

Aus der Klinik für Pädiatrie m. S. Onkologie/Hämatologie
der Medizinische Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

TEL-AML1 – Spleißvarianten und sequentielle Untersuchung zum
Therapieansprechen von *TEL-AML1* positiven ALL-Rezidiven im
Kindesalter.

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von

Sandra Elbers
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Dr. h. c. G. Henze
2. Prof. Dr. med. H. Kabisch
3. Prof. Dr. med. M. Suttorp

Datum der Promotion: 26.02.2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Akute Leukämien im Kindesalter.....	6
1.2	Zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen	7
1.3	Therapie der ALL	10
1.4	MRD (<i>minimal residual disease</i>)	10
1.4.1	MRD in klinischen Untersuchungen	11
1.5	Transkriptionsfaktoren	11
1.6	Die Transkriptionsfaktoren TEL und AML1	13
1.6.1	Transkriptionsfaktor TEL	13
1.6.2	Transkriptionsfaktor AML1.....	15
1.7	Translokation t(12;21).....	18
1.7.1	Fusionsgen <i>TEL-AML1</i>	18
1.7.2	Proteinstruktur	19
1.7.3	<i>TEL-AML1</i> in klinischen Untersuchungen	19
2	Fragestellung der Arbeit	21
3	Material und Methoden.....	22
3.1	Patienten und Patientenproben.....	22
3.1.1	<i>TEL-AML1</i> -Spleißvarianten-Untersuchung.....	22
3.1.2	MRD-Untersuchung.....	22
3.2	Statistische Auswertung.....	23
3.3	Materialien	23
3.4	Molekularbiologische Arbeitstechniken	26
3.4.1	Zelllinie	26
3.4.2	RNA-Isolierung	26
3.4.3	Reverse Transkription	27
3.4.4	Polymerasekettenreaktion	27
3.4.5	Agarosegelelektrophorese	34
3.4.6	Gewinnung von <i>TEL-AML1</i> -Plasmid-DNA.....	35
3.4.7	Sequenzierung	37
4	Ergebnisse	39
4.1	<i>long-distance</i> RT-PCR zum Nachweis von <i>TEL-AML1</i> -Spleißvarianten	39
4.1.1	Etablierung der <i>long-distance</i> RT-PCR	39

4.1.2	Nachweisbare Spleißvarianten.....	41
4.1.3	Vereinfachung des Nachweises der neuen Spleißvariante	42
4.1.4	Häufigkeit der <i>T2-A5</i> -Spleißvariante	43
4.1.5	Stabilität der <i>T2-A5</i> -Spleißvariante.....	45
4.1.6	<i>TEL-AML1</i> -Fusion ohne <i>TEL</i> Exon 5.....	45
4.2	<i>TEL-AML1</i> -Quantifizierung zur MRD-Bestimmung	46
4.2.1	Sensitivität.....	46
4.2.2	PCR-Kinetik / Standardkurve.....	47
4.2.3	RNA-Stabilität.....	48
4.2.4	Berechnung des MRD-Levels.....	49
4.2.5	<i>TEL-AML1 real-time</i> RT-PCR: MRD-Ergebnisse.....	49
4.2.6	MRD-Status und EFS.....	52
4.2.7	MRD-Status und Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit.....	55
5	Diskussion.....	56
5.1	<i>TEL-AML1</i> -Spleißvarianten.....	56
5.1.1	Methodische Aspekte	56
5.1.2	Ergebnisse im internationalen Vergleich	56
5.1.3	Funktion der verschiedenen Proteine.....	58
5.1.4	Bedeutung der <i>T2-A5</i> -Spleißvariante für die <i>TEL-AML1</i> -Diagnostik	61
5.2	MRD.....	64
5.2.1	Methoden zum Nachweis von MRD	64
5.2.2	Vergleich von DNA- und RNA-Untersuchung.....	67
5.2.3	Vergleich verschiedener Referenzgene	68
5.2.4	MRD bei ALL-Ersterkrankungen.....	69
5.2.5	MRD bei ALL-Rezidiven	70
5.2.6	MRD bei <i>TEL-AML1</i> positiven ALL.....	70
5.2.7	Ausblick.....	72
6	Zusammenfassung.....	74
7	Literatur	75

Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphoblastische Leukämie	HTH	<i>helix-turn-helix</i>
AML	Akute myeloische Leukämie	Ig	Immunglobulin
AUL	Akute unklassifizierbare Leukämie	Kb	Kilobasen
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster	KM	Knochenmark
bp	Basenpaare	KMT	Knochenmarkstransplantation
BSA	<i>bovine serum albumine</i>	Log	Logarithmus
CALLA	<i>common ALL antigen</i>	LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
CBF	<i>core binding factor</i>	MAPK	<i>mitogen activated proteinkinase</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i> Komple-	MCSFR	<i>monocyte colony stimulating factor</i>
cDNA	mentäre DNA		<i>receptor</i>
CML	Chronische myeloische Leukämie	MDS	Myelodysplastisches Syndrom
CMML	Chronische myelomonozytäre Leu-	MFD	<i>matched family donor</i>
	kämie	MgCl	Magnesium Chlorid
C _p	<i>crossing point</i>	MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
CSF	<i>colony stimulating factor</i>	MRD	<i>minimal residual disease</i>
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphate	mRNA	<i>messenger RNA</i>
DMSO	Dimethyl Sulfoxid	MUD	<i>matched unrelated donor</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PBC	<i>peripheral blast cell count</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate	PBGD	Porphobilinogen Desaminase
DTT	Dithiothreitol	PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
EBS	<i>ETS-binding-site</i>	PDGFR β	<i>platelet-derived growth factor recep-</i>
EFS	Ereignisfreies Überleben		<i>tor-β</i>
ETS	<i>E-twenty-six-specific</i>	REH	Humane prä-B-Leukämie Zelllinie
ETV6	<i>E-twenty-six-variant gene 6</i>	RHD	Runt-Homologie-Domäne
FAB	<i>French-American-British</i>	RNA	Ribonukleinsäure
FBS	Fetales Bovines Serum	RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
FisH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	RT-PCR	Reverse Transkription – Polymerase
FRET	<i>fluorescence resonance energy</i>		Ketten Reaktion
	<i>transfer</i>	SMMHC	<i>smooth muscle myosin heavy chain</i>
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-	SRV	Gesamtüberleben Stammzelltrans-
	Dehydrogenase	SZT	plantation
GC	Guanin / Cytosin	TBP	TATA-box-Binding-Protein
GM-CSF	<i>granulocyte/monocyte colony stimu-</i>	TD	Transaktivierungsdomäne <i>transloca-</i>
	<i>lating factor</i>	TEL	<i>tion, ETS, leukemia</i>
HLH	<i>helix-loop-helix</i>	TZR	T-Zell-Rezeptor
HPLC	<i>high performance liquid chromatog-</i>		
	<i>raphy</i>		

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. G. Henze möchte ich mich für die Überlassung des Themas sowie für die Bereitstellung der finanziellen und räumlichen Mittel bedanken.

Für die Betreuung der Arbeit und Ihre freundliche Unterstützung in jeder Hinsicht gebührt mein besonderer Dank Herrn Dr. Dr. Karl Seeger und Herrn Dr. Tillmann Taube, die mir nicht nur mit ihrem Fachwissen bei vielen Problemen helfen konnten, sondern mich auch mit ihrer Begeisterung für die Molekulargenetik angesteckt haben.

Ich danke Frau Cornelia Eckert für ihr Interesse an der Arbeit, ihre stete Hilfsbereitschaft und ihre wertvollen Anregungen.

Bei allen MTA des molekulargenetischen Labors, insbesondere bei Frau Gabriele Körner und Frau Claudia Hanel, möchte ich mich für alle Vorarbeiten, für ihre praktischen Tipps und Tricks, für ihre Geduld und ihr Verständnis bedanken.

Danken möchte ich auch Herrn Arend von Stackelberg für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Weiterhin gilt mein Dank meinen Mit-Doktoranden, meiner Familie und allen Freunden, die mir hilfreich und motivierend zur Seite standen.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Erklärung

Ich, Sandra Elbers, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „*TEL-AML1* – Spleißvarianten und sequentielle Untersuchung zum Therapieansprechen von *TEL-AML1* positiven ALL-Rezidiven im Kindesalter“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.