

Aus der Klinik für Pädiatrie, Abteilung Hämatologie/ Onkologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Nachweis von *TEL*- Genrekombinationen
mittels Southern Blot bei Kindern mit
akuter lymphoblastischer Leukämie.**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Blanka Kothe
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. J. Dudenhausen

Gutachter: 1. Herr Prof. Dr. med. h.c. G. Henze
 2. Frau Prof. Dr. med. R. Arnold
 3. Herr Prof. Dr. med. U. Bode

Eingereicht am: 18.09.2002
Datum der Promotion: 30.06.2003

ABSTRACT:

Das in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Verfahren der nicht- radioaktiven Southern Blot Hybridisierung unter Verwendung einer Digoxigenin Markierung hat sich für die Darstellung von Rekombinationen im TEL- Genlokus genomischer DNA als sensitive Vergleichsmethode bewiesen.

Es wurden insgesamt 122 Kinder mit dieser Methode auf das Vorliegen der Translokation t(12;21) untersucht. Bei einer nur relevante Faktoren berücksichtigenden Beschränkung des PatientInnenkollektivs auf protokollgerecht nach ALL- REZ BFM behandelte B- Vorläufer- Zell- ALL und Erstrezidive konnte eine Rekombination von TEL in 5 von 65 PatientInnen (7,7%) nachgewiesen werden. Lässt man die Einschlusskriterien der ALL- REZ BFM Studie unberücksichtigt, handelt es sich sogar um 7 von 71 (9,9%) PatientInnen. Damit bestätigen die hier vorliegenden Ergebnisse den Trend der aktuellen Diskussion über die Häufigkeit des Vorliegens des Fusionsgenes TEL- AML1 bei Erstrezidiven, die eine kumulative Inzidenz bei einem 10-jährigen Untersuchungszeitraum von $9 \pm 5\%$ angeben.

Weiterhin konnte mit ereignisfreien Beobachtungszeiträumen nach dem 1. Rezidiv im Median von 8,6 Jahren ein Trend zu späten Rezidiven und somit eine mittelfristig günstige Prognose für die TEL- Rearrangement positiven Rezidivfälle konstatiert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass TEL- AML1 positive PatientInnen eine Subgruppe darstellen, die lange erkrankungsfreie Intervalle mit zur Zeit üblichen Therapieprotokollen erreichen, nach Therapie der Ersterkrankung aber auch nach dem ersten Rezidiv.

Auf Grund der sich aus dem retrospektiven PatientInnenkollektiv ergebenden Selektion war es nicht möglich, statistisch signifikante Aussagen zur unabhängigen prognostischen Bedeutung für die langfristige Prognose von ALL im Kindesalter mit TEL- Rekombinationen zu treffen.

SCHLAGWÖRTER:

Akute lymphatische Leukämie (ALL) im Kindesalter
Translokation TEL- AML1 (ETV6- CBFa2)
Transkriptionsfaktor
ALL- Rezidiv
nicht- radioaktiver Southern Blot
ALL- REZ BFM Studie

ABSTRACT:

The presence of TEL/AML1 fusion gene in childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL) defines a subgroup of patients with better than average outcome. Around 20% of the patient at point of initial ALL diagnosis are characterised by this fusion transcript from translocation t(12;21)(p12;q22). However, the prognostic significance of this aberration has recently been disputed by the Berlin-Frankfurt-Munster (BFM) study group due to its relatively high incidence found in relapsed patients (19.6% and 21.9%, in two cohorts). Here we wanted to get more data in a long term follow up retrospect investigation by analysing DNA from frozen conserved bone marrow samples of 65 children. In the study presented here only five out of 65 (7.7%) patients selected as childhood B cell precursor acute lymphoblastic leukaemia only treated according to Berlin-Frankfurt-Munster (BFM) ALL relapse trial protocols (ALL-REZ BFM 82-96) (excluding T-lineage and Philadelphia chromosome (Ph)-positive leukaemia) carry this fusion. The detection was done due to a new developed non- radioactive Southern blotting with a Digoxigenin marked template. We could confirm the still good middle term prognosis in the relapsed TEL- AML1 positive subgroup. The TEL-AML1-positive and negative patients differed with respect to duration of last remission and age at initial diagnosis. At a median follow-up time of 8.6 years, children positive for TEL-AML1 had a higher probability of disease-free survival. Because of the small number of patients in this study it was not possible to get statistical significant facts about the independent prognostic impact for the long term prognosis of ALL in childhood with TEL rearrangement.

KEYWORDS:

non- radioactive Southern blotting

TEL-AML1 fusion transcript (t(12;21)(p12;q22) translocation) CBF alpha2 ETV6-AML1

chromosomal translocations

childhood B cell precursor acute lymphoblastic leukaemia (ALL)

Gene Rearrangement

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	6
1.1	ALL im Kindesalter	6
1.1.1	Therapie und Prognose der ALL im Kindesalter	6
1.1.1.1	Klassifizierungssysteme der ALL	8
1.1.1.2	Einfluss der Klassifizierung auf die Therapie	10
1.2	Leukämogenese	11
1.2.1	Transkriptionsfaktoren: Funktion und Beteiligung an der Leukämogenese	11
1.3	Die Bedeutung der Transkriptionsfaktoren TEL, AML1 und TEL- AML1 - ihre Funktion und Beteiligung an der Leukämogenese	12
1.3.1	Transkriptionsfaktor <i>TEL</i>	12
1.3.1.1	TEL- Gen	13
1.3.1.2	TEL - Protein und Funktion	13
1.3.1.3	TEL- Veränderungen und Einfluss auf die Leukämogenese	15
1.3.2	Transkriptionsfaktor <i>AML1</i>	16
1.3.2.1	AML1- Gen	16
1.3.2.2	AML1 - Protein und Funktion	16
1.3.2.3	AML1- Veränderungen und Einfluss auf die Leukämogenese	18
1.3.3	<i>TEL- AML1</i> - Fusionstranskript	19
1.3.3.1	TEL- AML1- Gen	19
1.3.3.2	TEL- AML1- Protein	20
1.3.3.3	Hypothesen und bisheriges Wissen über Funktion und Einfluss von TEL- AML1 auf die Leukämogenese	20
1.4	Translokation t(12;21) <i>TEL- AML1</i> als häufigste genetische Veränderung bei ALL im Kindesalter	22
2	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	23
3	MATERIAL UND METHODEN	24
3.1	PatientInnenkollektiv	24
3.2	Molekularbiologische Arbeitstechniken	24
3.2.1	DNA- Isolierung	24
3.2.2	Gewinnung der Plasmid- DNA von <i>TEL</i>	25
3.2.2.1	Beschreibung des Prinzips der Einklonierung von Genabschnitten	25
3.2.2.2	Durchführung der Klonierung	25
3.2.2.3	Aufreinigung der Plasmid- DNA	26
3.2.2.4	Ausschneiden der klonierten TEL- Sequenz/ Aufreinigung der Template- DNA	26
3.2.3	Beschreibung der Digoxigenin- markierten TEL- Sonde	26
3.2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung der nicht- radioaktiv- markierten TEL- Sonde	27
3.2.4.1	Beschreibung des Verfahrens der Polymerasekettenreaktion (PCR)	27

3.2.4.2 Bedingungen für die Durchführung der externen und internen PCR	27
3.2.4.3 RT - Reverse Transkription	28
3.2.5 Agarosegelelektrophorese zur Darstellung der PCR- Produkte	29
3.2.6 Dot Blot Analyse	29
3.2.7 Positiv- Kontrolle: Zelllinie REH	30
3.2.7.1 Kultivierung der Zelllinie	30
3.2.8 DNA- Restriktion	30
3.2.9 Gelelektrophorese der geschnittenen DNA	30
3.2.10 Southern Blot	31
3.2.10.1 Beschreibung des Versuchsaufbaus	31
3.2.10.2 Hybridisierung mit der Digoxigenin- markierten Sonde	32
3.2.11 Überprüfung der Southern Blot Ergebnisse mittels der PCR	33
3.2.11.1 nested- PCR	34
3.3 Statistische Auswertung	34
3.4 Materialien	35
3.4.1 Chemikalien	35
3.4.2 Nukleinsäuren	36
3.4.3 Enzyme	36
3.4.4 Klonierung	36
3.4.5 Reinigung der PCR- Produkte	36
3.4.6 Kultivierung von Zelllinien	37
3.4.7 Isolierung von DNA	37
3.4.8 Filme	37
3.4.9 Puffer und Lösungen	37
3.4.9.1 Lösungen für die Elektrophorese	37
3.4.9.2 Standardlösungen (Southern Blot)	38
3.4.9.3 Wash and Buffer Kit	38
3.4.10 RNA- Isolierung	38
3.4.11 Geräte	38
3.4.12 Software	39
4 ERGEBNISSE	40
4.1 Methodische Aspekte - Konzeption und Optimierung einer nicht-radioaktiven Southern Blot Hybridisierungsanalyse zum Nachweis von TEL-Genrekombinationen	40
4.1.1 Konzeption und Optimierung der Hybridisierung	40
4.1.1.1 Aufreinigung der Template- DNA	40
4.1.1.2 Southern Transfer, Hybridisierung und Chemolumineszenz	40
4.1.2 Auswertungskriterien/ Optionen der Beurteilung und Vergleich der DNA-Hybridisierungsergebnisse mit Ergebnissen einer RNA- basierten <i>nested</i> - PCR	41
4.1.3 Auswertung der PatientInnenfilter	43
4.1.4 Ergebnissen einer RNA- basierten <i>nested</i> - PCR	43
4.2 Ermittlung der Häufigkeit der TEL- Rekombination	44
4.3 Klinische Verläufe	45
4.3.1 Charakterisierung klinischer Merkmale der PatientInnen	45

4.4 Korrelation der Ergebnisse bezüglich der prognostischen Aussage - Charakterisierung des Behandlungserfolgs der PatientInnen mit einem Genrearrangement im <i>TEL</i>-Lokus - ereignisfreie Überlebenswahrscheinlichkeiten	49
5 DISKUSSION	51
5.1 Methodische Umsetzung – Konzeption der Southern Blot Analyse	51
5.1.1 Wahl der Methoden	51
5.1.2 Konzeption und Optimierung der Sonde	51
5.1.3 Vergleich der Methoden	51
5.2 Prävalenz und Prognostische Bedeutung von <i>TEL- AML1</i>	52
5.2.1 Prävalenz von <i>TEL- AML1</i> bei ALL im Kindesalter	52
5.2.2 <i>TEL- AML1</i> als prognostischer Faktor in verschiedenen Studien. Vergleich der Ergebnisse, PatientInnencharakteristika	55
5.2.3 Diskussion der prognostischen Bedeutsamkeit von <i>TEL- AML1</i> - Einfluss auf die Therapie	57
6 ZUSAMMENFASSUNG	59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: In der Abbildung sind die Enhancer, die vor oder hinter dem Gen liegen können, quer gestreift dargestellt, der Promotor kariert, die TATA- Box gepunktet und das Gen, das transkribiert werden soll gestreift. Die TATA-Box bildet gemeinsam mit Proteinen, den Transkriptionsfaktoren, den Startpunkt für die RNA- Polymerase. Enhancer und Promotor bilden Bindungsstellen für weitere Proteine (andere Transkriptionsfaktoren), die die Transkription verstärken.	12
Abbildung 2: cDNA: <i>TEL</i> - Gen EXON 1 – EXON 8: schematische Darstellung der Exonstruktur mit Angabe der jeweils letzten Base im Exon.	13
Abbildung 3: Translokationen, an denen <i>TEL</i> bei Leukämien beteiligt ist.	15
Abbildung 4: Der heterodimere <i>AML1/ CBFβ</i> Transkriptionsfaktor.	18
Abbildung 5: Translokationen, in die <i>AML1</i> bei Leukämien und MDS (Myelodysplastisches Syndrom) involviert ist.	18
Abbildung 6: Vereinfachtes Schema von <i>TEL</i> , <i>AML1</i> und <i>TEL- AML1</i> . <i>TEL</i> fusioniert fast mit dem gesamten <i>AML1</i> .	20
Abbildung 7: Vektorskizze.	26
Abbildung 8: Veranschaulichung der Southern Blot Analyse.	32
Abbildung 9: Prinzip der 11- UTP- Digoxigenin Chemolumineszenz Markierung.	33
Abbildung 10: Schematisch dargestellte Ergebnisse der Southern Blot Hybridisierungsanalyse für Rearrangements des <i>TEL</i> - Gens. Da für jedes	

Gen zwei Allele vorhanden sein sollten, ergeben sich unterschiedliche Kombinationen der Konfiguration des TEL- Genlokus (G/G; G/R; R/R; R/D).(G = germline, R = Rearrangement, D = Deletion)	42
Abbildung 11: Southern Blot Hybridisierungsanalyse zum Nachweis eines TEL- Genrearrangements in genomischer DNA. Die DNA wurde mit BamHI verdaut und die Hybridisierung erfolgte mit der Digoxigenin markierten Sonde TEL487. In Slot Nr.1 befindet sich ein Längenstandard (1 Kb Marker), der nur auf dem UV- Transiluminator sichtbar ist. Slot Nr.2 und 20 stellen die germline (G) Konfiguration von TEL Buffy coat DNA dar; Slot Nr.7 und Nr.14 zeigen Rekombinationen im TEL- Genlokus.	43
Abbildung 12: Elektrophoretische Auftrennung der RNA basierten TEL- AML1 PCR-. Ergebnisse Nummer 2, 5 und 6 sind TEL- AML1 positiv und Nummer 12 stellt die als Positivkontrolle verwendete Zelllinie REH dar, Slot 1, 3, 4 und 7 bis 10 sind TEL- AML1 negativ. Probe 11 ist nicht zu verwerten. Probe 13 und 14 stellen Mastermix 1 und 2 dar, also das Pipettiergemisch ohne RNA. Die bei 1 bis 10 und REH vorhandene untere Bande stellt die RNA- Materialkontrolle von dem Gen ABL dar.	44
Abbildung 13: Life- Table- Untersuchung nach Kaplan Meier. Überlebenswahrscheinlichkeit von Kindern mit 1. Rezidiv von B- Vorläuferzell- ALL der Therapiestudien ALL-REZ BFM 83-95 (Chemotherapie) in Abhängigkeit vom TEL- AML1 Status.	50
Tabellenverzeichnis	
Tabelle 1: Verteilungsmuster bestimmter je nach Reifestadium exprimierter Oberflächenmarker bei den verschiedenen Subtypen der ALL.(CD - cluster of differentiation; TdT – terminale Desoxynukleotidyltransferase; cy IgM – cytoplasmatisches IgM; S Ig – surface IgM)	9
Tabelle 2: Verteilung häufiger Translokationen bei den verschiedenen Subtypen der ALL des Kindesalters. (BVZ- ALL = B- Vorläuferzell- ALL = prä- prä- B- ALL + common- ALL + prä- B- ALL)	9
Tabelle 3: Herkunft und Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease EcoRI.	26
Tabelle 4: Externe PCR – Reagenzien auf 50µl und Amplifikationsbedingungen.	28
Tabelle 5: Interne PCR – Reagenzien auf 50µl und Amplifikationsbedingungen.	28
Tabelle 6: RT- PCR – Reagenzien eines Reaktionsansatzes von 20µl und Amplifikationsbedingungen.	29
Tabelle 7: Herkunft und Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease BamHI.	30
Tabelle 8: Externe PCR – Reagenzien. Interne PCR – Reagenzien.	34
Tabelle 9: Amplifikationsbedingungen für externe und interne PCR.	34
Tabelle 10: Vergleich der TEL- Rearrangement Southern Blot Analyse Ergebnisse mit den TEL- AML1 RNA basierten PCR- Ergebnissen.	41

Tabelle 11: Zusammensetzung des untersuchten PatientInnenkollektivs, eingeteilt nach Erkrankungsstadium und Immunphänotyp. („gesamt“ entspricht n = PatientInnenzahl)	44
Tabelle 12: Ergebnisse mittels Southern Blot Analyse nachgewiesener TEL-Genrearrangements der untersuchten 122 PatientInnen. (BVZ- ALL schließt ein: prä- prä- B- ALL, common- ALL, prä- B- ALL und My+ ALL) („gesamt“ entspricht n = PatientInnenzahl)	45
Tabelle 13: Median und Interquartilsabstand der Variablen bei dem auf TEL-Rekombinationen getesteteten und nicht getesteteten RezidivpatientInnenkollektiv („gesamt“ entspricht n= PatientInnenzahl; die PatientInnenzahl beträgt insgesamt 378).	46
Tabelle 14: Angaben zu Geschlecht, Rezidivzeitpunkt- und lokalisation von Kindern mit einem Rezidiv einer B- Vorläuferzell- ALL der Therapiestudien ALL-REZ BFM 83-95.	47
Tabelle 15: Angaben zur Therapie von Kindern mit einem Rezidiv einer B- Vorläuferzell- ALL der Therapiestudien ALL-REZ BFM 83-95.	47
Tabelle 16: Klinischer Verlauf von Kindern mit einem Rezidiv einer B- Vorläuferzell- ALL der Therapiestudien ALL-REZ BFM 83-95. (CR = complete remission; CCR = continuous complete remission)	48
Tabelle 17: Median und Interquartilsabstand der Variablen bei dem auf TEL-Rekombinationen getesteteten und nicht getesteteten RezidivpatientInnenkollektiv („gesamt“ entspricht n= PatientInnenzahl; die PatientInnenzahl beträgt insgesamt 378).	49

1 Einleitung

Leukämien entstehen durch klonales Wachstum maligne entarteter Zellen, die aus den unterschiedlichen Differenzierungsstadien der hämatopoetischen Entwicklung einschließlich der pluripotenten Stammzellen hervorgehen. Sie sind gemeinsam charakterisiert durch unkontrollierte Proliferation und Akkumulation unreifer, morphologisch veränderter und funktionell gestörter Leukozyten im Blut und in den parenchymatösen Organen wie Knochenmark, Milz, Leber und Lymphknoten. Die Klassifikation der Leukämien wird meist anhand der Ursprungszellen – lymphoid oder myeloid – des Differenzierungsstadiums - z.B. prä- prä- B-, c-, prä- B- ALL - sowie der zeitlichen Entwicklung des klinischen Verlaufs – akut oder chronisch – vorgenommen.

Die Ätiologie der Leukämien ist nach wie vor weitgehend ungeklärt. Es gibt Erklärungsansätze zum Einfluss genetischer Prädisposition, kanzerogener Substanzen oder Infektionen. [1, 2] Einige epidemiologische Studien geben Hinweise darauf, dass schon pränatale Ereignisse in der Pathogenese pädiatrischer Leukämien eine Rolle spielen.[3, 4] Des weiteren wird die Vermutung, dass maligne Transformationen bereits *in utero* auftreten durch Zwillingsforschungsergebnisse unterstützt, die eine hohe Konkordanzrate von 20 bis 25% bei Leukämien zeigen.[5, 6] Der Nachweis des pränatalen Ursprungs leukämischer Veränderungen wurde u.a. ebenfalls durch die PCR- Analyse (Polymerase- Ketten- Reaktion) neonataler Guthrie- Karten von Kindern die später an Leukämie erkrankten, geführt.[7, 8] FORD et al. konnten die identische Translokation t (12;21) (Fusion des *TEL*- Gens von Chromosom 12 mit dem *AML1*- Gen des Chromosoms 21) bei Zwillingspaaren nachweisen und damit begründen, dass die Leukämogenese *in utero* stattgefunden haben muss, gefolgt von einer intraplazentaren Metastasierung der transformierten Zellen.[9] WIEMELS et al. dagegen meinen, dass die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) des Kindesalters zwar normalerweise *in utero* initiiert wird, aber dass es weiterer postnataler Ereignisse bedarf, ehe es zu einer klinisch manifesten Leukämie kommt.[10] Dafür spricht vor allem die lange Latenzzeit zwischen der Bildung von z.B. Fusionen wie *TEL- AML1* und der Entwicklung einer Leukämie. Zusammenfassend kann wohl gesagt werden, dass die ersten genetischen Veränderungen schon während der fetalen Periode eintreten, gefolgt von einer präleukämischen- oder Latenzperiode vor klinischer Manifestation.

1.1 ALL im Kindesalter

Leukämien sind mit über einem Drittel aller Krebserkrankungen die häufigste maligne Entartung im Kindesalter. Die bei Kindern häufigsten Leukämieformen sind die akuten Leukämien, wobei die akuten lymphoblastischen Leukämien (ALL) einen Anteil von ca. 80% und die akuten myeloischen Leukämien (AML) von ca. 18% der Leukämiefälle ausmachen. In den restlichen Fällen handelt es sich um die im Kindesalter sehr seltene chronisch myeloische Leukämie (CML).

1.1.1 Therapie und Prognose der ALL im Kindesalter

Vor über 50 Jahren wurde bereits mit der Chemotherapie bei Leukämien im Kindesalter begonnen. Akute Leukämien bei Kindern sind die am besten auf Therapien ansprechenden Neoplasien überhaupt. Dabei stellt sich die Frage, ob die hier fast einmalige Zusammenarbeit und *Compliance* an klinischen Therapiestudien von allen Beteiligten bei akuten Leukämien im Kindesalter der Grund für diesen guten Behandlungserfolg ist. In der Literatur findet sich sogar eine Studie die festgestellt hat, dass die protokollgerecht behandelten PatientInnen generell einen besseren

Behandlungserfolg haben als die, die empirisch behandelt werden.[11] Trotz dieser sicher nicht zu vernachlässigenden Faktoren ist der Hauptgrund für das gute Therapieansprechen sicherlich ihr Ursprung in der Hämatopoese und die Biologie der Erkrankung (hohe Zytostatikasensibilität).[12]

Das exzellente Ansprechen auf die Polychemotherapie hat die Heilungschancen bei ALL im Kindesalter enorm erhöht. War die Fünfjahresüberlebensrate (5- JÜW) vor 1965 nur 5%, liegt sie jetzt zwischen 70 und 80%.[13] Ein wesentlicher Fortschritt liegt in der risikoadaptierten Therapie der PatientInnen. Dabei unterscheiden sich die prognosebeeinflussenden Faktoren für Ersterkrankungen und Rezidive einer ALL. Während für ALL- Ersterkrankungen das Alter und die Leukozytenzahl bei Diagnosestellung und der Immunphänotyp, sowie das Vorliegen bestimmter chromosomaler Translokationen (t [9;22], MLL- Translokation, etc.) eine Rolle bei der Entscheidung über die Intensität der Therapie spielen, sind dagegen bei Rezidiven der Zeitpunkt und der Ort des Rezidivs sowie der Immunphänotyp von prognostischer Bedeutung.[14, 15] Heutzutage ist MRD (minimal residual disease), d.h. das molekulare Ansprechen auf die Therapie, zuverlässiger, um eine prognostische Einschätzung und Therapiestratifizierung zu gewährleisten.[16] In der letzten Zeit ist vor allem im Interesse einer noch individuelleren Therapie die Aufmerksamkeit der Forschungsbestrebungen sehr auf den prognostischen Einfluss von genetischen Veränderungen der Leukämiezellen gelenkt worden. So konnte für die Translokationen t(9;22), t(1;19) und t(4;11) eine ungünstige Beeinflussung der Prognose beobachtet werden, und einige Therapiestudien berücksichtigen dies schon.[16]

Trotz der erwähnten Fortschritte erleiden zwischen 20 und 30% der Kinder ein Rezidiv der Erkrankung. Dabei treten allgemein die meisten Rezidive in den ersten 5 Jahren nach der Erstdiagnose einer ALL auf. Die Chance eines Überlebens nach einem Rezidiv ist generell schlecht und hat sich zum Beispiel bei PatientInnen mit einem frühen Knochenmarkrezidiv in den letzten 20 Jahren auch nicht wesentlich verändert. Der Behandlungserfolg ist besser für die PatientInnen die ein spätes Rezidiv oder ein isoliertes extramedulläres Rezidiv erleiden. Um die prognosebeeinflussenden Faktoren sicherer beurteilen zu können, bedarf es aber weiterhin vieler *very- long- term follow- up* Studien. Die entscheidenden Faktoren für eine lange zweite Remission (nach dem ersten Rezidiv) sind also bisher noch die Dauer der ersten Remission und der Ort des Rezidivs.[17, 18]

Dabei ist zu konstatieren, dass über die letzten Jahre die Ersttherapie - möglichst individuell angepasst - immer aggressiver geworden ist, was im ungünstigen Fall mit einer Induktion von sekundären Leukämien, v.a. AML, mit einer Zunahme von Zweitmalignomen, besonders des zentralen Nervensystems und vielen Nebenwirkungen, wie Kardiomyopathien, Wachstums- und Entwicklungsstörungen, zu assoziieren ist.[19, 20] Im Gegensatz zur ALL Erwachsener, bei der nur etwa 30 bis 40% der PatientInnen geheilt werden können, ist es in den letzten 25 Jahren dank ständiger Verbesserung der Therapie möglich geworden, zwei Drittel der Kinder mit ALL und eine steigende Zahl Kinder mit AML auf ihrem Weg zu einem Langzeitüberleben zu unterstützen.[21, 22, 23, 24] Diese positive Entwicklung ist, wie gesagt, vor allem auf eine moderne risikostratifizierte Polychemotherapie zurückzuführen. Die Zuweisung zu verschiedenen Therapiezweigen erfolgt nach klinischen Kriterien sowie nach der immunologischen und molekularbiologischen Klassifizierung. An dieser Stelle soll etwas detaillierter auf die verschiedenen Klassifizierungssysteme eingegangen werden.

1.1.1.1 Klassifizierungssysteme der ALL

- Klassifikation anhand der Morphologie:

Nach der FAB- Klassifikation (internationale französisch- amerikanisch- britische Kooperation) von 1976 werden drei Formen der ALL morphologisch unterschieden.[25, 26]

L1- Morphologie: kleine Zellen, homogenes Bild, schmaler Zytoplasmasaum, regelmäßiger Kern meist ohne Nukleoli

L2- Morphologie: große Zellen, heterogenes Bild, mittelbreiter Zytoplasmasaum, unregelmäßig häufig gespaltener Kern mit großen Nukleoli

L3- Morphologie: große Zellen, homogenes Bild, stark basophiles Zytoplasma, regelmäßige ovale Kerne mit deutlichen Nukleoli und Vakuolen im Zytoplasma

Da die FAB- Klassifikation nicht ausreichend mit immunologischen und genetischen Befunden korreliert, klinische und zytogenetische Veränderungen nicht berücksichtigt und ihre prognostische Bedeutung für die ALL fraglich ist, findet sie jedoch in der Klinik kaum noch Beachtung.

- Klassifikation anhand der Immunologie

Eine leukämische Transformation und klonale Expansion kann in den verschiedenen Reifestadien während der Lymphozytendifferenzierung stattfinden. Die Differenzierung von Lymphozyten verläuft in mehreren Stadien, in denen unterschiedliche Antigene exprimiert werden. Die für bestimmte Differenzierungsstadien relevante Antigen-Expression ermöglicht die immunphänotypische Klassifizierung der leukämischen Zelle entsprechend der normalen Reifungssequenz. Da nur sehr wenige der Antigene der Lymphozytendifferenzierung wirklich zellinien-spezifisch sind, erfolgt letztlich die Immunphänotypisierung anhand eines spezifischen Verteilungsmusters von zellreihen-assoziierten Antigenen, die mittels monoklonaler Antikörper in der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden.[27] So können die akuten lymphoblastischen Leukämien in Subtypen der B- und T- Zellreihe korrespondierend zu den Differenzierungsstadien eingeteilt werden, also in prä- prä- B-, common-, prä- B- und B- ALL Subtypen für die B- Zelllinie und in prä- T- und T- ALL Subtypen für die T- Zelllinie.[28] (Die Subtypen prä- prä- B-, common- und prä- B- ALL werden üblicherweise gemeinsam B- Vorläuferzell ALL [BVZ- ALL] genannt.) Allerdings gibt es einige Blasten, die neben T- und B- Zellmarkern zusätzlich myeloische Antigene koexprimieren können.[29] Für diese Mischformen der Leukämie gibt es verschiedene Bezeichnungen: z.B. akute Hybrid-Leukämie (AHL), myeloid- antigen positive ALL (My+ALL) oder lymphoid- antigen positive AML. Die My+ALL findet sich mit einer Häufigkeit von 3% bis 20% bei ALL. Laut der neuesten Definition wird sie mit zu den lymphatischen Leukämien der BVZ- ALL gezählt. Die Tabelle Nr. 1 illustriert einige je nach Reifestadium exprimierte Oberflächenmarker.

Tabelle 1: Verteilungsmuster bestimmter je nach Reifestadium exprimierter Oberflächenmarker bei den verschiedenen Subtypen der ALL.(CD - cluster of differentiation; TdT – terminale Desoxynukleotidyltransferase; cy IgM – cytoplasmatisches IgM; S Ig – surface IgM)

Markerexpression						
Immunphänotyp	TdT	HLA-DR	CD 10	CD 19	cy IgM	S Ig
prä- prä- B- ALL	+	+	-	+	-	-
common- ALL	+	+	+	+	-	-
prä- B- ALL	+	+	+/-	+	+	-
B- ALL	+/-	+	+/-	+	+/-	+
	TdT	CD7	CD2	CD1/2/3	CD8	cy CD3
prä- T- ALL	+	+	-	-	-	+/-
T- ALL	+	+	+	+/-	+/-	+

- Klassifikation anhand zytogenetischer und molekulargenetischer Veränderungen

Genveränderungen in leukämischen Zellen waren lange Zeit nur mittels zytogenetischer Analyse nachweisbar. Diesem Verfahren sind jedoch nur grobe strukturelle Veränderungen wie Deletionen, Translokationen und Insertionen zugänglich. Durch immer weiter entwickelte molekulargenetische Untersuchungsmethoden (z.B. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FiSH), Southern Blot Analyse und Polymerase- Ketten- Reaktion) können jetzt genetische Veränderungen wesentlich spezifischer und sensitiver aufgedeckt werden.[30] So ist es u.a. möglich bestimmte Gensequenzen, deren Proteinprodukte in die maligne Transformation und Proliferation involviert sind und somit eine Veränderung der Genexpression, der Genregulation oder der Genfunktion zur Folge haben können, zu identifizieren.[31] Dazu gehören die Beschreibung von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, die in die Leukämogenese involviert sind und deren Analyse wesentlich zum Verständnis der Pathogenese sowie zur Verbesserung der Therapiestrategien beigetragen haben.[32]

Bei etwa drei Viertel der Fälle pädiatrischer ALL werden Translokationen mit zyto- oder molekulargenetischen Methoden nachgewiesen. In vielen Fällen zeigt sich, dass ALL- Immunphänotypen mit spezifischen chromosomalen Aberrationen assoziiert sind.[33]

Die Tabelle Nr. 2 zeigt beispielhaft häufige genetische Veränderungen unter Berücksichtigung der Verteilung bei den verschiedenen Immunphänotypen.[34, 35]

Tabelle 2: Verteilung häufiger Translokationen bei den verschiedenen Subtypen der ALL des Kindesalters. (BVZ- ALL = B- Vorläuferzell- ALL = prä- prä- B- ALL + common- ALL + prä- B- ALL)

Verteilung genetischer Veränderungen bei ALL im Kindesalter				
Fusionsgen	Translokation	Häufigkeit Ersterkrankungen	Immunphänotyp	beteiligte Protein-Domänen
<i>TEL- AML1</i>	t(12;21)	20%	BVZ- ALL	RUNT, ETS

E2A- PBX1	t(1;19)	5%	BVZ- ALL	Hox
BCR- ABL	t(9;22)	4%	BVZ- ALL	Tyrosin- Kinase
MLL- Fusionen	t(4;11) t(1;11) t(11;19)	6%	prä- prä- B- ALL	Trithorax
MYC	t(8;14) t(2;8) t(8;22)	2%	B- ALL	bHLH
E2A- HLF	t(17;19)	1%	BVZ- ALL	bZIP
Hox11, LYL1, TAL1, TAL2, LM01, LM02	7q35/ TCRβ 14q11/ TCRαδ	7%	T- ALL	Hox, bHLH, LIM
Random	-	25%	-	-
keine	-	30%	-	-

Der Entwicklung der molekulargenetischen Untersuchungsmethoden ist es nicht zuletzt zu verdanken, dass jetzt eine Vielzahl verschiedener klon- oder leukämiespezifischer Genveränderungen als Marker zum Nachweis von residuellen Leukämiezellen (*minimal residual disease* = MRD) zur Beurteilung des Krankheits- bzw. Heilungsverlaufs zur Verfügung stehen.[36]

1.1.1.2 Einfluss der Klassifizierung auf die Therapie

Ziel der vorgestellten Differenzierung ist es, eine möglichst individuelle und risikoadaptierte Therapie der PatientInnen mit einer Verringerung der akuten toxischen Nebenwirkungen und der Spätfolgen der angewandten Zytostatika und mit einer Abschätzung der Notwendigkeit einer intensivierten Therapie - wie z.B. der Knochenmarktransplantation -, zu erreichen und zwar in der Absicht, ein möglichst langes ereignisfreies Überleben zu gewährleisten. Da eine absolut individuelle Therapie per se nicht möglich ist, wird versucht die PatientInnen mit Hilfe prognostischer Faktoren in Risikogruppen einzuteilen, die jeweils mit unterschiedlicher Therapieintensität behandelt werden. Neben den bekannten klinischen Risikofaktoren (Alter, Leukozytenzahl) existieren molekulargenetische Faktoren wie Hyperdiploidie (Chromosomenzahl pro Leukämiezelle über 50 bzw. DNA Index ≥ 1.16), T- Zell ALL- Immunphänotyp und Philadelphia Chromosom (t[9;22]). Zunehmend wird besonders die Einbeziehung dieser molekulargenetischer Merkmale in die Risikoklassifizierung favorisiert.[37, 38] RUBNITZ et al. schlagen eine vierteilige vor allem auf genetischen Merkmalen beruhende Risikoklassifikation für Ersterkrankungen einer ALL vor. Demnach werden z.B. Hyperdiploidie oder *TEL- AML1* Genfusion der Gruppe mit geringem Risiko, die E2A- PBX1 Genfusion oder der T- Zell Immunphänotyp der Hochrisikogruppe und die BCR- ABL Genfusion mit einer hohen initialen Leukozytenzahl oder Rekombinationen des MLL- Gens der Gruppe mit sehr hohem Risiko zugeordnet.[38, 39] Der diesem Schema angepassten intensivierten Therapie, bestehend aus den drei Phasen: Induktions-, Konsolidierungs-, Reinduktions- und Erhaltungstherapie, ist der eingangs erwähnte Erfolg mit einer Heilung von etwa zwei Drittel der Kinder zu verdanken.[40, 41] In der Berlin- Frankfurt- Münster ALL- Rezidiv Therapiestudie (ALL- REZ- BFM) werden Kinder mit ALL- Rezidiv aufgrund der unabhängigen prognostischen Faktoren Rezidivzeitpunkt, Rezidivlokalisierung und Immunphänotyp in die Therapiegruppen S1 - S4 eingeteilt. In der neuen

Therapieoptimierungsprüfung ALL- REZ- BFM 2002 wird das molekulare Ansprechen therapiebasierend auf den klonspezifischen Nachweis von Ig- und TZR- Genrekombinationen in Leukämiezellen zur Therapiestratifizierung mit verwendet.

1.2 Leukämogenese

Für die Pathogenese der akuten Leukämien wurden bisher nur in Ansätzen Erklärungsmodelle gefunden. Auf genetischer Ebene spielen hauptsächlich drei verschiedene Mechanismen (Insertion, Deletion und Translokation) eine Rolle. Deletionen verursachen oft den Verlust von Tumorsuppressorgenen mit einer konsekutiven Tumorprogression. Translokationen sind bei ca. 75% aller akuten lymphoblastischen Leukämien im Kindesalter zu finden und führen zu Fusions- und Hybridgenen.[31, 42] Dabei sind drei Viertel der Translokationen bei ALL für die Bildung spezifischer Onkogene verantwortlich.[43] Onkogene sind durch Mutation, Deletion, Amplifikation oder Insertion veränderte Gene, deren unveränderte Äquivalente Protoonkogene sind. Die Folge der verschiedenen genetischen Aberrationen sind veränderte Genregulation, Expression oder Funktion. Die Genamplifikationen auf der DNA- Ebene beispielsweise oder die Überexpression auf der RNA- Ebene verursachen einen Überschuss von Genprodukt und umgekehrt kann die Abnahme oder das Fehlen eines Genproduktes durch eine Gendeletion oder Mutation verursacht werden, was wiederum zu einer veränderten Menge, einer veränderten Aktivität oder zu einer veränderten zellulären Lokalisation von einem Protein führt. Es werden meist Gene transformiert, die für an der zellulären Signaltransduktion (bis zur Genexpression) und so im weiteren Sinne an den physiologischen Zellfunktionen, wie Wachstum, Differenzierung und Apoptose beteiligte Proteine kodieren. So kann es vor der Beendigung entwicklungskritischer Prozesse wie der DNA- Reparatur im Zellzyklus zu einem vorzeitigen Beginn der S- Phase kommen, was weitere genetische Veränderungen und so die Entwicklung eines malignen Phänotyps nach sich ziehen kann.[36] Auffällig ist, dass chromosomale Veränderungen sehr häufig mit einem bestimmten Tumorphänotyp assoziiert sind.[31]

Die Differenzierung und Proliferation von hämatologischen Vorläuferzellen zu reifen Zellen unterliegt der Kontrolle einer Vielzahl von Proteinen, wie z.B. Zytokinen, Transkriptionsfaktoren, zyklinabhängigen Kinase- Inhibitoren (CDI) oder zellzyklusregulierenden Proteinen, wie p15INK4B und p16INK4. [44, 45]

Transkriptionsfaktorkodierende Gene sind häufig in Genrekombinationen involviert, die durch chromosomale Translokationen entstehen. Die Expression oder Aktivierung von spezifischen durch Translokationen veränderte Gensequenzen für nukleäre Transkriptionsfaktoren wird für den häufigsten leukämogenen Mechanismus gehalten.[43] Der initiale Auslöser für reziproke chromosomale Translokation und die involvierten molekularen Mechanismen ist aber weitestgehend ungeklärt. Primäre genomische Fusionssequenzen scheinen wohl in einigen Fällen verantwortlich zu sein. Die häufige Beteiligung bestimmter Transkriptionsfaktoren an chromosomalen Translokationen in Leukämien deutet auf deren Bedeutung nicht nur in der Pathogenese von Leukämien, sondern auch in der normalen Hämatopoese hin.

1.2.1 Transkriptionsfaktoren: Funktion und Beteiligung an der Leukämogenese

Der Prozess der Transkription ist der erste Schritt der Genexpression und führt zur Produktion eines ersten RNA- Transkriptes von der DNA eines bestimmten Gens.

Die Transkription stellt damit auch den ersten kritischen Schritt in der Genexpression

dar, dem eine Reihe post- transkriptionaler Prozesse wie RNA- Splicing und Translation folgen. Dies führt letztendlich zur Produktion von Funktionsproteinen.[46]

Sowohl die basale Transkription als auch ihre Regulierung sind abhängig von spezifischen Proteinfaktoren, den sogenannten *Transkriptionsfaktoren*. Durch sie können externe Signale in interne Informationen umgewandelt werden. Transkriptionsfaktoren sind Kernproteine, die durch direkte Interaktion mit bestimmten DNA- Sequenzen in genregulatorischen Regionen – auch als Promotoren und Enhancer bekannt - deren Transkription und so die Formation der *messenger*- RNA (mRNA) kontrollieren.[47] Die Fähigkeit eines Transkriptionsfaktors die Transkription zu aktivieren, ist abhängig von spezifischen von der DNA Bindungsregion räumlich unabhängigen Aktivierungsdomänen des Proteins.[48]

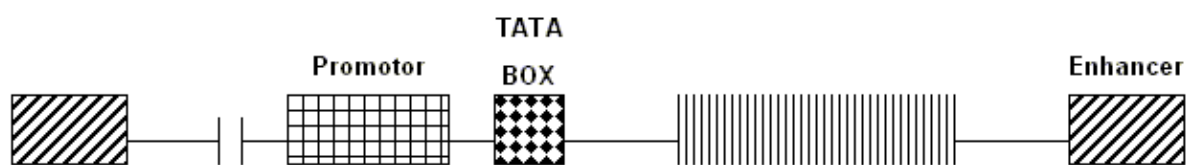


Abbildung 1: In der Abbildung sind die Enhancer, die vor oder hinter dem Gen liegen können, quer gestreift dargestellt, der Promotor kariert, die TATA- Box gepunktet und das Gen, das transkribiert werden soll gestreift. Die TATA- Box bildet gemeinsam mit Proteinen, den Transkriptionsfaktoren, den Startpunkt für die RNA- Polymerase. Enhancer und Promotor bilden Bindungsstellen für weitere Proteine (andere Transkriptionsfaktoren), die die Transkription verstärken.

Transkriptionsfaktoren enthalten somit örtlich getrennte transkriptionsaktivierende Domänen, DNA- bindende Domänen und Strukturen, die eine Faktordimerisation auszulösen vermögen, welche oft essentiell für die DNA- Bindung ist.

Wahrscheinlich agieren die verschiedenen Aktivierungsdomänen durch Interaktion mit anderen Proteinfaktoren, um die Transkription zu erleichtern. So kann es zu einer Verstärkung der aktivierenden bzw. der hemmenden Wirkung durch die gegenseitige Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren kommen. Dieses Zusammenspiel von Faktoren bildet den basalen Transkriptionskomplex, der mit der RNA- Polymerase interagiert.[49, 50, 51] Transkriptionsfaktoren werden auf der Basis ihrer spezifischen Proteinstruktur in verschiedene Klassen nach ihrem DNA- Bindungs- und/ oder – Dimerisationsmotiv eingeteilt.[52] Mehr als 80% der Transkriptionsfaktoren enthalten eines der folgenden Motive von Funktionsdomänen: Homeobox; Cystein- Histidin- Zinkfinger; Cystein- Cystein- Zinkfinger; Leucin- Zipper; HLH- Domäne.[53]

1.3 Die Bedeutung der Transkriptionsfaktoren TEL, AML1 und TEL-AML1 - ihre Funktion und Beteiligung an der Leukämogenese

1.3.1 Transkriptionsfaktor TEL

TEL ist ein Vertreter der eukaryontischen ETS- Transkriptionsfaktoren Familie (**E**-**t**wenty-**s**ix-**s**pecific) und wird durch das TEL- Gen (Translokation **E**T**S**- like **L**eukemia), auch ETV6 (**E**T**S**- **v**ariant **G**ene **6**) genannt, auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 (12p13) kodiert.[54]

1.3.1.1 TEL- Gen

Das *TEL*- Gen, das für einen ETS ähnlichen putativen Transkriptionsfaktor kodiert, wurde zuerst 1994 als ein Resultat seiner Fusion mit dem Plättchen assoziierten Wachstumsfaktor Rezeptor- β - Gen (PDGFR β) (*platelet derived growth factor receptor* β) bei einer chronisch myelo- monozytären Leukämie (CMML) mit einer t(5;12) (q33;p13) Translokation identifiziert.[54]

BEANS et al. konstruierten 1996 eine detaillierte Karte der genomischen Region, die das *TEL*- Gen enthält. Demnach besteht das *TEL*- Gen aus 240kb (Kilobasen) und enthält acht Exons. Ein alternatives Exon 1 (Exon 1B) kann sich 12 kb *upstream* von Exon 3 befinden.[55, 56] Die mRNA von *TEL* besteht aus acht Exons mit insgesamt 1356bp (Basenpaare) und kodiert für ein aus 452 Aminosäuren bestehendes nukleäres Phosphoprotein mit einer „*helix- loop- helix*“- Dimerisations- Domäne (HLH) am aminoterminalen Ende (5' Region) und einer ETS DNA- bindenden Domäne (DBD) am carboxy- terminalen Ende (3' Region). Das HLH- Motiv wird von den Exons 3 und 4 und die ETS DNA- bindende Domäne von den Exons 6 bis 8 kodiert. Auf der mRNA- Ebene finden sich drei verschiedene Transkripte (2400, 4300, 6200 Nukleotide), die möglicherweise durch differentielle Polyadenylierungs- Reaktionen der 3'- Region entstehen.

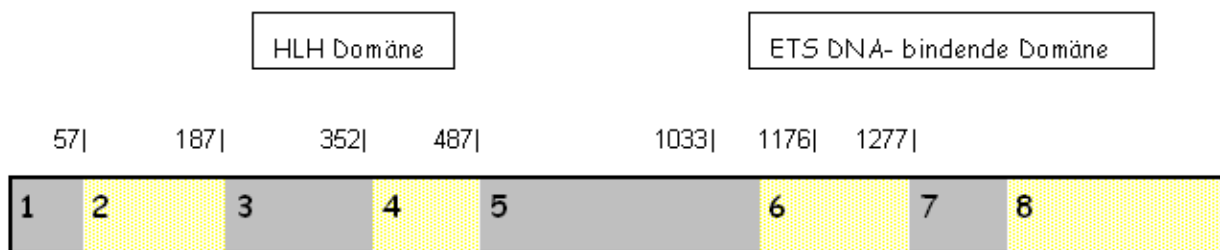


Abbildung 2: cDNA: *TEL*- Gen EXON 1 – EXON 8: schematische Darstellung der Exonstruktur mit Angabe der jeweils letzten Base im Exon.

1.3.1.2 TEL - Protein und Funktion

Das Charakteristische der ETS- Transkriptionsfaktorenfamilie ist die konservierte ETS DNA- bindende Domäne.[57] Diese ETS- Domäne ist als ein „*helix- turn- helix*“- Motiv strukturiert und besteht aus 85 Aminosäuren.[58] Sie ist hauptsächlich für die Bindung an spezifische Sequenzen über ein *GGAA/ T* Kernmotiv verantwortlich.[59, 60, 61] ETS DNA- Bindungsstellen wurden in den regulatorischen Elementen von Genen gefunden, die in pluripotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen beziehungsweise in spezifischen Zellreihen (T-, B- Zellen, myeloische Zellen) exprimiert werden.

Eine Reihe von Proteinen, die der ETS Familie zugerechnet werden, besitzen neben der ETS DNA- bindenden Domäne die HLH- Protein- Dimerisations- Domäne. Diese homologe Region lässt sich u.a. bei *TEL*, *FLI1*, *ETS1*, *ETS2*, *ERG2* und *GABP α* finden.[62, 63] Sie ist in Protein- Protein- Interaktionen involviert, die zu Homodimerisation und Heterodimerisation mit anderen Mitgliedern der ETS- Familie, wie z.B. *FLI1* führen.[64, 65, 66, 67, 68] Obwohl das ETS- Familienmitglied *TEL* in den verschiedensten Geweben exprimiert wird, ist über seine spezifische regulatorische Funktion bisher wenig bekannt. Eine wichtige Funktion haben die ETS-

Transkriptionsfaktoren vor allem bei der Regulierung der Entwicklung und Funktion von Zellen der verschiedenen hämatopoetischen Zellreihen und des Immunsystems. Außerdem sind ETS- Proteine wichtig für die Regulierung der Expression von Genen, die an der Zellzyklus- Progression und der Apoptose beteiligt sind. *TEL* funktioniert als ein sequenzspezifischer DNA- bindender Transkriptionsregulator.[69] WANG et al. konnten zeigen, dass *TEL* nicht für die Etablierung der Hämatopoese benötigt wird, sondern vielmehr für die Angiogenese des Dottersackes und für das Überleben ausgewählter Zellpopulationen. Weiterhin kamen sie zu dem Ergebnis, dass *TEL* nicht für die fetale Leberhämatopoese, wohl aber für die spätere Hämatopoese aller Zelllinien im Knochenmark essentiell ist und schon während der Transformation von Leber- zu Knochenmarkhämatopoese eine kritische Rolle einnimmt. So ist *TEL* der erste Transkriptionsfaktor, dessen spezifische Beteiligung an der Hämatopoese im Knochenmark beschrieben wurde.[70]

CHAKRABARTI et al. fanden heraus, dass die zentrale Region von *TEL* eine von der HLH- Domäne unabhängige Repressoraktivität ausübt. Das spricht dafür, dass *TEL* seine Repressorfunktion durch zwei verschiedene Mechanismen vermittelt. Die Vermittlung über die zentrale Region ist von der Bindung von Korepressoren abhängig. Die Transkriptionsrepression, die durch die HLH- Domäne vermittelt wird, ist, so weit bekannt, von Korepressoren unabhängig. FEARS et al. bestätigten, dass das *TEL*- Protein als starker Repressor der Transkriptionsaktivierung des Promotors des M- CSF- Rezeptors durch den Transkriptionsfaktor *AML1* und des Enhancers von T- Zell- Rezeptor- β im Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren wirkt.[71] KWIATKOWSKI et al. zeigten, dass *TEL* normalerweise an sich selbst und an Fli1 bindet. In *transient transfection assays* transaktiviert Fli1 megakaryozytenspezifische Promotoren, und *TEL* inhibiert diesen Effekt. In Transaktivierungs- Studien, die deletierte Mutagenen von *TEL* und vom *TEL- AML1*- Fusionsprotein nutzten, konnte man feststellen, dass die *helix- loop- helix* Domäne von *TEL* die Transaktivierung nur teilweise inhibiert und die komplette Hemmung die volle Länge des *TEL*- Moleküls, inklusive DNA- bindende Domäne, benötigt. *TEL* und Fli1 werden früh in der Hämatopoese exprimiert. Die Unfähigkeit von *TEL*- Fusionsproteinen, wie *TEL- AML1*, der Fli1 vermittelten Transaktivierung entgegenzuwirken, könnte zum malignen Phänotyp in humanen Leukämien, in welchen diese Fusionsproteine zu finden sind, führen. In weiteren Versuchen der Arbeitsgruppe um HICKSTEIN über die spezifischen Funktionen von *TEL* wurde der biologische Effekt der Interaktion zwischen Fli1 und *TEL* in hämatopoetischen Zellen untersucht.[72] Es wurden beide getrennt oder gemeinsam in Zellen der K562 Leukämiezelllinie exprimiert, die normalerweise weder endogenes *TEL* noch Fli1 enthält. Es fand sich eine dominante Suppression der Zellproliferation durch *TEL* durch einen down- regulierenden Effekt der Cyclin D3 Expression. Dies könnte eine weitere mögliche Erklärung dafür sein, wie die Disruption von *TEL* bei seiner Translokation und/ oder Deletion zu einer malignen Transformation führt. Dieser Mechanismus lässt weiterhin darauf schließen, dass die Lageveränderung des *TEL*- Gens in leukämischen Zelllinien, in welchen *TEL* deletiert ist, zu einer Störung der normalen Wachstumskontrolle führt. BOUGUSLAW et al. haben außerdem durch die Expression des Wildtyps *TEL* in REH- Zellen, in denen normalerweise ein *TEL*- Allel mit *AML1* fusioniert und das andere *TEL*- Allel deletiert ist, auch eine Suppression des Zellwachstums, eine Abnahme des Zellüberlebens und einen p53 unabhängigen Anstieg der Expression des Apoptose assoziierten Gens BAX beobachten können. *TEL* führt also in dem Fall zur Triggerung einer Apoptoseantwort. Diese Ergebnisse könnten therapeutisch richtungweisend für Leukämien der Zelllinien sein, in denen die *TEL*-

Expression durch Translokation und/ oder Deletion verändert ist.

1.3.1.3 TEL- Veränderungen und Einfluss auf die Leukämogenese

Zytogenetische Abweichungen unter Beteiligung des kurzen Armes von Chromosom 12 (12p), einschließlich Translokationen, Inversionen, Insertionen und Deletionen, wurden in einer Vielzahl von hämatopoetischen Malignomen beschrieben, u.a. in etwa 10% der Fälle von ALL, AML und myelodysplastischem Syndrom. *TEL* scheint an der größten Zahl von Translokationen beteiligt zu sein.[35, 42, 73, 74] Zur Zeit ist eine *TEL*-Beteiligung in über 40 verschiedenen Translokationen bekannt. Das häufigste Fusionsgen, an dessen Bildung es in ALL des Kindesalters beteiligt ist, ist *TEL-AML1*. [75] Die Fusionspartnergene von *TEL* kodieren für unterschiedliche Proteingruppen. So kodieren *AML1*, *MN1* oder *EVI1* beispielsweise für Transkriptionsfaktoren und *PDGFR β* , *ABL* und *JAK2* für Proteinkinasen.[54, 73, 74, 76, 77] An der Fusion kann entweder die HLH- Domäne oder die DNA- bindende ETS- Domäne von *TEL* beteiligt sein. Die Bruchpunkte in *TEL* können beispielsweise zwischen Exon 1 und 2, zwischen 2 und 3 *upstream* der HLH- Domäne liegen oder zwischen 3 und 5 und 5 und 6.

Grafik Nr. 3 veranschaulicht schematisch einige Beispiele für die Beteiligung von *TEL* an verschiedenen Translokationen.[78]

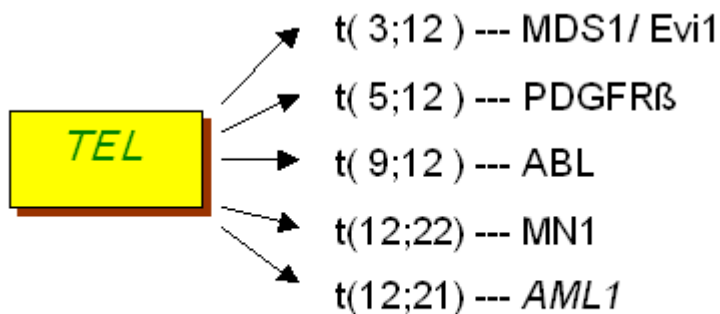


Abbildung 3: Translokationen, an denen TEL bei Leukämien beteiligt ist.

Der mögliche transformierende Effekt von *TEL* im Rahmen von Translokationen wird z.B. bei der Translokation t(3;12) in einer verstärkten Expression von EVI1 gesehen.[79] In der von GOLUB et al. beschriebenen Translokation t(5;12) sowie auch in der Translokation t(9;12), die zu einer Fusion mit der ABL- Tyrosinkinasedomäne führt, wird die resultierende Transformation von *TEL* bzw. von dem durch die Fusion mit *TEL* entstehenden Fusionsprotein in einer gestörten Aktivierung von nachgeschalteten Signaltransduktionswegen gesehen.[54]

Bei 15-22% der ALL werden außer den Translokationen von Chromosom 12 auch terminale oder interstitielle Deletionen in der Region des *TEL*- Genortes (Chromosomale Banden 12p12-p13) gefunden.[80] Der Verlust der normalen *TEL*-Expression ist ein häufiges und frühes Ereignis im Prozess der Leukämogenese, wobei entscheidend ist, in welchem Maße die Expression vermindert ist.[81] Die Inaktivierung beider Kopien des *TEL*- Gens, einmal durch Translokation und zum anderen durch Deletion oder andere Mechanismen, also der Verlust der *TEL*- Region des Chromosom 12, unterstützt die schon 1996 von KOBAYASHI et al. aufgestellte These, dass *TEL*

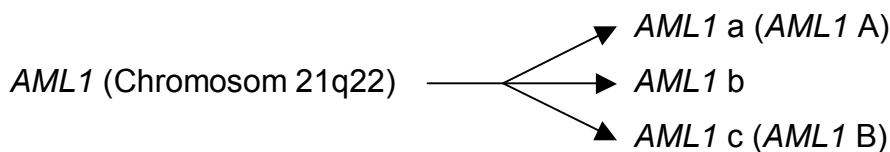
eine Funktion als Tumorsuppressorgen besitzen könnte.[82]

1.3.2 Transkriptionsfaktor *AML1*

AML1 (**A**cute **M**yeloid **L**eukemia **1** protein), auch synonym *core-binding factor alpha b subunit* (CBF α 2) genannt, wird zur Gruppe der Transkriptionsfaktoren der *core binding factors* (CBF) gerechnet. Diese Gruppe trägt auch den Namen *Polyoma enhancer binding proteins* (PEBP2).

1.3.2.1 *AML1*- Gen

Das *AML1*- Gen wurde 1991 bei der Klonierung der Translokation t(8;21), die mit einer akuten myeloischen Leukämie assoziiert ist, identifiziert. Es befindet sich auf dem langen Arm des Chromosom 21 und besteht aus 9 Exons, die ca. 150kb umspannen.[83] *AML1* kodiert für einen nukleären Transkriptionsfaktor. Es existieren verschiedene Transkripte von *AML1* (a, b und c), die alle eine RUNT- homologe Domäne (RHD) enthalten, die von den Exons 3 bis 4 kodiert werden.[84] Der Name ist abgeleitet von dem bei *Drosophila melanogaster* zu findenden RUNT- Gen.[85, 86] Die längeren Transkripte *AML1* b und c enthalten an ihrem carboxy- terminalen Ende eine weitere funktionelle Domäne, die sogenannte transkriptionsaktivierende Domäne (TAD). Daneben enthält *AML1* eine Zahl anderer funktioneller Bereiche, die für seine biologische Aktivität wichtig sind.[87, 88, 89]



1.3.2.2 *AML1* - Protein und Funktion

Die *core binding factors* sind Heterodimere und bestehen aus zwei Untereinheiten. Die Untereinheit α wird vom *AML1*- Gen kodiert und die Untereinheit β vom CBF β - Gen auf Chromosom 16q22. Während *AML1* ein nukleäres Protein ist, erfolgt die Bildung von CBF β im Zytoplasma mit einem anschließenden Import in den Kern durch die Heterodimerisation mit der Untereinheit CBF α . [90, 91, 92] Sie bilden zusammen mit vielen anderen gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren oder Koaktivatoren, wie beispielsweise p300 und CBP, die direkt an die TAD von *AML1* binden, einen transkriptionsaktivierenden Komplex.[93]

Die α - Untereinheit des Transkriptionsfaktorkomplexes kann auch von AML- 2 (CBF α 3) (Chromosom 1p36) oder AML3 (CBF α 1) (Chromosom 6p21), die der gleichen *core binding factors* (CBF α) Familien angehören, gebildet werden. Diese α - Untereinheiten unterstützen die Bindung an die DNA, ohne aber selbst direkt an sie zu binden.[94, 95] Die 118 Aminosäuren (AS) enthaltende RUNT- homologe- Domäne vermittelt die DNA-Bindung von *AML1* durch die Erkennung des Enhancer- Kern- Motivs TGT/ cGGT, welche für die transkriptionelle Regulierung einer Reihe von viralen und zellulären Enhancern und Promotoren wichtig ist.[96, 97, 98, 99] Des weiteren ist die RUNT- Domäne an der aktivitätsverstärkenden Bindung des Kofaktors CBF β beteiligt. Die durch das Enhancer- Kern- Motiv beeinflusste Genexpression ist zusätzlich von benachbarten Bindungsstellen zellreihenspezifischer Transkriptionsfaktoren abhängig, was zu der Annahme geführt hat, dass *AML1* die Organisation der Transkription

übernimmt, indem es gewebespezifische Transkriptionsfaktoren zu einem Komplex aus Nukleoproteinen zusammenführt und so eine zellinien-spezifische Transkription vermittelt.[100] Zielsequenzen für die Transkriptionsaktivierung durch *AML1* sind eine Reihe hämatopoesespezifischer Gene, wie der Myeloperoxidase (MPO), der neutrophilen Elastase, die Promotorregion von Complement Receptor Type 1 (CR1), der Wachstumsfaktoren *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) und Zytokin Interleukin-3 (IL3), der Wachstumsfaktor-Rezeptor CSF-1R (*colony-stimulating-factor-1*) und die Untereinheiten des T-Zellantigenrezeptors: α , β und δ . [85, 94, 101, 102]

AML1 wird während der Organentwicklung vielerorts gefunden, wie z.B. in hämatopoetischen Stammzellen, in der olfaktorischen und gustatorischen Schleimhaut und in neuronalen Ganglienzellen. Später findet sich eine Expression normalerweise nur in den hämatopoetischen Zellen.[103] Auf der Suche nach der Funktion und Bedeutung von *AML1* haben vor allem Experimente mit homozygoter Deletion des Maus *AML1*-Genes zu der Annahme geführt, dass der *AML1*/CBF β Komplex Schlüsselregulator der Genexpression während der frühen normalen Hämatopoese aller hämatopoetischen Zelllinien ist.[104, 105]

Die normale Funktion von *AML1*/CBF β ist demnach die Aktivierung der Transkription. Es wurden aber auch verschiedene Splicevarianten von *AML1* gefunden, denen die TAD fehlt und die somit durch ihre Expression eher für eine Hemmung der Transkription verantwortlich gemacht werden.[106] Eine wahrscheinlich zusätzliche Funktion von *AML1* ist seine Aktivierung der DNA-Replikation, auf die hier aber nicht weiter eingegangen werden soll.[107]

Um beispielsweise die Funktion von *AML1* während der B-Zelldifferenzierung zu untersuchen, da *AML1* im Rahmen der Translokation *TEL-AML1* sehr häufig in B-Vorläuferzellen gefunden wird, wurden verschiedene regulatorische Regionen von B-Zell-spezifischen Genen für mögliche *AML1*-bindende-Regionen gesucht. Es wurde eine putative *AML1*-Bindungsregion im Promotor des B-Zell-spezifischen Tyrosinkinasegens *BLK* gefunden. *BLK* wird mit dem B-Zellantigenrezeptor in Verbindung gebracht und ist in vielfältige Signaltransduktionswege involviert. Das Antigen-*crosslinking* zum B-Zellrezeptor führt zu einem schnellen Anstieg der Tyrosinkinaseaktivität, was wiederum zu einer Aktivierung einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen führt. Der Antigenrezeptor enthält selbst keine intrinsische Tyrosinkinasedomäne. Deshalb führt die Tyrosinkinaseaktivierung über eine vermittelte Signaltransduktion zu einer Interaktion zweier B-Zell-antigenrezeptor-assoziierten Proteine, Ig α und Ig β mit den zytoplasmatischen SRC-ähnlichen Kinasen, *BLK*, *LYN* und *FYN*. Diese schnelle Aktivierung der Tyrosinkinase triggert eine Kaskade von *downstream* Ereignissen, die zu einer veränderten Genexpression und entweder zu Zelldifferenzierung und Proliferation oder zu Apoptose führen.[108]

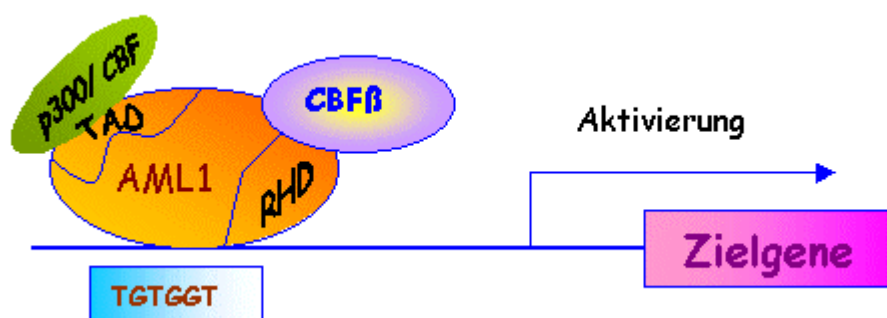


Abbildung 4: Der heterodimere AML1/ CBF β Transkriptionsfaktor.

1.3.2.3 AML1- Veränderungen und Einfluss auf die Leukämogenese

Auch der AML1/ CBF β - Transkriptionsfaktorkomplex scheint einer des häufigsten Ziele von Translokationen bei humanen Leukämien zu sein. Er ist in etwa 30% der AML und in 25% der ALL- Fälle involviert. Der Bruchpunkt in AML1 bei seiner Beteiligung an Translokationen liegt meist hinter der RUNT- Domäne. Beispielhaft veranschaulicht die Abbildung Nr. 5 einige Translokationen an denen AML1 beteiligt ist.

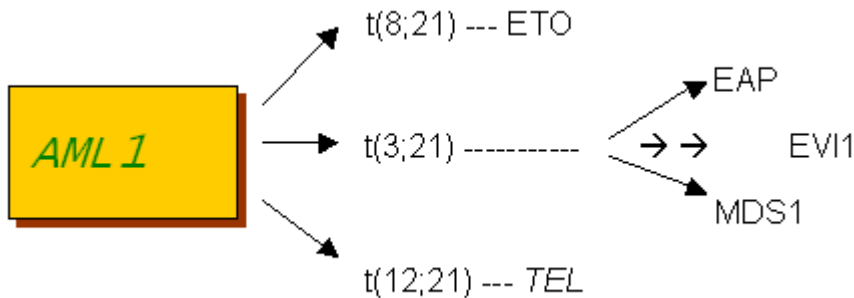


Abbildung 5: Translokationen, in die AML1 bei Leukämien und MDS (Myelodysplastisches Syndrom) involviert ist.

Durch die Translokation von AML1 in die unphysiologische Nachbarschaft anderer Gene, kann ein Fusionsgen entstehen, das für ein Fusionsprotein mit neuen Eigenschaften kodiert. Eine Translokation von AML1 a kann beispielsweise zu einer Blockierung von Granulozyten und zu einer Stimulation der Proliferation myeloischer Zelllinien führen.[106] Das bisher meiste Wissen über die Funktion von AML1 wurde im Rahmen seiner Fusion mit dem Transkriptionssuppressor *eight- twenty- one* Gen (ETO) (ebenfalls gebräuchliche Namen sind die Bezeichnungen: MTG8 und CBFA2T1) auf Chromosom 8 erlangt. Diese Translokation t(8;21) (q22;q22) kodiert für ein AML1/ ETO Fusionsprotein. Seine Expression führt zu einer Neutralisierung der normalen AML1/ CBF β vermittelten Aufgaben. Wie OKUDA et al. zeigen konnten, kommt es unter anderem durch eine aktive Hemmung der transkriptionsaktivierenden Funktion zu einer Beendigung der Differenzierung und durch ein Zusammenspiel mit anderen genetischen Mutationen zu einer Veränderung der Selbsterneuerungsfähigkeit und so zu einer direkten Induktion der Bildung, Reifung und Proliferation abnormaler hämatopoetischer Vorläuferzellen mit einer abnorm schnellen Teilungsrate mit der Ausbildung eines leukämischen Zellklons.[109] Ähnlich wie das AML1- Gen kann sein heterodimerer Partner, das CBF β - Gen, Ziel chromosomaler Veränderungen sein. So fusioniert es mit dem *smooth muscle myosin heavy chain* Gen, MYH11, durch inv (16) oder t(16;16), was ebenfalls zu einer direkten Unterdrückung der AML1 vermittelten Transkriptionsaktivierung führt.[110, 111] Dies könnte dafür sprechen, dass also beide Untereinheiten des CBF Heterodimeres direkt in die Pathogenese akuter Leukämien involviert sein können.[112] Alle bisherigen über AML1 erhobenen Daten – v.a. über die Beteiligung an den Translokationen AML1- ETO und TEL- AML1 erwecken den Eindruck, dass die Veränderungen der Transkriptionskaskade, die durch AML1 vermittelt werden, die häufigsten Mechanismen im Transformationsprozess humaner Leukämien sind.[55, 104, 113]

1.3.3 *TEL- AML1*- Fusionstranskript

Die Genfusion von *TEL* und *AML1* ist die bisher am häufigsten beschriebene reziproke chromosomale Rekombination bei Leukämien im Kindesalter. ROMANA et al. zeigten als erste, dass *TEL- AML1* mit einer Häufigkeit von 23% die häufigste genetische Rekombination bei Ersterkrankungen einer B- Vorläuferzell- ALL bei Kindern ist.[55] Viele folgende Untersuchungen zur Prävalenz dieser Translokation bestätigten eine Häufigkeit zwischen 20 und 28% bei ALL- Ersterkrankungen.[113, 114, 115, 116, 117] Das Fusionstranskript wird auch in ALL- Fällen Erwachsener hingegen nur mit einer Frequenz bis 3,4% festgestellt und dies auch nur bei Erwachsenen unter einem Alter von 28 Jahren.[118, 119] *TEL- AML1* wird selten in ALL- Fällen des Säuglingsalters gefunden und ebenfalls selten bei Menschen, bei denen sich eine Trisomie des Chromosoms 21 nachweisen lässt. GOLUB et al. konnten 1995 das erste mal mittels molekulargenetischer Untersuchungsmethoden die Fusion des Transkriptionsfaktors *TEL* mit dem Transkriptionsfaktor *AML1* beschreiben.[120] Sie zeigten damit, dass Veränderungen des *AML1*- Gens nicht nur mit myeloischen Leukämien, wie bisher bekannt, sondern auch mit lymphoblastischen assoziiert sein kann. Die Frage, warum die Fusion mit dem *TEL*- Gen nur in BVZ- ALL vorkommt, konnte bisher nicht beantwortet werden. Eine mögliche Erklärung läge in einer spezifischen Wirkung des Fusionsproteins auf die Proliferation und/ oder das Überleben von B- Vorläufer Zellen. Nachdem nicht mehr nur die zytogenetischen Nachweismethoden, mit denen *TEL- AML1* in den seltensten Fällen nachgewiesen werden kann, zur Verfügung standen, ist bis heute eine intensive Forschung über die prognostische Bedeutung von *TEL- AML1* und über die Rolle dieser Fusion in der Entwicklung maligner Erkrankungen zu verzeichnen.

1.3.3.1 *TEL- AML1*- Gen

Bei der Translokation t(12;21) fusionieren das *TEL*- Gen von Chromosom 12 und das *AML1*- Gen von Chromosom 21. Dies führt zu der Bildung zweier chimärer Gene: *TEL- AML1* und *AML1- TEL*. Nur ersteres findet sich konstant in Zellen, die diese Translokation aufweisen.[81, 113] Der Bruchpunkt von Chromosom 12 liegt im 5. Intron des *TEL*- Gens, wohingegen der Bruch von *AML1* in einem großen und bisher weitgehend unsequenzierten Bereich liegt, der die ersten zwei Introns des *AML1*- Gens umfasst.[121] Wie in anderen Fusionsgenen bei Leukämien beschrieben, ist der Bruchpunkt im Intron und die Sequenz der Fusion jeder/ s Patientin/ Patienten einmalig und kann somit als stabiler genomischer Marker eines Zellklons angesehen werden. Die Fusion der beiden Gene *TEL* und *AML1* führt normalerweise zu einer von zwei Hybrid-Fusions- mRNA, zu Typ A oder B. Bei Typ A handelt es sich um eine Fusion von *TEL* Exon 5 mit *AML1* Exon 2 und bei Typ B um eine Fusion von *TEL* Exon 5 mit *AML1* Exon 3. Zu diesen zwei am häufigsten vorliegenden *TEL- AML1* mRNA Typen existieren noch zwei weitere, Typ C und Typ D. Typ C als Fusion zwischen *TEL* Exon 5 und *AML1* Exon 2 mit Exon 3 ausgeschlossen und Typ D als Fusion aus *TEL* Exon 5 mit *AML1* Exon 4. BARTOLO et al. konnten zeigen, dass in dem von ihnen untersuchten PatientInnenkollektiv durchgehend bei allen PatientInnen diese vier Typen zusammen nachweisbar waren.[122] Deshalb scheint es wahrscheinlich, dass alle vier Fusionstranskripte in ein und demselben Translokationsbruchpunkt ihren Ursprung haben und es bei der anschließenden Translation zu alternativen Splicevarianten kommt. Typ A und B werden in einer signifikant größeren Menge gefunden. Bei MRD (*minimal residual disease detection*) Untersuchungen konnten BARTOLO et al. nach der kompletten Remission einer *TEL- AML1* positiven ALL nur noch Typ A nachweisen.

Es scheint, dass die zwei vorherrschenden *in-frame TEL- AML1*- Transkripte mit der Leukämogenese assoziiert sind.

1.3.3.2 TEL- AML1- Protein

Die chimäre *TEL- AML1*- mRNA kodiert für ein aus 796 Aminosäuren (AS) bestehendes Protein. Seine 336 AS am amino- terminalen Ende stammen von *TEL* (enthält die *helix-loop-helix*- Domäne, die für die DNA- Bindung verantwortliche ETS- Domäne geht verloren) und sind mit den Aminosäuren 21- 479 von *AML1* B (enthält die RUNT- und TAD- Domäne) fusioniert, also mit fast dem gesamten *AML1*. [120, 123] *TEL- AML1* kann Heterodimere mit dem Wildtyp *TEL* durch die HLH- Domäne bilden. BEMARDIN et al. stellten fest, dass das sonst hauptsächlich im Zytoplasma befindliche endogene *TEL* durch die Expression von *TEL- AML1* in den Kern transloziert wird und dass dies wahrscheinlich über die Interaktion von *TEL* zu *TEL- AML1* durch die HLH- Domäne geschieht. [124]

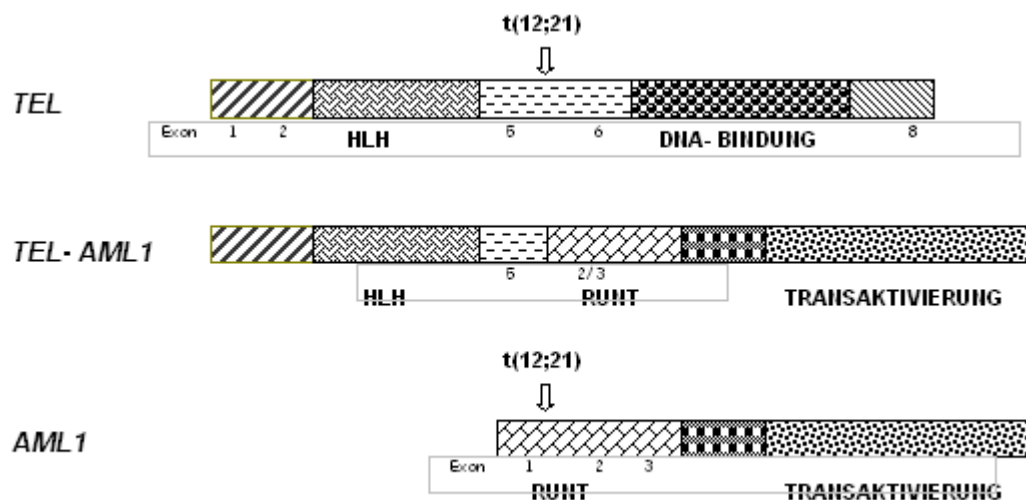


Abbildung 6: Vereinfachtes Schema von TEL, AML1 und TEL- AML1. TEL fusioniert fast mit dem gesamten AML1.

1.3.3.3 Hypothesen und bisheriges Wissen über Funktion und Einfluss von TEL- AML1 auf die Leukämogenese

Die Struktur von *TEL- AML1* lässt vermuten, dass die Fähigkeit an *AML1*- Zielsequenzen zu binden erhalten bleibt und es weiterhin zu einer Interaktion mit CBF β kommt. Ebenfalls bleibt wohl die Funktion der HLH- Domäne von *TEL* erhalten. Das *TEL- AML1* Fusionsprotein verändert die normalen Funktionen des endogenen *AML1* und *TEL* als Resultat der Fusion der unterschiedlichen funktionellen Domänen, die jetzt in einem Molekül vereinigt sind. Diese Annahme wird u.a. durch die direkte von *TEL- AML1* ausgelöste Suppression der *AML1* vermittelten Transkriptionsaktivierung bestätigt. [71, 123, 125] *AML1* entwickelt sich von einem Transkriptionsaktivator zu einem Transkriptionsrepressor. Für diese Unterdrückung der *AML1*- Funktion wird sowohl die HLH- Domäne von *TEL* als auch die DNA- bindende Domäne von *AML1* benötigt. Die Repression erfolgt nicht durch einen einfachen Wettstreit um die Bindung an das Enhancer- Kern- Motiv, vielmehr scheint es ein aktiver Prozess zu sein, der die beiden Domänen beteiligt. Wahrscheinlich wird der Mechanismus, durch den *TEL-*

AML1 zu einer Transformation führt, durch eine Unterbrechung des normalen *TEL*-Reaktionsweges durch die Heterodimerisierung mit *TEL-AML1* vermittelt. Weiterhin kann durch eine Bindung an das Enhancer- Kern- Motiv durch *TEL-AML1* die Expression der Gene verändert werden, die normalerweise der *AML1/ CBFβ*- Komplex reguliert. Wie die HLH- Domäne im einzelnen zu dieser *AML1*- Repression beiträgt, bleibt vorerst ungeklärt. Bekannt ist dagegen, dass die HLH- Domäne die Repression durch eine Protein- Protein Interaktion mit bisher nicht definierten zusätzlichen Molekülen unterstützt, die für seine biologische Aktivität vonnöten sind. Durch die dominante Unterdrückung der normalen Funktion von *AML1* in der hämatopoetischen Entwicklung trägt also *TEL-AML1* wahrscheinlich direkt zu einer hämatopoetischen Zelltransformation bei.[80, 126]

Das nicht translozierte *TEL*- Allel scheint im Transformationsprozess von Bedeutung zu sein. Interessant ist, dass es sehr häufig deletiert ist. RAYNAUD et al. beschreiben dieses Phänomen bei Ersterkrankungen in 14 von 16 untersuchten Fällen und SEEGER et al. fanden bei *TEL-AML1* positiven Rezidiven eine Deletion in 41,7% (10 von 24 PatientInnen) der Fälle im Gegensatz zu nur 13,3% (6 von 45 PatientInnen) der *TEL-AML1* negativen Fälle.[80, 126] Diverse Untersuchungen über die Deletion des zweiten *TEL*- Allels haben zu der Annahme geführt, dass die Deletion ein sekundäres Ereignis in *TEL-AML1* positiven Leukämien ist und für die Progression der Leukämie verantwortlich ist. *TEL* würde demnach die Funktion eines untypischen Tumorsuppressorgenes zukommen, dessen Verlust ein potenzierendes Ereignis darstellt, durch das erst die tatsächlichen transformierenden Eigenschaften von *TEL-AML1* zum Tragen kommen.[127] Die Wildtyp *TEL*- Funktion in Zellen mit *TEL-AML1*- Fusion mag in einer Aktivitätshemmung des Fusionsproteins liegen oder in der Funktion als Tumorsuppressor, dessen Inaktivierung es dem Fusionsprotein erlaubt, Transformationen auszulösen.[128]

Einige Einblicke in den transformierenden Prozess im Zusammenhang mit der Translokation t(12;21) liefern beispielsweise Experimente über den Einfluss von *TEL-AML1* auf den TCRβ- Enhancer. Das carboxy- terminale Ende von *AML1 B* ist normalerweise für die Transaktivierung des TCRβ- Enhancers verantwortlich, was durch die Fusion mit *TEL* verhindert wird.[129] Ein anderes Beispiel geben Untersuchungen über den Einfluss von *TEL-AML1* auf die Expression des Zytokins Interleukin- 3 (IL3). Für IL3 wurde ein inhibitorischer Einfluss auf das Zellwachstum von B- Lymphozyten bezüglich der Proliferation und des Überlebens *in vitro* beschrieben.[129] Das IL3- Gen besitzt eine *AML1* konsensusbindende Region in seinem Promotor, die Beziehung zu der Transkriptionsstartregion hat, welche für die Aktivierung von *AML1 A* oder *AML1 B* benötigt wird. Der Interleukin- 3 Promotor ist also ein potentiell relevantes Zielgen für *TEL-AML1*. UCHIDA et al. fanden durch Transfektionsversuche heraus, dass *TEL-AML1* die basale IL3- Promotor Aktivität in lymphoiden Zellen unterdrückt. Hierfür werden drei verschiedene Domänen von *TEL-AML1* benötigt: die HLH- Domäne von *TEL*, die RUNT- Domäne von *AML1* und eine 74 AS *downstream* von der RUNT- Domäne liegende Region in *AML1*. [130] Die transkriptionsaktivierende Funktion von *AML1 A* und *B* am IL3- Promotor wird durch die Fusion mit *TEL* im Sinne einer Repression der IL3- Expression verändert. Mit diesen Ergebnissen in Übereinstimmung steht, dass in *TEL-AML1* positiven Zellen keine autokrine IL3- Produktion zu finden ist.[124] Es ist jedoch bisher unklar, ob die Unterdrückung der IL3- Expression durch *TEL-AML1* in B- Zellen eine wirklich funktionelle Konsequenz haben könnte.

1.4 Translokation t(12;21) *TEL- AML1* als häufigste genetische Veränderung bei ALL im Kindesalter

Die Translokation t(12;21) (p13;q22) ist die häufigste zur Zeit bekannte prävalente strukturelle chromosomale Aberration bei akuten lymphoblastischen Leukämien im Kindesalter. Sie findet sich in jedem fünften Fall einer ALL- Ersterkrankung.

Die genaue Identifizierung von chromosomalen Veränderungen bei PatientInnen mit Leukämien gewinnt zunehmend an Bedeutung bei der Diagnosefindung und Gestaltung der Behandlung mit Hilfe von Risikostratifizierungen anhand molekulargenetischer Merkmale. In diesem Sinn wurden verschiedene Studien zu dem prognostischen Wert der *TEL- AML1*- Genfusion durchgeführt. Schon die erste Studie von SHURTLEFF et al. 1995 vermittelte den Eindruck, dass die *TEL- AML1* positiven ALL- Erkrankungen mit einer besseren Prognose assoziiert werden können. Diese PatientInnenkohorte wurde aber nicht mit einem einheitlichen Behandlungsprotokoll therapiert, und die Zahl der untersuchten PatientInnen war zu gering, um statistisch signifikante Aussagen zu treffen.[113] Sich anschließende Studien, die einheitlichere Protokolle risikoadaptierter Polychemotherapien verwendeten, konnten durchgehend zeigen, dass die *TEL- AML1*- Expression bei Ersterkrankungen einer ALL im Kindesalter mit einer sehr guten Prognose assoziiert ist.[114, 115, 117, 131] Die fünf- Jahres- Überlebenswahrscheinlichkeit lag bei etwa $90 \pm 5\%$, im Vergleich zu $65 \pm 5\%$ bei *germline* Konfiguration der für *TEL* und *AML1* kodierenden Gene.

Charakteristischerweise fanden sich bei *TEL- AML1*- Positivität fast ausschließlich ein B- Vorläuferzell Phänotyp einer ALL, ein Altersgipfel bei initialer Diagnose zwischen ein und zehn Jahren, eine initiale Leukozytenzahl von $< 50000/\mu\text{l}$ und keine hyperdiploiden Karyotypen (unter 50 Chromosomen).[37, 113, 115, 116, 117, 132, 133] All dies sind Faktoren, die für ein niedriges Risiko und eine gute Prognose sprechen. Es fand sich allerdings weiterhin ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit der Präsenz einer Koexpression eines myeloiden Antigens, was ursprünglich als ein ungünstiger prognostischer Faktor betrachtet wurde.[54, 134] Es wurde ebenfalls berichtet, dass ein *TEL*- Rearrangement an sich, nicht nur in der Beteiligung an der Fusion mit *AML1*, mit einer besseren Prognose assoziiert ist.[116] Die Frage, ob *TEL- AML1* ein eigenständiger signifikanter prognostischer Faktor ist, oder ob er nur mit anderen schon bekannten prognostischen Faktoren wie Alter und initialer Leukozytenzahl assoziiert ist, konnte sowohl für *TEL*- Rearrangements als auch für die Fusion *TEL- AML1* mittels multivarianter Analysen retrospektiv untersuchter PatientInnenkollektive, damit beantwortet werden, dass er unabhängig für eine gute Prognose steht.[135]

In der Erwartung einer sehr niedrigen Inzidenz für *TEL- AML1*- Fusionsgene, wegen der für Ersterkrankungen beschriebenen günstigen Prognose, wurden von SEEGER et al. retrospektiv PatientInnen mit ALL- Rezidiv gescreent, wobei überraschenderweise die Inzidenz mit ca. 20% etwa so hoch war wie bei der Erstdiagnose einer ALL.[136] Diese klar widersprüchlichen Ergebnisse könnten z.B. darauf hinweisen, dass die Prognose durch die verwendete initiale Therapie beeinflusst wird. Trotz der offensichtlich recht hohen *TEL- AML1*- Inzidenz im Rezidivfall einer ALL konnte gezeigt werden, dass dieses PatientInnenkollektiv sich durch eine gute mittelfristige Prognose und ein langes erkrankungsfreies Intervall auszeichnet.

2 Fragestellung und Zielsetzung

Angeregt durch diese widersprüchlichen Ergebnisse, stellt sich die Frage nach der Prävalenz und längerfristigen prognostischen Bedeutung von *TEL- AML1* bei ALL- Rezidiven. Da bisher wenig Aussagen über einen langen Beobachtungszeitraum gemacht werden können, ist es das Anliegen der vorliegenden Arbeit zur Gewinnung von Langzeitdaten retrospektiv alle zur Verfügung stehenden PatientInnenproben von ALL- Rezidiverkrankungen, die über die letzten Jahre im Rahmen der 1983 initiierten multizentrischen Therapiestudie ALL- REZ BFM (Berlin- Frankfurt- Münster) im molekulargenetischen Labor der onkologisch/ hämatologischen Abteilung der Kliniken und Polikliniken für Kinderheilkunde und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Charité Campus Virchow Klinikum der Medizinischen Fakultät der Humboldt Universität zu Berlin archiviert wurden, auf das Vorhandensein einer *TEL-* Genrekombination und deren unabhängige klinische prognostische Relevanz zu untersuchen.

Aus dem beschriebenen langen Zeitraum sind keine archivierten RNA- Proben verfügbar. Deshalb scheidet die heutzutage übliche RT- PCR zum Nachweis des Fusionstranskriptes aus. Es bleibt nur die Nachweismöglichkeit in genomischer DNA. Da die chromosomalen Bruchpunkte und damit der Fusionspunkt von *TEL- AML1*, wie beschrieben, nicht an einer definierten Stelle des Introns auftreten, stehen zum Nachweis der Genfusion entweder eine PCR- Amplifikation über die gesamte Länge des Fusionsintrons, die technisch kaum zu realisieren ist, oder die Southern Blot Analyse zur Verfügung. Hier wird die Etablierung einer nicht- radioaktiven Southern Blot Hybridisierungstechnik angestrebt.

Ziele:

- Etablierung einer nicht- radioaktiven Variante der Southern Blot Hybridisierungsanalyse für das *TEL-* Gen.
- Ermittlung der Häufigkeit von *TEL-* Genrekombinationen mittels Southern Blot Analyse bei archivierten KM- Proben von Kindern mit dem ersten ALL- Rezidiv.
- Gewinnung von Langzeitdaten im Rahmen der Diskussion über die langfristige Prognose von Kindern mit Rezidiv einer *TEL- AML1* positiven ALL.
- Korrelation molekulargenetischer und klinischer Daten in der Absicht prognostische Aussagen zu treffen.
- Ermittlung der Koinzidenz der genetischen Veränderungen im *TEL-* Genlokus und der bekannten Risikofaktoren der ALL- Rezidive, Zeitpunkt, Lokalisation und Immunphänotyp.
- Ermittlung der Koinzidenz der genetischen Aberrationen und dem Erreichen einer Remission.
- Bestimmung des Einflusses der genotypischen Aberrationen auf die ereignisfreie Überlebenswahrscheinlichkeit

3 Material und Methoden

3.1 PatientInnenkollektiv

Es wurden 122 PatientInnen, die zwischen 1982 und 1995 an einem Rezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie erkrankten, in die Studie aufgenommen. Die DNA der Leukämiezellen (vorrangig durch Knochenmarkpunktion gewonnen) wurde zum Nachweis einer Rekombination des *TEL*- Gens untersucht. Ebenfalls untersucht wurden DNA- Proben von Ersterkrankungen, die hauptsächlich von PatientInnen, die in der pädiatrischen Hämatologie/ Onkologie der Charité Campus Virchow Klinikum und in der Kinderklinik des Klinikum Berlin Buch behandelt wurden, stammten. Die Proben der RezidivpatientInnen rekrutierten sich aus dem Material, das die an der multizentrischen Therapiestudie für ALL- Rezidive bei Kindern (ALL- REZ BFM) beteiligten Kliniken dem Labor der pädiatrischen Hämatologie/ Onkologie der Charité Campus Virchow Klinikum zuschickten.

Es wurden archivierte Nylonmembranen sowohl von Ersterkrankungen, als auch von Rezidiven vieler PatientInnen untersucht, die in der Routine des molekulargenetischen Labors für Southern Blot Hybridisierungen bis 1995 hergestellt wurden. Des weiteren wurden archivierte kryokonservierte DNA- Proben einer Southern Blot Analyse unterzogen, wenn keine archivierten Membranen vorlagen oder deren durch die Lagerung bedingter Zustand eine Rehybridisierung nicht mehr erlaubte. Es wurde ausschließlich Material vom Zeitpunkt der Diagnose berücksichtigt.

3.2 Molekularbiologische Arbeitstechniken

3.2.1 DNA- Isolierung

Die DNA- Isolierung der frisch aufgearbeiteten positiven und negativen Kontrollproben erfolgte nach der Methode der Firma Gentra Systems mit dem Puregene® DNA Isolation Kit. DNA- Proben ab 1993 wurden über „Qiagensäulen“ der Firma QIAGEN gewonnen und die davor datierten DNA- Proben mittels der „Phenolchloroformmethode“, die hier beispielhaft für die Technik der DNA- Isolierung ausführlicher beschrieben werden soll.

Um die Erythrozyten selektiv zu lysieren wird Knochenmark mit dem 3- fachen Volumen Erythrozytenlysepuffer vermischt. Die Leukozyten werden nach der vollständigen Erythrozytenlyse 30 Minuten bei $g = 265$ (1200rpm) zentrifugiert. Das sedimentierte Leukozytenpellet wird in TEN- Puffer resuspendiert. Anschließend wird die Probe mit Proteinase K und 1/10 Vol 20% SDS versetzt und unter Bewegung bei 37°C für ca. 12 Stunden inkubiert. Die so durch die Auflösung der Kern- und Zellmembranen der Leukozyten freigesetzte DNA wird danach von den Zellproteinen durch Extraktion mit 1/2 Vol Phenol und 1/2 Vol Chloroform/ Isoamylalkohol für zehn Minuten gereinigt. Der durch die darauffolgende Zentrifugation (15 Minuten bei 5000rpm) sich bildende Überstand wird in ein neues Gefäß dekantiert und dieser Vorgang mehrmals wiederholt bis die Interphase keine Proteine mehr enthält. In der Probe verbleibende Reste von Phenol werden durch Extraktion mit 1/2 Vol Chloroform/Isoamylalkohol entfernt. Die Präzipitation der DNA erfolgt durch die Zugabe von 3 Vol absolutem Ethanol und 1/10 Vol 2M Natriumacetat. Anschließend folgt ein Waschgang mit 70%igem Ethanol. Mit unterschiedlicher Menge an Tris- Puffer wird die gewonnene DNA abschließend, je nach gewünschter Konzentration der Probe, gelöst. Die letztendliche Konzentration der DNA wird mittels UV- Spektrophotometer bestimmt indem eine Verdünnung der

jeweiligen DNA- Lösung in Aqua dest. hergestellt und die Absorption bei 260 nm (A_{260}) und 280°nm (A_{280}) gemessen wird.

3.2.2 Gewinnung der Plasmid- DNA von *TEL*

3.2.2.1 Beschreibung des Prinzips der Einklonierung von Genabschnitten

Plasmide sind extrachromosomal vorkommende, ringförmige DNA- Moleküle. Das Einklonieren eines PCR- Produktes in einen vorgegebenen Klonierungsvektor (Insertion) – im vorliegenden Fall *pCR 2,1- TA Cloning Vector* - und das anschließende Einbringen dieses Plasmids in das Zytoplasma kompetenter *E.coli*- Stämme (Transfektion) ermöglicht die Vermehrung der Zielsequenz. Es erfolgt eine zweifache Selektion der Bakterienkolonien. Der Klonierungsvektor enthält die Gensequenz für Antibiotikaresistenz gegen Ampicillin und Kanamycin. Die Agarmedien für die Bakterienkolonien enthalten eines dieser beiden Antibiotika. Somit können sich nur diejenigen *E.coli*- Stämme, die das Plasmid enthalten und damit antibiotikaresistent sind, vermehren. Um Bakterienkolonien zu unterscheiden, die einen leeren Vektor oder einen mit dem zu klonierenden DNA- Produkt enthalten, enthält der Vektor die genetische Information der ersten 146 Aminosäuren des β - Galaktosidasgens. In dieser Sequenz liegt die Insertionsstelle für das zu klonierende DNA- Produkt (*multiple cloning site*). Solche Vektoren werden für Wirtszellen benutzt, welche für das carboxy-terminale Ende der β - Galaktosidase kodieren. In einem Prozess, der als α -Komplementierung bezeichnet wird, ergeben die Proteinfragmente des β -Galaktosidasgens sowie die der Wirtszelle ein enzymatisch aktives Enzym, welches in Anwesenheit von 5- bromo- 4- chloro- 3- indolyl- β - D- Galaktosidase zur Blaufärbung der Bakterienkolonien führt. Kommt es zu einer Insertion des zu klonierenden DNA- Produktes, so verhindert diese die α - Komplimentierung und die Bakterienkolonien erscheinen weiß.

3.2.2.2 Durchführung der Klonierung

Mit Hilfe des TOPO™ TA Cloning® Kits können cDNA- Fragmente innerhalb weniger Minuten in den Klonierungsvektor inseriert werden. Die Ligation zwischen dem Vektor und dem Insert wird durch die Transferase- Aktivität der Taq- Polymerase vermittelt. Sie fügt an das 3'- Ende des synthetisierten PCR- Produkts ein einzelnes Desoxyadenosin (A) an, welches dann kovalent mit dem am 3'- Ende des linearisierten Vektors befindlichen Desoxythymidin (T)- Restes bindet. Der verwendete *pCR 2,1- TA Cloning Vector* besitzt eine *ColE1 origin* zur Replikation von *E. coli*, einen versatilen Polylinker, Gene für die Ampicillin- und Kanamycin- Resistenz und ein *lacZ*- alpha- Komplement zur blau- weiß- Selektion der Transformanten. Die bakterielle Expression des *lacZ*- alpha- Fragmentes zur alpha- Komplementierung wird durch den *lac*- Promotor reguliert. Nachdem die Ligation des PCR- Produktes in den Vector in einem ersten Schritt durch die Integration in seinen versatilen Polylinker erfolgt, findet die Transformation von *E. coli* und die Selektion der transformierten Zellen auf LB- Agaroseplatten, die zuvor mit Ampicillin versetzt wurden, statt. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach pickt man 10 weiße Kolonien und kultiviert wiederum über Nacht. Um zu überprüfen, ob es zur Transfektion gekommen ist, schließt sich eine Kontroll- PCR an.

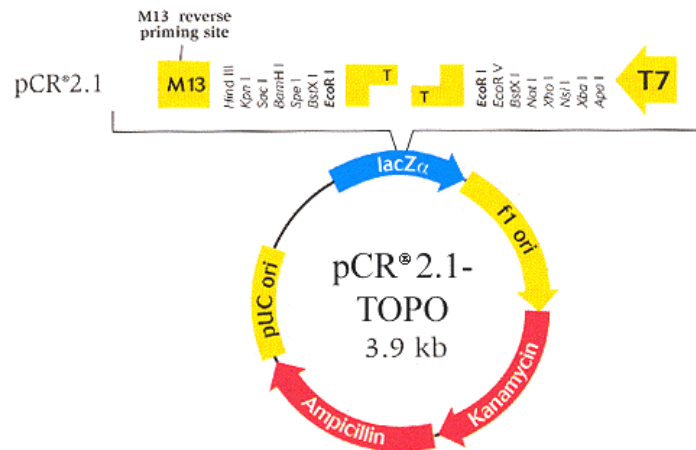


Abbildung 7: Vektorskizze.

3.2.2.3 Aufreinigung der Plasmid- DNA

Die Plasmid- DNA wird aus dem Zytoplasma, der in der Kontroll- PCR positiven Bakterienstämme, gewonnen. Dies geschieht mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit Protokolls.

3.2.2.4 Ausschneiden der klonierten TEL- Sequenz/ Aufreinigung der Template- DNA

Um die Spezifität des Verfahrens zu erhöhen, muss für die Digoxigenin- Markierung bei der Inkorporierung von Digoxigenin- 11- dUTP während der PCR eine möglichst reine Template- DNA eingesetzt werden, da verbleibende Vektorsequenzen (Plasmid) in der Ausgangs- DNA für die Sondenherstellung zu unspezifischen Hybridisierungssignalen führen können. Dafür wird das zuvor einklonierte *TEL*- Gen (Nukleotide 2→1387) aus dem Plasmid möglichst nah an den Primerbindungssequenzen mit dem Restriktionsenzym *EcoRI*, welches seine Schnittstellen direkt beiderseits der Topo-Cloning Region aufweist und auch keine Schnittstelle innerhalb des *TEL*- Gens hat, ausgeschnitten.

Tabelle 3: Herkunft und Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *EcoRI*.

EcoRI (*Escherichia coli* RY 13):

$$5' - G \downarrow AATTC - 3'$$

$$3' - CTTAA \uparrow G - 5'$$

Nach dem Verdau wird die Probe über ein Agarosegel aufgetrennt, die sichtbare Bande ausgeschnitten und über den QIAquick Gel Extraction Kit aufgereinigt.

3.2.3 Beschreibung der Digoxigenin- markierten TEL- Sonde

Die *TEL*- Sonde entspricht der *TEL*- cDNA von Nukleotid 487 bis 1072 (Exon 5 und 6). Sie hat eine Länge von 585bp. In diesem Abschnitt liegt keine Schnittstelle von *BamHI*. Es ist eine doppelsträngige DNA- Sonde, die mit 11- dUTP- Digoxigeninmarkiert ist. Das Nachweisprinzip wird im Zusammenhang mit der Southern Blot Untersuchung beschrieben.

3.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung der nicht- radioaktiv- markierten TEL- Sonde

3.2.4.1 Beschreibung des Verfahrens der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mittels der PCR - einer *in vitro* Nukleinsäuresynthese, die im Prinzip eine Nachahmung der *in vivo* DNA- Replikation darstellt - kann spezifisch der Abschnitt des *TEL*- Gens der cDNA auf ein Vielfaches amplifiziert und gleichzeitig nicht- radioaktiv markiert werden. Folgende Komponenten sind für die Amplifikation von DNA in der Polymerasekettenreaktion nötig: DNA, DNA- Polymerase, Primer (Oligonukleotide mit 15-30 Basen, die komplementär zu den Enden der definierten DNA- Sequenz sind, die amplifiziert werden soll) und ein Gemisch von dNTPs (Desoxyribonucleotidtriphosphate als Bausteine der zu synthetisierenden DNA), in dem 11- dUTP- Digoxigenin im Austausch zu TTP enthalten ist. Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion ist eine vielfache Hintereinanderreihung dreier Reaktionen, die sich nur in ihrer Inkubationstemperatur unterscheiden. Im ersten Schritt wird die DNA denaturiert, so dass Einzelstränge vorliegen. Beim zweiten Schritt - auch Annealing genannt - lagern sich zugegebene Oligonukleotide (Primer) an die komplementären DNA- Sequenzen. Der dritte und letzte Schritt im Zyklus der PCR ist die Synthese eines komplementären DNA- Stranges durch die DNA- Polymerase. Das Enzym synthetisiert vom 3'-Ende der angelagerten Primer ausgehend einen zur Ursprungs- DNA komplementären DNA- Strang. In jedem weiteren Zyklus dienen die an der Ursprungs- DNA synthetisierten DNA- Stränge wiederum als Matrize zur weiteren Amplifikation von DNA durch die Polymerase. So kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung des zwischen den Primern gelegenen DNA- Abschnittes. Durch die Verwendung der hitzestabilen Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* ist die Automatisierung der Temperaturzyklen möglich, da nicht bei jeder Hitzedenaturierung der DNA das Enzym zerstört wird und anschließend neu hinzugefügt werden muss.

3.2.4.2 Bedingungen für die Durchführung der externen und internen PCR

Um ein möglichst reines Ausgangsprodukt für die Hybridisierungssonde und damit eine erhöhte Spezifität und Effektivität zu erlangen, wird eine PCR in zwei aufeinanderfolgenden Schritten durchgeführt (sogenannte nested- PCR). Im ersten PCR- Ansatz (externe PCR) wird das durch die Plasmidaufreinigung erhaltene Produkt – *TEL* Nukleotid 2 bis 1374 - in einer Verdünnung mit Aqua dest. von 1:2000 für die Sondenherstellung eingesetzt. Um die unspezifische Hybridisierung durch verschiedene PCR- Nebenprodukte ferner zu vermeiden, wird das Produkt der externen PCR wiederum erst nach einer 1:10000 Verdünnung in den zweiten Ansatz (interne PCR) eingesetzt, welche nur für Exon 5 und 6 des *TEL*- Gens von den Nukleotiden 487 bis 1072 amplifiziert. Dabei erfolgt die Digoxigenin- Markierung. In dem Schritt der internen PCR wird Digoxigenin- 11- dUTP im Austausch zu TTP in einem Verhältnis von 1:19 inkorporiert. Ein *detection assay* wird direkt an die PCR angeschlossen, um die *labeling*- Effizienz in der PCR zu überprüfen und damit die spätere Hybridisierungssensitivität abschätzen zu können. Die aufgeführte Tabelle Nr. 4 stellt einen Reaktionsansatz von 50µl der externen PCR dar und listet die einzelnen Reaktionsschritte mit Temperatur und Dauer auf.

Tabelle 4: Externe PCR – Reagenzien auf 50µl und Amplifikationsbedingungen.

Menge	Reagenzien	Schritte	Temperatur in °C	Zeit in min
1,3µl	<i>Upstream</i> - Primer TEL 2	initiale Denaturierung	94	10,00
1,3µl	<i>Downstream</i> - Primer TEL 1374	annealing	58	0,45
5µl	dNTP- Mix (2mM)	elongation	72	1,30
5µl	PCR- Puffer	Denaturierung	94	0,30
0,2µl	AmpliTaq Gold® DNA- Polymerase (5U/µl)	Wiederholung 35 Zyklen		
1µl	Plasmid- cDNA (1:2000 verdünnt)	annealing	58	0,45
37µl	H2O dest.	elongation	72	1,30
		Denaturierung	94	0,30
		anschließend		
		annealing	58	0,30
		final elongation	72	7,00
			14	'for ever'

Die aufgeführte Tabelle Nr. 5 stellt einen Reaktionsansatz von 50µl der internen PCR dar und listet die einzelnen Reaktionsschritte mit Temperatur und Dauer auf.

Tabelle 5: Interne PCR – Reagenzien auf 50µl und Amplifikationsbedingungen.

Menge	Reagenzien	Schritte	Temperatur in °C	Zeit in min
1,3µl	<i>Upstream</i> - Primer TEL 487	initiale Denaturierung	94	10,00
1,3µl	<i>Downstream</i> - Primer TEL 1072	annealing	63	0,45
2,5µl	dNTP- Mix (2mM)	elongation	72	1,30
2,5µl	DIG-DNA-Labeling-Mix (mit Dig-11-dUTP)	Denaturierung	94	0,30
5µl	PCR- Puffer	Wiederholung 35 Zyklen		
0,2µl	AmpliTaq Gold® DNA- Polymerase (5U/µl)	annealing	63	0,45
1µl	Reaktionsprodukt externe PCR (1:10000)	elongation	72	1,30
37µl	H2O dest.	Denaturierung	94	0,30
		anschließend		
		annealing	58	0,30
		final elongation	72	7,00
			14	'for ever'

3.2.4.3 RT - Reverse Transkription

Um zur RNA komplementäre DNA (cDNA) zu gewinnen, die dann in die PCR eingesetzt werden kann, wurde die RNA dem im folgenden angeführten Reaktionsansatz der reversen Transkription unterzogen.

Tabelle 6: RT- PCR – Reagenzien eines Reaktionsansatzes von 20µl und Amplifikationsbedingungen.

Menge	Reagenzien
2µl	Hexanukleotide (50M)
1µl	DTT (100mM)
5µl	dNTP- Mix (2mM)
4µl	First Strand Buffer (5x conc.)
1µl	RNA
2µl	SuperScript IITM H- Reverse- Transkriptase (200U/µl)
20µl	H2O dest.
Reaktionsbedingungen	45 min 37°C 5 min 94°C

3.2.5 Agarosegelelektrophorese zur Darstellung der PCR- Produkte

Die Produkte aus der Sonden- PCR wurden mit 1/3 Volumen eines Gelladepuffers (Orange G) versetzt und in die Slots eines Agarosegels einpipettiert. Parallel dazu wurde ein DNA- Längenstandard aufgetragen (BIO- RAD, Precision Molecular Mass Standard), der die Größenordnung der im Gel aufgetrennten DNA- Fragmente erlaubte. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung mittels des Molecular Analyst® (BIO- RAD). Bei der Agarosegelelektrophorese wandern DNA- Moleküle entsprechend ihrer Größe und Ladung in einem konstanten elektrischen Feld. Die Auftrennung erfolgt in einem 3%igen mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel bei 120 Volt über einen Zeitraum von ca. 30 Minuten. Durch den Zusatz von Ethidiumbromid werden die im Agarosegel aufgetrennten DNA- Fragmente auf dem UV- Transilluminator anschließend sichtbar. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgt mit einer Polaroidkamera.

3.2.6 Dot Blot Analyse

Um die Sensitivität der hergestellten Sonde festzustellen, wurde eine Hybridisierungsanalyse der in der PCR hergestellten DIG- 11- dUTP markierten doppelsträngige cDNA- Sonde mittels einer Dot Blot Reaktion durchgeführt. Die Sonde hybridisiert zum *sense* und *antisense* Zielgen- Strang. Der erste Schritt bestand in der Prähybridisierung einer Verdünnungsreihe von TEL 487-1250 haltiger cDNA (10pg bis 0,01pg) auf einer Nylonmembran für 2 Stunden. Danach wurde mit der Zugabe der markierten DNA bei 65°C über Nacht hybridisiert. Anschließend wurde in zwei Waschgängen die unspezifisch gebundene DIG- 11- dUTP markierte DNA- Sonde beseitigt.

Waschschritte:

2 x mit „2 x Washing Solution“ (2 x SSC/ 0,1% SDS) für je 5 min bei Raumtemperatur

2 x mit „0,5 x Washing Solution“ (0,5 x SSC/ 0,1% SDS) für je 15 min bei 65°C

Es folgte die Detektion durch Chemolumineszenz wie sie im Abschnitt der Southern Blot Darstellung ausführlich beschrieben ist.

3.2.7 Positiv- Kontrolle: Zelllinie REH

Um eine *TEL*- Genrekombination in der Southern Blot Analyse richtig beurteilen zu können, ist es nötig jeweils einen negativen und einen positiven Standard mit zu hybridisieren. Als negatives Kontrollmaterial wurde DNA aus Leukozyten gesunder SpenderInnen eingesetzt, und als *TEL- AML1* positives Kontrollmaterial wurde DNA der Zelllinie REH der humanen prä- B- Zell- ALL, deren nicht transloziertes *TEL*- Allel deletiert ist, zur Hybridisierung verwendet.

3.2.7.1 Kultivierung der Zelllinie

Bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂ Gehalt von 5% wurden die Zellen der REH- Zelllinie im RPMI 1640 Medium mit folgenden Zusätzen kultiviert:

10% FCS

20 mM HEPES

2 mM Glutamin

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

3.2.8 DNA- Restriktion

Zur Southern Blot Analyse wird die DNA als erstes durch eine Restriktionsendonuklease in handhabbare Fragmente geschnitten. Um Genveränderungen beurteilen zu können, dürfen keine Schnittpunkte im gewünschten Genabschnitt sein. Durch Verdau und Auftrennung der Fragmente über ein Agarosegel entsteht ein Schmier von Fragmenten (*Restriction Smear*).

Die DNA wurde dementsprechend mit der Restriktionsendonuklease BamHI geschnitten. 10µg DNA wurden mit bis zu 120 Units/µl des Restriktionsenzym in geeigneten Restriktionspuffern inkubiert.

Tabelle 7: Herkunft und Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease BamHI.

BamHI (Bacillus amyloliquifaciens H)	5'- G↓GATCC- 3'
	3'-CCTAG↑G- 5'

Zur Überprüfung des Verdauens wurde die geschnittene PatientInnen DNA mit einem Gelladepuffer versetzt und in ein 0,6%iges mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel pipettiert. Die Auftrennung erfolgte über 2,5 Stunden bei 70 Volt. Bei unvollständigem Verdau wurde unter Zusatz von BamHI für weitere ca. 6 Stunden inkubiert.

3.2.9 Gelelektrophorese der geschnittenen DNA

Nach dem vollständigen Verdau wurde die geschnittene PatientInnen DNA mit ½ Volumen eines Gelladepuffers versetzt und in ein 0,6%iges mit Ethidiumbromid versetztes Agarosegel pipettiert. Zur Bestimmung der *germline*- DNA- Konfiguration wurde parallel eine verdaute Buffy Coat- Probe aufgetragen und als Positivkontrolle, Zellen der REH- Zelllinie. Zusätzlich wurde ein DNA- Längenstandard (λ - DNA/ HindIII) aufgetragen, der die Größenordnung der aufgetrennten DNA- Fragmente erlaubte. Die Auftrennung erfolgte über Nacht bei 4°C und 40 Volt. Die Dokumentation der DNA Restriktionsmuster erfolgte auf dem UV- Transilluminator bei 254nm mittels einer

Polaroidkamera.

3.2.10 Southern Blot

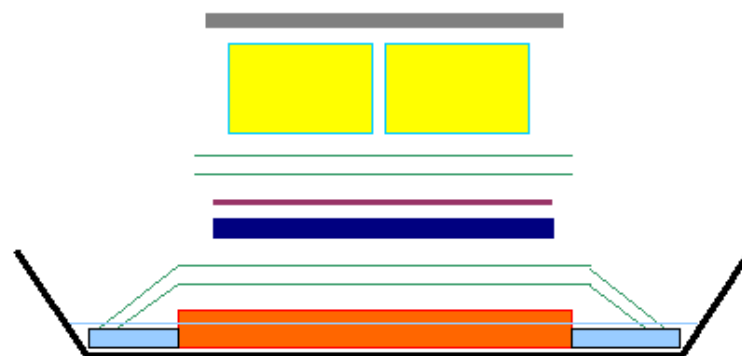
3.2.10.1 *Beschreibung des Versuchsaufbaus*

Entsprechend der 1975 von Southern beschriebenen Methode ist es möglich über eine spezifische Sonde, im vorliegenden Fall die Digoxigenin- markierte *TEL*- Sonde, eine korrespondierende Gen- Sequenz zu finden.[137] Die Darstellung der Fragmente ist aber nicht direkt auf dem Agarosegel möglich. Es ist vielmehr ein Medium nötig, auf dem die Hybridisierungsreaktion stattfinden kann. Deshalb wird die doppelsträngige DNA, nachdem sie über das Gel aufgetrennt worden ist, anschließend für 30 Minuten in 0,25 M HCl bei Raumtemperatur depuriniert, 30 Minuten in einer 0,5M NaOH- Lösung denaturiert und anschließend für wiederum 30 Minuten in einer 1,5 M NaCl- Lösung neutralisiert, um die dadurch vorliegenden einzelsträngigen Fragmente vom Gel auf eine Nylonmembran transferieren zu können. Das Gel wird auf ein Filterpapier (Whatmann 3MM Papier), das durch hochkonzentrierte Salzlösung (20 x SSC) getränkt wird, gelegt. Auf das Gel wird anschließend die Nylonmembran (bei den neu hergestellten Membranen handelte es sich um positiv geladene Nylonmembranen) und darüber saugfähiges trockenes Papier gelegt und das Ganze mit etwas Druck beschwert. Die Salzlösung wird durch das trockene Papier angezogen. Dabei gelangt sie erst durch das Gel und dann an die Nylonmembran. Die DNA steigt mit der Salzlösung auf, wird aber durch die Nylonmembran aufgehalten und bleibt so in der gleichen Konfiguration wie sie im Gel bestand an der Membran haften. Die Bindung der DNA durch die Nylonmembran hängt u.a. vom quantitativen Salzgehalt der Transportlösung ab. Der Transfer der DNA auf die Nylonmembran wurde entsprechend dem Aufbau von Southern durchgeführt (siehe Abbildung Nr. 8). Nach einer Transferzeit von maximal 24 Stunden wurde die DNA durch 15- minütiges Trocknen bei 80°C und anschließendem Auto- Crosslinken (Stratolinker von Stratagene) von beiden Seiten kovalent an die Membran gebunden und danach kurz in 2 x SSC gewaschen. Die so an der Nylonmembran fixierte und immobilisierte DNA kann nun mit einer spezifischen, im vorliegenden Fall mit einer nicht- radioaktiven, Sonde hybridisiert werden. Nur die Fragmente, die komplementär zu einer genauen Sonde sind, werden mit ihr hybridisieren. In der vorliegenden Arbeit wurde die Sonde über Antikörperbindung und Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Jede komplementäre Sequenz erscheint mit einer markierten Bande an der bestimmten Position der Größe des jeweiligen DNA- Fragmentes. Die Trennmuster der DNA- Fragmente im Gel bleiben erhalten, so dass der Filter eine exakte Replik des ursprünglichen Gels darstellt.



☆

Aufbau des Southern Transfers:



- Glasplatte
- Papiertücher
- Whatman 3MM Papier
- Nylonmembran
- Agarosegel mit Slotöffnung nach unten zeigend
- 20 x SSC - Puffer

Abbildung 8: Veranschaulichung der Southern Blot Analyse.

3.2.10.2 Hybridisierung mit der Digoxigenin- markierten Sonde

Der wie beschrieben vorbereitete Filter wird anschließend bei 38°C für 4 Stunden mit der DNA- Seite nach innen zeigend in einem Hybridisierungsgefäß prähybridisiert, wobei der hohe Salzgehalt aus der Membran gewaschen wird, der von dem Southern Blot Prozess noch übrig ist und die unspezifischen Bindungen werden mittels *Salmon sperm*- DNA abgesättigt. Anschließend erfolgt eine Hybridisierung mit der bei 95°C denaturierten markierten Sonde für mindestens acht Stunden bei 41°C. Die formamidhaltige Hybridisierungslösung wird dekantiert und die unspezifisch gebundene Sonde durch folgende Waschvorgänge entfernt:

3 x mit „2 x *Washing Solution*“ (2 x SSC/ 0,1% SDS) für je 5 min bei RT

3 x mit „0,5 x *Washing Solution*“ (0,5 x SSC/ 0,5% SDS) für je 15 min bei 65°C

Für die nicht- radioaktive Darstellung durch Chemolumineszenz erfolgen anschließend weitere Wasch- und Blockschritte für die spezifische Antikörperbindung nach einer verifizierten Methode der *Non- Radioactiv Digoxigenin Chemiluminescent Detection* von Roche Diagnostics/ Boehringer Mannheim, auf die im folgenden näher eingegangen wird.

Die Abbildung Nr. 9 stellt schematisch das Prinzip der *Chemiluminescent Detection* (Chemolumineszenz Reaktion) mit Digoxigenin (DIG), der anti- Digoxigenin Alkalischen Phosphatase (anti- DIG- AP) als gebundenes anti- DIG- Antikörperkonjugat und CDP- StarTM dar.

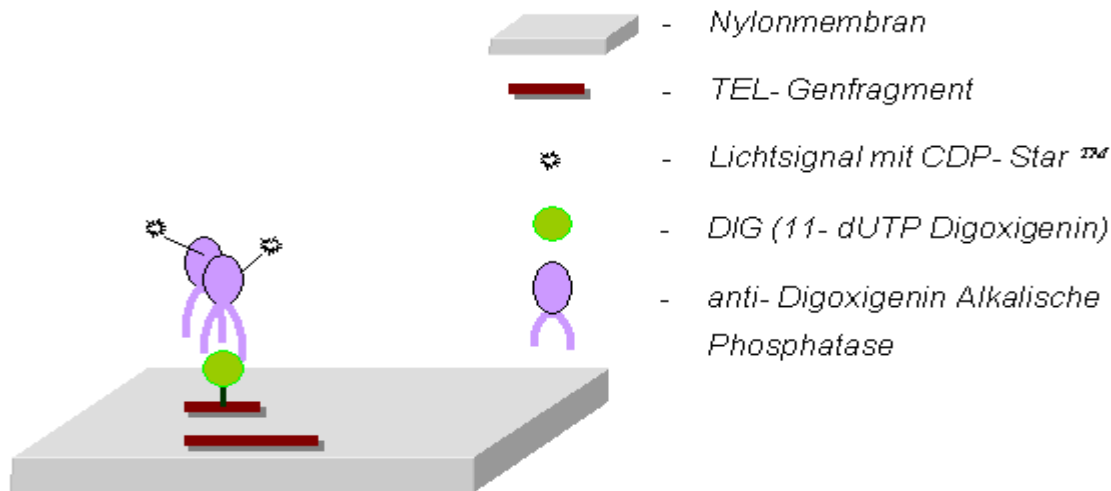


Abbildung 9: Prinzip der 11- UTP- Digoxigenin Chemolumineszenz Markierung.

Der Filter wird nach den sich direkt an die Hybridisierung anschließenden Waschschritten für eine Minute in *Washing Buffer* equilibriert. Anschließend wird der Filter für circa eine Stunde mit einer *Blocking Solution* bei Raumtemperatur behandelt, um unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Membran zu verhindern. Danach wird die Membran in einer 1:10000 *Blocking Solution* enthaltenden Verdünnung des Anti- Digoxigenins, Fab- fragments, welches mit Alkalischer Phosphatase konjugiert ist, für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung mit dem Antikörper wird verworfen und es folgen zwei Waschschriffe für jeweils 15 Minuten mit dem *Washing Buffer* bevor der Filter für drei Minuten in einem *Detection Buffer* equilibriert wird. Bis das Chemolumineszenzsubstrat hinzugegeben wird, muss der Filter feucht bleiben und wird deshalb zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt. Solange der Filter feucht bleibt, kann das Chemolumineszenzsubstrat CDP- StarTM in einer Konzentration von 1µl:1000µl *Detection Buffer* appliziert werden. Die Darstellung erfolgt durch die Belichtung von Röntgenfilmen in Röntgenkassetten. Je nachdem, ob es sich um eine Rehybridisierung alter Filter handelte oder um eine erstmalige Hybridisierung, betrug die Dauer der Exposition zwischen zehn Minuten bis maximal sechs Stunden. Zur Entfernung der hybridisierten *TEL*- Sonde wurden die Nylonfilter mit kochender 0,1 x *SSC* Lösung inkubiert und bis zur Abkühlung auf Raumtemperatur gewaschen. Dies ermöglicht konsequente Hybridisierungen der Nylonmembran.

3.2.11 Überprüfung der Southern Blot Ergebnisse mittels der PCR

Um die durch die Southern Blot Analyse erhaltenen Ergebnisse mit einer weiteren Methode zu überprüfen, wurden mit der bereits für den Routinenachweis der

Translokation t(12;21) im molekulargenetischen Labor der pädiatrischen Hämatologie/ Onkologie der Charité Campus Virchow Klinikum zur Verfügung stehenden *nested-PCR* 30 RNA PatientInnenproben untersucht.

3.2.11.1 nested- PCR

Das Prinzip entspricht methodisch dem in Abschnitt 3.2.4. zur *TEL*- Sondenherstellung bereits dargestellten. Im ersten (externen) PCR- Ansatz wurden die Primer *TEL_{ext.}* und *AML_{ext.}* verwendet und als Primer für die ABL- Kontrolle up ABL und *ABL_{ext.}*. Im zweiten (internen) PCR- Ansatz wurden die Primer *TEL_{int.}* und *AML_{int.}* verwendet und als Primer für die ABL- Kontrolle up *ABL_{int.}* und *ABL_{int.}*.

Tabelle 8: Externe PCR – Reagenzien. Interne PCR – Reagenzien.

Menge	Reagenzien	Menge	Reagenzien
xµl	Primer <i>TEL_{ext.}</i> und <i>AML_{ext.}</i> (je 5pmol)	xµl	Primer <i>TEL_{int.}</i> und <i>AML_{int.}</i> (je 10pmol)
xµl	Primer up ABL und <i>ABL_{ext.}</i> (je 2,5pmol)	xµl	Primer up <i>ABL_{int.}</i> und <i>ABL_{int.}</i> (je 2,5pmol)
3µl	dNTP Mix (2mM)	3µl	dNTP Mix (2 mM)
3µl	PCR- Puffer	3µl	PCR- Puffer
0,1µl	AmpliTaQ® DNA- Polymerase (5U/µl)	0,1µl	AmpliTaQ® DNA- Polymerase (5U/µl)
30µl	H2O dest.	30µl	H2O dest.
0,1µl	cDNA	0,1µl	PCR- Produkt (1:100 verdünnt)

Tabelle 9: Amplifikationsbedingungen für externe und interne PCR.

Schritte	Temperatur in °C	Zeit in Minuten
initiale Denaturierung	94	6,00
annealing	61	0,30
elongation	72	0,45
Denaturierung	94	1,00
Wiederholung Zyklus 1-5		
annealing	61	0,45
elongation	72	0,45
Denaturierung	94	1,00
annealing	61	0,45
Wiederholung Zyklus 6-29		
final elongation	72	10,00

3.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS Version 7,5.

Methoden: Life- Table- Analyse nach Kaplan Meier; Exakttest nach Fischer; Rangsummentest nach Wilcoxon; univariante Analyse

3.4 Materialien

3.4.1 Chemikalien

Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden:

- Dextran Sulfat
Biometra, Göttingen:
- Hybridisierungsnetze
Fluka Biochemika, Buchs:
- Skim Milk Powder
FMC, BioProducts, Rockland, USA:
- NuSieve GTG Agarose
- SeaKem GTG Agarose
Herbeta- Arzneimittel, Berlin:
- Ethanol 100%
Merck, Darmstadt:
- Formamid (HCONH₂)
- Natriumhydroxid (NaOH)
- Natriumthiosulfat
- 2- Propanol
NEN Life Science Products, Zaventem:
- Renaissance enhanced luminol Western Blot Chemiluminescence Reagent
Nucleon Scotlab:
- Natrium Perchlorat
Oncor Appligene, Heidelberg:
- Positive- HCD TM Nylon- Membran
Pall, Portsmouth, England:
- Biotin transfer Membran
Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden:
- Dimethyldichlorsilane Solution
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim:
- Anti- Digoxigenin- AP und DOP *fab fragments*
- CDP- Star™
- DIG DNA Labeling Mixture
- DNA Labeling and Detection kit
Serva, Feinbiochemika, Heidelberg
- Ethidiumbromid, reinst.
Sigma- Aldrich Chemie, Steinheim:
- BSA
- SDS

- Tris Base (TRIZMA®)
- Maleic Acid
Schleicher & Schüll Inc., Keene, USA:
- Sheets

3.4.2 Nukleinsäuren

Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA:

- Precision Molecular Mass Standard
Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:
- Desoxynucleoside Triphosphate Set
- DNA- Längenstandard
- λ -DNA/ HindIII Fragmente (kB: 23.1, 9.4, 6.7, 4.4, 2.3, 2.0, 0.6)
- λ -DNA/ Smal Fragmente (kB: 19.3, 12.2, 8.6, 8.2)
BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, USA:
- 1 Kb DNA Ladder
TIB Molbiol, Berlin:
- Oligonukleotide (Primer)

3.4.3 Enzyme

Amersham International, Buckinghamshire, England:

- EcoRV, SacI
Boehringer GmbH, Mannheim
- BamHI
Gibco BRL Life Technologies, Paisley, Schottland:
- Super Script Reverse Transcriptase
New England Biolabs, Schwalbach:
- Eco RI
- Hind III
Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA, USA:
- AmpliTaq® DNA- Polymerase
- Ampli Taq Gold

3.4.4 Klonierung

Invitrogen, Renfrewshire, Scotland, GB:

- TOPO™ TA Cloning® Kits
Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA:
- QIAprep Spin Miniprep Kit

3.4.5 Reinigung der PCR- Produkte

Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA:

- QIAquick Gel Extraction Kit (50)

- QIAquick PCR Purification Kit (50)

3.4.6 Kultivierung von Zelllinien

Biochrom KG, Berlin:

- RPMI 1640 Medium: Seromed®

3.4.7 Isolierung von DNA

Gentra Systems, Minneapolis, USA:

- Puregene® DNA Isolation Kit.
Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA:

- QIAquick, DNA Purification System
Phenolchloroformmethode:

- TEN- Puffer
- Proteinase K
- 20% SDS
- Phenol
- Chloroform/Isoamylalkohol
- Ethanol
- Natriumacetat
- Tris- Puffer

3.4.8 Filme

Du Pont de Nemours & Co. (Inc.), Wilmington, Delaware, USA:

- Cronex medical x- ray film
Polaroid Co., Cambridge, Mass. USA:
- Land Pack Filme Typ 667 (36DIN)

3.4.9 Puffer und Lösungen

3.4.9.1 Lösungen für die Elektrophorese

Elektrophorese- Puffer:

- 1x TAE, pH 8,0
24,2g Tris Base (TRIZMA® Base 99,9%)
5,71ml Eisessig (100%)
10 ml 0,5M EDTA
- Aqua dest. ad 5000ml
- 1x Gelladepuffer (Orange G):
20% Ficoll
10 mM Tris (pH 7,5)

1 mg/ml Orange G

- Ethidiumbromid: = 0,5 µg/ml EtBr in Aqua dest.

3.4.9.2 Standardlösungen (Southern Blot)

Depurinierungslösung.: HCl 0,2M

Denaturierungslösung.: NaOH 0,5M + NaCl 1,5M

Neutralisierungslösung.: Trisamoniummethan (C₄H₁₁NO₃) 0,5M + NaCl 3M pH 7,5

20 x SSC Stock Solution: 3M NaCl + 0,3 M NaCitrat (tri- Natriumcitrat- Dihydrat) pH 7,0
10% SDS pH 7,2

2 x SSC *Washing Solution*: 2 x SSC + 0,1% SDS

0,5 x SSC *Washing Solution*: 2 x SSC + 0,5% SDS

Hybridisierungslösung:

- 10 x Denhardts
- 10g Dextransulfat
- 0,1% SDS (10ml 10% SDS)
- 3x SSC
- 50 µg/µl Salmon-DNA
- 100 x Denhardts:2% Ficoll Typ 400
- 2% BSA
- 2% Polyvinylpyrrolidon Typ 360

3.4.9.3 Wash and Buffer Kit

Maleinsäure Puffer: 0,1M Maleinsäure und 0,15M NaCl und pH 7,5

Blocking Reagent Stock Solution

Washing Buffer: Maleinsäure Puffer + Tween20

Detection Buffer: 100mM TrisHCl und 100mM NaCl

3.4.10 RNA- Isolierung

Quiagen GmbH, Hilden:

- Rnaeasy Kit™

3.4.11 Geräte

Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA:

- Wide Mini Sub Cell (Agarosegelelektrophoresekammer)
DNA Engine™ PTC- 200 (MJ Research, Inc.) Watertown, MA, USA
- Eppendorf GmbH, Hamburg:
- Centrifuge 5415 C
Polaroid Co., Cambridge, Mass. USA:
- CU- 5 Nahaufnahme- Kamera
Biochrom KG, Berlin:

- Seromed®
Stratagene, La Jolla, CA, USA:
- Stratalinker 1800

3.4.12 Software

Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA:

- Molecular Analyst
- SPSS Version 7,5 (Windows)

4 Ergebnisse

4.1 Methodische Aspekte - Konzeption und Optimierung einer nicht-radioaktiven Southern Blot Hybridisierungsanalyse zum Nachweis von TEL- Genrekombinationen

4.1.1 Konzeption und Optimierung der Hybridisierung

4.1.1.1 Aufreinigung der Template- DNA

Bei der Herstellung der Digoxigenin- Sonde haben bei dem Versuch eine möglichst reine Template- DNA zu verwenden, spezifische Aufreinigungsversuche des herausgeschnittenen das *TEL*- Gen enthaltenden Fragmentes nach dem Schneiden mit dem Restriktionsenzym EcoRI, nicht zu besseren Hybridisierungsergebnissen geführt.

4.1.1.2 Southern Transfer, Hybridisierung und Chemolumineszenz

Vom Southern Transfer über die Hybridisierung bis zur Chemolumineszenz- Darstellung wurden alle Schritte im Hinblick auf die Sensitivitätsbeeinflussung und Bildhintergrundbildung überprüft. Die Methode des Southern Transfers, auch als *Capillary Transfer* bezeichnet, ist die sensitivste aller für den Transfer von Nukleinsäuren von Agarosegel auf Membranen zur Verfügung stehenden verschiedenen Methoden. Die Depurinierung der DNA im Agarosegel nach der Elektrophorese und vor dem Southern Transfer spielt in diesem Zusammenhang für die Sensitivität eine entscheidende Rolle. (Hierbei kommt es zu einer Fragmentierung hochmolekularer DNA, was zu einer guten Vorbereitung für einen optimalen Transfer beiträgt.) Besonders differieren kann der Zeitfaktor. Die besten Ergebnisse wurden mit einer Depurinierungsdauer von etwa 30 Minuten erzielt. Der Transfer vom Gel auf die Membran erfolgte abhängig von der Größe der DNA entweder mit 10 x SSC oder mit 20 x SSC konzentrierter Pufferlösung, wobei sich im vorliegenden Fall die Verwendung von 20 x SSC für den Transfer am günstigsten erwies. Die Membran wurde direkt an den Transfer anschließend von beiden Seiten im Stratolinker gecrosslinked, um mögliche Hintergrundprobleme bei der Darstellung auf Röntgenfilmen durch die Rückseite der Membran zu verhindern. Ein sich anschließendes sofortiges Waschen der Membran in 2 x SSC stellte sich als Hintergrund reduzierend heraus, da hiermit Verunreinigungen durch Salzprecipitate vermindert werden konnten. Der Zusatz von *Salmon sperm*- DNA in die Hybridisierungslösung erwies sich ferner in diesem Zusammenhang als effizienzfördernd. Die Verwendung der *Blocking Reagent Stock Solution* von Boehringer Mannheim beim Blocken von durch die Sonde verursachten unspezifischen Bindungen, stellte sich im Vergleich zu anderen am effektivsten für die Hintergrundreduzierung heraus. Beste Ergebnisse im Hinblick auf Schnelligkeit und Sensitivität der Darstellung der Chemolumineszenz- Reaktion wurden im Vergleich zu beispielsweise DOP *fab fragments* und NEN mit CDP- Star™ und Anti- Digoxigenin- AP erreicht.

Zur Optimierung der Auswertbarkeit wurden Vorversuche mit positiv geladenen Membranen mit für *TEL- AML1* positiven (REH- Zelllinie) und negativen (Buffy Coat) Kontrollproben durchgeführt. Eine recht lange Elektrophoreselaufzeit (circa 24 Stunden) und damit eine weite Auftrennung der größten DNA Fragmente erwies sich dabei als optimal.

Die neu hergestellten Hybridisierungsfilter mit PatientInnen- DNA konnten nach dem oben beschriebenen optimierten Versuchsaufbau ausgewertet werden. Bei der

Rehybridisierung alter Filter stellte sich allerdings die damalige standardisierte kurze Laufzeit als problematisch bei der Beurteilung der längeren DNA- Fragmente heraus. Wenn von auf rehybridisierten Filtern befindlichen PatientInnenproben noch kryokonservierte DNA Proben vorrätig und verwendbar waren, wurde eine Auftragung auf neue, positiv geladene Hybridisierungsmembranen angestrebt.

4.1.2 Auswertungskriterien/ Optionen der Beurteilung und Vergleich der DNA-Hybridisierungsergebnisse mit Ergebnissen einer RNA- basierten *nested-PCR*

Im folgenden soll auf einige Interpretationsmöglichkeiten der Hybridisierungsanalyse von *TEL*- Genrearrangements eingegangen werden.

Um die Vielfältigkeit der Rekombinationsmuster für das *TEL*- Gen bei monoklonalen Zellpopulationen einschätzen zu können, wurden von in der Laborroutine mittels PCR bereits auf das Vorliegen der *TEL- AML1*- Fusion getesteten PatientInnenproben neue Hybridisierungsfiler hergestellt und eine erneute PCR zur *TEL- AML1*- Detektion durchgeführt. Die Auswahl der über die Laborroutine befundeten PCR-PatientInnenproben erfolgte nach einem bewusst etwa gleichmäßig gehaltenen Verhältnis von für *TEL- AML1* positiven und negativen PatientInnen. Durch eine Laborassistentin wurden 30 *TEL- AML1* positive und negative Proben zur Untersuchung ausgewählt. Sowohl die Auswertung der Southern Blot Ergebnisse als auch die Auswertung der PCR erfolgte jeweils unabhängig ohne die Kenntnis des *TEL*- Status. Die Beurteilung der vergleichenden Southern Blot Analyse erfolgte ohne Kenntnis der PCR- Befunde für die jeweilige PatientInnennummer durch zwei unabhängige Personen, welche Erfahrung mit Southern Blot Verfahren hatten. Von den im Southern Blot untersuchten Proben war in 25 Fällen eine Übereinstimmung mit den PCR-Ergebnissen festzustellen. In einem Fall fand sich in der Hybridisierung eine *germline* Konfiguration im Gegensatz zum in der PCR dargestellten Rearrangement. 4 Fälle waren im Southern Blot aufgrund degenerierter DNA nicht auswertbar. Die PCR-Ergebnisse stimmten mit den jeweiligen Auswahlkriterien der Laborassistentin überein. Es war 10 mal eine Translokation im *TEL*- Genloкус durch die Hybridisierung nachweisbar und in 12 Fällen in der PCR. Eine *germline*- Konfiguration fand sich im Southern Blot in 15 und in der PCR in 18 Fällen.

Tabelle 10: Vergleich der *TEL*- Rearrangement Southern Blot Analyse Ergebnisse mit den *TEL- AML1* RNA basierten PCR- Ergebnissen.

		TEL- Rearrangement Southern Blot		
		+	-	nicht auswertbar
TEL- AML1 PCR	+	10	1	1
	-	/	15	3
	nicht auswertbar	/	/	/

Die Abbildung Nr. 10 veranschaulicht schematisch verschiedene Varianten des rearrangierten *TEL*- Genloкус in der Southern Blot Hybridisierungsanalyse mit der Digoxigenin markierten Sonde *TEL*₄₈₇. Auf die Ergebnisse der PCR wird im Abschnitt 4.1.3 näher eingegangen.

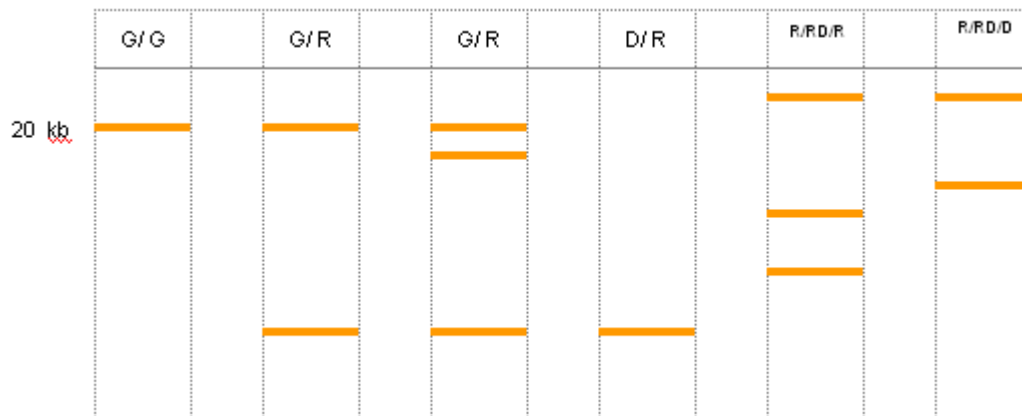


Abbildung 10: Schematisch dargestellte Ergebnisse der Southern Blot Hybridisierungsanalyse für Rearrangements des TEL- Gens. Da für jedes Gen zwei Allele vorhanden sein sollten, ergeben sich unterschiedliche Kombinationen der Konfiguration des TEL- Genlokus (G/G; G/R; R/R; R/D). (G = germline, R = Rearrangement, D = Deletion)

Bei der Untersuchung des *TEL*- Genlokus zeigten die DNA- Proben mit einer Keimbahnkonfiguration (G, *germline* Konfiguration) für *TEL* nach der Hybridisierung mit der 585 Basenpaare langen *TEL*₄₈₇ Digoxigenin markierten Sonde eine Bande bei etwa 20kb. Liegt eine lymphoblastische Zellpopulation mit einem rearrangierten *TEL*- Genlokus vor, so müssten theoretisch bei reziproker Translokation zwei Fragmente von *TEL* sichtbar werden, da der Bruchpunkt zwischen Exon 5 und 6 liegt. Dem entspräche beispielsweise die sechste der schematischen Darstellungen in Abbildung 10. Häufig war ein Teil deletiert, so dass in der Großzahl der Fälle nur eine zusätzliche Bande bei etwa 9kb zur Darstellung kam. Im Falle einer 100%igen Blastenpopulation war neben der Bande im Bereich von 9kb anstelle des Keimbahnfragments eine höher oder tiefer liegende Bande nachweisbar. Es gab überdies Fälle, in denen sich zwei rekombinierte *TEL* BamHI Fragmente neben dem *germline* Fragment fanden. Bei der Deletion eines Allels und einer Rekombination des zweiten Allels fehlte das Keimbahnfragment, wenn der Anteil der malignen Zellen ebenfalls 100% betrug. Das Keimbahnfragment war ferner nicht nachweisbar, wenn beide Allele deletiert waren. Wenn nicht alle Zellen von der Deletion betroffen waren, blieb ein Keimbahnfragment mit geringerer Intensität nachweisbar. Die unterschiedliche Lokalisation der Banden hängt ebenfalls von den an der Rekombination beteiligten Genabschnitten von *TEL* bzw. *AML1* (zwischen *TEL* Exon 5 und 6 bzw. zwischen *AML1* Exon 2 und 4 – je nach Bruchpunkt im Intron) und der dadurch veränderten Lage der Schnittstellen für das Restriktionsenzym BamHI ab, wonach die rekombinierten DNA- Fragmente kürzer oder länger als das Keimbahnfragment sein können und in einem anderen Kilobasenbereich erscheinen. So kann es aus verschiedenen Gründen zu Schwierigkeiten bei der Beurteilung kommen. Die Banden im Kilobasenbereich um 20kb können zudem beispielsweise „komigrieren“ und somit die Differenzierung zwischen einer Deletion des einen translozierten Anteils des rearrangierten *TEL*- Allels und einem nicht translozierten *TEL*- Allel z.T. erschweren. Besonders schwierig zeigte sich diese Differenzierung bei den alten rehybridisierten Filtern, die eine kürzere Laufzeit hatten und bei denen die Auftrennung in den höheren Kilobasenbereichen folglich gering war. Abbildung Nr. 11 veranschaulicht ein Beispiel eines PatientInnenfilters. Es wurde ein DNA-Längenstandard zur Bestimmung der Fragmentlänge und zwei Buffy Coat Proben als Negativkontrolle (Keimbahnstandard) mitgeführt.

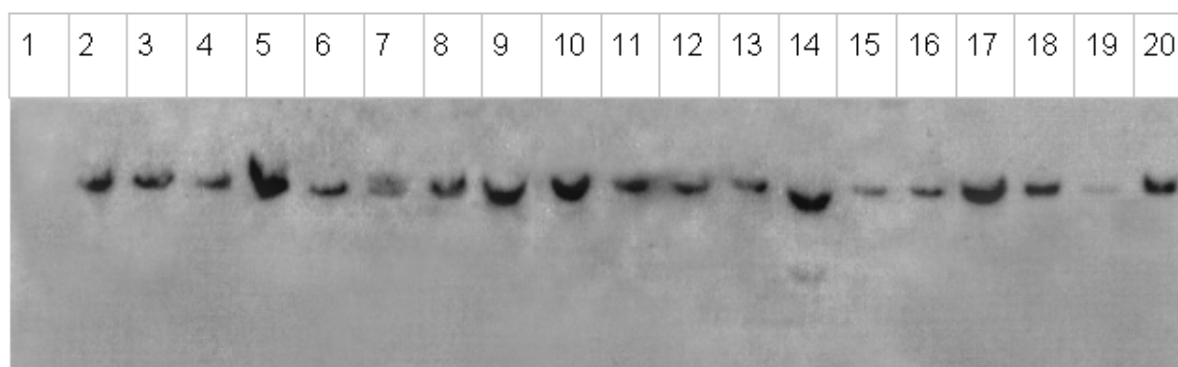


Abbildung 11: Southern Blot Hybridisierungsanalyse zum Nachweis eines *TEL*- Genrearrangements in genomischer DNA. Die DNA wurde mit *Bam*HI verdaut und die Hybridisierung erfolgte mit der Digoxigenin markierten Sonde *TEL*487. In Slot Nr.1 befindet sich ein Längenstandard (1 Kb Marker), der nur auf dem UV- Transiluminator sichtbar ist. Slot Nr.2 und 20 stellen die germline (G) Konfiguration von *TEL* Buffy coat DNA dar; Slot Nr.7 und Nr.14 zeigen Rekombinationen im *TEL*- Genlokus.

4.1.3 Auswertung der PatientInnenfilter

Zum Nachweis von *TEL*- Genrekombinationen wurde mindestens eine Southern Blot Analyse des Diagnosematerials pro PatientIn durchgeführt. Die überwiegende Anzahl der Proben wies eine Keimbahnkonfiguration für das *TEL*- Gen auf. Bei den Proben mit einem *TEL*- Rearrangement fanden sich meist zwei veränderte *TEL* *Bam*HI Fragmente als reziproke Produkte der Translokation. Eine Deletion des nicht rearrangierten *TEL*- Fragmentes, wie sie bei der Zelllinie REH zu beobachten ist, konnte nur in einem Fall festgestellt werden.

4.1.4 Ergebnissen einer RNA- basierten *nested*- PCR

Von archivierten PatientInnenproben wurde parallel der Nachweis einer *TEL*- Genrekombination durch die Southern Blot Analyse und der Nachweis eines *TEL*- *AML*1- Fusionsgens mittels RNA basierter PCR durchgeführt. Es wurde von archivierter RNA cDNA in einer RT- PCR amplifiziert und diese in einer *nested*- PCR mit den Primern *TEL*_{int.} und *AML*_{int.} auf das Vorhandensein der Translokation *TEL*- *AML*1 überprüft. Mittels der internen PCR wurden zwei verschiedene *TEL*- *AML*1- Amplifikationsprodukte dargestellt. Das längere Amplifikationsprodukt umfasste 269 bp und ging auf die Fusion des Exon 5 von *TEL* mit dem Exon 2 von *AML*1 zurück. Das kürzere PCR- Produkt hatte eine Länge von 230 bp und entsprach dem Fusionsprodukt aus *TEL* Exon 5 und *AML*1 Exon 3. In der vorliegenden Vergleichsreihe wies jedoch keine Probe allein das kürzere Transkript für die Fusion von *TEL* und *AML*1 auf.

Abbildung Nr. 12 zeigt über Gelelektrophorese aufgetrennte PCR- Fragmente.

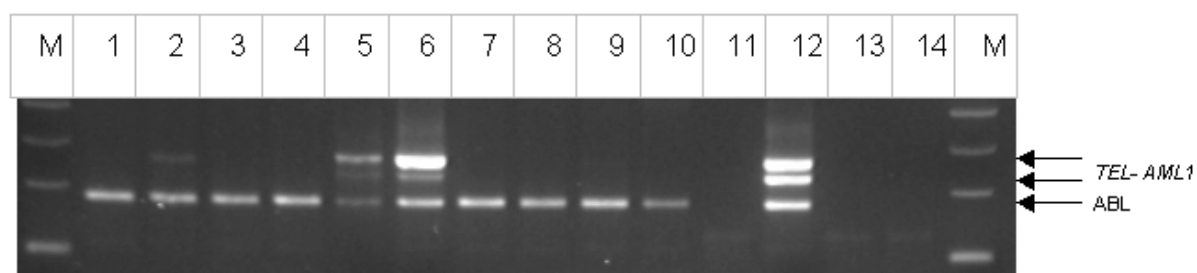


Abbildung 12: Elektrophoretische Auftrennung der RNA basierten TEL- AML1 PCR. Ergebnisse Nummer 2, 5 und 6 sind TEL- AML1 positiv und Nummer 12 stellt die als Positivkontrolle verwendete Zelllinie REH dar, Slot 1, 3, 4 und 7 bis 10 sind TEL- AML1 negativ. Probe 11 ist nicht zu verwenden. Probe 13 und 14 stellen Mastermix 1 und 2 dar, also das Pipettiergemisch ohne RNA. Die bei 1 bis 10 und REH vorhandene untere Bande stellt die RNA- Materialkontrolle von dem Gen ABL dar.

4.2 Ermittlung der Häufigkeit der *TEL*- Rekombination

Insgesamt wurden 228 DNA Proben auf das Vorliegen einer das *TEL*- Gen betreffenden Rekombination untersucht. Es wurden einerseits alte Filter rehybridisiert, andererseits gezielt archivierte DNA von ALL- REZ BFM 83 - 95 protokollgerecht behandelten ALL- ErstrezidivpatientInnen auf neu hergestellten Filtern hybridisiert. Da auf den alten Nylonmembranen die unterschiedlichsten Erkrankungen, Therapiekontrolle sowie Diagnosematerialien ohne Selektion aufgetragen wurden, ergab sich nach den Auswahlkriterien: ALL, bekannter Immunphänotyp und Diagnosematerial ein Probenumfang von 122 Kindern, welche in die Auswertung eingeschlossen wurden, davon 29 PatientInnen mit initialer ALL. Von den Kindern, die an einem ALL- Rezidiv erkrankten und nach den ALL- REZ BFM 83 - 95 Protokollen behandelt wurden, konnten insgesamt 93 Proben untersucht werden. Der größte Anteil der untersuchten PatientInnen zeigte den Immunphänotyp einer B- Vorläufer- Zell ALL (BVZ- ALL oder *B-Cell Precursor ALL*, *BCP- ALL*). Dementsprechend konnten 24 Proben einer ALL Ersterkrankung und 87 Proben eines ALL Rezidivs dem BVZ- ALL Typ zugerechnet werden. Die Rezidivkrankungen einer BVZ- ALL verteilten sich mit 71 PatientInnen auf ein erstes Rezidiv und mit 16 PatientInnen auf Folgerezidive. Die verbleibenden PatientInnenproben verteilten sich auf den T- Zell- Immunphänotyp mit insgesamt 11 PatientInnen. ALL- Proben des reifen B- Zellstadiums waren im untersuchten PatientInnenkollektiv nicht vertreten. PatientInnenproben ohne bekannten Immunphänotyp wurden aus der Auswertung ausgeschlossen.

Tabelle 11: Zusammensetzung des untersuchten PatientInnenkollektivs, eingeteilt nach Erkrankungsstadium und Immunphänotyp. („gesamt“ entspricht n = PatientInnenzahl)

ALL- Erkrankungsstadium			
Immunphänotyp	Ersterkrankung	Rezidiv	gesamt
BVZ- ALL	24	87	111
T-/ prä- T- ALL	5	6	11
gesamt	29	93	122

Bei erstmalig erkrankten Kindern lag das ermittelte Vorkommen eines rearrangierten *TEL*- Genlokus bei 6,9% (2/ 29) und bei Kindern mit rezidivierter ALL bei 9,7% (9/ 93). Ein *TEL*- Rearrangement zeigte sich mit unterschiedlicher Häufigkeit in den verschiedenen Subtypen der ALL. Bei dem am häufigsten vorliegenden Immunphänotyp einer BVZ- ALL war ein *TEL*- Rearrangement bei 11 von 111 untersuchten PatientInnen festzustellen. (Es wird hier keine detailliertere Unterteilung der B- Zell- Vorläufer- Subtypen in prä- prä- B- ALL, common- ALL, prä- B- ALL und My+ALL vorgenommen.) Innerhalb der 24 Proben von PatientInnen, die an einer initialen B- Vorläuferzell ALL erkrankt waren, konnte in zwei Fällen (7,7%) eine Rekombination im *TEL*- Genlokus identifiziert werden. Bei den 71 PatientInnenproben eines ALL Erstrezidivs konnte ein *TEL*- Rearrangement in einer Ratio von 9,9% (7/ 71)

gefunden werden. Bei den 11 PatientInnen des Immunphänotyps einer prä- T- ALL oder T- ALL, war der *TEL*- Genlokus nur in seiner Keimbahnkonfiguration nachzuweisen. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse spiegelt Tabelle Nr. 12 mit einer Darstellung der Häufigkeitsverteilung der nachgewiesenen *TEL*- Genrekombinationen eingeteilt nach der Verteilung des Immunphänotyps (BVZ-, T- und prä- T- ALL) und dem Stadium der Erkrankung (Ersterkrankung und Folgerezidive) wider.

Tabelle 12: Ergebnisse mittels Southern Blot Analyse nachgewiesener *TEL*- Genrearrangements der untersuchten 122 PatientInnen. (BVZ- ALL schließt ein: prä- prä- B- ALL, common- ALL, prä- B- ALL und My+ ALL) („gesamt“ entspricht n = PatientInnenzahl)

	n	TEL- Rearrangement									
		1. Erkrankung		1. Rezidiv		2. Rezidiv		3. Rezidiv		gesamt	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
BVZ- ALL	111	2 (7,7%)	22 (92,3%)	7 (9,9%)	64 (90,1%)	1 (33%)	2 (67%)	1 (7,7%)	12 (92,3%)	11 (9,9%)	100 (90,1%)
T-/ prä- T- ALL	11	-	5	-	4	-	-	-	2	-	11
gesamt	122	2	27	7	68	1	2	1	14	11	111

4.3 Klinische Verläufe

Um dem Vorhaben einer späteren statistischen Auswertung der prognostischen Bedeutung einer *TEL*- Genrekombination bei ALL- Rezidiven Folge zu leisten, wurde die untersuchte PatientInnengruppe im weiteren auf PatientInnen mit dem ersten Rezidiv einer B- Vorläufer- Zell- ALL, die protokollgerecht nach ALL- REZ BFM behandelt wurden, beschränkt. Damit wurde der neben einem frühen Zeitpunkt und einer ungünstigen Lokalisation des 1. Rezidivs für eine schlechte Prognose als unabhängiger Faktor geltende T- Zell- Immunphänotyp aus dem PatientInnenkollektiv ausgeschlossen. Folglich wurde die Zahl der in die Auswertung einfließenden Proben auf 65 PatientInnen eingegrenzt. Von diesen 65 PatientInnen war der *TEL*- Genlokus bei 5 PatientInnen (7,7%) rearrangiert. Eine Kontrollgruppe von 313 PatientInnen wurde zusätzlich nach den oben beschriebenen Auswahlkriterien erstellt und rekrutierte sich aus den nicht getesteten PatientInnen, die in der ALL- REZ BFM Studie bis zum erwähnten Nachweisbeginn durch die Routine- PCR- Untersuchung erfasst sind.

4.3.1 Charakterisierung klinischer Merkmale der PatientInnen

In der Therapiestudie ALL- REZ BFM ist eine Vielzahl klinischer Daten von RezidivpatientInnen erfasst, auf die im folgenden für das beschriebene PatientInnenkollektiv zurückgegriffen wird.

Anhand verschiedener klinischer Merkmale, wie Alter bei initialer Diagnose, Dauer der Remission usw., wurde eine Charakterisierung des PatientInnenkollektivs zum Rezidivzeitpunkt vorgenommen. So zeigte sich bei einem Vergleich der PatientInnenproben mit einem positiven oder einem negativen Hybridisierungsergebnis für ein *TEL*- Genrearrangement bei einem ersten Rezidiv einer ALL- Erkrankung für die Proben, deren Zellen im *TEL*- Gen rekombiniert waren, eine längere Dauer der ersten Remission zwischen Initial- und Erstrezidivdiagnose. Der Median der Dauer der ersten Remission lag mit 35 Monaten (2,9 Jahren) bei den für das *TEL*- Genrearrangement

positiv getesteten PatientInnen tendenziell über den negativ getesteten PatientInnen, bei welchen ein Median von 28 Monaten (2,3 Jahren) zu ermitteln war. Wie weiterhin aus der Tabelle Nr. 13 hervorgeht, lag das Alter bei Erstdiagnose der akuten lymphoblastischen Leukämie von *TEL*- Rearrangement positiven PatientInnen mit 88 Monaten (7,3 Jahren) im Vergleich über dem für ein *TEL*- Genrearrangement negativ getesteten PatientInnen mit 58 Monaten (4,8 Jahren). Der Median des Alters bei Rezidivdiagnose lag mit 123 Monaten (10,25 Jahren) bei den positiv getesteten PatientInnen etwas über den Ergebnissen der negativ getesteten mit 105 Monaten (8,75 Jahren). Die geringe Probenzahl erlaubt keine statistisch signifikanten Aussagen über die Unterschiede zwischen beiden Gruppen zu treffen. Eine Tendenz lässt sich jedoch erkennen: ALL- PatientInnen, deren leukämische Zellen im *TEL*- Genlokus rearrangiert sind, haben eine über dem Durchschnitt liegende Dauer der ersten Remission und erleiden so zu einem relativ späten Zeitpunkt ein Rezidiv.

Tabelle 13: Median und Interquartilsabstand der Variablen bei dem auf *TEL*- Rekombinationen getesteten und nicht getesteten RezidivpatientInnenkollektiv („gesamt“ entspricht n= PatientInnenzahl; die PatientInnenzahl beträgt insgesamt 378).

		TEL- Rearrangement		
		nicht getestet	+	-
	<i>n</i> =	313	5	60
Alter bei Initialdiagnose (in Monaten)	Median	63	88	58
	Minimum	1	77	9
	Maximum	197	151	190
Alter bei Rezidivdiagnose (in Monaten)	Median	110	123	105
	Minimum	12	111	23
	Maximum	212	208	203
Dauer der Remission (in Monaten)	Median	29	35	28
	Minimum	3	23	6
	Maximum	125	57	123
Leukozytenzahl 1000/μl	Median	6	6	7
	Minimum	0,6	2,5	1
	Maximum	301	9	97
periphere Blasten 1000/μl	Median	0,3	1	1
	Minimum	0	0	0
	Maximum	295	4	80,5

Die anderen unabhängigen klinischen und morphologischen prognostischen Variablen (wie: initiale Leukozytenwerte und Anzahl der peripheren Blasten) unterschieden sich bei positiven und negativen PatientInnen im Median nicht wesentlich voneinander. Im

Maximum lagen jedoch bei den *TEL*-Rearrangement positiven PatientInnen die initialen Leukozytenwerte bei 9000/ μ l und bei den negativen bei 97000/ μ l. Bei der Anzahl der peripheren Blasten ist ein ähnliches Verhältnis der Maxima zwischen *TEL*-Rearrangement positiv bzw. negativ getesteten PatientInnen zu erkennen (positiv = 4000/ μ l vs. negativ = 80500/ μ l).

Tabelle 14: Angaben zu Geschlecht, Rezidivzeitpunkt- und lokalisation von Kindern mit einem Rezidiv einer B- Vorläuferzell- ALL der Therapiestudien ALL-REZ BFM 83-95.

		TEL- Rearrangement			
		nicht getestet	+	-	gesamt getestet
	n =	313	5	60	65
Rezidivzeitpunkt	sehr früh	67 (21,4%)	-	11 (16,9%)	11 (16,9%)
	früh	94 (30,0%)	2 (3,1%)	18 (27,7%)	20 (30,8%)
	spät	152 (48,6%)	3 (4,6%)	31 (47,7%)	34 (52,3%)
Rezidivlokalisierung	KM isoliert	207 (66,1%)	4 (6,2%)	40 (61,5%)	44 (67,7%)
	KM kombiniert	76 (24,3%)	-	15 (23,1%)	15 (23,1%)
	extramedullär ohne KM- Befall	30 (9,6%)	1 (1,5%)	5 (7,7%)	6 (9,2%)

Ein erstes Rezidivereignis konnte bei PatientInnen mit rearrangierten *TEL*-Genfragmenten nicht vor 18 Monaten nach Erstdiagnose und einem therapiefreien Intervall unter sechs Monaten („sehr frühes Rezidiv“) beobachtet werden. Zwei *TEL*-Rearrangement positive PatientInnen erkrankten an einem frühen und drei an einem späten Rezidiv. Bei *TEL*-Rearrangement negativen PatientInnen ist dagegen eine Verteilung auf „sehr frühe Rezidive“ (18,3% oder 11/ 60), „frühe Rezidive“ (30% oder 18/ 60) und „späte Rezidive“ (51,7% oder 31/ 60) zu verzeichnen. Entsprechend dieser Charakteristika ergab sich die Einteilung in die ALL- REZ BFM

Therapiestrategiegruppen S1 bis S4. Sowohl die Gruppe S2 als auch die Gruppe S3 ist mit je zwei *TEL*-Rearrangement positiven PatientInnen besetzt. In der für eine *TEL*-Genrekombination positiv getesteten Gruppe wurde keinE PatientIn, die/ der nach den Richtlinien der Strategiegruppe S4 behandelt wurde gefunden. Es lässt sich also bei den *TEL*-Genrekombination positiven PatientInnen eine annähernd gleichmäßige Verteilung auf die ersten drei Therapiegruppen feststellen. Kontrastierend dazu zeigen neun PatientInnen der *TEL*-Rearrangement negativen PatientInnen eine Zuordnung zur Strategiegruppe S4.

Tabelle 15: Angaben zur Therapie von Kindern mit einem Rezidiv einer B- Vorläuferzell- ALL der Therapiestudien ALL-REZ BFM 83-95.

TEL- Rearrangement	
--------------------	--

		nicht getestet	+	-	gesamt getestet
	<i>n</i> =	313	5	65	60
Strategie-gruppen:	S1	5 (1,6%)	1 (1,5%)	2 (3,1%)	3 (4,6%)
	S2	200 (63,9%)	2 (3,1%)	37 (56,9%)	39 (60,0%)
	S3	45 (14,4%)	2 (3,1%)	12 (18,5%)	14 (21,6%)
	S4	63 (20,1%)	-	9 (13,8%)	9 (13,8%)
KMT	keine	239 (76,3%)	4 (6,2%)	49 (75,4%)	53 (81,6%)
	allogen	53 (17,3%)	1 (1,5%)	8 (12,3%)	9 (13,8%)
	autolog	20 (6,4%)	-	3 (4,6%)	3 (4,6%)

Es ließ sich feststellen, dass von den PatientInnen mit einem Rearrangement im *TEL*-Genlocus nur eine/ einer eine allogene Knochenmarktransplantation erhielt. Bei den PatientInnen mit einer *germline*- Konfiguration im *TEL*- Genlocus lag dagegen das Verhältnis der transplantierten mit 18,3% (11 von 60 PatientInnen) jedoch etwas unter dem der nicht getesteten mit 23,3% (73 von 313 PatientInnen).

Die Ergebnisse des Therapieansprechens (siehe Tabelle Nr. 16) zeigen, dass vier von fünf (80%) *TEL*- Rearrangement positiven PatientInnen eine zweite komplette Remission (2. CR; *second complete remission*) erreichten. Bei den *TEL*-Rearrangement negativen PatientInnen waren es 43 von 60 PatientInnen (71,7%). Eine/ einer der positiv getesteten PatientInnen, die eine 2. CR erreichten, entwickelte später ein Zweitmalignom und eine/ einer rezidierte erneut. Bei den positiv getesteten PatientInnen verstarb keine/ keiner in der 2. CR, dagegen waren bei den negativ getesteten fünf tödliche Ereignisse zu verzeichnen. Es fand sich des weiteren in der positiv getesteten Gruppe kein Therapie- *Non- Responder*, im Vergleich zu acht PatientInnen in der negativ getesteten Gruppe, die nicht auf die Therapie ansprachen. Eine/ einer der *TEL*- Rearrangement positiven PatientInnen verstarb in der Induktionsphase der Therapie, während sich lediglich zwei weiterhin in zweiter kompletter Remission befinden. 15 von 60 (25%) der im *TEL*- Genlocus *germline*-konfigurierten PatientInnen befinden sich weiterhin in zweiter kompletter Remission.

Tabelle 16: Klinischer Verlauf von Kindern mit einem Rezidiv einer B- Vorläuferzell- ALL der Therapiestudien ALL-REZ BFM 83-95. (CR = complete remission; CCR = continuous complete remission)

TEL- Rearrangement			
nicht getestet	+	-	gesamt getestet

	<i>n</i> =	313	5	60	65
Response	Remission	236 (75,4%)	4 (6,2%)	43 (66,1%)	47 (72,3%)
	<i>non- response</i>	23 (7,3%)	-	8 (12,3%)	8 (12,3%)
	Induktionstod	20 (6,4%)	1 (1,5%)	2 (3,1%)	3 (4,6%)
	Angabe fehlt	34 (10,9%)	-	7 (10,8%)	7 (10,8%)
Folgeereignis	in CCR	109 (34,8%)	2 (3,1%)	15 (23,1%)	17 (26,2%)
	verstorben in CR (Therapietod)	20 (6,4%)	-	5 (7,7%)	5 (7,7%)
	Zweitmalignom	2 (0,64%)	1 (1,5%)	-	1 (1,5%)
	erneut rezidiert	138 (44,1%)	1 (1,5%)	29 (44,7%)	30 (46,2%)
	<i>non- responder/ progressiv disease</i>	24 (7,7%)	-	9 (13,8%)	9 (13,8%)
	verstorben ohne CR (Induktionstod)	20 (6,4%)	1 (1,5%)	2 (3,1%)	3 (4,6%)

4.4 Korrelation der Ergebnisse bezüglich der prognostischen Aussage

- Charakterisierung des Behandlungserfolgs der PatientInnen mit einem Genrearrangement im *TEL*-Lokus
- ereignisfreie Überlebenswahrscheinlichkeiten

Aus der im vorigen Abschnitt dargestellten Charakterisierung des Rezidivverlaufes ergab sich bei den PatientInnen mit einer für den *TEL*-Genlokus positiv getesteten Rekombination eine mediane Beobachtungszeit von 77 Monaten (6,4 Jahren). Diese Gruppe weist damit eine wesentlich längere mediane Beobachtungszeit auf als die der *TEL*-Rearrangement negativen PatientInnen mit 20 Monaten (1,7 Jahren) und die der nicht getesteten Vergleichsgruppe mit 26 Monaten (2,2 Jahren).

Anschließend soll hinzugefügt werden, dass die zwei sich bis heute in kompletter Remission befindenden positiven PatientInnen über acht Jahre beobachtet wurden.

Tabelle 17: Median und Interquartilsabstand der Variablen bei dem auf *TEL*-Rekombinationen getesteten und nicht getesteten RezidivpatientInnenkollektiv („gesamt“ entspricht *n* = PatientInnenzahl; die PatientInnenzahl beträgt insgesamt 378).

TEL- Rearrangement		
nicht getestet	+	-

	<i>n</i> =	313	5	60
Beobachtungszeitraum (in Monaten)	Median	26	77	20
	Minimum	0,2	0,9	0,85
	Maximum	153	98	138

Wie die Abbildung Nr. 13 veranschaulicht, zeigt die Analyse der Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens nach Kaplan Meier (EFS, *event free survival time*) (Life-Table- Analyse) nach dem ersten Rezidiv einer BVZ- ALL eine höhere Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens in der Gruppe der PatientInnen mit einer Rekombination im *TEL*- Genlokus zu dem Zeitpunkt, zu dem etwa die Hälfte der nicht getesteten PatientInnen ein Folgeereignis erlitt. Die Gruppe der *TEL*-Rearrangement negativen PatientInnen zeigt insgesamt eine niedrigere Wahrscheinlichkeit eines ereignisfreien Überlebens.

ALL- REZ BFM 1. Rezidiv einer B- Vorläuferzell ALL

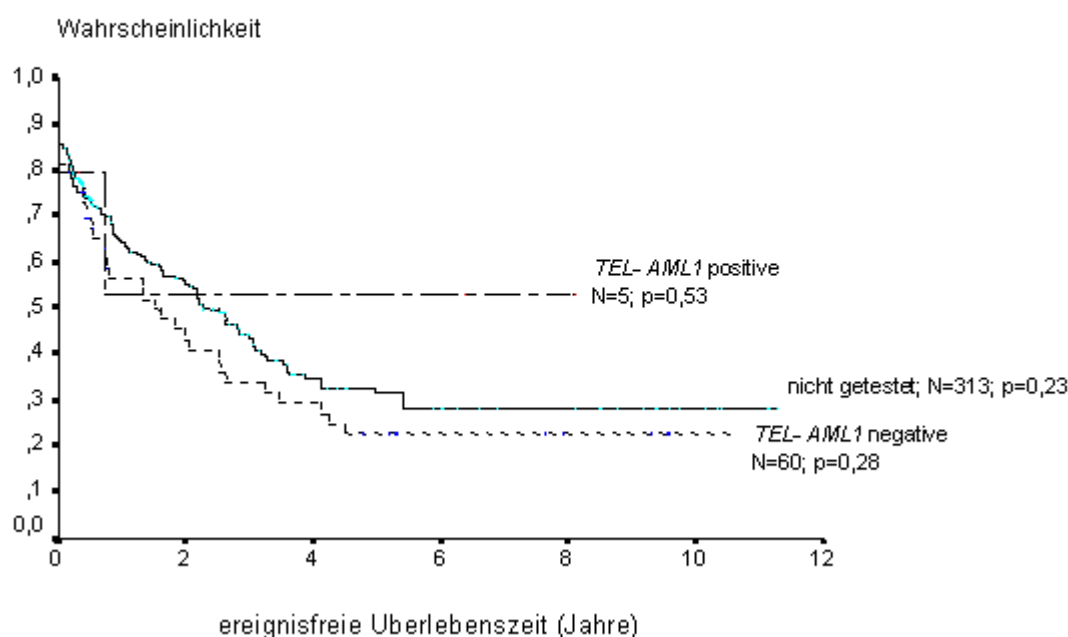


Abbildung 13: Life- Table- Untersuchung nach Kaplan Meier. Überlebenswahrscheinlichkeit von Kindern mit 1. Rezidiv von B- Vorläuferzell- ALL der Therapiestudien ALL-REZ BFM 83-95 (Chemotherapie) in Abhängigkeit vom TEL- AML1 Status.

5 Diskussion

5.1 Methodische Umsetzung – Konzeption der Southern Blot Analyse

5.1.1 Wahl der Methoden

Klonale rekombinierte *TEL*- Gene können durch von der Keimbahnkonfiguration abweichende Banden in der Hybridisierungsanalyse nach Southern dargestellt werden.[137] Mit der vorliegenden Arbeit gelang es erstmals Rekombinationen im *TEL*- Genlokus mittels eines nicht- radioaktiven Southern Blot Verfahrens nachzuweisen. Andere Arbeitsgruppen hatten radioaktive Sonden zum Nachweis genutzt.[75, 117, 120] Für die Darstellungen von Rekombinationen im *TEL*- Genlokus wurde aus verschiedenen Gründen angestrebt, ein nicht- radioaktives Southern Blot Hybridisierungsverfahren zu entwickeln. So bot das nicht- radioaktive Hybridisierungsverfahren den wesentlichen Vorteil einer kürzeren Entwicklungszeit während des Darstellungsverfahrens im Vergleich zu den sonst üblichen P³² radioaktiven Isotopenmarkierungen. Die Vermeidung von Umwelt- und Gesundheitsschäden bildet darüber hinaus einen nicht zu vernachlässigenden Aspekt zugunsten dieses Verfahrens. Von den zur Verfügung stehenden nicht- radioaktiven Darstellungsformen erwies sich die Chemolumineszenz- Methode als vorteilhaft, weil sie wesentlich sensitiver als andere nicht- radioaktive Darstellungsverfahren, wie z.B. die Fluoreszenzmarkierung oder Farbmarkierung, ist.[138] Die Sensitivität des Chemolumineszenz- Systems verpflichtet jedoch zu einer sehr sterilen Arbeitsweise. Hintergrund und Sensitivität stellten zwei grundsätzlich wichtige Probleme, die in der Konzipierung des Versuchsaufbaus berücksichtigt werden mussten, dar.

5.1.2 Konzeption und Optimierung der Sonde

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die PCR- Amplifikation der Fusion zwischen *TEL* und *AML1* auf DNA- Ebene bisher nicht möglich gewesen, da weder *AML1* ausreichend sequenziert ist, noch eine Polymerase existiert, welche Segmente dieser Länge fehlerfrei amplifizieren kann. Der Anspruch an eine *TEL* enthaltende cDNA, welche dann als Template für eine markierende Sonde dienen soll, war, dass sie den Translokationsbruchpunkt von *TEL* für die Fusion mit *AML1* überspannt. In der Literatur sind vor allem Sonden beschrieben, die für Exon 5 und 6 von *TEL* markieren, da die Bruchpunkte für die Fusion von *TEL*- *AML1* am häufigsten zwischen diesen beiden Exons liegen. Die genaue Lage des zweiten translozierten Anteils von *TEL* kann jedoch nicht festgelegt werden, da es von den verschiedenen Transkripten von *AML1*, von den individuell gelegenen Bruchpunkten und von den verschiedenen Splicevarianten von *TEL*- *AML1* abhängig ist. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Sonde mit einer Länge von 585 bp ausgewählt. Sie reicht von Nukleotid 487 der *TEL* cDNA bis zum Nukleotid 1072. Die Sonde umspannt damit den zentralen Abschnitt von *TEL* einschließlich der sich am amino- terminalen Ende befindlichen DNA- bindenden Region.

5.1.3 Vergleich der Methoden

Den Ergebnissen der von SEEGER et al. 1998 veröffentlichten Studie folgend, in der die Prävalenz von *TEL*- *AML1* bei Rezidiven einer ALL im Kindesalter ähnlich hohe Prozentzahlen erreichte wie bei ALL- Ersterkrankungen, wurde die Notwendigkeit von Langzeitdaten, die bei der Beurteilung der prognostischen Bedeutung des Vorliegens dieser Translokation helfen könnten, absehbar. [139] Die unmittelbar dafür zur Verfügung stehende Möglichkeit war die retrospektive Untersuchung an einer großen Zahl archiverter KM- Proben von ALL- RezidivpatientInnen.

Die retrospektive Langzeitdatenermittlung gestaltet sich mit den zur Zeit für den Nachweis von *TEL- AML1* üblichen Untersuchungsverfahren wie PCR und FiSH schwierig, da die PCR nur als RT- PCR von cDNA ausgehend möglich ist, da die Intronsequenzen der DNA von *AML1* noch nicht ausreichend bekannt sind und RNA nicht konserviert wurde. Ebenfalls stehen aus den früheren Jahren der ALL- REZ BFM Studie keine Ausstriche für eine FiSH- Analyse zur Verfügung. Deshalb wurde eine Rehybridisierung alter Southern Blot Filter und der Southern Transfer mit anschließender Hybridisierung von kryokonservierter DNA angestrebt. Ein weiteres Ziel war es, die nicht- radioaktive Form des Southern Blot zu etablieren und sie als eine zusätzlich Kontrolluntersuchung zu FiSH und PCR verfügbar zu machen.

In Anbetracht des großen zeitlichen und finanziellen Aufwandes des Southern Blot Verfahrens wurde die PatientInnengruppe, von der neue Hybridisierungen angefertigt wurden, von Anfang an auf den Immunphänotyp der B- Vorläufer- Zell ALL beschränkt, da in allen Studien über die Translokation t(12;21) diese relevant bei genannter Subgruppe gefunden wird und in der Diskussion über die Bedeutung der Fusion von *TEL* und *AML1* andere Arbeiten der letzten Zeit ebenfalls nur BVZ- ALL untersucht haben.[35, 54, 55, 113, 115, 116, 117, 120, 131, 132, 140, 141, 142] Verschiedentlich ist gezeigt worden, dass mit Sonden, die im Bereich von Exon 5 und 6 des *TEL*- Gens markieren, aufgrund der *TEL*- Bruchpunktcharakteristika die Darstellung von *TEL*- Genrearrangements mit der der Translokation t(12;21) weitestgehend übereinstimmen. RUBNITZ et al. haben 188 neu diagnostizierte PatientInnen mit BVZ- ALL auf das Vorliegen eines *TEL*- Rearrangements mittels Southern Blot untersucht.[116] Von 48 im Southern Blot dargestellten *TEL*- Rekombination positiven PatientInnenproben waren in der sich anschließenden PCR nur 44 für *TEL- AML1* positiv. Dabei stand von drei PatientInnen kein Material für die PCR zur Verfügung.[143] Ähnlich fand sich auch bei SHURTLEFF et al., die in einem mit BamHI verdauten und mit der Sonde pSB (466bp) markierenden Hybridisierungsverfahren 160 PatientInnen untersucht hatten und dabei in 38 Fällen das Vorliegen eines *TEL*- Rearrangements entdeckten, in der anschließend durchgeführten RT- PCR das Fusionsprodukt *TEL- AML1* in 35 der 38 Fälle.[113] Es lässt sich also bei den *TEL*- Rearrangement positiven Fällen eine nahezu uniforme Expression von *TEL- AML1* nachweislich referieren. Trotzdem sich in der Literatur weder Studien finden lassen, die auf die Rehybridisierung archivierter Filter zurückgreifen, noch Arbeiten, die nicht alle gefundenen *TEL*- Rearrangements mittels PCR auf das Vorliegen von *TEL- AML1* überprüfen, darf durch den hier durchgeführten Vergleich von Southern Blot und PCR- Ergebnissen von PatientInnen, deren Material für beide Methoden zur Verfügung stand, in dem nur in einem Fall ein Unterschied in den Ergebnissen beobachtet werden konnte, davon ausgegangen werden, dass ein Abweichen von der *germline*- Konfiguration im Southern Blot mit der Fusion *TEL- AML1* übereinstimmt. Da sich in den Studien von GOLUB et al. und SHURTLEFF et al. aber keine 100%ige Übereinstimmung der Ergebnisse fand, muss angenommen werden, dass sich in einzelnen Fällen alternative Bruchpunkte finden, die zu chimären Produkten führen, die nicht mit den üblichen Sonden nachgewiesen werden oder, dass *TEL* mit anderen Genen fusioniert oder teilweise deletiert ist.[54, 113]

5.2 Prävalenz und Prognostische Bedeutung von *TEL- AML1*

5.2.1 Prävalenz von *TEL- AML1* bei ALL im Kindesalter

Auf der Suche nach prognostischen Faktoren fand sich *TEL- AML1* als ein Faktor, der eventuell mit einer günstigen Prognose für die BVZ- ALL im Kindesalter assoziiert ist.

Mit *TEL- AML1* fand sich so das erste Beispiel für eine spezifische genetische Veränderung, die mit einer günstigen Prognose bei Kindern mit ALL assoziiert sein könnte. ROMANA et al. beschrieben als erste in einer sich anschließenden regen Forschungstätigkeit über die Prävalenz und die prognostische Bedeutung dieser Fusion, eine Häufigkeit von 23% bei Ersterkrankungen einer ALL des BVZ- Zelltyps.[55] Weiter folgende Studien mit größeren PatientInnenzahlen wurden von RUBNITZ et al., SHURTLEFF et al. und McLEAN et al. vorgelegt.[113, 115, 116] RUBNITZ et al. untersuchten 188 neu diagnostizierte PatientInnen mit BVZ- ALL auf das Vorliegen eines *TEL*- Rearrangements mittels Southern Blot Analyse. 26% der PatientInnen wiesen ein Abweichen von der Keimbahnkonfiguration auf.[117]

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten DNA- Proben von 122 Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie wurden mit einer für die Rekombination im Bereich des *TEL*- Gens spezifischen nicht- radioaktiven Gensonde (Exon 5 und 6) das Vorkommen eines rearrangierten *TEL*- Genlokus mit einer Prävalenz von 6,9% (2/ 29) bei Ersterkrankungen und bei Kindern mit rezidivierter ALL bei 9,7% (9/ 93) gefunden. Die hier vergleichsweise geringe Prävalenz bei Ersterkrankungen ist sicherlich auf die durch eine in dem Fall starke Selektion bedingte kleine PatientInnenzahl zurückzuführen. Bei einer Beschränkung auf protokollgerecht nach ALL- REZ BFM behandelte Erstrezidive einer BVZ- ALL fand sich eine Rekombination von *TEL* bei 5 von 65 PatientInnen (7,7%).

Aufgrund der vielseitig referierten günstigen Prognose, welche auch durch ein besonders schnelles Verschwinden nachweisbarer Restzellen in MRD- Untersuchungen unterstützt wurde, schienen die Prävalenzangaben für *TEL- AML1* bei nicht näher klassifizierten Rezidiven von HARBOTT et al. (konsekutiv erhobene Daten) und SEEGER et al. (retrospektiv erhobene Daten) von 20% (9/ 44) bzw. 21,9% (32/ 146) dem Eindruck der guten prognostischen Beeinflussung zu widersprechen.[131, 136, 144, 145, 146] Bei einer weiteren Präzisierung der ALL- Charakteristika fanden HARBOTT et al. nur BVZ- ALL bei den *TEL- AML1* positiven PatientInnen und bei der Einschränkung auf 1. Rezidive 15,6% (5/ 32). Sie berücksichtigen im Gegensatz zur Arbeitsgruppe von SEEGER et al. nicht das Kriterium „BCR- ABL positiv“. SEEGER et al. referierten 1998 bei einem protokollgerecht nach ALL- REZ BFM behandelten retrospektiv untersuchten Rezidivkollektiv von 146 PatientInnen die erwähnte Prävalenz von *TEL- AML1* von 21,9% (32/ 146). Bei Berücksichtigung aller Rezidive einer BVZ- ALL finden sich 32 von 133 *TEL- AML1* positive Fälle (24%), was vergleichbar mit der Inzidenz des von HARBOTT et al. untersuchten PatientInnenkollektivs ist. Zur Bewertung der prognostischen Signifikanz von *TEL- AML1* bei ALL- Rezidiven wurde die weitere Auswertung auf das Kollektiv mit einem BCR- ABL positiven BZV- ALL- Erstrezidiv limitiert. Diese Eingrenzung des PatientInnenkollektivs erfolgte nur zur Vermeidung von Schiefen innerhalb der protokollgerecht nach ALL- REZ behandelten PatientInnen bezüglich des EFS. PatientInnen mit ALL- Erstrezidiv vom T- Zellimmunphänotyp oder mit BCR- ABL Positivität haben bekanntlich eine extrem schlechte Prognose.

Die sich anschließenden, die Diskussion bestimmenden Arbeiten untersuchten zum einen, die Rezidivrate bei Ersterkrankungskollektiven in einem bestimmten Beobachtungszeitraum und zum anderen beschränkten sie sich auf die Inzidenzbestimmung bei reinen Rezidiverkrankungskollektiven. Zur ersten Gruppe können beispielsweise Studien von LOH et al., RUBNITZ et al., McLEAN et al., AYIGAD et al. und SHURTLEFF et al. und zur zweiten die Arbeiten von ZUNA et al.,

BORKHARD et al. und SEEGER et al. sowie die hier vorliegende gerechnet werden.[16, 39, 115, 117, 126, 142, 143, 146, 147, 148, 149]

Die Dana- Farber Cancer Institute (DFCI) Study Group konnte nach einem Resümee bei 81 nach ihren Protokollen behandelten PatientInnen, von denen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose 22 PatientInnen *TEL- AML1* positiv waren, in einer medianen *Follow- up* Zeit von 11,5 Jahren ein 100%iges ereignisfreies Überleben feststellen.[115, 147, 150] Bei der Untersuchung an einer RezidivpatientInnengruppe von BCR- ABL negativen BVZ- ALL fanden sie nur bei einer Probe von 28 eine Fusion von *TEL* und *AML1* (3,6%), wobei hier ebenfalls nicht ausdrücklich eine Unterscheidung in 1. Rezidiv oder Folgerezidiv vorgenommen wurde.[150] Ähnlich niedrige Ergebnisse beschreiben RUBNITZ et al.. In einer Gruppe von 49 RezidivpatientInnen konnten sie nur in fünf Fällen bei einer medianen Remissionsdauer von 4,1 Jahren ein *TEL- AML1* Fusionsgen nachweisen (10,2%). Bei einer Eingrenzung der PatientInnengruppe auf BVZ- ALL fand sich eine Frequenz von 10,8% (5/ 46). Sie errechneten weiterhin im Rahmen einer Überarbeitung ihrer Ergebnisse *TEL- AML1* positiver Ersterkrankungen eine kumulative Inzidenz von $9 \pm 5\%$ nach 10 Jahren für das Auftreten eines Rezidivs mit allen Rezidiven, die über 3 Jahre vom Diagnosezeitpunkt auftraten. Dagegen fanden HABOTT et al. wie bereits erwähnt in einem retrospektiv untersuchten PatientInnenkollektiv eine Prävalenz von 15,6% (5/ 32).[151] Diesen Ergebnissen kommen auch die Angaben von ZUNA et al., welche eine Häufigkeit von ersten Rezidiven bei *TEL- AML1* positiven BVZ- ALL PatientInnen von 11,8% (4/ 34) bzw. in einem *Update* ihrer Ergebnisse von 15,2% (7/ 46) angeben, nahe, wobei sie den Status anderer genetischer Marker nicht erwähnen.[146]

Inzwischen liegen zum Vergleich mit den Verlaufsbeobachtungen bei Ersterkrankungskollektiven erste prospektive Untersuchungsergebnisse an einem RezidivpatientInnenkollektiv vor. So konnten SEEGER et al. in einer zweieinhalb Jahre dauernden prospektiven Untersuchung eine Prävalenz von 17,4% (31/ 178) bei *TEL- AML1* positiven 1. Rezidiven einer BVZ- ALL finden. Bei einer Revision ihres retrospektiv beobachteten PatientInnenkollektivs ergibt sich eine Häufigkeit von 21,1% (19/ 90) bei einer Gesamtstudienpopulation von 268 PatientInnen mit einer Prävalenz von 17,5%. Die Prävalenzangabe von 17,4% nähert sich damit den Angaben von ZUNA et al. und HARBOTT et al..[146] [151] In einer Weiterführung ihrer Untersuchung über etwa insgesamt drei Jahre bei einem Gesamtkollektiv von 340 PatientInnen, von denen 117 retrospektiv und 223 prospektiv untersucht wurden, finden sie in der *TEL- AML1* positiven Gruppe der 1. Rezidive einer BVZ- ALL eine Häufigkeit von 16,7% (28/ 168) wobei sie genau an diesem Punkt keine explizite Unterscheidung in eine prospektive oder retrospektive Gruppe transparent machen. Sie ermitteln bei 72 von den insgesamt 310 BVZ- ALL Rezidiv PatientInnen (20%) eine *TEL- AML1* Positivität. Die 30 ausgeschlossenen PatientInnen entsprechen den T- ALL. Von den 202 prospektiven BVZ- ALL Rezidiv PatientInnen waren 40 *TEL- AML1* positiv (19,8%). In ihrer Arbeit werden besonders die kleinen PatientInnengruppen, die unterschiedlichen Therapieansätze und die zu kurzen Beobachtungszeiträume anderer Arbeitsgruppen für die großen Abweichungen zwischen den Studien verantwortlich gemacht.

Die Ergebnisse von SEEGER et al. mit der vergleichsweise höchsten Prävalenz des Fusionsgens *TEL- AML1* bei PatientInnen mit einem Erstrezidiv einer BVZ- ALL weichen ebenfalls stark von den hier mittels Southern Blot angetroffenen Häufigkeitsangaben mit 7,7% ab, trotzdem beide PatientInnenkollektive dem gleichen Datenpool der ALL- REZ BFM Studie entnommen wurden. Die Diskussion über die

bisher veröffentlichten retro- und prospektiven Daten über die Inzidenz von *TEL- AML1* bei ALL- Erstrezidiven berücksichtigend ist nicht auszuschließen, dass sich die in dieser Arbeit gefundene geringere Inzidenz und die damit bedingte mögliche Selektion auch auf die retrospektive Analyse der *TEL*- Rekombinationen zurückzuführen ist.

Es lässt sich zusammenfassend also konstatieren, dass sich sowohl im Großteil der retrospektiven als auch bei den prospektiven Untersuchungen die Prävalenzangaben in dem von RUBNITZ et al. berechneten 10 Jahres- Zeitraum für eine kumulative Inzidenz von $9 \pm 5\%$ bewegen. Eine der großen Schwierigkeiten in der Beurteilung der unterschiedlichen Studien ist die große Variabilität und die mangelnde Transparenz des Studiendesigns inklusive unterschiedlicher Gruppengröße, Eingrenzung des PatientInnenkollektivs und der Therapieschemata, die in ihrer Verschiedenartigkeit bisher nicht Augenmerk der Studien waren. Besonders auffällig weichen zwei Gruppen von dem Bereich der kumulativen Inzidenz *TEL- AML1* positiver Ersterkrankungen für das Auftreten eines Rezidivs ab: Die Angaben von SEEGER et al. mit 16,7% und die Ergebnisse der Dana- Farber Cancer Institute Study Group mit einem 100%igen ereignisfreien Überleben nach 11,5 Jahren Beobachtungszeit bzw. bei der Untersuchung an einer RezidivpatientInnengruppe die Prävalenz von 3,6%.

5.2.2 *TEL- AML1* als prognostischer Faktor in verschiedenen Studien. Vergleich der Ergebnisse, PatientInnencharakteristika

RUBNITZ et al. fanden in den von ihnen auf das Vorliegen eines *TEL*- Rearrangements untersuchten 188 neu diagnostizierten PatientInnen mit BVZ- ALL eine deutlich bessere 5- Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit bei positiven PatientInnen von $91 \pm 5\%$ (vs. $65 \pm 5\%$ bei negativen).[117, 143] Ein *TEL*- Rearrangement stand dabei unabhängig von anderen bekannten guten Risikofaktoren für BVZ- ALL, wie niedriges initiales Alter, niedrige initiale Leukozytenzahl und Hyperdiploidie, für eine gute Prognose. In ihrem PatientInnenkollektiv fand sich unter Ausschluss von Hochrisikotranslokationen wie t(4,11) und t(9,22) in einem Vergleich mit einer hyperdiploiden PatientInnenengruppe, dass beide Gruppen eine ähnliche 5- Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit zeigten, wobei beide Gruppen in einer Signifikanzstratifizierung von $p < 0,001$ zu Gruppen mit non- hyperdiploiden und *TEL*- Keimbahnkonfiguration besser abschneiden. Sie ermittelten einen 5,4- fachen Anstieg des Risikos für PatientInnen mit *TEL*- Keimbahnkonfigurierter ALL im Vergleich zu PatientInnen mit *TEL*- rekombinierter ALL. Nur drei der von ihnen untersuchten PatientInnen mit *TEL- AML1* positiver ALL erlitten ein Rezidiv. Diese Studie war die erste, die eine große PatientInnenzahl untersuchte und bei einer medianen Beobachtungszeit von 3 Jahren die unabhängige prognostische Bedeutung von *TEL*- Rekombinationen bestimmte. Zudem scheinen die *TEL- AML1* positiven ALL typische Charakteristika aufzuweisen. So fand sich häufig bei diesen PatientInnen eine Assoziation mit sonst als unabhängig für eine gute Prognose stehenden Faktoren, wie niedriges Alter bei Initialdiagnose, non- T- Phänotyp und niedrige initiale Leukozytenzahl. RUBNITZ et al. beschreiben ein *TEL- AML1* positives ALL- Rezidiv- PatientInnenkollektiv mit einem Altersgipfel bei initialer Diagnose zwischen 1 bis 10 Jahren bei 91% und mit einem Altersgipfel zwischen 2 und 6 Jahren bei 70% der PatientInnen mit einem Vorherrschen des BVZ- Zelltyps und mit einer niedrigen initialen Leukozytenzahl.[143] Bei der ersten prospektiven Untersuchung von BORKHARD et al. an 334 PatientInnen zeigte sich bei einer ähnlichen Altersverteilung und ebenfalls fehlendem hyperdiploidem Chromosomensatz, dass bei 64% der Kinder mit einem *TEL- AML1* positiven Status eine Leukozytose zum Diagnosezeitpunkt fehlte (Leukozyten unter 20000 pro μ l).[131]

Mit der vorliegenden Arbeit an einem PatientInnenkollektiv primär von Erstrezidiven, aber auch Ersterkrankungen, können diese Charakteristika im Trend bestätigt werden. Die überwiegende Anzahl der insgesamt untersuchten sowie auch der *TEL*-Rearrangement positiven PatientInnen kann der B- Vorläuferzellreihe zugerechnet werden (111/ 122 bzw. 11/ 11). Von den 11 PatientInnen mit einer prä- T- ALL oder T- ALL wies, wie erwartet, keine/ keiner ein *TEL*- Rearrangement auf.

Es fand sich in Übereinstimmung mit den in der Literatur zu findenden Angaben bei dem eingegrenzten PatientInnenkollektiv Leukozytenzahlen im Median von 6000/ μ l und eine maximale Leukozytenzahl von nur 9000/ μ l im deutlichen Unterschied zu der *TEL*-Rearrangement negativen PatientInnengruppe mit einer maximalen initialen Leukozytenzahl von 97000/ μ l. Kein Unterschied ließ sich im Median der initialen Leukozytenzahl feststellen. Anzumerken ist hier, dass im untersuchten PatientInnenkollektiv die Altersverteilung zum Zeitpunkt der initialen Diagnose im Gegensatz zu den sonst beschriebenen PatientInnendaten steht. Alle anderen Studien beschrieben, dass PatientInnen mit *TEL- AML1* positiver ALL zu einem früheren Zeitpunkt als die restlichen Patienten erstmalig erkrankten. In der vorliegenden Arbeit lag das initiale Erkrankungsalter der PatientInnen *TEL*- rekombinierten ALL- Rezidiv mit 88 Monaten über dem der PatientInnen mit *TEL*- Keimbahnkonfiguration ALL.

Übereinstimmend zeigen alle Studien, dass *TEL- AML1* positive BVZ- ALL mit einer langen ersten Remissionsdauer und so mit späten Rezidiven assoziiert sind.[152] SEEGER et al. zeigen ebenfalls statistisch signifikante Unterschiede zwischen PatientInnen mit *TEL- AML1* positiver und negativer ALL bezüglich der Dauer der ersten Remission, wenn eine Eingrenzung auf BVZ- ALL und 1. Rezidive vorgenommen wird, und zwar im Median von 45,4 vs. 28,9 Monate ($p < 0,001$) und dem Alter bei Ersterkrankungen im Median von 53 vs. 77 Monate ($p = 0,004$). Es wird allgemein im Median die Dauer der Remission zwischen 35 und 56 Monaten angegeben. Die Ereignisse treten im Vergleich zu den PatientInnen mit *TEL*- Keimbahn- ALL im Durchschnitt ein Jahr später auf.[16, 116, 131, 136, 142, 146, 150, 151] Mit der vorliegenden Arbeit kann das Phänomen der längeren Dauer der ersten Remission im Falle eines Rezidivs einer *TEL- AML1* positiven BVZ- ALL im Vergleich zu den PatientInnen *TEL*- Keimbahn- ALL mit einem Median von 35 Monaten vs. 28 Monaten bestätigt werden. Weil entsprechend dieser Zahlen die Hälfte der PatientInnen ihr Rezidiv nach etwa 4 Jahren erleidet, bedarf es in weiteren Studien also Beobachtungszeiten die über diesen Zeitraum hinausreichen.

Ähnliches deutet sich für ein weiteres Charakteristikum der im *TEL*- Lokus rekombinierten PatientInnengruppe an. Diese PatientInnen weisen auch nach dem Erreichen der zweiten Remission eine deutlich längere EFS Zeit auf. SEEGER et al. zeigen in ihrem RezidivpatientInnenkollektiv, in dem sich auch sehr viele Folgerezidive befanden, dass die von ihnen untersuchten 5 *TEL- AML1* positiven Zweitrezidivfälle späte Rezidive waren. Sie assoziierten damit ein Vorliegen der Fusion *TEL- AML1* bei einem ersten Rezidiv mit einer mittelfristig günstigen Prognose und gaben somit den Hinweis, dass auch im Rezidivfall genetische Faktoren zunehmend eine Rolle für die Vorhersagbarkeit der Prognose spielen können.

Andere Studien haben bisher das EFS nach dem Erreichen einer zweiten Remission bei PatientInnen mit *TEL- AML1* positiver ALL nicht untersucht.

Mit der vorliegenden Arbeit kann die bisher längste referierte Beobachtungszeit von

TEL rearrangierten Rezidiven einer BVZ- ALL angegeben werden. Ein PatientIn konnte ereignisfrei über einen Zeitraum von 8,2 Jahren nach dem Erreichen der zweiten kompletten Remission beobachtet werden. Bei einem Vergleich der medianen Beobachtungszeiträume nach der 2. CR von *TEL* rearrangierten (6,4 Jahre) und *TEL germline* ALL (1,7 Jahre) wurde das wesentlich bessere Überleben der erstgenannten Gruppe deutlich.

5.2.3 Diskussion der prognostischen Bedeutsamkeit von *TEL- AML1* - Einfluss auf die Therapie

RUBNITZ et al. stellten die Hypothesen auf, wie die PatientInnen mit einem rearrangierten *TEL*- Genlokus aufgrund ihrer genetischen Konstellation in veränderte Therapieschemata eingestuft werden müssten. Ein Klassifizierungsschema, das *TEL*-Rearrangements mit einschliesse, würde die Risikoeinstufung von etwa 25% der BVZ-ALL verändern. Etwa 15 - 20% der PatientInnen mit einem *TEL*- Keimbahnstatus und einer fehlenden Hyperdiploidie, die wegen ihres Alters und ihrer Leukozytenzahl in gute Risikogruppen eingestuft werden, müssten demnach Therapiegruppen mit einem höheren Risiko zugeteilt werden und bekämen so eine intensiviertere Therapie.[117, 143] Weitere 5 - 10% der PatientInnen mit einem rekombinierten *TEL*- Status, die wegen ihres Alters und ihrer Leukozytenzahl in hohe Risikogruppen eingestuft werden, wären demnach in Gruppen mit einem niedrigeren Risiko einzustufen.[117, 143]

Eine bereits erwähnte Arbeitsgruppe mit nach unten hin abweichenden Prävalenzangaben ist die Dana- Farber Cancer Institute Study Group. Durch ihre Ergebnisse stellt sich die Frage, ob die stark abweichenden Angaben allein durch eine unterschiedliche Größe des PatientInnenkollektivs und durch das prospektive oder retrospektive Studiendesign und dadurch bedingter Materialselektion und Schiefen zu begründen sind. Eine weniger wahrscheinliche, für AML aber im Zusammenhang mit DNA- Topoisomerase II häufiger beschriebene Theorie, bestünde in einer Erklärung der höheren Inzidenzen durch therapieinduzierte *TEL- AML1* positive Zweitmalignome.[153, 154] Bei den Studien, die den *TEL- AML1*- Status ein und derselben PatientInnen sowohl zum Diagnosezeitpunkt der Ersterkrankung als auch zum Zeitpunkt des Rezidivs untersuchten, zeigte sich stets eine Übereinstimmung der *TEL- AML1*- Positivität bzw. Negativität. Es ist bisher nur ein von FILATOV et al. beschriebener Fall bekannt, bei dem zum Zeitpunkt der initialen Diagnosestellung einer ALL als genetische Veränderung nur eine Deletion von 6q gefunden werden konnte und bei der Rezidivdiagnosestellung eine neu aufgetretene *TEL- AML1*- Translokation festgestellt wurde.[155] Eine eher wahrscheinliche und wesentliche Erklärung könnte die genaue Überprüfung der unterschiedlichen Therapieprotokolle geben. Eine japanische Studie an ALL- PatientInnen konnte beispielsweise zeigen, dass *TEL- AML1* positive PatientInnen, die mit einem weniger intensiven Antimetaboliten basierten Therapieregime behandelt wurden, eine Fünfjahresrate einer ereignisfreien Überlebenschance (EFS) von nur $55 \pm 15\%$ im Gegensatz zu einer 100% Rate bei den nach intensiveren Protokollen behandelten PatientInnen hatten.[132]

Bei einem Vergleich der nordamerikanischen Therapieprotokolle mit den Protokollen der ALL- BFM- Studie wird deutlich, dass sich die von erstgenannten empfohlenen Therapieprotokolle von den anderen in ihrer Zusammensetzung unterscheiden. Sie verwenden beispielsweise einen höheren L- Asparaginase Anteil in einer intensivierten Antimetaboliten basierten Therapie, wohingegen letztgenannte eine größere Anzahl verschiedener Chemotherapeutika in ihre Protokolle einfließen lassen. Weiterhin wurde

gezeigt, dass die in der Studie der Dana- Farber Cancer Institute Study Group behandelten *TEL- AML1* positiven PatientInnen aufgrund anderer Risikofaktoren Therapiestrategiegruppen mit einer höheren Intensität zugeordnet wurden und davon eventuell besser profitierten als von einer verminderten Intensität der Therapie.[147, 149]

Es kann also abschließend anhand der Untersuchungen der letzten Zeit, die sich nach der Veröffentlichung der ersten Arbeiten zum Vorkommen der *TEL- AML1* Fusion bei RezidivpatientInnen von HARBOTT et al. und SEEGER et al., in denen eine ähnliche Inzidenz wie bei Ersterkrankungen gefunden wurde, vermutet werden, dass sich die Prävalenzen von *TEL- AML1* bei Erstrezidiven anderer Gruppen durch prospektive Erhebung der Daten angleichen werden. Ob *TEL- AML1* letztlich ein unabhängiger prognostischer Faktor ist, oder ob es nicht doch nur ein Epiphänomen bei PatientInnen mit günstiger Prognose ist. Darauf und auf den Einfluss unterschiedlicher Therapiestrategien werden in Zukunft die prospektiven Studien, in denen wünschenswerterweise klar definierte vergleichbare PatientInnenkollektive in einem international offenen Austausch untersucht werden, Auskunft geben können.

Bei all der Kritik und Unsicherheit, die über die unabhängige prognostische Bedeutung von *TEL- AML1* existieren, darf nicht außer Acht gelassen werden, dass *TEL- AML1* die häufigste bisher bekannte Translokation bei ALL im Kindesalter ist, die nach dem bisherigen Wissen über die funktionelle Beeinflussung der Hämatopoese und Leukämogenese mit großer Wahrscheinlichkeit eine Bedeutung in der Pathogenese von Leukämien bei Menschen hat.

6 Zusammenfassung

Das in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Verfahren der nicht- radioaktiven Southern Blot Hybridisierung unter Verwendung einer Digoxigenin Markierung hat sich für die Darstellung von Rekombinationen im *TEL*- Genlokus genomischer DNA als sensitive Vergleichsmethode bewiesen.

Es wurden insgesamt 122 Kinder mit dieser Methode auf das Vorliegen der Translokation t(12;21) untersucht. Bei einer nur relevante Faktoren berücksichtigenden Beschränkung des PatientInnenkollektivs auf protokollgerecht nach ALL- REZ BFM behandelte B- Vorläufer- Zell- ALL und Erstrezidive konnte eine Rekombination von *TEL* in 5 von 65 PatientInnen (7,7%) nachgewiesen werden. Lässt man die Einschlusskriterien der ALL- REZ BFM Studie unberücksichtigt, handelt es sich sogar um 7 von 71 (9,9%) PatientInnen. Damit bestätigen die hier vorliegenden Ergebnisse den Trend der aktuellen Diskussion über die Häufigkeit des Vorliegens des Fusionsgenes *TEL- AML1* bei Erstrezidiven, die eine kumulative Inzidenz bei einem 10-jährigen Untersuchungszeitraum von $9 \pm 5\%$ angeben.

Weiterhin konnte mit ereignisfreien Beobachtungszeiträumen nach dem 1. Rezidiv im Median von 8,6 Jahren ein Trend zu späten Rezidiven und somit eine mittelfristig günstige Prognose für die *TEL*- Rearrangement positiven Rezidivfälle konstatiert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass *TEL- AML1* positive PatientInnen eine Subgruppe darstellen, die lange erkrankungsfreie Intervalle mit zur Zeit üblichen Therapieprotokollen erreichen, nach Therapie der Ersterkrankung aber auch nach dem ersten Rezidiv.

Auf Grund der sich aus dem retrospektiven PatientInnenkollektiv ergebenden Selektion war es nicht möglich, statistisch signifikante Aussagen zur unabhängigen prognostischen Bedeutung für die langfristige Prognose von ALL im Kindesalter mit *TEL*- Rekombinationen zu treffen.

Literaturverzeichnis

- [1] Greaves, M. F. und Alexander, F. E. (1993): An infectious etiology for common acute lymphoblastic leukemia in childhood?, *Leukemia* (Band 7), Nr. 3, Seite 349-60.
- [2] Margolin, J.F. und Poplack, D.G. (1997): *Acute lymphoblastic leukemia, Principles and Practice of Pediatric Oncology*.
- [3] Ross, J. A.; Davies, S. M.; Potter, J. D. und Robison, L. L. (1994): Epidemiology of childhood leukemia, with a focus on infants, *Epidemiol Rev* (Band 16), Nr. 2, Seite 243-72. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0007713179>
- [4] Shu, X. O.; Ross, J. A.; Pendergrass, T. W.; Reaman, G. H.; Lampkin, B. und Robison, L. L. (1996): Parental alcohol consumption, cigarette smoking, and risk of infant leukemia: a Childrens Cancer Group study, *J Natl Cancer Inst* (Band 88), Nr. 1, Seite 24-31. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0008847721>
- [5] Ford, A. M.; Ridge, S. A.; Cabrera, M. E.; Mahmoud, H.; Steel, C. M.; Chan, L. C. und Greaves, M. (1993): In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias, *Nature* (Band 363), Nr. 6427, Seite 358-60. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0008497319>
- [6] Gill Super, H. J.; Rothberg, P. G.; Kobayashi, H.; Freeman, A. I.; Diaz, M. O. und Rowley, J. D. (1994): Clonal, nonconstitutional rearrangements of the MLL gene in infant twins with acute lymphoblastic leukemia: in utero chromosome rearrangement of 11q23, *Blood* (Band 83), Nr. 3, Seite 641-4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0008298125>
- [7] Gale, K. B.; Ford, A. M.; Repp, R.; Borkhardt, A.; Keller, C.; Eden, O. B. und Greaves, M. F. (1997): Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 94), Nr. 25, Seite 13950-4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0009391133>
- [8] Greaves, M. F. (1997): Aetiology of acute leukaemia, *Lancet* (Band 349), Nr. 9048, Seite 344-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9024390>
- [9] Ford, A.M.; Bennett, C.A.; Price, C.M.; Bruin, M.C.A.; van Wering, E.R. und Greaves, M. (1998): Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* (Band 95), Seite 4584-4588.
- [10] Wiemels, J. L.; Cazzaniga, G.; Daniotti, M.; Eden, O. B.; Addison, G. M.; Masera, G.; Saha, V.; Biondi, A. und Greaves, M. F. (1999): Prenatal origin of acute

- lymphoblastic leukaemia in children, *Lancet* (Band 354), Nr. 9189, Seite 1499-503.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10551495>
- [11] Meadows, A. T.; Kramer, S.; Hopson, R.; Lustbader, E.; Jarrett, P. und Evans, A. E. (1983): Survival in childhood acute lymphocytic leukemia: effect of protocol and place of treatment, *Cancer Invest* (Band 1), Nr. 1, Seite 49-55. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=6582988>
- [12] Kersey, J. H. (1997): Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia, *Blood* (Band 90), Nr. 11, Seite 4243-4251.
- [13] Reiter, A.; Schrappe, M.; Ludwig, W. D.; Lampert, F.; Harbott, J.; Henze, G.; Niemeyer, C. M.; Gadner, H.; Muller-Wehrich, S.; Ritter, J. und et al. (1992): Favorable outcome of B-cell acute lymphoblastic leukemia in childhood: a report of three consecutive studies of the BFM group, *Blood* (Band 80), Nr. 10, Seite 2471-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=1421370>
- [14] Wheeler, K.; Richards, S.; Bailey, C. und Chessells, J. (1998): Comparison of bone marrow transplant and chemotherapy for relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia: the MRC UKALL X experience. Medical Research Council Working Party on Childhood Leukaemia, *Br J Haematol* (Band 101), Nr. 1, Seite 94-103. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9576189>
- [15] Henze, G.; Fengler, R.; Hartmann, R.; Kornhuber, B.; Janka Schaub, G.; Niethammer, D. und Riehm, H. (1991): Six-year experience with a comprehensive approach to the treatment of recurrent childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL-REZ BFM 85). A relapse study of the BFM group, *Blood* (Band 78), Nr. 5, Seite 1166-72.
- [16] Rubnitz, J. E.; Behm, F. G.; Wichlan, D.; Ryan, C.; Sandlund, J. T.; Ribeiro, R. C.; Rivera, G. K.; Hancock, M. L.; Relling, M. V.; Evans, W. E.; Pui, C. H. und Downing, J. R. (1999): Low frequency of TEL-AML1 in relapsed acute lymphoblastic leukemia supports a favorable prognosis for this genetic subgroup, *Leukemia* (Band 13), Nr. 1, Seite 19-21.
- [17] Henze, G.; Fengler, R. und Adams, H.P. (1997): ALL-REZ BFM 96 - Studie zur Behandlung von Kindern mit Rezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie. Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH).
- [18] Gaynon, P. S.; Qu, R. P.; Chappell, R. J.; Willoughby, M. L.; Tubergen, D. G.; Steinherz, P. G. und Trigg, M. E. (1998): Survival after relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: impact of site and time to first relapse--the Children's Cancer Group Experience, *Cancer* (Band 82), Nr. 7, Seite 1387-95. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9529033>

-
- [19] Pui, C. H. (1995): Childhood leukemias, *N-Engl-J-Med* (Band 332), Nr. 24, Seite 1618-30.
- [20] Loning, L.; Zimmermann, M.; Reiter, A.; Kaatsch, P.; Henze, G.; Riehm, H. und Schrappe, M. (2000): Secondary neoplasms subsequent to Berlin-Frankfurt-Munster therapy of acute lymphoblastic leukemia in childhood: significantly lower risk without cranial radiotherapy, *Blood* (Band 95), Nr. 9, Seite 2770-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10779419>
<http://www.bloodjournal.org/cgi/content/full/95/9/2770>
<http://www.bloodjournal.org/cgi/content/abstract/95/9/2770>
- [21] Pui, C.H. und Evans, W.E. (1998): Acute lymphoblastic leukemia, *N-Engl-J-Med* (Band 339), Nr. 9, Seite 605.
- [22] Reiter, A.; Schrappe, M.; Ludwig, W. D.; Hiddemann, W.; Sauter, S.; Henze, G.; Zimmermann, M.; Lampert, F.; Havers, W. und Niethammer, D. (1994): Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86, *Blood* (Band 84), Nr. 9, Seite 3122-33.
- [23] Crist, W.; Shuster, J.; Look, T.; Borowitz, M.; Behm, F.; Bowman, P.; Frankel, L.; Pullen, J.; Krance, R.; Steuber, P. und et al. (1992): Current results of studies of immunophenotype-, age- and leukocyte- based therapy for children with acute lymphoblastic leukemia. The Pediatric Oncology Group, *Leukemia* (Band 6), Nr. Suppl 2, Seite 162-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0001578922>
- [24] Rivera, G. K.; Pinkel, D.; Simone, J. V.; Hancock, M. L. und Crist, W. M. (1993): Treatment of acute lymphoblastic leukemia. 30 years' experience at St. Jude Children's Research Hospital [see comments], *N Engl J Med* (Band 329), Nr. 18, Seite 1289-95. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0008413409>
- [25] Bennett, J. M.; Catovsky, D.; Daniel, M. T.; Flandrin, G.; Galton, D. A.; Gralnick, H. R. und Sultan, C. (1976): Proposals for the classification of the acute leukaemias. French- American-British (FAB) co-operative group, *Br J Haematol* (Band 33), Nr. 4, Seite 451-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0000188440>
- [26] Lilleyman, J. S.; Hann, I. M.; Stevens, R. F.; Eden, O. B. und Richards, S. M. (1986): French American British (FAB) morphological classification of childhood lymphoblastic leukaemia and its clinical importance, *J Clin Pathol* (Band 39), Nr. 9, Seite 998-1002. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0003463568>
- [27] Pui, C. H.; Behm, F. G. und Crist, W. M. (1993): Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Blood* (Band 82), Nr. 2, Seite 343-62. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0008329694>

-
- [28] Russell, N. H. (1997): Biology of acute leukaemia, *Lancet* (Band 349), Nr. 9045, Seite 118-22. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0008996433>
- [29] Pui, C. H.; Raimondi, S. C.; Head, D. R.; Schell, M. J.; Rivera, G. K.; Mirro, J., Jr.; Crist, W. M. und Behm, F. G. (1991): Characterization of childhood acute leukemia with multiple myeloid and lymphoid markers at diagnosis and at relapse [see comments], *Blood* (Band 78), Nr. 5, Seite 1327-37. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0001878594>
- [30] Rubnitz, J. E. und Look, A. T. (1998): Molecular genetics of childhood leukemias, *J Pediatr Hematol Oncol* (Band 20), Nr. 1, Seite 1-11.
- [31] Rabbitts, T. H. (1994): Chromosomal translocations in human cancer, *Nature* (Band 372), Nr. 6502, Seite 143-9.
- [32] Sawyers, C. L. (1997): Molecular genetics of acute leukaemia, *Lancet* . Jan (Band 349), Nr. 9046, Seite 196-200.
- [33] Golub, T. R.; Slonim, D. K.; Tamayo, P.; Huard, C.; Gaasenbeek, M.; Mesirov, J. P.; Coller, H.; Loh, M. L.; Downing, J. R.; Caligiuri, M. A.; Bloomfield, C. D. und Lander, E. S. (1999): Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring, *Science* (Band 286), Nr. 5439, Seite 531-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10521349>
- [34] Camitta, B. M.; Pullen, J. und Murphy, S. (1997): Biology and treatment of acute lymphocytic leukemia in children, *Semin Oncol* (Band 24), Nr. 1, Seite 83-91. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9045307>
- [35] Raimondi, S. C.; Shurtleff, S. A.; Downing, J. R.; Rubnitz, J.; Mathew, S.; Hancock, M.; Pui, C. H.; Rivera, G. K.; Grosveld, G. C. und Behm, F. G. (1997): 12p abnormalities and the TEL gene (ETV6) in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Blood* (Band 90), Nr. 11, Seite 4559-66.
- [36] Biondi, A. und Masera, G. (1998): Molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukemia, *Haematologica* (Band 83), Nr. 7, Seite 651-9.
- [37] Rubnitz, J. E.; Behm, F. G.; Pui, C. H.; Evans, W. E.; Relling, M. V.; Raimondi, S. C.; Harrison, P. L.; Sandlund, J. T.; Ribeiro, R. C.; Grosveld, G. und Downing, J. R. (1997): Genetic studies of childhood acute lymphoblastic leukemia with emphasis on p16, MLL, and ETV6 gene abnormalities: results of St Jude Total Therapy Study XII, *Leukemia* (Band 11), Nr. 8, Seite 1201-6.
- [38] Rubnitz, J. E. und Pui, C. H. (1997): Recent advances in the biology and treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia, *Curr Opin Hematol* (Band 4), Nr. 4, Seite 233-41.
- [39] Rubnitz, J. E. und Pui, C. H. (1999): Molecular diagnostics in the treatment of

- leukemia [In Process Citation], *Curr Opin Hematol* (Band 6), Nr. 4, Seite 229-35.
- [40] Chessells, J. M. (1998): Relapsed lymphoblastic leukaemia in children: a continuing challenge, *Br J Haematol* (Band 102), Nr. 2, Seite 423-38. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0009695956>
- [41] Henze, G.; Fengler, R. und Hartmann, R. (1994): Chemotherapy for relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: Results of the BFM Study Group, *Haematol Blood Transfus* (Band 36), Seite 374-9.
- [42] Raimondi, S. C. (1993): Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Blood* (Band 81), Nr. 9, Seite 2237-51.
- [43] Look, A.T. (1997): Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias, *Science* (Band 278), Seite 1059.
- [44] Hiramata, T. und Koeffler, H. P. (1995): Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer, *Blood* (Band 86), Nr. 3, Seite 841-54. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0007620180>
- [45] Hebert, J.; Cayuela, J. M.; Berkeley, J. und Sigaux, F. (1994): Candidate tumor-suppressor genes MTS1 (p16INK4A) and MTS2 (p15INK4B) display frequent homozygous deletions in primary cells from T- but not from B-cell lineage acute lymphoblastic leukemias [see comments], *Blood* (Band 84), Nr. 12, Seite 4038-44. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0007994022>
- [46] Latchman, D. S. (1993): Transcription factors: an overview, *Int J Exp Pathol* (Band 74), Nr. 5, Seite 417-22.
- [47] Papavassiliou, A.G. (1995): Molecular medicine. Transcription factors, *N-Engl-J-Med* (Band 332), Seite 45.
- [48] Ptashne, M. (1988): How eukaryotic transcriptional activators work, *Nature* (Band 335), Nr. 6192, Seite 683-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0003050531>
- [49] Sigler, P. B. (1988): Transcriptional activation. Acid blobs and negative noodles [news], *Nature* (Band 333), Nr. 6170, Seite 210-2. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0003367995>
- [50] Keleher, C. A.; Goutte, C. und Johnson, A. D. (1988): The yeast cell-type-specific repressor alpha 2 acts cooperatively with a non-cell-type-specific protein, *Cell* (Band 53), Nr. 6, Seite 927-36. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0003289753>
- [51] Treacy, M. N.; He, X. und Rosenfeld, M. G. (1991): I-POU: a POU-domain protein that inhibits neuron-specific gene activation, *Nature* (Band 350), Nr. 6319, Seite

577-84. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=1673230>

- [52] Murre C, McCaw PS, Baltimore D (1989): A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins, *Cell* (Band 56), Seite 777-783.
- [53] Mitchell, P. J. und Tjian, R. (1989): Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins, *Science* (Band 245), Nr. 4916, Seite 371-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0002667136>
- [54] Golub, T. R.; Barker, G. F.; Lovett, M. und Gilliland, D. G. (1994): Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation, *Cell* (Band 77), Nr. 2, Seite 307-16.
- [55] Romana, S. P.; Poirel, H.; Leconiat, M.; Flexor, M. A.; Mauchauffe, M.; Jonveaux, P.; Macintyre, E. A.; Berger, R. und Bernard, O. A. (1995): High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia, *Blood* (Band 86), Nr. 11, Seite 4263-9.
- [56] Romana, S. P.; Mauchauffe, M.; Le Coniat, M.; Chumakov, I.; Le Paslier, D.; Berger, R. und Bernard, O. A. (1995): The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion, *Blood* (Band 85), Nr. 12, Seite 3662-70.
- [57] Wasylyk, B.; Hahn, S.L. und Giovane, A. (1993): The ETS family of transcription factors, *Eur J Biochem* (Band 211), Seite 7-18.
- [58] Raouf, A.; Li, V.; Kola, I.; Watson, D. K. und Seth, A. (2000): The Ets1 proto-oncogene is upregulated by retinoic acid: characterization of a functional retinoic acid response element in the Ets1 promoter, *Oncogene* (Band 19), Nr. 15, Seite 1969-74. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0010773887>
- [59] Donaldson, L. W.; Petersen, J. M.; Graves, B. J. und McIntosh, L. P. (1994): Secondary structure of the ETS domain places murine Ets-1 in the superfamily of winged helix-turn-helix DNA-binding proteins, *Biochemistry* (Band 33), Nr. 46, Seite 13509-16. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0007947760>
- [60] Donaldson, L. W.; Petersen, J. M.; Graves, B. J. und McIntosh, L. P. (1996): Solution structure of the ETS domain from murine Ets-1: a winged helix- turn-helix DNA binding motif, *Embo J* (Band 15), Nr. 1, Seite 125-34. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0008598195>
http://www.oup.co.uk/jnls/list/embojo/hdb/Volume_15/Issue_01/150125.sgm.abs.html
- [61] Liang, H.; Mao, X.; Olejniczak, E. T.; Nettlesheim, D. G.; Yu, L.; Meadows, R. P.; Thompson, C. B. und Fesik, S. W. (1994): Solution structure of the ets domain of

- Fli-1 when bound to DNA, *Nat Struct Biol* (Band 1), Nr. 12, Seite 871-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0007773776>
- [62] Boulukos, K. E.; Pognonec, P.; Rabault, B.; Begue, A. und Ghysdael, J. (1989): Definition of an Ets1 protein domain required for nuclear localization in cells and DNA-binding activity in vitro, *Mol Cell Biol* (Band 9), Nr. 12, Seite 5718-21. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0002555704>
- [63] Seth, A. und Papas, T. S. (1990): The c-ets-1 proto-oncogene has oncogenic activity and is positively autoregulated, *Oncogene* (Band 5), Nr. 12, Seite 1761-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0002284095>
- [64] Jousset, C.; Carron, C.; Boureux, A.; Quang, C. T.; Oury, C.; Dusanter Fourt, I.; Charon, M.; Levin, J.; Bernard, O. und Ghysdael, J. (1997): A domain of TEL conserved in a subset of ETS proteins defines a specific oligomerization interface essential to the mitogenic properties of the TEL-PDGFR beta oncoprotein, *Embo J* (Band 16), Nr. 1, Seite 69-82.
- [65] Carroll, M.; Tomasson, M. H.; Barker, G. F.; Golub, T. R. und Gilliland, D. G. (1996): The TEL/platelet-derived growth factor beta receptor (PDGF beta R) fusion in chronic myelomonocytic leukemia is a transforming protein that self-associates and activates PDGF beta R kinase-dependent signaling pathways, *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A* (Band 93), Nr. 25, Seite 14845-50.
- [66] Golub, T. R.; McLean, T.; Stegmaier, K.; Carroll, M.; Tomasson, M. und Gilliland, D. G. (1996): The TEL gene and human leukemia, *Biochim-Biophys-Acta* (Band 1288), Nr. 1, Seite M7-10.
- [67] Golub, T. R.; Goga, A.; Barker, G. F.; Afar, D. E.; McLaughlin, J.; Bohlander, S. K.; Rowley, J. D.; Witte, O. N. und Gilliland, D. G. (1996): Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the Ets protein TEL in human leukemia, *Mol Cell Biol* (Band 16), Nr. 8, Seite 4107-16.
- [68] Golub, T. R.; Barker, G. F.; Stegmaier, K. und Gilliland, D. G. (1996): Involvement of the TEL gene in hematologic malignancy by diverse molecular genetic mechanisms, *Curr Top Microbiol Immunol* (Band 211), Seite 279-88.
- [69] Poirel, H.; Oury, C.; Carron, C.; Duprez, E.; Laabi, Y.; Tsapis, A.; Romana, S. P.; Mauchauffe, M.; Le Coniat, M.; Berger, R.; Ghysdael, J. und Bernard, O. A. (1997): The TEL gene products: nuclear phosphoproteins with DNA binding properties, *Oncogene* (Band 14), Nr. 3, Seite 349-57.
- [70] Wang, L. C.; Swat, W.; Fujiwara, Y.; Davidson, L.; Visvader, J.; Kuo, F.; Alt, F. W.; Gilliland, D. G.; Golub, T. R. und Orkin, S. H. (1998): The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow, *Genes Dev* (Band 12), Nr. 15, Seite 2392-402.

- [71] Fears, S.; Gavin, M.; Zhang, D.E.; Hetherington, C.; Ben David, Y.; Rowley, J.D. und Nucifora, G. (1997): Functional characterization of ETV6 and ETV6/CBFA2 in the regulation of the MCSFR proximal promotor, *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A* (Band 94), Seite 1949.
- [72] Kwiatkowski, B. A.; Bastian, L. S.; Bauer, T. R.; Tsai, S.; Zielinska-Kwiatkowska, A. G. und Hickstein, D. D. (1998): The ets family member Tel binds to the Fli-1 oncoprotein and inhibits its transcriptional activity, *J Biol Chem* (Band 273), Nr. 28, Seite 17525-30. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9651344>
<http://www.jbc.org/cgi/content/full/273/28/17525>
- [73] Papadopoulos, P.; Ridge, S. A.; Boucher, C. A.; Stocking, C. und Wiedemann, L. M. (1995): The novel activation of ABL by fusion to an ets-related gene, TEL, *Cancer-Res* (Band 55), Nr. 1, Seite 34-8.
- [74] Buijs, A.; Sherr, S.; van Baal, S.; van Bezouw, S.; van der Plas, D.; Geurts van Kessel, A.; Riegman, P.; Lekanne Deprez, R.; Zwarthoff, E.; Hagemeijer, A. und Grosveld, G. (1995): Translocation (12;22) (p13;q11) in myeloproliferative disorders results in fusion of the ETS-like TEL gene on 12p13 to the MN1 gene on 22q11 [published erratum appears in *Oncogene* 1995 Aug 17;11(4):809], *Oncogene* (Band 10), Nr. 8, Seite 1511-9.
- [75] O'Connor, H. E.; Butler, T. A.; Clark, R.; Swanton, S.; Harrison, C. J.; Secker Walker, L. M. und Foroni, L. (1998): Abnormalities of the ETV6 gene occur in the majority of patients with aberrations of the short arm of chromosome 12: a combined PCR and Southern blotting analysis, *Leukemia* (Band 12), Nr. 7, Seite 1099-106.
- [76] Peeters, P.; Raynaud, S. D.; Cools, J.; Wlodarska, I.; Grosgeorge, J.; Philip, P.; Monpoux, F.; Van Rompaey, L.; Baens, M.; Van den Berghe, H. und Marynen, P. (1997): Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia, *Blood* (Band 90), Nr. 7, Seite 2535-40.
- [77] Lacronique, V.; Boureux, A.; Valle, V. D.; Poirel, H.; Quang, C. T.; Mauchauffe, M.; Berthou, C.; Lessard, M.; Berger, R.; Ghysdael, J. und Bernard, O. A. (1997): A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia, *Science* (Band 278), Nr. 5341, Seite 1309-12. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0009360930>
- [78] Baccichet, A. und Sinnett, D. (1997): Frequent deletion of chromosome 12p12.3 in children with acute lymphoblastic leukaemia, *Br J Haematol* (Band 99), Nr. 1, Seite 107-14.
- [79] Peeters, P.; Wlodarska, I.; Baens, M.; Criel, A.; Selleslag, D.; Hagemeijer, A.; Van den Berghe, H. und Marynen, P. (1997): Fusion of ETV6 to MDS1/EVI1 as a result of t(3;12)(q26;p13) in myeloproliferative disorders, *Cancer Res* (Band 57), Nr. 4, Seite 564-9.

-
- [80]Raynaud, S.; Cave, H.; Baens, M.; Bastard, C.; Cacheux, V.; Grosgeorge, J.; Guidal Giroux, C.; Guo, C.; Vilmer, E.; Marynen, P. und Grandchamp, B. (1996): The 12;21 translocation involving TEL and deletion of the other TEL allele: two frequently associated alterations found in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Blood* (Band 87), Nr. 7, Seite 2891-9.
- [81]Poirel, H.; Lacronique, V.; Mauchauffe, M.; Le Coniat, M.; Raffoux, E.; Daniel, M. T.; Erickson, P.; Drabkin, H.; MacLeod, R. A.; Drexler, H. G.; Ghysdael, J.; Berger, R. und Bernard, O. A. (1998): Analysis of TEL proteins in human leukemias, *Oncogene* (Band 16), Nr. 22, Seite 2895-903.
- [82]Kobayashi, H.; Satake, N.; Maseki, N.; Sakashita, A. und Kaneko, Y. (1996): The der(21)t(12;21) chromosome is always formed in a 12;21 translocation associated with childhood acute lymphoblastic leukaemia, *Br J Haematol* (Band 94), Nr. 1, Seite 105-11.
- [83]Miyoshi, H.; Shimizu, K.; Kozu, T.; Maseki, N.; Kaneko, Y. und Ohki, M. (1991): The t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1, *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A* (Band 88), Nr. 23, Seite 10431-4.
- [84]Miyoshi, H.; Ohira, M.; Shimizu, K.; Mitani, K.; Hirai, H.; Imai, T.; Yokoyama, K.; Soeda, E. und Ohki, M. (1995): Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia, *Nucleic-Acids-Res* (Band 23), Nr. 14, Seite 2762-9.
- [85]Crute, B. E.; Lewis, A. F.; Wu, Z. N.; Bushweller, J. H. und Speck, N. A. (1996): Biochemical and biophysical properties of the core binding factor alpha 2 (aml1) dna binding domain, *Journal Of Biological Chemistry*. Oct (Band 271), Nr. 42, Seite 26251-26260.
- [86]Daga, A.; Karlovich, C. A.; Dumstrei, K. und Banerjee, U. (1996): Patterning of cells in the *Drosophila* eye by Lozenge, which shares homologous domains with AML1, *Genes Dev* (Band 10), Nr. 10, Seite 1194-205. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0008675007>
- [87]Tanaka, T.; Kurokawa, M.; Ueki, K.; Tanaka, K.; Imai, Y.; Mitani, K.; Okazaki, K.; Sagata, N.; Yazaki, Y.; Shibata, Y.; Kadowaki, T. und Hirai, H. (1996): The extracellular signal-regulated kinase pathway phosphorylates AML1, an acute myeloid leukemia gene product, and potentially regulates its transactivation ability, *Mol-Cell-Biol* (Band 16), Nr. 7, Seite 3967-79.
- [88]Zeng, C.; van Wijnen, A. J.; Stein, J. L.; Meyers, S.; Sun, W.; Shopland, L.; Lawrence, J. B.; Penman, S.; Lian, J. B.; Stein, G. S. und Hiebert, S. W. (1997): Identification of a nuclear matrix targeting signal in the leukemia and bone-related AML/CBF-alpha transcription factors, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 94), Nr. 13, Seite 6746-51.
- [89]Chen, Q.; Cheng, J. T.; Tasi, L. H.; Schneider, N.; Buchanan, G.; Carroll, A.; Crist,

- W.; Ozanne, B.; Siciliano, M. J. und Baer, R. (1990): The tal gene undergoes chromosome translocation in T cell leukemia and potentially encodes a helix-loop-helix protein, *Embo J* (Band 9), Nr. 2, Seite 415-24.
- [90] Tanaka, T.; Tanaka, K.; Ogawa, S.; Kurokawa, M.; Mitani, K.; Yazaki, Y.; Shibata, Y. und Hirai, H. (1997): An acute myeloid leukemia gene, AML1, regulates transcriptional activation and hemopoietic myeloid cell differentiation antagonistically by two alternative spliced forms, *Leukemia* (Band 3), Seite 299-302.
- [91] Lu, Q.; Knoepfler, P. S.; Scheele, J.; Wright, D. D. und Kamps, M. P. (1995): Both Pbx1 and E2A-Pbx1 bind the DNA motif ATCAATCAA cooperatively with the products of multiple murine Hox genes, some of which are themselves oncogenes, *Mol Cell Biol* (Band 15), Nr. 7, Seite 3786-95.
- [92] Chiba, N.; Watanabe, T.; Nomura, S.; Tanaka, Y.; Minowa, M.; Niki, M.; Kanamaru, R. und Satake, M. (1997): Differentiation dependent expression and distinct subcellular localization of the protooncogene product, PEBP2beta/CBFbeta, in muscle development, *Oncogene* (Band 14), Nr. 21, Seite 2543-52. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0009191054>
- [93] Kitabayashi, I.; Yokoyama, A.; Shimizu, K. und Ohki, M. (1998): Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation, *Embo J* (Band 17), Nr. 11, Seite 2994-3004.
- [94] Levanon, D.; Negreanu, V.; Bernstein, Y.; Bar Am, I.; Avivi, L. und Groner, Y. (1994): AML1, AML2, and AML3, the human members of the runt domain gene-family: cDNA structure, expression, and chromosomal localization, *Genomics* (Band 23), Nr. 2, Seite 425-32.
- [95] Takahashi, A.; Satake, M.; Yamaguchi-Iwai, Y.; Bae, S. C.; Lu, J.; Maruyama, M.; Zhang, Y. W.; Oka, H.; Arai, N.; Arai, K. und et al. (1995): Positive and negative regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter activity by AML1-related transcription factor, PEBP2, *Blood* (Band 86), Nr. 2, Seite 607-16. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0007605990>
- [96] Ogawa, E.; Maruyama, M.; Kagoshima, H.; Inuzuka, M.; Lu, J.; Satake, M.; Shigesada, K. und Ito, Y. (1993): PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the *Drosophila* runt gene and the human AML1 gene, *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A* (Band 90), Nr. 14, Seite 6859-63.
- [97] Wang, Q.; Stacy, T.; Miller, J. D.; Lewis, A. F.; Gu, T. L.; Huang, X. M.; Bushweller, J. H.; Bories, J. C.; Alt, F. W.; Ryan, G.; Liu, P. P.; Wynshawboris, A.; Binder, M.; Marinpadilla, M.; Sharpe, A. H. und Speck, N. A. (1996): The cbf beta subunit is essential for cbf alpha 2 (aml1) function in vivo, *Cell* . Nov (Band 87), Nr. 4, Seite 697-708.
- [98] Meyers, S.; Lenny, N. und Hiebert, S. W. (1995): The t(8;21) fusion protein interferes with AML-1B-dependent transcriptional activation, *Mol-Cell-Biol* (Band

- 15), Nr. 4, Seite 1974-82.
- [99] Sun, W.; O'Connell, M. und Speck, N. A. (1993): Characterization of a protein that binds multiple sequences in mammalian type C retrovirus enhancers, *J Virol* (Band 67), Nr. 4, Seite 1976-86. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=8445719>
- [100] Carey, M. (1998): The enhanceosome and transcriptional synergy, *Cell* (Band 92), Nr. 1, Seite 5-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9489694>
- [101] Meyers, S.; Downing, J. R. und Hiebert, S. W. (1993): Identification of AML-1 and the (8;21) translocation protein (AML- 1/ETO) as sequence-specific DNA-binding proteins: the runt homology domain is required for DNA binding and protein-protein interactions, *Mol Cell Biol* (Band 13), Nr. 10, Seite 6336-45. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=8413232>
- [102] Daga, A.; Tighe, J. E. und Calabi, F. (1992): Leukaemia/Drosophila homology, *Nature* (Band 356), Nr. 6369, Seite 484. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=1560822>
- [103] Corsetti, M.T. und Calabi, F. (1997): Lineage and stage specific expression of runt box polypeptides in primitive and definitive hematopoiesis, *Blood* (Band 89), Seite 321.
- [104] Okuda, T.; van Deursen, J.; Hiebert, S. W.; Grosveld, G. und Downing, J. R. (1996): AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis, *Cell* (Band 84), Nr. 2, Seite 321-30.
- [105] Sasaki, K.; Yagi, H.; Bronson, R. T.; Tominaga, K.; Matsunashi, T.; Deguchi, K.; Tani, Y.; Kishimoto, T. und Komori, T. (1996): Absence of fetal liver hematopoiesis in mice deficient in transcriptional coactivator core binding factor beta, *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A* (Band 93), Nr. 22, Seite 12359-63.
- [106] Tanaka, T.; Tanaka, K.; Ogowa, S.; Kurokawa, M.; Mitani, K.; Nishida, J.; Shibata, Y.; Yazaki, Y. und Hirai, H. (1995): An acute myeloid leukemia gene, AML1, regulates hemopoietic myeloid cell differentiation and transkriptional activation antagonistically by two alternative spliced forms, *EMBO-J* (Band 14), Seite 341.
- [107] Chen, J. und Ruley, H. E. (1998): An enhancer element in the EphA2 (Eck) gene sufficient for rhombomere-specific expression is activated by HOXA1 and HOXB1 homeobox proteins, *J Biol Chem* (Band 273), Nr. 38, Seite 24670-5.
- [108] Liebermann, D. A. und Hoffman, B. (1998): MyD genes in negative growth control, *Oncogene* (Band 17), Nr. 25, Seite 3319-29. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9916994>
- [109] Okuda, T.; Cai, Z.; Yang, S.; Lenny, N.; Lyu, C. J.; van Deursen, J. M.; Harada, H.

- und Downing, J. R. (1998): Expression of a knocked-in AML1-ETO leukemia gene inhibits the establishment of normal definitive hematopoiesis and directly generates dysplastic hematopoietic progenitors, *Blood* (Band 91), Nr. 9, Seite 3134-43.
- [110] Kanno, T.; Kanno, Y.; Chen, L. F.; Ogawa, E.; Kim, W. Y. und Ito, Y. (1998): Intrinsic transcriptional activation-inhibition domains of the polyomavirus enhancer binding protein 2/core binding factor alpha subunit revealed in the presence of the beta subunit, *Mol Cell Biol* (Band 18), Nr. 5, Seite 2444-54. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9566865>
- [111] Adya, N.; Stacy, T.; Speck, N. A. und Liu, P. P. (1998): The leukemic protein core binding factor beta (CBFbeta)-smooth-muscle myosin heavy chain sequesters CBFalpha2 into cytoskeletal filaments and aggregates, *Mol Cell Biol* (Band 18), Nr. 12, Seite 7432-43. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9819429>
<http://mcb.asm.org/cgi/content/full/18/12/7432>
- [112] Liu, P.; Tarle, S. A.; Hajra, A.; Claxton, D. F.; Marlton, P.; Freedman, M.; Siciliano, M. J. und Collins, F. S. (1993): Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia, *Science* (Band 261), Nr. 5124, Seite 1041-4.
- [113] Shurtleff, S. A.; Buijs, A.; Behm, F. G.; Rubnitz, J. E.; Raimondi, S. C.; Hancock, M. L.; Chan, G. C.; Pui, C. H.; Grosveld, G. und Downing, J. R. (1995): TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis, *Leukemia* (Band 9), Nr. 12, Seite 1985-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0008609706>
- [114] Nakao, M.; Yokota, S.; Horiike, S.; Taniwaki, M.; Kashima, K.; Sonoda, Y.; Koizumi, S.; Takaue, Y.; Matsushita, T.; Fujimoto, T. und Misawa, S. (1996): Detection and quantification of TEL/AML1 fusion transcripts by polymerase chain reaction in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia* (Band 10), Nr. 9, Seite 1463-70.
- [115] McLean, T. W.; Ringold, S.; Neuberg, D.; Stegmaier, K.; Tantravahi, R.; Ritz, J.; Koeffler, H. P.; Takeuchi, S.; Janssen, J. W.; Seriu, T.; Bartram, C. R.; Sallan, S. E.; Gilliland, D. G. und Golub, T. R. (1996): TEL/AML-1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Blood* (Band 88), Nr. 11, Seite 4252-8.
- [116] Rubnitz, J. E.; Downing, J. R.; Pui, C. H.; Shurtleff, S. A.; Raimondi, S. C.; Evans, W. E.; Head, D. R.; Crist, W. M.; Rivera, G. K.; Hancock, M. L.; Boyett, J. M.; Buijs, A.; Grosveld, G. und Behm, F. G. (1997): TEL gene rearrangement in acute lymphoblastic leukemia: a new genetic marker with prognostic significance, *J Clin Oncol* (Band 15), Nr. 3, Seite 1150-7.
- [117] Rubnitz, J. E.; Shuster, J. J.; Land, V. J.; Link, M. P.; Pullen, D. J.; Camitta, B. M.; Pui, C. H.; Downing, J. R. und Behm, F. G. (1997): Case-control study suggests a

- favorable impact of TEL rearrangement in patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia treated with antimetabolite-based therapy: a Pediatric Oncology Group study, *Blood* (Band 89), Nr. 4, Seite 1143-6.
- [118]Raynaud, S.; Mauvieux, L.; Cayuela, J. M.; Bastard, C.; Bilhou Naber, C.; Debuire, B.; Bories, D.; Boucheix, C.; Charrin, C.; Fiere, D. und Gabert, J. (1996): TEL/AML1 fusion gene is a rare event in adult acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia* (Band 10), Nr. 9, Seite 1529-30.
- [119]Aguilar, R. C. T.; Sohal, J.; Vanrhee, F.; Carapeti, M.; Franklin, I. M.; Goldstone, A. H.; Goldman, J. M. und Cross, N. C. P. (1996): Tel aml1 fusion in acute lymphoblastic leukaemia of adults, *British Journal Of Haematology*. Dec (Band 95), Nr. 4, Seite 673-677.
- [120]Golub, T. R.; Barker, G. F.; Bohlander, S. K.; Hiebert, S. W.; Ward, D. C.; Bray Ward, P.; Morgan, E.; Raimondi, S. C.; Rowley, J. D. und Gilliland, D. G. (1995): Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia, *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A* (Band 92), Nr. 11, Seite 4917-21.
- [121]Bernard, O. A.; Romana, S. P.; Poirel, H. und Berger, R. (1996): Molecular cytogenetics of t(12;21) (p13;q22), *Leuk Lymphoma* (Band 23), Nr. 5-6, Seite 459-65.
- [122]Bartolo, C. (1999): TEL-AML1 alternative transcripts in pediatric ALL: Significance for minimal residual disease testing., *The American Society of Hematology*.
- [123]Hiebert, S. W.; Sun, W.; Davis, J. N.; Golub, T.; Shurtleff, S.; Buijs, A.; Downing, J. R.; Grosveld, G.; Roussel, M. F.; Gilliland, D. G.; Lenny, N. und Meyers, S. (1996): The t(12;21) translocation converts AML-1B from an activator to a repressor of transcription, *Mol Cell Biol* (Band 16), Nr. 4, Seite 1349-55.
- [124]Bemardin, F. (1999): TEL-AML1 binds endogenous TEL and slows the proliferation of Ba/F3 pro-B cells., *The American Society of Hematology*.
- [125]Meyers, S.; Lenny, N.; Sun, W. und Hiebert, S. W. (1996): AML-2 is a potential target for transcriptional regulation by the t(8;21) and t(12;21) fusion proteins in acute leukemia, *Oncogene* (Band 13), Nr. 2, Seite 303-12.
- [126]Seeger, K.; Buchwald, D.; Peter, A.; Taube, T.; von Stackelberg, A.; Schmitt, G. und Henze, G. (1999): TEL-AML1 fusion in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia [letter; comment], *Blood* (Band 94), Nr. 1, Seite 374-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0010428549>
- [127]Stegmaier, K.; Takeuchi, S.; Golub, T. R.; Bohlander, S. K.; Bartram, C. R. und Koeffler, H. P. (1996): Mutational analysis of the candidate tumor suppressor genes TEL and KIP1 in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Cancer-Res* (Band 56), Nr. 6, Seite 1413-7.
- [128]Romana, S. P.; Le Coniat, M.; Poirel, H.; Marynen, P.; Bernard, O. und Berger, R.

- (1996): Deletion of the short arm of chromosome 12 is a secondary event in acute lymphoblastic leukemia with t(12;21), *Leukemia* (Band 10), Nr. 1, Seite 167-70.
- [129] Yonemura, Y.; Ku, H.; Hirayama, F.; Souza, L. M. und Ogawa, M. (1996): Interleukin 3 or interleukin 1 abrogates the reconstituting ability of hematopoietic stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 93), Nr. 9, Seite 4040-4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=8633013>
- [130] Uchida, H.; Zhang, J. und Nimer, S. D. (1997): AML1A and AML1B can transactivate the human IL-3 promoter, *J Immunol* (Band 158), Nr. 5, Seite 2251-8.
- [131] Borkhardt, A.; Cazzaniga, G.; Viehmann, S.; Valsecchi, M.G.; Ludwig, W-D.; Burci, L.; Mangioni, s.; Schrappe, M.; Riehm, M.; Lampert, M.; Basso, G.; Masera, G.; Harbott, G. und Biondi, A. (1997): Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in German and Italian multicenter therapy trials, *Blood* (Band 90), Seite 571.
- [132] Takahashi, Y.; Horibe, K.; Kiyoi, H.; Miyashita, Y.; Fukuda, M.; Mori, H.; Nozaki, C.; Hasegawa, S.; Kawabe, T.; Kato, K.; Kojima, S.; Matuyama, T. und Naoe, T. (1998): Prognostic significance of TEL/AML1 fusion transcript in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia, *J Pediatr Hematol Oncol* (Band 20), Nr. 3, Seite 190-5.
- [133] Pui, C. H.; Rubnitz, J. E.; Hancock, M. L.; Downing, J. R.; Raimondi, S. C.; Rivera, G. K.; Sandlund, J. T.; Ribeiro, R. C.; Head, D. R.; Relling, M. V.; Evans, W. E. und Behm, F. G. (1998): Reappraisal of the clinical and biologic significance of myeloid-associated antigen expression in childhood acute lymphoblastic leukemia, *J Clin Oncol* (Band 16), Nr. 12, Seite 3768-73.
- [134] Baruchel, A.; Cayuela, J. M.; Ballerini, P.; Landman-Parker, J.; Cezard, V.; Firat, H.; Haddad, E.; Auclerc, M. F.; Valensi, F.; Cayre, Y. E.; Macintyre, E. A. und Sigaux, F. (1997): The majority of myeloid-antigen-positive (My+) childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemias express TEL-AML1 fusion transcripts, *Br J Haematol* (Band 99), Nr. 1, Seite 101-6.
- [135] Smith, M.; Arthur, D.; Camitta, B.; Carroll, A. J.; Crist, W.; Gaynon, P.; Gelber, R.; Heerema, N.; Korn, E. L.; Link, M.; Murphy, S.; Pui, C. H.; Pullen, J.; Reamon, G.; Sallan, S. E.; Sather, H.; Shuster, J.; Simon, R.; Trigg, M.; Tubergen, D.; Uckun, F. und Ungerleider, R. (1996): Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia [see comments], *J-Clin-Oncol* (Band 14), Nr. 1, Seite 18-24.
- [136] Seeger, K.; Adams, H. P.; Buchwald, D.; Beyermann, B.; Kremens, B.; Niemeyer, C.; Ritter, J.; Schwabe, D.; Harms, D.; Schrappe, M. und Henze, G. (1998): TEL-AML1 fusion transcript in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. The Berlin-Frankfurt-Munster Study Group, *Blood* (Band 91), Nr. 5, Seite 1716-22.
- [137] Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J Mol Biol* (Band 98), Nr. 3, Seite 503-17. URL:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0001195397>

- [138] Hodges, K. A.; Kosciol, C. M.; Rezuks, W. N.; Abernathy, E. C.; Pastuszak, W. T. und Tsongalis, G. J. (1996): Chemiluminescent detection of gene rearrangements in hematologic malignancy, *Ann Clin Lab Sci* (Band 26), Nr. 2, Seite 114-8.
- [139] Uchida, H.; Zhang, J. und Nimer, S. D. (1997): Aml1a and aml1b can transactivate the human il 3 promoter, *Journal Of Immunology*. Mar (Band 158), Nr. 5, Seite 2251-2258.
- [140] Liang, D. C.; Chou, T. B.; Chen, J. S.; Shurtleff, S. A.; Rubnitz, J. E.; Downing, J. R.; Pui, C. H. und Shih, L. Y. (1996): High incidence of TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia in Taiwan, *Leukemia* (Band 10), Nr. 6, Seite 991-3.
- [141] Fears, S.; Vignon, C.; Bohlander, S. K.; Smith, S.; Rowley, J. D. und Nucifora, G. (1996): Correlation between the ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) fusion gene and karyotypic abnormalities in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, *Genes Chromosomes Cancer* (Band 17), Nr. 2, Seite 127-35.
- [142] Ayigad, S.; Kuperstein, G.; Zilberstein, J.; Liberzon, E.; Stark, B.; Gelernter, I.; Kodman, Y.; Luria, D.; Ash, S.; Stein, J.; Goshen, Y.; Yaniv, I.; Cohen, I. J. und Zaizov, R. (1999): TEL-AML1 fusion transcript designates a favorable outcome with an intensified protocol in childhood acute lymphoblastic leukemia [letter], *Leukemia* (Band 13), Nr. 3, Seite 481-3.
- [143] Rubnitz, J. E.; Pui, C. H. und Downing, J. R. (1999): The role of TEL fusion genes in pediatric leukemias, *Leukemia* (Band 13), Nr. 1, Seite 6-13.
- [144] Cayuela, J. M.; Baruchel, A.; Orange, C.; Madani, A.; Auclerc, M. F.; Daniel, M. T.; Schaison, G. und Sigaux, F. (1996): TEL-AML1 fusion RNA as a new target to detect minimal residual disease in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, *Blood* (Band 88), Nr. 1, Seite 302-8.
- [145] Satake, N.; Kobayashi, H.; Tsunematsu, Y.; Kawasaki, H. und Horikoshi, Y. (1997): Minimal residual disease with TEL-AML1 fusion transcript in childhood acute lymphoblastic leukemia with t(12;21), *British J. Haematol.* (Band 97), Seite 607.
- [146] Zuna, J.; Hrusak, O.; Kalinova, M.; Muzikova, K.; Stary, J. und Trka, J. (1999): TEL/AML1 positivity in childhood ALL: average or better prognosis? Czech Paediatric Haematology Working Group, *Leukemia* (Band 13), Nr. 1, Seite 22-4.
- [147] Loh, M.L. (1999): Response Letter, *Blood* (Band 94), Nr. 1, Seite 375-376.
- [148] Seeger, K.; Buchwald, D.; Taube, T.; Peter, A.; von Stackelberg, A.; Schmitt, G.; Kochling, J. und Henze, G. (1999): TEL-AML1 positivity in relapsed B cell precursor acute lymphoblastic leukemia in childhood. Berlin-Frankfurt-Munster Study Group [letter] [see comments], *Leukemia* (Band 13), Nr. 9, Seite 1469-70. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0010483004>

-
- [149] Rubnitz, J. E.; Downing, J. R. und Pui, C. H. (1999): Significance of the TEL-AML fusion gene in childhood AML, *Leukemia* (Band 13), Nr. 9, Seite 1470-1. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10483005>
- [150] Loh, M. L.; Silverman, L. B.; Young, M. L.; Neuberg, D.; Golub, T. R.; Sallan, S. E. und Gilliland, D. G. (1998): Incidence of TEL/AML1 fusion in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia, *Blood* (Band 92), Nr. 12, Seite 4792-7.
- [151] Harbott, J.; Viehmann, S.; Borkhardt, A.; Henze, G. und Lampert, F. (1997): Incidence of TEL/AML1 fusion gene analyzed consecutively in children with acute lymphoblastic leukemia in relapse, *Blood* (Band 90), Nr. 12, Seite 4933-7.
- [152] Nygaard, R.; Moe, P. J.; Brincker, H.; Clausen, N.; Nyman, R.; Perkkio, M.; Eilertsen, M. E.; Johansen, O. J.; Vare, M.; Brinch, L. und et al. (1989): Late relapses after treatment for acute lymphoblastic leukemia in childhood: a population-based study from the Nordic countries, *Med Pediatr Oncol* (Band 17), Nr. 1, Seite 45-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0002913474>
- [153] Berger, R.; Leconiat, M.; Romana, S. P. und Jonveaux, P. (1996): Secondary acute myeloblastic leukemia with t(16 21)(q24 q22) involving the aml1 gene, *Hematology And Cell Therapy. Apr* (Band 38), Nr. 2, Seite 183-186.
- [154] Zent, C.; Kim, N.; Hiebert, S.; Zhang, D. E.; Tenen, D. G.; Rowley, J. D. und Nucifora, G. (1996): Rearrangement of the AML1/CBFA2 gene in myeloid leukemia with the 3;21 translocation: expression of co-existing multiple chimeric genes with similar functions as transcriptional repressors, but with opposite tumorigenic properties, *Curr Top Microbiol Immunol* (Band 211), Seite 243-52.
- [155] Filatov, L. V.; Saito, M.; Behm, F. G.; Rivera, G. K. und Raimondi, S. C. (1996): A subtle deletion of 12p by routine cytogenetics is found to be a translocation to 21q by fluorescence in situ hybridization: t(12;21)(p13;q22), *Cancer-Genet-Cytogenet* (Band 89), Nr. 2, Seite 136-40.

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.