

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Rainer Haas

MUTATIONEN DER MITOCHONDRIALEN DNA
BEI CHRONISCHER MYELOISCHER LEUKÄMIE
UND ANDEREN MYELOPROLIFERATIVEN
NEOPLASIEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Anna Christina Küpper

2011

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Norbert Gattermann

Koreferent: Prof. Dr. med. Mathias Cohnen

Wesentliche Teile dieser Dissertation wurden im April 2008 in *Experimental Hematology* veröffentlicht: **Wulfert M, Küpper AC, Tapprich C, Bottomley SS et al.** Analysis of mitochondrial DNA in 104 patients with myelodysplastic syndromes. *Exp Hematol.* (2008), 36, 577-586

I Inhaltsverzeichnis

II	Abbildungsverzeichnis	6
III	Tabellenverzeichnis	8
IV	Abkürzungsverzeichnis	9
V	Aminosäurencode	12

1 Einleitung 13

1.1	Die Mitochondrien	13
1.1.1	Aufbau und Herkunft	13
1.1.2	Die mitochondriale DNA des Menschen	15
1.1.3	Heteroplasmie und replikative Segregation	19
1.1.4	Mutationen der mitochondrialen DNA	20
1.1.5	Mitochondriale Funktionsstörungen durch Mutationen der nukleären DNA	22
1.1.6	Die mitochondriale Theorie des Alterns	22
1.2	Das myelodysplastische Syndrom	24
1.2.1	Epidemiologie und Klinik	24
1.2.2	Einteilung der myelodysplastischen Syndrome	24
1.2.3	Therapie und Prognose	25
1.2.4	Molekularbiologie	26
1.3	Die chronische myeloische Leukämie	27
1.3.1	Historischer Überblick	27
1.3.2	Epidemiologie und Klinik	28
1.3.3	Molekularbiologie	31
1.3.4	Zellbiologie und Stammzellkinetik	35
1.3.5	Therapie und Prognose	37
1.4	Andere chronische myeloproliferative Neoplasien	40
1.4.1	Die Philadelphia-negative chronische myeloische Leukämie	40
1.4.2	Die Polyzythämia vera	40
1.4.3	Die Osteomyelofibrose	42
1.4.4	Die Essentielle Thrombozythämie	44
1.5	Die Heteroduplex-Analyse mit dem WAVE®-System	46
1.5.1	Prinzip der Heteroduplex-Analyse mit dem WAVE®-System	46
1.5.2	Heteroplasmie-Detektion	47
1.6	Die Aufgabenstellung dieser Arbeit	49

2 Material & Methoden 50

2.1	Chemikalien und Bezugsquellen	50
2.1.1	Chemikalien und Bezugsquellen für die DNA-Extraktion	50
2.1.2	Chemikalien und Bezugsquellen für die Polymerase-Kettenreaktion und die Gel-Elektrophorese	50
2.1.3	Chemikalien und Bezugsquellen für die Heteroduplexanalyse mit dem Wave®-System	50
2.1.4	Chemikalien und Bezugsquellen für die Aufreinigung des PCR-Produkts zur Sequenzierung	51
2.2	Probenmaterial	51
2.3	DNA-Extraktion	51
2.4	Polymerase-Kettenreaktion und Gelelektrophorese	52
2.5	Heteroduplex-Analyse mit dem WAVE®-System	53
2.6	Fraction Collector	54
2.7	DNA-Sequenzierung	54

<u>3</u>	<u>Ergebnisse</u>	<u>56</u>
3.1	Häufigkeit heteroplasmischer mtDNA-Mutationen	56
3.2	Einzeldarstellung der Heteroplasmien der CML-Proben	59
3.2.1	Probe ACK 4	59
3.2.2	Probe ACK 5	59
3.2.3	Probe ACK 9	61
3.2.4	Proben ACK 11 + ACK 20	61
3.2.5	Proben ACK 12 + ACK 18	62
3.2.6	Probe ACK 16	63
3.2.7	Probe ACK 19	64
3.2.8	Probe ACK 22	64
3.2.9	Probe ACK 26	65
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der CML-Proben	66
3.4	Einzeldarstellung der Heteroplasmien der weiteren MPN-Proben	67
3.4.1	Probe ACK 29 (PV)	67
3.4.2	Probe ACK 30 (PV)	68
3.4.3	Probe ACK 31 (PV)	69
3.4.4	Probe ACK 34 (OMF)	70
3.4.5	Probe ACK 37 (CML Ph ⁻)	70
3.4.6	Probe ACK 40 (CML Ph ⁻)	71
3.4.7	Probe ACK 42 (AML aus einer PV)	73
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse der weiteren MPN-Proben	74
3.6	Homoplasmische Veränderungen der mtDNA bei CML- und MPN-Patienten	75
3.7	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der MDS-Proben	77
<u>4</u>	<u>Diskussion</u>	<u>82</u>
<u>5</u>	<u>Zusammenfassung</u>	<u>89</u>
<u>6</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>91</u>
<u>7</u>	<u>Anhang</u>	<u>112</u>
7.1	PCR-amplifizierte mtDNA-Segmente für die Heteroduplex-Analyse	112
7.2	Zusätzliche Fragmente als Ersatz für lange PCR-Produkte	117
7.3	Beispiel DNA-Sequenzierung und Konservierung	118
7.4	GNU Free Documentation License	119
<u>8</u>	<u>Danksagung</u>	<u>124</u>
<u>9</u>	<u>Lebenslauf</u>	<u>125</u>

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Aufbau eines menschlichen Mitochondrions _____	13
Abbildung 2 Zuordnung der Untereinheiten der Atmungskette zum mitochondrialen und nukleären Genom (modifiziert nach Gattermann) _____	16
Abbildung 3 Das mitochondriale Genom _____	17
Abbildung 4 Heteroplasmie und replikative Segregation ²¹ _____	19
Abbildung 5 Blutausstrich bei CML in 400facher Vergrößerung _____	30
Abbildung 6 Karyogramm eines Patienten mit dem Philadelphia-Chromosom. _____	31
Abbildung 7 Die verschiedenen Spleißvarianten des bcr-abl-Gens _____	32
Abbildung 8 Vermutete Pathomechanismen bei der CML _____	33
Abbildung 9 Schematische, vereinfachte Darstellung wichtiger Signaltransduktionswege des bcr-abl-Onkoproteins _____	34
Abbildung 10 Schematische Darstellung der Hämatopoese mit immunologischen Markern einzelner Zellpopulationen, for details see text (modifiziert nach U. Steidl ⁹⁶) _____	36
Abbildung 11 Die historische Entwicklung der CML-Therapie _____	39
Abbildung 12 Schemazeichnung zur Funktion des WAVE [®] -Systems _____	46
Abbildung 13 Die vier möglichen DNA-Fragmente nach Denaturierung und Annealing _____	48
Abbildung 14 DHPLC-Beispiel-Chromatogramm bei Vorliegen einer Mutation _____	49
Abbildung 15 Verteilung der gefundenen Mutationen bei den MPN-Patienten über das mitochondriale Genom _____	57
Abbildung 16 Verteilung der gefundenen Mutationen bei den MDS-Patienten über das mitochondriale Genom _____	58
Abbildung 17 dhPLC-Analyse von Probe ACK 4 (Cox 72b, 60°C) und dazugehörige Sequenzanalyse _____	59
Abbildung 18 dhPLC-Analyse von Probe ACK 5 (KR 85a, 58°C) und dazugehörige Sequenzanalyse _____	60
Abbildung 19 dhPLC-Analyse von Probe ACK 5 (mrR 92a, 60°C) und dazugehörige Sequenzanalyse _____	60
Abbildung 20 dhPLC-Analyse von Probe ACK 5 (ATP 68a, 61°C) und dazugehörige Sequenzanalyse _____	60
Abbildung 21 dhPLC-Analyse von Probe ACK 9 (NAD 52a, 62°C) und dazugehörige Sequenzanalyse _____	61
Abbildung 22 dhPLC-Analyse von Probe ACK 11 (KR 82a, 60°C) und dazugehörige Sequenzanalyse _____	61

Abbildung 23 dHPLC-Analyse von Probe ACK 20 (KR 82a, 60°C) und dazugehörige Sequenzanalyse _____	62
Abbildung 24 dHPLC-Analysen der Proben ACK 12 + 18 (NAD 46a, 60°C) _____	62
Abbildung 25 dHPLC-Analyse von Probe ACK 12 (NAD 52a, 62°C) und dazugehörige Sequenzanalyse _____	63
Abbildung 26 dHPLC-Analyse von Probe ACK 16 (mrR 98a, 61°C) und dazugehörige Sequenzanalyse _____	63
Abbildung 27 dHPLC-Analyse von Probe ACK 19 (NAD 61a, 58°C) und dazugehörige Sequenzanalyse _____	64
Abbildung 28 dHPLC-Analyse von Probe ACK 22 (Cox 77b, 59°C) und dazugehörige Sequenzanalyse _____	64
Abbildung 29 dHPLC-Analyse von Probe ACK 26 (mrR 94a, 59°C) und dazugehörige Sequenzanalyse _____	65
Abbildung 30 dHPLC-Analyse von Probe ACK 29 (KR 81a, 59°C) und dazugehörige Sequenzanalyse _____	67
Abbildung 31 dHPLC-Analyse von Probe ACK 29 (mrR 98a, 58°C)) und dazugehörige Sequenzanalyse _____	68
Abbildung 32 dHPLC-Analyse von Probe ACK 30 (Cyb 05, 60°C) und dazugehörige Sequenzanalyse. _____	68
Abbildung 33 dHPLC-Analyse von Probe ACK 30 (Cyb 07a, 57°C) und dazugehörige Sequenzanalyse _____	69
Abbildung 34 dHPLC-Analyse von Probe ACK 31 (NAD 43a, 58°C) und dazugehörige Sequenzanalyse _____	69
Abbildung 35 dHPLC-Analyse von Probe ACK 34 (NAD 46a, 58°C) und dazugehörige Sequenzanalyse _____	70
Abbildung 36 dHPLC-Analyse von Probe ACK 37 (mrR 98a, 61°C), _____	71
Abbildung 37 dHPLC-Analyse von Probe ACK 40 (Cox 75, 59°C) und dazugehörige Sequenzanalyse _____	72
Abbildung 38 dHPLC-Analyse von Probe ACK 40 (Cox 58a, 60°C) und dazugehörige Sequenzanalyse _____	72
Abbildung 39 dHPLC-Analyse von Probe ACK 40 (Cox 36a, 60°C) und dazugehörige Sequenzanalyse _____	72
Abbildung 40 dHPLC-Analyse von Probe ACK 42 (Cox 58a, 60°C) und dazugehörige Sequenzanalyse _____	73

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Unterschiedliche Kodierung durch mitochondriale bzw. nukleäre tRNAs _____	18
Tabelle 2 Klinische Syndrome, die mit mtDNA-Mutationen einhergehen (nach www.mitomap.org, 10.07.2008) ²³ _____	21
Tabelle 3 Klassifikationskriterien nach FAB (aus „Das Rote Buch“) ³⁸ _____	24
Tabelle 4 WHO-Vorschläge zur Klassifizierung myelodysplastischer Syndrome 2008 _____	25
Tabelle 5 Diagnosekriterien der PVSG ¹⁵⁴ _____	41
Tabelle 6 WAVE [®] -Methode _____	54
Tabelle 7 Häufigkeit der gefundenen heteroplasmischen mtDNA-Mutationen nach Erkrankungstyp _____	56
Tabelle 8 Zusammenfassung der Ergebnisse der CML-Proben _____	66
Tabelle 9 Zusammenfassung der Ergebnisse der weiteren MPN-Proben _____	74
Tabelle 10 Zusammenfassung der gefundenen Homoplasmien der CML- und MPN-Proben _____	75
Tabelle 11 Heteroplasmische und homoplasmische mtDNA-Mutationen bei MDS-Patienten: _____	77
Tabelle 12 Zusammenfassung der Ergebnisse der MDS-Proben _____	77
Tabelle 13 Primer und WAVE [®] -Bedingungen _____	112
Tabelle 14 Zusätzliche Fragmente als Ersatz für lange PCR-Produkte _____	117
Tabelle 15 Beispiel DNA-Sequenzierung und Konservierung _____	118

IV Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
AKT	Gen für Proteinkinase B
ALP	Alkalische Leukozytenphosphatase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bad	<i>Bcl-2-Antagonist of Cell Death</i> , pro-apoptotisches Protein der Bcl-2-Familie
bcr-abl	Fusionsprodukt der Gene bcr (<i>breakpoint cluster region</i>) und abl (<i>Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1</i>)
bp	<i>base pairs</i>
C	Cytosin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMML	Chronische myelomonozytäre Leukämie
CO	Kohlenstoffmonoxid
CoQ	Coenzym Q
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cytochrom-C-Oxidase
CRP	C-reaktives Protein
Cyb	Cytochrom b
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dHPLC	<i>Denaturing High Performance Liquid Chromatography</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
D-Loop	<i>Displacement-Loop</i>

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EPO	Erythropoetin
ET	Essentielle Thrombozythämie
FAB	<i>French American British</i> , Klassifikation der myelodysplastischen Syndrome
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH ₂	Reduzierte Form von FAD
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.
G	Guanin
H ⁺	Wasserstoffion
H ₂ O	Wasser
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
kD	Kilodalton
LDH	Lactatdehydrogenase
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MPN	Myeloproliferative Neoplasie
MRD	<i>Minimal residual disease</i>
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
mtDNA	Mitochondriale DNA
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid; in dieser Arbeit steht NAD zusätzlich zusammen mit den Ziffern 11 bis 64 für Primerpaare der Gene ND1 bis ND6
nDNA	Nukleäre DNA
O ₂	Sauerstoff
OMF	Osteomyelofibrose

OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
p53	Protein des TP53-Tumorsuppressor-Gens
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PEG-IFN	Pegyliertes Interferon
PI 3	Phosphoinositid-3-Kinasen
PV	Polyzythämia vera
PVSG	Polyzythämia vera Study Group
RA	Refraktäre Anämie
RAS	<i>Rat sarcoma</i> , ein Proto-Onkogen, das für ein sogenanntes kleines G-Protein (monomeres) codiert
RARS	Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	<i>Real time</i> -Polymerasekettenreaktion
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
T	Thymin
TIA	Transistorische ischämische Attacke
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
U	Uracil
UV	Ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation

V Aminosäuren-Codes

A	Alanin	Ala
C	Cystein	Cys
D	Asparaginsäure	Asp
E	Glutaminsäure	Glu
F	Phenylalanin	Phe
G	Glycin	Gly
H	Histidin	His
I	Isoleucin	Ile
K	Lysin	Lys
L	Leucin	Leu
M	Methionin	Met
N	Asparagin	Asn
P	Prolin	Pro
Q	Glutamin	Gln
R	Arginin	Arg
S	Serin	Ser
T	Threonin	Thr
V	Valin	Val
W	Tryptophan	Trp
Y	Tyrosin	Tyr

1 Einleitung

1.1 Die Mitochondrien

1.1.1 Aufbau und Herkunft

Mitochondrien sind Zellorganellen der Eukaryonten mit einer Doppelmembran, eigener DNA und 70S-Ribosomen. Während das äußere der beiden Membransysteme keine Besonderheiten aufweist und lediglich die äußere Begrenzung des Organells darstellt, bildet die innere Membran Falten und Fächer, die sog. Cristae. Hier läuft die mitochondriale Atmungskette zur Energiegewinnung der Zelle ab (oxidative Phosphorylierung, OXPHOS). Außerdem finden sich in der inneren Lipid-Doppelschicht Proteine, die in ähnlicher Form sonst nur bei Bakterien vorkommen. Die mitochondriale DNA ist ringförmig, doppelsträngig und liegt, ähnlich wie die der Bakterien, relativ nackt vor, ohne z.B. durch Histone verpackt zu sein. Jedes Organell enthält ca. 2 bis 10 Kopien dieses DNA-Moleküls¹ (Abb.1).

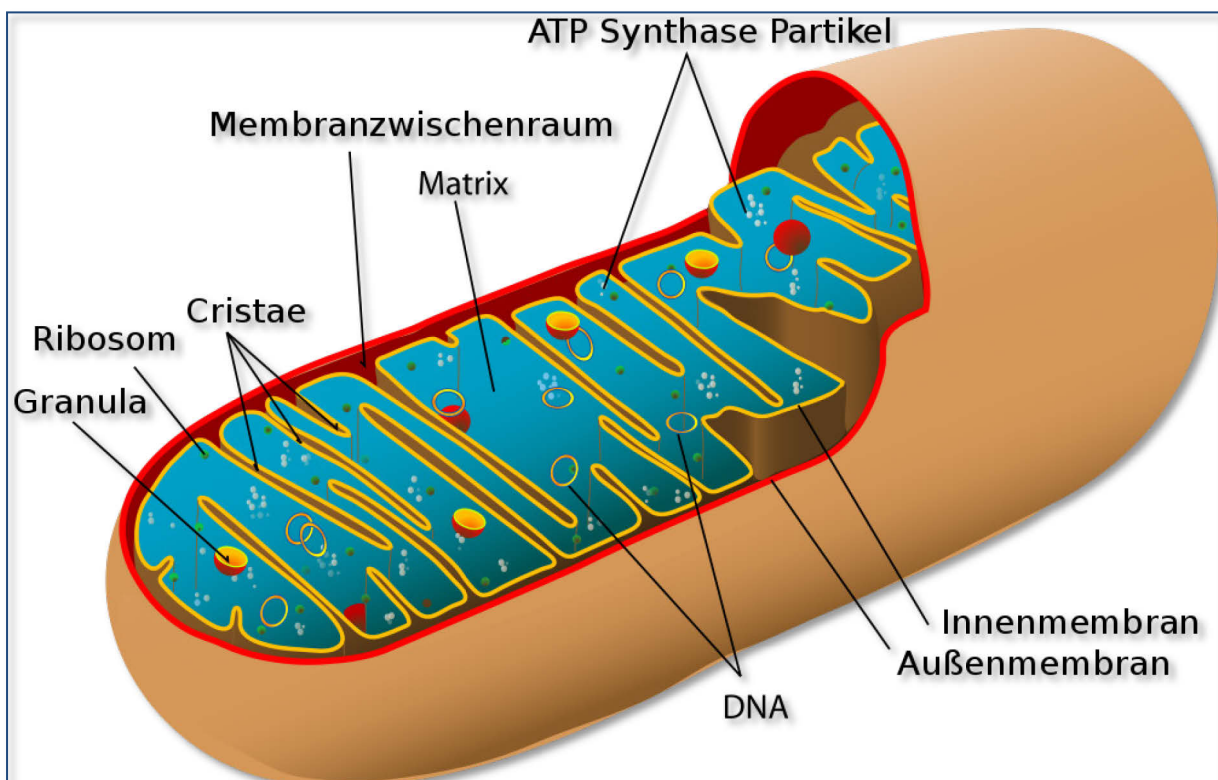


Abbildung 1 Aufbau eines menschlichen Mitochondrions

Wikimedia Commons, lizenziert unter GNU-Lizenz für freie Dokumentation (Lizenztext siehe Anhang 7.4),
 URL:http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Animal_mitochondrion_diagram_de.svg?uselang=de (20.04.2010)

Die Entstehung der Mitochondrien – der „Kraftwerke“ eukaryontischer Zellen – geht nach heutiger Auffassung auf eine endosymbiontische Beziehung zwischen Eukaryont und Prokaryont zurück und verlief vermutlich folgendermaßen: Vor etwa 1,5 Milliarden Jahren stieg der Sauerstoffgehalt der Erdatmosphäre stark an. Den im Ozean lebenden, photosyntheseaktiven Cyanobakterien (Purpurbakterien) gelang es, durch Weiterentwicklung ihrer bereits bestehenden Elektronentransportketten den toxischen Sauerstoff zu Wasser zu reduzieren und damit unschädlich zu machen. Dabei entstand eine Cytochrom-Oxidase, die Elektronen aus organischen und anorganischen Substraten bis zu O_2 als terminalem Elektronenakzeptor transportieren konnte. Die wesentlich komplexer gebauten Eukaryonten, die auf anaeroben Stoffwechsel angewiesen waren, wurden ebenfalls gezwungen, sich an den steigenden Sauerstoffgehalt anzupassen. Die sog. Endosymbionten-Hypothese geht davon aus, dass sich die Eukaryontenzelle zu diesem Zweck ein Cyanobakterium einverleibte und sich so dessen System zur oxidativen Phosphorylierung zunutze machte. Es entwickelte sich eine Symbiose, bei der die Wirtszelle das Nahrungsangebot mithilfe der Enzyme aus der Atmungskette der aerob lebenden Bakterien effektiver nutzen konnte. Der Endosymbiont dagegen war im Inneren der größeren Zelle vor veränderten Umwelteinflüssen gesichert, konnte Sauerstoff entgiften und vermehrt Energie produzieren².

Die aktuell revidierte Sicht der Eukaryonten-Entwicklung geht inzwischen davon aus, dass zwei Bakterientypen (aerob und anaerob) fusionierten und sich daraus ein primitiver Eukaryont entwickelte³. Wie bereits oben erwähnt, sind Mitochondrien von zwei Membranen umschlossen. Die äußere Membran entstammt dabei vermutlich der Plasmamembran der Wirtszelle, die sich bei der Phagozytose um das eindringende Bakterium schloss. Die innere Membran, die aus der Bakterienmembran entstanden sein könnte, enthält bestimmte Lipide, Enzyme und Transportsysteme, die auch heute noch in rezenten Plasmamembranen von Prokaryonten zu finden sind. Die DNA der Organellen ist, wie bei Bakterien, ringförmig. Außerdem können Organellen nicht aus der genetischen Information des Zellkerns gebildet werden, sondern vermehren sich durch Zweiteilung auseinander. Der Teilungsprozess erinnert an den der Bakterien. Auch die Ribosomen der Zellorganellen ähneln in ihrem Aufbau eher bakteriellen als eukaryontischen Ribosomen.

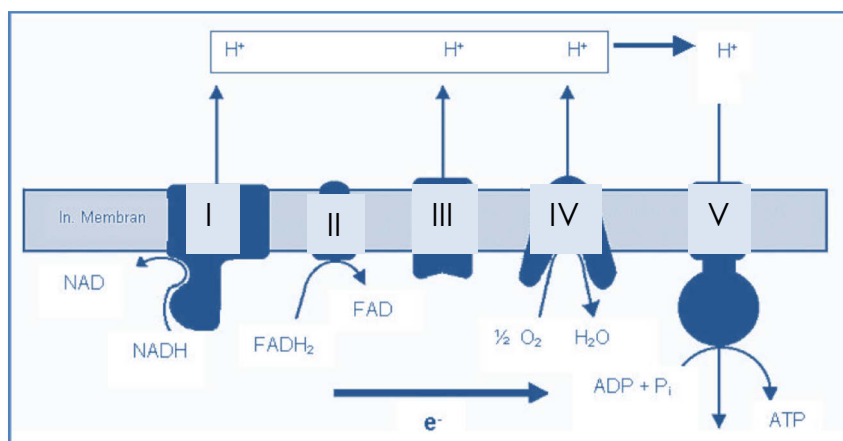
Im Laufe der Evolution wurde das Genom des Protomitochondriums zum größten Teil in den Zellkern des Eukaryonten übernommen. Dies betrifft sowohl alle Gene für gemeinsame Stoffwechselwege der Symbionten als auch einen großen Teil der Gene für die Atmungsket-

tenproteine. Heute sind in der mtDNA des Menschen von den ursprünglich 3000 bis 4000 Genen des Protomitochondriums nur noch 37 Gene vorhanden. Eine Erklärung, warum diese schließlich noch verblieben sind, liegt möglicherweise im unterschiedlichen genetischen Code von Pro- und Eukaryonten, der die Aminosäureabfolge des translatierten Proteins bestimmt. Wenn diese Mitochondrien-Gene im Zellkern exprimiert würden, würden möglicherweise funktionsuntüchtige Genprodukte hergestellt. Außerdem entstehen große hydrophobe Unter-einheiten der Atmungskette, die nicht in das Mitochondrium importiert werden können.⁴

1.1.2 Die mitochondriale DNA des Menschen

Mitochondrien besitzen eine eigene genetische Information, die semiautonom neben dem nukleären Genom existiert. Sie stellt mengenmäßig weniger als ein Prozent der Gesamtzell-DNA, ist aber nichtsdestotrotz lebensnotwendig für die Zelle. Die mitochondriale DNA (mtDNA) des Menschen besteht aus einem doppelsträngigen DNA-Molekül, welches 16569 bp umfasst und in einer Supercoilstruktur vorliegt. Im Matrixraum eines jeden Mitochondriums befinden sich etwa 2 bis 10 solcher DNA-Plasmide. Sie sind in der Regel identisch und werden bei der Teilung der Organelle zufällig auf die Tochtermitochondrien verteilt².

Die zirkuläre mtDNA besteht aus einem Guanin-reichen schweren Strang (*heavy H strand*) und einem Cytosin-reichen leichten Strang (*light L strand*). Der H-Strang kodiert für zwei ribosomale RNA-Gene (rRNAs), 14 Transfer-RNA-Gene (tRNAs) und 12 Proteingene für insgesamt 4 unterschiedliche Atmungskettenkomplexe. Auf dem L-Strang findet man ein Protein-Gen und weitere 8 tRNA-Gene. Insgesamt findet man die Gene von 7 der ca. 40 Untereinheiten des Komplex I (NADH-Dehydrogenase), 1 von 10 Untereinheiten von Komplex III (Cytochrom-C-Reduktase), 3 der 13 Untereinheiten von Komplex IV (Cytochrom-C-Oxidase) sowie 2 der 12 Untereinheiten von Komplex V (ATP-Synthetase) auf der mtDNA. Alle zusätzlich für die Funktionalität des Mitochondriums notwendigen Proteine sind kernkodiert. Sie werden im Zytoplasma der Zelle synthetisiert und anschließend in die Organelle transportiert. Zu den genannten Proteinen zählen auch alle nicht mitochondrial kodierten Enzymunter-einheiten der Atmungskettenkomplexe. Sie werden im Mitochondrium gemeinsam mit den dort kodierten und hergestellten Proteinen zu funktionsfähigen Enzymkomplexen zusammengefügt⁵ (Abb. 2).



Komplex	I NADH:CoQ Reduktase	II Succinat:CoQ Reduktase	III Ubichinol: Cytochrom-C Reduktase	IV Cytochrom-C Oxidase	V ATP-Synthase
Untereinheiten					
mtDNA	7	0	1	3	2
nDNA	>30	4	9	10	10

Abbildung 2 Zuordnung der Untereinheiten der Atmungskette zum mitochondrialen und nukleären Genom (modifiziert nach Gattermann)

Dargestellt ist die innere Mitochondrienmembran, oben befindet sich der Intermembranraum, unten der Matrixraum. In die innere Mitochondrienmembran sind die fünf Atmungskettenkomplexe eingebettet, die Pfeile zeigen den Elektronentransport.

Im Gegensatz zur nukleären DNA existieren im mitochondrialen Genom keine Introns und, mit Ausnahme des 1123 Basenpaare langen *displacement-Loops*, keine längeren nichtkodierenden Basenfolgen. Der *displacement-Loop* (D-Loop) enthält wichtige Gensequenzen für die Transkription und die Replikation der mtDNA⁵ (Abb. 3).

Sowohl die Replikation als auch die Transkription der mtDNA weisen im Vergleich zur nukleären DNA (nDNA) einige Besonderheiten auf. Die Replikation der mtDNA läuft unabhängig vom Zellzyklus ab und dauert mit etwa 2 Stunden sehr viel länger als die der nDNA⁶. Sie beginnt mit dem H-Strang und geht von dessen Startpunkt (*origin* O_H) im D-Loop aus. Der schwere Strang wird nun zunächst im Uhrzeigersinn zu ca. 2/3 repliziert, bis der Replikationsursprung O_L für den leichten Strang erreicht ist. Dieser wird nun in Gegenrichtung ebenfalls repliziert, der H-Strang wird im Uhrzeigersinn weiter komplettiert. Zum Ende liegen zwei ineinander verschränkte zirkuläre DNA-Moleküle vor. Diese werden mit Hilfe einer Topoisomerase voneinander getrennt. Zellen von Säugetieren enthalten normalerweise 10³ – 10⁴ Kopien der mt-DNA mit 2-10 mitochondrialen Genomen pro Organelle. Diese Genome werden alle unabhängig vom Zellzyklus repliziert, was zur Folge hat, dass einige mtDNA-

Moleküle ständig repliziert werden, andere gar nicht. Dieses Phänomen führt, gemeinsam mit der zufälligen Verteilung während der Zellteilung, zur Segregation von Sequenzvarianten während der Mitose (siehe unten).⁷

Die Transkription geht ebenfalls vom D-Loop aus, wo jeder der beiden DNA-Stränge seinen eigenen Promotor besitzt. Anders als im nukleären Genom, wo einzelne Gene ihren eigenen Promotor besitzen, wird im Mitochondrium ein den ganzen Strang umfassendes RNA-Molekül transkribiert. Es entstehen somit zwei lange Transkripte, die erst später durch Restriktionsenzyme in die einzelnen mRNAs, rRNAs und die dazwischen liegenden tRNAs gespalten werden⁸. Um eine Überproduktion an tRNAs und Proteinen zu vermeiden, existiert für den H-Strang eine weitere transkriptions-terminierende Regulationssequenz am 3'-Ende der 16S-rRNA⁹. Die H-Strang-Transkription beginnt immer im D-Loop und wird dann nach Abschluss der Produktion der rRNAs wahlweise über den erwähnten Transkriptionsterminator hinweg fortgeführt.

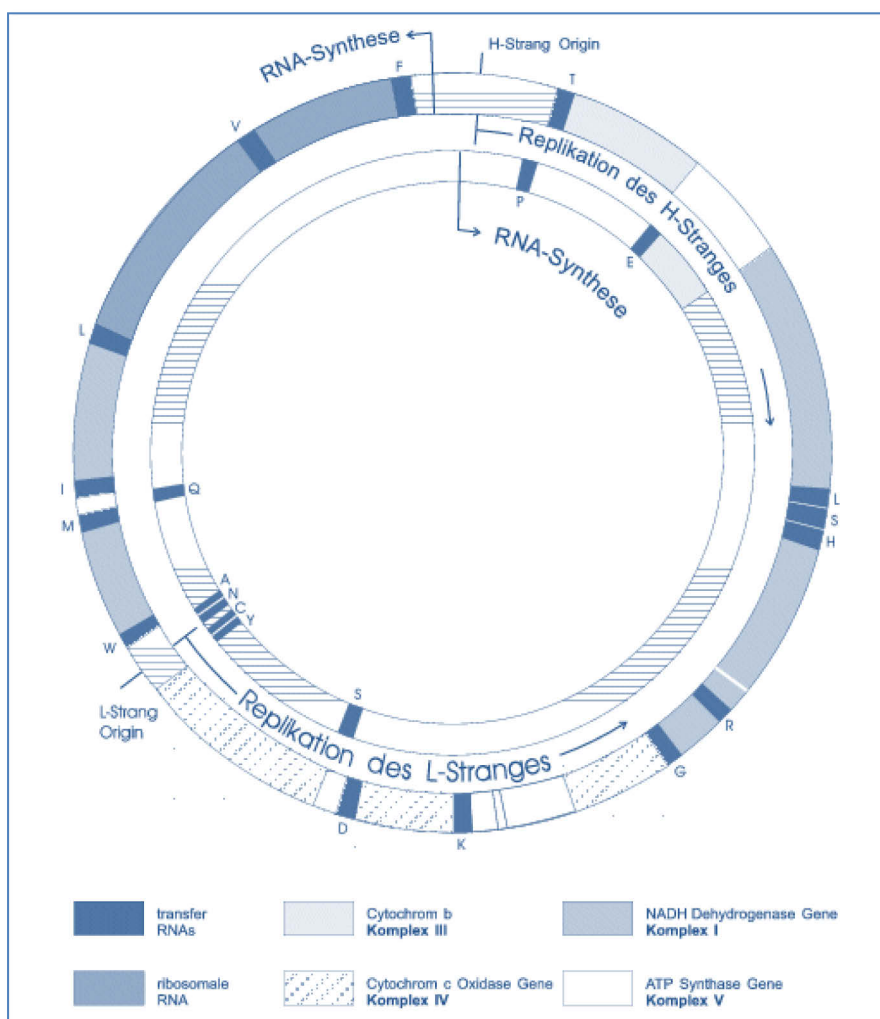


Abbildung 3 Das mitochondriale Genom
(modifiziert nach www.mitomap.org, 20.11.2008)

Auch bei der Translation gibt es einige wichtige Abweichungen zwischen den Vorgängen im Zytoplasma der Zelle und in der mitochondrialen Matrix. Der früher als universell angenommene genetische Code zeigt in den Mitochondrien einige Unterschiede: AUA steht für Methionin statt für Isoleucin, UGA codiert nicht für ein Stopp-Codon sondern für Tryptophan, AGA und AGG stehen für Stopp-Codons anstatt für Arginin¹⁰ (Tab. 1).

Tabelle 1 Unterschiedliche Kodierung durch mitochondriale bzw. nukleäre tRNAs

Codon	Bedeutung	
	„Universal Code“	humaner mitochondrialer Code
UGA	STOP	Trp
AUA	Ile	Met
AGA AGG	Arg	STOP

Außerdem ermöglicht eine Reihe ungewöhnlicher Wobble-Regeln den 22 mitochondrialen tRNA's die Entschlüsselung aller 64 möglichen Codon-Triplets. Im nukleären Code sind dazu 32 tRNA's nötig¹¹.

Weitere Besonderheiten der mtDNA:

Die mtDNA wird maternal vererbt¹². Ursachen sind die ungleiche Mitochondrienmenge in Eizelle (ca. 200.000 Kopien) und Spermium (nur wenige Mitochondrien, die weitgehend während der Embryogenese abgebaut werden). Die maternale Vererbung mitochondrialer Erkrankungen lässt sich allerdings nur beobachten, wenn die Mutation der mtDNA keine Einschränkung der Reproduktionsfähigkeit verursacht. Daher beruhen schwere mitochondriale Erkrankungen meistens auf Neumutationen¹³.

Die mtDNA besitzt keine Introns und hat somit eine wesentlich höhere Gendichte, sie wird nicht durch Histonproteine vor genotoxischen Einflüssen geschützt, die aufgrund der räumlichen Nähe zu Sauerstoffradikalen der mitochondrialen Atmungskette hier wesentlich größer sind, sie wird kontinuierlich während des gesamten Zellzyklus repliziert und hat nach bisherigem Kenntnisstand nur wenige Reparaturmechanismen, Schäden führen meist zu Wachstumsstillstand und Apoptose¹⁴. Aus diesen Gründen weist die mtDNA im Vergleich zu nDNA eine ca. 10-fach höhere Mutationsrate auf^{15, 16, 17}, außerdem ist die Wahrscheinlichkeit, dass Mutationen funktionelle Auswirkungen haben durch die hohe Gendichte erhöht.

1.1.3 Heteroplasmie und replikative Segregation

Die meisten Zellen enthalten Hunderte von Mitochondrien, somit ist das mitochondriale Genom in vielen Kopien pro Zelle vorhanden. Aus diesem Grund ist es auch möglich, dass in einer Zelle nebeneinander normale und mutierte mtDNA-Moleküle vorkommen (Heteroplasmie). Während der Mitose werden die Mitochondrien nach dem Zufallsprinzip auf die Tochterzellen verteilt. Es können sich Zellpopulationen mit überwiegend normalen Mitochondrien neben solchen mit überwiegend mutierten Mitochondrien etablieren, falls die Mutation das Überleben bzw. die Proliferation der Zellen nicht wesentlich beeinträchtigt. Nach den Gesetzen der Wahrscheinlichkeitsrechnung werden die Zellen mit einem mittleren Anteil veränderter Mitochondrien im Verlauf vieler Replikationszyklen immer weniger. Dies stimmt mit der Beobachtung von Wallace 1994¹³ überein: Das mitochondriale Genom der einzelnen Zellen driftet in Richtung auf einen Zustand vollständiger Mutation oder Normalität (Homoplasmie). Diesen Vorgang bezeichnet man als replikative Segregation² (Abb. 4).

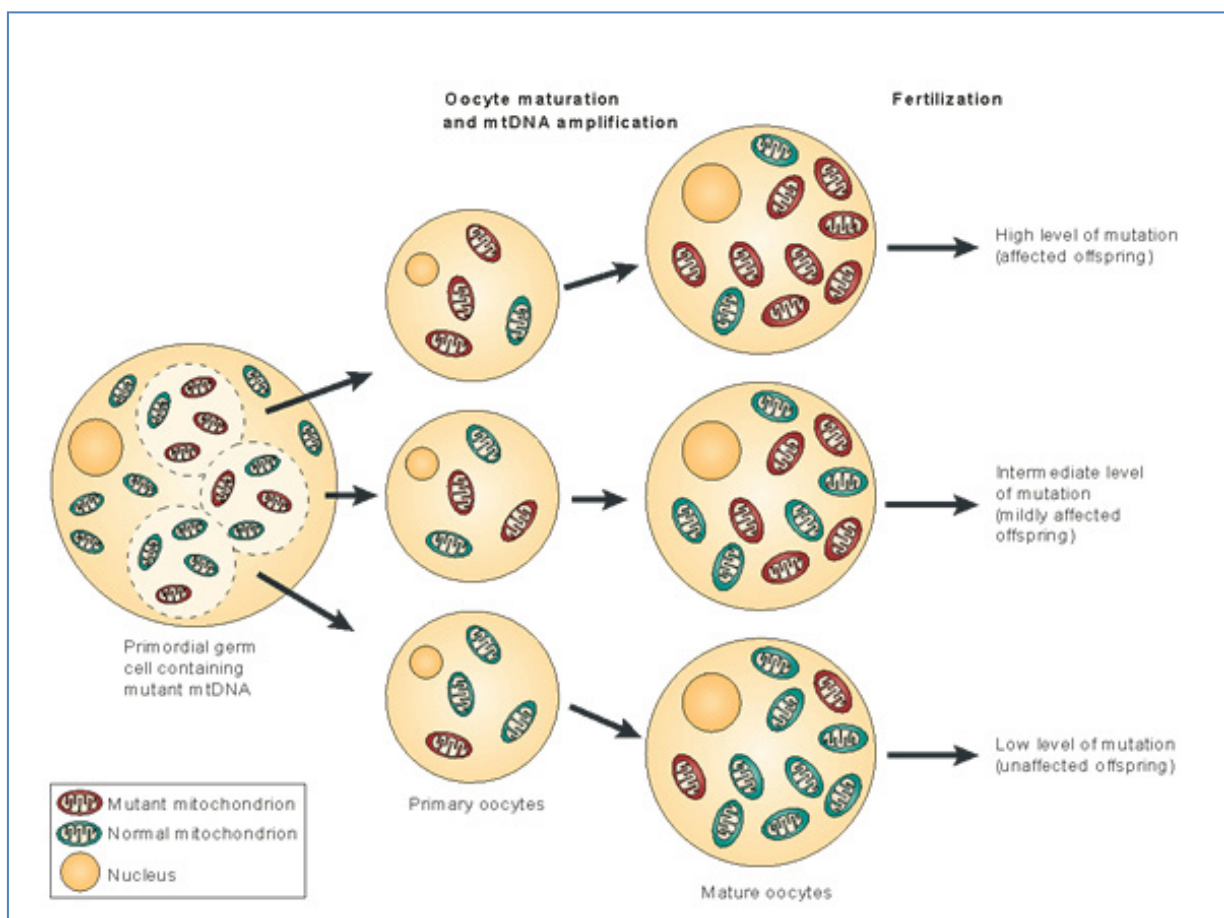


Abbildung 4 Heteroplasmie und replikative Segregation²¹

Im Rahmen der Oogenese und der Embryogenese folgen die Zellteilungen sehr rasch aufeinander, so dass für den Übergang von Heteroplasmie zu Homoplasmie nur wenige Generationszyklen notwendig sind. Da während der frühesten Embryogenese nur die nukleäre DNA und nicht die mtDNA repliziert wird, kommt es zu einer „Ausdünnung“ der mtDNA in den Zellen. Somit enthalten die Zellen der weiblichen Keimbahn nur noch wenige mtDNA-Moleküle. Der Großteil der Keimbahnzellen wird so ein normales mitochondriales Genom erhalten, auch wenn in der Eizelle mutierte mtDNA-Moleküle vorhanden waren¹⁸. Genauso kann es aber natürlich auch passieren, dass eine Keimbahnzelle überwiegend pathologische mtDNA-Moleküle erhält, so dass sich in der nächsten Generation bereits eine mitochondrial bedingte Erkrankung manifestieren kann (*bottle-neck*).

1.1.4 Mutationen der mitochondrialen DNA

Typisch für mtDNA-Mutationen ist zunächst das Auftreten heteroplasmatischer DNA. Veränderte und normale DNA-Plasmide existieren nebeneinander¹⁹. Unterschreitet der Anteil der Wildtyp-DNA eine gewisse Schwelle kann es zur Störung der mitochondrialen Funktionen und zur Erkrankung der betroffenen Person kommen²⁰. Gleichzeitig kann die Verteilung von kranken bzw. gesunden Mitochondrien sowohl von Gewebe zu Gewebe als auch von Zelle zu Zelle unterschiedlich sein. Als Grund dafür gilt die ungleichmäßige Verteilung der Mitochondrien von der Ausgangszelle auf Tochterzellen während der Embryogenese bzw. bei späteren Teilungen. Dies führt zu Zellen und Geweben mit einer großen und anderen mit einer geringeren Menge an mutierter mitochondrialer DNA²². Bei einigen Patienten ist die Mutation deshalb nur in bestimmten Geweben nachweisbar. Häufig betroffen sind postmitotische Gewebe wie Muskeln und das zentrale Nervensystem. Es können aber auch Leber, Nieren, Blut²³ oder andere Gewebe bzw. Zellen beeinträchtigt sein. In vielen Fällen sind mehrere Gewebe im Sinne einer Multisystemerkrankung betroffen. Deshalb hat sich die Bezeichnung mitochondriale Zytopathie etabliert (Tab. 2).

Tabelle 2 Klinische Syndrome, die mit mtDNA-Mutationen einhergehen (nach www.mitomap.org, 10.07.2008)²⁴

Erkrankung	Mutiertes Gen	Position	Basenaustausch	Aminosäure
CPEO	verschiedene ausgedehnte Deletionen			
Exercise Intolerance	COX I CYB tRNA Tyr	5920 15150 5874	G → A G → A T → G	W → Ter W → Ter (tRNA)
Fam. Diabetes mell. mit Taubheit	tRNA leu(UUR) 10.4 kb Deletion	3243	A → G	(tRNA)
KSS	verschiedene ausgedehnte Deletionen			
Leigh-Syndrom	tRNA Lys	8344	A → G	(tRNA)
LHON	ND1 ND2 ND4 ND5 ND6 ATP6 cyt b COX I COX III tRNA leu(UUR)	3394 4640 10663 13730 14484 9101 15257 7444 9438 3275	T → C C → A T → C G → A T → C T → C G → A G → A G → A C → A	Y → H I → M V → A G → E M → V I → T D → N Ter → K G → S (tRNA)
MELAS	ND1 ND4 ND5 ND6 tRNA Phe rRNA2	3308 11084 13513 14453 583 3093	T → C A → G G → A G → A G → A C → G	M → T T → A D → N A → V (tRNA) 16S rRNA
MERRF	tRNA Lys	8296	A → G	(tRNA)
MM	COX II CYB tRNA Phe tRNA leu(UUR) tRNA Thr	7671 15059 618 3243 15915	T → A G → A T → C A → G G → A	M → K G → E (tRNA) (tRNA) (tRNA)
MMC	tRNA leu(UUR) tRNA leu(UUR)	3303 3260	A → G A → G	(tRNA) (tRNA)
NARP	ATPase	8993	T → G	L → R
Pearson- Syndrom	verschiedene ausgedehnte Deletionen			
Taubheit durch Aminoglykosid-Überempfindlichkeit	12sRNA	1555	A → G	

Abkürzungen: CPEO: chronic progressive external ophthalmoplegia; KSS: Kearns-Sayre-syndrome; LHON: Leber's hereditary optic neuropathy; MELAS: mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes; MERRF: myoclonic epilepsy and ragged red muscle fibers; MM: mitochondrial myopathy; MMC: maternal myopathy and cardiomyopathy; NARP: neurogenic muscle weakness, ataxia and retinitis pigmentosa ; Ter: termination (STOP)

Der größte Teil der mt-DNA-Mutationen wird maternal vererbt. Von Einfluss ist hierbei die Prognose der speziellen Erkrankung, die oft schon die Möglichkeit einer Nachkommenschaft limitiert, aber auch der jeweilige DNA-Schädigungstyp. Die übrigen Krankheitsfälle beruhen auf Spontanmutationen bzw. nukleären DNA-Veränderungen. Als ursächlich für die im Ge-

gensatz zum Kern höhere mitochondriale Mutationsfrequenz gelten verschiedene Faktoren, wie etwa das Fehlen schützender Histone, die Ansammlung freier Radikale im Matrixraum bzw. die limitierten Reparaturmöglichkeiten im Mitochondrium. So neigen mitochondriale Erkrankungen mit fortschreitendem Lebensalter zu einer deutlichen Progression^{25, 26, 27}. Dies ist sicher auch im Zusammenhang mit der natürlichen Akkumulation geschädigter DNA im Alter zu sehen, welche gleichzeitig mit einem Sinken der Enzymaktivitäten einhergeht. Zweifellos fällt diese normale Entwicklung bei vorbestehender DNA-Schädigung weit mehr ins Gewicht als bei gesunden Individuen. Außerdem scheinen einige Mutationstypen mit einer Tendenz zur Ansammlung der defekten DNA einherzugehen²⁸.

1.1.5 Mitochondriale Funktionsstörungen durch Mutationen der nukleären DNA

In letzter Zeit wurden zunehmend nukleäre DNA-Veränderungen bei verschiedenen mitochondrialen Erkrankungen gefunden. Dabei fielen zum einen Gendefekte auf, die über die direkte Funktionsstörung eines nukleären Proteins zu einem mitochondrialen Funktionsverlust führten. Zum Zweiten scheint es aber auch Veränderungen der Kern-DNA zu geben, die über eine Behinderung der intergenomischen Kern-Mitochondrien-Kommunikation zu sekundären mtDNA-Störungen (zum Beispiel zu multiplen mtDNA-Deletionen) führen².

1.1.6 Die mitochondriale Theorie des Alterns

Mittlerweile gibt es einige Theorien, die versuchen, das Phänomen des Alterns aufzudecken. Zu den vorherrschenden Theorien zählt die Theorie des physiologischen Alterns. Ausgangspunkt ist hier die Tatsache, dass der Austausch und die Reparatur von defekten Molekülen in biologischen Systemen nie vollständig ablaufen. Mit fortschreitendem Alter kommt es daher zu einer Anhäufung von Defekten, so dass Organfunktionen zunehmend beeinträchtigt werden können. Diese Funktionseinschränkungen sind irgendwann nicht mehr mit dem Überleben des Organismus vereinbar. Weitere Überlegungen sind die Telomer-Theorie, bei der davon ausgegangen wird, dass die Telomere bei jeder Zellteilung an Länge einbüßen und sich so die Zahl der möglichen Zellteilungen begrenzt, und das Altern des Immunsystems durch verzögerte adäquate Immunantwort auf Infektionen durch sinkende Proliferationskapazität von T-Lymphozyten.

Die spezifische Lebensdauer jeder Spezies ist teilweise auch durch äußere Bedingungen beeinflusst. Die Lebensspanne von Fruchtfliegen ist beispielsweise durch eine Absenkung der

Umgebungstemperatur von 30°C auf 10°C von 14 auf bis zu 120 Tage verlängerbar. Bei niedrigen Temperaturen sinkt der Stoffwechselumsatz und damit der Sauerstoffverbrauch. Ein weiteres Beispiel ist der Einfluss der Menge der Nahrungsaufnahme auf die Lebensdauer von Mäusen und Ratten^{29, 30, 31}. Die Lebenserwartung verschiedener Tierarten verhält sich umgekehrt proportional zu ihrem Grundumsatz, d.h. große Lebewesen mit weniger Sauerstoffverbrauch pro Kilogramm Körpergewicht leben länger als kleine Tiere mit hohem Sauerstoffverbrauch pro Gewichtseinheit. Die Bedeutung des Sauerstoffverbrauchs für das Altern hängt möglicherweise mit den dabei entstehenden freien Radikalen (*reactive oxygen species*, ROS) zusammen (*free radical theory of aging*)³². Der altersabhängige Rückgang der Leistungsfähigkeit ist besonders auffällig in Geweben mit hohem Sauerstoffumsatz wie z.B. im Zentralnervensystem, der Leber und der Muskulatur^{33, 34}. Hier konnte parallel zu einer Abnahme der OXPHOS-Enzym-Aktivität eine Zunahme der ROS und eine Akkumulation von somatischen mtDNA-Veränderungen nachgewiesen werden.

Sauerstoff wird größtenteils am Ende der mitochondrialen Atmungskette umgesetzt und dort an Komplex IV durch Aufnahme von zwei Elektronen und Bindung an zwei Protonen zu Wasser reduziert. In der Atmungskette findet man jedoch auch Redox-Komponenten, durch die ein einzelnes Elektron direkt auf Sauerstoff übertragen werden kann. So entstehen stark toxische Superoxid-Radikale (O_2^-). Dies geschieht bei etwa 1-2% des mitochondrial umgesetzten Sauerstoffs³⁵. Die mitochondriale Atmungskette ist damit der toxischen Wirkung dieser Radikale besonders ausgesetzt, was in der Folge zu einer gestörten ATP-Produktion und damit zur Beeinträchtigung der Zellfunktionen führen kann.

Auch die mtDNA liegt nahe an der Quelle der Sauerstoffradikale. Es entstehen modifizierte Basen (z.B. 8-Hydroxy-Guanin), die Punktmutationen und Strangbrüche bewirken können. Durch fehlende bzw. weniger ausgeprägte Reparaturmechanismen (s. o.) werden oxidative Schäden der mtDNA zudem nicht so effektiv behoben wie bei der nukleären DNA³⁶. Auf diese Weise können sich die Veränderungen durch Replikation mutierter mtDNA genetisch verankern. Mutationen der mtDNA können wiederum zu funktionell eingeschränkten OXPHOS-Proteinen und einem vermehrten Anfall von Sauerstoffradikalen führen, was konsekutiv auch wieder eine eingeschränkte ATP-Produktion zur Folge hat^{37, 38}. So entsteht ein Teufelskreis gestörter OXPHOS-Funktion und vermehrter ROS-Produktion.

1.2 Das myelodysplastische Syndrom

1.2.1 Epidemiologie und Klinik

Das myelodysplastische Syndrom (MDS) ist ein Überbegriff für eine heterogene Gruppe von vorwiegend im höheren Lebensalter (ab 70 Jahren 20 Fälle / 100.000 / Jahr) auftretenden klonalen Knochenmarkserkrankungen mit Transformation einer frühen hämatopoetischen Vorläuferzelle. Dadurch bedingter Störung von Proliferation, Differenzierung und Apoptose³⁹. Betroffen sind meist mehrere Zellreihen (Granulo-, Erythro, Thrombopoese). Viele der sich entwickelnden Blutzellen weisen schwere Reifungsstörungen auf und reagieren nicht adäquat auf Wachstums- und Differenzierungsfaktoren⁴⁰. Diese Zellen werden nicht in die Zirkulation entlassen, sondern gehen bereits im Knochenmark zugrunde². Daher findet man bei Patienten trotz normaler oder erhöhter Zelldichte im Knochenmark eine hämatopoetische Insuffizienz in Form von Anämie, Leukopenie und Thrombopenie.

Die myelodysplastischen Syndrome sind initial meist symptomarm und stellen oft einen klinischen Zufallsbefund dar. Im Krankheitsverlauf treten Symptome der Zytopenie auf: Müdigkeit, Leistungsminderung, Tachykardie, Blässe (Anämie), Blutungsneigung, Hämatome, Petechien (Thrombopenie), Infektanfälligkeit (Granulopenie)³⁹.

1.2.2 Einteilung der myelodysplastischen Syndrome

Die myelodysplastischen Syndrome werden nach der French-American-British-Klassifikation (FAB)⁴¹ in folgende Typen eingeteilt (Tab. 3):

Tabelle 3 Klassifikationkriterien nach FAB (aus „Das Rote Buch“)³⁹

MDS-Typ	Blastenanteil		Besonderheiten
	Blut	KM	
Refraktäre Anämie (RA)	< 1%	< 5%	Meist mit Granulo-/Thrombozytopenie
Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS)	< 1%	< 5 %	Nachweis von Ringsideroblasten im Knochenmark (> 15% der Erythroblasten)
Refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung (RAEB)	< 5%	5-20 %	meist Bi- oder Trizytopenie
RAEB in Transformation (RAEB-T)	≥ 5%	20-30 %	Blasten, evtl. Auer-Stäbchen
Chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML)	< 5%	5-20 %	Periphere Monozytose > 1000/µl

Die FAB-Klassifikation wurde 1982 in der aktuellen Form von einer internationalen Arbeitsgruppe ins Leben gerufen und im Jahre 1999 mit der sogenannten WHO-Klassifikation erweitert bzw. überarbeitet (Tab. 4). Die WHO-Klassifikation unterscheidet nach morphologischen und zytogenetischen Kriterien acht Untergruppen. CMML und RAEB-T wurden dabei ausgliedert. Diese Unterteilung ermöglicht bessere Aussagen zur Prognose, ist für die klinische Praxis aber schwerer zu handhaben.

Tabelle 4 WHO-Vorschläge zur Klassifizierung myelodysplastischer Syndrome 2008

(www.mds-register.de, 16.03.2010) (modifiziert nach: Haferlach u. Schoch: WHO-Klassifikationen der AML und der MDS⁴²)

Kategorie	Abkürzung	periphere Blasten	KM-Blasten	Dysplasien
Refraktäre Zytopenie mit Unilineären Dysplasien	RCUD	<1%	<5%	unilineär
a) Refraktäre Anämie mit Unilineären Dysplasien	RA	<1%	<5%	unilineär
b) Refraktäre Thrombozytopenie mit Unilineären Dysplasien	RT	<1%	<5%	unilineär
c) Refraktäre Neutropenie mit Unilineären Dysplasien	RN	<1%	<5%	unilineär
Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten	RARS	<1%	<5%	Dyserythropoese, >15% Ringsideroblasten
MDS mit del(5q)	MDS mit del(5q)	<1%	<5%	multilineär, isolierte del(5q)
Refraktäre Anämie mit Blastenexzess I	RAEB I	<5%	<10%	uni- oder multilineär
Refraktäre Anämie mit Blastenexzess II	RAEB II	<20%	<20%	uni- oder multilineär
Unklassifizierte MDS	MDS-U	<1%	<5%	unilineär

1.2.3 Therapie und Prognose

Die Therapieentscheidung erfolgt in Abhängigkeit von Alter und Allgemeinzustand des Patienten. Bei Patienten ab ca. 65 Jahren ist die Therapieintention in der Regel als palliativ anzusehen und es werden symptomatische und supportive Behandlungsmaßnahmen (Erythrozytensubstitution, Behandlung von Infektkomplikationen, Behandlung einer sekundären Häm siderose mit Deferoxamin, Thrombozythensubstitution bei manifester hämorrhagischer Diathese) eingesetzt. Der einzige kurative Therapieansatz besteht in einer allogenen Stammzelltransplantation und ist aufgrund der transplantationsassoziierten Mortalität nur bei Patienten unter 65 Jahren erfolgsversprechend. Neue Therapieoptionen wie immunsuppressive Therapie mit Cyclosporin, Differenzierungsinduktion mit all-Transretinolsäure, Behand-

lung mit DNA-Methyltransferase-Inhibitoren und Thalidomid werden derzeit im Rahmen klinischer Studien überprüft³⁹.

Die Prognose des MDS ist abhängig vom Subtyp des MDS (Blastenanteil im Knochenmark > 10% ungünstig), vom Karyotyp des transformierten Zellklons (ungünstig sind Monosomie 7, 7q-, komplexer Karyotyp), vom Alter und Allgemeinzustand des Patienten sowie vom Auftreten von Infektkomplikationen. Bei etwa 25% der Patienten geht das myelodysplastische Syndrom im weiteren Krankheitsverlauf in eine akute myeloische Leukämie (AML) über. Diese Entwicklung ist häufig vom Auftreten chromosomaler Veränderungen begleitet, die Ausdruck der genetischen Instabilität der Knochenmarkszellen sind.

1.2.4 Molekularbiologie

Bei etwa der Hälfte der MDS-Patienten findet sich schon bei der Erstdiagnose ein abnormer Karyotyp im Knochenmark: Chromosomale Aberrationen (z.B. Monosomie 7, Deletion 5q-, Deletion 7q, Deletion 20q, Trisomie 8, t(6;9), t(8;21)) und Genveränderungen (RAS-Onkogen-Aktivierung, p53-Mutationen, Genhypermethylierung- und inaktivierung, Überexpression von bcl2)³⁹.

Da Chromosomenveränderungen häufig erst in einer späteren Krankheitsphase auftreten⁴³, ist es unwahrscheinlich, dass sie die primäre Ursache für die MDS-Pathogenese darstellen. Der Wachstumsvorteil und die Reifungsstörungen der MDS-Stammzellen müssen daher zumindest teilweise auf zytogenetisch nicht nachweisbaren genomischen Veränderungen beruhen⁴⁴. Bei der Untersuchung von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen fanden sich am häufigsten Mutationen der RAS-Gene, dies war bei etwa 10-20 % der MDS-Patienten der Fall⁴⁵. RAS-Mutationen wurden als Risikofaktor für den Übergang des MDS in eine akute myeloische Leukämie diskutiert, treten aber auch bei stabilem Krankheitsverlauf und teilweise auch im Knochenmark von gesunden Probanden auf. Sie scheinen, ähnlich wie Mutationen des FMS-Protoonkogens und p53-Mutationen, allein nicht in der Lage zu sein, ein myelodysplastisches Syndrom hervorzurufen. Wahrscheinlich müssen, wie auch bei soliden Tumoren, mehrere Mutationen zusammenwirken, um ein MDS auszulösen. Da eine starke Altersabhängigkeit nicht nur bei der Inzidenz der myelodysplastischen Syndrome, sondern auch beim Auftreten von Mutationen der Mitochondrien-DNA auffällt, könnte möglicherweise eine Beteiligung von mtDNA-Mutationen bei der MDS-Pathogenese vorliegen, insbesondere weil auch Stammzellen nicht von der altersabhängigen Akkumulation von mtDNA-Mutationen ver-

schont bleiben. Taylor *et al.*⁴⁶ konnten dies für Stammzellen der Dickdarmmukosa nachweisen, Shin *et al.*⁴⁷ erhoben entsprechende Befunde an Vorläuferzellen der Blutzellen. Die pathophysiologischen Auswirkungen von mtDNA-Mutationen betreffen die Funktion der mitochondrialen Atmungskette, da sämtliche Gene der Mitochondrien-DNA für Komponenten der Atmungskette kodieren. Ein Defekt der Atmungskette wirkt sich am ehesten auf die ATP-Regeneration aus, kann aber noch andere Folgen haben, wie zum Beispiel Beeinträchtigungen des mitochondrialen Eisenstoffwechsels⁴⁸ und der Pyrimidinbiosynthese. Letztere könnte über eine Störung der Konzentration der zellulären DNA-Bausteine eine defekte DNA-Replikation oder -Reparatur und damit eine Vielzahl genetischer Veränderungen nach sich ziehen⁴⁹. Dies wiederum könnte zumindest teilweise die genetische Instabilität des MDS-Klons erklären.

1.3 Die chronische myeloische Leukämie

1.3.1 Historischer Überblick

Rudolf Virchow⁵⁰ und John Hughes Bennett⁵¹ beschrieben im Jahre 1845 unabhängig voneinander erstmals das Krankheitsbild einer CML. Virchow verwendete den Begriff „Weißes Blut“ (Leukämie) für eine Gruppe von Erkrankungen, bei denen das Verhältnis von roten und weißen Blutzellen deutlich zugunsten der weißen Reihe verschoben war, ohne dass Zeichen einer schweren Entzündung oder Infektion vorlagen⁵². Zu diesem Zeitpunkt ahnte er noch nicht, welche komplizierten molekularbiologischen Vorgänge und Veränderungen sich hinter diesem Krankheitsprozess verbergen sollten.

Es wurde bald klar, dass es sich bei den von Virchow beschriebenen „Leukämien“ um eine sehr inhomogene Krankheitsgruppe handelte. Die heute gebräuchliche Einteilung der Leukämien in akute und chronische Verläufe sowie die Unterscheidung zwischen Neoplasien der lymphatischen und myeloischen Zelllinie entstand erst Anfang des letzten Jahrhunderts durch die Einführung der panoptischen Färbetechniken⁴⁹.

Die Aufklärung des bei der CML zugrunde liegenden pathogenetischen Mechanismus begann 1960 mit der Entdeckung des so genannten „Philadelphia-Chromosoms“ durch Nowell und Hungerford⁵³. Im Jahre 1973 erkannte Janet Rowley, dass dieses atypische Chromosom das Ergebnis einer Translokation zwischen dem Chromosom 9 und dem Chromosom 22 darstell-

te⁵⁴. Mitte der 80er Jahre entdeckte man, dass durch diese Translokation das c-Abl-Onkogen vom langen Arm des Chromosoms 9 in die Bcr-Region (*breakpoint cluster region*) des langen Arms von Chromosom 22 verlagert wird. Wie mittlerweile bekannt ist, codiert das so entstandene Bcr-Abl-Onkogen für ein leukämiespezifisches Protein mit einer Größe von meist 210kDa (abhängig vom Bruchpunkt, siehe Kapitel 1.2.4 Molekularbiologie), das sich durch eine erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität auszeichnet. Diese gesteigerte Aktivität führt zu einer Aktivierung von Onkoproteinrezeptoren und Wachstumsfaktoren, was dann die neoplastische Proliferation der leukämischen Zellen zur Folge hat⁵².

Durch die Aufdeckung dieses Zusammenhangs in den 80er Jahren wurde die chronische myeloische Leukämie zur ersten genetisch definierten Leukämieform und kann somit als eine „Modellkrankheit der molekularen Medizin“⁵⁵ gesehen werden. Die CML ist eine der wenigen malignen Erkrankungen, bei der ein singuläres Onkogen (*bcr-abl*) krankheitsauslösend wirkt^{56, 57}. Diese Erkenntnisse führten zur Entstehung einer völlig neuen Therapieform: Imatinib (Glivec[®]) wurde als ATP-kompetitiver Inhibitor der Tyrosinkinasen PDGFR, cKit und abl entwickelt^{58, 59}. Seit 2003 ist Glivec[®] in Deutschland als Standardtherapeutikum für die CML in chronischer Phase zugelassen und führte innerhalb kürzester Zeit zu einer Revolution der CML-Therapie⁶⁰. In vielen Studien konnte mittlerweile eine Überlegenheit hinsichtlich der hämatologischen, zytogenetischen und molekularen Remission in der chronischen Phase gegenüber früheren Therapieformen demonstriert werden^{56, 57, 58}. Nach diesem erfolgreichen Modell werden heute immer mehr dieser so genannten „small molecule inhibitors“ entwickelt: Dasatinib und Nilotinib werden ebenfalls bei der CML eingesetzt, Erlotinib (Tarceva[®]), ein Antagonist des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors HER1 (humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 1, EGFR-1), kommt beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom zur Anwendung⁶¹.

1.3.2 Epidemiologie und Klinik

Die chronische myeloische Leukämie ist eine maligne Erkrankung der hämatopoetischen Stammzelle⁶². Sie wird in die Gruppe der chronischen myeloproliferativen Neoplasien (MPN) eingeteilt⁶³.

Zu den MPN im Sinne der WHO-Klassifikation 2008 zählen:

- Chronische myeloische Leukämie (CML)

- Polycythaemia vera (PV)
- Essentielle Thrombozythämie (ET)
- Primäre Myelofibrose, Osteomyelofibrose/-sklerose (PMF, OMF, OMS)
- Chronische Neutrophilenleukämie (CNL)
- Chronische Eosinophilenleukämie (CEL)
- Hypereosinophiles Syndrom (HES)
- Systemische Mastozytose (SM)
- unklassifizierbare Myeloproliferative Neoplasien

Der früher verwendete Begriff "chronische myeloproliferative Syndrome/Erkrankungen" umfasste nur die ersten vier der genannten Erkrankungen⁶⁴.

Bei der CML sind alle drei Zellreihen der Myelopoese (Leukopoese, Erythropoese und Thrombopoese) betroffen, wobei die Leukopoese hervorsticht⁶². Die CML hat eine Inzidenz von 1 – 2:100.000⁶⁵, Männer sind ca. 1,4-mal häufiger betroffen als Frauen⁶⁶. Die CML gilt zwar als Erkrankung des höheren Lebensalters mit der höchsten Inzidenz im fünften und sechsten Lebensjahrzehnt, sie kann jedoch in jedem Alter, auch bei Kindern, auftreten. Das Fehlen eines konkordanten Auftretens bei eineiigen Zwillingen spricht gegen eine hereditäre Beteiligung. Mögliche Risikofaktoren sind der Kontakt mit Röntgen- oder Gammastrahlung oder langjähriger Umgang mit Benzen und anderen aromatischen Lösungsmitteln⁶⁶. Eine Häufung von Leukämien einschließlich der CML fand sich auch nach dem Atombombenabwurf von Hiroshima. Bei der Mehrzahl der Erkrankten ist jedoch kein Zusammenhang mit einer Strahlen- oder Chemikalienexposition nachweisbar⁶⁶.

Die CML ist gekennzeichnet durch einen zwei- oder meist dreiphasigen Verlauf, der in die chronische Phase, die akzelerierte Phase und die Blastenkrise eingeteilt wird. Unterschieden werden diese Phasen anhand von klinischen und labordiagnostischen Parametern. In der chronischen Phase sind es vor allem Laborparameter, hauptsächlich Blutbildveränderungen, die zur Diagnose führen. Bei einem Großteil der Patienten findet man eine oft exzessive Leukozytose ($>30.000/\mu\text{l}$) im peripheren Blut, verbunden mit einer pathologischen Linksverschiebung bis hin zum Myeloblasten sowie ein so genanntes „Buntes Bild“ mit Baso- und Eosinophilie⁶⁶ (Abb. 5). In 95% der Fälle wird durch zytogenetischen Nachweis das Philadelphia-Chromosom gefunden^{53, 67}. Weitere typische Parameter sind eine erniedrigte oder nicht nachweisbare Aktivität der alkalischen Leukozytenphosphatase (ALP), eine Erhöhung der

Laktatdehydrogenase (LDH) und ein erhöhter Harnsäurespiegel im Blut. Das klinische Erscheinungsbild ist in der chronischen Phase eher unspezifisch: Druckgefühl im Oberbauch (Splénomegalie), Abgeschlagenheit, Fieber, Gewichtsverlust und erhöhte Infektanfälligkeit. Die chronische Phase lässt sich medikamentös meist gut therapieren und dauert im Durchschnitt 3 bis 5 Jahre. Sie geht dann in die akzelerierte Phase über, die sich durch zunehmende Resistenz auf die Initialtherapie auszeichnet. Hierbei fallen im Blutbild trotz adäquater Therapie steigende Leukozytenzahlen, eine zunehmende Zahl von Blasten (bis zu 30%), eine Thrombopenie (unter $100.000/\mu\text{l}$) oder eine progrediente Thrombozytose und eine starke Basophilie (bis zu 20%) auf⁶⁸. Die Splénomegalie nimmt zu, es kommt zu signifikantem Gewichtsverlust, persistierendem, nicht infektassoziiertem Fieber und zur Anämie. Des Weiteren findet man häufig neue Chromosomenaberrationen zusätzlich zum Ph-Chromosom (z. B. Trisomie 8, Isochromosom 17, Trisomie 19).

Das Endstadium der CML ist die so genannte Blastenkrise, die relativ plötzlich im Verlauf der chronischen Phase oder im Anschluss an die akzelerierte Phase auftritt. Man findet im peri-

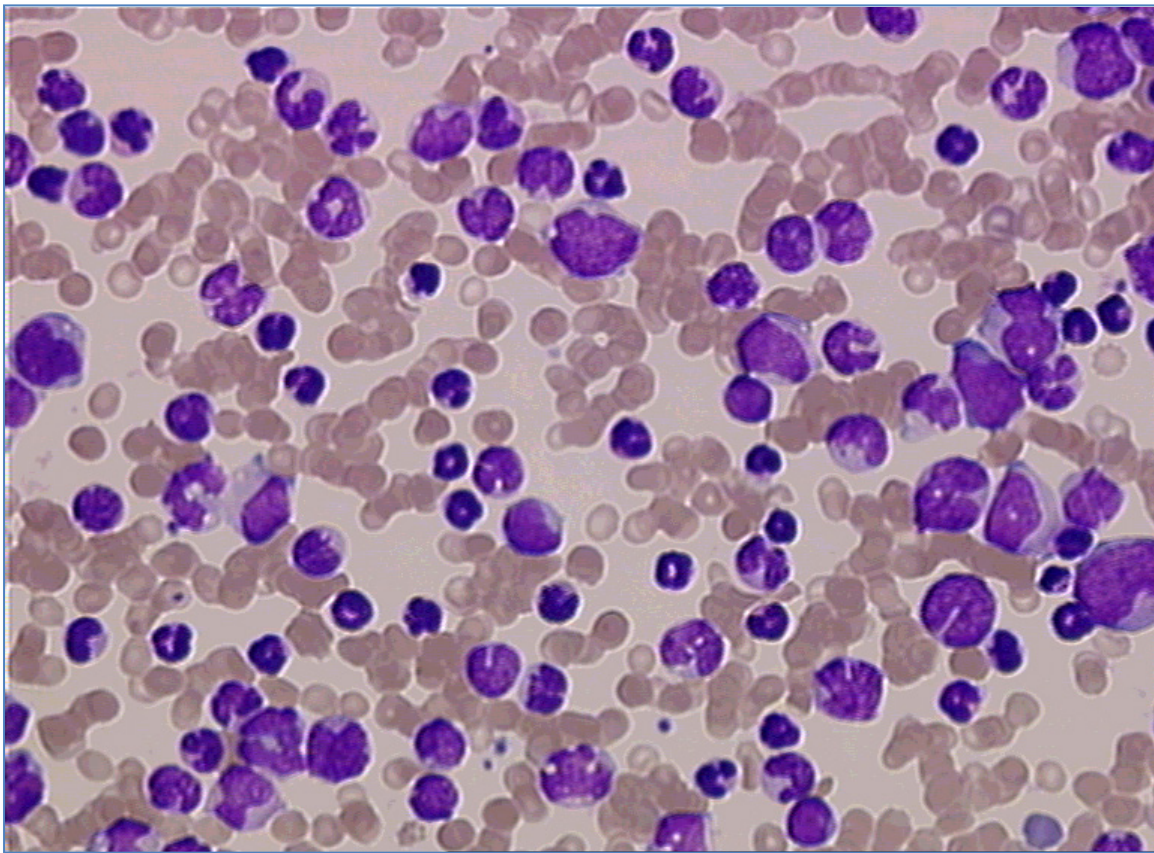


Abbildung 5 Blutausstrich bei CML in 400facher Vergrößerung

(Foto: Klinik für Hämatologie und Onkologie, HHU Düsseldorf)

Man sieht eine Leukozytose mit pathologischer Linksverschiebung: Stabkernige neutrophile Granulozyten, Myelozyten, Promyelozyten und auch Blasten sind erkennbar. Außerdem Dysplasie der Erythropoese mit Anisozytose und vereinzelt kernhaltigen erythrozytären Vorstufen.

peren Blut die verschiedensten blastären Phänotypen (myeloisch, megakaryoblastär, monoblastär, erythroblastär, basophil, eosinophil, B-lymphoblastisch, T-lymphoblastisch), was den Stammzellcharakter der CML verdeutlicht⁶⁶. Damit hat die CML in der Blastenkrise alle Kriterien einer akuten Leukämie mit einem Blastenanteil von über 30% in peripherem Blut und Knochenmark^{69, 70}.

1.3.3 Molekularbiologie

Das für die CML charakteristische zytogenetische Phänomen ist das Philadelphia-Chromosom, ein verkürztes Chromosom 22, welches durch Brüche im Bereich der langen Arme der Chromosomen 9 und 22 und anschließende reziproke Translokation dieser Fragmente entsteht (Abb. 6).

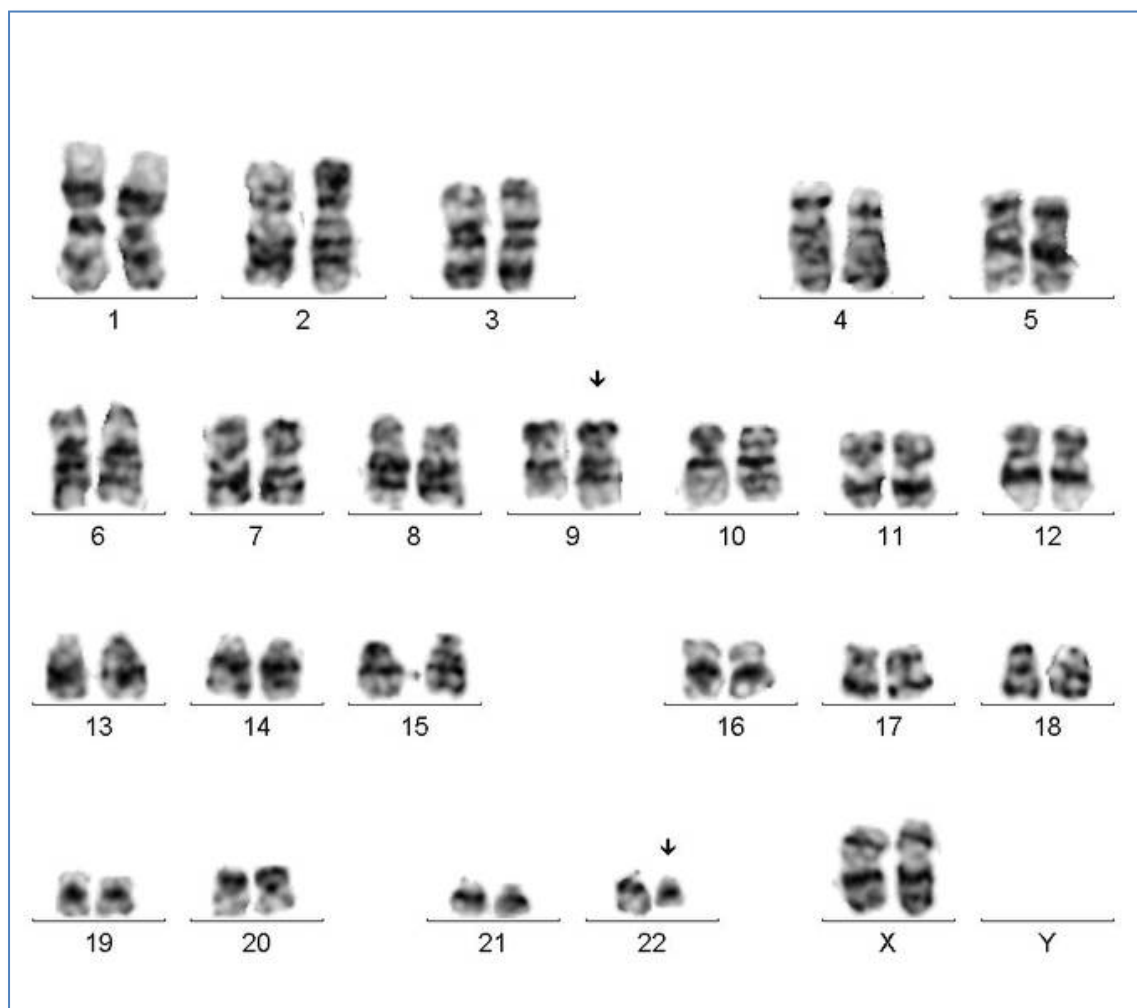


Abbildung 6 Karyogramm eines Patienten mit dem Philadelphia-Chromosom. Mit Pfeilen markiert ist die reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 (aus www.medizinisch-genetik.de, 16.03.2010).

Auf molekularer Ebene liegen die Bruchpunkte auf Chromosom 9 im Bereich des *abl*-Protoonkogens, auf Chromosom 22 im Bereich des *bcr*-Gens⁶⁶. Durch die Philadelphia-Translokation kommt es zur Fusion dieser beiden Gene *bcr* und *abl* und damit zur Entstehung des *bcr-abl*-Fusionsonkogens^{54, 71, 72}. Dieses kann in verschiedenen Spleißvarianten vorliegen, die zu einem 190 kD, einem 210 kD und einem 230 kD schweren Protein führen (Abb. 7). Am häufigsten kommt die 210 kD schwere Variante, das $p210^{bcr-abl}$ vor⁷³. Die Art des *bcr-abl*-Fusionsproteins ist mit dem Phänotyp der CML assoziiert. Während die typische CML bei Vorliegen des $p210^{bcr-abl}$ beobachtet wird, ist die seltene $p190^{bcr-abl}$ -CML durch Monozytose und fehlende Basophilie charakterisiert. Die $p230^{bcr-abl}$ -CML reift deutlich besser aus, ist mit einer Thrombozytose assoziiert und wird auch als chronische Neutrophilenleukämie bezeichnet⁶⁶.

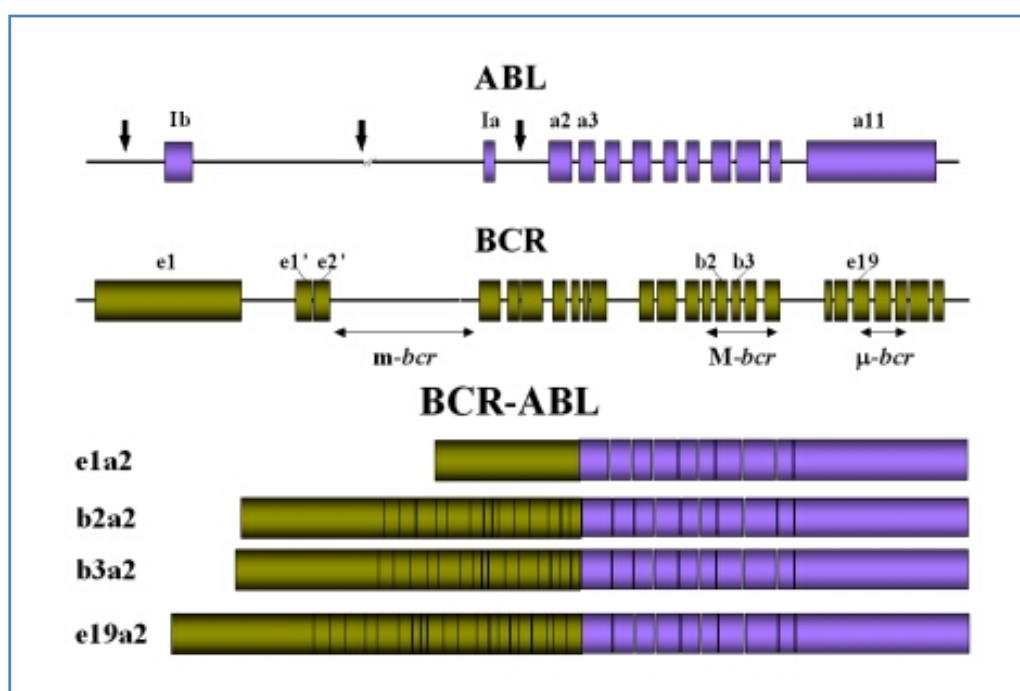


Abbildung 7 Die verschiedenen Spleißvarianten des *bcr-abl*-Gens (aus www.cml-online.de, 2005)

Zum Verständnis der funktionellen Veränderungen in der Zelle, die durch die Entstehung des *bcr-abl*-Fusionsonkogens hervorgerufen werden, ist insbesondere die Funktion von Wildtyp-*abl* von entscheidender Bedeutung. *Abl* ist eine nur im Zellkern lokalisierte Nichtrezeptor-Tyrosinkinase^{74, 75}, deren Funktion noch nicht vollständig geklärt ist. *Abl* ist an der Regulation des Zellzyklus, an der zellulären Antwort auf radioaktive Strahlung und an der Informationsweitergabe der Zelle über Integrin-Moleküle beteiligt⁷⁶. Das Protoonkogen *c-abl* weist

Homologien mit dem v-abl-Onkogen auf, welches für die transformierende Aktivität des Abelson-Mäuse-Leukämie-Virus verantwortlich ist. Über bcr ist bislang nur sehr wenig bekannt. Es handelt sich um eine Serin-Threoninkinase. Es ist umstritten, ob bcr überhaupt etwas zur Pathogenese der CML beisteuert, denn bcr-abl positive Leukämien können auch in bcr -/- Mäusen ausgelöst werden⁷⁷. Bcr selbst scheint also kein onkogenes Potential zu besitzen.

Die Fusion der beiden Gene führt nun zu deutlichen Veränderungen in der Zelle. Einerseits führt die veränderte Signalsequenz des Proteins zu einer anderen Lokalisierung: Das nukleäre Protein abl wird durch die Fusion mit bcr ins Zytosol transloziert und kann so auf völlig verschiedene Signaltransduktionswege einwirken. Außerdem kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der Tyrosinkinase-Aktivität, was für die Pathogenese den wichtigsten Einflussfaktor darstellt⁷⁸. Deregulierte Tyrosinkinase-Aktivität scheint ein gemeinsamer Mechanismus bei den myeloproliferativen Störungen zu sein, Mutationen anderer Tyrosinkinasen konnten bereits als pathogenetisches Prinzip für einzelne Erkrankungen dieser Gruppe gezeigt werden: Eine Genfusion von ZNF198 mit dem *fibroblast growth factor receptor 1* führt zum 8p11-positiven myeloproliferativen Syndrom⁷⁹ oder die des tel-Onkogens mit dem *platelet-derived growth factor β receptor* zur t(5;12)-positiven chronischen myelomonozytären Leukämie⁷².

Das bcr-abl-Protein wirkt an verschiedenen Stellen auf die physiologischen Signalkaskaden ein. Dies führt zu den drei pathogenetischen „Säulen“ der malignen Transformation bei der CML: Veränderte Adhäsionseigenschaften am Knochenmarkstroma⁸⁰, Aktivierung mitogener Signalwege⁸¹ und Apoptoseinhibition⁸² (Abb. 8). Die veränderten Adhäsionseigenschaften erklären sich aus der Interaktion mit dem abl-Anteil des bcr-abl-Proteins: Wie oben erwähnt, stellt abl für Adhäsionsproteine ein Adaptermolekül dar⁸³. Hohe zytosolische Konzentrationen

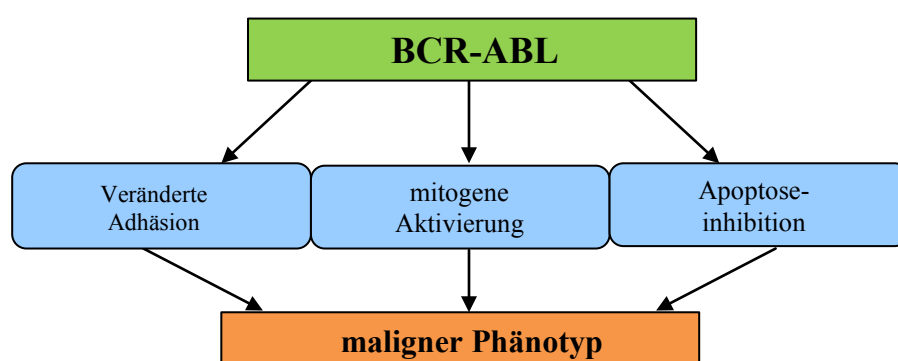


Abbildung 8 Vermutete Pathomechanismen bei der CML (modifiziert nach M. Deininger⁸⁵)

von bcr-abl führen nun dazu, dass eine $\beta 1$ -Integrinvariante exprimiert wird, die auf normalen Progenitorzellen nicht vorkommt⁸⁴. Diese Variante wirkt inhibitorisch auf die Adhäsion. Die durch bcr-abl ausgelösten Veränderungen in der Signaltransduktion sind insgesamt recht komplex und zeichnen sich durch verschiedene Querverknüpfungen und Redundanzen aus. Die Signale haben sowohl anti-apoptotische als auch proliferative Anteile und sind nur schwer trennbar. Sie können hier nur stark vereinfacht dargestellt werden. Wichtige beteiligte Gene sind ras, die MAP-Kinase-Familie und die PI-3-Kinase mit der Serin-Threoninkinase AKT (Abb. 9).

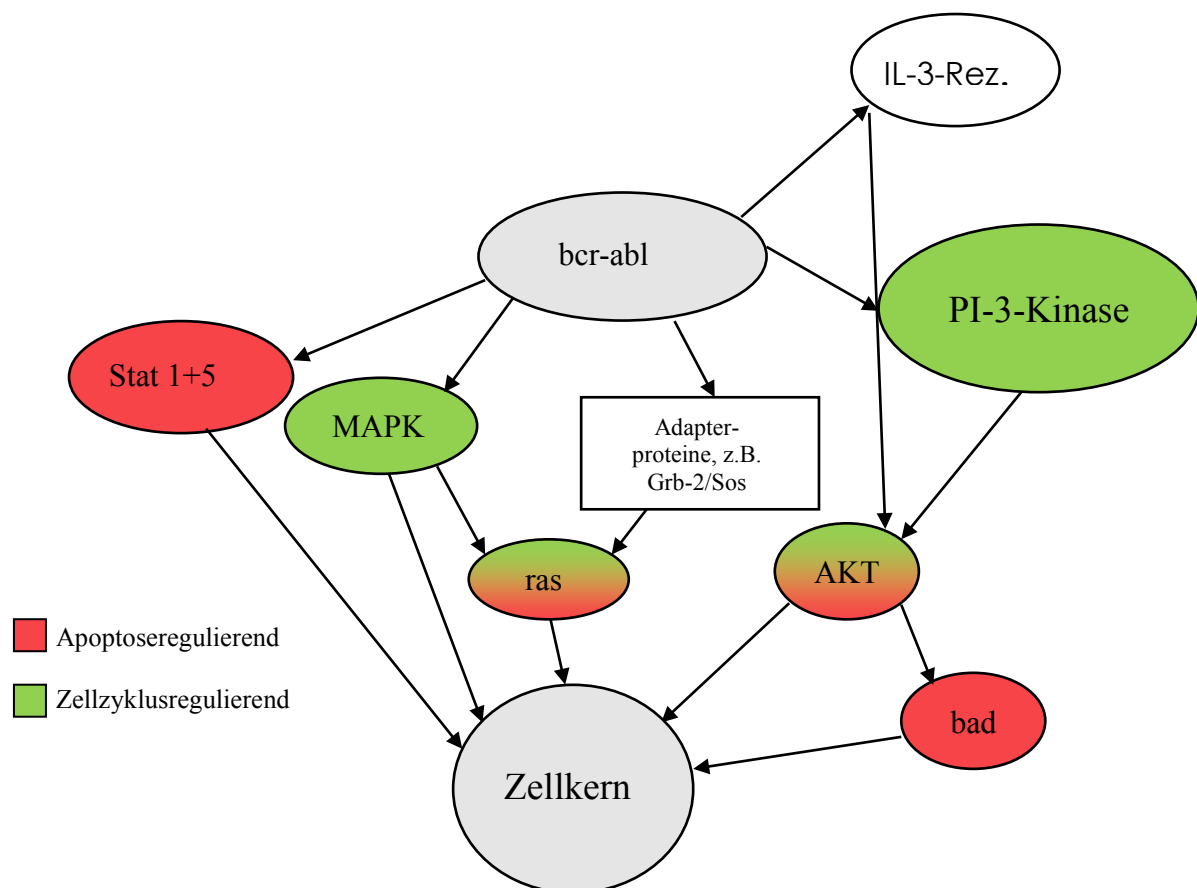


Abbildung 9 Schematische, vereinfachte Darstellung wichtiger Signaltransduktionswege des bcr-abl-Onkoproteins

Ein Partner von bcr-abl sind die Gene des ras-Signalweges und der MAP-Kinase-Familie: bcr-abl selbst und verschiedene seiner Adapterproteine, z.B. Grb-2/Sos⁸⁶ aktivieren diese Kaskade konstitutiv. Interessanterweise sind dafür aktivierende N-ras-Mutationen nicht notwendig⁸⁷. Ras spielt auch eine wichtige Rolle für die Apoptose in der CML, indem es die Ex-

pression von bcl-2 reguliert⁸⁸. Bcr-abl kann zudem an die β c-Untereinheit des IL-3-Rezeptors binden⁸⁹, dieser Rezeptor ist für die Hämatopoese generell wichtig und kann bcr-abl-positiven Zellen eine partielle Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren sichern⁹⁰.

Aus der Großfamilie der *signal transducers and activators of transcription* (STATs) spielen STAT 1 und besonders STAT 5 durch ihre anti-apoptotischen Effekte eine Rolle^{91, 92}.

Weiterhin erwähnenswert sind die Gene des PI3-Kinase-Weges⁹³. Ein wichtiger Partner der bcr-abl-Adapterproteine ist die Serin-Threoninkinase akt als nachgeschalteter Partner der PI3-Kinase⁹⁴. Akt ist in der Hämatopoese normalerweise in den Signalweg des IL-3-Rezeptors eingebunden (s.o.)^{95, 96}. Außerdem ist das pro-apoptotische bad ein Schlüsselsubstrat von akt. Phosphoryliertes bad ist inaktiv, denn phosphoryliert kann es nicht mehr an anti-apoptotische Proteine binden^{97, 98}.

1.3.4 Zellbiologie und Stammzellkinetik

Damit eine Zelle die Definition einer Stammzelle erfüllt, muss sie über zwei wesentliche Eigenschaften verfügen: Die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und die Möglichkeit zur Differenzierung in reife Zellen. Für die Blutstammzelle bedeutet dies, dass sie dem Organismus eine lebenslange Versorgung mit Blutzellen ermöglicht^{99, 100}. Ein Oberflächenmarker für hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen ist das CD34-Antigen^{101, 102}. Die Funktion des CD34-Moleküls ist zwar bis heute nicht eindeutig geklärt, allerdings macht es Stammzellen für Forschung und Therapie zugriffsfähig, denn über immunmagnetische Verfahren kann man CD34⁺ Zellen in hoher Reinheit gewinnen. CD34⁺ Zellen sind allerdings keine homogene Population. Die Expression von CD34 lässt sich von der frühen, naiven Stammzelle, bis hin zu den bereits in ihrer Entwicklung liniendeterminierten Progenitorzellen (Abb. 10) verfolgen. Um ausdrücken zu können, wie weit eine CD34⁺ Zelle in ihrer Entwicklung fortgeschritten ist, verwendet man andere Marker: CD38 fehlt den frühen Zellen mit besonders hohem Rekonstitutionspotential und wird erst später exprimiert¹⁰³. Linien-spezifische Marker der myelo-monozytären, erythrozytären, megakaryozytären und B- bzw. T-lymphozytären Reifung kommen noch hinzu.

Stammzellen dienen als gutes Modell für die Tumorforschung im Allgemeinen, da ihnen Eigenschaften zuzurechnen sind, die sich auch im Tumorgewebe wiederfinden. Solche Eigenschaften sind zum Beispiel die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, die Migrationsfähigkeit sowie

die reduzierte Alterung durch Expression von Telomerase¹⁰⁴. Es gibt einige maligne Erkrankungen, für die gezeigt wurde, dass es sich um Erkrankungen der entsprechenden, gewebespezifischen Stammzellen handelt. Ein Paradebeispiel hierfür ist die CML. Bei dieser Leukämie handelt es sich um einer Erkrankung der CD34⁺ hämatopoetischen Stammzelle. Daher sind alle Blutzellreihen Teil des malignen Klons, auch wenn klinisch die Granulo- und Thrombozytopenese im Vordergrund stehen. Bei der Transformation in die Blastenkrise kommt es dann zu einer Expansion der granulozytären und monozytären Progenitorzellen. Diese gewinnen somit ein „Stammzellpotential“, das die nativen Progenitorzellen nicht haben¹⁰⁵, sodass man sie heute als Kandidaten für die Population der „leukämischen Stammzellen“ bei der CML-Blastenkrise bezeichnet. Die Aufklärung der „leukämischen Stammzellen“ auch anderer leukämischer Erkrankungen ist momentan ein reges Forschungsgebiet.

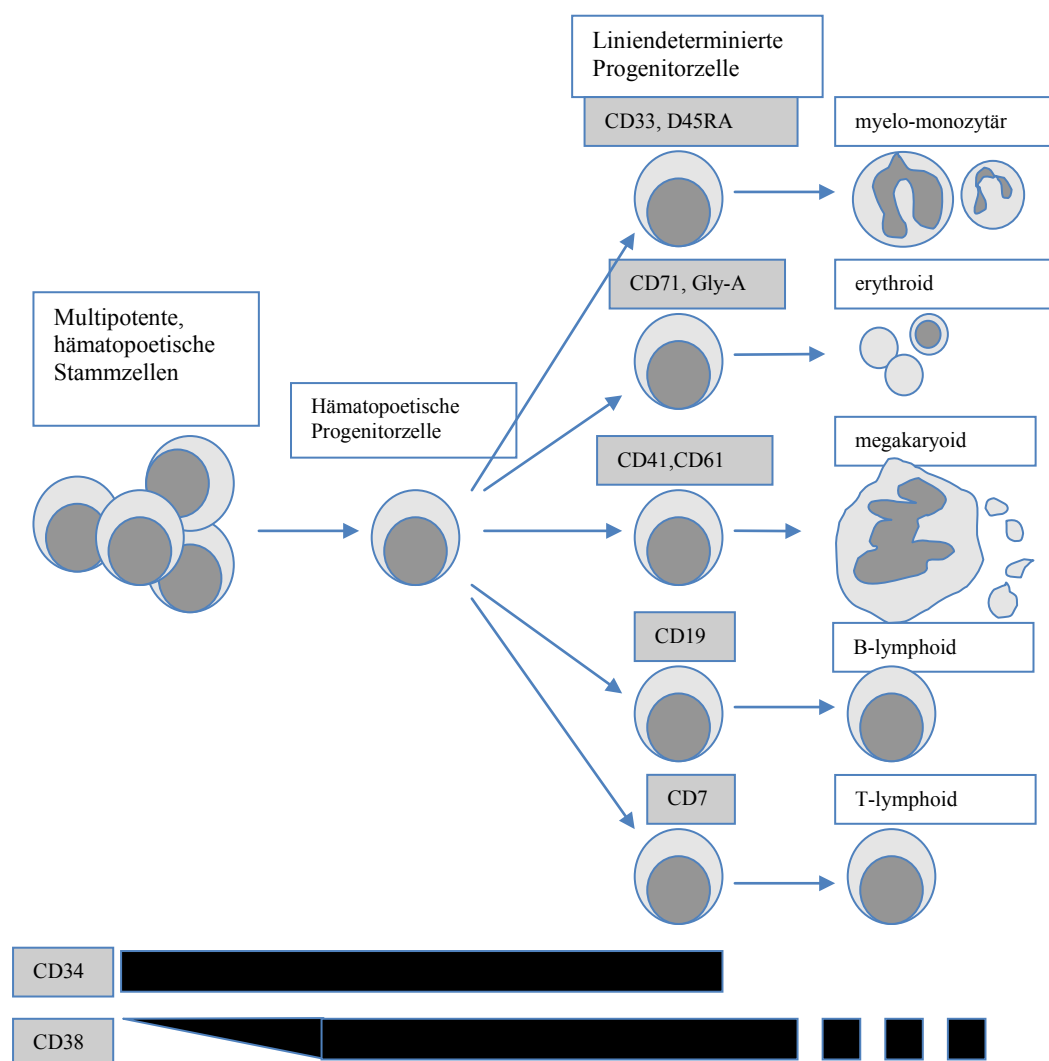


Abbildung 10 Schematische Darstellung der Hämatopoese mit immunologischen Markern einzelner Zellpopulationen, *for details see text* (modifiziert nach U. Steidl¹⁰⁰)

Die Stammzellen bei der CML zeichnen sich prinzipiell durch die gleichen Eigenschaften wie die normalen Stammzellen aus, grundlegende Unterschiede finden sich in der verzögerten Ausreifung der Zellen und der gesteigerten Proliferationsaktivität. Interessant ist, dass die malignen Stammzellen vom gesunden Pendant nicht grundverschieden sind, wie die Gruppe um Deininger in ihrer Übersichtsarbeit darlegte⁸⁵. Vielmehr sind die Abläufe sehr ähnlich und relativ nah an der normalen Physiologie, verglichen mit anderen malignen Erkrankungen. Einen Hinweis auf eine mitochondriale Beteiligung an der Pathogenese der CML gibt es bislang nicht.

1.3.5 Therapie und Prognose

Die definitive Heilung der CML kann nur durch eine allogene Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation erreicht werden (Heilungsrate von bis zu 70%)¹⁰⁶⁻¹¹⁴. Diese sollte daher möglichst frühzeitig nach Diagnosestellung erfolgen, falls ein geeigneter Spender vorhanden ist. Aufgrund ihrer hohen Systemtoxizität kommt diese allerdings nur für jüngere Patienten in Frage. Zum Zwecke der Reduktion dieser Toxizität wurden in den letzten Jahren nicht-myceloablative Blutstammzelltransplantationsprotokolle entwickelt^{115, 116}. Die Indikation zur allogenen Stammzelltransplantation besteht derzeit nur bei Resistenzentwicklung gegenüber Imatinib und neueren Tyrosinkinaseinhibitoren oder bei Progression in Akzelerationsphase und Blastenkrise¹¹⁷.

Als rein medikamentöse Therapien werden die Zytostatika Hydroxyurea oder Cytosin-Arabinosid verwendet, in früherer Zeit kam auch Busulfan zur Anwendung. Diese kommen als Therapeutikum nur dann dauerhaft in Frage, wenn Kontraindikationen gegen die anderen Therapien bestehen. Über viele Jahre wurde als Standardtherapeutikum das Interferon- α ^{118, 119} verwendet. Hierbei wurden immerhin in 15 % der Fälle komplette zytogenetische Remissionen erreicht.

Seit einigen Jahren steht der bereits oben erwähnte Tyrosinkinasehemmer Imatinib (Glivec®)^{60, 120, 121} zur Verfügung, der seit November 2001 bei CML in akzelerierter Phase und Blastenkrise und seit 2003 als Standardtherapeutikum bei CML in chronischer Phase in Deutschland zugelassen ist. Imatinib stellt ein völlig neues Therapieprinzip dar, da es die Tyrosinkinase-Aktivität des bcr-abl-Onkoproteins hemmt und so spezifisch in die maligne Signaltransduktion eingreift^{122, 123, 124}. Dies führt zu einer drastischen Wachstumsreduktion

der malignen Zellen in vitro und in vivo^{125, 126}. Die Einführung dieser neuen Substanz führte in kürzester Zeit zu einer Revolution der Therapie⁶⁰. In 85% der Fälle kommt es zu kompletten zytogenetischen Remissionen, das progressionsfreie Überleben beträgt nach 3 Jahren 95% (vgl. 70% bei Interferon- α) (Abb. 11).

Aufgrund der Transplantations-assoziierten Morbidität und Mortalität sowie der spezifischen Wirkungsweise bei günstigerem Nebenwirkungsprofil besteht derzeit ein Konsens über die Wahl von Imatinib als Therapie der ersten Wahl bei CML in chronischer Phase.

Ein neues therapeutisches Problem ist die Resistenzbildung des bcr-abl-Onkoproteins gegenüber Imatinib. Dies bedeutet, dass eine hämatologische oder zytogenetische Remission zu definierten Zeitpunkten nicht erreicht wird. Die Häufigkeit einer primären Resistenz steigt mit Fortschreiten der Erkrankung an (5% in chronischer Phase, 18 bis 30% in akzelerierter Phase und 60% in der Blastenkrise)¹²⁷⁻¹³⁴. Unter einer sekundären Resistenz versteht man den Verlust einer zuvor erreichten zytogenetischen oder hämatologischen Remission oder die Progression der Erkrankung unter der laufenden Therapie¹¹⁷. Diese Resistenzursachen sind in jüngerer Zeit intensiv erforscht worden und einige Fälle erklären sich durch Mutationen des bcr-abl-Gens, die im Protein zu einer räumlichen Konformationsänderung des aktiven Zentrums der Tyrosinkinaseuntereinheit führen und Imatinib nicht wirksam werden lassen bzw. zu einer mangelnden Adhärenz von Imatinib führen^{135, 136, 137}. Andere Fälle erklären sich zum Beispiel über Genamplifikationen des bcr-abl-Gens oder zusätzliche zytogenetische Aberrationen¹³⁸⁻¹⁴⁶. Bei suboptimalem Ansprechen auf Imatinib oder Resistenz besteht neben der Dosiserhöhung mittlerweile die Möglichkeit, auf andere zugelassene abl-Tyrosinkinaseinhibitoren zu wechseln. Dasatinib ist bei Vorliegen einer Resistenz oder Intoleranz gegenüber Imatinib für die Behandlung der CML in allen Phasen zugelassen^{147, 148}, Nilotinib für die Therapie von Patienten in chronischer und akzelerierter Phase¹⁴⁹⁻¹⁵⁷.

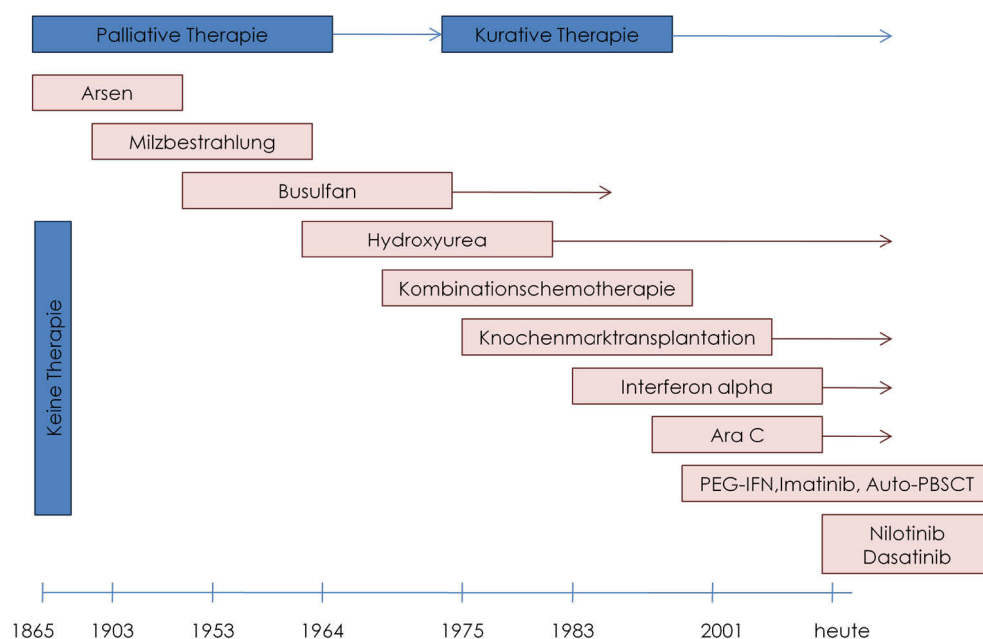


Abbildung 11 Die historische Entwicklung der CML-Therapie (modifiziert nach www.cml-online.de, 2005)

Neben der Resistenzentwicklung kommen aufgrund der immer breiteren Anwendung von Imatinib nun zunehmend neue Probleme zum Vorschein. Denn das In-vitro-Wachstum der malignen Zellen wird durch Imatinib zwar stark reduziert, aber nicht gänzlich aufgehalten¹²². Ähnlich verhält es sich mit den Verhältnissen in vivo, denn ein fehlender Nachweis von bcr-abl mRNA während Imatinib-Therapie kann zwar erreicht werden (molekulare Remission), diese Erfolge treten allerdings nicht regelmäßig auf¹⁵⁸. So findet die minimale Resterkrankung (MRD, *minimal residual disease*), ein Begriff, der erst durch die moderne Molekularbiologie Bedeutung erlangte, heute zunehmend Aufmerksamkeit. Eine zur MRD gängige Theorie ist, dass es sich hierbei um Residuen sehr früher „ruhender“ Blutstammzellen handelt, die eine so geringe Proliferationsrate haben, dass Imatinib seine Toxizität nicht entfalten kann^{159, 160}.

Die mediane Überlebenszeit der CML betrug unter Interferontherapie im Allgemeinen 4-5 Jahre. Die Prognose wird für Patienten, die mit Interferon- α behandelt wurden, durch den so genannten *New Score*-Prognoseindex¹⁶¹ bestimmt. Dieser Index berücksichtigt Alter, Milzgröße, Anzahl der Blasten, der Eosinophilen, der Basophilen und der Thrombozyten. Da sich die Therapiemöglichkeiten in den letzten Jahren stark verändert haben, scheint hier allerdings eine Überarbeitung sinnvoll. Ungünstige Prognosefaktoren sind das Fehlen des Philadelphia-Chromosoms (s. u.), zusätzliche Chromosomenaberrationen, Thrombozytenzahlen $< 100.000/\mu\text{l}$, Hämoglobin $< 7\text{mg/dl}$ und mehr als 20% Basophile.

1.4 Andere chronische myeloproliferative Neoplasien

1.4.1 Die Philadelphia-negative chronische myeloische Leukämie

Bei etwa 10% der Patienten mit klinischen und morphologischen Kriterien der CML fehlt das typische Philadelphia-Chromosom. Bei ca. 30-50% dieser Patienten lässt sich durch molekulargenetische Techniken (*Southern Blot*, *Western Blot*, RT-PCR, FISH) trotzdem das bcr-abl-Transkript nachweisen. Diese Ph-negativen/bcr-abl-positiven Fälle werden durch „variante“ Ph-Translokationen mit Beteiligung mehrerer Chromosomen (Chromosom 7 oder 8) verursacht. Das klinische Bild und die Prognose entsprechen dem der ph-positiven CML. Die übrigen 50-70% stellen Ph-negative und bcr-abl-negative Fälle dar. Aufgrund einiger Ähnlichkeiten mit der chronischen myelomonozytären Leukämie (CMML, zählt zu den myelodysplastischen Syndromen) wie zum Beispiel Alter, Milzgröße und periphere Blutparameter wurden nach Einführung der FAB-Kriterien für myelodysplastische Syndrome einige Fälle als CMML reklassifiziert; diese Einordnung wurde aber mittlerweile wieder verworfen, heute wird die so genannte „atypische“ CML als eigene Entität angesehen.

Die bcr-abl-negative CML betrifft meist ältere Patienten und ist gekennzeichnet durch niedrigere initiale Leukozytenzahlen, niedrigere Basophilenzahlen, niedrigere Thrombozytenzahlen, einen höheren ALP-Index, höhere LDH-Werte, ein schlechteres Ansprechen auf die Therapie und einen insgesamt aggressiveren Verlauf³⁹.

1.4.2 Die Polyzythämia vera

Bei der Polyzythämia vera handelt es sich um eine seltene Erkrankung der myeloepoetischen Stammzelle mit autonomer Proliferation v. a. der Erythropoese, aber auch der Thrombo- und Granulopoese¹⁶².

Die PV wird im Allgemeinen nach dem 60. Lebensjahr diagnostiziert, hat eine Inzidenz von 4 - 6 Fällen / 1 Mio. Einwohner / Jahr in Deutschland und tritt bei Männern und Frauen im Verhältnis von 3:2 auf³⁹. Die Ätiologie der PV ist unbekannt.

Das klinische Bild der PV wird vorrangig bestimmt durch die Polyglobulie und die daraus resultierende Erythrozytose. Diese führt zunächst zu einer Hautrötung (Plethora), später treten Symptome der zerebralen (z.B. Kopfschmerzen, Schwindel, TIA) und peripheren (z. B.

Akrozyanose, Angina pectoris) Minderdurchblutung auf, die durch die Erhöhung der Blutviskosität bedingt sind¹⁶². Weitere typische Symptome sind Hypertonieneigung, Tinnitus, Sehstörungen, Epistaxis, Hepatosplenomegalie, thrombembolische Ereignisse, Erythromelalgie (*burning feet syndrome*) und ein quälender therapieresistenter, oft aquagener Pruritus, sowie die klassischen „B-Symptome“ Müdigkeit, Leistungsminderung, Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust.

Das Blutbild bei der PV zeigt eine Erhöhung des Hämatokrits, der Erythrozytenmasse, des Blutvolumens und meist auch des Hämoglobinwertes. Eine Granulozytose wird in ungefähr 2/3, eine Thrombozytose in 50% der Fälle beobachtet¹⁶³. Die ALP ist stark erhöht, Harnsäure, LDH und CRP sind ebenfalls oberhalb der Norm, der Erythropoetin-Spiegel ist vermindert. Das Knochenmark ist hyperzellulär und zeigt eine ausgeprägte Eisenverarmung¹⁶². Zur Erleichterung der Diagnosestellung wurden von der *Polycythemia Vera Study Group* (PVSG) Diagnosekriterien erstellt (s. Tab. 5).

Tabelle 5 Diagnosekriterien der PVSG¹⁶³

Kriterium	Bedingungen
A1	Erythrozytenzahl $> 5,5 \times 10^9$ / bzw. $> 5,0 \times 10^9$ bei Männern/Frauen oder Hämoglobin $> 18,5$ g/dl / bzw. $> 16,5$ g/dl bei Männern/Frauen oder Hämatokrit über 52% / 49% bei Männern/Frauen
A2	keine sekundäre Erythrozytose: keine familiäre Polyglobulie keine Steigerung des Erythropoetin (EPO)-Wertes durch Hypoxie keine gesteigerte EPO-Bildung durch Tumor keine gesteigerte O ₂ -Affinität des Hb keine erhöhte EPO-Affinität durch Anomalie des EPO-Rezeptors
A3	Nachweis der <i>JAK2</i> -Mutation oder Nachweis der <i>PRV1</i> -Überexpression in Granulozyten oder klonale genetische Anomalie in den Zellen des Knochenmark außer Philadelphia-Chromosom oder BCR-ABL-Fusionsgen
A4	Splenomegalie
A5	Erythroide Koloniebildung <i>in vivo</i>
B1	Thrombozytenzahl $> 450 \times 10^9/l$ (450 000/ μ l, 450/nl)
B2	Leukozytenzahl $> 12 \times 10^9/l$ (12 000/ μ l, 12/nl)
B3	Proliferation des Knochenmarks mit Überwiegen der erythropoetischen und megakaryozytären Proliferation
B4	Niedriger Erythropoetinspiegel im Serum

Die Diagnose einer PV kann gestellt werden,
wenn *erstens*:

- Kriterien A1 + A2 **oder** Kriterien A1 + A3 erfüllt sind,

und *zweitens*

- ein weiteres A-Kriterium **oder** zwei B-Kriterien erfüllt sind.

Das Krankheitsbild beruht auf einer noch nicht vollständig verstandenen Transformation multipotenter Stammzellen. Vor kurzem wurde eine Mutation im JAK2-Gen (JAK steht für "Januskinase"), einer Tyrosinkinase, beschrieben^{164, 165}. Diese Mutation der genomischen DNA führt zu einem Aminosäure-Austausch (Valin gegen Phenylalanin) an Position 617 des JAK2-Proteins ("V617F-Mutation"). Das JAK2-Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion in der Zelle^{166, 167}. Durch die Mutation wird es aktiviert, so dass betroffene Zellen dauerhaft eine gesteigerte Zellteilungsrate haben. Die V617F-Mutation findet man bei verschiedenen hämatologischen Erkrankungen, aber besonders häufig (in mehr als 50%) bei der Polyzythämia vera. Die betroffenen blutbildenden Stammzellen sind von der Stimulation durch Erythropoetin (EPO) unabhängig und zeigen eine hundertfach erhöhte Sensitivität auf Wachstumsfaktoren wie IGF-1 (*Insulinlike-Growth-Factor-1*) und IL-3 (Interleukin-3).

Die PV ist bislang nicht heilbar, das Therapieziel ist die Reduktion der vermehrten Blutzellmasse und die Normalisierung des Hämatokrits, sowie die Vermeidung von Komplikationen der Polyzythämie und Thrombozytose. Bei gesicherter Diagnose sollten als Erstbehandlung Aderlässe durchgeführt werden¹⁶³. Des Weiteren werden Thrombozytenaggregationshemmer zur Vermeidung thrombembolischer Komplikationen, Interferon- α und Hydroxyharnstoff als antiproliferative Therapie und die Radiophosphorthherapie mit ³²P eingesetzt. Im Rahmen klinischer Studien wird versucht, die PV mit einer myeloablativen Therapie und anschließender Knochenmark- oder Stammzelltransplantation definitiv zu heilen. Die mediane Überlebenszeit der PV beträgt 9-12 Jahre, in 20% geht die Erkrankung in eine Osteomyelofibrose (siehe unten) über.

1.4.3 Die Osteomyelofibrose

Die Osteomyelofibrose ist eine seltene, chronisch-progrediente Erkrankung des höheren Lebensalters. Sie ist durch eine fortschreitende fibröse Umwandlung und Insuffizienz des Knochenmarks, eine extramedulläre Blutbildung mit zunehmender massiver Splenomegalie und eine leuko-erythroblastische Anämie mit Poikilozytose gekennzeichnet¹⁶³.

Für die Entstehung der OMF werden mehrere pathogenetische Mechanismen diskutiert: Zum einen führt die maligne Transformation und klonale Proliferation einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle zur paraneoplastischen Sekretion von Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF β , EGF, TNF α , IL-1) mit fibrogener, angiogenetischer und osteogener Wirkung,

durch die normale Fibroblasten zur überschießenden Kollagensynthese (Typ III und Typ I) stimuliert werden. Hierdurch kommt es zu einer zunehmenden reaktiven Markfibrose, zur Verdrängung der normalen Hämatopoese und zur kompensatorischen extramedullären Blutbildung in Milz, Leber und anderen Organen. Zum anderen induzieren zirkulierende Immunkomplexe eine chronische Entzündungsreaktion mit Nachweis von vaskulitischen Veränderungen, Plasmozytose und vermehrter Lymphozyteninfiltration. Die Fibrosierung des Knochenmarks bei der OMF ist demnach eine sekundäre Reaktion auf eine zugrunde liegende Myeloproliferation mit obligater Beteiligung der Megakaryopoese¹⁶³.

Die OMF verläuft klinisch oft über einen längeren Zeitraum asymptomatisch und ist häufig ein Zufallsbefund. Bei zunehmender Markfibrose und Einschränkung der normalen Hämatopoese kommt es zu unspezifischen Allgemeinsymptomen (Leistungsminderung, Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust, Fieber, Nachtschweiß, Blässe), Anämie, Leukopenie mit erhöhter Infektanfälligkeit, Thrombopenie mit Blutungsneigung und Petechien sowie Oberbauchbeschwerden durch zunehmende Spleno- und Hepatomegalie. Das Labor zeigt initial eine Leuko- und Thrombozytose, später eine Panzytopenie, wobei die Anämie im Vordergrund steht⁸². LDH, CRP und ALP sind mäßig erhöht. Bei der Knochenmarkpunktion kommt es aufgrund der Markfibrose häufig zur *Punctio sicca*; entscheidend ist daher die Knochenmarkbiopsie mit histologischer Untersuchung.

Die Therapie der OMF ist palliativ, eine periphere Blut-Stammzelltransplantation war bisher nur bei wenigen Patienten kurativ. Bei asymptomatischen Patienten besteht keine Therapieindikation. Die palliative Therapie stützt sich auf supportive, symptomorientierte Maßnahmen wie z. B. die Gabe von Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten, Einsatz von Desferroxamin (Desferal[®]) bei Eisenüberladung durch hohe Transfusionsfrequenz und Gabe von Allopurinol bei erhöhten Harnsäurespiegeln durch gesteigerten Zellzerfall. Bei Anämie kann durch die Gabe von Androgenen (Danazol/Winobanin[®] oder Metenolon/Primobolan[®]) eventuell eine Stimulation der Blutbildung erreicht werden¹⁶². Bei symptomatischer Splenomegalie und/oder Hypersplenismus werden eine milde Chemotherapie mit Hydroxyharnstoff (z. B. Litalir[®]) oder alternativ mit Chlorambucil, Busulfan oder Thioguanin und/oder eine Milzbestrahlung empfohlen. Die Splenektomie gilt als *Ultima ratio* bei intolerablen, Hydroxyharnstoff-refraktären Splenomegalie-bedingten Schmerzen, refraktärer hämolytischer Anämie oder Thrombozytopenie¹⁶³.

Die OMF ist eine progrediente und in der Regel chronische Erkrankung und kann sich deshalb über einen Zeitraum von mehr als 10 Jahren erstrecken. Da der klinischen Diagnosestellung häufig ein langes symptomfreies Intervall vorausgeht, sind die medianen Überlebenszeiten sehr variabel, sie betragen durchschnittlich ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung 4-5 Jahre. Als ungünstige Prognosefaktoren gelten höheres Alter, Anämie und Thrombozytopenie. Dagegen sind Milzgröße, Markzellularität und Schweregrad der Fibrose für die Prognose nicht von Bedeutung¹⁶³.

1.4.4 Die Essentielle Thrombozythämie

Die letzte der zum Formenkreis der MPS gehörenden Erkrankungen, die in dieser Arbeit kurz angesprochen werden soll, ist die Essentielle Thrombozythämie. Hierbei handelt es sich um eine hämatopoetische Stammzellerkrankung mit klonaler oder polyklonaler Expansion der Thrombozytopoese mit Thrombozytenzahlen $> 600.000/\mu\text{l}$ ³⁹.

Die ET ist eine seltene Erkrankung mit einem medianen Manifestationsalter von 60-70 Jahren. Durch die maligne Transformation einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle kommt es möglicherweise zu einer molekularen Veränderung des Thrombopoetin-Gens. Dieses führt zu einer klonalen Proliferation mit Betonung der Thrombopoese und somit zu einer Thrombozytose mit z. T. funktionsgestörten Thrombozyten. Klinisch kommt es nach einer asymptomatischen Anfangsphase zu thrombembolischen Komplikationen (zerebrale, kardiale und periphere arterielle Embolien, tiefe Beinvenenthrombosen, Lungenembolie), zu Blutungen, zur Splenomegalie mit Oberbauchbeschwerden sowie zu den typischen Allgemeinsymptomen einer malignen Grunderkrankung³⁹. Im peripheren Blut findet man eine Thrombozytose, eine Erhöhung von Harnsäure, CRP und LDH und eine normale oder leicht erhöhte ALP. Im Serum zeigt sich häufig eine Pseudohyperkaliämie durch Kaliumfreisetzung aus den Thrombozyten.

Die Indikation zur Einleitung einer Therapie besteht bei Auftreten von Blutungsereignissen, ischämischen Symptomen oder Thrombosen. Zur Prävention thrombembolischer Komplikationen und zur Reduktion der Thrombozytenzahlen werden Acetylsalicylsäure (Aspirin[®]), Hydroxyharnstoff (Litalir[®]), Anagrelide (Agrylin[®]) und Interferon α eingesetzt.

Trotz der potenziellen Morbidität der ET ist die Lebenserwartung der Patienten bei adäquater Therapie nicht wesentlich eingeschränkt. Auftretende Komplikationen können jedoch zu einer

wesentlichen Beeinträchtigung der Lebensqualität führen⁸³. Die mediane Überlebenszeit nach Diagnosestellung beträgt 10-15 Jahre, ca. 25% der Patienten entwickeln im Verlauf eine OMF, 5% eine akute Leukämie.

Für alle hier erläuterten chronisch myeloproliferativen Neoplasien gilt, wie auch schon für die CML, dass es bislang keine Hinweise auf eine Beteiligung mitochondrialer Mutationen an der Pathogenese gibt.

1.5 Die Heteroduplex-Analyse mit dem WAVE[®]-System

Als Screening-Methode bei der Suche nach Mutationen der mtDNA wurde das WAVE[®]-System von Transgenomic (Crewe, United Kingdom) eingesetzt. Es handelt sich hierbei um eine denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatografie (dHPLC), die es möglich macht, DNA-Fragmente automatisch und schnell auf Mutationen zu untersuchen und auch geringe Konzentrationen dieser Mutationen zu detektieren. Diese mutierten DNA-Fragmente können dann eluiert, angereichert und einer näheren Analyse durch DNA-Sequenzierung zugeführt werden. Auf diese Weise war es möglich, eine primäre Suche mittels DNA-Sequenzierung zu umgehen, da diese zum einen bei der Anzahl von Proben vom technischen und finanziellen Aufwand her nicht zu realisieren gewesen wäre und zum anderen sollte primär nach heteroplasmischen Mutationen der mtDNA gesucht werden. Hier hat die automatisierte DNA-Sequenzierung eine deutlich geringere Sensitivität.

1.5.1 Prinzip der Heteroduplex-Analyse mit dem WAVE[®]-System

Die Heteroduplex-Analyse beruht auf der unterschiedlichen thermodynamischen Stabilität von Hetero- und Homoduplexmolekülen. Dazu werden im WAVE[®]-System (Abb. 12) die zu analysierenden PCR-Produkte in einer flüssigen Phase über eine stationäre Phase (hier DNasep Column, Säule mit alkylierten, nichtporösen Poly(styren-divinylbenzen)Teilchen mit

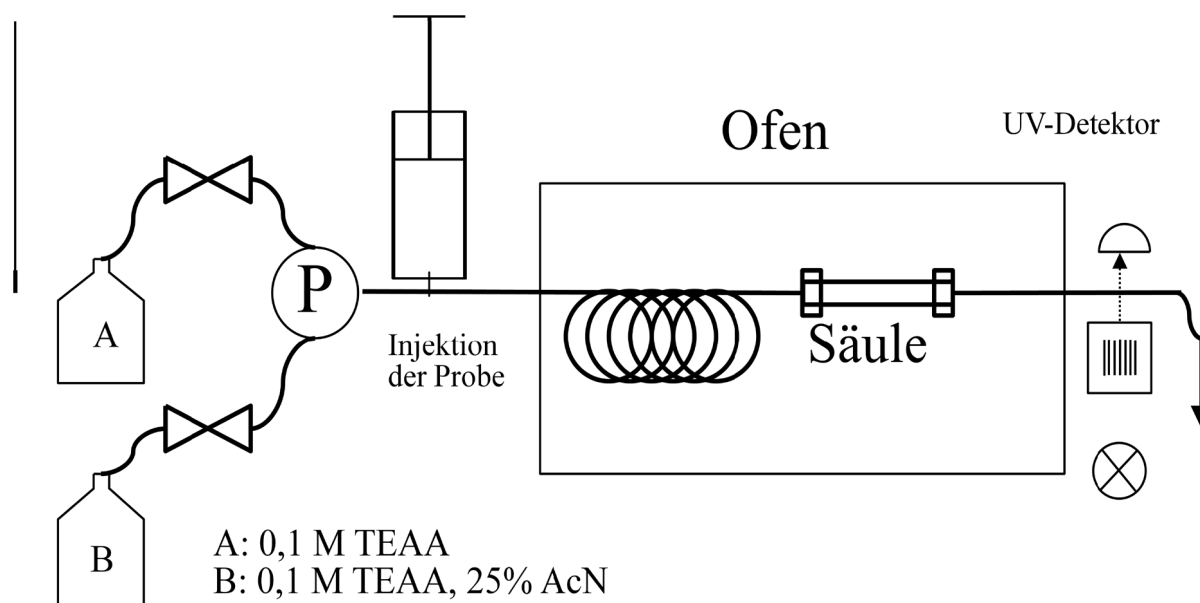


Abbildung 12 Schemazeichnung zur Funktion des WAVE[®]-Systems

einem Durchmesser von 2-3 μm) transportiert und in Abhängigkeit von Größe und Konformation an der stationären Phase zurückgehalten. Zunächst binden fast alle Teilchen, dann wird durch eine kontinuierliche Veränderung der Lösemittel selektiv eluiert. Unterschiedliche Fraktionen des Analysats passieren auf diese Weise zu verschiedenen Zeiten den angeschlossenen UV-Detektor. Die DNA der amplifizierten Genfragmente interagiert in diesem Fall nicht direkt mit der stationären Phase, sondern ein Brücken-Molekül, Triethylammoniumacetat, (TEAA) vermittelt hier die Adsorption. Die Nukleinsäuren sind durch die Phosphatreste negativ geladen, TEAA besteht einerseits aus positiv geladenen Ionen (Ammonium), die die Nukleinsäuren binden, andererseits hat es hydrophobe neutrale Anteile (drei Ethylgruppen), die mit der stationären Phase der Säule interagieren. Je länger das DNA-Fragment ist, desto mehr negative Ladung ist vorhanden und desto mehr TEAA-Moleküle werden gebunden. Gleichzeitig bedeuten mehr TEAA-Moleküle auch eine stärkere Adsorption an die Säule. Die hydrophobe Bindung zwischen TEAA und der stationären Phase kann durch ansteigende Konzentration von Acetonitril in der flüssigen Phase (Puffer B) gelöst werden. Dementsprechend werden mit ansteigender Acetonitril-Konzentration immer längere DNA-Fragmente abgelöst. Folglich werden während eines Probenlaufs zuerst kürzere und später längere DNA-Fragmente detektiert. Zusätzlich zur Separation unterschiedlich langer DNA-Fragmente ist es mit dem WAVE[®]-System auch möglich, DNA-Stränge gleicher Länge, aber unterschiedlicher Konformation zu trennen. Diese unterscheiden sich ebenfalls durch die Bindungseigenschaften an der Säule.

1.5.2 Heteroplasmie-Detektion

Bei der Heteroduplex-Analyse werden Punktmutationen der mtDNA mithilfe einer intraindividuellen Analyse detektiert. Ein positiver Heteroduplexbefund zeigt an, dass gleichzeitig verschiedene mtDNA-Populationen (Wildtyp und Mutante) in einem Individuum vorliegen. Es kann somit ein zuverlässiger Nachweis auf das Vorliegen einer heteroplasmischen Punktmutation erbracht werden. Ein interindividueller Vergleich von mtDNA wäre hier nicht aussagekräftig genug, da es zahlreiche Polymorphismen der mtDNA gibt und Veränderungen der Basensequenz somit nicht gleichbedeutend mit pathogenetisch bedeutsamen Mutationen sind.

Mit dem WAVE[®]-System lassen sich Hetero- und Homoduplices voneinander trennen und damit Punktmutationen nachweisen. Hierzu wird das Fragment-Gemisch der zu untersuchenden PCR-Produkte durch eine thermische Einheit während der HPLC erhitzt. Mit steigender

Temperatur kommt es zu einer fortschreitenden Denaturierung der doppelsträngigen DNA. Die Stabilität des Doppelstranges ist abhängig von der Art der Basenpaarung: Ein stark GC-haltiger Doppelstrang ist stabiler als ein vorwiegend AT-haltiger Strang und denaturiert erst bei höheren Temperaturen.

Ist nach vorheriger De- und Renaturierung eine Basenfehlpaarung an der Stelle einer Punktmutation vorhanden (Heteroduplex), dann fehlt hier die Basenpaarung. Durch diese Destabilisierung denaturieren die Heteroduplexes bei einer niedrigeren Temperatur als die entsprechenden Homoduplexes (Abb. 13).

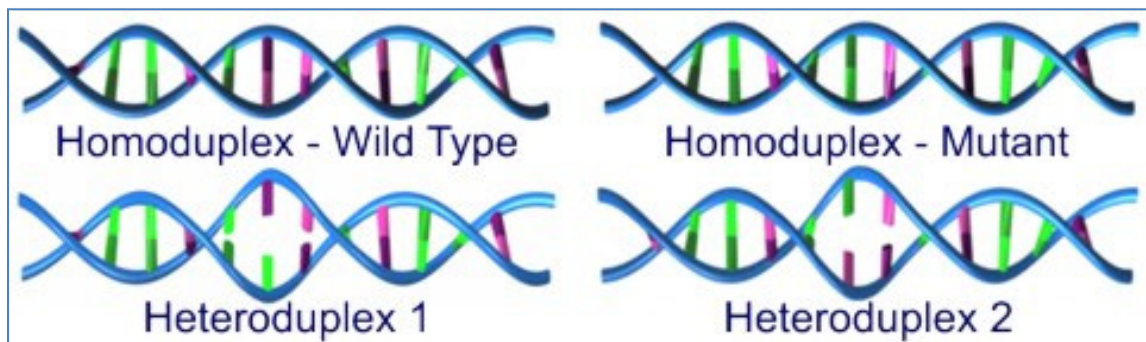


Abbildung 13 Die vier möglichen DNA-Fragmente nach Denaturierung und Annealing (nach www.roswellpark.org/Research/Shared_Resources/Gene_Expression_Resource/TransgenomicWaveSystem, 10.07.2008)

Bei geeignet gewählter Temperatur, die für die einzelnen PCR-Fragmente ausgetestet wurde (siehe Anhang 7.1), und ausreichender Verzögerungszeit in der stationären Phase können in der dHPLC für ein DNA-Fragmentgemisch aus Hetero- und Homoduplexes zwei Populationen von Einzelsträngen detektiert werden, welche die vier Doppelstranggenerationen repräsentieren, die sich bei De- und Renaturierung gebildet hatten (Abb. 14). In der Regel kann man allerdings nur die Hetero- und Homoduplexes voneinander unterscheiden, man sieht nur zwei Peaks, keine vier.

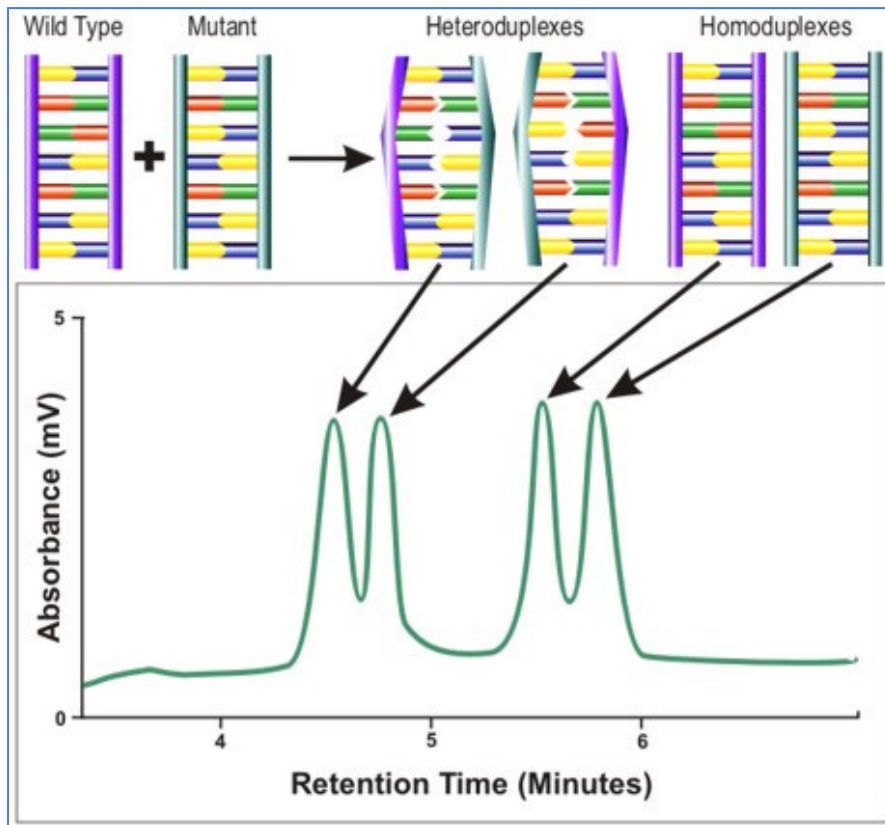


Abbildung 14 DHPLC-Beispiel-Chromatogramm bei Vorliegen einer Mutation
 Die Abbildung zeigt den Idealfall mit aufgetretener Heteroplasmie und Homoplasmie, in der Realität sieht man meist nur zwei oder drei Peaks. (nach www.roswellpark.org/Research/Shared_Resources/Gene_Expression_Resource/TransgenomicWaveSystem, 10.07.2008)

1.6 Die Aufgabenstellung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte als Kontrollgruppe zu der von Wulfert et. al.¹⁷⁰ 2008 veröffentlichten Studie an 104 MDS-Patienten das mitochondriale Genom von Patienten mit einer myeloproliferativen Neoplasie untersucht werden. Gattermann et. al.¹⁶⁷ hatten bei vorhergehenden Untersuchungen eine Vielzahl von mtDNA-Mutationen nachweisen können. Um zu zeigen, ob es sich hierbei um ein Charakteristikum des MDS handelt, sollten bei der vorliegenden Arbeit Patienten mit einer myeloproliferativen Erkrankung auf die gleiche Art und Weise untersucht werden. Patienten mit MPN haben ein klonales Knochenmark, zeigen aber im Gegensatz zu MDS-Patienten pathophysiologisch keine Beteiligung der Mitochondrien. Als Kontrollgruppe wurden keine gesunden Probanden ausgewählt, da diese kein klonales Knochenmark aufweisen und damit Mutationen in einzelnen Stammzellen des gesunden polyklonalen Knochenmarks unter der Nachweisgrenze bleiben.

2 Material & Methoden

2.1 Chemikalien und Bezugsquellen

2.1.1 Chemikalien und Bezugsquellen für die DNA-Extraktion

QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) enthält folgende Lösungen:

- Lysepuffer AL
- Proteinase K
- Waschpuffer AW1 und AW2
- Elutionspuffer AL
- Silicagelsäulchen

2.1.2 Chemikalien und Bezugsquellen für die Polymerase-Kettenreaktion und die Gel-Elektrophorese

- Thermopol Reaction Buffer (New England Biolabs Inc., Frankfurt am Main)
- PCR-Primer (s. Anlage, MWG Biotech AG, Ebersberg)
- Nukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP (Perkin Elmer, Langen; ab Ende 2003 Qbiogene, Heidelberg)
- Vent_R[®]-DNAPolymerase (New England Biolabs Inc., Frankfurt)
- Blue/Orange 6x Loading Dye (Promega, Mannheim)
- pGEM[®] DNA Marker (Promega, Mannheim)
- TAE-Puffer, pH 8,4 (40 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 20 mM Essigsäure, beides Merck, Darmstadt; 1mM EDTA, Roth, Karlsruhe)
- Agarose (peqlab, Erlangen)
- Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml, Sigma, Steinheim)

2.1.3 Chemikalien und Bezugsquellen für die Heteroduplexanalyse mit dem Wave[®]-System

- Aqua dest. (Milli-Q-Aufreinigungsanlage Milipore GmbH, Neu Isenburg)
- TEAA Triethylammonium-Acetat (Transgenomic, Crewe, United Kingdom)

- Puffer A: 0,1M TEAA (50 ml 2M TEAA werden mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt)
- Puffer B: 0,1M TEAA, 25% Acetonitril (50 ml 2M TEAA und 250 ml Acetonitril werden mit Aqua dest. zunächst auf ca. 950 ml, nach Temperaturengleich der endothermen Lösung dann auf 1000 ml aufgefüllt)
- Injektionspuffer: 8% Acetonitril (80 ml Acetonitril werden mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt)
- Waschpuffer: 75% Acetonitril (750 ml Acetonitril werden mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt)

2.1.4 Chemikalien und Bezugsquellen für die Aufreinigung des PCR-Produkts zur Sequenzierung

QIAquick PCR purification kit (Qiagen GmbH, Hilden) enthält folgende Lösungen:

- Puffer PB
- Puffer PE
- Elutionspuffer EB
- Silicagelsäulchen

2.2 Probenmaterial

Für die Untersuchungen wurden zunächst 20 CML-Proben, davon 6 Knochenmarksproben und 14 Proben aus peripherem Blut untersucht (CML-Reihe). Desweiteren wurden 10 PV-Proben, 7 OMF-Proben und 2 Philadelphia-negativen CML-Proben (MPN-Reihe) analysiert. Diese Proben stammten alle aus peripherem Blut. Der Altersmedian der CML-Patienten lag bei 53 Jahren, die anderen Patienten waren im Median 61 Jahre alt.

Durch die parallele Auswertung von 20 bzw. 19 Proben ließ sich die Auswertung vereinfachen, da jeweils ähnliche Chromatogramme verglichen werden konnten.

2.3 DNA-Extraktion

Die Extraktion der gesamten (mitochondrialen und nukleären) DNA wurde mithilfe des QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt: Zur

Extraktion wurden 200 µl Blut bzw. Knochenmark mit 200 µl Lysepuffer AL und 25 µl Proteinase K versetzt und anschließend für mindestens 10 Minuten bei 56°C inkubiert, um die Zellmembranen zu zerstören und die DNA freizusetzen. Bei einigen Proben musste dieser Schritt aufgrund schlechter Lyseeigenschaften auf bis zu 30 Minuten erhöht werden. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden 200 µl Ethanol hinzugefügt. Anschließend wurde das Lysat auf eine QIAamp® Spin Column aufgetragen und bei 10.000 U/min für 1 min zentrifugiert. Die DNA bindet dabei aufgrund einer hohen Salzkonzentration an die Säulenmatrix aus Silikagel. Durch die nachfolgenden Waschschrte mit den Waschpuffern AW1 und AW2 wurden sämtliche Verunreinigungen entfernt. Im letzten Arbeitsschritt wurde die DNA mit Hilfe des salzarmen Elutionspuffers AL von der Säule eluiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt.

2.4 Polymerase-Kettenreaktion und Gelelektrophorese

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und 67 entsprechender PCR-Primerpaare wurde das komplette mitochondriale Genom in überlappenden Fragmenten amplifiziert. Die PCR-Primer sind so gewählt, dass die entstehenden PCR-Fragmente hinsichtlich ihres DNA-Schmelz-Profiles für die Detektion von Mutationen in der dHPLC optimale Eigenschaften zeigen. Außerdem wurden die Längen und Positionen der Primer so angepasst, dass Punktmutationen an jeder möglichen Nukleotid-Position detektiert werden können. Die entstehenden PCR-Produkte überdecken das mitochondriale Genom komplett. Die Positionen und Längen der verwendeten Primer sind der Tab. 7.1 und 7.2 im Abhang zu entnehmen¹⁶⁹.

Die Amplifizierung der mtDNA-Segmente erfolgte mit den CML-Proben in PCR's mit jeweils 35 Zyklen, bei der Bearbeitung der MPS-Proben wurden meist 40 Zyklen eingesetzt. Ein Zyklus setzte sich zusammen aus einer Denaturierungszeit von 60 sec bei 94°C, 60 sec Primeranlagerung (*annealing*) bei 49-59°C in Abhängigkeit von der jeweils vorgegebenen Hybridisierungstemperatur des Primers und 60 sec bei 72°C zur DNA-Polymerisation¹⁴⁵. Vor den eigentlichen Zyklen wurden die Proben für 4 Minuten bei 94 °C vordenaturiert, nach dem letzten Zyklus wurde die Elongationszeit um 7 Minuten verlängert, die Proben noch einmal für 1 Minute bei 94 °C denaturiert und anschließend zur Renaturierung und Lagerung auf 4 °C abgekühlt.

Ein 50 µl PCR-Ansatz enthielt jeweils 5 µl 10xPCR-Puffer (Thermopol Reaction Buffer; enthält 20mM MgSO₄), je 4 µl des entsprechenden Vorwärts- und Rückwärtsprimers (Primerkonzentration 10 pmol/µl), 8 µl einer Lösung, die 2,5 mM jedes dNTP enthält (gesamt 10 mM dNTPs), 0,5 µl (1 U) Vent_R[®]-DNAPolymerase und 1,5 µl der zu amplifizierenden DNA in 1:10 Verdünnung (CML-Patienten) bzw. unverdünnt (PV-/OMF-Patienten). Das Endvolumen von 50 µl wurde durch Zugabe von Aqua dest. erreicht. Anstatt einer Taq-Polymerase wurde die Vent-Polymerase verwendet, da diese eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität hat und somit in der Lage ist, fehlerhaft eingebaute Nukleotide zu erkennen und den Fehler durch erneute Polymerisation zu beheben. Hierdurch kommt es zu deutlich weniger Kopierfehlern im Laufe der PCR.

Der automatische Ablauf der PCR-Zyklen wurde in einem GeneAmp System 9600 (Perkin-Elmer, Langen) bzw. einem T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

Zur Kontrolle der PCR wurden im Anschluss an die Amplifikation 10 µl der PCR-Produkte mit 2 µl Auftragspuffer (Blue/Orange 6x Loading Dye) versetzt und auf ein 2%iges Agarosegel mit 200µg/l Ethidiumbromid aufgetragen. Als Längenstandard lief zusätzlich der pGEM[®] DNA Marker mit. Das Agarosegel wurde aus 250 ml TAE-Puffer, 5 g Agarose und 5 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) hergestellt. Das Gel kam nach dem Aushärten in eine Gelkammer. (Gel Electrophoresis Apparatus GNA-200, Pharmacia, Uppsala, Schweden), die mit einem Elektrophoresegerät (EPS 3500, Pharmacia, Uppsala, Schweden) verbunden war. Das Gel lief bei 85V und 150mA in der Regel 1 ½ Stunden, maximal 2 ½ Stunden. Die Auswertung des Gels erfolgte mittels eines Geldokumentationssystems (GelDoc2000, BioRad, München), die Daten wurden über Computer mit Hilfe des Programms Quantity One 4.0.3. (BioRad, München) erfasst.

2.5 Heteroduplex-Analyse mit dem WAVE[®]-System

Die Methode der Heteroduplex-Analyse mit dem WAVE[®]-System wurde bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben. Hier soll lediglich eine WAVE[®]-Methode exemplarisch beschrieben werden (Tab. 6).

Tabelle 6 WAVE[®]-Methode

Zeit	Puffer A	Puffer B	Waschpuffer	Beschreibung
0,0 min	55% **	45%	0%	Probeninjektion
0,1 min	50%*	50%	0%	Start Elutionsgradient
6,1 min	38%*	62%	0%	Stop Elutionsgradient
6,2 min	0%	0%	100%	Anfang Waschschrift
6,7 min	0%	0%	100%	Ende Waschschrift
6,8 min	55%**	45%	0%	Anfang Equilibrierung (für die nächste Injektion)
8,0 min	55%**	45%	0%	Ende

*Der Elutionsgradient änderte sich jeweils um 2% pro Minute, diese Werte sind in der Tabelle angegeben.

**Jeweils 5% höher als der angegebene erste Wert von Puffer A.

2.6 Fraction Collector

Bei einem Anteil von um die 50% mutierter DNA im PCR-Produkt können die Mutationen mittels direkter DNA-Sequenzierung leicht bestätigt und identifiziert werden. Bei einem geringeren Anteil an mutierter DNA (unter 30%) würde die direkte Sequenzierung keine klaren Ergebnisse hervorbringen. Um dieses Problem zu umgehen, wurde zum einen eine neue PCR zur Bestätigung des Befundes angefertigt und zum anderen der Heteroduplex-Peak mit Hilfe eines Fraction Collectors (Transgenomic) eluiert. Es wurden bei einem dHPLC-Lauf 12 Anteile des Eluats von je 150 µl gewonnen. Der Anteil, der dem Heteroduplex-Peak entspricht wurde noch einmal amplifiziert und mit einem erneuten dHPLC-Lauf bestätigt. Nach der Reinigung mit dem QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden) wurde dieses PCR-Produkt sequenziert.

2.7 DNA-Sequenzierung

Die DNA- Sequenzierung der Proben wurde bei Sequence Laboratories GmbH in Göttingen durchgeführt. Das veränderte Fragment wurde sowohl vom 5'- zum 3'-Ende des H-Stranges („Vorwärts“-Strang) als auch vom 5'- zum 3'-Ende des komplementären L-Stranges („Rückwärts“-Strang) sequenziert. Die Ergebnisse der Rückwärtssequenzierung wurden für die Darstellung invertiert, d.h. die Nukleotidfolge erscheint in Richtung 3'-5'-Ende und „übersetzt“ in die Nukleotidfolge des schweren Stranges. So ließen sich Vorwärts- und Rückwärtssequenzierung leichter und übersichtlicher mit der überarbeiteten Cambridge Sequenz¹⁷¹ und der MITOMAP-Datenbank (www.mitomap.org)²⁴ vergleichen. Bei Punktmutationen wurde zusätzlich ein Vergleich mit der mtDNA-Sequenz von zwei Menschen, zwei Primaten, neun Säugetieren, sechs Wirbeltieren, drei Insekten, zwei Hefen und einer Pflanze durchgeführt,

um die Konservierung der betroffenen Nukleotide und Aminosäuren in der Evolution abzuschätzen. Im Anhang (7.3, S.116) findet sich ein Beispiel eines bekannten Polymorphismus der Untereinheit 3 der mitochondrialen NADH-Dehydrogenase. Bei Patient P.399 (MDS vom Subtyp einer RARS mit 32% Ringsideroblasten) fand sich an Position 29 ein Aminosäureaustausch von Glycin zu Serin (nicht konservierte Aminosäure).

3 Ergebnisse

3.1 Häufigkeit heteroplasmischer mtDNA-Mutationen

Bei der Untersuchung des kompletten mitochondrialen Genoms von insgesamt 39 Patienten mit einem MPN fand sich bei 17 Patienten mindestens eine heteroplasmische mtDNA-Mutation, insgesamt wurden 25 Heteroplasmien gefunden. Dies entspricht einer Häufigkeit von 44%. Bei den meisten Mutationen handelte es sich um Transitionen. Bei der Untersuchung der MDS-Patienten durch Wulfert et. al.¹⁷⁰ fanden sich bei insgesamt 58 von 104 Patienten (56%) 108 Mutationen. Dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant.

Tabelle 7 Häufigkeit der gefundenen heteroplasmischen mtDNA-Mutationen nach Erkrankungstyp

FAB Klassifikation	Anzahl Patienten	Altersmedian	Heteroplasmische mtDNA-Mutationen
CML	24	53 (22-71)	11/24 (48%)
PV	9	63 (45-72)	4/9 (44%)
OMF	5	62 (59-80)	1/5 (20%)
ET	1	72	1/1 (100%)
gesamt MPN	39	61 (22-81)	17/39 (44%)
RA	23	66 (43-86)	9/23 (38%)
RARS	33	70 (30-83)	17/32 (53%)
RAEB	35	69 (44-94)	23/34 (68%)
RAEB-T	7	61 (31-88)	6/7 (86%)
CMML	6	73 (59-78)	3/7 (43%)
gesamt MDS*	104	68 (31-94)	58/104 (56%)

*Die MDS-Daten stammen aus ¹⁷⁰.

Bei den Untersuchungen der MDS-Patienten von Wulfert et. al.¹⁷⁰ zeigte sich ein altersabhängiger Anstieg der Mutationsrate von ca. 30% in Patienten der Altersgruppe 40-49 Jahre auf über 70% in der Gruppe der 80- bis 89-Jährigen. Dieses Ergebnis konnte im Kollektiv der MPN-Patienten nicht gefunden werden, was möglicherweise an der geringeren Anzahl der Patienten liegen könnte. Das Durchschnittsalter der MPN-Patienten war mit 61 Jahren niedriger als das Durchschnittsalter der MDS-Patienten (68 Jahre).

Heteroplasmische Mutationen der mtDNA konnten in allen untersuchten Krankheitsbildern nachgewiesen werden. Die Mutationen verteilten sich über das komplette mitochondriale Genom, ohne dass sich *hot spots* identifizieren ließen (Abb. 15 und 16). Die Verteilung der mtDNA-Mutationen über das mitochondriale Genom zeigte keine offensichtliche Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp.

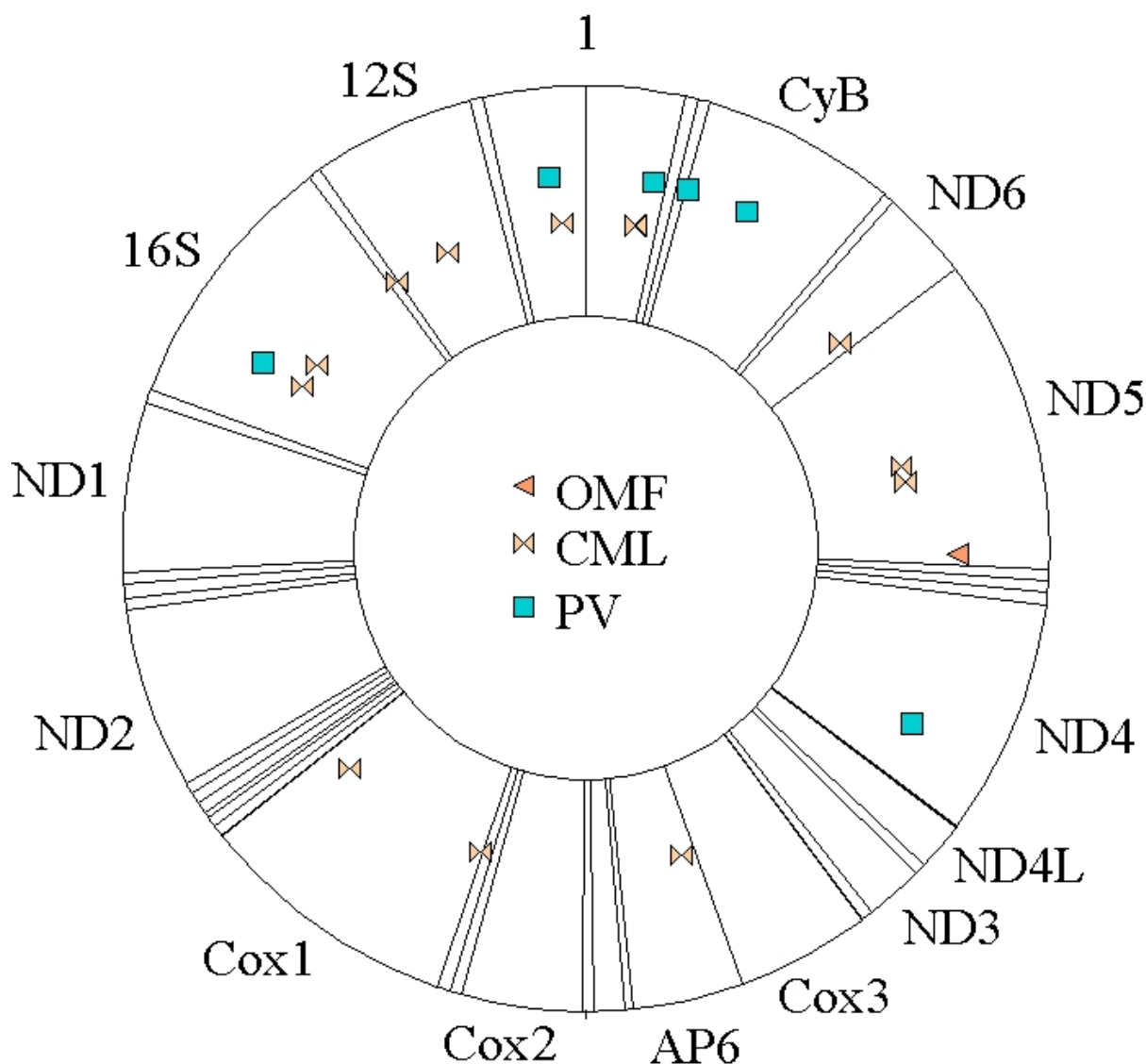


Abbildung 15 Verteilung der gefundenen Mutationen bei den MPN-Patienten über das mitochondriale Genom

Bei den schmalen Vektoren handelt es sich um tRNA's, die nicht näher gekennzeichnet sind

CyB: Cytochrom B

ND: NADH-Dehydrogenase

Cox: Cytochrom-C-Oxidase

AP: ATP-Synthase

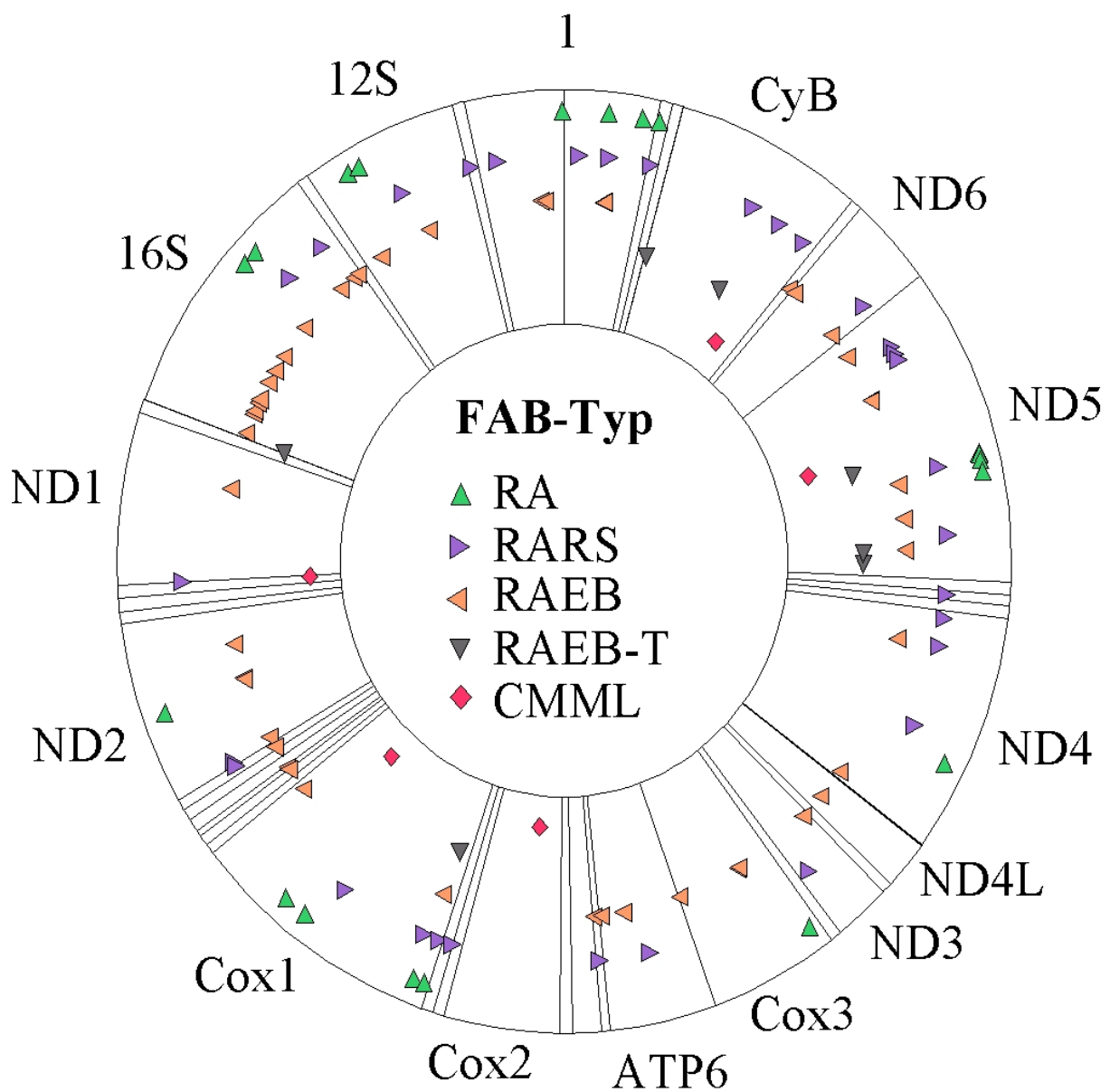


Abbildung 16 Verteilung der gefundenen Mutationen bei den MDS-Patienten über das mitochondriale Genom

Bei den schmalen Vektoren handelt es sich um tRNA's, die nicht näher gekennzeichnet sind

CyB: Cytochrom B

ND: NADH-Dehydrogenase

Cox: Cytochrom-C-Oxidase

AP: ATP-Synthase

3.2 Einzeldarstellung der Heteroplasmien der CML-Proben

3.2.1 Probe ACK 4

Es zeigte sich mit dem Primerpaar Cox 72b bei 60°C ein Heteroduplex-Befund (Abb. 17). Bei der Sequenzierung stellte sich eine heteroplasmische Mutation an der Position 6194 dar. Diese Transition A→G im Bereich des Gens Cox 1 ist neu und noch nicht auf www.mitomap.org registriert. Sie führt allerdings nicht zu einem Aminosäureaustausch (Met = Met).

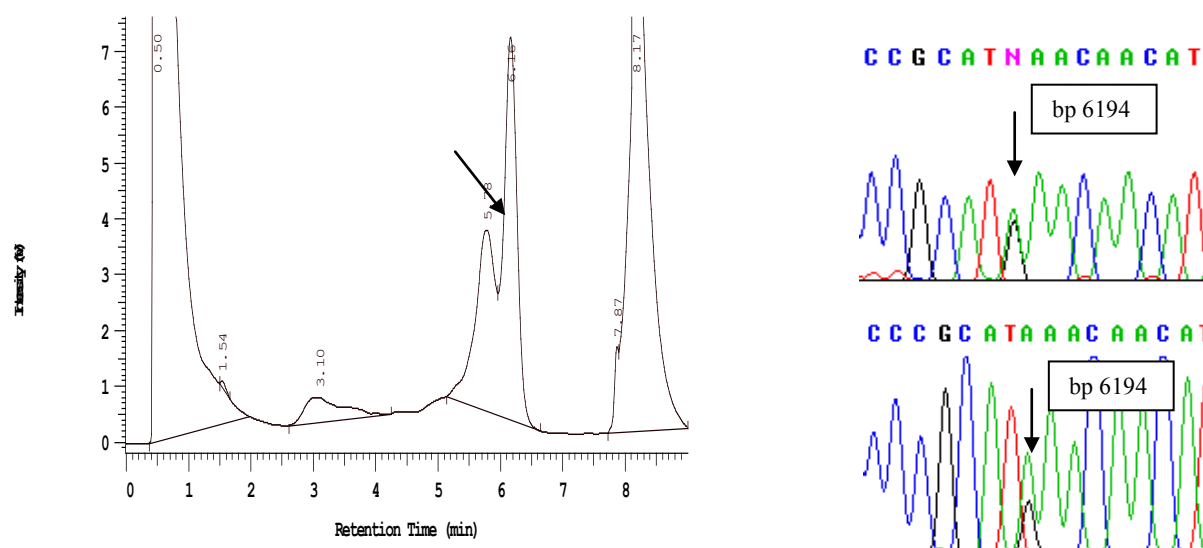


Abbildung 17 dHPLC-Analyse von Probe ACK 4 (Cox 72b, 60°C) und dazugehörige Sequenzanalyse
Oben Vorwärtssequenzierung, unten revers-komplementäre Darstellung der Rückwärtssequenzierung.

3.2.2 Probe ACK 5

Hier zeigte sich ein Heteroduplex-Befund mit dem Primerpaar KR 85a bei 58°C (Abb. 18). Die Transition T → C an der Position 245 in der Kontrollregion ist neu. Außerdem fanden sich bei dieser Probe in der Kontrollregion zwei häufige Polymorphismen an den Stellen 309 und 311 (zusätzliche C's). Mit dem Primerpaar mrR 92a bei 60°C stellte sich an der Position 1199 eine Heteroplasmie dar (G → A; Abb. 19). Diese Veränderung im Gen für die 12S-rRNA ist ebenfalls noch nicht vorbeschrieben. Weiterhin fand sich ein Heteroduplex-Befund mit dem Primerpaar ATP 68a bei 61°C an Position 9110. Diese neu aufgetretene Transition T → C im ATPase-6-Gen führt zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Threonin (Abb. 20). Der zusätzliche Peak in Abb. 20 ist durch fehlerhafte PCR-Produkte zu erklären. Durch die kleinschrittige Skalierung in dieser Abbildung wird dieser Peak hier deutlich sichtbar.

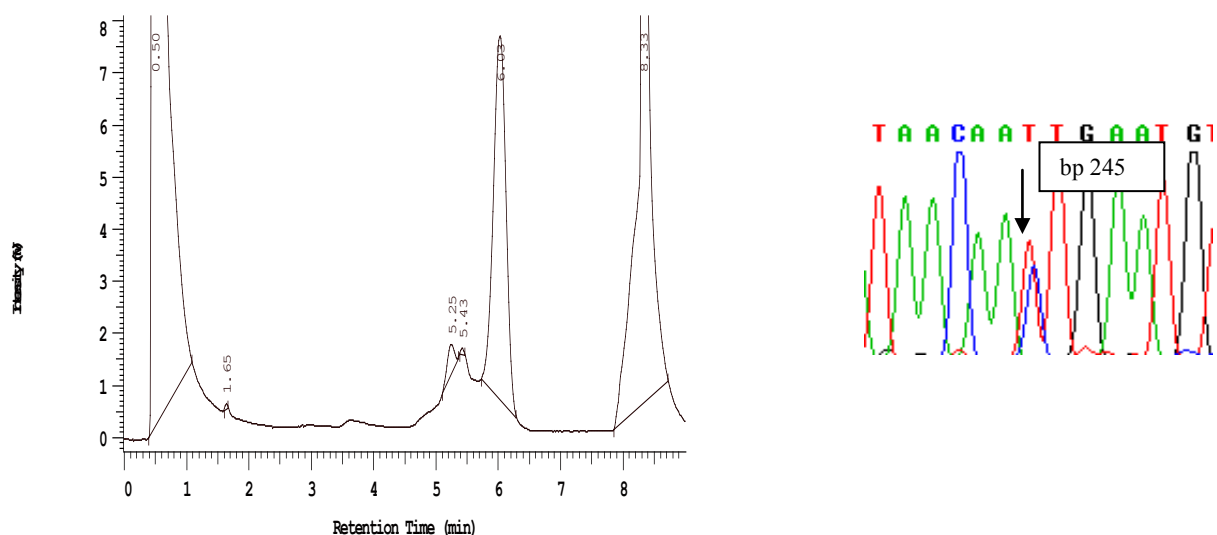


Abbildung 18 dHPLC-Analyse von Probe ACK 5 (KR 85a, 58°C) und dazugehörige Sequenzanalyse
Oben Vorwärtssequenzierung, unten revers-komplementäre Darstellung der Rückwärtssequenzierung.

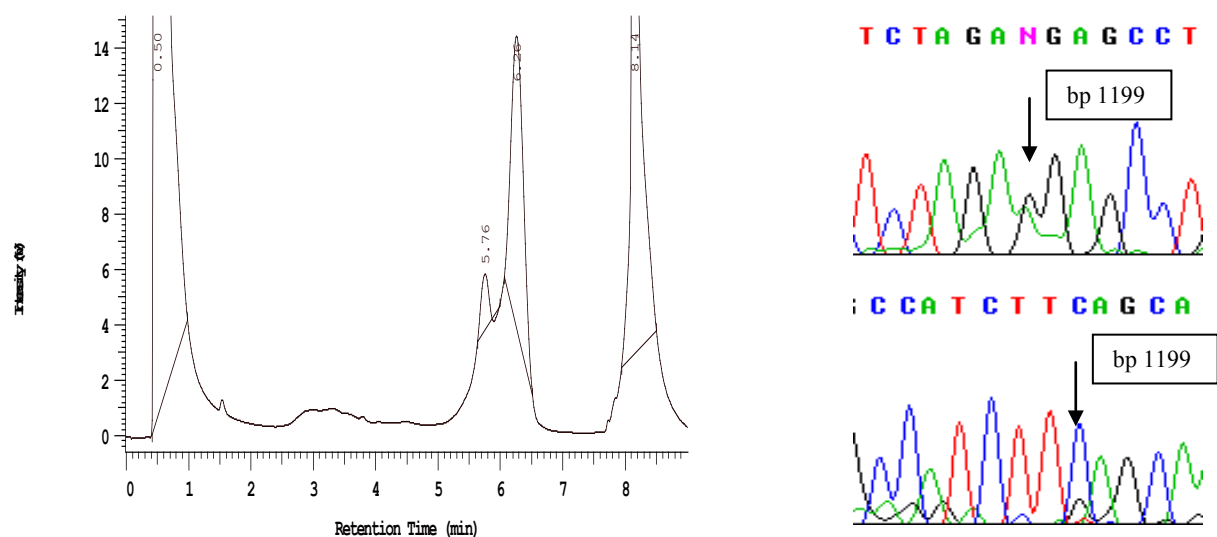


Abbildung 19 dHPLC-Analyse von Probe ACK 5 (mrR 92a, 60°C) und dazugehörige Sequenzanalyse
Oben Vorwärtssequenzierung, unten revers-komplementäre Darstellung der Rückwärtssequenzierung.

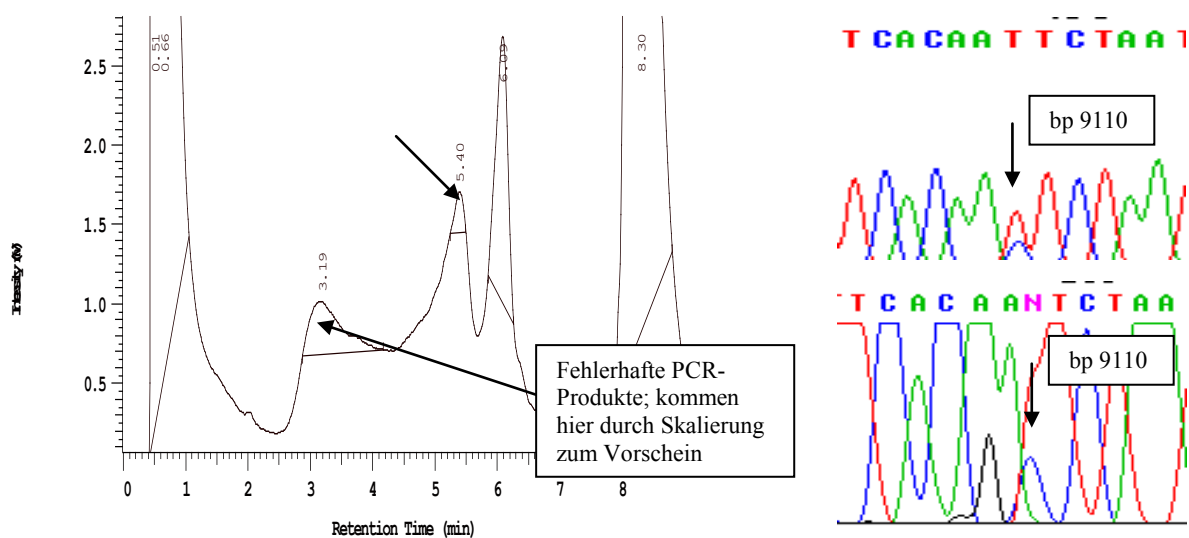


Abbildung 20 dHPLC-Analyse von Probe ACK 5 (ATP 68a, 61°C) und dazugehörige Sequenzanalyse
Oben Vorwärtssequenzierung, unten revers-komplementäre Darstellung der Rückwärtssequenzierung

3.2.3 Probe ACK 9

Diese Probe zeigt mit dem Primerpaar NAD 52a bei 62°C einen Heteroduplex-Befund an der Stelle 12997 (G → A; Abb.21). Es kommt zu einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Threonin im Gen ND 5. Dieser Austausch war bisher in der Literatur nicht bekannt.

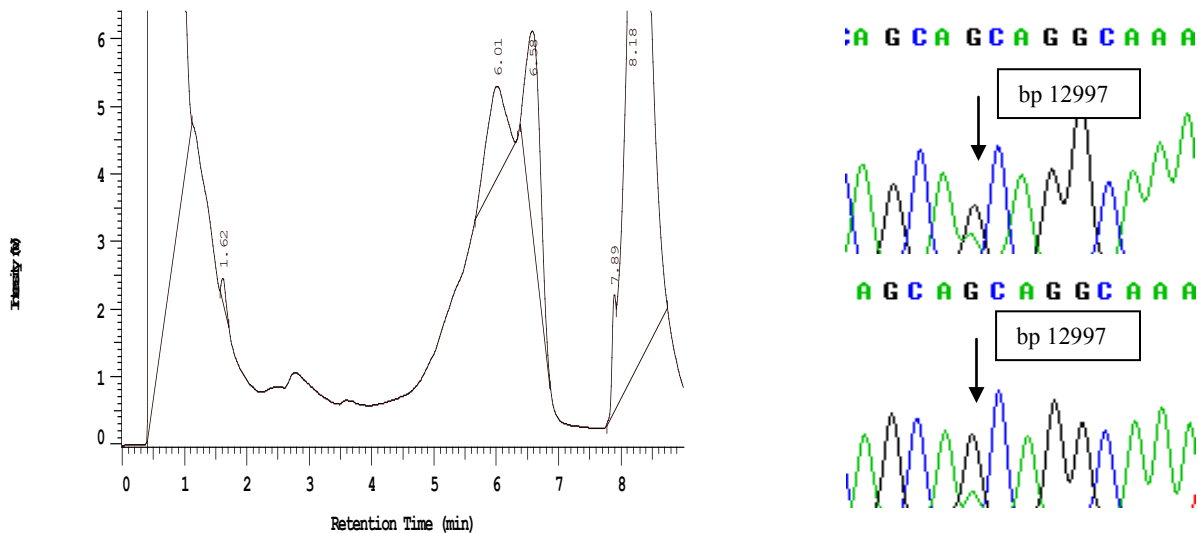


Abbildung 21 dHPLC-Analyse von Probe ACK 9 (NAD 52a, 62°C) und dazugehörige Sequenzanalyse
Oben Vorwärtssequenzierung, unten revers-komplementäre Darstellung der Rückwärtssequenzierung.

3.2.4 Proben ACK 11 + ACK 20

Bei der Probe ACK 11 stellte sich mit dem Primerpaar KR 82a bei 60°C eine Heteroplasmie an der Position 16218 (C → T) dar (Abb. 22). Bei Probe ACK 20 zeigte sich ein Heteroplasmie-Befund mit dem gleichen Primerpaar an der Stelle 16207 (A → G; Abb.23). Beide Mutationen in der Kontrollregion sind bereits als Polymorphismen bekannt.

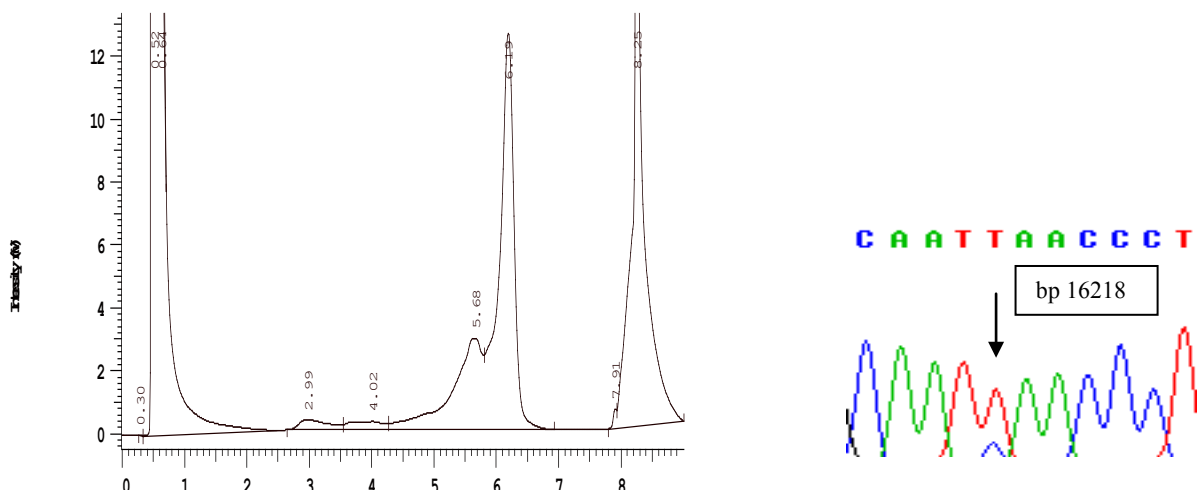


Abbildung 22 dHPLC-Analyse von Probe ACK 11 (KR 82a, 60°C) und dazugehörige Sequenzanalyse
Nur revers-komplementäre Darstellung der Rückwärtssequenzierung, da Vorwärtssequenzierung nicht auswertbar.

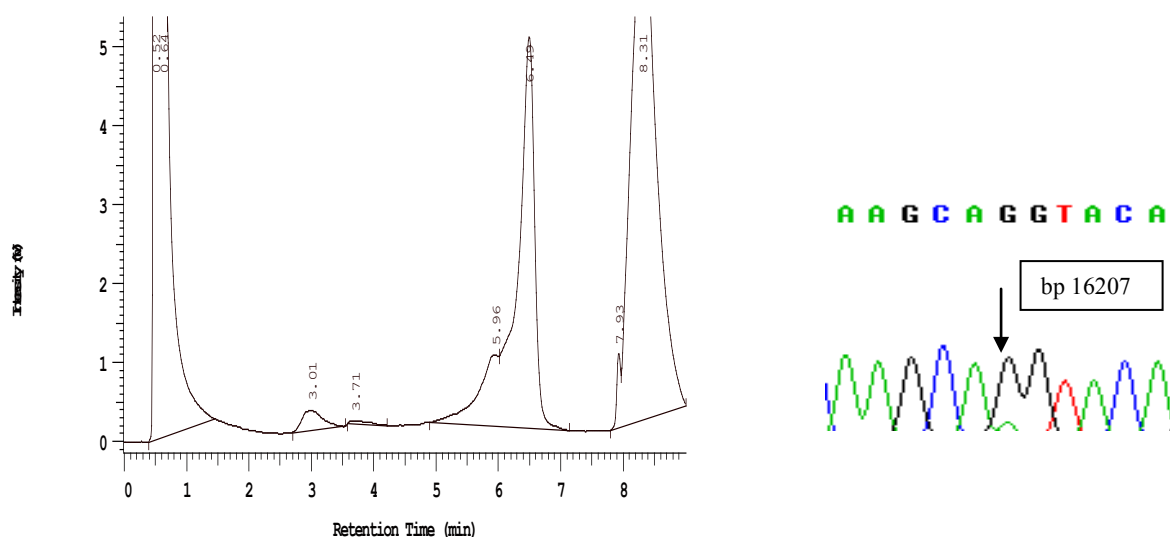


Abbildung 23 dHPLC-Analyse von Probe ACK 20 (KR 82a, 60°C) und dazugehörige Sequenzanalyse
Nur revers-komplementäre Darstellung der Rückwärtssequenzierung, da Vorwärtssequenzierung nicht auswertbar.

3.2.5 Proben ACK 12 + ACK 18

Diese Proben zeigten beide einen Heteroduplex-Befund (Abb. 24) mit dem Primerpaar NAD 46a (Gen ND 4). In den Sequenzierungen beider Proben ließ sich jedoch keine Auffälligkeit nachweisen. Es könnte sich um einen häufigen Polymorphismus in der Primerbindungsstelle handeln.

Bei der Probe ACK 12 gab es mit dem Primerpaar NAD 52a bei 62°C einen weiteren Heteroduplex-Befund. Hier zeigte sich in der Sequenzierung eine Transition C → T an der Position 13130 im ND5-Gen. Diese führt zu einem Austausch der Aminosäuren Prolin zu Leucin und war bisher nicht bekannt (Abb. 25).

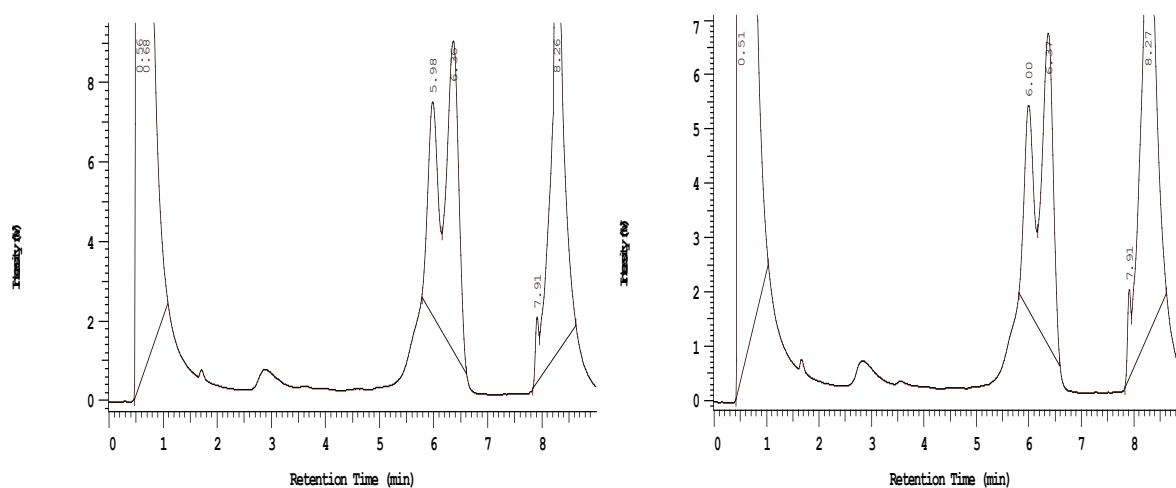


Abbildung 24 dHPLC-Analysen der Proben ACK 12 + 18 (NAD 46a, 60°C)

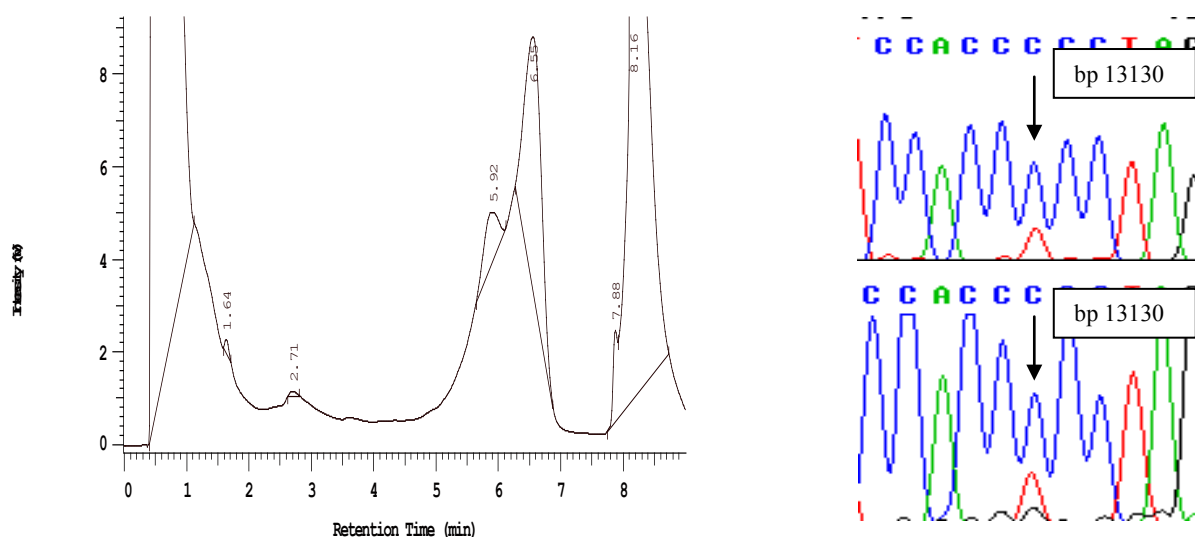


Abbildung 25 dHPLC-Analyse von Probe ACK 12 (NAD 52a, 62°C) und dazugehörige Sequenzanalyse
Oben Vorwärtssequenzierung, unten revers-komplementäre Darstellung der Rückwärtssequenzierung.

3.2.6 Probe ACK 16

Diese Probe zeigte mit dem Primerpaar mrR 98a einen Heteroduplex-Befund bei 61°C. Hier ließ sich ein Austausch A → T in der 16S-rRNA (Position 2623) feststellen, der bisher noch nicht beschrieben wurde (Abb. 26).

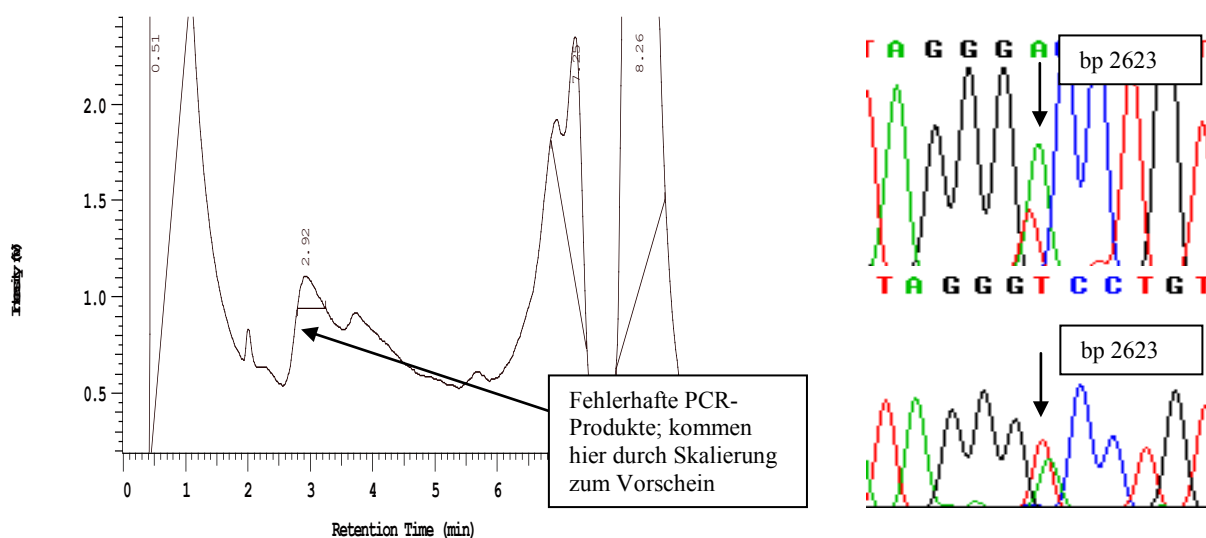


Abbildung 26 dHPLC-Analyse von Probe ACK 16 (mrR 98a, 61°C) und dazugehörige Sequenzanalyse
Oben Vorwärtssequenzierung, unten revers-komplementäre Darstellung der Rückwärtssequenzierung.

3.2.7 Probe ACK 19

Diese Probe zeigte mit dem Primerpaar NAD 61a bei 58°C einen Heteroduplex-Befund. Bei der Sequenzierung stellte sich an der Position 14256 im ND6-Gen eine bisher nicht beschriebene Transition $T \rightarrow C$ dar, die zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Valin führt (Abb. 27).

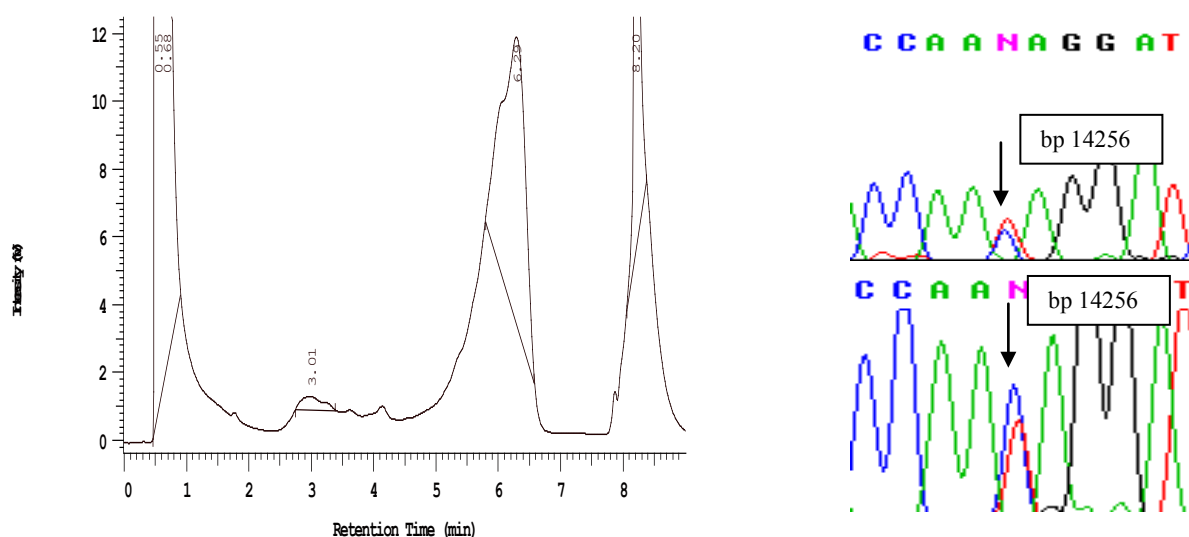


Abbildung 27 dHPLC-Analyse von Probe ACK 19 (NAD 61a, 58°C) und dazugehörige Sequenzanalyse. Oben Vorwärtssequenzierung, unten revers-komplementäre Darstellung der Rückwärtssequenzierung.

3.2.8 Probe ACK 22

Hier fand sich ein Heteroduplex-Befund mit dem Primerpaar Cox 77b bei 59°C. In der Sequenzierung fand sich an der Stelle 7453 ein Basenaustausch $G \rightarrow A$ in der tRNA für Serin (Abb. 28). Dieser Befund ist neu, es handelt sich um einen bisher nicht beschriebenen Polymorphismus. In der Abbildung zeigt sich zwar nur eine schmale Schulter, trotzdem war dieser Befund im Vergleich mit den Chromatogrammen der anderen 19 Probanden auffällig.

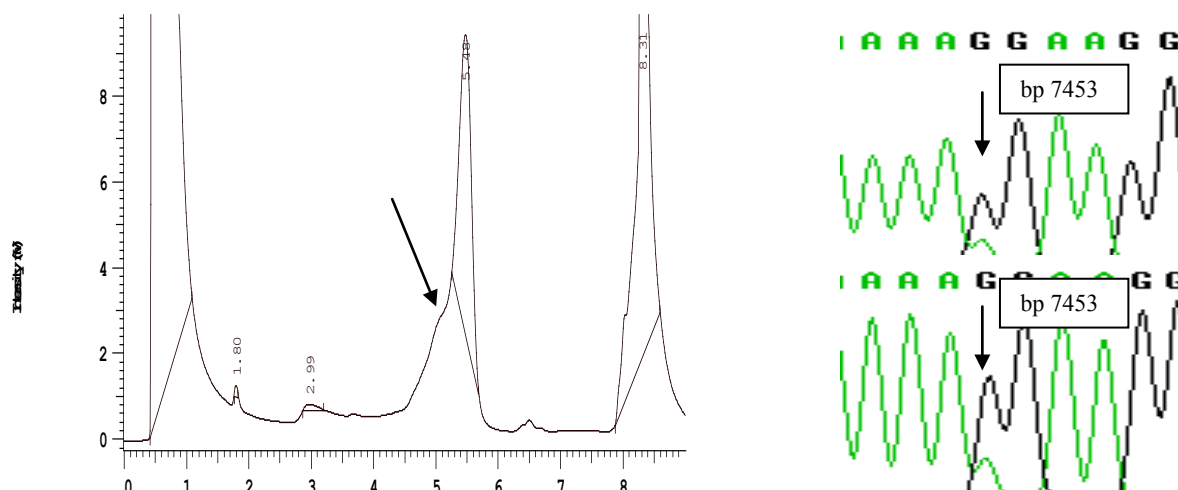


Abbildung 28 dHPLC-Analyse von Probe ACK 22 (Cox 77b, 59°C) und dazugehörige Sequenzanalyse. Oben Vorwärtssequenzierung, unten revers-komplementäre Darstellung der Rückwärtssequenzierung.

3.2.9 Probe ACK 26

Bei dieser Probe fand sich eine Heteroplasmie im Bereich des Primers mrR 94a bei 59°C. Bei der Sequenzierung zeigte sich an der Position 1680 eine 25%ige Heteroplasmie A und G im Gen der 16S-rRNA (Abb. 29). Dieser Befund wurde bisher noch nicht beschrieben.

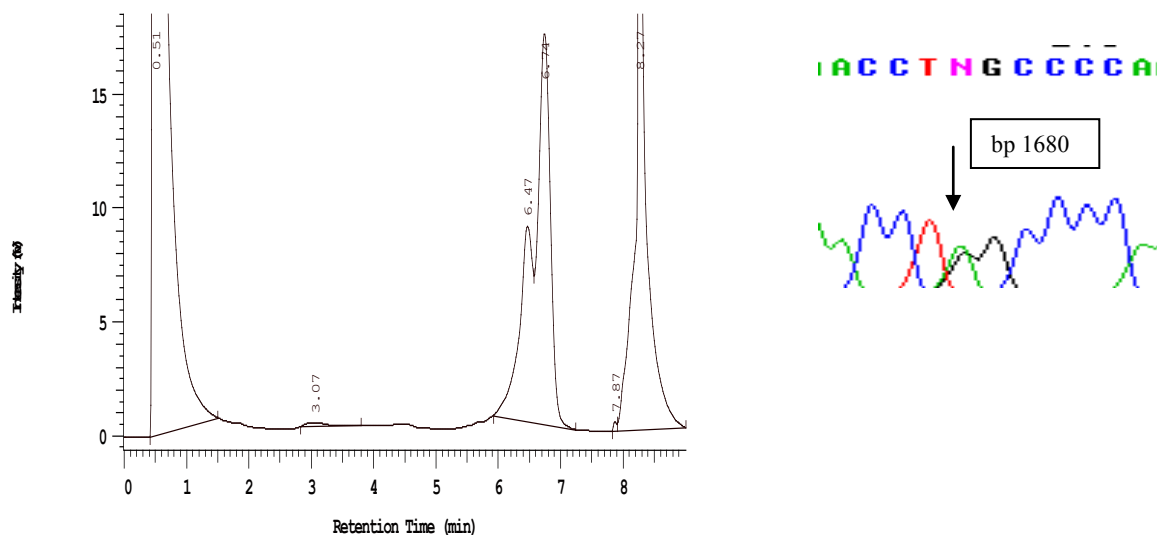


Abbildung 29 dHPLC-Analyse von Probe ACK 26 (mrR 94a, 59°C) und dazugehörige Sequenzanalyse
Nur Vorwärtssequenzierung, da Rückwärtssequenzierung nicht auswertbar.

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der CML-Proben

Tabelle 8 Zusammenfassung der Ergebnisse der CML-Proben

Proben-Nr.	Geschlecht / Alter	Erkrankung	Primer	mtDNA-Position	mtDNA-Mutation	Gen	AS-Austausch	% Het.	Bemerkungen	Neu?
ACK 1	M / 62	CML								
ACK 2	M / 62	CML								
ACK 3	M / 60	CML	Cyb 03						Primer-dimer	
ACK 4	M / 22	CML	Cox 72b	6194	A → G	Cox 1		30%		✓
			NAD 54a			ND 5			*	
ACK 5	W / 47	CML	KR 85a	245	T → C	KR		50%		✓
			mrR 92a	1199	G → A	12S-rRNA		klein		✓
			ATP 68a	9110	T → C	ATPase 6	Ile → Thr	30%		✓
ACK 6	M / 71	CML								
ACK 7	M / 46	CML								
ACK 9	M / 71	CML	NAD 52a	12997	G → A	ND 5	Ala → Thr	50%		✓
ACK 10	M / 40	CML	ATP 69a	9123	G/A	AT-Pase 6		100%	Polymorphismus im F-Primer	
ACK 11	M / 60	CML	KR 82a	16218	C → T	KR		>80%		
ACK 12	W / 57	CML	NAD 46a			ND 4			*	
			NAD 52a	13130	C → T	ND 5	Pro → Leu	30%		✓
ACK 16	?	CML	mrR 98a	2623	A → T	16S-rRNA		50%		✓
ACK 17	?	CML	NAD 53a			ND 5			Bek. Polymorphismen	
ACK 18	?	CML	NAD 46a			ND 4			*	
ACK 19	?	CML	NAD 61a	14256	A → G	ND 6	Ile → Val	50%		✓
ACK 20	?	CML	KR 82a	16207	A → G	KR		>80%		
ACK 21	?	CML								
ACK 22	?	CML	Cox 77b	7453	G → A	tRNA Ser		Klein		✓
ACK 23	?	CML								
ACK 24	?	CML								
ACK 26	W / 68	CML	mrR 94a	1680	A → G	16S-rRNA		25%		✓
			mrR 95a	1680	A → G	16S-rRNA				

*Bei einigen Proben konnten auffällige Befunde im Wave-Lauf durch die Sequenzierung nicht bestätigt werden. Möglicherweise handelt es sich um Gene in der Kontrollregion oder in den Primerbereichen, s. u.

3.4 Einzeldarstellung der Heteroplasmien der weiteren MPN-Proben

3.4.1 Probe ACK 29 (PV)

Bei dieser Probe fand sich ein in Mitomap bekannter häufiger Polymorphismus G und A an der Stelle 16129 in der Kontrollregion. Er wurde mit dem Primer KR 81a nachgewiesen (s. Abb. 30). Zusätzlich zeigte diese Probe auch noch einen Heteroplasmiebefund G → A (50%) an Position 2825 in der 16S-rRNA (Primer mrR 98a, 61°C). Dieser Befund war noch nicht bekannt und betrifft eine bei Vertebraten konservierte Aminosäure (Abb. 31). Außerdem fand sich mit dem gleichen Primer an der Position 2706 ein bekannter Polymorphismus A → G.

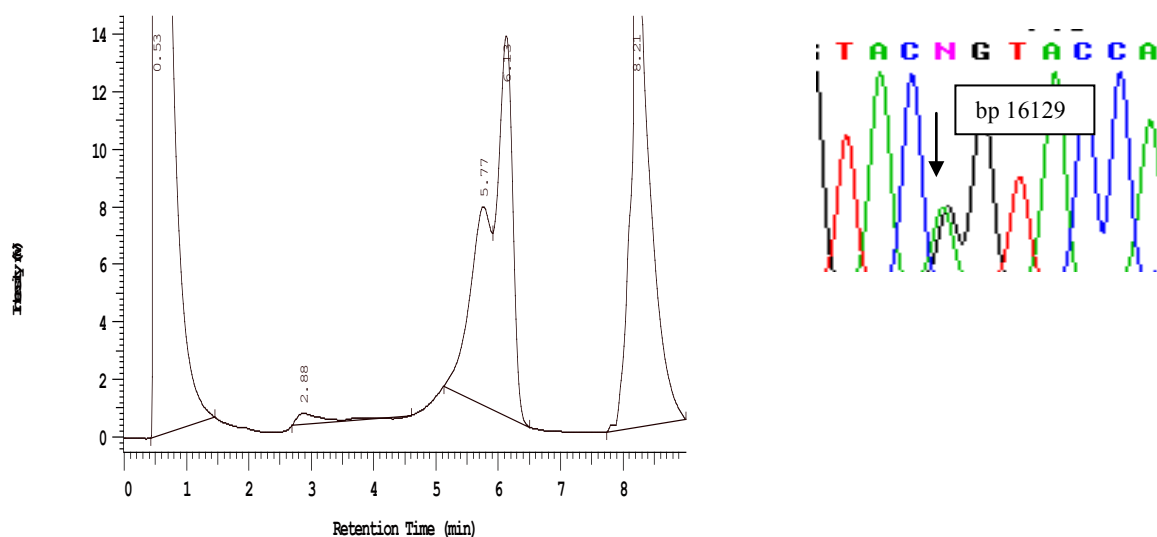


Abbildung 30 dHPLC-Analyse von Probe ACK 29 (KR 81a, 59°C) und dazugehörige Sequenzanalyse
Nur Vorwärtssequenzierung, da Rückwärtssequenzierung nicht auswertbar.

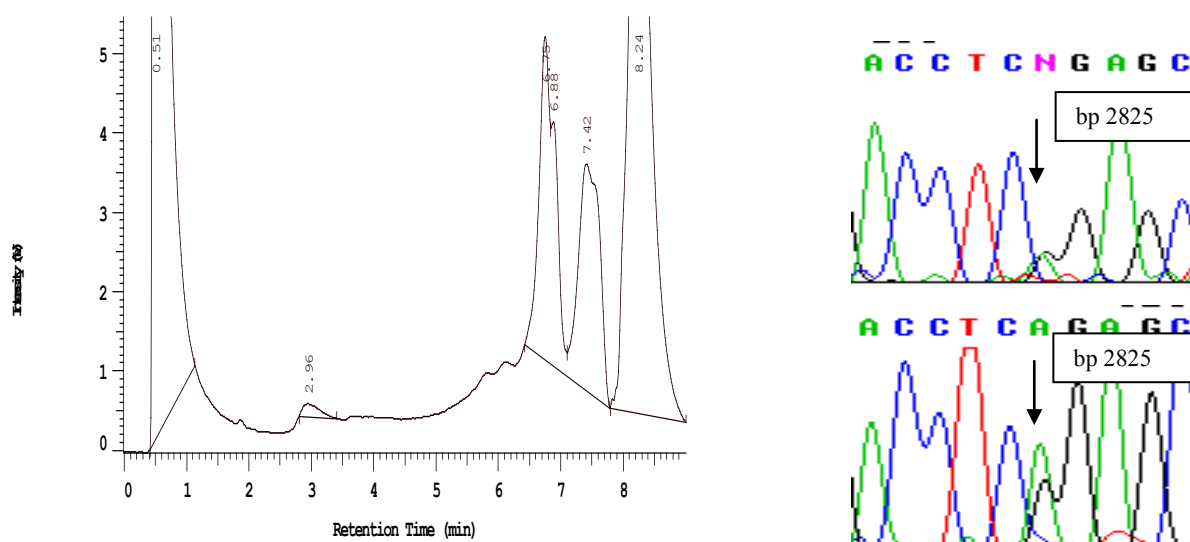


Abbildung 31 dHPLC-Analyse von Probe ACK 29 (mrR 98a, 58°C) und dazugehörige Sequenzanalyse. Oben Vorwärtssequenzierung, unten revers-komplementäre Darstellung der Rückwärtssequenzierung.

3.4.2 Probe ACK 30 (PV)

Bei diesem Patienten konnten zwei neue Heteroduplexbefunde nachgewiesen werden. Zum einen zeigte sich eine doppelte Heteroplasmie (T → G; A → G) an den Positionen 15441 und 15442 im Cytochrom-B-Gen mit dem Primer Cyb 05 bei 60°C (Abb. 32). Hier kommt es zu einem Aminosäureaustausch von Leucin zu Tryptophan. Zum anderen wurde an der Stelle 15882 eine Heteroplasmie G und C gefunden, die zu einem Aminosäureaustausch von Tryptophan zu Serin führt. Diese Heteroplasmie wurde mit dem Primer Cyb 07a bei 57°C nachgewiesen (Abb. 33).

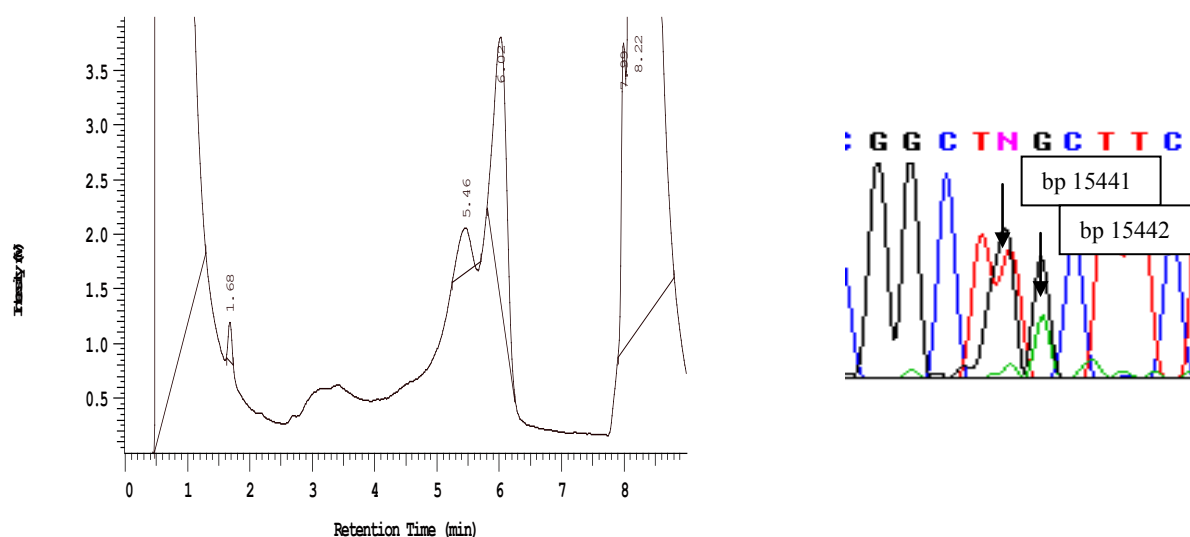


Abbildung 32 dHPLC-Analyse von Probe ACK 30 (Cyb 05, 60°C) und dazugehörige Sequenzanalyse. Nur revers-komplementäre Darstellung der Rückwärtssequenzierung, da Vorwärtssequenzierung nicht auswertbar.

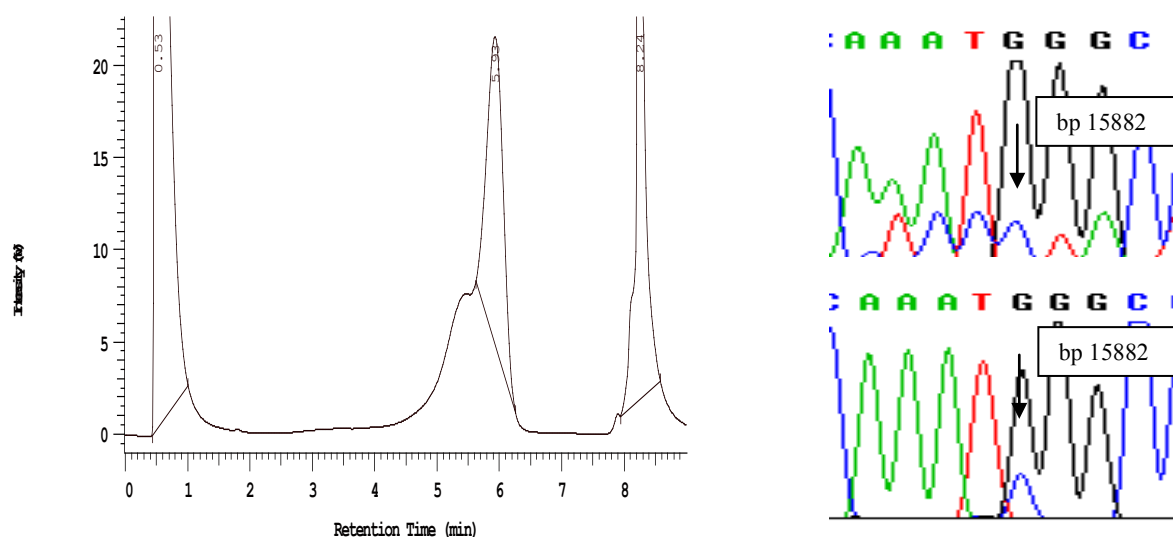


Abbildung 33 dHPLC-Analyse von Probe ACK 30 (Cyb 07a, 57°C) und dazugehörige Sequenzanalyse
Oben Vorwärtssequenzierung, unten revers-komplementäre Darstellung der Rückwärtssequenzierung.

3.4.3 Probe ACK 31 (PV)

Bei dieser Probe zeigte sich ein Heteroduplexbefund im Bereich des Primers NAD 43a (Position 11150; G → A). Diese bereits in der Literatur beschriebene Heteroplasmie führt zu einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Threonin (Abb. 34).

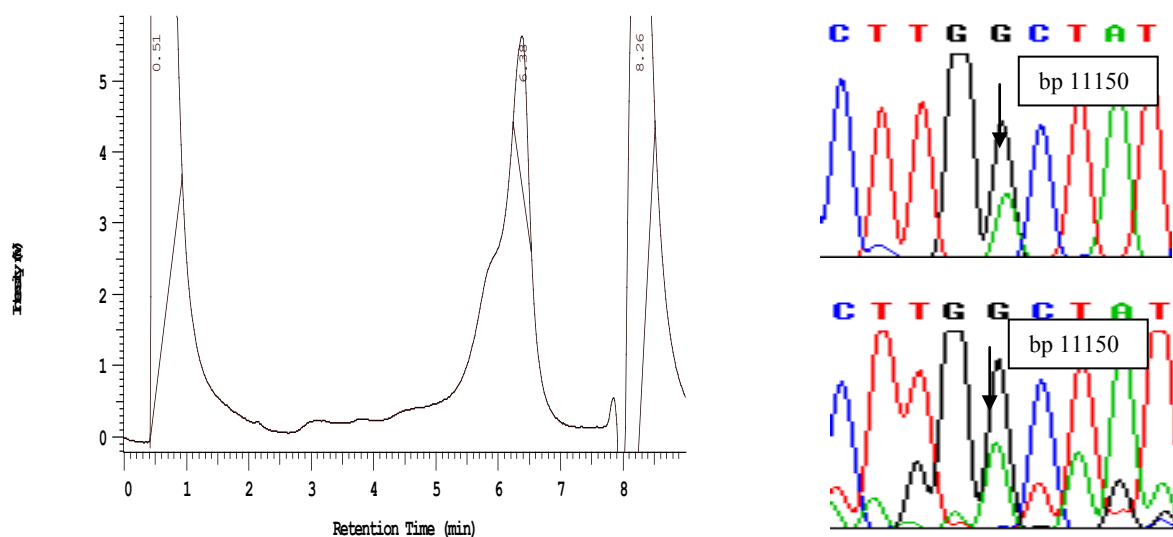


Abbildung 34 dHPLC-Analyse von Probe ACK 31 (NAD 43a, 58°C) und dazugehörige Sequenzanalyse
Oben Vorwärtssequenzierung, unten revers-komplementäre Darstellung der Rückwärtssequenzierung.

3.4.4 Probe ACK 34 (OMF)

Hier fand sich mit dem Primer NAD 46a im ND 5-Gen eine 50%ige Heteroplasmie an der Position 12415 (Abb. 35). Dieser Basenaustausch A→G ist neu aufgetreten und führt zu einem Austausch von Asparagin zu Asparaginsäure.

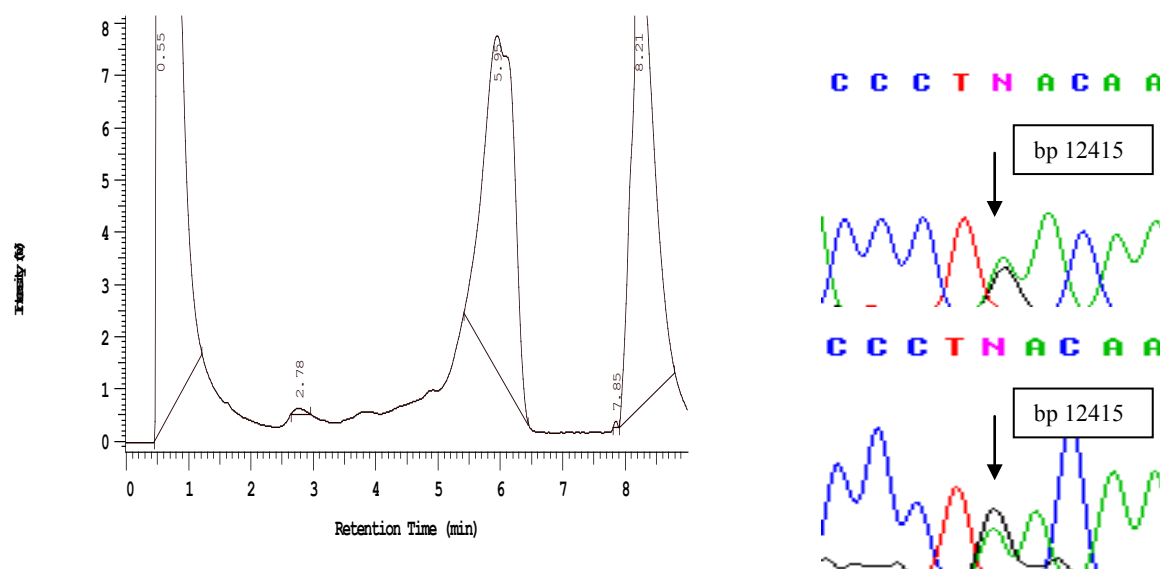


Abbildung 35 dHPLC-Analyse von Probe ACK 34 (NAD 46a, 58°C) und dazugehörige Sequenzanalyse. Oben Vorwärtssequenzierung, unten revers-komplementäre Darstellung der Rückwärtssequenzierung.

3.4.5 Probe ACK 37 (CML Ph⁻)

Bei dieser Probe von einer jungen Patientin mit einer fulminant verlaufenden Philadelphia-negativen CML fand sich eine 18bp umfassende heteroplasmische Deletion im 16s-rRNA-Gen. Diese Deletion konnte sowohl mit dem Primer mrR 98a bei 61°C als auch mit dem Primer mrR99a bei 62°C nachgewiesen werden (Abb. 36). Sie erstreckt sich im Bereich von bp 2832 bis bp 2849. Ab der entsprechenden Position findet man in beiden Richtungen eine Überlagerung von normaler und verkürzter Sequenz.

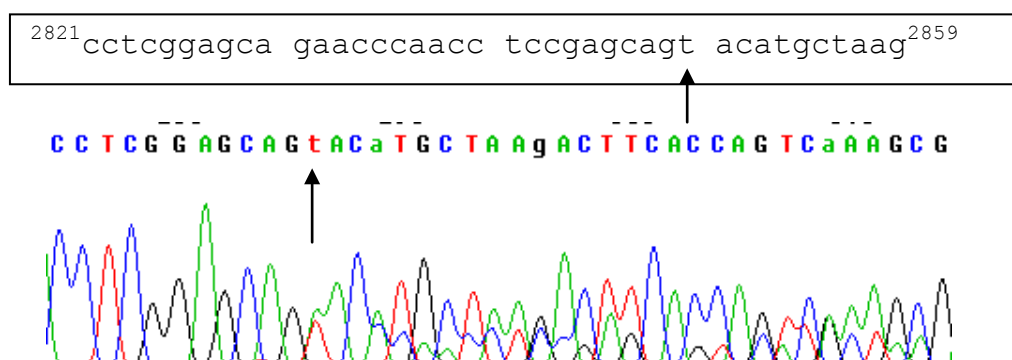
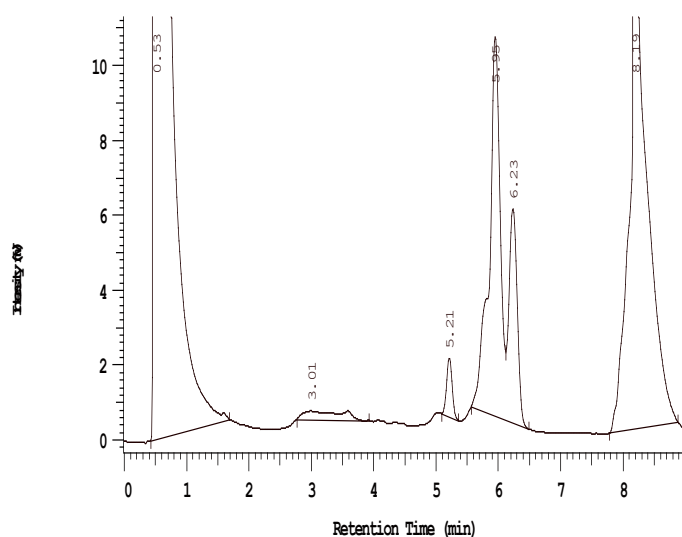


Abbildung 36 dhPLC-Analyse von Probe ACK 37 (mrR 98a, 61°C), Original-Sequenz der mtDNA bp 2821-2859 und Vorwärtssequenzierung mit der 18 bp-Deletion.

3.4.6 Probe ACK 40 (CML Ph⁻)

Hierbei handelte es sich um einen Patienten mit Philadelphia-negativer CML, der sich bereits einer allogenen Stammzelltransplantation unterziehen musste und anschließend wieder ein Rezidiv seiner Erkrankung entwickelt hatte (Zeitpunkt der Probenentnahme). Es zeigten sich mehrere auffällige Befunde. Im Bereich des Primers Cox 75 (Cox 1-Gen) fand sich an der Position 6717 eine 50%ige Heteroplasmie G→A, die zu einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Serin führt (Abb 37). Sie wurde bisher noch nicht beschrieben. Im Cox 2-Gen konnte mit dem Primer Cox 58a an der Stelle 7981 eine 90%ige Heteroplasmie C→T nachgewiesen werden (Abb. 38). Hierbei handelt es sich allerdings um eine *silent mutation* ohne Aminosäureaustausch. Eine weitere Auffälligkeit zeigte sich an der Position 9502 (Cox 3-Gen, Primer Cox 36a). Eine 50%ige, bisher noch nicht bekannte Heteroplasmie G→A führt hier zu einem STOP-Codon (Abb. 39).

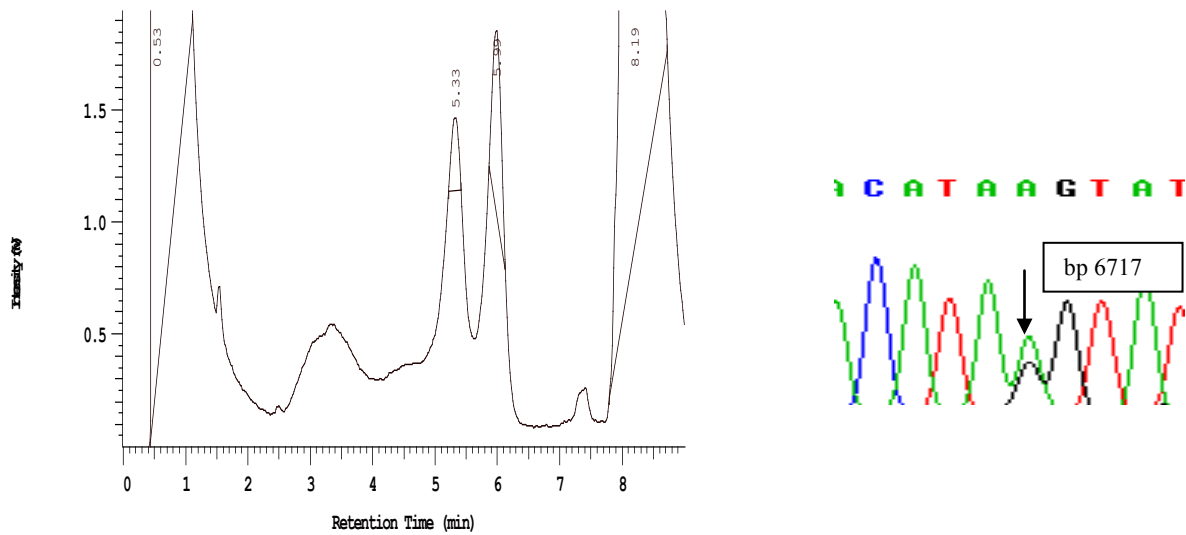


Abbildung 37 dHPLC-Analyse von Probe ACK 40 (Cox 75, 59°C) und dazugehörige Sequenzanalyse
Nur revers-komplementäre Darstellung der Rückwärtssequenzierung, da Vorwärtssequenzierung nicht auswertbar.

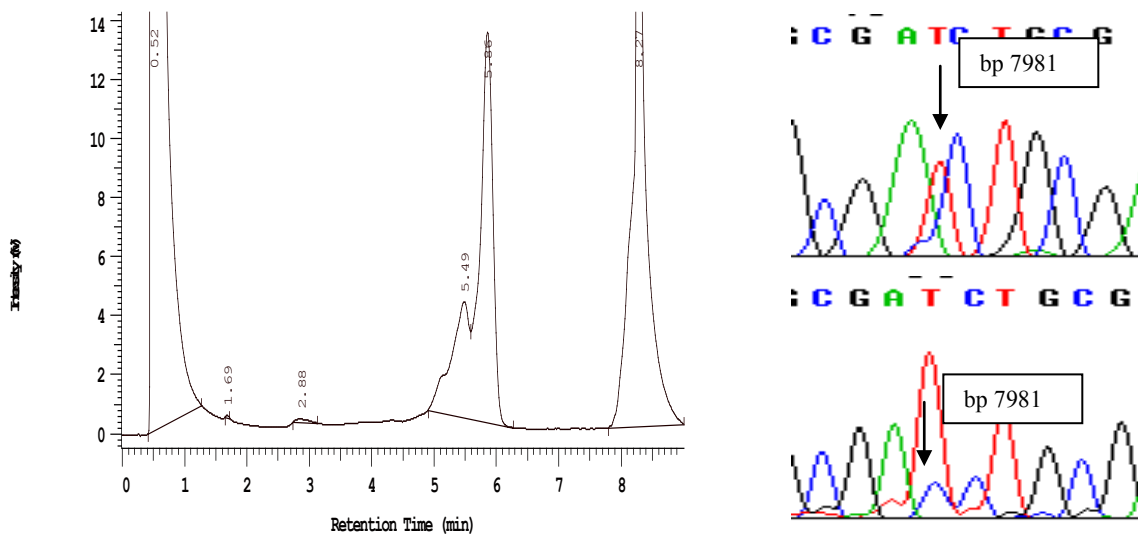


Abbildung 38 dHPLC-Analyse von Probe ACK 40 (Cox 58a, 60°C) und dazugehörige Sequenzanalyse
Oben Vorwärtssequenzierung, unten revers-komplementäre Darstellung der Rückwärtssequenzierung.

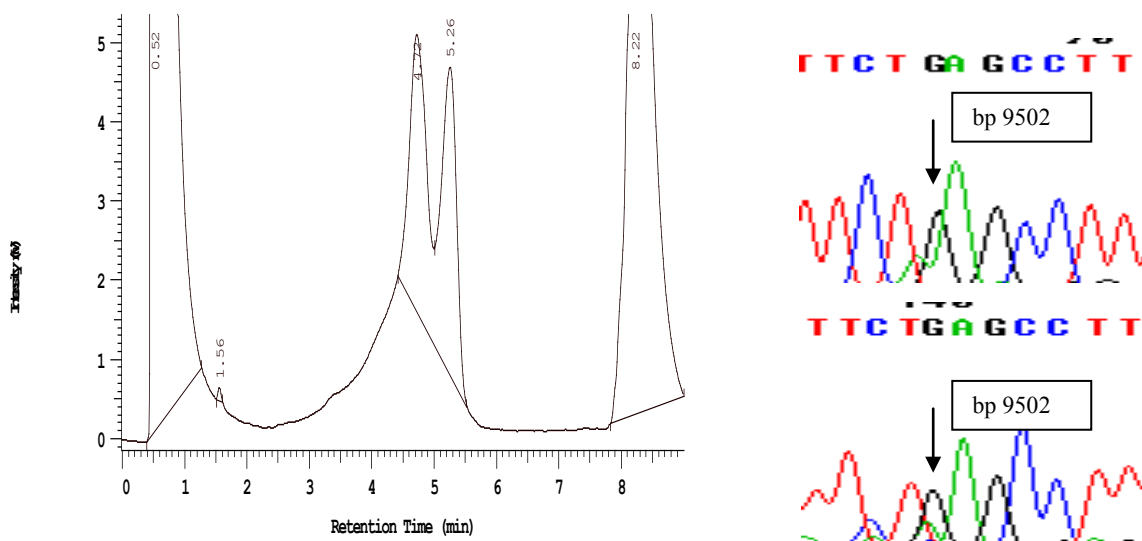


Abbildung 39 dHPLC-Analyse von Probe ACK 40 (Cox 36a, 60°C) und dazugehörige Sequenzanalyse
Oben Vorwärtssequenzierung, unten revers-komplementäre Darstellung der Rückwärtssequenzierung.

3.4.7 Probe ACK 42 (AML aus einer PV)

Bei dieser Probe fand sich mit dem Primer Cox 58a (60°C) eine kleine, noch nicht beschriebene Heteroplasmie an Position 8211 im Cox 2-Gen (Abb. 40). Durch den Wechsel T→C kommt es zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Threonin.

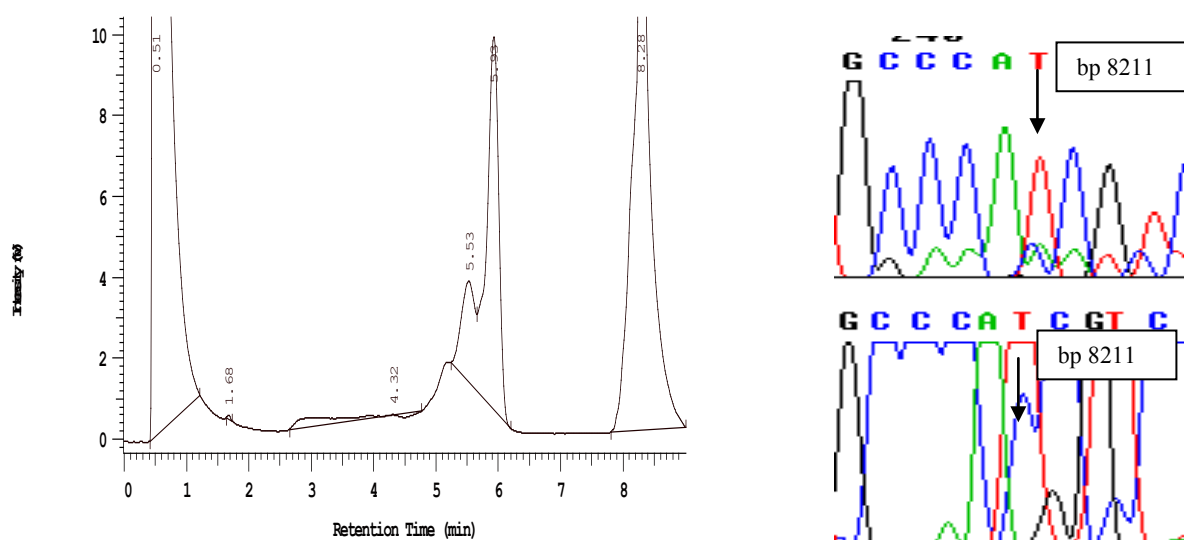


Abbildung 40 dhPLC-Analyse von Probe ACK 42 (Cox 58a, 60°C) und dazugehörige Sequenzanalyse
Oben Vorwärtssequenzierung, unten revers-komplementäre Darstellung der Rückwärtssequenzierung.

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der weiteren MPN-Proben

Tabelle 9 Zusammenfassung der Ergebnisse der weiteren MPN-Proben

Proben-Nr.	Geschlecht / Alter	Erkrankung	Primer	mtDNA-Position	mtDNA-Mutation	Gen	AS-Austausch	% Het.	Bemerkungen	Neu?
ACK 27	M / 61	PV	ATP 66a			ATPase 6			*	
			Cyb 06b			Cyto B			*	
ACK 28	M / 54	PV								
ACK 29	M / 67	PV	KR 81a	16129	G → A	KR		30%		
			mrR 98a	2825	G → A	16S-rRNA		50%		✓
ACK 30	M / 45	PV	KR 84a			KR			*	
			NAD 15a			ND 1			???	
			Cyb 05	15441 15442	T → G G → A	Cyto B	Leu → Trp	10%		✓
			Cyb 07a	15882	G → C	Cyto B	Trp → Ser	10%		✓
ACK 31	M / 72	PV	NAD 43a	11150	G → A	ND 4	Ala → Thr	20%		
ACK 32	M / 63	PV	NAD 51a	12618	G / A	ND 5			bekannter Polymorphismus	
ACK 33	M / 56	PV								
ACK 34	M / 60	OMF	NAD 46a	12415	A → G	ND 5	Asn → Asp	50%		✓
ACK 35	M / 62	OMF	NAD 44a			ND 4			*	
ACK 36	W / 64	OMF								
ACK 37	M / 49	CML Ph ⁻	mrR 98a	2832-2849	del	16s-rRNA			Heteroplasmische Deletion von 18 bp	✓
			mrR 99a	2832-2849	del	16s-rRNA			Heteroplasmische Deletion von 18 bp	✓
ACK 38	W / 80	OMF	Cox 77b	mehrere		Cox 1			*	
ACK 39		CML Ph ⁻								
ACK 40	W	CML Ph ⁻	Cox 75	6717	G → A	Cox 1	Gly → Ser	50%		✓
			Cox 58a	7981	C → T	Cox 2		90%	silent	
			Cox 36a	9502	G → A	Cox 3	STOP (!)	50%		✓
			NAD 44a	11719	G → A	ND 4			bekannter Polymorphismus	
			NAD 64a	14659	G → A	ND 6		5%		✓
			Cyb 03			Cyto B			*	

Proben-Nr.	Geschlecht / Alter	Erkrankung	Primer	mtDNA-Position	mtDNA-Mutation	Gen	AS-Austausch	% Het.	Bemerkungen	Neu?
ACK 41	M / 53	AML aus OMF								
ACK 42	M / 54	AML aus PV	Cox 58a	8211	T → C	Cox 2	Ile → Thr	10%		✓
ACK 43	M / 68	PV								
ACK 44	M / ?	ET	KR 85a	303-309		KR			Längeninhomogenität im Poly-C-Trakt	
			NAD 44a			ND 4			*	

*Bei einigen Proben konnten auffällige Befunde im Wave-Lauf durch die Sequenzierung nicht bestätigt werden. Möglicherweise handelt es sich um Gene in der Kontrollregion oder in den Primerbereichen, s. u.

3.6 Homoplasmische Veränderungen der mtDNA bei CML- und MPN-Patienten

Zusätzlich zu den hier ausführlich beschriebenen Heteroplasmien fanden sich noch einige homoplasmische Veränderungen im Vergleich zur Referenz-Sequenz¹⁷¹. Die meisten sind bereits als Polymorphismen beschrieben. Es handelt sich hauptsächlich um sog. *silent mutations*, die ohne Aminosäureaustausch einhergehen und daher nicht von pathophysiologischer Relevanz sind. Homoplasmische Mutationen finden sich gehäuft in nicht konservierten Aminosäuren während heteroplasmische Mutationen vielfach in hoch konservierten Aminosäuren vorkommen. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, sich, wie in dieser Arbeit geschehen, bei der Suche nach pathogenetisch bedeutsamen Mutationen auf Heteroplasmien zu konzentrieren. Bei den hier dargestellten Homoplasmien handelt es sich lediglich um Zufallsbefunde, die hier nur der Vollständigkeit halber kurz dargestellt werden sollen.

Tabelle 10 Zusammenfassung der gefundenen Homoplasmien der CML- und MPN-Proben

Proben-Nr.:	Gene	Nukleotide	Position	Diagnose	Mitomap	konserviert
ACK 44	CR	T152C	-	ET	bekannt	n.d.
ACK 44	CR	T217C	-	ET	bekannt	n.d.
ACK 44	CR	309insC	-	ET	bekannt	n.d.
ACK 44	CR	311insC	-	ET	bekannt	n.d.
ACK 37	16S-RNA	G2695A	nt 1025	CML Ph-	neu	ja
ACK 37	16S-RNA	A2706G	nt 1036	CML Ph-	bekannt	nein
ACK 29	16S-RNA	A2706G	nt 1036	PV	bekannt	nein
ACK 37	16S-RNA	T3197C	nt 1527	CML Ph-	bekannt	nein
<i>viele</i>	Cox 1	C7028T	A375	-	bekannt	silent

Proben-Nr.:	Gene	Nukleotide	Position	Diagnose	Mitomap	konserviert
ACK 10	ATPase 6	G9123A	L199	CML	bekannt	silent
ACK 35	ND 4	A11467G	L236	OMF	bekannt	silent
ACK 35	ND 4	G11719A	G320	OMF	bekannt	silent
ACK 35	ND 4	T11732C	L325	OMF	bekannt	silent
ACK 32	ND 5	G12618A	L94	PV	bekannt	silent
ACK 17	ND 5	G13368A	G344	CML	bekannt	silent
ACK 30	Cyto b	C15793T	I349	PV	neu	silent
ACK 27	Cyto b	A15848G	T368A	PV	neu	nein
<i>viele</i>	CR	T16189C	-	-	<i>InsulinResistenz</i>	n.d.
<i>viele</i>	CR	T16362C	-	-	bekannt	n.d.
<i>viele</i>	CR	T16519C	-	-	bekannt	n.d.

CR: control region.

Nukleotide: Basenaustausch und Nukleotid-Position in der mtDNA

Position: Position der Nukleotid-Veränderung im RNA-Gen oder Position der Aminosäureveränderung im Protein-Gen

Mitomap: Information, ob die Mutation bekannt oder neu in der MITOMAP Datenbank ist

Konserviert: silent, nein AS-Austausch; n.d., not done.

3.7 Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der MDS-Proben

Tabelle 11 Heteroplasmische und homoplasmische mtDNA-Mutationen bei MDS-Patienten: Anteil neuer Mutationen, die konservierte Nucleotide bzw. Aminosäuren in unterschiedlichen Gen-Typen betreffen

Heteroplasmische Mutationen				
	CR	rRNA	tRNA	Prot.
Transitionen	9	21	15	56 (11)
Transversionen	0	1	0	4 (1)
andere	1 ins	0	0	1 del
gesamt	10	22	15	61 (12)
Neue Mutationen	2	21	9	49 (9)
Davon konserviert	n.d.	14	6	26

Homoplasmische Mutationen				
	CR	rRNA	tRNA	Prot.
Transitionen	35	8	2	42 (31)
Transversionen	4	0	0	1 (0)
	5 ins	0	0	0
gesamt	44	8	2	43 (31)
Neue Mutationen	1	0	0	9 (6)
Davon konserviert	n.d.	0	0	2

CR: Kontrollregion; rRNA: mitochondriale ribosomale RNAs; tRNA: mitochondriale transfer-RNAs; Prot.: Protein-Gen-Mutationen, davon silent; neu: nicht registriert in Mitomap; konserviert: wenigstens in Säugetieren; n.d., not determined. Identische Mutationen, die in mehr als einer Probe gefunden wurden, wurden nur einmal gezählt. Bewertung der konservierten tRNA-Mutationen nach Helm *et al.*¹⁷².

Tabelle 12 Zusammenfassung der Ergebnisse der MDS-Proben

Proben Nr.	Gene	Nucleotide	Position	Het.	Diagnose	RS	Neu?	konserviert
429	CR	C64+T		hoch	RARS	13%		n.d.
536	CR	C198+T		minimal	RAEB	0%		n.d.
373 426	CR	A234+G		mittel minimal	RAEB	0%		n.d.
613	CR	insAC514+insACAC		mittel	RARS	68%	✓	n.d.
586	12S-RNA	T669+C	nt 22	mittel	RARS	25%	✓	nein
377	12S-RNA	G1130+A	nt 483	mittel	RAEB	38%	✓	nein
389	12S-RNA	T1184+C	nt 537	gering	AML-4	60%	✓	ja
447 ^a	12S-RNA	G1200+C	nt 553	minimal	RARS	74%	✓	ja
504	12S-RNA	G1380+A	nt 733	mittel	RA	0%	✓	no
445 ^a 531 ^b 532 ^a	12S-RNA	T1456+C	nt 809	mittel mittel keine	RA	0%	✓	ja
430	12S-RNA	G1551+A	nt 904	mittel	RAEB	0%	✓	ja

Proben Nr.	Gene	Nucleotide	Position	Het.	Diagnose	RS	Neu?	konserviert
329	12S-RNA	T1560+C	nt 913	minimal	RA	0%	✓	ja
373 426	16S-RNA	G1768+A	nt 98	mittel mittel	RAEB	0%	✓	ja
362	16S-RNA	A1811+G	nt 141	hoch	RAEB	0%		nein
540	16S-RNA	T1861+C	nt 191	gering	RARS	25%	✓	nein
377	16S-RNA	G1941+A	nt 271	minimal	RAEB	38 %	✓	nein
402	16S-RNA	T2158+C	nt 488	mittel	RARS	41 %	✓	nein
389	16S-RNA	G2174+A	nt 504	mittel	AML-4	60%	✓	ja
438 ^a	16S-RNA	T2194+C	nt 524	minimal	RA	0%	✓	nein
445 ^a 531 ^b 532 ^a	16S-RNA	G2292+A	nt 622	mittel mittel gering	RA	0%	✓	ja
525 ^a 440 ^a	16S-RNA	T2342+C	nt 672	gering minimal	RAEB RAEB	0%	✓	ja
440 ^a	16S-RNA	G2608+A	nt 938	gering	RAEB	0%	✓	ja
473	16S-RNA	T2737+C	nt 1067	minimal	RAEB	19%	✓	ja
377	16S-RNA	A2833+G	nt 1163	minimal	RAEB	38%	✓	ja
363	16S-RNA	T2973+C	nt. 1303	mittel	RAEB	0%	✓	ja
541	16S-RNA	G3002+A	nt 1332	mittel	RAEB	0%	✓	ja
371	16S-RNA	G3068+A	nt 1398	mittel	RAEB	30%	✓	ja
473	16S-RNA	G3095+A	nt 1425	mittel	RAEB	19%	✓	ja
537	tRNA ^{Leu}	G3242+A	nt 13	mittel	RAEB	0%	MM	ja
381	tRNA ^{Leu}	T3290+C	nt 61	mittel	RAEB-T	0%		nein
380	ND 1	A3669+T	W121	mittel	RAEB	40%	✓	silent
399	tRNA ^{Gln}	G4339+A	nt 62	minimal	RARS	32 %	✓	ja
384	tRNA ^{Gln}	G4360+A	nt 41	mittel	CMML	0%	✓	nein
443 ^a	ND 2	G4821+A	V118+I	mittel	RAEB	0%	✓	ja
536	ND 2	A5080+G	N204+S	minimal	RAEB	0%	✓	ja
377	ND 2	T5089+C	I207+T	minimal	RAEB	38%	✓	ja
532 ^a	ND 2	A5109+G	T214+A	hoch	RA	0%	✓	nein
431	tRNA ^{Trp}	G5540+A	nt 29	mittel	AML-M2	0%	En- ceph	nein
371	tRNA ^{Trp}	A5559+G	nt 48	mittel	RAEB	30%	✓	ja
402	nonco- ding	T5580+C	-	minimal	RARS	41 %		nein
402	tRNA ^{Ala}	T5609+C	nt 47	minimal	RARS	41 %	✓	nein
503	tRNA ^{Ala}	T5641+C	nt 15	hoch	RAEB	0%	✓	ja
380	tRNA ^{Cys}	G5821+A	nt 6	minimal	RAEB	40%		nein

Proben Nr.	Gene	Nucleotide	Position	Het.	Diagnose	RS	Neu?	konserviert
380	tRNA ^{Tyr}	C5840+T	nt 52	minimal	RAEB	40%	✓	nein
380	Cox 1	G6023+A	E40	minimal	RAEB	40%		silent
384	Cox 1	G6360+A	A153+T	mittel	CMML	0%	✓	ja
220	Cox 1	G6446+A	T181	gering	RA	40%	✓	silent
385	Cox 1	C6596+T	Y231	mittel	RA	0%	✓	silent
433	Cox 1	A6720+G	M273+V	gering	RAEB	20%	✓	ja
398	Cox 1	A7339+G	K479+ST OP	mittel	RARS	42 %	✓	STOP
366	Cox 1	C7366+T	P488+L	gering	RAEB	2%	✓	nein
446 ^a	Cox 1	TR7372+C	M490+T	gering	RA	0%	✓	nein
364	Cox I	T7378+C	L492+P	minimal	RAEB-T	0%	✓	ja
444 ^a	Cox 1	T7440+C	S513+P	minimal	RA	0%	✓	nein
588	tRNA ^{Ser}	A7450+G	nt 67	mittel	RARS	30%	✓	ja
396	tRNA ^{Asp}	A7543+G	nt 26	minimal	RARS	75 %	MEPR	ja
457 ^b 523 ^a	Cox 2	T8069+C	S162+P	mittel mittel	CMML	0%	✓	ja
451 ^a	ATPase 8 ATPase 6	T8551+C	H62 F9+L	mittel	RAEB	0%		silent ja
424	ATPase 8 ATPase 6	T8567+C	S68+P I14+T	mittel	RARS	30%		nein ja
503	ATPase 6	T8612+C	L29+P	mittel	RAEB	0%	✓	nein
440 ^a 525 ^a	ATPase 6	G8782+A	G86+ST OP	mittel mittel	RAEB	0%	✓	STOP
613	ATPase 6	G8921+A	G132+D	mittel	RARS	68%		ja
589	Cox 3	G9237+A	V11+M	mittel	RAEB	0%	✓	ja
537	Cox 3	T9730+C	L175+P	mittel	RAEB	0%	✓	nein
374	Cox 3	G9744+A	E182+K	minimal	RAEB	0%	✓	ja
446 ^a	Cox 3	G9942+A	D246+N	mittel	RA	0%	✓	ja
399	ND 3	G10143+A	G29+S	minimal	RARS	32 %		nein
541	ND 3	G10364+A	L102	mittel	RAEB	0%	✓	silent
372	ND 4L	G10569+A	E34+K	mittel	RAEB	0%	✓	ja
389	ND 4L	A10754+G	L95	gering	AML-M4	60%		silent
536	ND 4	T10800+A	L14+Q	minimal	RAEB	0%	✓	nein
577	ND 4	G11226+C	G156+A	gering	RA	0%	✓	ja
613	ND 4	T11354+C	Y199+H	gering	RARS	68%	✓	nein
369	ND 4	A11880+G	N374+S	minimal	RAEB	0%		ja
483	ND 4	T11899+C	S380	minimal	RARS	55%	✓	silent
402	ND 4	C12084+A	S422+Y	mittel	RARS	41 %	✓	nein
401	tRNA ^{Ser}	C12237+T	nt 31	mittel	RARS	53 %		nein

Proben Nr.	Gene	Nucleotide	Position	Het.	Diagnose	RS	Neu?	konserviert
364	ND 5	12425+delA	(+STOP)	mittel	RAEB-T	0%	✓	STOP
368	ND 5	T12519+C	V61	mittel	RAEB-T	0%	✓	silent
380	ND 5	G12539+A	W68+ST OP	mittel	RAEB	40%	✓	STOP
386 387	ND 5	G12630+A	W98	mittel mittel	RARS RARS	25% 75%		silent
541	ND 5	G12769+A	E145+K	minimal	RAEB	0%	✓	ja
389	ND 5	G12847+A	A171+T	mittel	AML-4	60%	✓	ja
329	ND 5	G12994+A	A220+T	mittel	RA	5%	✓	ja
589	ND 5	A13025+G	H230+R	mittel	RAEB	0%	✓	ja
367	ND 5	A13062+G	M242	minimal	RA	0%	✓	silent
389	ND 5	T13076+C	L247+P	gering	AML-M4	60%	✓	ja
421	ND 5	T13081+C	S249+P	mittel	RARS	56%	✓	ja
367	ND 5	T13095+C	V253	minimal	RA	0%	✓	silent
367	ND 5	A13105+G	I257+V	minimal	RA	0%		nein
422	ND 5	G13178+A	G281+D	gering	RAEB-T	0%	✓	ja
384	ND 5	A13299+G	Q321	mittel	CMML	0%	✓	silent
440 ^a 525 ^a	ND 5	A13676+G	N447+S	gering minimal	RAEB	0%	✓	nein
503	ND 5	A13681+G	T449+A	minimal	RAEB	0%	✓	nein
589	ND 5	A13681+G	T449+A	minimal	RAEB	0%	✓	nein
433	ND 5	T13832+C	L499+P	minimal	RAEB	20%	✓	ja
613	ND 5	T13879+C	S515+P	mittel	RARS	68%		nein
424	ND 5	T13931+C	I532+T	mittel	RARS	30%	✓	nein
378	ND 5	T14048+C	I571+T	gering	RAEB	14%	✓	nein
451 ^a	ND 6	G14249+A	A142+V	gering	RAEB	0%		nein
433	ND 6	G14259+A	P139+S	mittel	RAEB	20%		ja
369	ND 6	A14672+G	M1+T	minimal	RAEB	0%	✓	ja
536	tRNA ^{Glu}	G14721+A	nt 22	mittel	RAEB	0%	✓	ja
588	Cyto b	G14847+A	G34+D	gering	RARS	30%	Ex.Int.	ja
459 ^b 528 ^c 529 ^a 530 ^d	Cyto b	T14952+C	I69+T	mittel gering mittel minimal	CMML	0%	✓	ja
398	Cyto b	G15047+A	G101+S	hoch	RARS	42%	✓	ja
544	Cyto b	T15183+C	I146+T	gering	RAEB-T	0%	✓	ja
399	Cyto b	G15261+A	S172+N	mittel	RARS	32%	✓	nein
370	tRNA ^{Thr}	T15889+C	nt 2	mittel	RAEB-T	0%		nein
449 ^a 462 ^b	tRNA ^{Pro}	T16022+C	nt 2	gering minimal	RARS	50%	✓	ja

Proben Nr.	Gene	Nucleotide	Position	Het.	Diagnose	RS	Neu?	konserviert
429	CR	T16027+C		gering	RARS	13%	✓	n.d.
579	CR	G16129+A		gering	RA	0%		n.d.
540	CR	T16311+C		mittel	RARS	25%		n.d.
374	CR	T16311+C		mittel	RAEB	0%		n.d.
577	CR	C16344+T		mittel	RA	0%		n.d.
443 ^a	CR	C16320+T		mittel	RAEB	0%		n.d.
421	CR	T16519+C		hoch	RARS	56%		n.d.

^a mononukleäre Zellen, ^b Granulozyten; ^c CD34⁺-Zellen; ^d CD8⁺-Zellen;

CR: Kontrollregion.

Nucleotide: Basenaustausch und Nucleotid-Position in der mtDNA

Position: Position der Nucleotid-Veränderung im RNA-Gen oder Position der Aminosäureveränderung im Protein-Gen

Het.: Heteroplasmiegrad: minimal (<10%), gering: ca. 10-30 %, mittel: ca. 30-70%, hoch: >70%.

RS: Ringsideroblasten.

Mitomap: Information, ob die Mutation bekannt oder neu in der MITOMAP Datenbank ist

Einige Mutationen sind mit bekannten Erkrankungen assoziiert: MM (Mitochondriale Myopathie), Enceph

(Encephalomyopathie), MEPR (Myoklonische Epilepsie und psychomotorische Regression) oder Ex. int. (exercise intolerance).

Konserviert: silent, nein AS-Austausch; n.d., not done; STOP Stop-Codon

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die mitochondriale DNA aus peripheren Blut- oder Knochenmarkszellen von Patienten mit einer myeloproliferativen Neoplasie mithilfe der Heteroduplex-Analyse auf Mutationen untersucht.

Das ausgewählte Studienkollektiv diente als Vergleich zu einer von Wulfert et. al.¹⁷⁰ durchgeführten Studie, bei der Patienten mit einem myelodysplastischen Syndrom auf die gleiche Art und Weise untersucht wurden. Hier fand man bei 58 von insgesamt 104 Patienten eine oder mehrere (insgesamt 111) heteroplasmische Mutationen (prozentuale Häufigkeit: 56%). Als Vergleichsgruppe wurden im Rahmen dieser Arbeit Patienten mit einem MPS ausgewählt, da man hier, im Gegensatz zum gesunden Menschen, ebenfalls ein klonales Knochenmark, allerdings ohne signifikante Dysplasien, findet. Es ist außerdem bekannt, dass die Mitochondrien bei MPN-Patienten – im Gegensatz zum MDS – nicht an der Pathogenese beteiligt sind. Bei gesunden polyklonalen Knochenmark- oder Blutproben bleiben einzelne Klone auch nach der Amplifizierung so klein, dass ihre Mutationen (vermutlich) unter der Nachweisgrenze der Heteroduplexanalyse bleiben. Aus diesem Grund schien unserer Arbeitsgruppe die Vergleichbarkeit der beiden ausgewählten Studienkollektive sinnvoller zu sein.

Bei insgesamt 39 untersuchten Patienten in der MPN-Gruppe fanden wir 25 heteroplasmische Mutationen bei 16 verschiedenen Patienten (prozentuale Häufigkeit: 44%). Damit war die Häufigkeit heteroplasmischer Mutationen bei den MPN-Patienten zwar geringer, der Unterschied statistisch aber nicht signifikant ($p=0,156$). Dieses Ergebnis spricht allerdings gegen eine generelle Bedeutung der mitochondrialen Mutationen bei der Pathogenese des MDS und für eine klonale Expansion rein altersabhängig zufälliger Mutationen.

Die größte Differenz zeigte sich bei mitochondrialen tRNA-Mutationen, die bei den MDS-Proben häufiger auftraten als bei den MPN-Proben. tRNA-Mutationen sind der häufigste bekannte Auslöser für mitochondriale Erkrankungen aufgrund von mtDNA-Mutationen. Deshalb lässt sich vermuten, dass die bei den MDS-Patienten gefundenen tRNA-Mutationen eine höhere Relevanz für die Pathogenität haben. Zusätzlich wurden in beiden Versuchsreihen noch einige homoplasmische Mutationen gefunden. Bei den meisten handelt es sich um bereits bekannte Polymorphismen, andere sind sogenannte *silent mutations* oder Veränderungen von nicht konservierten Nukleotiden, die bisher noch nicht als Polymorphismen registriert

wurden. Es scheint sehr unwahrscheinlich, dass diese Polymorphismen von pathophysiologischer Relevanz sind, deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht systematisch danach gesucht und auf eine weitere Darstellung der zufällig festgestellten Befunde verzichtet. Auffällig war hingegen, dass die homoplasmischen Mutationen in den seltensten Fällen hoch konservierte Aminosäuren betrafen (5%), die heteroplasmischen Mutationen dagegen mit 43% deutlich häufiger. Diese Beobachtung stimmt mit der von Shin *et. al.*¹⁷³ überein. Diese Arbeitsgruppe fand bei ihrer Analyse mittels direkter DNA-Sequenzierung hauptsächlich homoplasmische Veränderungen an nicht konservierten Aminosäuren.

Ein interessanter Punkt ist, dass bei unserer Analyse wesentlich mehr Transitionen als Transversionen gefunden wurden (Verhältnis 18:2). Möglicherweise könnte dieses Folge des Fehlens eines entsprechenden mtDNA-*mismatch-repair*-Systems sein, welches bei der nukleären DNA für das Entfernen von Transitionen zuständig ist¹⁷⁴.

Mit der Heteroduplex-Analyse ist es nicht möglich, eine hundertprozentige Mutationsdetektion durchzuführen. Aus diesem Grund kann es sich bei den vorliegenden Ergebnissen nur um eine vorsichtige Schätzung handeln. Besonders bei einem Anteil von <5% bzw. >95% heteroplasmischen Materials wird die Heteroduplex-Analyse unzuverlässig. Dabei muss man allerdings auch bedenken, dass Mutationen mit einem Anteil von unter < 5% höchstwahrscheinlich pathophysiologisch irrelevant sind und ein Auftreten heteroplasmischer Mutationen mit einem Anteil von > 95% auch bei einem klonalen Knochenmark sehr unwahrscheinlich ist, weil immer noch ein paar nichtmutierte Zellen mit analysiert werden.

Bei der Untersuchung der MDS-Patienten fanden Wulfert *et. al.*¹⁷⁰ einen altersabhängigen Anstieg der Mutationshäufigkeit. Dieser Trend konnte bei der Untersuchung der MPS-Patienten nicht bestätigt werden. Möglicherweise liegt dies aber auch an dem kleineren Studienkollektiv der MPN-Gruppe. In den vergangenen Jahren konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass es in der Mehrzahl somatischer Zellen und auch der Stammzellen zu einer altersabhängigen Akkumulation von mtDNA-Mutationen kommt¹⁷⁵⁻¹⁷⁸. Es ist also möglich, dass altersbedingte mtDNA-Mutationen bei unseren Patienten in einer Stammzelle schon vorlagen, bevor sie ein myelodysplastisches bzw. myeloproliferatives Syndrom entwickelten. Zu dieser Beobachtung würde auch passen, dass das Studienkollektiv der MPN-Patienten mit durchschnittlich 61 Jahren etwas jünger war als die Patienten der MDS-Gruppe (68 Jahre). Um die Theorie der altersabhängigen Akkumulation mitochondrialer Mutationen in hämato-

logischen Stammzellen definitiv nachzuweisen, müsste man die Zellen im Vergleich zu altersmäßig passenden normalen Zellen untersuchen. Die in unserer Studie gefundenen Daten passen zu den Beobachtungen von He *et. al.*¹⁷⁹, der bei Patienten mit akuter und chronischer Leukämie in 40% somatische Punktmutationen der mtDNA nachweisen konnte. Hier waren die Patienten mit einem Durchschnittsalter von 49 Jahren noch jünger als unsere MPS-Patienten. Auch Shin *et. al.*¹⁷⁷ beschrieben eine altersabhängige Akkumulation von mtDNA-Mutationen, verdeutlicht durch eine hochgradige Heterogenität der mtDNA-Sequenz bei normalen Knochenmarks- und CD34⁺-Blut-Zellen im Vergleich zu Nabelschnurblut. Überraschend ist, dass Shin *et. al.* bei 10 untersuchten MDS-Patienten homoplasmische Sequenzveränderungen fanden, jedoch keine heteroplasmischen Mutationen. Möglicherweise könnte dieses durch den Umstand erklärt werden, dass die Mutationsanalyse in dieser Studie mittels direkter DNA-Sequenzierung durchgeführt wurde. Dieses Verfahren ist für den Nachweis von heteroplasmischen Veränderungen nur eingeschränkt geeignet.

Altersabhängige mtDNA-Mutationen können funktionelle Auswirkung haben, was beispielsweise von Taylor *et al.*¹⁷⁶ mittels der COX-Färbung bei menschlichen Kolonkryptenzellen belegt wurde. Neben den rein stochastischen Mechanismen könnten auch funktionelle Effekte an der intrazellulären Anreicherung von mtDNA-Mutationen beteiligt sein. Hierfür spricht, dass sich das Spektrum altersabhängig akkumulierender mtDNA-Mutationen in Kardiomyozyten drastisch von dem in Zellen der Mundschleimhaut unterscheidet¹⁷⁵. Dies kann nicht zufallsbedingt sein, sondern spricht für funktionelle Wechselwirkungen zwischen mtDNA-Mutationen und gewebsspezifischen Prozessen, die die Entstehung oder die intrazelluläre Expansion der Mutationen fördern.

Der Nachweis, dass es in postmitotischen Zellen, aber auch in Stammzellen, zu einer altersabhängiger Akkumulation von mtDNA-Mutationen kommt, die auch funktionelle Auswirkungen mit sich bringen, stützt die mitochondriale Theorie des Alterns. Da altersabhängig die Inzidenz von Tumorerkrankungen und somit auch hämatopoetischer Neoplasien ansteigt, könnte es sein, dass mtDNA-Mutationen ursächlich an der Karzinogenese beteiligt sind. Die im Folgenden erläuterten Mechanismen könnten dabei eine entscheidende Rolle spielen.

Eine unzureichende ATP-Produktion könnte zu genomischer Instabilität beitragen. Da die Motorproteine des mitotischen Spindelapparates ATP- bzw. GTP-abhängig sind, könnte es bei ATP-Mangel zu Funktionsstörungen des Spindelapparates mit konsekutiven Chromoso-

men-Fehlverteilungen kommen. Die daraus resultierende Aneuploidie ist ein häufiges Merkmal von Tumorzellen. Außerdem sind viele DNA-Reparaturmechanismen ATP-abhängig und ein mitochondrial bedingter ATP-Mangel könnte die DNA-Reparaturkapazität beeinträchtigen.

Die mitochondriale Atmungskette ist an der de-novo Synthese von Pyrimidinnukleotiden beteiligt. Ein wichtiges Enzym der Pyrimidinsynthese, die Dihydroorotat-Dehydrogenase, funktioniert nur im Zusammenspiel mit einer intakten mitochondrialen Atmungskette¹⁸⁰. Dysregulation der Atmungskette hat eine starke Beeinträchtigung der Pyrimidinsynthese mit entsprechenden Veränderungen im Nukleotidpool der Zellen zur Folge¹⁸¹. Ein Ungleichgewicht der intrazellulären Nukleotide führt zu fehlerhafter DNA-Replikation und erhöhter Mutationsrate im Zellkern¹⁸².

Eine Beeinträchtigung der Atmungskettenfunktion durch mtDNA-Mutationen führt zu einer stark vermehrten Produktion von Sauerstoffradikalen. In betroffenen Zellen kann dies wiederum zu einer erhöhten Mutationsrate beitragen.

Es ist sehr schwer, die hier gefundenen Ergebnisse bezüglich ihrer Relevanz zu beurteilen. Viele der Protein-Gen-Mutationen sind stumm, bei den Mutationen die zu einem Aminosäureaustausch führen oder tRNAs oder rRNAs betreffen, muss der Grad der Konservierung nicht unbedingt mit der Pathogenität korrelieren. Denn auch wenn es sich um ein hochkonserviertes Nukleotid handelt, kann der Effekt gering sein, wenn der Heteroplasmiegrad niedrig bleibt. Leider kann dieses Problem nicht damit gelöst werden, dass man den beobachteten Heteroplasmiegrad zugrunde legt, denn die Heteroduplex-Analyse kann nicht zwischen einem niedrigen intrazellulärem Heteroplasmielevel bei einem fast komplett klonalem Knochenmark und einem hohen Heteroplasmielevel in einem Klon, der nur einen kleinen Teil des Knochenmarks repräsentiert, unterscheiden.

In früheren Studien mit MDS-Patienten, dieser Arbeitsgruppe um Wulfert und Gattermann, waren *hot spots* im Bereich der Cytochrom C- Oxidase Gene I und II Gegenstand der Diskussion^{168, 183, 184}. Ähnliche Ergebnisse konnten wir hier nicht wiederholen. Die Tatsache, dass wir bei unserer Analyse keine *hot spots* identifizieren konnten, spielt aber für die mögliche Beteiligung von mtDNA-Mutationen an der Pathogenese von MDS oder anderen Erkrankungen keine Rolle. Alle Protein-Gene des mitochondrialen Genoms kodieren für Untereinheiten

der Atmungskette und die mitochondrialen tRNAs und rRNAs sind notwendig für die Synthese dieser Untereinheiten. Somit haben alle auftretenden mtDNA-Mutationen eine gemeinsame Endstrecke, nämlich eine mögliche Funktionsstörung der Atmungskette. Wegen dieser Konvergenz ihrer funktionellen Auswirkung können pathogenetisch relevante mtDNA-Mutationen weit über das gesamte mitochondriale Genom verstreut sein. Dies entspricht dem bekannten Phänomen, dass bei hereditären mitochondrialen Erkrankungen die Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp nur schwach ausgeprägt ist. Ein großer Teil der phänotypischen Auswirkung lässt sich nicht durch die Lokalisation der Mutation erklären, sondern ist abhängig vom prozentualen Anteil der mutierten mtDNA-Moleküle (Grad der Heteroplasmie), der in verschiedenen Organen zudem sehr unterschiedlich sein kann. Des Weiteren kann es sich bei dem Fehlen der *hot spots* natürlich auch um ein Problem der kleinen Zahlen handeln.

Bei der primären Anreicherung einer bestimmten mtDNA-Mutation in einer Stammzelle handelt es sich möglicherweise um ein rein stochastisches, also von Zufallsereignissen gesteuertes Phänomen. Mittels mathematischer Modelle und computergestützter Simulationen zeigten Elson *et al.* 2001¹⁸⁵ für postmitotische Zellen und Coller *et al.* 2001¹⁸⁶ für proliferierende Zellen, dass die erhöhte Mutationsrate der mtDNA, der mitochondriale Turnover innerhalb der Zellen, die zelluläre Proliferationsrate sowie die Lebensdauer eines Menschen genügen, um mit großer Wahrscheinlichkeit in zahlreichen Körperzellen eine zufällige mtDNA-Mutation stark anzureichern. Hierbei ist es nicht unbedingt erforderlich, dass das mutationstragende mtDNA-Molekül durch die Mutation einen replikativen Vorteil erhält.

Eine interessante Beobachtung ist, dass wir mehr Mutationen bei Patienten in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien fanden. Hier handelte es sich teilweise sogar um recht junge Patienten, so dass die Mutationshäufigkeit nicht mit der mitochondrialen Theorie des Alterns erklärt werden kann. Bei einer jungen Patientin zeigte sich sogar eine ausgedehnte Deletion von 18bp. Mögliche Überlegungen hierzu wären, dass entweder die Mutationen zu einem schnelleren Fortschreiten der Erkrankung führen oder dass bei fortschreitender Erkrankung mehr oxidativer Stress entsteht, der dann wiederum das Auftreten von Mutationen begünstigt. Möglicherweise ist diese Deletion aber auch vollkommen harmlos, bzw. der Heteroplasmiegrad von ca. 50% reicht bei weitem noch nicht aus, um pathologisch relevant zu werden. Bei einigen bekannten pathologischen Mutationen benötigt man Heteroplasmiegrade von über 90% für einen Phänotyp in der Zellkultur¹⁸⁷.

Es ist daher davon auszugehen, dass es sich bei Mutationen der mitochondrialen DNA, die bei klonalen Veränderungen des Knochenmarks gefunden wurden, mehrheitlich um klonale Marker ohne schädigenden Effekt handelt. Im Einzelfall führen sie zu mitochondrialer Dysfunktion und bestimmen so den Phänotyp der Erkrankung. Ein Hinweis könnte hier möglicherweise das Vorhandensein von mtDNA-Deletionen bei allen Patienten mit einem Pearson-Syndrom sein: Der sideroblastische Phänotyp und andere myelodysplastische Veränderungen könnten durch Defekte der mitochondrialen DNA begünstigt werden.^{188, 189}. Um hier aber zu einer definitiven Aussage zu gelangen, müssen noch weitere funktionelle Studien durchgeführt werden.

Einen ersten Ansatz machen hier Bowen und Peddie¹⁹⁰. Sie verglichen den Sauerstoffverbrauch von peripheren Blutstammzellen von gesunden Probanden und Patienten mit MDS und konnten feststellen, dass der O₂-Verbrauch bei MDS-Patienten signifikant herabgesetzt war, was auf einen Defekt in der mitochondrialen Atmungskette hindeutete. Hellström-Lindberg *et. al.*^{191, 192} beobachteten, dass erythrozythäre Vorläuferzellen von RA- und RARS-Patienten eine deutlich erhöhte Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien zeigten. Cytochrom C ist ein Marker für mitochondrial vermittelte Apoptose, allerdings ist hier nicht klar erwiesen, ob der primäre Defekt in den Mitochondrien liegt. Die gleiche Arbeitsgruppe fand gemeinsam mit Cazzola *et. al.*¹⁹³ heraus, dass einige MDS-Patienten eine verringerte mitochondriale ATP-Produktion in mononukleären Knochenmarkzellen aufwiesen. Hier gab es allerdings keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten- und Kontroll-Gruppe. Kürzlich gelang es der Gruppe um Thompson¹⁹⁴ zu zeigen, dass MDS-Progenitor-Zellen sensibler auf die *in vitro* erhöhte Sauerstoffspannung reagieren. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass MDS durch eine Läsion ausgelöst wird, die Apoptose induzierend wirkt, wenn die Sauerstoffspannung höher ist, als in der hämatopoetischen Stammzellreihe. Aus unserer Sicht würde ein primärer Defekt der mitochondrialen Atmungskette hervorragend in dieses Modell passen.

Bei all den Hinweisen auf primär mitochondriale Schäden der Atmungskette muss aber auch bedacht werden, dass ein Großteil der Atmungskettenuntereinheiten und sonstigen mitochondrialen Proteine im nukleären Genom codiert werden und somit auch dort Veränderungen vorliegen können. Hier ist die Publikation von Craven *et. al.*¹⁹⁵ zu erwähnen. Man fand bei einer Mutante des Zebrabärblings einen MDS-ähnlichen Phänotyp, der durch eine Mutation des nukleären Gens Hspa9b verursacht wurde. Für dieses Gen gibt es bereits Hin-

weise, dass es an der Entstehung des MDS beteiligt ist^{196, 197}. Es kodiert für ein mitochondriales Matrix-Chaperon, das am Transport und Zusammenbau von Proteinen in der mitochondrialen Matrix beteiligt ist. Sein Fehlen reguliert apoptoseinhibierende Proteine herunter und produziert oxidativen Stress, der wiederum zum Zelltod führen kann.

Die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Mutationen der mtDNA bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie oder einer anderen myeloproliferativen Neoplasie können nicht widerlegen, aber auch nicht bestätigen, dass es sich bei den von Wulfert *et. al.*¹⁷⁰ gefundenen mitochondrialen Veränderungen um ein Charakteristikum des MDS handelt. Allerdings spricht die Vielzahl der bei den MPN gefundenen mitochondrialen Mutationen gegen eine generelle Bedeutung bei der Pathogenese des MDS und eher für eine klonale Expansion rein altersabhängig zufälliger Mutationen.

Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen mitochondrialen Defekten und der Entstehung von hämatopoetischen Neoplasien kann weiterhin nicht bewiesen werden, die entsprechende Hypothese kann nur deskriptiv unterstützt werden. Es müsste zukünftig versucht werden, durch neue Studien, möglicherweise auch durch Tiermodelle, stärkere Belege für eine tumorinduzierende Wirkung mitochondrialer Veränderungen zu gewinnen.

Sollte sich herausstellen, dass die meisten neoplasieassoziierten mtDNA-Mutationen in keinem kausalen Zusammenhang mit der Entwicklung einer hämatopoetischen Neoplasie stehen, sondern nur die altersabhängige Akkumulation von mtDNA-Mutationen in Stammzellen widerspiegeln, könnte der Nachweis von diesen Mutationen trotzdem interessant bleiben. Als klonale Marker kann ihnen eine durchaus nützliche Rolle beim Nachweis der minimalen Resterkrankung (MRD) zufallen. Da in jeder Zelle nicht nur eine Kopie sondern mehrere Hundert Kopien der mtDNA vorliegen, kann sich für die MRD-Diagnostik ein Sensitivitätsvorteil von ca. zwei Log-Stufen gegenüber dem Nachweis nukleärer Mutationen ergeben.

5 Zusammenfassung

1997 zeigten Gattermann *et. al.*¹⁶⁷ erstmalig, dass mitochondriale Mutationen auch im hämatopoetischen System auftreten und dort ebenfalls von Bedeutung sein können: Sie fanden Mutationen mitochondrialer tRNAs bei Patienten mit myelodysplastischem Syndrom und bei sideroblastischer Anämie. Diese Mutationen tragen möglicherweise dazu bei, dass die Knochenmarkzellen bei MDS zahlreiche Differenzierungs- und Funktionsstörungen (z. B. eine pathologische Eisenakkumulation in den Mitochondrien) aufweisen, sie könnten der Grund für die gesteigerte Apoptose-Aktivität und die ineffektive Hämatopoese sein und es wäre möglich, dass sie zu einer chromosomalen Instabilität der betroffenen Zellen führen. Dieses lässt vermuten, dass die mitochondriale Dysfunktion ein Baustein in der komplexen Pathophysiologie des MDS ist. Dazu untersuchte eine Arbeitsgruppe um Wulfert *et. al.* das Knochenmark von 104 MDS-Patienten auf klonale heteroplasmische Mutationen der mitochondrialen DNA¹⁷⁰.

Als Kontrollgruppe zur Untersuchung der 104 MDS-Proben wurde bei dieser Arbeit das Knochenmark von 37 Patienten mit einer myeloproliferativen Neoplasie (MPN: 24 Patienten mit CML, 9 mit PV und 4 mit OMF) auf die gleiche Art untersucht. Patienten mit MPN haben ein klonales Knochenmark, zeigen aber im Gegensatz zu MDS-Patienten pathophysiologisch keine Beteiligung der Mitochondrien. Als Kontrollgruppe wurden keine gesunden Probanden ausgewählt, da diese kein klonales Knochenmark aufweisen. Heteroplasmische Mutationen in einzelnen Zellen bleiben unter der Nachweisgrenze.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das gesamte mitochondriale Genom nach heteroplasmischen Mutationen durchsucht. Die mtDNA wurde durch Gesamt-DNA-Extraktion aus Knochenmarkzellen oder peripherem Blut gewonnen und mit insgesamt 67 spezifischen Primerpaaren mithilfe der PCR amplifiziert. Die gewonnenen PCR-Produkte wurden einer Heteroduplex-Analyse unterzogen. Diese wurde mit einer denaturierenden HPLC (*high performance liquid chromatography*) durchgeführt, die die Nukleinsäuren in Abhängigkeit von ihrer thermodynamischen Stabilität auftrennt (WAVE[®]-DNA-Fragment-Analyse, Transgenomic). Mit diesem System lassen sich aufgrund herabgesetzter Bindungsstärke einer Fehlbasenpaarung heteroplasmische Punktmutationen nachweisen. Anschließend wurden die heteroplasmischen PCR-Produkte sequenziert, um so den genauen Ort der Mutati-

on bestimmen zu können. Zuletzt wurden die Ergebnisse mit der Datenbank bekannter Polymorphismen und Mutationen abgeglichen²⁴.

Bei 56% der MDS-Patienten wurden heteroplasmische mtDNA-Mutationen, meistens Transitionen, gefunden. Bei den myeloproliferativen Erkrankungen waren es 44%. Die Häufigkeit der Mutationen nahm bei MDS mit dem Alter und der Erkrankungsschwere zu, bei den MPN-Patienten konnte keine Altersabhängigkeit nachgewiesen werden. Es konnten keine Hot Spots identifiziert werden. Die heteroplasmischen Mutationen waren größtenteils bisher nicht bekannte Polymorphismen, über die Hälfte betrafen konservierte Aminosäuren oder Nukleotide. Die Mutationshäufigkeit war in Protein-codierenden Genen (50 von 10^6 Basen-Paaren) geringer als in anderen mitochondrialen Genen (Transfer-RNA, rRNA, Kontrollregion; ca. 80 von 10^6 Basen-Paaren).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Mitochondrien häufig ultrastrukturelle Abnormitäten bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien aufweisen und die mitochondriale Dysfunktion zur Pathologie der Erkrankungen beitragen kann. Die funktionale Bedeutung dieser Veränderungen bleibt aber weiterhin unklar, da der Genotyp bei mitochondrialen Erkrankungen nur wenig mit dem Phenotyp korreliert. Das Konzept der altersabhängigen Akkumulation von mitochondrialen Mutationen in hämatopoetischen Stammzellen wird durch die klonale Vermehrung von mtDNA-Mutationen bei MDS unterstützt. Die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Mutationen der mtDNA bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie oder einer anderen myeloproliferativen Neoplasie können nicht widerlegen, aber auch nicht bestätigen, dass es sich bei den von Wulfert *et. al.*¹⁷⁰ gefundenen mitochondrialen Veränderungen um ein Charakteristikum des MDS handelt. Sie sprechen eher für eine klonale Expansion altersabhängiger Mutationen.

6 Literaturverzeichnis

¹ **Lill R, Diekert K, Kaut A, Lange H et al.** The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Biol Chem* (1999); 380: 1157-1166

² **Gattermann N** Mutationen der mitochondrialen DNA im hämatopoetischen System, Institut für wissenschaftliche Publikationen, Bonn (1999)

³ **Gray MW, Burger G, Lang BF** Mitochondrial evolution. *Science* (1999); 283: 1476-1481

⁴ **Wallace, DC** Why Do We Still Have a Maternally Inherited Mitochondrial DNA? Insights from Evolutionary Medicine. *Annu Rev Biochem* (2007); 76: 781-821

⁵ **Clayton DA** Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *Int Rev Cytol* (1992); 141: 217-232

⁶ **Clayton DA** Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* (1982); 28: 693-705

⁷ **Scarpulla RC** Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev* (2008), 88(2):611-638

⁸ **Ojala D, Montoya J, Attardi G** tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* (1981); 290: 470-474

⁹ **Christianson TW, Clayton DA** In vitro transcription of human mitochondrial DNA: accurate termination requires a region of DNA sequence that can function bidirectionally. *Proc Natl Acad Sci USA* (1986); 83: 6277-6281

¹⁰ **Anderson S, Banitier AT, Barren BG, De Bruijn MH et al.** Sequence and organisation of the human mitochondrial genome. *Nature* (1981); 290: 457-465

¹¹ **Attardi G.** Animal mitochondrial DNA: an extreme example of genetic economy. *Int Rev Cytol* (1985); 93: 93-145

- ¹² **Wallace DC, Zheng X, Lott MT, Shoffner JM et al.** Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERFF): Genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell* (1988); 55: 601-610
- ¹³ **Wallace DC** Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci USA* (1994); 91: 8739-8746
- ¹⁴ **Yakes FM, van Houten B.** Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* (1997); 94: 514-519
- ¹⁵ **Brown WM, George Jr. W., Wilson AC.** Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* (1979); 76: 1967-1971
- ¹⁶ **Miyata T, Hayashida H, Kikuno R, Hasegawa M et al.** Molecular clock of silent substitution: at least six-fold preponderance of silent changes in mitochondrial genes over those in nuclear genes. *J Mol Evol* (1982); 19: 28-35
- ¹⁷ **Wallace DC, Ye JH, Neckelmann SN, Singh G et al.** Sequence analysis of cDNAs for the human and bovine ATP synthase β subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations. *Curr Genet* (1987); 12: 81-90
- ¹⁸ **Nagley P, Zhang C, Martinus RD, Vaillant F et al.** Mitochondrial DNA mutation and human aging: molecular biology, bioenergetics, and redox therapy. *Mitochondrial DNA in Human Pathology*. Eds. S. DiMauro and D.C. Wallace. Raven Press, New York, (1993)
- ¹⁹ **Shoubridge EA, Karpatis G, Hastings KE.** Deletion mutants are functionally dominant over wild-type mitochondrial genomes in skeletal muscle fiber segments in mitochondrial disease. *Cell* (1990); 62: 43-49
- ²⁰ **Chomyn A, Martinuzzi A, Yoneda M, Daga OH et al.** MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992); 89: 4221-4225

- ²¹ **Taylor RW, Turnbull DM** Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* (2005), 6(5):389-402
- ²² **Macmillan C, Lach B, Shoubridge EA** Variable distribution of mutant mitochondrial DNAs (tRNA(Leu[3243])) in tissues of symptomatic relatives with MELAS: the role of mitotic segregation. *Neurology* (1993); 43: 1586-1590
- ²³ **Fontenay M, Cathelin S, Amiot M, Gyan E et al.** Mitochondria in hematopoiesis and hematological diseases. *Oncogene* (2006), 25, 4757–4767
- ²⁴ **MITOMAP:** A Human Mitochondrial Genome Database. <http://www.mitomap.org>, (2010)
- ²⁵ **Corral-Debrinski M, Stepien G, Shoffner JM, Lott MT et al.** Hypoxemia is associated with mitochondrial DNA damage and gene induction. *JAMA* (1991); 266: 1812-1816
- ²⁶ **Cortopassi GA, Arnheim, N.** Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic Acids Res* (1990); 18: 6927-6933
- ²⁷ **Reichmann H.** Mitochondriale Myopathie. *Dtsch Med Wochenschr* (1992); 117: 681
- ²⁸ **Attardi G, Yoneda M, Chomyn A** Complementation and segregation behavior of disease-causing mitochondrial DNA mutations in cellular model systems. *Biochim Biophys Acta* (1995); 1271: 241-248
- ²⁹ **Holehan AM, Merry BJ** The experimental manipulation of aging by diet. *Biol Rev Camb Philos Soc* (1986); 61: 329-368
- ³⁰ **Masoro EJ** Food restriction in rodents: an evaluation of its role in the study of aging. *J Gerontol* (1988); 43: B59-B64
- ³¹ **Weindruch R, Walford RL** The retardation of aging and disease by dietary restriction. Charles C. Thomas, Springfield, IL, USA (1988)
- ³² **Harman D.** The ageing process. *Proc Natl Acad Sci USA* (1981); 78: 7124-7128

- ³³ **Trounce I, Byrne E, Marzuki S.** Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in ageing. *Lancet* (1989); 1: 637-639
- ³⁴ **Wallace DC** Mitochondrial DNA in aging and disease. *Sci Am* (1997); 277: 40-47
- ³⁵ **Richter C, Park JW, Ames BN** Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA* (1988); 85: 645-646
- ³⁶ **Croteau DL, Stierum RH, Bohr VA** Mitochondrial DNA repair pathways. *Mutat Res* (1999); 434: 137-148
- ³⁷ **Miquel J.** An integrated theory of ageing as a result of mitochondrial DNA mutation in differentiated cells. *Arch Gerontol Geriatr* (1991); 12: 99-117
- ³⁸ **Turrens JF, Boveris A.** Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* (1980); 191: 421-427
- ³⁹ **Berger DP, Engelhardt R, Mertelsmann R** Das Rote Buch. Hämatologie und internistische Onkologie, 2. überarbeitete und erweiterte Auflage (2002), ecomed-Verlagsgesellschaft, Landsberg/Lech
- ⁴⁰ **Merchav, S; Wagemaker, G, Souza, LM, Tatarsky, I** Impaired response of myelodysplastic marrow progenitors to stimulation with recombinant haemopoietic growth factors. *Leukemia* (1991); 4: 340-346
- ⁴¹ **Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G et al.** Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* (1982), 51(2):189-199
- ⁴² **Haferlach T, Schoch C** WHO classification of acute myeloid leukaemia (AML) and the myelodysplastic syndrome (MDS). *Dtsch Med Wochenschr* (2002); 127: 447-450
- ⁴³ **Mufti, GJ** Chromosomal deletions in the myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* (1992); 16: 35-41

- ⁴⁴ **Tefferi A, Vardiman JW.** Mechanisms of disease: Myelodysplastic Syndromes *N Engl J Med* (2009), 361, 1872-1885
- ⁴⁵ **Haase D, Germing U, Schanz J, et al.** New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* (2007), 110, 4385-4395
- ⁴⁶ **Taylor RW, Barron MJ, Borthwick GM, Gospel A et. al.** Mitochondrial DNA mutations in human colonic crypt stem cells. *J Clin Invest* (2003); 112: 1351-1360
- ⁴⁷ **Shin MG, Kajigaya S, Tarnowka M, McCoy JP Jr et. al.** Mitochondrial DNA sequence heterogeneity in circulating normal human CD34 cells and granulocytes. *Blood* (2004); 103: 4466-4477
- ⁴⁸ **Gattermann, N** From sideroblastic anemia to the role of mitochondrial DNA mutations in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* (2000); 24:141-151
- ⁴⁹ **Kunz W, Gellerich FN, Schild L** Contribution to control of mitochondrial oxidative phosphorylation by supplement of reducing equivalents. *Biochem Med Metab Biol* (1994); 52: 65-75
- ⁵⁰ **Virchow, R** Weisses Blut, *Forieps neue Notizen* (1845); 36: 151-156
- ⁵¹ **Bennett, JH** Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppration of the blood, *Edinburgh Medical and Surgical Journal* (1845); 64: 413-423
- ⁵² **Wehmeier A, Löffel J** Einteilung der Leukämien: Epidemiologie und Prognose. *Innovartis* (3/2001); 5-11.
- ⁵³ **Nowell P, Hungerford D** A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* (1960); 132: 1497

- ⁵⁴ **Rowley JD** Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* (1973); 243: 290-293
- ⁵⁵ **Kronenwett R, Haas R.** Molekulare Diagnostik bei Leukämien – Grundlage für neue Behandlungskonzepte in der Hämatologie, *Innovartis* (3/2001), 23-30
- ⁵⁶ **Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D** Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* (1990); 247: 824–830
- ⁵⁷ **Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON** Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* (1990); 247: 1079–1082
- ⁵⁸ **Zimmermann J, Buchdunger E, Mett H, Meyer T et al.** (Phenylamino)pyrimidine (PAP) derivatives: a new class of potent and highly selective PDGF-receptor autophosphorylation inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* (1996); 6: 1221–1226
- ⁵⁹ **Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S et al.** Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* (1996); 2: 561–566
- ⁶⁰ **Kantarjian HM, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F et al. (International STI571 CML study group)** Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* (2002); 346: 645-652 *Erratum in: N Engl J Med* (2002); 346: 1923
- ⁶¹ **Herbst RS, Sandler AB** Overview of the current status of human epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer. *Clin Lung Cancer* (2004), 6 Suppl 1:S7-S19
- ⁶² **Fialkow PJ, Jacobson RJ, Papayannopoulou T** Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *Am J Med* (1977); 63: 125-130
- ⁶³ **Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD** The World Health Organisation (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* (2002); 100: 2292-2302

- ⁶⁴ **Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES et al.** WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4. Auflage, IARC Press, Lyon (2008)
- ⁶⁵ **Faderl S, Talpaz M, Kantarjian HM et al.** The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* (1999); 341: 164-172
- ⁶⁶ **Hochhaus A, Hehlmann R.** Chronische myeloische Leukämie (CML), Uni-Med Verlag, Bremen, (2001)
- ⁶⁷ **Lange T, Bumm T, Otto S, Niederwieser D et al.** Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction should not replace conventional cytogenetics for monitoring patients with chronic myeloid leukemia during early phase of imatinib therapy. *Haematologica* (2004); 89: 49-57
- ⁶⁸ **Kantarjian HM, Dixon D, Keating MJ, Freireich EJ et al.** Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer* (1988); 61: 1441-1446
- ⁶⁹ **Sokal JE, Baccarani M, Russo D, Tura S** Staging and prognosis in chronic myelogenous leukemia. *Semin Hematol* (1988); 25: 49-61
- ⁷⁰ **Griffin JD, Todd RF, Ritz J, Schlossmann SF et al.** Differentiation patterns in the blastic phase of chronic myeloid leukemia. *Blood* (1983); 61: 85-91
- ⁷¹ **Groffen J, Stephenson JR, Grosveld G. et al.** Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* (1984); 36: 93-99
- ⁷² **Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A et al.** Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* (1983); 306: 277-280
- ⁷³ **Melo JV** The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* (1996); 88: 2375-2384

- ⁷⁴ **van Etten RA, Jackson P, Baltimore D** The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell* (1989); 58: 669-678
- ⁷⁵ **Laneuville P** Abl tyrosine protein kinase. *Semin Immunol* (1995); 7: 255-266
- ⁷⁶ **Goldman JM, Melo JV** BCR-ABL in Chronic Myelogenous Leukemia – How Does It Work? *Acta Haematologica* (2008), 119, 212–217
- ⁷⁷ **Voncken JW, Kaartinen V, Groffen J, Heisterkamp N** Bcr/Abl associated leukemogenesis in bcr null mutant mice. *Oncogene* (1998); 16: 2029-2032
- ⁷⁸ **Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON** Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* (1990); 247: 1079-1082
- ⁷⁹ **Reiter A, Sohal J, Kulkarni S, Goldman JM et al.** Consistent fusion of ZNF198 to the fibroblast growth factor receptor-1 in the 1(8;13)(p11;q12) myeloproliferative syndrome. *Blood* (1998); 92: 1735-1742
- ⁸⁰ **Demiroglu A, Steer EJ, Heath C, Taylor K, et al.** The t(8;22) in chronic myeloid leukemia fuses BCR to FGFR1: transforming activity and specific inhibition of FGFR1 fusion proteins. *Blood* (2001); 98: 3778-3783
- ⁸¹ **Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, Goldman JM et. al.** Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature* (1987); 328: 342-344
- ⁸² **Puil L, Liu J, Gish G, Pawson T et al.** Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J* (1994); 13: 764-773
- ⁸³ **Bedi A, Zehnbaauer BA, Barber JP, Sharkis SJ et. al.** Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood* (1994); 83: 2038-2044

- ⁸⁴ **Lewis JM, Schwartz MA** Integrins regulate the association and phosphorylation of paxillin by c-Abl. *J Biol Chem.* (1998); 273: 14225-14230
- ⁸⁵ **Deininger MW, Goldman JM, Melo JV.** The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* (2000); 96: 3343-3356
- ⁸⁶ **Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD, Dai Z et al.** BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* (1993); 75: 175-185
- ⁸⁷ **Watzinger F, Gaiger A, Karlic H, Becher R et al.** Absence of N-ras mutations in myeloid and lymphoid blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Cancer Res* (1994); 54: 3934-3938
- ⁸⁸ **Sanchez-Garcia I, Martin-Zanca D.** Regulation of Bcl-2 gene expression by BCR-ABL is mediated by Ras. *J Mol Biol* (1997); 267: 225-228
- ⁸⁹ **Wilson-Rawls J, Xie S, Liu J, Laneuville P et. al.** P210 Bcr-Abl interacts with the interleukin 3 receptor beta(c) subunit and constitutively induces its tyrosine phosphorylation. *Cancer Res* (1996); 56: 3426-3430
- ⁹⁰ **Jonuleit T, Peschel C, Buchdunger E, Aulitzky WE et al.** Bcr-Abl kinase promotes cell cycle entry of primary myeloid CML cells in the absence of growth factors. *Br J Haematol* (1998); 100: 295-303
- ⁹¹ **Chai SK, Nichols GL, Rothman P** Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. *J Immunol* (1997); 159: 4720-4728
- ⁹² **de Groot RP, Raaijmakers JA, Lammers JW, Jove R et al.** STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells. *Blood* (1999); 94: 1108-1112
- ⁹³ **Skorski T, Kanakaraj P, Nieborowska-Skorska M, Calabretta B et al.** Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood* (1995); 86: 726-736

- ⁹⁴ **Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Calabretta B et al.** Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J.* (1997); 16: 6151-6161
- ⁹⁵ **Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC** PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* (1997); 88: 435-437
- ⁹⁶ **del Peso L, González-García M, Page C, Herrera R et al.** Interleukin-3-induced phosphorylation of bad through the protein kinase akt. *Science* (1997); 278: 687-689
- ⁹⁷ **Neshat MS, Raitano AB, Wang HG, Reed JC et al.** The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Bad-dependent and -independent pathways: roles for phosphatidylinositol 3-kinase and Raf. *Mol Cell Biol* (2000); 20: 1179-1186
- ⁹⁸ **Majewski M, Nieborowska-Skorska M, Salomoni P, Skorski T et al.** Activation of mitochondrial Raf-1 is involved in the antiapoptotic effects of Akt. *Cancer Res* (1999); 59: 2815-2819
- ⁹⁹ **Civin CI, Trischmann T, Kadan NS, Davis J et al.** Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis. *J Clin Oncol* (1996); 14: 2224-2233
- ¹⁰⁰ **Steidl U, Kronenwett R, Martin S, Haas R.** Molecular biology of hematopoietic stem cells. *Vitam Horm* (2003); 66: 1-28
- ¹⁰¹ **Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ et al.** Antigenic analysis of hematopoiesis III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* (1984); 133: 157-165
- ¹⁰² **Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM et. al.** Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992); 89: 2804-2808
- ¹⁰³ **Terstappen LW, Huang S.** Analysis of bone marrow stem cell. *Blood cells* (1994); 20: 45-61

- ¹⁰⁴ **Passegue E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL.** Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci USA* (2003);100 Suppl 1:11842-11849
- ¹⁰⁵ **Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Sawyers CL et al.** Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med.* (2004); 351: 657-667
- ¹⁰⁶ **Horowitz MM, Rowlings PA, Passweg JR.** Allogeneic bone marrow transplantation for CML: a report from the International Bone Marrow Transplant Registry. *Bone Marrow Transplant* (1996); 17 Suppl 3: S5-S6
- ¹⁰⁷ **van Rhee F, Szydlo RM, Hermans J, Devergie A et al.** Long-term results after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: a report from the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* (1997); 20: 553-560
- ¹⁰⁸ **Clift RA, Anasetti C.** Allografting for chronic myeloid leukemia. *Bailleres Clin Hematol.* (1997); 10: 319-336
- ¹⁰⁹ **Simonsson B, Oberg G, Bjoreman M, Bjorkholm M et al.** Intensive treatment and stem cell transplantation in chronic myelogenous leukemia: long-term follow-up. *Acta Haematol* (2005); 113: 155–162
- ¹¹⁰ **Robin M, Guardiola P, Devergie A, Yeshurun M et al.** A 10-year median follow-up study after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in chronic phase from HLA-identical sibling donors. *Leukemia* (2005); 19: 1613–1620
- ¹¹¹ **Socie G, Clift RA, Blaise D, Devergie A et al.** Busulfan plus cyclophosphamide compared with total-body irradiation plus cyclophosphamide before marrow transplantation for myeloid leukemia: long-term follow-up of 4 randomized studies. *Blood* (2001); 98: 3569–3574

¹¹² **Gratwohl A, Hermans J, Goldman JM, Arcese W et al.** Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Lancet* (1998); 352: 1087–1092

¹¹³ **Passweg JR, Walker I, Sobocinski KA, Klein JP et al.** Validation and extension of the EBMT Risk Score for patients with chronic myeloid leukaemia (CML) receiving allogeneic haematopoietic stem cell transplants. *Br J Haematol* (2004); 125: 613–620

¹¹⁴ **De Souza CA, Vigorito AC, Ruiz MA, Nucci M et al.** Validation of the EBMT risk score in chronic myeloid leukemia in Brazil and allogeneic transplant outcome. *Haematologica* (2005); 90: 232–237

¹¹⁵ **Slavin S, Aker M, Shapira MY, Or R et al.** Reduced-intensity conditioning for the treatment of malignant and life-threatening non-malignant disorders. *Clin Transpl* (2003); 275-282

¹¹⁶ **Lee MY, Chiou TJ, Yang MH, Chen PM et al.** Relatively favorable outcomes of post-transplant pulmonary function in patients with chronic myeloid leukemia receiving non-meloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol* (2005); 74: 152-157

¹¹⁷ **von Bubnoff N; Duyster, J** Chronische myeloische Leukämie: Therapie und Monitoring. *Dtsch Arztebl Int* (2010); 107(7): 114-121

¹¹⁸ **Talpaz M, Kantarjian HM, McCredie KB, Keating MJ et al.** Clinical Investigation of human alpha interferon in chronic myelogenous leukemia. *Blood* (1987); 69: 1280-1288

¹¹⁹ **Hehlmann R, Berger U, Hochhaus A et al. (German CML study group)** Randomized comparison of interferon alpha and hydroxyurea with hydroxyurea monotherapy in chronic myeloid leukemia (CML-study II): prolongation of survival by the combination of interferon alpha and hydroxyurea. *Leukemia* (2003); 17: 1529-1537

- ¹²⁰ **Muller MC, Gattermann N, Hehlmann R, Hochhaus A et al.** Dynamics of Bcr-abl mRNA Expression in first-line-therapy of chronic myelogenous leukemia patients with imatinib or interferon α /ara-C. *Leukemia* (2003); 17: 2392-2400
- ¹²¹ **Deininger MW, O'Brien SG, Ford JM, Druker BJ.** Practical management of patients with chronic myeloid leukemia receiving imatinib. *J Clin Oncol* (2003); 21: 1637–1647
- ¹²² **Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Lydon NB et al.** Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-abl positive cells. *Nat Med* (1996); 2: 561-566
- ¹²³ **Deininger M, Goldman JM Lydon NB, Melo JV.** The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL positive cells. *Blood* (1997); 90: 3691-3698
- ¹²⁴ **Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B et al.** Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* (2001); 344: 1031-1037
- ¹²⁵ **Baccarani M** Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia. Recommendations from an expert panel on behalf of the European Leukemia Net. *Blood* (2006), 108, 1809–1820
- ¹²⁶ **O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I et al.** Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* (2003); 348: 994–1004
- ¹²⁷ **Cortes J, Talpaz M, O'Brien SG et al.** Molecular responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase treated with imatinib mesylate. *Clin Cancer Res* (2005), 11, 3425-3432
- ¹²⁸ **Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Grigg A et al.** High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood* (2002); 99: 3472–3475

- ¹²⁹ **Kantarjian H, Talpaz M, O'Brien S, Jones D et al.** Survival benefit with imatinib mesylate therapy in patients with accelerated-phase chronic myelogenous leukemia—comparison with historic experience. *Cancer* (2005); 103: 2099–2108
- ¹³⁰ **Palandri F, Castagnetti F, Alimena G, Testoni N et al.** The long-term durability of cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia treated with imatinib 600 mg: the GIMEMA CML Working Party experience after a 7-year follow-up. *Haematologica* (2009); 94: 205–212
- ¹³¹ **Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes JE, Smith TL et al.** Treatment of Philadelphia chromosome-positive, accelerated-phase chronic myelogenous leukemia with imatinib mesylate. *Clin Cancer Res* (2002); 8: 2167–2176
- ¹³² **Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ et al.** Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* (2001); 344: 1038–1042
- ¹³³ **Kantarjian HM, Cortes J, O'Brien S, Giles FJ et al.** Imatinib mesylate (STI571) therapy for Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in blast phase. *Blood* (2002); 99: 3547–3553
- ¹³⁴ **Ottmann OG, Druker BJ, Sawyers CL, Goldman JM et al.** A phase 2 study of imatinib in patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoid leukemias. *Blood* (2002); 100: 1965–1971
- ¹³⁵ **Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Sawyers CL et al.** Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* (2002); 2: 117–125
- ¹³⁶ **Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Hughes TP et al.** High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood* (2002); 99: 3472–3475

- ¹³⁷ **Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, Hehlmann R et al.** Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* (2002); 16: 2190–2196
- ¹³⁸ **Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N et al.** Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* (2001); 293: 876–880
- ¹³⁹ **von Bubnoff N, Schneller F, Peschel C, Duyster J** BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study. *Lancet* (2002); 359: 487–491
- ¹⁴⁰ **Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, La Rosée P et al.** Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* (2002); 16: 2190–2196
- ¹⁴¹ **Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Grigg A et al.** High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood* (2002); 99: 3472–3475
- ¹⁴² **Roche-Lestienne C, Soenen-Cornu V, Gardel-Duflos N, Lai JL et al.** Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood* (2002); 100: 1014–1018
- ¹⁴³ **Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME et al.** Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* (2002); 2: 117–125
- ¹⁴⁴ **Markt S, Marin D, Foot N, Szydlo R et al.** Chronic myeloid leukemia in chronic phase responding to imatinib: the occurrence of additional cytogenetic abnormalities predicts disease progression. *Haematologica* (2003); 88: 260–267
- ¹⁴⁵ **Cortes JE, Talpaz M, Giles F, O'Brien S et al.** Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. *Blood* (2003); 101: 3794–3800

- ¹⁴⁶ **Kantarjian H, Pasquini R, Hamerschlag N, et al.** Dasatinib or high-dose imatinib for chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of first-line imatinib: a randomized phase 2 trial. *Blood* (2007), 109, 5143-5150
- ¹⁴⁷ **Hochhaus A, Kantarjian HM, Baccarani M, et al.** Dasatinib induces notable hematologic and cytogenetic responses in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of imatinib therapy. *Blood* (2007), 109, 2303-2309
- ¹⁴⁸ **Hochhaus A, La Rosée P** Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. *Leukemia* (2004); 18: 1321–1331
- ¹⁴⁹ **Hochhaus A, Baccarani M, Deininger M, Apperley JF et al.** Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia* (2008); 22: 1200–1206
- ¹⁵⁰ **Apperley JF, Cortes JE, Kim DW, Roy L et al.** Dasatinib in the treatment of chronic myeloid leukemia in accelerated phase after imatinib failure: the START a trial. *J Clin Oncol* (2009); 27: 3472–3479
- ¹⁵¹ **Cortes J, Kim DW, Raffoux E, Martinelli G et al.** Efficacy and safety of dasatinib in imatinib-resistant or -intolerant patients with chronic myeloid leukemia in blast phase. *Leukemia* (2008); 22: 2176–2183
- ¹⁵² **Kantarjian HM, Giles F, Gattermann N, Bhalla K et al.** Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood* (2007); 110: 3540–3546
- ¹⁵³ **Shah NP, Kantarjian HM, Kim DW, Réa D et al.** Intermittent target inhibition with dasatinib 100 mg once daily preserves efficacy and improves tolerability in imatinib-resistant and -intolerant chronic-phase chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol* (2008); 26: 3204–3212

- ¹⁵⁴ **le Coutre P, Ottmann OG, Giles F, Kim DW et al.** Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is active in patients with imatinib-resistant or -intolerant accelerated phase chronic myelogenous leukemia. *Blood* (2008); 111: 1834–1839
- ¹⁵⁵ **Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Donato N et al.** Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* (2006); 354: 2531–2541
- ¹⁵⁶ **Kantarjian H, Giles F, Wunderle L, Bhalla K et al.** Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N Engl J Med* (2006); 354: 2542–2551
- ¹⁵⁷ **Kantarjian H, Pasquini R, Levy V, Jootar S et al.** Dasatinib or high-dose imatinib for chronic-phase chronic myeloid leukemia resistant to imatinib at a dose of 400 to 600 milligrams daily: two-year follow-up of a randomized phase 2 study (START-R). *Cancer* (2009); 115(18): 4136–4147
- ¹⁵⁸ **Jabbour E, Cortes, JE, Kantarjian, HM** Molecular Monitoring in Chronic Myeloid Leukemia Response to Tyrosine Kinase Inhibitors and Prognostic Implications. *Cancer* (2008), 112, 2112-2118
- ¹⁵⁹ **Holyoake TL, Jiang X, Eaves C, Eaves A.** Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood* (1999); 94: 2056-2064
- ¹⁶⁰ **Graham SM, Jørgensen HG, Allan E, Pearson C et al.** Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* (2002); 99: 319-325
- ¹⁶¹ **Hasford J, Pfirrmann M, Hehlmann R, Allen NC et al.** A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. *J Natl Cancer Inst.* (1998); 90. 850-858
- ¹⁶² **Renz-Polster H, Braun J.** *Basislehrbuch Innere Medizin*, 2. korrigierte Auflage (2001) Urban & Fischer, München

- ¹⁶³ **Petrides, PE, Dietzfelbinger H, Beykirch M, Diebold J et. al.** Chronische myeloproliferative Erkrankungen (CMPE). Manual: Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome. Zuckschwerdt, München, (2003)
- ¹⁶⁴ **Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS et al.** A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* (2005); 352: 1779-1790
- ¹⁶⁵ **James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J et al.** A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* (2005); 434: 1144-1148
- ¹⁶⁶ **Tefferi A, Gilliland DG** Oncogenes in Myeloproliferative Disorders *Cell Cycle* (2007),6, 550-566
- ¹⁶⁷ **Gattermann N, Retzlaff S, Wang Y.L, Hofhaus G. et al.** Heteroplasmic point mutations of mitochondrial DNA affecting subunit I of cytochrome c oxidase in two patients with acquired idiopathic sideroblastic anemia. *Blood* (1997), 90: 4961-4972
- ¹⁶⁸ **Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL et al.** The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both “atypical” myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* (2005), 106, 1207-1209
- ¹⁶⁹ **Wulfert M, Tapprich C, Gattermann N.** Optimized PCR fragments for heteroduplex analysis of the whole human mitochondrial genome with denaturing HPLC. *J Chromatogr B* (2006); 831: 236-247
- ¹⁷⁰ **Wulfert M, Küpper AC, Tapprich C, Bottomley SS et al.** Analysis of mitochondrial DNA in 104 patients with myelodysplastic syndromes. *Exp Hematol* (2008), 36: 577-586
- ¹⁷¹ **Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowers RN et. al.** Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA *Nat Genet* (1999), 23: 147
- ¹⁷² **Helm M, Brulé H, Friede D, Giegé R et al.** Search for characteristic structural features of mammalian mitochondrial tRNAs. *RNA* (2000);6:1356-1379

- ¹⁷³ **Shin MG, Kajigaya S, Levin BC, Young NS.** Mitochondrial DNA mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* (2003);101: 3118-3125
- ¹⁷⁴ **Foury F, Hu J, Vanderstraeten S.** Mitochondrial DNA mutators. *Cell Mol Life Sci* (2004), 61: 2799-2811
- ¹⁷⁵ **Nekhaeva E, Bodyak ND, Kravtsov Y, McGrath SB et al.** Clonally expanded mtDNA point mutations are abundant in individual cells of human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2002), 99: 5521-5526
- ¹⁷⁶ **Taylor RW, Barron MJ, Borthwick GM, Gospel A et al.** Mitochondrial DNA mutations in human colonic crypt stem cells. *J Clin Invest* (2003); 112: 1351-1360
- ¹⁷⁷ **Shin MG, Kajigaya S, McCoy JP, Levin BC et. al.** Marked mitochondrial DNA sequence heterogeneity in single CD34 cell clones from normal adult bone marrow. *Blood* (2004); 103: 553-561
- ¹⁷⁸ **Shin MG, Kajigaya S, Tarnowka M, McCoy JP.** Mitochondrial DNA sequence heterogeneity in circulating normal CD34 cells and granulocytes. *Blood* (2004), 103: 4466-4477
- ¹⁷⁹ **He L, Luo L, Proctor SJ, Middleton PG et al.** Somatic mitochondrial DNA mutations in adult-onset leukaemia. *Leukemia* (2003), 17: 2487-2491
- ¹⁸⁰ **Löffler, M, Jöckel J, Schuster G, Becker C.** Dihydroorotat-ubiquinone oxidoreductase links mitochondria in the biosynthesis of pyrimidine nucleotides. *Mol Cell Biochem* (1997), 174: 125-129
- ¹⁸¹ **Gattermann N, Dadak M, Hofhaus G, Wulfert M et al.** Severe impairment of nucleotide synthesis through inhibition of mitochondrial respiration. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* (2004), 23: 1275-1279

- ¹⁸² **Kunz BA, Kohalmi SE, Kunkel TA, Mathews CK et al.** International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability. *Mutat Res* (1994), 318: 1-64
- ¹⁸³ **Gattermann N.** From sideroblastic anemia to the role of mitochondrial DNA mutations in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* (2000), 24:141-151
- ¹⁸⁴ **Reddy PL, Shetty VT, Dutt D, York A et al.** Increased incidence of mitochondrial cytochrome c-oxidase gene mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* (2002), 116: 564-575
- ¹⁸⁵ **Elson, JL, Samuels DC, Turnbull DM, Chinnery PF.** Random intracellular drift explains the clonal expansion of mitochondrial mutations with age. *Am J Hum Genet* (2001), 68: 802-806
- ¹⁸⁶ **Coller HA, Khrapko K, Bodyak ND, Nekhaeva E et al.** High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumors can be explained without selection. *Nat Genet* (2001), 28: 147-150
- ¹⁸⁷ **Hofhaus G, Gattermann N** Mitochondria harbouring mutant mtDNA - a cuckoo in the nest? *Biol Chem* (1999), 380:871-877
- ¹⁸⁸ **Rötig A, Colonna M, Bonnefont JP, Blanche S et al.** Mitochondrial DNA deletion in Pearson's marrow/pancreas syndrome. *Lancet* (1989), 333: 902-903
- ¹⁸⁹ **Rötig A, Cormier V, Koll F, Mize CE et al.** Site-specific deletions of the mitochondrial genome in the Pearson marrow-pancreas syndrome. *Genomics* (1991), 10: 502-504
- ¹⁹⁰ **Bowen D, Peddie C.** Mitochondrial oxygen consumption and ineffective haematopoiesis in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* (2002), 118: 345-346

- ¹⁹¹ **Tehranchi R, Fadeel B, Forsblom AM, Christensson B et al.** Granulocyte colony-stimulating factor inhibits spontaneous cytochrome c release and mitochondria-dependent apoptosis of myelodysplastic syndrome hematopoietic progenitors. *Blood* (2003), 101: 1080-1086
- ¹⁹² **Tehranchi R, Fadeel B, Schmidt-Mende J, Forsblom AM et al.** Antiapoptotic role of growth factors in the myelodysplastic syndromes: concordance between in vitro and in vivo observations. *Clin Cancer Res* (2005), 11: 6291-6299
- ¹⁹³ **Tehranchi R, Invernizzi R, Grandien A, Zhivotovsky B et al.** Aberrant mitochondrial iron distribution and maturation arrest characterize early erythroid precursors in low-risk myelodysplastic syndromes. *Blood* (2005), 106: 247-253
- ¹⁹⁴ **Thompson JE, Conlon JP, Yang X, Sanchez PV et al.** Enhanced growth of myelodysplastic colonies in hypoxic conditions. *Exp Hematol* (2007), 35: 21-31
- ¹⁹⁵ **Craven SE, French D, Weilan Y, Sauvage F et al.** Loss of Hspa9b in zebrafish recapitulates the ineffective hematopoiesis of the myelodysplastic syndrome. *Blood* (2005), 105: 3528-3534
- ¹⁹⁶ **Liu TX, Zhou Y, Kanki JP, Deng M et al.** Evolutionary conservation of zebrafish linkage group 14 with frequently deleted regions of human chromosome 5 in myeloid malignancies. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002), 99: 6136-6141
- ¹⁹⁷ **Horrigan SK, Arbieva ZH, Xie HY, Kravarusic J et al.** Delineation of a minimal interval and identification of 9 candidates for a tumor suppressor in malignant myeloid disorders on 5q31. *Blood* (2000), 95: 2372-2377

7 Anhang

7.1 PCR-amplifizierte mtDNA-Segmente für die Heteroduplex-Analyse

Tabelle 13 Primer und WAVE®-Bedingungen

Fragment ^a	Länge	Primerposition ^b	F-Primer ^c R-Primer	Nachweis	T _{WAVE} [®]
Kontrollregion (16103-191)					
KR 81a	298 bp	15.962 - 15.986 16.259 - 16.235	5' AAA AAG TCT TTA ACT CCA CCA TTA G 3' 5' GTG GCT TTG GAG TTG CAG TTG ATG T 3'	15.987 - 16.031 16.032 - 16.234	56 °C 59 °C
KR 82a	326 bp	16.180 - 16.204 16.505 - 16.481	5' AAA ACC CCC TCC CCA TGC TTA CAA G 3' 5' ACC AGA TGT CGG ATA CAG TTC ACT T 3'	16.205 - 16.355 16.356 - 16.465	60 °C 62 °C
KR 83a	307 bp	16.413 - 16.437 150 - 126	5' TGA AAT CAA TAT CCC GCA CAA GAG T 3' 5' GAT GAG GCA GGA ATC AAA GAC AGA T 3'	16.438 - 74	61 °C
KR 84a	135 bp	10 ~ 42 - 66 13 ~ 153 - 129	5' cCG Ggg Gcc C'TC CAT GCA TTT GGT ATT TTC GTC TG 3' 5' GcG Cgg cgg gcg g'TA GGA TGA GGC AGG AAT CAA AGA CA 3'	67 - 128	63 °C
KR 85a	296 bp	104 - 128 14 ~ 385 - 361	5' CCG GAG CAC CCT ATG TCG CAG TAT C 3' 5' ggc ccG ggg cCc GG'T TAG GCT GGT GTT AGG GTT CTT TGT 3'	129 - 294 295 - 360	58 °C 61 °C
KR 86a	481 bp	8 ~ 322 - 346 794 - 770	5' CCG Cgc Cc'G GCC ACA GCA CTT AAA CAC ATC TCT 3' 5' AGG CTA AGC GTT TTG AGC TGC ATT G 3'	347 - 769	58 °C
Mitochondriale ribosomale 12S- und 16S-rRNA (648-1601 und 1671-3228)					
mrR 91a	480 bp	741 - 765 1.220 - 1.196	5' ATC AAA AGG AAC AAG CAT CAA GCA C 3' 5' TAT CGA TTA CAG AAC AGG CTC CTC T 3'	971 - 1.195 766 - 970	58 °C 60 °C
mrR 92a	415 bp	1.162 - 1.186 1.576 - 1.552	5' ACT CAA AGG ACC TGG CGG TGC TTC A 3' 5' CAC TTA CCA TGT TAC GAC TTG TCT C 3'	1.187 - 1.465	60 °C
mrR 93a	123 bp	10 ~ 1.440 - 1.464 18 ~ 1.534 - 1.510	5' gGc ggg Ccg g'GA GTA GAG TGC TTA GTT GAA CAG GG 3' 5' CCg Ccg cgc ggg cGC Gcg 'GGG GTT TTA GTT AAA TGT CCT TTG A 3'	1.465 - 1.509	62 °C
mrR 94a	295 bp	1.439 - 1.463 1.733 - 1.709	5' AGA GTA GAG TGC TTA GTT GAA CAG G 3' 5' GGT AAA TGG TTT GGC TAA GGT TGT C 3'	1.505 - 1.708	59 °C
mrR 95a	463 bp	1.628 - 1.652 6 ~ 2.084 - 2.060	5' CAA CTT ACA CTT AGG AGA TTT CAA C 3' 5' cgg gcc 'TAC AAG GGG ATT TAG AGG GTT CTG T 3'	1.653 - 2.059	59 °C
mrR 96a	534 bp	1.998 - 2.022 2.531 - 2.507	5' TAC CGA GCC TGG TGA TAG CTG GTT G 3' 5' ATA CTG GTG ATG CTA GAG GTG ATG T 3'	2.023 - 2.320 2.321 - 2.506	56 °C 58 °C
mrR 97a	183 bp	10 ~ 2.480 - 2.504 10 ~ 2.642 - 2.618	5' Ggg gCc CGG C'AA ATC TTA CCC CGC CTG TTT ACC AA 3' 5' CeG ggC Ccc C'GT GGA GCC ATT CAT ACA GGT CCC TA 3'	2.505 - 2.617	59 °C
mrR 98a	378 bp	2.517 - 2.541 2.894 - 2.870	5' TAG CAT CAC CAG TAT TAG AGG CAC C 3' 5' ATT GAG TAT AGT AGT TCG CTT TGA C 3'	2.542 - 2.739 2.740 - 2.869	58 °C 61 °C
mrR 99a	627 bp	2.762 - 2.786 3.389 - 3.365	5' CTA ACA AAC CCA CAG GTC CTA AAC T 3' 5' AGA ATT TTT CGT TCG GTA AGC ATT A 3'	3.262 - 3.364 2.841 - 3.261	58 °C 61 °C

Fragment ^a	Länge	Primerposition ^b	F-Primer ^c R-Primer	Nachweis	T _{WAVE} [®]
NADH-Dehydrogenase-Untereinheit I (3306-4262)					
NAD 11a	265 bp	8 ~ 3.246 - 3.270 7 ~ 3.495 - 3.471	5' GGC cgg GC'C CGG TAA TCG CAT AAA ACT TAA AAC 3' 5' ccG cGG C'GG GTT TTA GGG GCT CTT TGG TGA AG 3'	3.271 - 3.400 3.401 - 3.470	58 °C 61 °C
NAD 12a	361 bp	3.397 - 3.421 3.757 - 3.733	5' ATA CAA CTA CGC AAA GGC CCC AAC G 3' 5' GTA GAA TGA TGG CTA GGG TGA CTT C 3'	3.422 - 3.732	61 °C
NAD 13a	322 bp	3.676 - 3.700 3.997 - 3.973	5' AAC TCA AAC TAC GCC CTG ATC GGC G 3' 5' TGT TTG TGT ATT CGG CTA TGA AGA A 3'	3.701 - 3.880	60 °C
NAD 14a	174 bp	15 ~ 3.856 - 3.880 15 ~ 3.999 - 3.976	5' cGg CCC gcG GCC gcg 'ATA TGA TTT ATC TCC ACA CTA GCA G 3' 5' GGc Ggc ggg cgg cgc 'AAT GTT TGT GTA TTC GGC TAT GAA 3'	3.881 - 3.974	62 °C
NAD 15a	371 bp	3.911 - 3.935 10 ~ 4.271 - 4.248	5' AAG GGG AGT CCG AAC TAG TCT CAG G 3' 5' cgc ccg CcG c'CA TAT TTC TTA GGT TTG AGG GGG A 3'	3.974 - 4.247	58 °C
NAD 16a	302 bp	4.214 - 4.238 4.515 - 4.491	5' GAT ATG TCT CCA TAC CCA TTA CAA T 3' 5' CTG CAA AGA TGG TAG AGT AGA TGA C 3'	4.240 - 4.325 4.326 - 4.490	56 °C 59 °C
NADH-Dehydrogenase-Untereinheit II (4469-5512)					
NAD 21a	165 bp	10 ~ 4.438 - 4.462 11 ~ 4.581 - 4.557	5' GGC CCg cgC C'CC GAA AAT GTT GGT TAT ACC CTT CC 3' 5' cgc gcc cGC cg'G CAT GTT TAT TTC TAG GCC TAC TCA 3'	4.463 - 4.556	60 °C
NAD 22a	241 bp	4.506 - 4.530 8 ~ 4.738 - 4.714	5' ATC TTT GCA GGC ACA CTC ATC ACA G 3' 5' gcc Gcg cG'G TAG TAT TGG TTA TGG TTC ATT GTC 3'	4.531 - 4.713	58 °C
NAD 23a	232 bp	4.660 - 4.684 8 ~ 4.883 - 4.859	5' CAA CCG CAT CCA TAA TCC TTC TAA T 3' 5' gcg GcG cc'G GGG GCT AGT TTT TGT CAT GTG AGA 3'	4.685 - 4.785 4.786 - 4.858	56 °C 60 °C
NAD 24a	266 bp	4.792 - 4.816 8 ~ 5.049 - 5.025	5' TAG CCC CCT TTC ACT TCT GAG TCC C 3' 5' Gcg CGG cg'G AAC TGC TAT TAT TCA TCC TAT GTG 3'	4.859 - 5.024	58 °C
NAD 25a	236 bp	4.981 - 5.005 5 ~ 5.211 - 5.188	5' ACC AAA CCC AGC TAC GCA AAA TCT T 3' 5' GcG Gc'G GGT GGA TGG AAT TAA GGG TGT TA 3'	5.006 - 5.110 5.111 - 5.187	57 °C 60 °C
NAD 26a	358 bp	10 ~ 5.154 - 5.177 12 ~ 5.489 - 5.465	5' CgC GgC CCc g'CT ACT ATC TCG CAC CTG AAA CAA G 3' 5' cgG cgc ggg cGG 'GGA GAT AGG TAG GAG TAG CGT GGT A 3'	5.300 - 5.380 5.179 - 5.464	58 °C 60 °C
NAD 27a	348 bp	5.448 - 5.468 5.795 - 5.771	5' CCC ACA CTC ATC GCC CTT ACC 3' 5' AAT TCG AAG AAG CAG CTT CAA ACC T 3'	5.469 - 5.590 5.591 - 5.770	58 °C 60 °C
NAD 28a	394 bp	5.702 - 5.726 6.095 - 6.071	5' AGC ACC CTA ATC AAC TGG CTT CAA T 3' 5' TAC AAA TGC ATG GGC TGT GAC GAT A 3'	5.730 - 6.070	59 °C
Cytochrom-C-Oxidase-Untereinheit I (5903-7444)					
Cox 72b	296 bp	5.973 - 5.997 6.268 - 6.244	5' GCA TGA GCT GGA GTC CTA GGC ACA G 3' 5' GCT CCG GCC TCC ACT ATA GCA GAT G 3'	6.048 - 6.243	60 °C
Cox 73b	213 bp	6.188 - 6.212 11 ~ 6.389 - 6.371	5' CCG CAT AAA CAA CAT AAG CTT CTG A 3' 5' GcG gcG cgg cc'G ATG GCC CCT AAG ATA GAG 3'	6.238 - 6.370	61 °C
Cox 74	313 bp	6.315 - 6.333 6.628 - 6.608	5' CAC CCT GGA GCC TCC GTA G 3' 5' TCA GGG TGA CCG AAA AAT CAG 3'	6.334 - 6.607 6.421 - 6.555	59 °C 61 °C

Fragment ^a	Länge	Primerposition ^b	F-Primer ^c R-Primer	Nachweis	T _{WAVE} [®]
Cox 75	360 bp	6.541 - 6.560 6.900 - 6.880	5' GCA ACC TCA ACA CCA CCT TC 3' 5' TCA TAT TGC TTC CGT GGA GTG 3'	6.591 - 6.879	59 °C
Cox 76	430 bp	6.851 - 6.868 7.280 - 7.260	5' CGG CGT CAA AGT ATT TAG 3' 5' GAA TGA GCC TAC AGA TGA TAG 3'	6.871 - 7.259	60 °C
Cox 77b	297 bp	7.240 - 7.264 7.536 - 7.512	5' CAT ACA CCA CAT GAA ACA TCC TAT C 3' 5' ATG GTT TTT CTA ATA CCT TTT TGA A 3'	7.265 - 7.325 7.326 - 7.510	56 °C 59 °C
Cytochrom-C-Oxidase-Untereinheit II (7585-8268)					
Cox 21	353 bp	7.470 - 7.490 7.822 - 7.804	5' CCA AAG CTG GTT TCA AGC CAA 3' 5' TGG GAG GGC GAT GAG GAC T 3'	7.491 - 7.580 7.581 - 7.770	56 °C 59 °C
Cox 22b	567 bp	7.586 - 7.610 8.152 - 8.128	5' ATG GCA CAT GCA GCG CAA GTA GGT C 3' 5' CGG TCG TGT AGC GGT GAA AGT GGT T 3'	7.611 - 8.120 7.791 - 8.040	58 °C 60 °C
Cox 23b	548 bp	7.743 - 7.767 8.290 - 8.266	5' CTA ACA TCT CAG ACG CTC AGG AAA T 3' 5' CTA GAG GGG GTA GAG GGG GTG CTA T 3'	7.793 - 8.222	60 °C
Cox 24b	481 bp	8.151 - 8.175 8 ~ 8.623 - 8.599	5' CGG GGG TAT ACT ACG GTC AAT GCT C 3' 5' ccc GGc GG'T GGG GAT CAA TAG AGG GGG AAA TAG 3'	8.176 - 8.560	58 °C
Cytochrom-C-Oxidase-Untereinheit III (9206-9988)					
Cox 30b	557 bp	8.472 - 8.496 9.028 - 9.004	5' CTC CCT CAC CAA AGC CCA TAA AAA T 3' 5' GGC CTG CAG TAA TGT TAG CGG TTA G 3'	8.561 - 8.765 8.766 - 9.003	57 °C 59 °C
Cox 31b	619 bp	8.966 - 8.990 9.584 - 9.560	5' TCA GCC TAC TCA TTC AAC CAA TAG C 3' 5' GGG ATT TAG CGG GGT GAT GCC TGT T 3'	8.991 - 9.516 9.271 - 9.420	58 °C 60 °C
Cox 32c	177 bp	15 ~ 9.480 - 9.504 12 ~ 9.629 - 9.605	5' cgg cCC gCg Geg Gcc 'TTT TTC TTC GCA GGA TTT TTC TGA G 3' 5' GGc Ggc cGg cgC 'TCC TGA TGC GAG TAA TAC GGA TGT G 3'	9.505 - 9.604	62 °C
Cox 33b	479 bp	9.510 - 9.534 9.988 - 9.964	5' TAC CAC TCC AGC CTA GCC CCT ACC C 3' 5' GAC CCT CAT CAA TAG ATG GAG ACA T 3'	9.601 - 9.963	59 °C
Cox 34	267 bp	9.930 - 9.950 10.196 - 10.179	5' TGG CAT TTT GTA GAT GTG GTT 3' 5' GGG GGA TAT AGG GTC GAA 3'	9.951 - 10.130	56 °C
NADH-Dehydrogenase-Untereinheit III (10058-10405)					
NAD 37a	342 bp	20 ~ 9.972 - 9.996 10.293 - 10.269	5' GgC cgc gcC cGc gcG cCg CC'A TCT ATT GAT GAG GGT CTT ACT CTT 3' 5' GGG CTC ATG GTA GGG GTA AAA GGA G 3'	9.997 - 10.268 10.141 - 10.240	56 °C 59 °C
NAD 38a	446 bp	10.149 - 10.173 10.594 - 10.570	5' ATA GAA AAA TCC ACC CCT TAC GAG T 3' 5' ATG AAC AGC GAT AGT ATT ATT CCT T 3'	10.211 - 10.569	56 °C
NADH-Dehydrogenase-Untereinheit IV (10469-12138)					
NAD 41a	265 bp	15 ~ 10.501 - 10.525 10 ~ 10.740 - 10.716	5' cgg gcg ccg cgC cgG 'CAT TTA CCA TCT CAC TTC TAG GAA T 3' 5' cgg cGG cgc g'GT ACG TAG TCT AGG CCA TAT GTG TT 3'	10.526 - 10.670 10.671 - 10.715	60 °C 62 °C
NAD 42a	349 bp	10.690 - 10.714 7 ~ 11.031 - 11.007	5' GCC TAG CCC TAC TAG TCT CAA TCT C 3' 5' gcg gcg c'CG TGA TAG TGG TTC ACT GGA TAA GT 3'	10.715 - 10.915 10.916 - 11.006	58 °C 60 °C
NAD 43a	341 bp	10.949 - 10.973 10 ~ 11.279 - 11.255	5' CCC CTC CTA ATA CTA ACT ACC TGA C 3' 5' gGg gcG ccc g'GT GAG CCT AGG GTG TTG TGA GTG TA 3'	10.974 - 11.140 11.141 - 11.254	58 °C 61 °C

Fragment ^a	Länge	Primerposition ^b	F-Primer ^c R-Primer	Nachweis	T _{WAVE} [®]
NAD 44a	544 bp	11.211 - 11.235 11.754 - 11.730	5' TCT ACA CCC TAG TAG GCT CCC TTC C 3' 5' GAG TTT GCT AGG CAG AAT AGT AAT G 3'	11.236 - 11.720	58 °C
NAD 45a	528 bp	11.685 - 11.709 12.212 - 12.188	5' TCA CCG GCG CAG TCA TTC TCA TAA T 3' 5' TTT CTC GGT AAA TAA GGG GTC GTA A 3'	12.151 - 12.187 11.710 - 12.150	57 °C 59 °C
NAD 46a	486 bp	12.149 - 12.173 12.634 - 12.610	5' TTA ACC AAA ACA TCA GAT TGT GAA T 3' 5' TGG ACC ATG TAA CGA ACA ATG CTA C 3'	12.175 - 12.575	58 °C
NADH-Dehydrogenase-Untereinheit V (12336-14147)					
NAD 51a	474 bp	12.534 - 12.558 13.007 - 12.983	5' ACA CTG AGC CAC AAC CCA AAC AAC C 3' 5' GAT TTG CCT GCT GCT GCT AGG AGG A 3'	12.559 - 12.760 12.761 - 12.982	58 °C 60 °C
NAD 52a	310 bp	10 ~ 12.928 - 12.952 13.227 - 13.203	5' CcC gcG gGg C'CC ACA ACA AAT AGC CCT TCT AAA CG 3' 5' GTC ATT TTG TGT AAG GGC GCA GAC T 3'	13.081 - 13.202 12.968 - 13.080	60 °C 62 °C
NAD 53a	533 bp	13.162 - 13.186 13.694 - 13.670	5' CTA ACA CTA TGC TTA GGC GCT ATC A 3' 5' GGG TTT AGT AGG GTG GGG TTA TTT T 3'	13.187 - 13.650	59 °C
NAD 54a	376 bp	13.613 - 13.637 13.988 - 13.967	5' TAA TTC TTC TCA CCC TAA CAG GTC A 3' 5' AGT AGG GGC AGG TTT TGG CTC G 3'	13.638 - 13.840 13.841 - 13.966	58 °C 60 °C
NADH-Dehydrogenase-Untereinheit VI (14148-14672)					
NAD 61a	437 bp	13.942 - 13.966 14.378 - 14.354	5' ACA ATC CCC TAT CTA GGC CTT CTT A 3' 5' AGG TAG GAT TGG TGC TGT GGG TGA A 3'	13.967 - 14.241	58 °C
NAD 62b	346 bp	14.148 - 14.172 14.493 - 14.469	5' ACC TAT TCC CCC GAG CAA TCT CAA T 3' 5' GGG GGA ATG ATG GTT GTC TTT GGA T 3'	14.242 - 14.468	60 °C
NAD 63a	163 bp	14.442 - 14.466 14.604 - 14.580	5' ACT CCT CAA TAG CCA TCG CTG TAG T 3' 5' TCT CCT ATT TAT GGG GGT TTA GTA T 3'	14.467 - 14.556	56 °C
NAD 64a	342 bp	14.516 - 14.540 14.857 - 14.833	5' AAA CCC ATA TAA CCT CCC CCA AAA T 3' 5' AAG GAG TGA GCC GAA GTT TCA TCA T 3'	14.557 - 14.786	58 °C
Cytochrom b (14746-15882)					
Cyb 01	172 bp	14.684 - 14.704 14.855 - 14.835	5' CGG ACT ACA ACC ACG ACC AAT 3' 5' GGA GTG AGC CGA AGT TTC ATC 3'	14.705 - 14.809	58 °C
Cyb 02	199 bp	14.789 - 14.809 14.987 - 14.969	5' AAC CAC TCA TTC ATC GAC CTC 3' 5' AGC GGA TGA TTC AGC CAT A 3'	14.935 - 14.968 14.810 - 14.934	61 °C 63 °C
Cyb 03	337 bp	14.891 - 14.911 15.227 - 15.207	5' CTA TTC CTA GCC ATG CAC TAC 3' 5' CTA GGT CTG TCC CAA TGT ATG 3'	15.011 - 15.170 14.912 - 15.010	60 °C 62 °C
Cyb 04	280 bp	15.086 - 15.106 15.365 - 15.347	5' AAC ATC GGC ATT ATC CTC CTG 3' 5' TGT TTG ATC CCG TTT CGT G 3'	15.107 - 15.346	60 °C
Cyb 05	294 bp	15.291 - 15.310 15.584 - 15.564	5' ACT TCA TCT TGC CCT TCA TT 3' 5' TTG TGT AGG CGA ATA GGA AAT 3'	15.316 - 15.560	60 °C
Cyb 06b	369 bp	15.503 - 15.527 15.871 - 15.847	5' CCA GAC AAT TAT ACC CTA GCC AAC C 3' 5' TTT GTT TTC AAT TAG GGA GAT AGT T 3'	15.631 - 15.780 15.528 - 15.630	58 °C 60 °C

Fragment ^a	Länge	Primerposition ^b	F-Primer ^c R-Primer	Nachweis	T _{WAVE} [®]
Cyb 07a	286 bp	15.754 - 15.778 16.039 - 16.015	5' CTG AAT CGG AGG ACA ACC AGT AAG C 3' 5' CTT CCC CAT GAA AGA ACA GAG AAT A 3'	15.779 - 15.990	57 °C

^aTR 88a und TR 89a ersetzen mrR 99a, Cox 57a bis Cox 36a ersetzen Cox 22b bis Cox 31b

^bX~ oder Y+: Anzahl zusätzlich zur Cambridge-Sequenz angefügter Nukleotide

^c Kleinbuchstaben zeigen angefügte Nukleotide an, Großbuchstaben geben die Cambridgesequenz wieder

7.2 Zusätzliche Fragmente als Ersatz für lange PCR-Produkte

Tabelle 14 Zusätzliche Fragmente als Ersatz für lange PCR-Produkte

Fragment ^a	Länge	Primerposition ^b	F-Primer ^c R-Primer	Nachweis	T _{WAVE} [®]
Mitochondriale ribosomale 12S- und 16S-rRNA (648-1601 und 1671-3228)					
TR 88a	323 bp	2.782 - 2.806 3.104 - 3.080	5' AAA CTA CCA AAC CTG CAT TAA AAA T 3' 5' AGA TAG AAA CCG ACC TGG ATT ACT C 3'	2.857 - 3.079	60 °C
TR 89a	364 bp	3.020 - 3.044 3.384 - 3.360	5' CCG CTA TTA AAG GTT CGT TTG TTC A 3' 5' TTT TCG TTC GGT AAG CAT TAG GAA T 3'	3.060 - 3.359	59 °C
Cytochrom-C-Oxidase-Untereinheit II (7585-8268)					
Cox 57a	327 bp	16 ~ 7.698 - 7.722 8.008 - 7.984	5' Cgg cgC gGC ggC Ccg G' TCC TGT ATG CCC TTT TCC TAA CAC T 3' 5' TCG ATT GTC AAC GTC AAG GAG TCG C 3'	7.723 - 7.983	60 °C
Cox 58a	325 bp	7.941 - 7.965 10 ~ 8.255 - 8.231	5' ACT CCT ACA TAC TTC CCC CAT TAT T 3' 5' gGG Gcg ggc g'CG GGC CCT ATT TCA AAG ATT TTT AG 3'	7.966 - 8.230	60 °C
tRNA Lysin (8295-8364)					
ATP 87a	243 bp	8.123 - 8.147 15 ~ 8.350 - 8.326	5' AAC CAA ACC ACT TTC ACC GCT ACA C 3' 5' ccC gCc Gcg ggG cGG' TGT TGG TTC TCT TAA TCT TTA ACT T 3'	8.148 - 8.325	60 °C
ATP 88a	266 bp	8.225 - 8.249 5 ~ 8.485 - 8.461	5' ATT CCC CTA AAA ATC TTT GAA ATA G 3' 5' gcG GG'C TTT GGT GAG GGA GGT AGG TGG TAG 3'	8.305 - 8.460	58 °C
ATP-Synthetase-Untereinheit 8+6 (8366-9207)					
ATP 65a	214 bp	15 ~ 8.434 - 8.458 8.632 - 8.608	5' cgC gCc gcg Ccc Cgc' CAC CCA ACT AAA AAT ATT AAA CAC A 3' 5' ATT TGG AGG TGG GGA TCA ATA GAG G 3'	8.459 - 8.607	59 °C
ATP 66a	269 bp	8.580 - 8.604 8.848 - 8.824	5' CGC CGC AGT ACT GAT CAT TCT ATT T 3' 5' AGG GGA TGG CCA TGG CTA GGT TTA T 3'	8.605 - 8.764	57 °C
ATP 67a	323 bp	8.714 - 8.738 9.036 - 9.012	5' CTA AAG GAC GAA CCT GAT CTC TTA T 3' 5' GAG TAG GTG GCC TGC AGT AAT GTT A 3'	8.765 - 9.011	60 °C
ATP 68a	288 bp	13 ~ 8.931 - 8.955 9.205 - 9.181	5' ggG GCg CgC Ccg C' ACC CCT TAT CCC CAT ACT AGT TAT T 3' 5' ATG TGT TGT CGT GCA GGT AGA GGC T 3'	9.068 - 9.180 8.956 - 9.067	59 °C 61 °C
ATP 69a	243 bp	20 ~ 9.100 - 9.124 9.322 - 9.298	5' GCc ggC Ccg Cgg CgC ccg cC' ATC TTC ACA ATT CTA ATT CTA CTG A 3' 5' GAG TGG AAG TGA AAT CAC ATG GCT A 3'	9.125 - 9.297	61 °C
Cytochrom-C-Oxidase-Untereinheit III (9206-9988)					
Cox 35a	237 bp	9.268 - 9.292 9.504 - 9.480	5' CCC TCT CAG CCC TCC TAA TGA CCT C 3' 5' CTC AGA AAA ATC CTG CGA AGA AAA A 3'	9.293 - 9.443	62 °C
Cox 36a	254 bp	9.376 - 9.400 9.629 - 9.605	5' GAT GGC GCG ATG TAA CAC GAG AAA G 3' 5' TCC TGA TGC GAG TAA TAC GGA TGT G 3'	9.401 - 9.511	60 °C

^aTR 88a und TR 89a ersetzen mrR 99a, Cox 57a bis Cox 36a ersetzen Cox 22b bis Cox 31b

^bX~ oder Y+: Anzahl zusätzlich zur Cambridge-Sequenz angefügter Nukleotide

^c Kleinbuchstaben zeigen angefügte Nukleotide an, Großbuchstaben geben die Cambridgesequenz wieder

7.3 Beispiel DNA-Sequenzierung und Konservierung

Tabelle 15 Beispiel DNA-Sequenzierung und Konservierung

ID	Protein sequences of mitochondrial NADH-dehydrogenase subunit 3
AT	MMLEFAPFIYLVISLVLVLLGVFPLFASNSSTYPEKLSAYECGDFDPFGDARSRFDIRFYLVSILFLIFDLEVTFFFP--WAVSLNKIDLFGFWSMMAFLFILTIGFLYEWKRGALDWE-
SC	-----
SP	-----
LT	----MLLTALSSAIALLVPIIILGAAWVLASRSTEDREKSSPFECGDFPKSTARIPFSTRFFLLAIIFIVPDIIVLMLPLPTILHTSDVFTTTSVL-FLMLLLIIGLIHEWKEGSLDWSS
CE	----MLVLLMVLVFTLVLLFAFYINFLLSIKDM-GKNKISAFECGFSVVGKIQNSFSIHFFIMMLMFVIFDLEIVMFLGLIVSDLSS-----YISFLMMFIFILGGFYMEWYKGLVWVI
DM	----MFSIIFIALLLILLITIVMFLASILSKKALIDREKSSPFECGDFPKSSSRLPFSRFFLITIIIFLIFDVEIAILPMTIIMKYSNIMIWTITSII-FILILLIGLYHEWNQGMNWSN
PD	----MN-LLVMIISTALPTIIMLLGFWLPLNLP-DNEKVSPEYECGDFPLGSRARLPFSLKFFLVAITFLFDLEIAILLPLPWAQYDTPPTAFIALL-ILILLTLGLIYEWLQGGLEWAE
BP	----MN-LLLTLLTNTLLALLVFIAFWLPQLNV-YAEKTSPEYECGDFPMGSRARLPFSMKFFLVAITFLFDLEIAILLPLPWAQYDTPPTAFIALL-ILILLTLGLIYEWLQGGLEWAE
CL	----MNLVISILAITIILSSILAVVSFWLPQMLNP-DAEKLSPEYECGDFPLGSRARLPFSIRFFLVAITFLFDLEIAILLPLPWAQYDTPPTAFIALL-ILILLTLGLIYEWLQGGLEWAE
PS	----MNTLMTTLLTTLTSLIIMMALNYTITNKNP-HHEKMSPEYECGDFPMGSRARLPFSIRFFLVAITFLFDLEIAILLPLPWAQYDTPPTAFIALL-ILILLTLGLIYEWLQGGLEWPN
XL	-----MTATILMIAMTLLSTILAILSFWLPQMTNP-DMEKLSPEYECGDFPLGSRARLPFSIRFFLVAITFLFDLEIAILLPLPWAQYDTPPTAFIALL-ILILLTLGLIYEWLQGGLEWAE
GG	----MNTLTFMLSLFSLLSALTTMNFVLAQMAP-DTEKLSPEYECGDFPLGSRARLPFSIRFFLVAITFLFDLEIAILLPLPWAQYDTPPTAFIALL-ILILLTLGLIYEWLQGGLEWAE
BT	----MN-LMLALLTNTFLATLLVIAFWLPQLNV-YSEKTSPEYECGDFPMGSRARLPFSMKFFLVAITFLFDLEIAILLPLPWAQYDTPPTAFIALL-ILILLTLGLIYEWLQGGLEWAE
EA	----MN-LMLTLLTNTLLASLLVLI AFWLPQLNI-YAEKTSPEYECGDFPMGSRARLPFSMKFFLVAITFLFDLEIAILLPLPWAQYDTPPTAFIALL-ILILLTLGLIYEWLQGGLEWAE
EC	----MN-LMLTLLTNTLLASLLVLI AFWLPQLNI-YAEKTSPEYECGDFPMGSRARLPFSMKFFLVAITFLFDLEIAILLPLPWAQYDTPPTAFIALL-ILILLTLGLIYEWLQGGLEWAE
OC	----MN-LMLVLLINTTISLVLVIAFWLPQLNI-YSEKSSPEYECGDFPMGSRARLPFSMKFFLVAITFLFDLEIAILLPLPWAQYDTPPTAFIALL-ILILLTLGLIYEWLQGGLEWAE
OA	----MN-LMTLTLTNTFLATLLVIAFWLPQLNV-YSEKTSPEYECGDFPMGSRARLPFSMKFFLVAITFLFDLEIAILLPLPWAQYDTPPTAFIALL-ILILLTLGLIYEWLQGGLEWAE
RN	----MN-LPIIITINITLSFILISIAFWLPQMLNP-YSEKANPEYECGDFPTSSARLPFSMKFFLVAITFLFDLEIAILLPLPWAQYDTPPTAFIALL-ILILLTLGLIYEWLQGGLEWAE
MM	----MN-LYTVIFINILLSLTLVIAFWLPQMLNP-YSE-ANPEYECGDFPTSSARLPFSMKFFLVAITFLFDLEIAILLPLPWAQYDTPPTAFIALL-ILILLTLGLIYEWLQGGLEWAE
CS	----MN-LMTLTLINTSLASVLI AFWLPQLNI-YTEKASPEYECGDFPMGSRARLPFSMKFFLVAITFLFDLEIAILLPLPWAQYDTPPTAFIALL-ILILLTLGLIYEWLQGGLEWAE
CF	----MN-VMLTMTNTVTLASLLVLI AFWLPQLNI-YTDKTSPEYECGDFPMGSRARLPFSMKFFLVAITFLFDLEIAILLPLPWAQYDTPPTAFIALL-ILILLTLGLIYEWLQGGLEWAE
GO	----MN-FALILMTNTLLALLMIITFWLPQLNS-YMEKTNPEYECGDFVSPARIPFSMKFFLVAITFLFDLEIAILLPLPWAQYDTPPTAFIALL-ILILLTLGLIYEWLQGGLEWAE
PT	----MN-FVLILMTNTLLALLMIITFWLPQLNS-YMEKSTPEYECGDFMSPARVFPFSMKFFLVAITFLFDLEIAILLPLPWAQYDTPPTAFIALL-ILILLTLGLIYEWLQGGLEWAE
HA	----MN-FALILMINTLLALLMIITFWLPQLNG-YMEKSTPEYECGDFMSPARVFPFSMKFFLVAITFLFDLEIAILLPLPWAQYDTPPTAFIALL-ILILLTLGLIYEWLQGGLEWAE
HC	----MN-FALILMINTLLALLMIITFWLPQLNG-YMEKSTPEYECGDFMSPARVFPFSMKFFLVAITFLFDLEIAILLPLPWAQYDTPPTAFIALL-ILILLTLGLIYEWLQGGLEWAE
P.399	----MN-FALILMINTLLALLMIITFWLPQLNS-YMEKSTPEYECGDFMSPARVFPFSMKFFLVAITFLFDLEIAILLPLPWAQYDTPPTAFIALL-ILILLTLGLIYEWLQGGLEWAE

ID	organism	english name	GenBank
AT	Arabidopsis thaliana	thale cress	Y08502
SC	Saccharomyces cerevisiae	baker's yeast	AJ011856
SP	Schizosaccharomyces pombe	fission yeast	X54421
LT	Lumbricus terrestris	common earthworm	U24570
CE	Caenorhabditis elegans	roundworm	X54252
DM	Drosophila melanogaster	fruit fly	U37541
PD	Protopterus dolloi	lungfish	L42813
BP	Balaenoptera physalus	finback whale	X61145
CL	Crossostoma lacustre	freshwater loach	M91245
PS	Pelomedusa subrufa	african side-necked turtle	AF039066
XL	Xenopus laevis	african clawed frog	M10217
GG	Gallus gallus	chicken	X52392
BT	Bos taurus	cow	J01394
EA	Equus asinus	donkey	X97337
EC	Equus caballus	horse	X79547
OC	Oryctolagus cuniculus	rabbit	AJ001588
OA	Ovis aries	sheep	AF010406
RN	Rattus norvegicus	norway rat	X14848
MM	Mus musculus	mouse	J01420
CS	Ceratotherium simum	white rhinoceros	Y07726
CF	Canis familiaris	dog	U96639
GO	Gorilla gorilla	gorilla	D38114
PT	Pan troglodytes	chimpanzee	D38113
HA	Homo sapiens (Afrikan)	human	D38112
HC	Homo sapiens (Cambridge)	human	J01415
P.399	Homo sapiens, Patient 399	human	-

7.4 GNU Free Documentation License

Version 1.3, 3 November 2008

Copyright © 2000, 2001, 2002, 2007, 2008 Free Software Foundation, Inc. <<http://fsf.org/>>

Everyone is permitted to copy and distribute verbatim copies of this license document, but changing it is not allowed.

0. PREAMBLE

The purpose of this License is to make a manual, textbook, or other functional and useful document "free" in the sense of freedom: to assure everyone the effective freedom to copy and redistribute it, with or without modifying it, either commercially or noncommercially. Secondly, this License preserves for the author and publisher a way to get credit for their work, while not being considered responsible for modifications made by others.

This License is a kind of "copyleft", which means that derivative works of the document must themselves be free in the same sense. It complements the GNU General Public License, which is a copyleft license designed for free software.

We have designed this License in order to use it for manuals for free software, because free software needs free documentation: a free program should come with manuals providing the same freedoms that the software does. But this License is not limited to software manuals; it can be used for any textual work, regardless of subject matter or whether it is published as a printed book. We recommend this License principally for works whose purpose is instruction or reference.

1. APPLICABILITY AND DEFINITIONS

This License applies to any manual or other work, in any medium, that contains a notice placed by the copyright holder saying it can be distributed under the terms of this License. Such a notice grants a world-wide, royalty-free license, unlimited in duration, to use that work under the conditions stated herein. The "Document", below, refers to any such manual or work. Any member of the public is a licensee, and is addressed as "you". You accept the license if you copy, modify or distribute the work in a way requiring permission under copyright law.

A "Modified Version" of the Document means any work containing the Document or a portion of it, either copied verbatim, or with modifications and/or translated into another language.

A "Secondary Section" is a named appendix or a front-matter section of the Document that deals exclusively with the relationship of the publishers or authors of the Document to the Document's overall subject (or to related matters) and contains nothing that could fall directly within that overall subject. (Thus, if the Document is in part a textbook of mathematics, a Secondary Section may not explain any mathematics.) The relationship could be a matter of historical connection with the subject or with related matters, or of legal, commercial, philosophical, ethical or political position regarding them.

The "Invariant Sections" are certain Secondary Sections whose titles are designated, as being those of Invariant Sections, in the notice that says that the Document is released under this License. If a section does not fit the above definition of Secondary then it is not allowed to be designated as Invariant. The Document may contain zero Invariant Sections. If the Document does not identify any Invariant Sections then there are none.

The "Cover Texts" are certain short passages of text that are listed, as Front-Cover Texts or Back-Cover Texts, in the notice that says that the Document is released under this License. A Front-Cover Text may be at most 5 words, and a Back-Cover Text may be at most 25 words.

A "Transparent" copy of the Document means a machine-readable copy, represented in a format whose specification is available to the general public, that is suitable for revising the document straightforwardly with generic text editors or (for images composed of pixels) generic paint programs or (for drawings) some widely available drawing editor, and that is suitable for input to text formatters or for automatic translation to a variety of formats suitable for input to text formatters. A copy made in an otherwise Transparent file format whose markup, or absence of markup, has been arranged to thwart or discourage subsequent modification by readers is not Transparent. An image format is not Transparent if used for any substantial amount of text. A copy that is not "Transparent" is called "Opaque".

Examples of suitable formats for Transparent copies include plain ASCII without markup, Texinfo input format, LaTeX input format, SGML or XML using a publicly available DTD, and standard-conforming simple HTML, PostScript or PDF designed for human modification. Examples of transparent image formats include PNG, XCF and JPG. Opaque formats include proprietary formats that can be read and edited only by proprietary word processors, SGML or XML for which the DTD and/or processing tools are not generally available, and the machine-generated HTML, PostScript or PDF produced by some word processors for output purposes only.

The "Title Page" means, for a printed book, the title page itself, plus such following pages as are needed to hold, legibly, the material this License requires to appear in the title page. For works in formats which do not have any title page as such, "Title Page" means the text near the most prominent appearance of the work's title, preceding the beginning of the body of the text.

The "publisher" means any person or entity that distributes copies of the Document to the public.

A section "Entitled XYZ" means a named subunit of the Document whose title either is precisely XYZ or contains XYZ in parentheses following text that translates XYZ in another language. (Here XYZ stands for a specific section name mentioned below, such as "Acknowledgements", "Dedications", "Endorsements", or "History".) To "Preserve the Title" of such a section when you modify the Document means that it remains a section "Entitled XYZ" according to this definition.

The Document may include Warranty Disclaimers next to the notice which states that this License applies to the Document. These Warranty Disclaimers are considered to be included by reference in this License, but only as regards disclaiming warranties: any other implication that these Warranty Disclaimers may have is void and has no effect on the meaning of this License.

2. VERBATIM COPYING

You may copy and distribute the Document in any medium, either commercially or noncommercially, provided that this License, the copyright notices, and the license notice saying this License applies to the Document are reproduced in all copies, and that you add no other conditions whatsoever to those of this License. You may not use technical measures to obstruct or control the reading or further copying of the copies you make or distribute. However, you may accept compensation in exchange for copies. If you distribute a large enough number of copies you must also follow the conditions in section 3.

You may also lend copies, under the same conditions stated above, and you may publicly display copies.

3. COPYING IN QUANTITY

If you publish printed copies (or copies in media that commonly have printed covers) of the Document, numbering more than 100, and the Document's license notice requires Cover Texts, you must enclose the copies in covers that carry, clearly and legibly, all these Cover Texts: Front-Cover Texts on the front cover, and Back-Cover Texts on the back cover. Both covers must also clearly and legibly identify you as the publisher of these copies. The front cover must present the full title with all words of the title equally prominent and visible. You may add other material on the covers in addition. Copying with changes limited to the covers, as long as they preserve the title of the Document and satisfy these conditions, can be treated as verbatim copying in other respects.

If the required texts for either cover are too voluminous to fit legibly, you should put the first ones listed (as many as fit reasonably) on the actual cover, and continue the rest onto adjacent pages.

If you publish or distribute Opaque copies of the Document numbering more than 100, you must either include a machine-readable Transparent copy along with each Opaque copy, or state in or with each Opaque copy a computer-network location from which the general network-using public has access to download using public-standard network protocols a complete Transparent copy of the Document, free of added material. If you use the latter option, you must take reasonably prudent steps, when you begin distribution of Opaque copies in quantity, to ensure that this Transparent copy will remain thus accessible at the stated location until at least one year after the last time you distribute an Opaque copy (directly or through your agents or retailers) of that edition to the public.

It is requested, but not required, that you contact the authors of the Document well before redistributing any large number of copies, to give them a chance to provide you with an updated version of the Document.

4. MODIFICATIONS

You may copy and distribute a Modified Version of the Document under the conditions of sections 2 and 3 above, provided that you release the Modified Version under precisely this License, with the Modified Version filling the role of the Document, thus licensing distribution and modification of the Modified Version to whoever possesses a copy of it. In addition, you must do these things in the Modified Version:

- A. Use in the Title Page (and on the covers, if any) a title distinct from that of the Document, and from those of previous versions (which should, if there were any, be listed in the History section of the Document). You may use the same title as a previous version if the original publisher of that version gives permission.
- B. List on the Title Page, as authors, one or more persons or entities responsible for authorship of the modifications in the Modified Version, together with at least five of the principal authors of the Document (all of its principal authors, if it has fewer than five), unless they release you from this requirement.
- C. State on the Title page the name of the publisher of the Modified Version, as the publisher.
- D. Preserve all the copyright notices of the Document.
- E. Add an appropriate copyright notice for your modifications adjacent to the other copyright notices.
- F. Include, immediately after the copyright notices, a license notice giving the public permission to use the Modified Version under the terms of this License, in the form shown in the Addendum below.
- G. Preserve in that license notice the full lists of Invariant Sections and required Cover Texts given in the Document's license notice.
- H. Include an unaltered copy of this License.
- I. Preserve the section Entitled "History", Preserve its Title, and add to it an item stating at least the title, year, new authors, and publisher of the Modified Version as given on the Title Page. If there is no section Entitled "History" in the Document, create one stating the title, year, authors, and publisher of the Document as given on its Title Page, then add an item describing the Modified Version as stated in the previous sentence.
- J. Preserve the network location, if any, given in the Document for public access to a Transparent copy of the Document, and likewise the network locations given in the Document for previous versions it was based on. These may be placed in the "History" section. You may omit a network location for a work that was published at least four years before the Document itself, or if the original publisher of the version it refers to gives permission.
- K. For any section Entitled "Acknowledgements" or "Dedications", Preserve the Title of the section, and preserve in the section all the substance and tone of each of the contributor acknowledgements and/or dedications given therein.
- L. Preserve all the Invariant Sections of the Document, unaltered in their text and in their titles. Section numbers or the equivalent are not considered part of the section titles.
- M. Delete any section Entitled "Endorsements". Such a section may not be included in the Modified Version.
- N. Do not retitle any existing section to be Entitled "Endorsements" or to conflict in title with any Invariant Section.
- O. Preserve any Warranty Disclaimers.

If the Modified Version includes new front-matter sections or appendices that qualify as Secondary Sections and contain no material copied from the Document, you may at your option designate some or all of these sections as invariant. To do this, add their titles to the list of Invariant Sections in the Modified Version's license notice. These titles must be distinct from any other section titles.

You may add a section Entitled "Endorsements", provided it contains nothing but endorsements of your Modified Version by various parties—for example, statements of peer review or that the text has been approved by an organization as the authoritative definition of a standard.

You may add a passage of up to five words as a Front-Cover Text, and a passage of up to 25 words as a Back-Cover Text, to the end of the list of Cover Texts in the Modified Version. Only one passage of Front-Cover Text and one of Back-Cover Text may be added by (or through arrangements made by) any one entity. If the Document already includes a cover text for the same cover, previously added by you or by arrangement made by the same entity you are acting on behalf of, you may not add another; but you may replace the old one, on explicit permission from the previous publisher that added the old one.

The author(s) and publisher(s) of the Document do not by this License give permission to use their names for publicity for or to assert or imply endorsement of any Modified Version.

5. COMBINING DOCUMENTS

You may combine the Document with other documents released under this License, under the terms defined in section 4 above for modified versions, provided that you include in the combination all of the Invariant Sections of all of the original documents, unmodified, and list them all as Invariant Sections of your combined work in its license notice, and that you preserve all their Warranty Disclaimers.

The combined work need only contain one copy of this License, and multiple identical Invariant Sections may be replaced with a single copy. If there are multiple Invariant Sections with the same name but different contents, make the title of each such section unique by adding at the end of it, in parentheses, the name of the original author or publisher of that section if known, or else a unique number. Make the same adjustment to the section titles in the list of Invariant Sections in the license notice of the combined work.

In the combination, you must combine any sections Entitled "History" in the various original documents, forming one section Entitled "History"; likewise combine any sections Entitled "Acknowledgements", and any sections Entitled "Dedications". You must delete all sections Entitled "Endorsements".

6. COLLECTIONS OF DOCUMENTS

You may make a collection consisting of the Document and other documents released under this License, and replace the individual copies of this License in the various documents with a single copy that is included in the collection, provided that you follow the rules of this License for verbatim copying of each of the documents in all other respects.

You may extract a single document from such a collection, and distribute it individually under this License, provided you insert a copy of this License into the extracted document, and follow this License in all other respects regarding verbatim copying of that document.

7. AGGREGATION WITH INDEPENDENT WORKS

A compilation of the Document or its derivatives with other separate and independent documents or works, in or on a volume of a storage or distribution medium, is called an "aggregate" if the copyright resulting from the compilation is not used to limit the legal rights of the compilation's users beyond what the individual works permit. When the Document is included in an aggregate, this License does not apply to the other works in the aggregate which are not themselves derivative works of the Document.

If the Cover Text requirement of section 3 is applicable to these copies of the Document, then if the Document is less than one half of the entire aggregate, the Document's Cover Texts may be placed on covers that bracket the Document within the aggregate, or the electronic equivalent of covers if the Document is in electronic form. Otherwise they must appear on printed covers that bracket the whole aggregate.

8. TRANSLATION

Translation is considered a kind of modification, so you may distribute translations of the Document under the terms of section 4. Replacing Invariant Sections with translations requires special permission from their copyright holders, but you may include translations of some or all Invariant Sections in addition to the original versions of these Invariant Sections. You may include a translation of this License, and all the license notices in the Document, and any Warranty Disclaimers, provided that you also include the original English version of this License and the original versions of those notices and disclaimers. In case of a disagreement between the translation and the original version of this License or a notice or disclaimer, the original version will prevail.

If a section in the Document is Entitled "Acknowledgements", "Dedications", or "History", the requirement (section 4) to Preserve its Title (section 1) will typically require changing the actual title.

9. TERMINATION

You may not copy, modify, sublicense, or distribute the Document except as expressly provided under this License. Any attempt otherwise to copy, modify, sublicense, or distribute it is void, and will automatically terminate your rights under this License.

However, if you cease all violation of this License, then your license from a particular copyright holder is reinstated (a) provisionally, unless and until the copyright holder explicitly and finally terminates your license, and (b) permanently, if the copyright holder fails to notify you of the violation by some reasonable means prior to 60 days after the cessation.

Moreover, your license from a particular copyright holder is reinstated permanently if the copyright holder notifies you of the violation by some reasonable means, this is the first time you have received notice of violation of this License (for any work) from that copyright holder, and you cure the violation prior to 30 days after your receipt of the notice.

Termination of your rights under this section does not terminate the licenses of parties who have received copies or rights from you under this License. If your rights have been terminated and not permanently reinstated, receipt of a copy of some or all of the same material does not give you any rights to use it.

10. FUTURE REVISIONS OF THIS LICENSE

The Free Software Foundation may publish new, revised versions of the GNU Free Documentation License from time to time. Such new versions will be similar in spirit to the present version, but may differ in detail to address new problems or concerns. See <http://www.gnu.org/copyleft/>.

Each version of the License is given a distinguishing version number. If the Document specifies that a particular numbered version of this License "or any later version" applies to it, you have the option of following the terms and conditions either of that specified version or of any later version that has been published (not as a draft) by the Free Software Foundation. If the Document does not specify a version number of this License, you may choose any version ever published (not as a draft) by the Free Software Foundation. If the Document specifies that a proxy can decide which future versions of this License can be used, that proxy's public statement of acceptance of a version permanently authorizes you to choose that version for the Document.

11. RELICENSING

"Massive Multiauthor Collaboration Site" (or "MMC Site") means any World Wide Web server that publishes copyrightable works and also provides prominent facilities for anybody to edit those works. A public wiki that anybody can edit is an example of such a server. A "Massive Multiauthor Collaboration" (or "MMC") contained in the site means any set of copyrightable works thus published on the MMC site.

"CC-BY-SA" means the Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 license published by Creative Commons Corporation, a not-for-profit corporation with a principal place of business in San Francisco, California, as well as future copyleft versions of that license published by that same organization.

"Incorporate" means to publish or republish a Document, in whole or in part, as part of another Document.

An MMC is "eligible for relicensing" if it is licensed under this License, and if all works that were first published under this License somewhere other than this MMC, and subsequently incorporated in whole or in part into the MMC, (1) had no cover texts or invariant sections, and (2) were thus incorporated prior to November 1, 2008.

The operator of an MMC Site may republish an MMC contained in the site under CC-BY-SA on the same site at any time before August 1, 2009, provided the MMC is eligible for relicensing.

8 Danksagung

Allen nachfolgend Genannten danke ich dafür, dass sie mich auf dem teilweise beschwerlichen, aber auch sehr interessanten Weg zu dieser Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Insbesondere gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Norbert Gattermann für die Vergabe des Themas, für das Bereitstellen der Ressourcen und die Mitarbeit in seinem Laborbereich. Hier richtet sich mein besonderer Dank an Dr. Michael Wulfert, der mir für sämtliche fachliche und organisatorische Fragen, die Arbeit im Labor, der Auswertung der Daten und der Erstellung der Dissertation stets hilfreich zur Seite stand.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Monika Pooten für Ihre Anleitung und Hilfe während der experimentellen Arbeit im Labor. Im weiteren Verlauf gab sie mir oft neuen Anstoß zum Weiterarbeiten und ist mittlerweile „eine richtig gute Freundin“ geworden.

Desweiteren gilt mein Dank den damaligen Mitarbeitern der KMT-Ambulanz, durch die ich bereits während meines Studiums einen guten Einblick in die praktische Tätigkeit in der Hämatologie bekommen konnte. Hier wurde mir jeden Tag die Relevanz der klinischen Forschung auf diesem Gebiet verdeutlicht.

Ein großer Dank geht natürlich auch an meine Eltern und Freunde, die mich immer wieder zum Weitermachen ermutigt haben und mir zahlreiche Hilfestellung auf technischer und inhaltlicher Seite gegeben haben.

Zuletzt danke ich dem Direktor der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie, Herrn Professor Dr. med. Rainer Haas, für seine bereitwillige Aufnahme in der Klinik und sein fortwährendes Interesse am Fortgang der Arbeit. Selbstverständlich gilt dieser Dank auch allen, die ich hier vergessen haben sollte.

9 Lebenslauf

■ Persönliche Daten

Name: Anna Christina Küpper
 Geburtsdatum: 7. September 1980
 Geburtsort: Gelsenkirchen
 Familienstand: ledig
 Konfession: römisch-katholisch
 Eltern: Marita Küpper, geb. Gotzhein
 Ulrich Arnold Küpper

■ Schulbildung

09/1986 – 06/1990 Grundsule an der Danziger Straße, Gelsenkirchen
 08/1990 – 06/1999 Bischöfliches Gymnasium Am Stoppenberg, Essen
 Abschluss: Abitur
 10/1999 – 03/2000 Staatlich anerkannte Lehranstalt für technische Assistenten in
 der Medizin, Bergmannsheil Bochum

■ Studium

04/2000 – 03/2005 Medizinstudium an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
 03/2002 Physikum
 03/2003 1. Staatsexamen
 03/2005 2. Staatsexamen
 04/2005 – 03/2006 Medizinstudium an der Ruhr-Universität, Bochum
 Praktisches Jahr im Evangelischen Krankenhaus Hattingen
 (Wahlfach: Anästhesie)
 05/2006 3. Staatsexamen und Approbation

■ Berufliche Tätigkeit

08/2006 – 07/2009 Assistenzärztin in der Klinik für Anästhesie, Intensivmedizin
 und Schmerztherapie II, CA Dr. med. U. Ringeler, Alfried
 Krupp Krankenhaus Steele, Essen
 04/2009 Zusatzbezeichnung Notfallmedizin
 seit 08/2009 Assistenzärztin in der Klinik für Anästhesie, Intensivmedizin
 und Schmerztherapie I, CA Prof. Dr. med. K. F. Waschke, Alf-
 ried Krupp Krankenhaus Rüttenscheid, Essen
 09/2011 Fachärztin für Anästhesiologie

■ Sonstige Tätigkeiten

08/1999 – 10/2002 Aushilftätigkeit im Pflegedienst, Martin-Luther-Krankenhaus,
 Wattenscheid

08/2002 – 10/2004	Studentische Hilfskraft im Ambulanten Therapiezentrum und der Knochenmarktransplantationsambulanz der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
05/2003 – 10/2004	Mitarbeit an einer Phase-III-Studie der Firma Novartis bezüglich des oralen Eisenchelators ICL 670
10/2004 – 06/2006	Studentische Hilfskraft im Grönemeyer Institut für MikroTherapie
05/2008 – heute	Tätigkeit als freiberufliche Notärztin im Ennepe-Ruhr-Kreis und beim Deutschen Roten Kreuz Dortmund

■ Veröffentlichungen, Vorträge, Poster

Wulfert M, Küpper AC, Tapprich C, Gattermann N Analysis of mitochondrial DNA in 104 patients with myelodysplastic syndromes, *Experimental Hematology* 2008

Braun M, Küpper AC, Grönemeyer DHW Treatment of osteoporotic vertebral compression fractures with image-guided percutaneous vertebroplasty, in Vorbereitung

Maratos YK, Gevargez-Zoubalan A, Küpper AC, Baier J, Grönemeyer DHW La radiofréquence pour le traitement des tumeurs vertébrales irrésécables associée à une vertébroplastie sous guidage radiologique, Vortrag, Poster und elektronisches Poster für den JFR 2005, Paris

Maratos YK, Gevargez-Zoubalan A, Küpper AC, Baier J, Grönemeyer DHW CT-guided Treatments for Chronic Cervicobrachialgia: Indications, Technique, Procedure Pitfalls and Long-term Results, Vortrag und elektronisches Poster für den RSNA 2005, Chicago