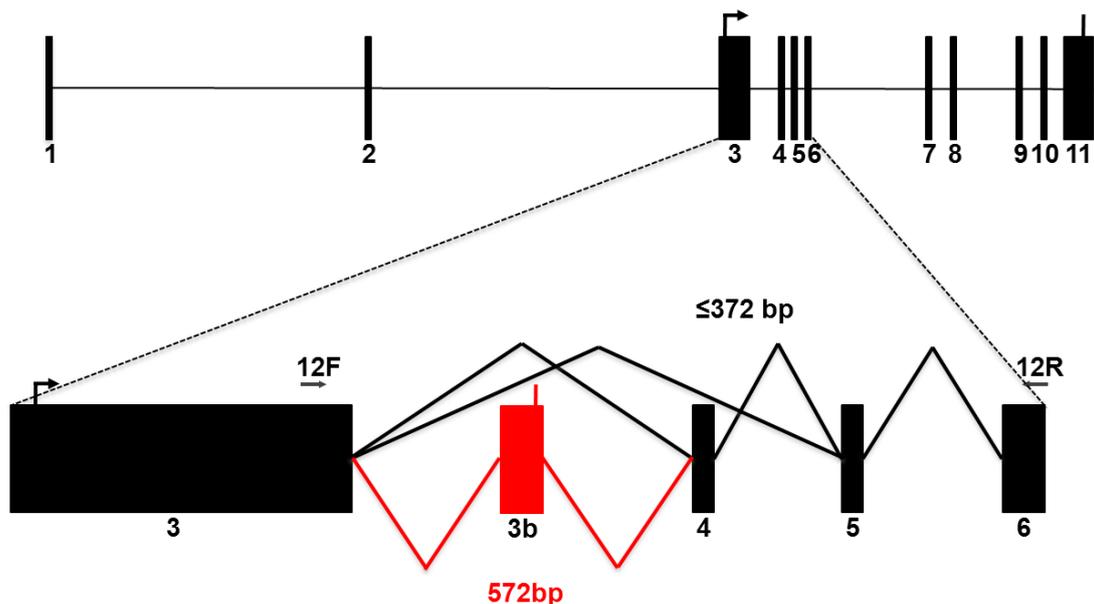


Abbildung 15. Schematische Darstellung der TET2-Exonstruktur und der Spleißvarianten zwischen Exons 3 und 6. Die Positionen der Start- und Stoppcodons (Pfeil und Strich) sowie die Position des Primerpaars 12 (12F und 12 R) sind angezeigt. Bekannte Spleißvarianten sind schwarz, die postulierte Spleißvariante inklusive des neu beschriebenen Exons 3b rot dargestellt. Zusätzlich sind die resultierenden Fragmentlängen einer PCR mit S12 aus cDNA (vgl. Abbildung 11) für die verschiedenen Spleißvarianten in schwarz (bekannt) und rot (inklusive Exon 3b) angegeben.

3.3.3 Expression von Exon 3b in den verschiedenen Patientengruppen

Exon 3b konnte durch Sequenzierung (vergleiche Abbildung 12) in 10/33 (30%, von einer Probe keine cDNA mehr verfügbar) und durch PCR in 16/26 (62%, von acht Proben keine cDNA mehr verfügbar, Abbildung 13) JAK2V617F-positiven Proben nachgewiesen werden (zusammengefasst in Tabelle 16).

Tabelle 16. TET2: pathologische Mutationen und Spleißvarianten in der JAK2V617F-Gruppe. Seq: Exon durch Sequenzierung nachgewiesen. PCR: Exon durch PCR nachgewiesen. nd: aufgrund Materialmangels nicht durchgeführt.

Patient	Pathologische TET2-Mutationen	Alternatives Spleißen					
		Exon 3b		Skip E4		Skip E6	
		Seq	PCR	Seq	PCR	Seq	PCR
H1							ja
H2			ja	ja	ja	ja	ja
H3	ja		nd	ja	nd	ja	nd
H4			ja			ja	ja
H5	ja	ja	nd		nd	ja	nd
H6	ja			ja	ja		ja
H7		ja	ja	ja	ja	ja	ja
H8			ja	ja		ja	ja
H9						ja	ja
H10				ja	ja		ja
H11						ja	ja
H12		ja	ja	ja	ja	ja	ja
H13			nd		nd	ja	nd
H14	ja			ja	ja		ja
H15		ja	nd		nd		nd
H16			nd	ja	nd		nd
H17	ja			ja	ja	ja	ja
H18		ja	ja	ja		ja	nd
H19	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
H20		ja	ja	ja	ja	ja	ja
H21		ja	ja	ja		ja	nd
H22						ja	ja
H23			nd		nd		nd
H24	ja	nd	nd	nd	nd	nd	nd
L1	ja			ja		ja	ja
L2			ja	ja	ja	ja	ja
L3					ja	ja	ja
L4			ja	ja	ja	ja	ja
L5	ja		ja	ja	ja	ja	ja
L6	ja		ja	ja	ja	ja	ja
L7		ja	nd	ja	nd	nd	nd
L8	ja	ja	ja	ja	ja	nd	ja

L9		ja	ja	ja	ja	ja	
L10		ja	ja	ja	ja	ja	
Gesamt	11/34	10/33	16/26	23/33	17/26	24/31	24/24

Im Gegensatz dazu konnte Exon 3b (sei es durch Sequenzierung oder durch PCR) weder in den BCR/ABL-positiven Proben (0/10 und 0/10, Tabelle 17 und Abbildung 16A) noch in einer der untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden (0/18 und 0/18, Tabelle 18 und Abbildung 16B).

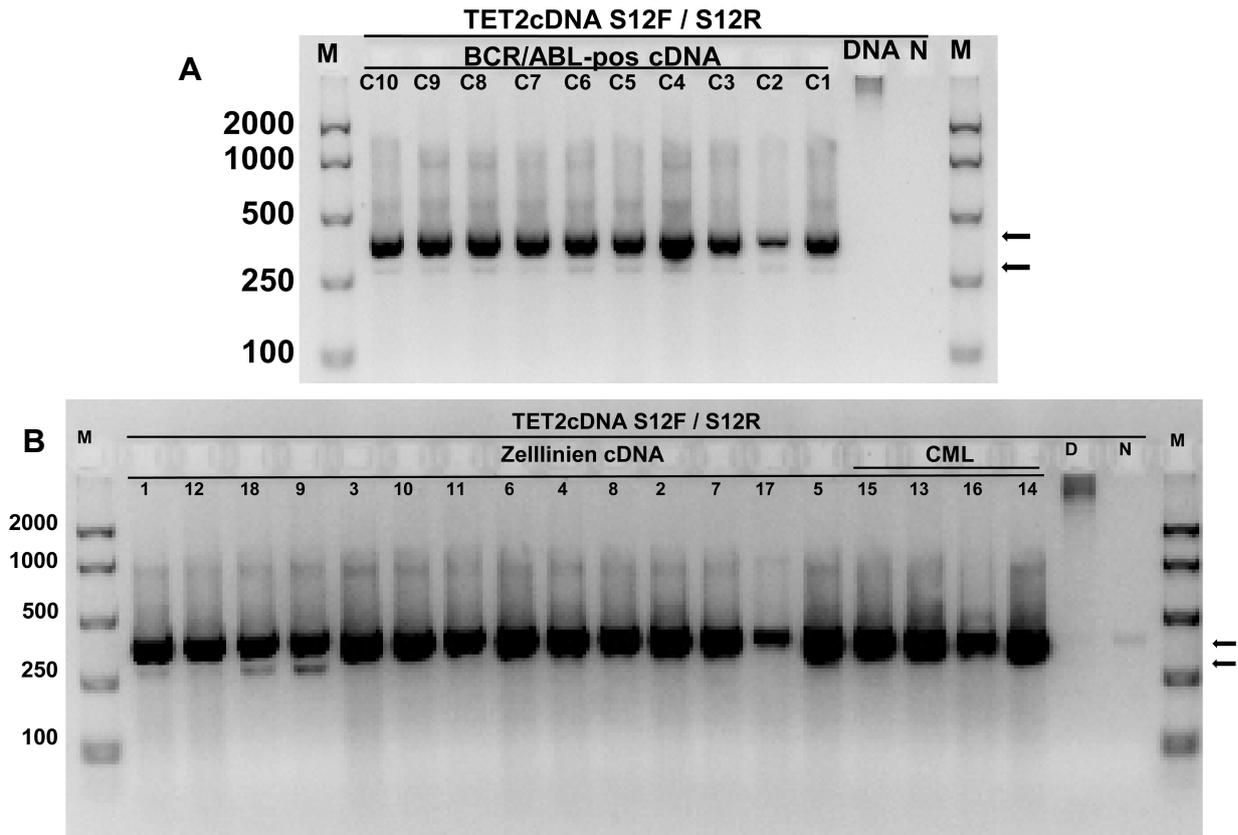


Abbildung 16. Agarosegelelektrophorese der Produkte einer Taq-PCR mit Primerpaar S12 aus der cDNA BCR-ABL-positiver Proben (Gel A, C1-C10, vgl. Tabelle 3) und der Zelllinien (Gel B, 1-16, zur Zuordnung der Proben siehe Tabelle 18). M: Marker, Fragmentlängen am linken Rand in bp. D: humane DNA (Kontrolle), N: Negativkontrolle (keine Template zugegeben). Die schwarzen Pfeile am rechten Rand zeigen die erwarteten Produktlängen (281bp und 372bp), das Produkt >500bp fehlt.

Der direkte Vergleich der beiden Patientengruppen mittels Fisher's Exact Test zeigt für die Sequenzierung keine Signifikanz (10/33 vs. 0/10, $p=0.084$), jedoch für die PCR (16/26 vs. 0/10, $p=0.001$) – wobei es sich in beiden Fällen um qualitative Nachweismethoden handelt und die Sequenzierung die geringere Sensitivität aufweist. Vergleicht man die Patientenproben, in denen eine pathologische Mutation und/oder Exon 3b (durch Sequenzierung) nachgewiesen werden konnte, zeigt sich wiederum ein

signifikanter Unterschied zwischen JAK2V617F-positiven (18/34) und BCR/ABL-positiven (0/10) Proben ($p=0.03$).

Tabelle 17. TET2: Pathologische Mutationen und Spleißvarianten in der BCR/ABL-Gruppe. Seq: Exon durch Sequenzierung nachgewiesen. PCR: Exon durch PCR nachgewiesen.

Patient	Pathologische TET2-Mutationen	Alternatives Spleißen					
		Exon E3b		Skip E4		Skip E6	
		Seq	PCR	Seq	PCR	Seq	PCR
C1					ja	ja	ja
C2				ja	ja	ja	ja
C3					ja	ja	ja
C4						ja	ja
C5				ja	ja	ja	ja
C6					ja	ja	ja
C7					ja	ja	ja
C8						ja	ja
C9						ja	ja
C10					ja	ja	ja
Gesamt	0/10	0/10	0/10	2/10	7/10	10/10	10/10

Tabelle 18. TET2: Pathologische Mutationen und Spleißvarianten in den untersuchten Zelllinien. Seq: Exon durch Sequenzierung nachgewiesen. PCR: Exon durch PCR nachgewiesen.

Zelllinie	Pathologische TET2-Mutationen	Alternatives Spleißen					
		Exon 3b		Skip E4		Skip E6	
		Seq	PCR	Seq	PCR	Seq	PCR
1 EOL-1							ja
2 HEL							ja
3 HL-60						ja	ja
4 HT93							ja
5 Kasumi-1						ja	ja
6 KG-1							ja
7 MOLM-13							
8 MV-4							ja
9 NB-4				ja	ja		ja
10 OCI-AML2							ja
11 OCI-AML3							ja
12 PL-21							
13 K-562							
14 KCL-22							
15 KU-812							
16 LAMA-87							
17 MOLM-20	ja						ja
18 U-937					ja		
Gesamt		0/18	0/18	1/18	2/18	2/18	11/18

3.3.4 Alternatives Spleißen von Exon 4

Zusätzlich konnte in den Sequenzierreaktionen ein Skipping von Exon 4 (Abbildung 15), welches aufgrund seiner Länge (91 bp) ebenfalls zu einem frameshift und zu einem trunkierten Protein führt, in 23/33 JAK2V617F-positiven aber nur in 2/10 BCR/ABL-positiven Proben nachgewiesen werden ($p=0.009$, Tabelle 16, Tabelle 17).

In der PCR ist allerdings auch in einigen BCR/ABL-positiven Proben ein (wenn auch sehr schwaches) 281 bp-Band für Exon 4-Skippping zu erahnen (Abbildung 16A), in der PCR daher 17/26 vs 7/10 ($p=1.00$). In den Zelllinien war Exon 4-Skippping allerdings nur in 1/18 (Sequenzierung, Tabelle 18) bzw. 2/18 (Abbildung 16B) nachzuweisen.

3.3.5 Alternatives Spleißen von Exon 6 – ein häufiges Ereignis in allen untersuchten Gruppen

Skippping von Exon 6 (Abbildung 17) ist aktuell noch nicht als Spleißvariante beschrieben⁵⁵ und führt ebenfalls zu einem frameshift.

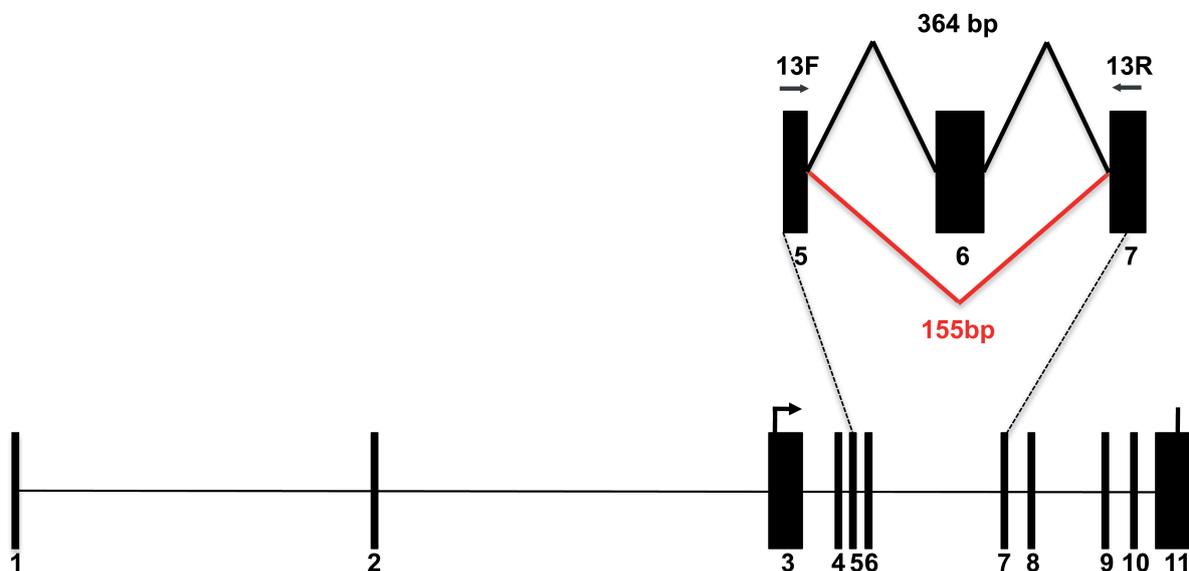


Abbildung 17. Schematische Darstellung der TET2-Exonstruktur und der Spleißvarianten von Exon 6. Die Positionen der Start- und Stoppcodons (Pfeil und Strich) sowie die Position des Primerpaars S13 sind angezeigt. Bekannte Spleißvarianten sind schwarz, die postulierte Spleißvariante ohne Exon 6 rot dargestellt. Zusätzlich sind die resultierenden Fragmentlängen einer PCR mit Primern 13F und 13R aus cDNA (vgl. Abbildung 18) für die verschiedenen Spleißvarianten in schwarz (bekannt, 365bp) und rot (ohne Exon 6, 155bp) angegeben.

Skipping von Exon 6 war allerdings in beiden Patientengruppen häufig nachweisbar (Sequenzierung 24/31 [Tabelle 16] vs. 10/10 [Tabelle 17], $p=0.164$; PCR 24/24 [Abbildung 18] vs. 10/10 [Abbildung 19]).

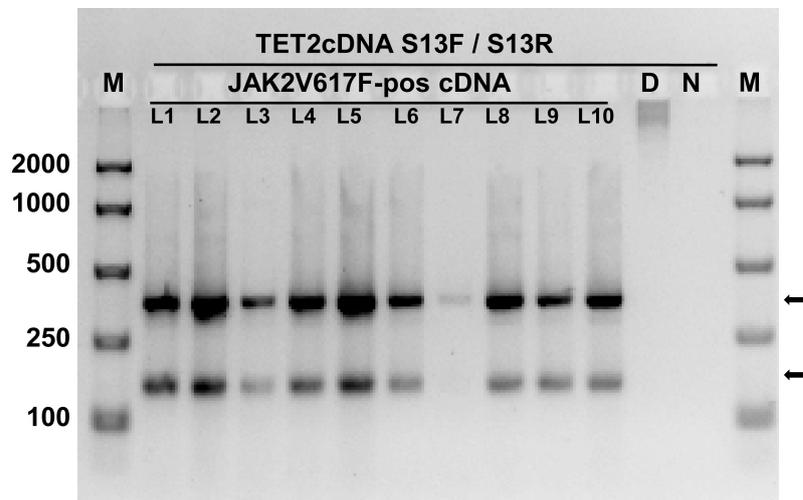


Abbildung 18. Agarosegelelektrophorese der Produkte einer Taq-PCR mit Primerpaar S13 aus der cDNA JAK2V617F-positiver Proben (L1-L10, vgl. Tabelle 5). M: Marker, Fragmentlängen am linken Rand. D: humane DNA (Kontrolle), N: Negativkontrolle (keine Template zugegeben). Die schwarzen Pfeile am rechten Rand zeigen die Produkte mit (364 bp, oben) und ohne Exon 6 (155 bp, unten).

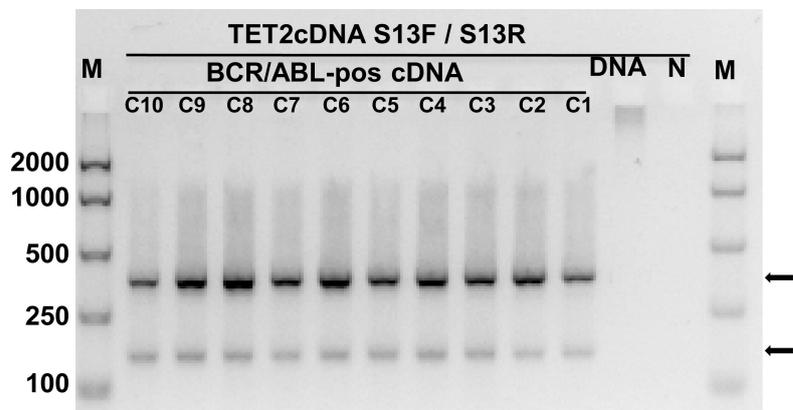


Abbildung 19. Agarosegelelektrophorese der Produkte einer Taq-PCR mit Primerpaar S13 aus der cDNA BCR-ABL-positiver Proben (C1-C10, vgl. Tabelle 3). M: Marker, Fragmentlängen am linken Rand. DNA: humane DNA (Kontrolle), N: Negativkontrolle (keine Template zugegeben). Die schwarzen Pfeile am rechten Rand zeigen die Produkte mit (364 bp, oben) und ohne Exon 6 (155 bp, unten).

In den Zelllinien konnte Skipping von Exon 6 in 2/18 (Sequenzierung, Tabelle 18) bzw. 11/18 (PCR, Abbildung 20) gezeigt werden.

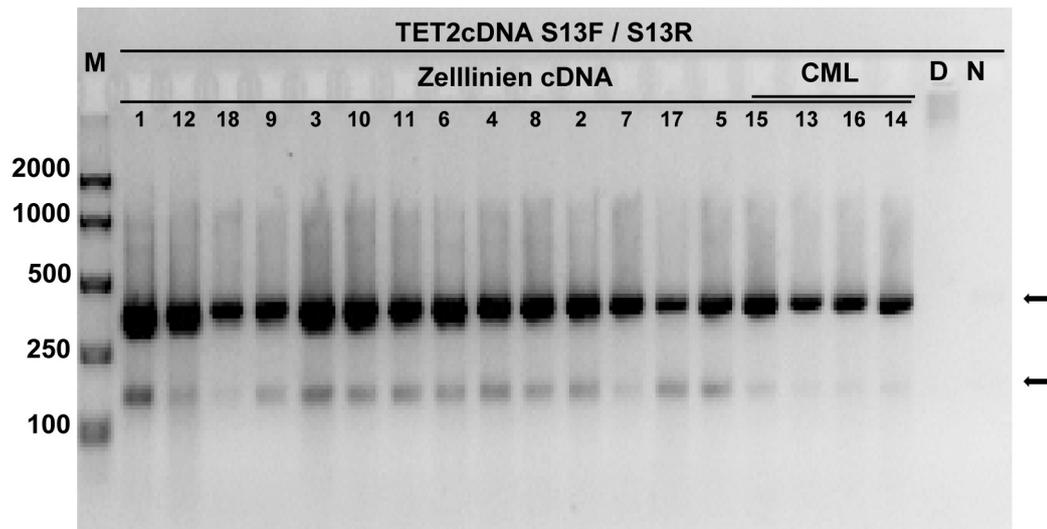


Abbildung 20. Agarosegelelektrophorese der Produkte einer Taq-PCR mit Primerpaar S13 aus der cDNA der Zelllinien (zur Zuordnung der Proben siehe Tabelle 18). M: Marker, Fragmentlängen am linken Rand in bp. D: humane DNA (Kontrolle), N: Negativkontrolle (keine Template zugegeben). Die schwarzen Pfeile am rechten Rand zeigen die Produkte mit (364 bp, oben) und ohne Exon 6 (155 bp, unten).

4. Diskussion

Die Untersuchungen zeigen, dass die Detektion von *TET2*-Mutationen mittels Kapillarsequenzierung von cDNA möglich ist. Die Frequenz von *TET2*-Mutationen war in den untersuchten *JAK2V617F*-positiven Proben signifikant höher als in den untersuchten *BCR/ABL*-positiven Proben. Es bestand kein Unterschied in der Frequenz von *TET2*-Mutationen zwischen hoch und niedrig *JAK2V617F*-positiven Proben. Darüber hinaus fiel auf, dass alternatives Spleißen von *TET2* in MPN häufig ist, dass auch bisher nicht beschriebene Spleißvarianten auftreten können, und dass sich die Frequenz dieser möglicherweise als aberrant einzuordnenden Spleißvarianten in den untersuchten myeloischen Neoplasien unterscheidet.

4.1 Kapillarsequenzierung von cDNA zur Detektion von *TET2*-Mutationen in myeloischen Neoplasien

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Detektion von *TET2*-Mutationen in myeloischen Neoplasien mittels Kapillarsequenzierung aus cDNA grundsätzlich möglich ist. Einschränkend ist festzuhalten, dass die Frequenz von alternativem Spleißen gerade in den *JAK2V617F*-positiven MPN (Tabelle 16) so hoch ist, dass der Aufwand für die Sequenzierung aufgrund der dann auftretenden übereinanderliegenden Sequenzen (Abbildung 12) im Vergleich zu anderen Ansätzen prohibitiv hoch ist. Darüber hinaus kann es durch die (in einigen Fällen als nested PCR, also doppelt durchgeführte) PCR der cDNA auch bei Verwendung einer DNA-Polymerase mit proof-reading-Aktivität zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen kommen, welche die Spezifität der Methode einschränken.

Alternativen wären insbesondere die Kapillarsequenzierung der einzelnen Exons aus DNA unter der Verwendung leistungsfähigerer Geräte (multiple Kapillaren, 800 bp pro Sequenzierreaktion, inklusive Abgleich mit somatischer Patienten-DNA, beispielsweise aus T-Lymphozyten) oder die Pyrosequenzierung.⁷⁴ Letztere Methode steigert auch, gerade bei der Detektion von Mutationen vor einem somatischen Hintergrund, die Sensitivität der Mutationsanalyse.

4.2 Frequenz von pathologischen TET2-Mutationen

Die Aussagekraft der vorliegenden Untersuchung zur Frequenz von pathologischen TET2-Mutationen ist auch aufgrund der methodenbedingt geringen Fallzahl eingeschränkt.

4.2.1 Zelllinien

Weder in den AML- (0/12) noch den CML- Zelllinien (0/4) konnten TET2-Mutationen nachgewiesen werden. Dies ist vereinbar mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen, die eine Mutationsfrequenz von 10% in der AML³⁷ und 2% bis 10% in der CML^{41,42} nachwiesen (siehe auch Tabelle 1).

In der Zelllinie MOLM-20 fanden sich zwei frameshift-Mutationen. Hier ist anzumerken, dass in dieser Zelllinie eine Translokation t(4;11)(q21;q23) vorhanden ist welche das Gen MLL betrifft.⁷¹ MLL kodiert eine Histonmethyltransferase^{75,76}, die ebenfalls eine Rolle bei der Transkriptionskontrolle spielt und sie war der Fusionspartner von TET1 in den Patienten, in denen TET1 erstmals beschrieben wurde.^{28,29}

4.2.2 Patientenproben

Insbesondere bei der Einordnung der Ergebnisse der Mutationsanalyse in den Patientenproben sind Selektionseffekte zu berücksichtigen. Zum einen wurden nur Patienten einer Universitätsklinik untersucht, was einen ersten Selektionsschritt darstellt: Hier kann eine Patientenselektion sowohl durch die zuweisenden Ärzte als auch durch die Patienten selbst eine Rolle spielen. Zum anderen wurden die Proben abhängig vom Ergebnis einer anderen Untersuchung (hochpositiver BCR/ABL-Nachweis, hoch- bzw. niedrigpositive JAK2V617F-Schmelzkurvenanalyse) ausgewählt.

4.2.2.1 BCR/ABL-Gruppe

In Analogie zu den vier untersuchten CML-Zelllinien konnte in keiner der zehn Proben BCR/ABL-positiver Patienten eine TET2-Mutation nachgewiesen werden. In der Literatur sind TET2-Mutationen in CML-Patienten beschrieben^{41,42} (siehe auch Tabelle

1). Diese wurden allerdings nur bei Patienten in der akzelerierten Phase oder Blastenphase⁴¹ beziehungsweise im Rahmen einer akuten myeloischen Transformation festgestellt.⁴²

Dahingegen waren 9/10 der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patientenproben bei Erstdiagnose entnommen und 7/10 Patienten befanden sich in der chronischen Phase der Erkrankung, so dass auch diese Ergebnisse im Einklang mit bisher publizierten Daten stehen und den Eindruck verstärken, dass TET2-Mutationen eher in fortgeschrittenen Phasen der CML auftreten.

4.2.2.2 JAK2V617F-Gruppe

Die hier festgestellte Frequenz von TET2-Mutationen in JAK2V617F-positiven MPN (11/34, 32%) ist etwas höher als bisher publiziert (8-20%, siehe Tabelle 1).^{34,37,39}

Als Ursachen für diese Diskrepanz können in erster Linie die kleine Fallzahl sowie die bereits angesprochenen Selektionseffekte gesehen werden. Darüber hinaus waren im hier untersuchten JAK2V617F-positiven Kollektiv zwei Fälle von sekundärer AML vertreten. In dieser Gruppe waren TET2-Mutationen in 24-43%^{34,35} der Fälle beschrieben worden und auch in der vorliegenden Untersuchung war eine TET2-Mutation in einem von zwei Fällen nachweisbar (Tabelle 16, H17 und H22).

Die Auswahl der in der JAK2V617F-Schmelzkurvenanalyse hochpositiven Proben erfolgte aufgrund der Tatsache, dass in einem Knochenmarksaspirat neben dem malignen Klon auch immer somatische Zellen und damit somatische DNA vorhanden ist. Die Sensitivität der Kettenabbruchsequenzierung zur Mutationsdetektion nimmt ab, je mehr somatische DNA in einer untersuchten Probe vorhanden ist, da das Wildtyp-Signal ein mutiertes Signal überlagert. Ein hochpositives Ergebnis der JAK2V617F-Schmelzkurvenanalyse deutet also darauf hin, dass in der untersuchten Probe der Anteil des JAK2-mutierten Klons relativ zum somatischen Hintergrund hoch ist. Wenn nun sowohl TET2- als auch JAK2-Mutationen im selben Klon vorhanden sind, sollte die Sensitivität der TET2-Mutationsanalyse in JAK2-hochpositiven Proben erhöht sein.

Allerdings bestand kein Unterschied in der Frequenz von TET2-Mutationen zwischen den hochpositiven und niedrigpositiven Proben (7/24 vs. 4/10, p=0.692). Dieses Ergebnis lässt nun (wiederum eingeschränkt durch die geringe Fallzahl) verschiedene Interpretationen zu: Zum einen könnte die Sensitivität der

Kettenabbruchsequenzierung im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen nicht, wie angenommen, limitierend sein. Andererseits können im Laufe der klonalen Evolution von MPN verschiedene Mutationen entweder parallel in unabhängigen Klonen⁷⁷ oder nacheinander im selben Klon auftreten, so dass zu einem gegebenen Untersuchungszeitpunkt verschiedene Subklone (jeweils mit oder ohne JAK2- bzw. TET2- Mutationen) angenommen werden können. Die Tatsache, dass TET2-Mutationen durch Kettenabbruchsequenzierung nachgewiesen werden können, auch ohne dass bereits ein dominanter JAK2V617F-Klon mit einem hochpositiven Schmelzkurvenanalysergebnis vorliegt, kann also als Hinweis darauf gewertet werden, dass TET2-Mutationen im Laufe der klonalen Evolution vor JAK2-Mutationen auftreten. Die Datenlage zu dieser Frage ist allerdings komplex: Frühe Klonalitätsanalysen^{25,26} sprachen für ein spätes Auftreten von JAK2-Mutationen und die Transplantationsexperimente von Delhommeau et al³⁴ wiesen auf ein Auftreten von TET2- vor JAK2-Mutationen hin. Andererseits wurden bei der Analyse von Familien mit erblichen MPN keine erblichen TET2-Mutationen nachgewiesen⁷⁸ und Klonalitätsanalysen an sekundären AML nach JAK2V617F-positiven MPN zeigen einen hohen Grad an klonaler Heterogenität, da TET2-Mutationen sowohl vor als auch nach JAK2-Mutationen nachgewiesen werden konnten.⁷⁹

4.2.2.3 Vergleich der Mutationsfrequenzen in den beiden Patientengruppen

In den insgesamt 44 untersuchten Patientenproben ergab sich ein signifikanter Unterschied in der Frequenz von TET2-Mutationen zwischen der JAK2V617F- und der BCR/ABL-Gruppe ($p=0.046$). Dieser Unterschied ist mit publizierten Daten vereinbar (siehe Tabelle 1) und deutet darauf hin, dass TET2-Mutationen in der Pathogenese JAK2V617F-positiver MPN auf der einen und der CML auf der anderen Seite eine unterschiedliche Rolle spielen.

4.3 Alternatives Spleißen führt zur Inaktivierung von TET2

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer schnellen und kostengünstigen Methode zur TET2-Mutationsanalyse. Eine der Schwierigkeiten der gewählten Methode, also der Sequenzierung von cDNA, bestand jedoch in der Beobachtung von neuen, teils noch nicht beschriebenen alternativen Spleißvarianten

von TET2. Dies erhöhte zwar den experimentellen Aufwand. Andererseits ermöglichte gerade die Analyse der cDNA die Beschreibung dieser neuen Varianten.

Diese bestand in Einzelnen im Nachweis eines weiteren Exons, Exon 3b, durch cDNA-Sequenzierung und der Segmentlängenanalyse von PCR-Produkten aus cDNA in MPN, sowie der Beschreibung des Skippings von Exon 4. Beide Ereignisse traten in den JAK2V617F-positiven Patientenproben häufiger als in BCR/ABL-positiven Proben auf und beide haben eine Trunkierung und damit Inaktivierung des Tumor-Suppressor-Proteins TET2 zur Folge. Diese Beobachtungen legen nahe, dass aberrantes alternatives Spleißen einen weiteren Mechanismus zur Inaktivierung von TET2 in myeloproliferativen Neoplasien darstellt und dass dieser in JAK2V617F-positiven MPN häufiger Auftritt als in der CML.

4.3.1 Grenzen der vorliegenden Analyse alternativen Spleißens von TET2

Das Auftreten unerwarteter Sequenzen in der Sequenzierung aus cDNA nach PCR wurde initial als potentiell Artefakt mehrfacher PCR-Schritte gewertet. Allerdings waren alle Primerpaare mit Blast gegen humane mRNA-Bibliotheken getestet worden. Des Weiteren konnte diese Möglichkeit durch die Fragmentlängenanalyse nach direkter PCR aus cDNA ausgeschlossen werden. Die Negativ- und Positivkontrollen in diesen Experimenten konnten Kontaminationen ausschließen.

Die hier durchgeführten Experimente weisen demnach alternatives Spleißen von TET2 in MPN nach. Allerdings handelt es sich sowohl bei der Sequenzierung als auch bei Fragmentlängenanalyse um qualitative Verfahren, die keine Quantifizierung der verschiedenen Spleißvarianten relativ zueinander zulassen. Eine solche Quantifizierung könnte durch eine quantitative real-time PCR unter Benutzung spezifischer Primerpaare für die einzelnen Spleißvarianten erreicht werden.

4.4 Alternatives Spleißen in hämatologischen Erkrankungen

Das alternative Spleißen von mRNA stellt einen hochflexiblen Kontrollmechanismus für die Genexpression in Eukaryoten dar, der auch in der Pathogenese maligner Erkrankungen eine Rolle spielt (für eine Übersicht siehe David & Manley, 2010⁸⁰). Schon 2006 wurde aberrantes alternatives Spleißen von interferon regulatory factor-1 (IRF-1) in CD34+ hämatopoietischen Vorläuferzellen von MDS-Patienten

nachgewiesen.⁸¹ Im Jahr 2011 zeigte eine Sequenzierungsstudie des gesamten Exoms von 29 Patienten mit MDS häufige Mutationen in Genen wie U2AF35 oder SF3B1, die Kernbestandteile der Spleiß-Maschinerie, des sogenannten Spliceosoms, kodieren. Diese konnten, wenn auch seltener, auch in Patienten mit MPN gefunden werden.⁸² Auch von weiteren Arbeitsgruppen wurden Mutationen des Spliceosoms in MDS nachgewiesen.^{83,84} Darüber hinaus fanden sich Mutationen eines weiteren Spliceosom-Gens, des serinine/arginine rich splicing factor 2 (SRSF2) in 19% von 53 Patienten mit einer sekundären AML nach MPN.⁸⁵ Von besonderer Relevanz für die vorliegende Arbeit ist die Entdeckung, dass in Patienten mit MDS und nachgewiesener Mutation von U2AF1 mittels deep sequencing von mRNA aberrantes Spleißen von TET2, insbesondere zwischen Intron 5 und Exon 6, gezeigt werden konnte.⁸⁶

4.5 TET2: Viele Wege zur Inaktivierung eines Tumorsuppressors

Damit liegt die Hypothese nahe, dass das hier festgestellte aberrante alternative Spleißen von TET2 auch in den MPN Folge einer durch Mutationen ausgelösten Dysfunktion des Spleißapparates sein könnte. Makishima et al. postulieren dies auf der Basis ihrer Untersuchungen in MDS bereits als einen neuen und universellen Mechanismus der Genese hämatologischer Malignome.⁸⁶ Im Falle der MPN sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig, bevor ein kausaler Zusammenhang postuliert werden kann.

Etwas weiter gefasst wäre aberrantes alternatives Spleißen damit ein weiterer „Pfad“, der es einem malignen Klon erlaubt, die Funktion eines Tumorsuppressors wie TET2 zu verlieren. Neben den in der Einleitung schon beschriebenen chromosomalen Deletionen und inaktivierenden Mutationen mit oder ohne Verlust der Heterozygotie³⁴ könnte auch aberrantes alternatives Spleißen zu einem kompetitiven Wachstumsvorteil ähnlich eines TET2^{-/-} „knock-outs“^{43,47} führen.

4.6 Multiple Ebenen der Transkriptionskontrolle in Tumorzellen

Aus noch größerer Distanz betrachtet, ergibt sich das Bild multipler miteinander interagierender Ebenen der Proteinsynthese, auf denen ein Kontrollverlust zur Genese von Neoplasien führen kann: Chromosomale Stabilität, Stabilität des genetischen Codes, Stabilität der epigenetischen Modifikationen, Stabilität der mRNA und eben auch

die Stabilität der Spliceosoms. Noch weiter gedacht, führt dieser Bogen über die Stabilität posttranslationaler Modifikationen bis zu Stabilität des Proteinabbaus.

TET2 zeigt beispielhaft die Interaktion dieser Ebenen, da es selbst epigenetische Modifikationen steuert, aber seine Funktion wiederum von allen anderen Ebenen (also durch Deletion, Mutation oder aberrantes alternatives Spleißen) „bedroht“ ist. Ein weiteres Beispiel für derartige Interaktionen auf unterschiedlichen Kontrollebenen stellen Experimente dar, die zeigen, dass auch epigenetische DNA-Modifikationen das alternative Spleißen eines Genprodukts beeinflussen können.⁸⁷

Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen inaktivierenden Veränderungen von TET2 durch Mutationen und aberrantes alternatives Spleißen betreffen also nur einen winzigen Ausschnitt der komplexen Interaktionen und Prozesse auf dem Weg einer hämatopoetischen Zelle in Richtung Malignität. Allerdings veranschaulicht bereits dieser winzige Ausschnitt eindrucksvoll die Komplexität des Gesamtsystems. Mit dem aberranten alternativen Spleißen vermittelt er einen Einblick in einen bis vor kurzem so gut wie unbekanntem Prozess in der Genese hämatologischer Neoplasien.

5. Zusammenfassung

Ten-eleven translocation 2 (TET2) katalysiert die Oxidation von 5-Methylcytosin in Desoxyribonukleinsäure (DNA) und damit einen entscheidenden Schritt der epigenetischen Expressionskontrolle. *TET2*-Mutationen spielen eine Rolle bei der Pathogenese maligner hämatologischer Erkrankungen und sind, beispielsweise in der akuten myeloischen Leukämie (AML), von prognostischer Relevanz. Initiale Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer schnellen und kostengünstigen Methode zur *TET2*-Mutationsanalyse für die klinische Praxis. Aufgrund des zur Verfügung stehenden Einkapillarsequenzierers (Applied Biosystems ABI310) und da Mutationen über die gesamte Länge des Gens auf multiplen Exons gefunden werden können, bot sich die Kapillarsequenzierung, basierend auf der Amplifikation von 1400 bp langen cDNA Fragmenten aus Knochenmarksaspiraten, als Methode an. Neben 18 humanen Zelllinien wurden 34 Patientenproben mit myeloproliferativen Neoplasien (MPN) und nachgewiesener aktivierender Mutation der Janus Kinase 2 (*JAK2V617F*) und zum Vergleich 10 Patientenproben mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) und Nachweis des Fusionsgens *BCR/ABL* untersucht. Alle trunkierenden Mutationen (also frameshift- und nonsense- Mutationen) wurden als pathologisch gewertet, ebenso wie alle missense-Mutationen im Bereich der zwischen allen Mitgliedern der *TET*-Genfamilie konservierten homeoboxes 1 und 2.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Detektion von *TET2*-Mutationen in myeloischen Neoplasien mittels Kapillarsequenzierung aus komplementärer DNA (cDNA) grundsätzlich möglich ist. Weder in den zwölf untersuchten AML-Zelllinien noch in den vier untersuchten CML-Zelllinien fanden sich pathologische *TET2*-Mutationen. Einzig in MOLM-20, einer Schwesterzelllinie von CNLBC1, welche aus dem peripheren Blut einer Patientin mit Chronischer Neutrophiler Leukämie (CNL) etabliert worden war, zeigten sich zwei pathologische *TET2*-Mutationen. Es bestand ein signifikanter ($p=0.046$) Unterschied in der Frequenz von pathologischen *TET2*-Mutationen zwischen den *JAK2V617F*-positiven Proben (11/34, 32%) und den *BCR/ABL*-positiven Proben (0/10). Dies deutet darauf hin, dass *TET2*-Mutationen bei der Pathogenese *JAK2V617F*-positiver MPN auf der einen und der CML auf der anderen Seite eine unterschiedliche Rolle spielen.

Da in einem Knochenmarksaspirat neben dem malignen Klon auch somatische Zellen und damit somatische DNAs vorliegen und die Sensitivität der Kettenabbruchsequenzierung zur Mutationsdetektion abnimmt, je mehr somatische DNA in einer untersuchten Probe vorhanden ist, erfolgte die Auswahl von in der JAK2V617F-Schmelzkurvenanalyse hochpositiven Proben unter der Annahme, dass in diesen Proben der Anteil des JAK2-mutierten Klons relativ zum somatischen Hintergrund hoch ist. Zum Vergleich wurden auch Proben mit einem niedrigpositiven Ergebnis der JAK2V617F-Schmelzkurvenanalyse untersucht. Allerdings bestand kein Unterschied in der Frequenz von TET2-Mutationen zwischen den hochpositiven und niedrigpositiven Proben (7/24 vs. 4/10, $p=0.692$). Die Tatsache, dass TET2-Mutationen durch Kettenabbruchsequenzierung nachgewiesen werden können, auch ohne dass bereits ein dominanter JAK2V617F-Klon mit einem hochpositiven Schmelzkurvenanalysergebnis vorliegt, kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass TET2-Mutationen im Laufe der klonalen Evolution vor JAK2-Mutationen auftreten.

Die hier gewählte Methode der Sequenzierung von cDNA eröffnete die Möglichkeit der Beschreibung von neuen, teils noch unbekanntenen alternativen Spleißvarianten von TET2. Dies bestand im Einzelnen im Nachweis eines weiteren Exons, Exon 3b, durch cDNA-Sequenzierung und Segmentlängenanalyse von PCR-Produkten aus cDNA in MPN sowie der Beschreibung des Skippings von Exon 4. Beide Ereignisse traten in den JAK2V617F-positiven Patientenproben häufiger auf als in BCR/ABL-positiven Proben und beide haben eine Trunkierung und damit Inaktivierung des Tumor-Suppressor-Proteins TET2 zur Folge.

Das alternative Spleißen von Boten-RNA (mRNA) stellt einen hochflexiblen Kontrollmechanismus für die Genexpression in Eukaryoten dar, der auch in der Pathogenese maligner Erkrankungen eine Rolle spielt. Im Lichte der Entdeckung häufiger Mutationen von Genen des Spliceosoms in hämatologischen Neoplasien im Jahr 2011 und damit assoziiertem aberrantem Spleißen von Genen wie TET2 legen diese Beobachtungen nahe, dass aberrantes alternatives Spleißen einen weiteren Mechanismus zur Inaktivierung von TET2 in myeloproliferativen Neoplasien darstellt und dass dieser in JAK2V617F-positiven MPN häufiger auftritt als in der CML, beziehungsweise der AML. Insbesondere das Auftreten trunkierender Exon 3B Insertionstranskripte war hochsignifikant mit myeloproliferativen Erkrankungen ausserhalb des CML/AML Formenkreises assoziiert.

6. Zitate

1. Vardiman JW, Bruning RD, Arber DA, et al. Introduction and overview of the classification of the myeloid neoplasms. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al., Hrsg. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4. Aufl. Lyon: IARC; 2008:18–30.
2. Virchow R. Weisses Blut. *Froriep's Notizen aus dem Gebiet der Natur- und Heilkunde*. 1845;36(10):151–156.
3. Bennett JH. Case of hypertrophy of the spleen and liver, in which death took place from suppuration of the blood. *Edinburgh Medical and Surgical Journal*. 1845;64:413–423.
4. Vaquez H. Sur une forme spéciale de cyanose s'accompagnant d'hyperglobulie excessive et persistante. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales*. 1892;44:384–388.
5. Heuck G. Zwei Fälle von Leukämie mit eigenthümlichem Blut- resp. Knochenmarksbefund. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin*. 1879;78:475–496.
6. Epstein E, Goedel A. Hämorrhagische Thrombocythämie bei vasculärer Schrumpfmilz. *Virchows Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin*. 1934;292:233–248.
7. Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat. Rev. Cancer*. 2007;7(9):673–683.
8. Dameshek W. Editorial: Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951;6(4):372–375.
9. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia [abstract, Autumn meeting of the National Academy of Sciences 14-16 November 1960]. *Science*. 1960;142:1497.
10. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243(5405):290–293.
11. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, et al. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*. 1984;36(1):93–99.
12. Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A, et al. Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 1983;306(5940):277–280.
13. Heisterkamp N, Jenster G, ten Hoeve J, et al. Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. *Nature*. 1990;344(6263):251–253.
14. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*. 1990;247(4944):824–830.
15. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med*. 2001;344(14):1031–1037.
16. von Bubnoff N, Duyster J. Chronic myelogenous leukemia: treatment and monitoring. *Dtsch Arztebl Int*. 2010;107(7):114–121.
17. Prchal JF, Axelrad AA. Letter: Bone-marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med*. 1974;290(24):1382.
18. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365(9464):1054–1061.

19. James C, Ugo V, Le Couédic J-P, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434(7037):1144–1148.
20. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* 2005;352(17):1779–1790.
21. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7(4):387–397.
22. Sandberg EM, Wallace TA, Godeny MD, VonDerLinden D, Sayeski PP. Jak2 Tyrosine Kinase: A True Jak of All Trades? *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2004;41:207–232.
23. Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* 2006;355(23):2452–2466.
24. Parganas E, Wang D, Stravopodis D, et al. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell*. 1998;93(3):385–395.
25. Kralovics R, Teo S-S, Li S, et al. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006;108(4):1377–1380.
26. Nussenzveig RH, Swierczek SI, Jelinek J, et al. Polycythemia vera is not initiated by JAK2V617F mutation. *Experimental Hematology*. 2007;35(1):32.e1–32.e9.
27. Campbell PJ, Baxter EJ, Beer PA, et al. Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations, and role in leukemic transformation. *Blood*. 2006;108(10):3548–3555.
28. Ono R, Taki T, Taketani T, et al. LCX, leukemia-associated protein with a CXXC domain, is fused to MLL in acute myeloid leukemia with trilineage dysplasia having t(10;11)(q22;q23). *Cancer Res*. 2002;62(14):4075–4080.
29. Lorsch RB, Moore J, Mathew S, et al. TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23). *Leukemia*. 2003;17(3):637–641.
30. Jones DH, Winistorfer SC. Sequence specific generation of a DNA panhandle permits PCR amplification of unknown flanking DNA. *Nucleic Acids Res*. 1992;20(3):595–600.
31. Megonigal MD, Rappaport EF, Wilson RB, et al. Panhandle PCR for cDNA: a rapid method for isolation of MLL fusion transcripts involving unknown partner genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000;97(17):9597–9602.
32. Ochman H, Gerber AS, Hartl DL. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*. 1988;120(3):621–623.
33. Willis TG, Jadayel DM, Coignet LJ, et al. Rapid molecular cloning of rearrangements of the IGHJ locus using long-distance inverse polymerase chain reaction. *Blood*. 1997;90(6):2456–2464.
34. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N. Engl. J. Med.* 2009;360(22):2289–2301.
35. Jankowska AM, Szpurka H, Tiu RV, et al. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009;113(25):6403–6410.
36. Langemeijer SMC, Kuiper RP, Berends M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat. Genet.* 2009;41(7):838–842.
37. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood*. 2009;114(1):144–147.

38. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Ciudad M, et al. TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. 2009;94(12):1676–1681.
39. Tefferi A, Pardanani A, Lim K-H, et al. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia*. 2009;23(5):905–911.
40. Tefferi A, Levine RL, Lim K-H, et al. Frequent TET2 mutations in systemic mastocytosis: clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFR α correlates. *Leukemia*. 2009;23(5):900–904.
41. Makishima H, Jankowska AM, McDevitt MA, et al. CBL, CBLB, TET2, ASXL1, and IDH1/2 mutations and additional chromosomal aberrations constitute molecular events in chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 2011;117(21):e198–206.
42. Roche-Lestienne C, Marceau A, Labis E, et al. Mutation analysis of TET2, IDH1, IDH2 and ASXL1 in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2011;25(10):1661–1664.
43. Quivoron C, Couronné L, Della Valle V, et al. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell*. 2011;20(1):25–38.
44. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009;324(5929):930–935.
45. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, et al. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*. 2010;466(7310):1129–1133.
46. Ko M, Bandukwala HS, An J, et al. Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011;108(35):14566–14571.
47. Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, et al. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell*. 2011;20(1):11–24.
48. Pfaffeneder T, Hackner B, Truß M, et al. The discovery of 5-formylcytosine in embryonic stem cell DNA. *Angewandte Chemie International Edition*. 2011;50(31):7008–7012.
49. Ito S, Shen L, Dai Q, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*. 2011;333(6047):1300–1303.
50. He Y-F, Li B-Z, Li Z, et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*. 2011;333(6047):1303–1307.
51. Nabel CS, Kohli RM. Molecular biology. Demystifying DNA demethylation. *Science*. 2011;333(6047):1229–1230.
52. Chou W-C, Chou S-C, Liu C-Y, et al. TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. *Blood*. 2011;118(14):3803–3810.
53. Metzeler KH, Maharry K, Radmacher MD, et al. TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J. Clin. Oncol.* 2011;29(10):1373–1381.
54. Law JA, Jacobsen SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet*. 2010;11(3):204–220.
55. Ensembl genome browser 64: Homo sapiens - Gene summary - Gene: TET2 (ENSG00000168769). (Accessed November 21, 2011 at http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000168769;r=4:106067032-106200973.)
56. TET2 tet methylcytosine dioxygenase 2 [Homo sapiens] - Gene - NCBI. (Accessed November 21, 2011 at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/54790#reference-sequences>.)

57. Homo sapiens tet methylcytosine dioxygenase 2 (TET2), transcript varia - Nucleotide - NCBI. (Accessed November 21, 2011 at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/325197189>.)
58. Ensembl genome browser 64: Homo sapiens - Transcript summary - Transcript: TET2-002 (ENST00000380013). (Accessed November 21, 2011 at http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000168769;r=4:106067032-106200973;t=ENST00000380013.)
59. Methylcytosine dioxygenase TET2 isoform a [Homo sapiens] - Protein - NCBI. (Accessed November 21, 2011 at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001120680.1.)
60. Ensembl genome browser 64: Homo sapiens - Protein summary - Transcript: TET2-002 (ENST00000380013). (Accessed November 21, 2011 at http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000168769;r=4:106067032-106200973;t=ENST00000380013.)
61. DSMZ: Catalogue Human and Animal Cell Lines. (Accessed November 23, 2011 at <http://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-human-and-animal-cell-lines.html#searchResult>.)
62. Kishi K, Toba K, Azegami T, et al. Hematopoietic cytokine-dependent differentiation to eosinophils and neutrophils in a newly established acute promyelocytic leukemia cell line with t(15;17). *Exp. Hematol.* 1998;26(2):135–142.
63. Dobrovic A, Trainor K, Morley A. Detection of the molecular abnormality in chronic myeloid leukemia by use of the polymerase chain reaction. *Blood.* 1988;72(6):2063–2065.
64. McClure R, Mai M, Lasho T. Validation of two clinically useful assays for evaluation of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia.* 2006;20(1):168–171.
65. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987;162(1):156–159.
66. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985;230(4732):1350–1354.
67. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1977;74(12):5463–5467.
68. Swerdlow H, Gesteland R. Capillary gel electrophoresis for rapid, high resolution DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(6):1415–1419.
69. ABI Prism 310 User's Manual. (Accessed March 20, 2012 at http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041812.pdf.)
70. den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum. Genet.* 2001;109(1):121–124.
71. Kojima K, Sakai I, Hasegawa A, et al. 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). *Leukemia.* 2004;18(5):998–1005.
72. Brunak S, Engelbrecht J, Knudsen S. Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *J. Mol. Biol.* 1991;220(1):49–65.
73. Lomsadze A, Ter-Hovhannisyan V, Chernoff YO, Borodovsky M. Gene identification in novel eukaryotic genomes by self-training algorithm. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(20):6494–6506.
74. Kohlmann A, Grossmann V, Klein H-U, et al. Next-generation sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in TET2, CBL, RAS, and RUNX1. *J. Clin. Oncol.* 2010;28(24):3858–3865.

75. Milne TA, Briggs SD, Brock HW, et al. MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol. Cell.* 2002;10(5):1107–1117.
76. Nakamura T, Mori T, Tada S, et al. ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol. Cell.* 2002;10(5):1119–1128.
77. Beer PA, Jones AV, Bench AJ, et al. Clonal diversity in the myeloproliferative neoplasms: independent origins of genetically distinct clones. *Br. J. Haematol.* 2009;144(6):904–908.
78. Saint-Martin C, Leroy G, Delhommeau F, et al. Analysis of the ten-eleven translocation 2 (TET2) gene in familial myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2009;114(8):1628–1632.
79. Beer PA, Delhommeau F, LeCouédic J-P, et al. Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. *Blood.* 2010;115(14):2891–2900.
80. David CJ, Manley JL. Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. *Genes & Development.* 2010;24(21):2343–2364.
81. Maratheftis CI, Bolaraki PE, Giannouli S, et al. Aberrant alternative splicing of interferon regulatory factor-1 (IRF-1) in myelodysplastic hematopoietic progenitor cells. *Leuk. Res.* 2006;30(9):1177–1186.
82. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature.* 2011;478(7367):64–69.
83. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N. Engl. J. Med.* 2011;365(15):1384–1395.
84. Graubert TA, Shen D, Ding L, et al. Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes. *Nat. Genet.* 2012;44(1):53–57.
85. Zhang S-J, Rampal R, Manshouri T, et al. Genetic analysis of patients with leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms reveals recurrent SRSF2 mutations which are associated with adverse outcome. *Blood.* 2012;119(19):4480–4485.
86. Makishima H, Visconte V, Sakaguchi H, et al. Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood.* 2012;119(14):3203–3210.
87. Shukla S, Kavak E, Gregory M, et al. CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature.* 2011;479(7371):74–79.

Erklärung

Ich, Heiner Zimmermann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Mutationen und aberrantes alternatives Spleißen von Ten-Eleven Translocation 2 (TET2) in myeloproliferativen Neoplasien“ selbst ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Lebenslauf Heiner Zimmermann

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste Heiner Zimmermann

Peer-reviewed publications:

Zimmermann, H., Gardner, D.S., Jellyman, J.K., Fowden, A.L., Giussani, D.A. & Forhead, A.J. (2003) Effect of dexamethasone on pulmonary and renal angiotensin-converting enzyme concentration in fetal sheep during late gestation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 189, 1467–1471.

Hinrichs, C., Wendland, S., Zimmermann, H., Eurich, D., Neuhaus, R., Schlattmann, P., Babel, N., Riess, H., Gärtner, B., Anagnostopoulos, I., Reinke, P. & Trappe, R.U. (2011) IL-6 and IL-10 in post-transplant lymphoproliferative disorders development and maintenance: a longitudinal study of cytokine plasma levels and T-cell subsets in 38 patients undergoing treatment. *Transplant International*, 24, 892–903.

Trappe, R., Zimmermann, H., Fink, S., Reinke, P., Dreyling, M., Pascher, A., Lehmkuhl, H., Gärtner, B., Anagnostopoulos, I. & Riess, H. (2011) Plasmacytoma-like post-transplant lymphoproliferative disorder, a rare subtype of monomorphic B-cell post-transplant lymphoproliferation, is associated with a favorable outcome in localized as well as in advanced disease - a prospective analysis of 8 cases. *Haematologica*, 96, 1067–71.

Zimmermann, H. & Trappe, R.U. (2011) Therapeutic options in post-transplant lymphoproliferative disorders.

Therapeutic Advances in Hematology, 2, 393–407.
(Review)

Trappe, R., Oertel, S., Leblond, V., Mollee, P., Sender, M., Reinke, P., Neuhaus, R., Lehmkuhl, H., Horst, H.A., Salles, G., Morschhauser, F., Jaccard, A., Lamy, T., Leithäuser, M., Zimmermann, H., Anagnostopoulos, I., Raphael, M., Riess, H. & Choquet, S. (2012) Sequential treatment with rituximab followed by CHOP chemotherapy in adult B-cell post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD): the prospective international multicentre phase 2 PTLD-1 trial. *The Lancet Oncology*, 13, 196–206.

Zimmermann, H., Oschlies, I., Fink, S., Pott, C., Neumayer, H.H., Lehmkuhl, H., Hauser, I.A., Dreyling, M., Kneba, M., Gärtner, B., Anagnostopoulos, I., Riess, H., Klapper, W. & Trappe, R.U. (2012) Plasmablastic posttransplant lymphoma: cytogenetic aberrations and lack of Epstein-Barr virus association linked with poor outcome in the prospective German posttransplant lymphoproliferative disorder registry. *Transplantation*, 93, 543–550.

Zimmermann, H., Reinke, P., Neuhaus, R., Lehmkuhl, H., Oertel, S., Atta, J., Planker, M., Gärtner, B., Lenze, D., Anagnostopoulos, I., Riess, H. & Trappe, R.U. (2012) Burkitt post-transplantation lymphoma in adult solid organ transplant recipients. *Cancer*, 118, 4715–4724.

Trappe, R., Budde, U. & Zimmermann, H. (2012) Haemorrhage due to proteolysis of FXIII and hyperfibrinolysis under vemurafenib treatment of metastatic melanoma. *Thrombosis and Haemostasis*, 108, 798–800.
(Letter to the editor)