

Aus der Klinik für Kinder -Onkologie, -Hämatologie, und -Immunologie der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. U. Göbel

Projekt unter Leitung von Universitätsprofessor Dr. med. U. Göbel

Genetische Analyse zur Rolle des *CUTL1* Gens auf Chromosom 7 Bande q22 bei  
Patienten mit myeloischen Neoplasien und Monosomie 7

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Simone Hindersin

2006

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Ulrich Göbel

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Ulrich Germing

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	
1.1. Hypothese eines myeloischen Tumorsuppressorgens auf Chromosom 7	2
1.2. Prinzip zur positionellen Klonierung myeloischer Tumorsuppressorgene	3
1.3. Definition von kritischen Regionen auf Chromosom 7	4
1.4. Chromosom 7 Kandidaten Tumorsuppressorgene	5
1.5. Das <i>CUTL1</i> Gen auf Chromosom 7	6
1.6. Ziel dieser Dissertation	10
<b>2. Patienten und Methoden</b>	
2.1. Patienten	11
2.2. Methoden	13
2.2.1. DNA-Extraktion aus Patientenvollblut	13
2.2.2. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	14
2.2.3. Primerdesign mit Bioinformatik	14
2.2.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Auftrennung der PCR-Produkte	16
2.2.5. Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus	17
2.2.6. Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus zur <i>CUTL1</i> Mutationsanalyse	18
2.2.7. Silberfärbung der Gele	19
2.2.8. Klonierung	20

2.2.9. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (alkalische Lyse)	21
2.2.10. Automatisierte DNA-Sequenzanalyse der klonierten DNA-Fragmente	22
<b>3. Ergebnis</b>	
3.1. <i>CUTL1</i> Mutationsanalyse mittels Einzelstrang-Konformationsanalysen	24
3.2. Auffällige SSCP-Gele und Abklärung mittels Sequenzierung	25
<b>4. Diskussion</b>	
4.1. Klinische Bedeutung der Monosomie 7 im Kindesalter	29
4.2. Tumorsuppressorgene	30
4.3. Deletion des <i>CUTL1</i> Gens in Chromosom 7 Bande q22 in Leukämiezellen	33
4.4. Die Funktion des <i>CUTL1</i> Gens	34
4.5. „Loss of heterozygosity“ Mechanismus zur Aktivierung von Onkogenen	34
4.6. Das <i>CUTL1</i> Gen ist nicht bei Patienten mit Monosomie 7 mutiert	35
4.7. Fazit	36
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	38
<b>6. Zusammenfassung</b>	48
<b>7. Anhang</b>	49

**Abkürzungen**

aa	Aminosäure
Acc. No.	Genbank Nummer
AML	akute myeloische Leukämie
bp	Basenpaare
CDS	häufig deletiertes DNA Segment
CUTL1	Cut-like1 Gen
CDP	Genprodukt von CUTL1
CR	Cut repeat
Cux1	murines Homolog von CDP
DNA	Desoxyribonukleinsäure
del	Deletion
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung
HD	Homeobox-Domäne
JAK2	Janus Kinase 2
JMML	juvenile myelomonozytäre Leukämie
LOH	Loss of heterozygosity
MDS	myelodysplastisches Syndrom
RB	Retinoblastom-Gen
RT	Raumtemperatur
SSCP	Single-strand-conformation-polymorphism
t(x;y)	Translokation
TGF $\beta$	Transformation growth factor $\beta$
TSG	Tumorsuppressorgen
WT	Wildtyp

## **1. Einleitung**

Der komplette somatische Verlust des Chromosom 7 oder die partielle Deletion innerhalb des langen Arms von Chromosom 7, Monosomie 7 oder Deletion 7q, sind häufige chromosomale Veränderungen bei malignen myeloischen Erkrankungen (Luna-Fineman et al., 1995; Le Beau et al., 1986; Le Beau et al., 1996). Diese somatischen Aberrationen werden bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML), myelodysplastischem Syndrom (MDS) oder juveniler myelomonozytärer Leukämie (JMML) gefunden. Unter den Patienten mit MDS tritt die Monosomie 7 besonders häufig bei Patienten mit sekundärem MDS auf (Le Beau et al., 1986; Luna-Fineman et al., 1995; Pedersen-Bjergaard et al., 1994; Thirman et al., 1996). Das sekundäre MDS ist definiert als MDS nach erfolgter Chemo- oder Strahlentherapie, MDS nach schwerer aplastischer Anämie, MDS bei Patienten mit angeborener Erkrankung mit Knochenmarkversagen sowie als MDS mit familiärer Prädisposition bzw. mehreren MDS-Fällen innerhalb einer Familie (Hasle et al., 1999). Trotz jahrelanger intensiver Forschung in verschiedenen Laboratorien ist bis heute unklar, warum diese zytogenetische Veränderung in myeloischen Neoplasien auftritt und wie sie zur Leukämieentstehung beiträgt. Aufgrund der häufig schlechten Prognose von Patienten mit myeloischen Neoplasien ist die Erforschung dieser Fragen von hoher wissenschaftlicher Bedeutung.

### **1.1. Hypothese eines myeloischen Tumorsuppressorgens auf Chromosom 7**

Der Verlust von genetischem Material ist ein gut beschriebener Mechanismus zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (TSG) (Weinberg et al., 1991). Es wird daher vermutet, daß sich auf Chromosom 7 ein oder mehrere TSG befinden, deren Verlust zur Transformation myeloischer Zellen beiträgt (Le Beau et al., 1996).

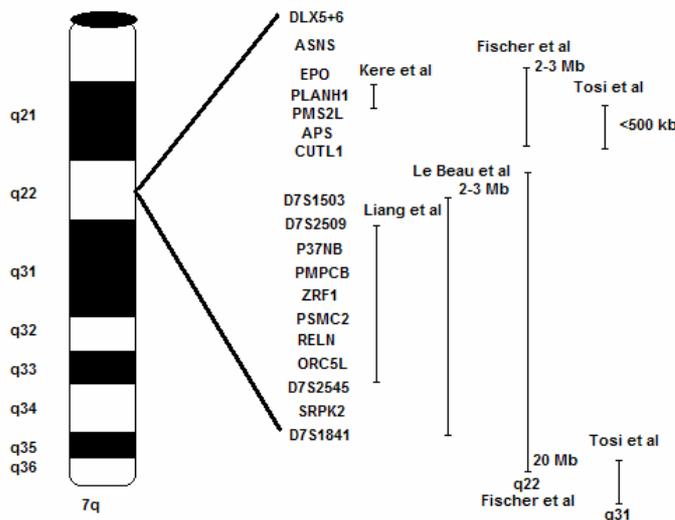
Bei klassischen TSG kommt es zu zwei inaktivierenden Ereignissen, d.h. es werden beide Allele bei der Transformation inaktiviert (Weinberg et al., 1991; Knudson et al., 1993; Levine et al., 1993). Unter der Annahme, daß Chromosom 7 ein klassisches TSG trägt, ist in dem zweiten, nicht deletierten Allel ein inaktivierendes zweites Ereignis zu erwarten.

## **1.2. Prinzip zur positionellen Klonierung myeloischer Tumorsuppressorgene**

Eine Methode zur positionellen Klonierung eines myeloischen Chromosom 7 TSG beinhaltet drei Schritte: 1) Definition einer kritischen Region, in der das TSG vermutet wird; 2) Identifizierung aller Gene innerhalb dieser Region; 3) Suche nach Mutationen im nicht deletierten Allel in Leukämieproben von Patienten mit Monosomie 7. Genomische DNA Abschnitte, die in den meisten Deletionen enthalten sind, werden als häufig deletierte Segmente (CDS) bezeichnet. Diese CDS sind kritische Regionen, da diese Regionen vermutlich für die Transformation relevante Gene tragen.

### **1.3. Definition von kritischen Regionen auf Chromosom 7**

Verschiedene Arbeitsgruppen haben die Hypothese aufgestellt, daß ein oder mehrere myeloische TSG insbesondere in solchen Regionen innerhalb von Chromosom 7 liegen, die nicht nur bei Patienten mit kompletter Monosomie 7 sondern auch bei Patienten mit partieller Deletion 7q deletiert sind (Le Beau et al., 1996; Kratz et al., 2002; Emerling et al., 2002; Curtiss et al., 2005). Ein häufig deletiertes Segment innerhalb Chromosom 7 Bande q22 wurde durch die detaillierte zytogenetische Analyse von 81 Patienten mit malignen myeloischen Erkrankungen und einer Deletion 7q definiert (Le Beau et al., 1996). Knochenmarkzellen von 15 dieser Patienten wurden mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) analysiert, um das kleinste deletierte Segment zu definieren. Diese Studie identifizierte eine 2-3 Mb umfassende Region innerhalb der Bande 7q22 (Le Beau et al., 1996) (siehe Abb.1). Auch andere Studien wurden durchgeführt, um ein häufig deletiertes Segment zu charakterisieren (Le Beau et al., 1996; Fischer et al., 1997; Kere et al., 1987; Kere et al., 1989; Liang et al., 1998; Tosi et al., 1999). In diesen Studien wurden teilweise überlappende häufig deletierte Segmente unterschiedlicher Größe beschrieben. Bemerkenswerterweise liegen die meisten dieser deletierten Segmente innerhalb der Bande 7q22 (Le Beau et al., 1996; Fischer et al., 1997; Kere et al., 1987; Kere et al., 1989; Liang et al., 1998; Tosi et al., 1999;) (Abb.1).



**Abb.1: Schematische Darstellung des langen Arms von Chromosom 7**  
 Illustration der durch molekulare und zytogenetische Analysen identifizierten kritischen Regionen im langen Arm von Chromosom 7, Bande q22. Links: Diagramm des humanen Chromosoms 7q mit Banden q21-q36. Rechts: Vergrösserte Illustration der Bande 7q22 mit verschiedenen genomischen Markern, Genen und kritischen Regionen. Die kritischen Regionen wurden durch die verschiedenen Arbeitsgruppen definiert, um für myeloische Erkrankungen wichtige Tumorsuppressorgene zu lokalisieren. Generelle Übereinstimmung besteht darin, dass 7q22 von den meisten Deletionen betroffen ist.

### 1.4. Chromosom 7 Kandidaten Tumorsuppressorgene

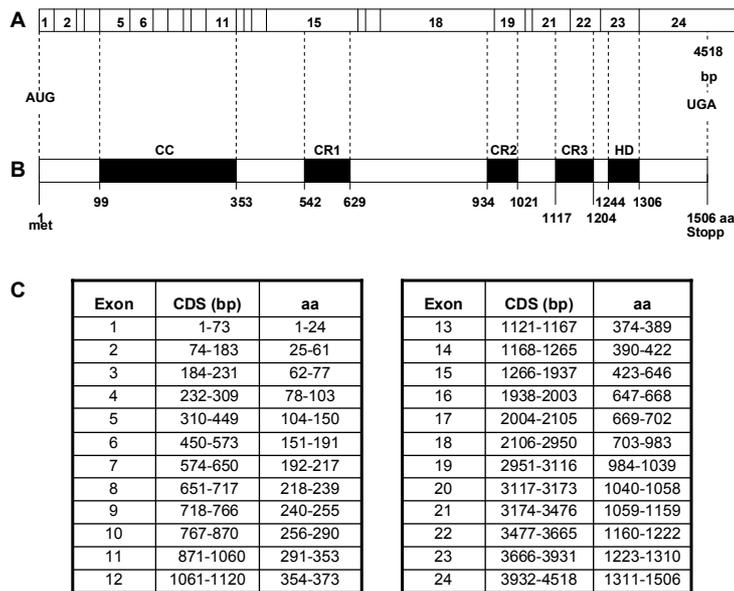
Mehrere Kandidatengene wurden innerhalb kritischer Regionen in Bande 7q22 identifiziert (Kratz et al., 2001; Kratz et al., 2000; Emerling et al., 2002; Curtiss et al., 2005). In keinem der bisher getesteten Gene (Tabelle 1) wurden bis heute Mutationen identifiziert (Kratz et al., 2000; Kratz et al., 2001; Emerling et al., 2002; Curtiss et al., 2005).

**Tabelle 1:** Gene in Chromosom 7, Bande q22, die in früheren Studien mittels Mutationsanalysen bei Patienten mit Monosomie 7 getestet wurden

Gen	Funktion
<i>FBXL13</i>	kodiert ein F-box Protein mit Leucin-reichen Abschnitten
<i>LRRC17</i>	kodiert Protein mit Leucinreichen Abschnitten
<i>SVH</i>	verwandt mit ALEX1-3 (Armadillo-like-proteins lost in epithelial cancer on chr X), kodiert Phosphorilase D
<i>NAPE-PLD</i>	mutmaßliche Zink-abhängige Hydrolase
<i>S100A14</i>	kodiert S100 Calcium bindendes Protein A14
<i>PMPCB</i>	mitochondriale Peptidase
<i>ZRF1</i>	antagonisiert Aktivität von Inhibitoren der Differenzierung (Id)
<i>PSMC2</i>	Komponente von 26s proteosomaler ATPase und HIV- Koaktivator
<i>RELN</i>	Maus-Homolog, involviert in neuronale Migration und zerebelläre Entwicklung
<i>ORC5L</i>	Homolog von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Komponente des Ursprungs des Replikationskomplexes)
<i>MLL5</i>	Trithorax Gruppen (trx-G) Protein
<i>SRPK2</i>	Homolog einer Arginin/Serin-reichen splicing factor kinase
<i>PIK3CG</i>	katalytische Untereinheit p110 gamma von Phosphoinositid 3-OH-Kinase Gamma

### 1.5. Das *CUTL1* Gen auf Chromosom 7

In den von Fischer (Fischer et al., 1997) und Tosi (Tosi et al., 1999) unabhängig voneinander definierten häufig deletierten Segmenten innerhalb Chromosom 7 Bande q22 liegt das Gen *CUTL1*. Das Genprodukt von *CUTL1*, auch bekannt als CDP (CCAAT displacement Protein), Cut oder Cux-1 gehört zu einer Gruppe von Homeobox Transkriptionsfaktoren, welche an der Regulation von Wachstum und Differenzierung von Zellen beteiligt sind (Nepveu et al., 2001). Das Protein ist evolutionär konserviert und die am besten charakterisierte Isoform beinhaltet vier DNA Bindungsdomänen, drei so genannte Cut repeats (CR1-3) und eine Homeobox-Domäne (HD) (Harada et al., 1995) (Abb.2).



**Abb.2: CUTL1- mRNA und das Genprodukt CDP**

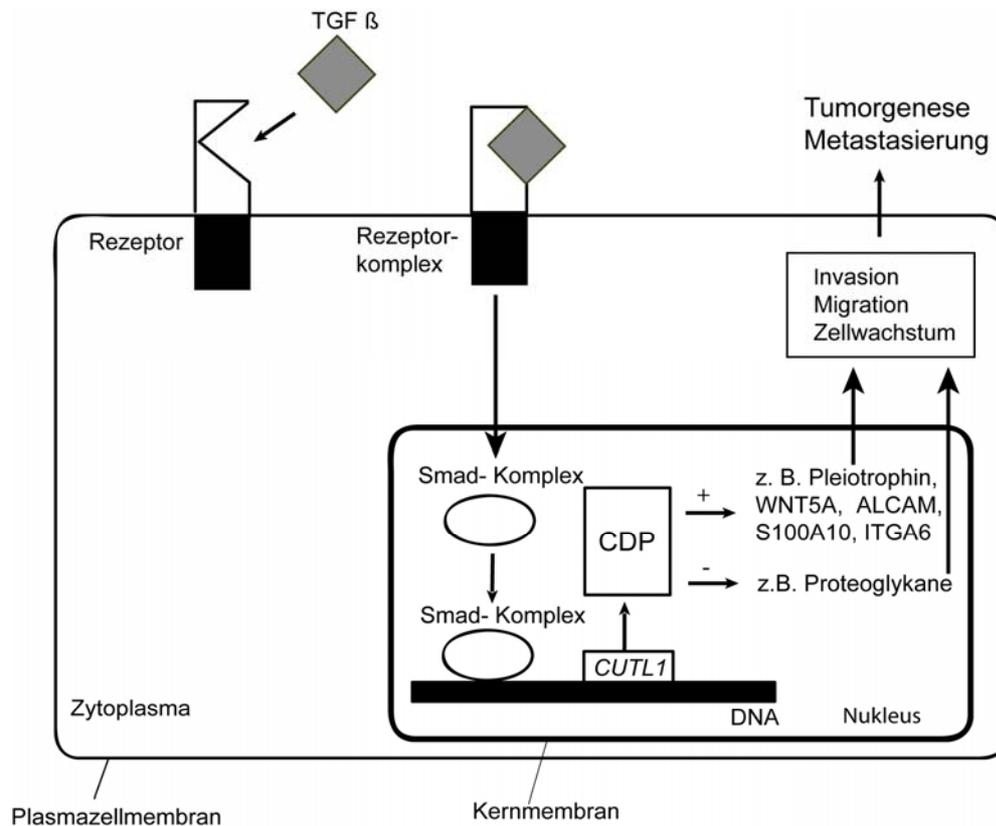
In Abschnitt **A** ist die mRNA von *CUTL1* dargestellt (Isoform a, Genbank Acc. No. NM\_181552); Innerhalb der kodierenden Sequenz sind die Grenzen der 24 Exone eingetragen. Abschnitt **B** zeigt das Genprodukt CDP (Cut displacement protein). Die schwarzen Kästen repräsentieren die evolutionär konservierten Regionen: eine coiled-coil Domäne (CC: aa 99-353) und vier DNA-Bindungsdomänen, davon drei so genannte Cut repeats (CR1: aa 542-629, CR2: aa 934-1021, CR3: aa 1117-1204) und eine Homeobox-Domäne (HD: aa 1244-1306). Die Domänen wurden mit Hilfe der Internetseite <http://harvester.embl.de> identifiziert. In Abschnitt **C** findet sich eine Tabelle, in der die Exongrenzen (bp) und die jeweilige Aminosäure (aa)- Position von CDP eingetragen sind.

CDP ist sowohl ein aktivierender als auch ein inaktivierender Transkriptionsfaktor. Und ist in dieser Funktion an der Proliferation und an der Zellzyklusprogression beteiligt (Van Wijnen et al., 1996; Coqueret et al., 1998; Truscott et al., 2003). Knock-out Studien mit dem murinen Homolog Cux1, zeigten Wachstumsretardierung, gestörte Differenzierung von Lungenepithel, Haarfollikeldefekte, reduzierte männliche Fertilität und eine gestörte Funktion von B- und T-Zellen (Ellis et al., 2001; Luong et al., 2002; Sinclair et al., 2001). Interessanterweise entwickeln Cux1 defiziente Mäuse eine myeloische Hyperplasie (Sinclair et al., 2001). Transgene Cux1 Mäuse zeigen Organomegalie und Multiorganhyperplasie (Ledford et al., 2002). Verschiedene

Kinasen phosphorylieren CDP und modulieren hierdurch dessen DNA-Bindungsaffinität. Zu diesen Kinasen gehören die Zyklin-abhängige Kinase (CDK-Kinase) und die Proteinkinase C (PKC). Beide hemmen die DNA-Bindungsaktivität von CDP (Coqueret et al., 1996; Santaguida et al., 2001).

Loss of heterozygosity (LOH) Untersuchungen an einer Untergruppe von uterinen Leiomyomen und Brustkrebsproben identifizierten *CUTL1* als mögliches TSG (Ishwad et al., 1997; Zeng et al., 1997; Zeng et al., 1999). Jedoch zeigt eine jüngere Studie, daß *CUTL1* eine Brustkrebs fördernde Rolle hat. Goulet und Mitarbeiter beschrieben eine gesteigerte Expression der Isoform p75 in Brustkrebszellen (Goulet et al., 2002). Michl et al. identifizierten *CUTL1* in einer breit angelegten Suche nach Modulatoren der Zellmotilität unter Verwendung einer so genannten „RNA interference Library“ (Michl et. al., 2005). In dieser Studie konnte gezeigt werden, daß die Aktivität von *CUTL1* mit gesteigerter Migration und Invasion von Tumorzelllinien assoziiert ist. Ferner wurde deutlich, daß die Expression von *CUTL1* durch den „Transformation growth factor  $\beta$ “ (TGF $\beta$ )- Signalweg gefördert wird.

TGF $\beta$  ist ein wesentlicher Faktor, welcher Zellmigration, Zellinvasion und Tumorprogression moduliert (Michl et. al., 2005). Ein Modell zur biologischen Funktion von *CUTL1* ist in Abb.3 dargestellt.



### Abb.3: Modell zur Rolle von *CUTL1* im TGFβ-Signalweg

TGFβ ist als wichtiger Modulator für die Migration und Invasion von Tumorzellen bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass ein TGFβ-abhängiger Signalweg (unter Beteiligung von Smad) die Expressionsrate von *CUTL1* steigert. Das *CUTL1* Genprodukt, CDP, aktiviert bzw. hemmt die Transkription verschiedener Gene, deren Genprodukte fundamentale zelluläre Prozesse wie Invasion, Motilität und Wachstum von Zellen regulieren. Zu den Proteinen, deren Expression durch CDP gesteigert wird, gehören u.a. Pleiotrophin, WNT5A, ALCAM, S100A10 und ITGA6. Wiederum andere Gene werden in ihrer Expression durch *CUTL1* gehemmt. Diese Gene kodieren u.a. für verschiedene Proteoglykane, die an der Steuerung von Entzündungsreaktionen und Chemotaxis beteiligt sind (nach Michl et al., 2005).

### **1.6. Ziel dieser Dissertation**

Aufgrund der bedeutenden Rolle des *CUTL1* Gens bei der Transformation sowie dessen Lokalisation auf Chromosom 7 Bande q22 stellt dieses Gen ein wichtiges Kandidatengen für myeloische Neoplasien mit Monosomie 7 dar. Über Mutationsanalysen in diesem Gen bei Patienten mit myeloischen Neoplasien wurde jedoch bis heute nicht berichtet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von *CUTL1* bei myeloischen Neoplasien mit Monosomie 7 mittels Mutationsanalysen im *CUTL1* Gen bei Patienten mit myeloischen Erkrankungen und Monosomie 7 getestet.

## 2. Patienten und Methoden

### 2.1. Patienten

Ich analysierte genomische DNA aus diagnostischem peripheren Blut oder Knochenmark von insgesamt 13 Patienten mit verschiedenen myeloischen Neoplasien und Monosomie 7 oder Deletion 7q. Ein Patient wies die Translokation t(1;7) auf. Die klinischen Charakteristika der Patienten (Geschlecht, Alter, Diagnose und Karyotyp) sind in der Tabelle 2 aufgeführt. DNA Proben von den 9 pädiatrischen Patienten wurden mir von dem koordinierenden Studienzentrum der Studie EWOG MDS (European Working Group of MDS in Childhood) in Freiburg (Prof. Dr. Niemeyer) zur Verfügung gestellt. DNA Proben von 4 internistischen Patienten mit myeloischen Neoplasien erhielt ich vom MDS Register in Düsseldorf (PD Dr. Ulrich Germing). DNA Proben von 8 weiteren Patienten wurden aus der Analyse ausgeschlossen, da diese DNA nicht zufrieden stellend amplifizierbar war.

**Tabelle 2:** Charakteristika der in dieser Dissertation auf das Vorliegen einer *CUTL1* Mutation analysierten Patienten

Nr.	Geschlecht/ Alter (Jahre)	Diagnose	Karyotyp
1	M/10,5	RC	45,XY, -7
2	M/1,1	JMML	45,XY, -7
3	M/8,7	RAEB-t	45,XY, -7
4	M /3,4	RC	45,XY, -7
5	M/12,5	RC	45,XY, -7
6	M/12,5	RAEB	45,XY, -7
7	M/16,1	MDR-AML	45,XY, -7
8	M/0,3	JMML	45,XY, -7
9	M/3,7	JMML	45,XY, -7
10	F/55	RA	46,XX, -7
11	F/32	MDR-AML	45,XX, -7
12	F/71	Sekundäre AML	Chr. 7 Veränderung n.n.B.
13	M/53	RA	t(1;7)

RC: refraktäre Zytopenie; RA: refraktäre Anämie; JMML: juvenile myelomonozytäre Leukämie; RAEB: refraktäre Anämie mit Blastenexzess; RAEB-T: refraktäre Anämie mit Blastenexzess in Transformation; MDR-AML: MDS (myelodysplastische Syndrome) related-akute myeloische Leukämie; del: Deletion, -7: Monosomie 7

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. DNA-Extraktion aus Patientenvollblut**

Bis zur DNA-Extraktion wurden die EDTA-Blutproben maximal für 24 Std. bei 4°C gelagert. Die Extraktion von DNA aus Vollblut geschah unter Anwendung des "QIAamp DNA Blood Mini Kit" der Firma Qiagen. Vor Beladung der QIAamp Säule musste das Zellysate auf die Bindungsbedingungen eingestellt werden, damit die DNA-Adsorption an die QIAamp Silicagel-Membran optimal erfolgen konnte. Die DNA wurde während des Zentrifugationsschrittes an die Membran gebunden. Salz und pH-Bedingungen im Lysat stellen sicher, daß weder Proteine noch andere Kontaminanten, die eine PCR oder andere Reaktionen hemmen könnten, auf der Membran zurückblieben. Zur Zellyse wurden 20 µl Proteinase K mit 200 µl EDTA-Patientenblut und 200 µl AL Puffer vermischt. Nach Mischen folgte ein Inkubationsschritt von 10 min Dauer bei 56°C. Zur Probe wurden 200 µl Ethanol (96-100%) hinzugefügt. Vorsichtig wurde dieses Gemisch in die QIAamp Säule übertragen und bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Nach Applikation von 500 µl AW1 Waschpuffer auf die Säule wurde die Probe erneut bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert. Wieder wurde das Filtrat verworfen. Nach Zugabe von 500 µl AW2 Waschpuffer auf die Säule wurde eine 3 min Zentrifugation bei 14000 rpm durchgeführt. Die beiden Waschschriffe eliminieren verbliebene Kontaminanten, ohne die DNA-Bindung zu beeinflussen. Das Eluat wurde verworfen und 200 µl destilliertes Wasser hinzugefügt. Die Probe wurde 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert. Das Eluat enthielt nun die gereinigte DNA, welche bis zum Einsatz in der PCR bei -20°C aufbewahrt wurde. Die DNA Proben von pädiatrischen Patienten wurden in Freiburg aus mononukleären Zellen extrahiert, so daß für diese Proben keine weitere Extraktion erforderlich war.

### 2.2.2. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von isolierter doppelsträngiger DNA wurde in einem Spektralphotometer durch die Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Die DNA-Isolate wurden hierzu um den Faktor 20 mit Aqua dest. verdünnt und in eine Quarzküvette gegeben. Die optische Dichte dieser Probe bei der Wellenlänge von 260 nm wurde bestimmt. Der erhaltene Wert gab die DNA Konzentration in ng/µl an. Die Kalibrierung des Nullpunktes erfolgte durch Abgleichen mit Aqua dest.

### 2.2.3. Primerdesign mit Bioinformatik

Die genomische Struktur des *CUTL1* Gens (Genbank Acc. No. M74099) ermittelte ich über BLAST Vergleiche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) der kodierenden mRNA (Rong Zeng et al., 2000) mit der genomischen Sequenz (<http://www.chr7.org>). Unter Berücksichtigung der AC-GT Regel identifizierte ich Exon-Intron Grenzen. Anschließend entwarf ich Primer, welche die Exone flankieren. Hierfür verwendete ich das Programm „Primer 3“ (<http://www.genome.wi.mit.edu>). Synthetisiert wurden die Primer-Paare durch die Firma MWG-Biotech. Für jedes Exon wurden Primer-Paare konstruiert, die auch die hochkonservierten Spleissstellen miterfassten. Die zur Suche von Mutationen angewandte Methode, das SSCP (Single-strand-conformation-polymorphism), arbeitet für eine DNA-Fragmentgröße bis ca. 300 bp am spezifischsten. Da Exon 15, 18 und 21 eine Größe von 300 bp überschreiten, wurden hier Primer-Paare für überlappenden Amplikons konstruiert. Die vollständig lange mRNA der in dieser Dissertation untersuchten Isoform 1a (Accession no. NM\_181552) beinhaltet die Exons 1b- 24. Für Exone 2-23 gelang es, Primerpaare und PCR Bedingungen zu erarbeiten. Diese Exone, die für alle funktionellen Domänen von CDP kodieren, wurden in dieser Dissertation analysiert.

**Tabelle 3:** In dieser Arbeit verwendete Primerpaare

Exon	Exon- länge (bp)	Produktgröße (bp)	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
2	111	174	TTTTCTTTCTGTTTCCCC	GATCCCTTCAAAGCGAACAC
3	48	132	GAAGGGTGGCTCAGGATAGA	TCCTTCTCAAATGGCTGCTT
4	79	133	CCACTGGTGGGCCATTACT	TTCTTTCTTTCTTCCCTTTCA
5	138	186	AAGAACGCATTTTCCACCAA	GGTGATGGCTGTTTTCTGT
6	124	222	AGGGGCAAATGCTATGTCAG	GGAATTGTGTGCTTCTCTTACTG
7	77	150	CTCCCCACATCCATGGTACT	ATGACCAATTTGGCTTCGTC
8	67	124	TGTATGGATAAGGGAGGCCA	TTAGTAATTCCTTGCCTTTCAGC
9	49	118	AGCCGGTCTCCTTGTGACTA	TAAAAGCGTCCAGGGTCTTA
10	105	205	CAAGCGGCTGTAACCTCGAAG	TTTCTCTTTCACCCCTTTTCA
11	189	311	GAAAGGCAGAGGGTGTGTGT	CAGCGCAGTTTTGTCATCTC
12	59	115	CCACAGGGCTCTCCGTACT	CATGGCCACTGATCAAATTCT
13	49	110	GCTGATGCTAGTGCTGACCA	ACCCCTCTGTTGTGCTCTTG
14	97	162	CTGGAAGCGAACCAACCAC	CGCTCTGCCCTTCTAGG
15	672	266 (15.1)	CACCCAACGCCAGTCTCT	GATGGACTGCAGAAATCG
		284 (15.2)	TCCCAACACATAATGTCCGA	GGCAGCTAATGCAGTCCTTC
		255 (15.3)	TGTGCTGTATGGACCTGTTGA	CCTCCTTCTCAGTTGCCCC
		176 (15.4)	ACTTAACCCCGCTGGTGAG	ATGCATTCTGTTTGCCTTC
16	66	184	CCCTAGGTGACTGACTGCAA	TGTCACACAGCCCATATCGT
17	102	164	TGGATGAAGAAATGGAAGCTG	TTTGGGTTTGATGTCATTGG
18	845	289 (18.1)	GTCCCATACTCCCAGAGC	GAGATGGGAGAACCAAAGCC
		273 (18.2)	CTTGACATGGGCACGAT	GAGAGAAGAAATGCCGCCTC
		282 (18.3)	ACCGCTGCCCTTCTCTTT	ATCTCCCTGAAGAAGCCCTC
		186 (18.4)	GGCCTCCTTTTTGAGGGC	GCCTTAAAGCAGGCACCACT
		191 (18.5)	GGGGTGAGGATGGTGATGT	CTCTACCCCTGTTTCTCCA
19	166	225	CTCTCCTGTGGCAGGACC	CACTGATGGCCTGTGTGTTT
20	57	121	AAGCAACAGAACTGGCTGC	CCGCGTTCCTTCTTTAAT
21	303	270 (21.1)	CTGACTCAGCAGCCGAGAG	GAGTCGGTGAAGAGCCTGAC
		184 (21.2)	CTGGTGGCTTGCTGTCCT	ACAGCTATTTTCAGGCACGG
22	189	283	CTGTCTATGAATGCGGACG	GGCTCTCGGTGACAATACCT
23	265	360	ACAGATCAGCCCCTTCCC	CTGGGCCTGACCTTAGTCTG

### 2.2.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Auftrennung der PCR-Produkte

Für die PCR-Reaktion wurden 1 µl Patienten- bzw. Probanden- DNA (template) in einem 25 µl-PCR-Reaktionsansatz mit Vorwärts- und Rückwärtsprimern, den vier Desoxynukleosidtriphosphaten, Puffer und Taq-Polymerase eingesetzt und unter den genannten PCR-Bedingungen amplifiziert. Zur Kontaminationskontrolle wurde eine Negativkontrolle untersucht, die alle Reagenzien mit Ausnahme der DNA enthielt.

PCR-Bedingungen: Das Reaktionsvolumen betrug 25,0 µl pro Ansatz, davon 19,25 µl Aqua dest, 2,5 µl 10× PCR-Puffer, 1,0 µl Desoxynukleosidtriphosphate, 1,0 µl Primer Mix (jeweils 10 pmol/µl), 1,0 µl DNA (10-50 ng/µl) und 0,25 µl Taq-Polymerase (5 U/µl). Jeder Reaktionsansatz wurde mit folgenden PCR-Temperaturen untersucht: 2 min Initialdenaturierung bei 94°C und anschließend

35-37 Zyklen (siehe Tabelle 6):

1) 30 sek bei 95°C, 2) 30 sek bei 56-59 °C (Tabelle 4), 3) 1 min bei 72 °C.

**Tabelle 4:** PCR-Bedingungen zur Analyse des *CUTL1* Gens -  
Anlagerungstemperaturen und Anzahl der Zyklen

Exon	Anlagerungstemp.	Zyklen
2	58°C	35
3, 4, 5, 7, 8, 9, 12, 15.1,15.3,15.4,17, 18.1,18.2,18.4,18.520, 21.1, 21.2, 22	57°C	35
6,15.2,18.3	57°C	36
10,16	58°C	35
11,23	59°C	35
13	56°C	35
14	56°C	36
19	57°C	37

Die Ergebnisoptimierung wurde durch eine Gradienten-PCR erzielt, bei der die Anlagerungstemperatur in 1°C-Schritten variiert wurde. Als optimale Anlagerungstemperatur galt die, die ein deutliches und spezifisches Produkt hervorbrachte, welches als Bande vorhergesagter Größe in der Gelelektrophorese sichtbar gemacht wurde. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,7-prozentigen Agarosegel nach einer Laufzeit von 20 min bei 100 Volt Spannung aufgetrennt. Um die Größe der aufgetrennten PCR-Fragmente abschätzen zu können, ließ ich einen DNA-Längenstandard (pUC19) mit DNA-Fragmenten bekannter Größe mitlaufen. Durch die sichtbaren Bestandteile des Ladungspuffers ließ sich die Laufweite der Proben im Gel abschätzen. Die Lokalisation der DNA-Fragmente im Agarosegel konnte durch Zugabe einer geringen Menge des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid zum Gel auf einem UV-Schirm sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert werden.

### **2.2.5. Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus**

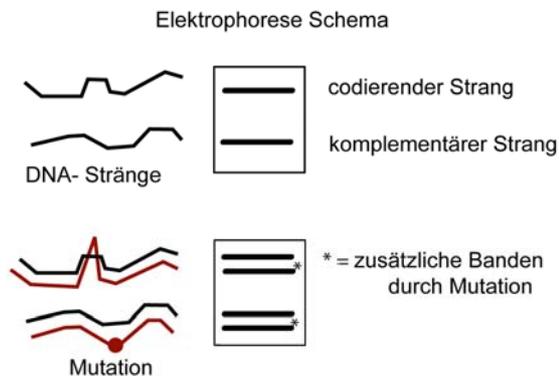
Der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus (SSCP) dient der Suche nach Punktmutationen. Genabschnitte können mit dieser Technik auf noch unbekannt Mutationen untersucht werden (Orita et al., 1989a; Orita et al., 1989b). Das Prinzip basiert darauf, daß einzelsträngige DNA durch Basenpaarung bestimmte Konformationen eingeht. Je nach Struktur wandern die beiden Einzelstränge der jeweiligen Doppelstrang-DNA unterschiedlich schnell entlang des Spannungsgradienten durch das Polyacrylamidgel. Alle DNA-Einzelstränge mit gleicher Basensequenz legen in einer bestimmten Zeit eine bestimmte Wegstrecke im Gel zurück und werden so in gleicher Höhe auf dem Gel nach der Färbung sichtbar. Diese Konformationen sind also von Faktoren wie Sequenz und Temperatur

abhängig. Liegt eine Veränderung der Primärstruktur eines Einzelstranges vor, ändert sich auch die Struktur und es kommt unter definierten Bedingungen zu einer Konformationsänderung im Vergleich zur normalen Sequenz im Polyacrylamidgel. Die Laufeigenschaften des DNA-Fragments im Gel sind verändert (Orita et al. 1989a). Als Resultat findet man nach dem Anfärben bei einer mutierten Probe ein Bandenmuster, das sich von dem des Wildtyps unterscheidet. Je nachdem, ob es sich beim Träger um eine homozygot oder eine heterozygot vorliegende Mutation handelt, sind entweder beide Banden (beide Allele) oder nur eine Bande (eines der beiden Allele) different zu den Wildtypbanden. Die durch unterschiedliche Bandenmuster auffallenden Proben wurden mittels DNA-Sequenzierung analysiert. Die Länge der Fragmente, die mittels SSCP analysiert werden konnten, wurde auf etwa 250 Basen begrenzt, um optimale Ergebnisse zu erhalten.

#### **2.2.6. Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus zur *CUTL1* Mutationsanalyse**

Nach PCR-Amplifikation des zu untersuchenden Genabschnitts wurden 4 bis 8 µl der Proben mit 4 µl SSCP-Ladungspuffer denaturiert und dann auf Eis gelagert, um eine Renaturierung zu vermeiden. Zum Giessen des Gels wurden die benötigten Chemikalien gemischt. Nach Zugabe der Katalysatoren Ammoniumpersulfat und N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, die Initiatoren der Polymerisation des Akryl-Bis-Gels, wurde das Gemisch in einer Perfusorspritze mit Hilfe einer Kanüle zwischen die Glasplatten gegossen. Die Proben wurden auf ein 8-10 prozentiges, nicht denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen, um im Anschluß im Kühlraum bei 4°C in 1×TBE-Laufpuffer bei 110-220 Volt für 15-20 Stunden über Nacht elektrophoretisch aufgetrennt zu werden. Das SSCP-Gel wurde zum Nachweis der

Nukleinsäuren gefärbt und getrocknet. Das Gel hat eine Stärke von 0,45 mm und wurde vor der Silberfärbung zur besseren Handhabung auf eine Folie (GelBond PAG) aufgetragen.



#### Abb.4: Modell zur Erläuterung des Elektrophoresebildes bei der SSCP-Analyse

In der Mitte der Abbildung ist eine schematische Zeichnung des Elektrophoresebildes dargestellt. Rechts davon sind die Banden nach ihrer Funktion benannt. Links des Elektrophoreseschemas sind die DNA-Stränge mit und ohne Mutation gezeigt.

#### 2.2.7. Silberfärbung der Gele

Die auf dem Gel befindliche DNA wurde für 20 min mit einer Fixierlösung behandelt. Zur Färbung inkubierte ich das SSCP- Gel für 20-30 min in einer Silbernitratlösung, damit sich die positiv geladenen Silberionen an die DNA anlagern konnten. Nach mehrmaligem Waschen behandelte ich das Gel zur Reduktion des Silbernitrats mit Entwickler bestehend aus Natronlauge und Formalin und ließ es so lange in der Lösung, bis die nun sichtbar werdenden Banden die gewünschte Farbintensität erreichten. Die Neutralisation erfolgte im Anschluß mit einer Natriumbikarbonatlösung. Die gefärbten Gele wurden photographiert, zur Aufbewahrung in Klarsichtfolie eingeschweißt und durch Vergleich der

Bandenmuster zwischen Kontrollen und Patienten ausgewertet. Die PCR-Produkte, deren Einzelstränge ein vom Wildtyp abweichendes Wanderungsmuster zeigten, wurden nach Alleltrennung durch Klonierung durch ein automatisiertes Verfahren sequenziert.

### 2.2.8. Klonierung

Unter Anwendung von Vektorsystemen kann man einen gesuchten DNA-Abschnitt isolieren und vermehren. Kleine DNA-Fragmente lassen sich mittels Plasmidvektoren in Bakterien klonieren. Der Plasmidvektor pUC19 enthält einen Polylinker, in dem sich einmal vorhandene Klonierungsstellen für viele Restriktionsendonukleasen sowie ein Gen für Ampicillinresistenz befinden, das die Identifizierung transformierter Zellen erlaubt. Die Vektoren bieten die Möglichkeit, transformierte Bakterienkolonien durch die so genannte Blau-Weiß Selektionierung zu erkennen. Die PCR-Produkte der in der SSCP mutationsverdächtigen *CUTL1*-Allele wurden in die sogenannte TOPO-Region des pCR2.1-TOPO-Cloning-Vektors (Invitrogen, Groningen, NL) eingebracht. Dieses prokaryotische Plasmid besitzt T-Überhänge am 3'-Ende, die neben der Anwesenheit von Topoisomerase eine Ligation mit PCR-Produkten (häufig mit überstehenden A-Nukleotiden) begünstigen. In einem Reaktionsvolumen von 6 µl wurden 3 µl frisches PCR-Produkt, 1 µl Salzlösung und 1 µl des pCR2.1-TOPO Vektor eingesetzt. Das fehlende Volumen wurde durch Aqua dest. ersetzt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Transformation. 2 µl des TOPO-Reaktionsgemisches wurden mit 50 µl kompetenten Bakterien 30 min. auf Eis inkubiert. Ich arbeitete mit dem *Escherichia coli* Bakterienstamm DH5αF' F-Φ80lacZΔM15Δ(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoAsupE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA (Invitrogen Groningen, NL).

Nach Inkubation bei 42°C für 1 min wurden die Proben gekühlt. Es wurde 250 µl raumtemperiertes SOC-Medium hinzugefügt und die Proben bei 200 rpm für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden auf eine vorgewärmte, mit 50 µg/ml Ampicillin versetzten Kulturplatte ausgestrichen. Diese Kulturplatte wurde vorher mit 40 µl einer 40 mg/ml Isopropyl-thiogalactosid Stammlösung behandelt. Durch die Insertion eines DNA-Fragments in den Klonierungsvektor wird das lacZ-Gen, das für β-Galaktosidase kodiert, inaktiviert. Transformierte Bakterien, in denen das lacZ-Gen durch die Insertion eines DNA-Fragments gehemmt wird, wachsen bei einer Inkubation auf Luria-Bertani-Agar-Platten mit (5-Brom-4-chlor-3-indolyl)-ss-D-galactosid (X-Gal) zu weißen Kolonien heran, während sich Klone ohne eine Insertion blau anfärben. Nach einer 12- bis 18-stündigen Inkubation bei 37°C wurden pro Platte 10 weiße Klone gepickt. Diese wurden jeweils in 3 ml Luria-Bertani-Flüssigkeitsmedium, ebenfalls mit einem Ampicillinzusatz von 50 µg/ml, bei 37°C über 12 Std. kultiviert.

### **2.2.9. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (alkalische Lyse)**

Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurden Plasmid-Mini Präparationen („Plasmid Mini-Preparation-Kit“, Qiagen) nach Herstellerprotokoll und an Anlehnung an die Methode von J.D.Brown durchgeführt. Hierfür wurden zunächst 2 ml der Bakterienkultur bei 6000 rpm für 2 min pelletiert und der Überstand dekantiert. Anschließend wurden die Zellen in 300 µl Pufferlösung P1 resuspendiert und weitere 300 µl Lyse-Lösung P2 zugegeben. Die Probe wurde vorsichtig gemischt und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Danach wurden 300 µl Neutralisationslösung P3 zugegeben, die Probe gemischt, 10 min auf Eis inkubiert und für 20 min mit 14000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Im Anschluß an die Zentrifugation wurde der Überstand in

einem neuen Gefäß mit 600 µl Isopropanol versetzt und die DNA durch erneute Zentrifugation bei 14000 rpm für 30 min sedimentiert. Das erhaltene DNA-Pellet wurde mit 200 µl 70%-igem Ethanol gewaschen, erneut sedimentiert (14000 rpm, 15 min RT) und bei 37°C getrocknet. Zur Elution der DNA wurden 120 µl Aqua dest. hinzugefügt. Die wässrige DNA-Lösung wurde für eine SSCP-Kontrolle und folgende Sequenzierung verwendet.

#### **2.2.10. Automatisierte DNA-Sequenzanalyse der klonierten DNA-Fragmente**

Die Analyse erfolgte automatisiert mit einem Kapillarsequenziergerät (Model 310A) der Firma Applied Biosystem. Verwendet wurde das „BigDye Terminator Sequencing Ready Reaktion Kit“ von Applied Biosystems. Der Sequenzieransatz enthielt 4 µl Terminator Ready Reaktion Mix mit modifizierter Taq-Polymerase, Desoxynukleotide und fluoreszenzmarkierte Desoxynukleotide, etwa 200 ng Template, Primer M13 a 1 pmol/µl ( 3,2 µl) und deionisiertes H<sub>2</sub>O ad 20 µl.

Primer M13 Sequenz vorwärts (5' → 3'): GTAAAACGACGGCCAG

Primer M13 Sequenz rückwärts (3' → 5'): CAGGAAACAGCTATGAC

Die Proben wurden nach einem fünfminütigen Denaturierungsschritt folgendem Amplifikationsprogramm mit 26 Zyklen unterzogen: Denaturierung für 30 sek. bei 95°C, Primerannealing von 30 sek. bei 55°C und Extension von 4 min. bei 60°C.

Der Sequenzieransatz wurde mit dem „Dye Ex Spin Kit“ von Quiagen nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt, da der Sequenziererfolg von der Reinheit der eingesetzten DNA abhängt. Das Prinzip der Reinigung beruhte auf der selektiven Bindung von DNA an einer in Mikrotubes eingebauten Silica-Gel-Membran.

Das Sequenziergerät detektierte nun die unterschiedlichen Abbruchprodukte über den Empfang von Emissionen der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe.

### 3. Ergebnis

#### 3.1. *CUTL1* Mutationsanalyse mittels Einzelstrang- Konformationsanalysen

Ich analysierte Exone 2 bis 23 des *CUTL1* Gens in DNA aus diagnostischem Blut oder Knochenmark von insgesamt 13 Patienten (Tabelle 2). Bei 8 dieser Patienten ließen sich maximal 4 Exone nicht amplifizieren. Bei der SSCP Analyse wurden 6 verschiedene abnorme und variationsverdächtige SSCP Muster aufgedeckt (Abbildungen 5-10, Tabelle 5). Die entsprechenden Patienten DNA Proben wurden reamplifiziert und im Folgenden der Sense - oder Antisensestrang sequenziert. Diese Analyse bestätigte in jedem untersuchten Fall den Austausch eines Nukleotids. In drei Fällen befand sich dieser Nukleotidaustausch innerhalb intronischer Sequenz. Da alle diese Veränderungen auch bei Kontroll DNA, d.h. DNA gesunder Probanden, auftraten, handelt es sich wahrscheinlich um Polymorphismen (Tabelle 5). In drei weiteren Fällen fand sich der Nukleotidaustausch innerhalb kodierender Sequenz. Da diese Variationen keine Veränderung in der vorhergesagten Aminosäuresequenz hervorrufen und zwei dieser Veränderungen auch bei Kontrollpersonen auftraten, handelt es sich auch hier am ehesten um Polymorphismen (Tabelle 5). Mutationen bzw. Variationen, die zu einem Austausch der vorhergesagten Aminosäuresequenz führen, wurden nicht identifiziert.

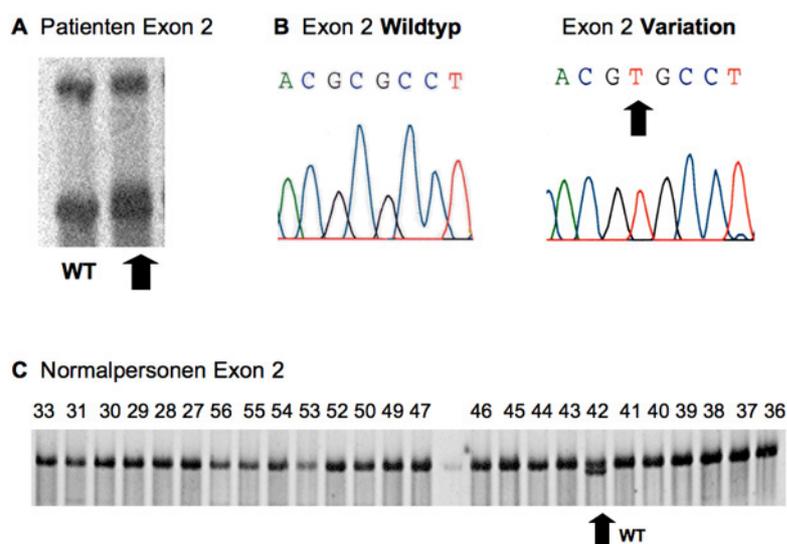
**Tabelle 5:** In dieser Dissertation identifizierte Polymorphismen im *CUTL1* Gen

Lokalisation	Nukleotidaustausch	Häufigkeit im Patientenkollektiv (Patienten Nr.)	Häufigkeit bei Kontrollpersonen
Intron 2	+8A→G	2/12 (3, 5)	1/25
Intron 7	+6G→A	8/13 (2, 3, 5, 6, 7, 11, 12, 13)	12/24
Intron 8	+11A→C	2/13 (2, 5)	1/25
Exon 13	c.1104G>A* (Pro368Pro)	11/13 (1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13)	17/25
Exon 14	c.1206C>T*(Ser402Ser)	7/13 (1, 4, 5, 7, 8, 10, 11)	10/25
Exon 20	c.3084C>T* (Ser1028Ser)	2/12(2, 8)	0/24

\* Genbank Accession Nummer M74099

### 3.2. Auffällige SSCP Gele und Abklärung mittels Sequenzierung

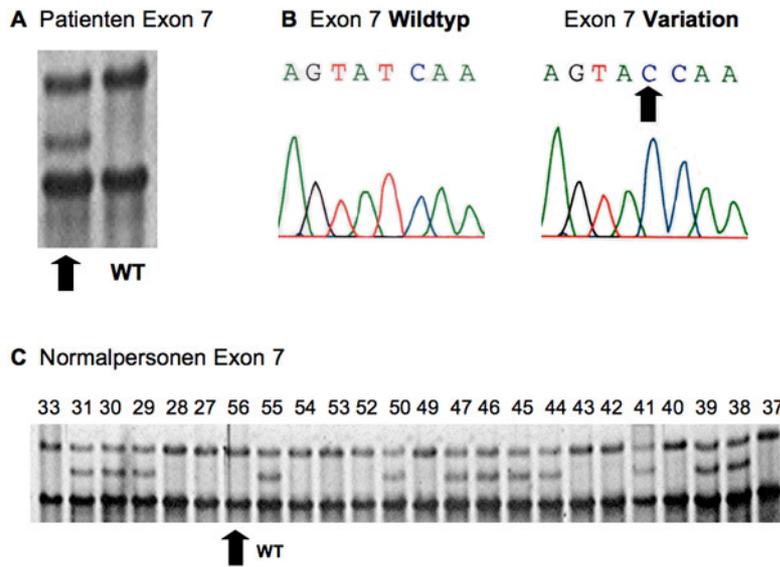
Die folgenden Abbildungen 5-10 zeigen die in dieser Arbeit erstellten auffälligen SSCP Gele sowie deren Abklärung mittels Sequenzanalysen.



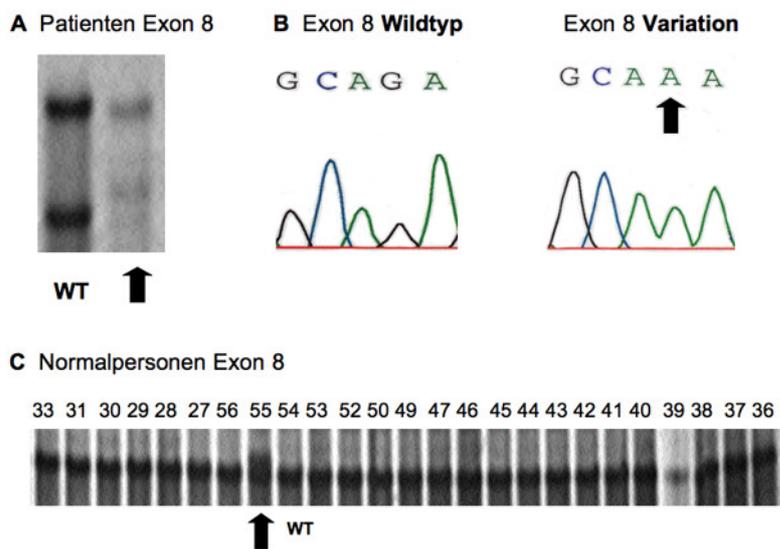
**Abb.5:** **A** *CUTL1* SSCP-Polyacrylamidgel für Exon 2 nach Silberfärbung. Das variierende Muster ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

**B** Mittels Klonierung wurde das normale (Wildtyp) und variierende Allel voneinander getrennt. Es ist der Antisensestrang dargestellt. Nach dem Sequenzieren wird die genaue Basenveränderung auf DNA Ebene sichtbar. In diesem Fall: Intron 2 +8A→G, d.h., dass an Position 8 3' der Exon/Intron-Grenze ein Basenaustausch von Guanin zu Adenin stattfindet.

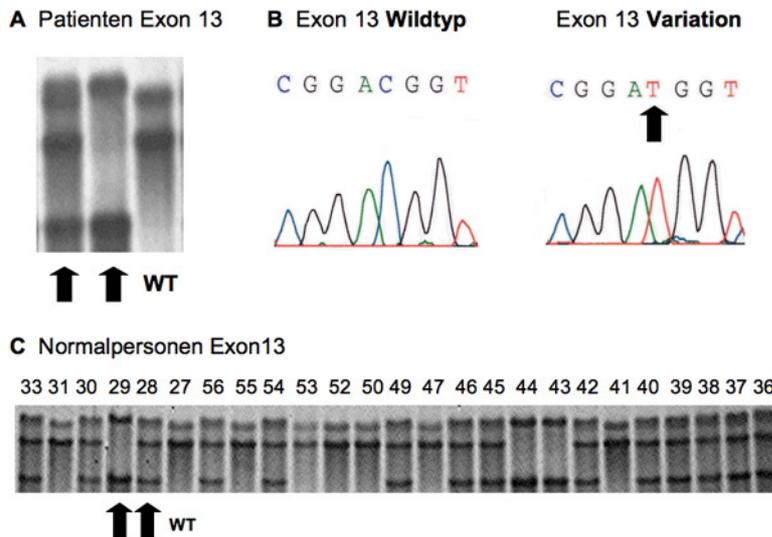
**C** Es wurden gesunde Normalpersonen untersucht: veränderte Muster sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Das Ergebnis der Sequenzierung ist identisch mit der Sequenzierung der abnormen Patientmuster (nicht gezeigt).



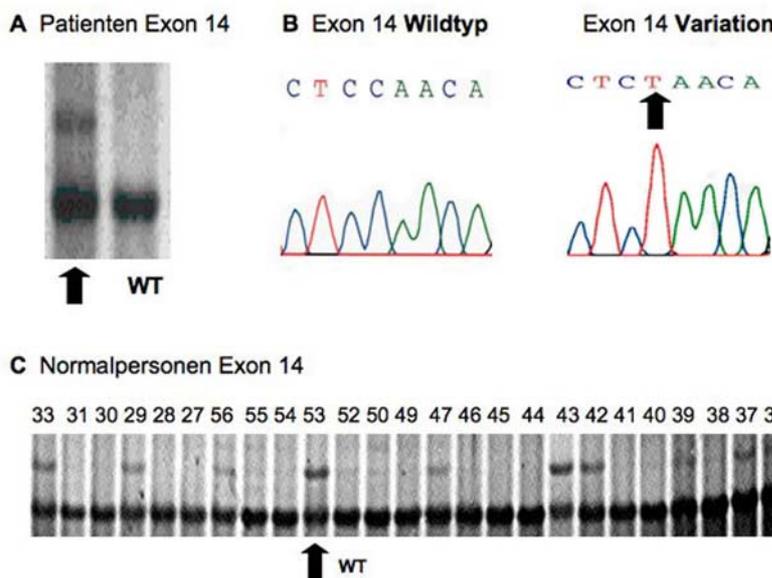
**Abb.6:** **A** *CUTL1* SSCP-Polyacrylamidgel für Exon 7 nach Silberfärbung. Das variierende Muster ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.  
**B** Mittels Klonierung wurde das normale (Wildtyp) und variierende Allel voneinander getrennt. Es ist der Antisensestrang dargestellt. Nach dem Sequenzieren wird die genaue Basenveränderung auf DNA Ebene sichtbar. In diesem Fall: Intron 7 +6G→A d.h., dass an Position 6 3' der Exon/Intron-Grenze ein Basenaustausch von Adenin zu Guanin stattfindet.  
**C** Es wurden gesunde Normalpersonen untersucht: veränderte Muster sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Das Ergebnis der Sequenzierung ist identisch mit der Sequenzierung der abnormen Patientenmuster (nicht gezeigt).



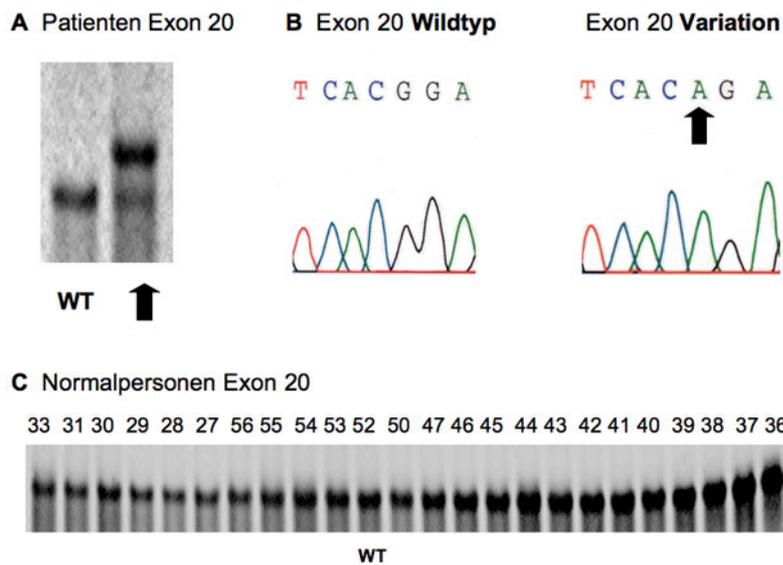
**Abb.7:** **A** *CUTL1* SSCP-Polyacrylamidgel für Exon 8 nach Silberfärbung. Das variierende Muster ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.  
**B** Mittels Klonierung wurde das normale (Wildtyp) und variierende Allel voneinander getrennt. Es ist der Sensestrang dargestellt. Nach dem Sequenzieren wird die genaue Basenveränderung auf DNA Ebene sichtbar. In diesem Fall: Intron 8 +11A→C d.h., dass an Position 11 3' der Exon/Intron-Grenze ein Basenaustausch von Cytosin zu Adenin stattfindet.  
**C** Es wurden gesunde Normalpersonen untersucht: veränderte Muster sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Das Ergebnis der Sequenzierung ist identisch mit der Sequenzierung der abnormen Patientenmuster (nicht gezeigt).



**Abb.8:** **A** *CUTL1* SSCP-Polyacrylamidgel für Exon 13 nach Silberfärbung. Das variierende Muster ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. **B** Mittels Klonierung wurde das normale (Wildtyp) und variierende Allel voneinander getrennt. Es ist der Antisensestrang dargestellt. Nach dem Sequenzieren wird die genaue Basenveränderung auf DNA Ebene sichtbar. In diesem Fall: Exon 13 1104G>A(Pro368Pro) d.h., an Basenposition 1104 3' wurde im Exon 13 Guanin durch Adenin ersetzt, es blieb allerdings bei Generierung der Aminosäure Prolin an der Aminosäureposition 368 im Protein. **C** Es wurden gesunde Normalpersonen untersucht: veränderte Muster sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Das Ergebnis der Sequenzierung ist identisch mit der Sequenzierung der abnormen Patientenumuster (nicht gezeigt).

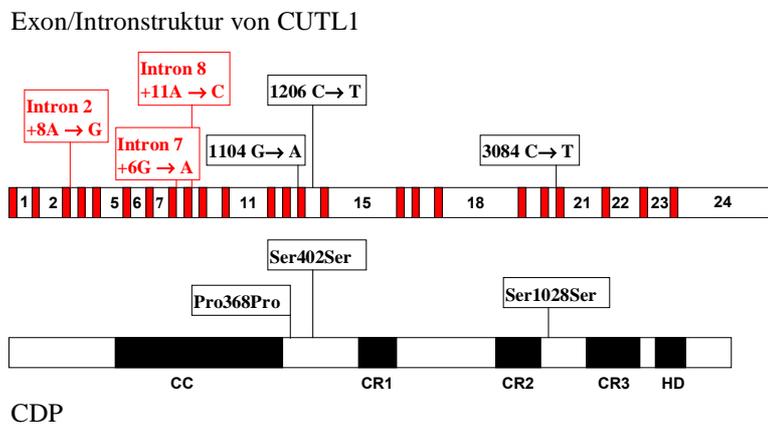


**Abb.9:** **A** *CUTL1* SSCP-Polyacrylamidgel für Exon 14 nach Silberfärbung. Das variierende Muster ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. **B** Mittels Klonierung wurde das normale (Wildtyp) und variierende Allel voneinander getrennt. Es ist der Sensestrang dargestellt. Nach dem Sequenzieren wird die genaue Basenveränderung auf DNA Ebene sichtbar. In diesem Fall: Exon 14 1206C>T(Ser402Ser) d.h., an Basenposition 1206 3' im Exon 14 wurde Cytosin durch Thymin substituiert, am Einbau der Aminosäure Serin an Position 402 im Protein änderte sich nichts. **C** Es wurden gesunde Normalpersonen untersucht: veränderte Muster sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Das Ergebnis der Sequenzierung ist identisch mit der Sequenzierung der abnormen Patientenumuster (nicht gezeigt).



**Abb.10:** **A** *CUTL1* SSCP-Polyacrylamidgel für Exon 20 nach Silberfärbung. Das variierende Muster ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.  
**B** Mittels Klonierung wurde das normale (Wildtyp) und variierende Allel voneinander getrennt. Es ist der Antisensestrang dargestellt. Nach dem Sequenzieren wird die genaue Basenveränderung auf DNA Ebene sichtbar. In diesem Fall: Exon 20 3084C>T(Ser1028Ser) d.h., an Basenposition 3084 3' im Exon 20 führte der Basenwechsel von Cytosin zu Thymin nicht zu einer Änderung der Herstellung der Aminosäure Serin und am Einbau dieser Aminosäure an Position 1028 im Protein.  
**C** Es wurden gesunde Normalpersonen untersucht: veränderte Muster sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Das Ergebnis der Sequenzierung ist identisch mit der Sequenzierung der abnormen Patientenmuster (nicht gezeigt).

Die Lokalisation der identifizierten Veränderungen innerhalb des *CUTL1* Genortes ist in Abb.11 dargestellt.



**Abb.11: Durch SSCP-Analysen gefundene Veränderungen in Bezug zur Exon/Intronstruktur von *CUTL1***  
 Im oberen Bereich der Abbildung ist die Intron/Exonstruktur von *CUTL1* dargestellt. Die Introns sind rot abgebildet und nicht im korrekten Grössenverhältnis dargestellt. Zur Vereinfachung der Darstellung haben alle Introns identische Grössen. Die roten Buchstaben zeigen die gefundenen intrinsischen Veränderungen, in den Kästen sind die Polymorphismen zu sehen. Im unteren Anteil der Abbildung ist die Proteinstruktur gezeigt, hier sind die Aminosäuren an der entsprechenden Position eingetragen. Die Änderung einer Base führte in keinem Fall zu einer Änderung der Aminosäureabfolge.

## 4. Diskussion

### 4.1. Klinische Bedeutung der Monosomie 7 im Kindesalter

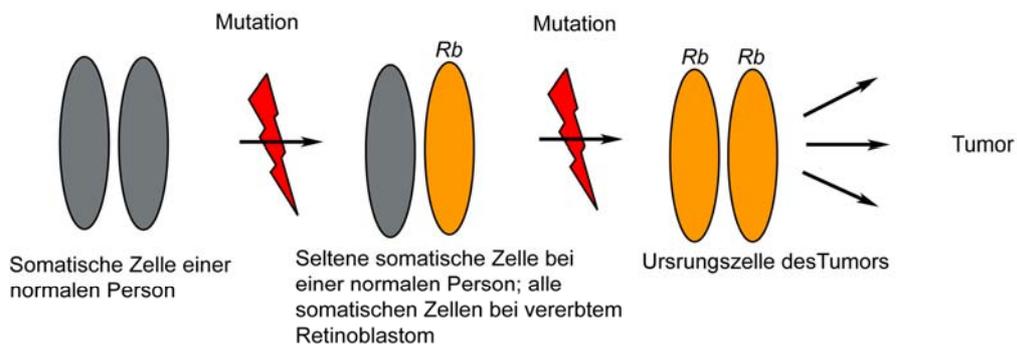
Die Monosomie 7 gehört zu den häufigsten chromosomalen Anomalien bei myeloischen Neoplasien (Luna-Fineman et al., 1995; Le Beau et al., 1986; Le Beau et al., 1996). Im Kindesalter tritt die Monosomie 7 insbesondere bei Patienten mit JMML und bei Patienten mit MDS auf. Kinder mit niedriggradigem MDS und Monosomie 7 entwickeln im Durchschnitt innerhalb von 1,9 Jahren einen Progress ihrer Erkrankungen (Kardos et al., 2003). Daher besteht für diese Patienten mit Monosomie 7 eine Indikation zur baldigen Stammzelltransplantation (SZT). Entgegen der häufig zitierten Aussage, daß die Monosomie 7 einen durchweg schlechten prognostischen Faktor darstellt, ist dies im Kindesalter nicht immer zutreffend. So ist bei Patienten mit JMML das Überleben nach SZT nicht davon abhängig, ob eine Monosomie 7 vorliegt (Locatelli et al., 2005). Es ist Gegenstand aktueller Diskussion, ob eine *de novo* akute myeloische Leukämie (AML) mit Monosomie 7 nicht eher als fortgeschrittenes MDS bzw. als MDS-assoziierte AML angesehen werden sollte, da sowohl Patienten mit fortgeschrittenem MDS als auch Patienten mit AML und Monosomie 7 ähnliche klinische Verläufe zeigen und in der Regel nicht ohne SZT geheilt werden können. Hingegen ist die AML ohne Monosomie 7 häufig chemosensitiv und meist mit balancierten chromosomalen Translokationen assoziiert (Pedersen-Bjergaard et al., 1994; Pedersen-Bjergaard et al., 1991; Fenaux et al., 1989). Unter den Patienten mit MDS nach Chemo- oder Strahlentherapie ist die Monosomie 7 die häufigste chromosomale Veränderung. Hier tritt sie insbesondere nach einer Strahlentherapie und/oder nach einer Therapie mit alkylierenden Substanzen auf (Le Beau et al., 1986; Luna-Fineman et al., 1995; Pedersen-Bjergaard et al., 1994; Thirman et al., 1996). Im Gegensatz zu therapieassoziierten myeloischen Neoplasien nach Einnahme von Topoisomerase Inhibitoren, die

durchschnittlich drei Jahre nach Erstbehandlung auftritt, entsteht das therapieassoziierte MDS mit Monosomie 7 nach durchschnittlich 7 Jahren (Pedersen-Bjergaard et al., 1987; Pedersen-Bjergaard et al., 1994). Interessanterweise findet sich die Monosomie 7 ebenfalls gehäuft bei myeloischen Leukämien von Patienten mit zu myeloischen Neoplasien prädisponierenden Grunderkrankungen. Zu diesen Erkrankungen gehören die Fanconi-Anämie, das Shwachman-Diamond Syndrom und die kongenitale Neutropenie (Luna-Fineman et al., 1995). Für diese Patienten mit einer Prädisposition für myeloische Neoplasien ist eine jährliche zytogenetische Analyse von Knochenmarkzellen indiziert, um ein MDS mit Monosomie 7 frühzeitig zu erkennen.

#### **4.2. Tumorsuppressorgene**

Tumorsuppressoren haben die Eigenschaft, die Transformation der Zelle zu unterdrücken und gehören zu den zentralen Steuereinheiten von Proliferation und Wachstum in der Zelle (Weinberg et al., 1991; Knudson et al., 1993). Häufig werden TSG durch den Verlust von genetischem Material inaktiviert. Die Existenz der TSG wurde 1971 erstmals von Knudson postuliert (Knudson et al., 1971). TSG wirken, im Gegensatz zu klassischen dominanten Onkogenen, auf zellulärer Ebene rezessiv. Das bedeutet, daß beide Allele inaktiviert werden müssen, um zur Transformation zu führen (Weinberg et al., 1991). Für die Aufrechterhaltung der normalen Zellwachstumsregulation reicht in diesem Modell das Genprodukt eines normalen Allels für das regelrechte Zellwachstum aus. Hingegen ist die Inaktivierung des zweiten Allels für die Tumorgenese entscheidend; demnach sind zwei Mutationen notwendig, um das TSG zu inaktivieren. Knudson formulierte 1971 auf der Grundlage epidemiologischer Untersuchungen des erblichen und sporadischen Retinoblastoms

eine Zwei-Treffer-Hypothese („two-hit-model“) (Knudson et al., 1971). Bei der erblichen Form ist ein Allel des Retinoblastom Gens, *RB*, in der Keimbahn mutiert. Bei der Tumorentstehung kommt es zu einer somatischen Mutation im zweiten Allel. Bei der sporadischen Form des Retinoblastoms führen zwei somatische Ereignisse zum Funktionsverlust beider Allele und somit zur Tumorentstehung.



#### Abb.12: Knudsons Zwei-Schritt-Hypothese

Die schematische Darstellung zeigt den Weg von einer gesunden Zelle einer Normalperson (Allele in grau) zur Ursprungszelle eines Tumors (Allele in orange) durch zwei Mutationen am Beispiel des Retinoblastom Gens. Für ein sporadisches Retinoblastom sind zwei Mutationen erforderlich, für die familiäre Form des Retinoblastoms ist dagegen bereits eine Mutation ausreichend.

In Tabelle 6 sind einige bekannte TSG zusammengestellt, die eine Rolle bei der Entstehung solider Tumoren spielen

**Tabelle 6:** Beispiele von bekannten Tumorsuppressorgenen

Gen	Erkrankung	Funktion
<i>APC</i>	Familiäre, adenomatöse Polyposis coli	Signaltransduktion
<i>BRCA1</i>	Familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom	DNA-Reparatur
<i>BRCA2</i>	Familiäres Mamma-, Ovarial- und Prostatakarzinom	DNA-Reparatur
<i>NF1</i>	Neurofibromatose 1	GTPase aktivierendes Protein
<i>PMS1/HNPCC3</i>	Kolonkarzinom	DNA-Reparatur
<i>RB1</i>	Retinoblastom, Osteosarkom, Karzinome (Blase, Mamma, Lunge, Prostata)	Transkriptions- modifikator
<i>WT1</i>	Nephroblastom (Wilms-Tumor)	Transkriptionsfaktor

TSG sind häufig rezessiv, so daß Verlust beider TSG Allele eine Voraussetzung für die Tumorgenese ist. In letzter Zeit wurden jedoch TSG identifiziert, bei denen bereits die Inaktivierung eines Allels ausreicht, um zur Transformation zu führen. Dieses Phänomen wird als Haploinsuffizienz bezeichnet. Beispiele für wahrscheinlich haploinsuffizient wirkende TSG sind *P27KIP1*, *RUNX1*, *TP53* und *DMP1* (Fero et al., 1998; Song et al., 1999; Venkatachalam et al., 1998; Inoue et al., 2001).

#### **4.3. Deletion des *CUTL1* Gens in Chromosom 7 Bande q22 in Leukämiezellen**

Mehrere „kritische“ Deletionsregionen auf dem langen Arm von Chromosom 7 innerhalb Bande 7q22 wurden mit Hilfe molekulargenetischer Methoden von Patientenproben mit malignen myeloischen Erkrankungen definiert (Le Beau et al., 1986; Le Beau et al., 1996; Fischer et al., 1997; Kere et al., 1987; Kere et al., 1989; Liang et al., 1998; Tosi et al., 1999). Das Gen *CUTL1* befindet sich innerhalb der von Fischer und Tosi definierten Deletionsregionen und ist allein aufgrund dieser Lokalisation als mögliches Kandidatengen für myeloische Leukämien anzusehen.

Fischer und Mitarbeiter (Fischer et al., 1997) führten FISH-Analysen an 21 Leukämieproben mit Chromosom 7 Aberrationen durch und beschrieben zwei nicht überlappende „kritische“ Regionen zwischen Bereich 7q22 und 7q31. Die erste der beschriebenen Regionen umspannt etwa 2-3 Mb und enthält unter anderen das Gen *CUTL1*. Tosi und Mitarbeiter (Tosi et al., 1999) untersuchten Knochenmarksproben von 17 Patienten mit myeloischen Erkrankungen mittels FISH. Übereinstimmend mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, lagen die Deletionsbruchpunkte in 14 untersuchten Proben in oder proximal von 7q22. Ein Patient mit einem komplexen Karyotyp bei AML wies eine balancierte Translokation  $t(7;7)(p13; q22)$  auf. Der Translokationsbruchpunkt lag innerhalb der Bande 7q22 und ging mit der Deletion von etwa 150kb einher. Die deletierte Sequenz betrifft den *CUTL1* Genort. Die beschriebene Deletion überschneidet sich mit der proximalen, von Fischer und Mitarbeitern bereits beschriebenen Region (Fischer et al., 1997) (Abb.1).

Auch bei soliden Tumoren wurde LOH im Bereich des *CUTL1* Gens beschrieben. Zeng et al. fanden LOH auf dem langen Arm von Chromosom 7 in Brustkrebsproben. Deletionen von genetischem Material im Bereich von 7q22 wurden in verschiedenen Tumorentitäten gefunden. Sie waren assoziiert mit vermehrter Tumorgroße (Zeng et al., 1999). Außerdem wurde LOH in der Region 7q22 auch bei einigen uterinen

Leiomyomen, gutartigen Tumoren ausgehend von glatten Muskelzellen des Myometrium, entdeckt (Zeng et al., 1997).

#### **4.4. Die Funktion des *CUTL1* Gens**

*CUTL1* ist verantwortlich für die Expression zahlreicher Zelloberflächenproteine und anderer Proteine, die in die Kontrolle von Zelladhäsion und Migration involviert sind. Das *CUTL1* Genprodukt CDP ist ein Transkriptionsregulator, der an der Regulation von Zellwachstum, Entwicklung und Zellzyklusprogression beteiligt ist (Nepveau et al., 2001). Michl et al. konnten zeigen, daß CDP ein Programm aktiviert, welches Gene reguliert, die Einfluß auf Zellmotilität, Migrationsrate und Invasion haben. Die Expression von CDP wird dabei durch den Wachstumsfaktor TGF $\beta$  erhöht. CDP spielt eine zentrale Rolle in der Koordination eines Genexpressionsprogrammes, das mit Zellmotilität, Metastasierungsrate und Tumorprogression assoziiert ist (Michl et al., 2005). Die Expression von CDP ist mit einem schlecht differenzierten Phänotyp bei Brust -und Pankreaskarzinomen und mit vermindertem Überleben von Brustkrebspatienten assoziiert (Michl et al., 2005; Troup et al., 2003). Somit ist *CUTL1* nicht nur aufgrund der Lokalisation sondern auch aufgrund dessen Funktion bei der Transformation ein gutes Kandidatengen für myeloische Neoplasien.

#### **4.5. „Loss of heterozygosity“ Mechanismus zur Aktivierung von Onkogenen**

Die Funktion des *CUTL1* Genprodukts CDP als stromabwärts von TGF $\beta$  liegender Transkriptionsfaktor, der die Expression von neoplasieassoziierten Proteinen fördert, spricht dafür, daß *CUTL1* nicht als TSG sondern als Onkogen agiert. Neuere Daten zeigen, daß auch Onkogene durch LOH aktiviert werden können. So finden sich bei

vielen Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen aktivierende Mutationen im Janus Kinase 2 (*JAK2*) Gen (zusammengefasst in: Shannon und van Etten, 2005). Bei vielen dieser Patienten wird das nicht mutierte Allel mit mitotischer Rekombination deletiert (Baxter et al., 2005; James et al., 2005; Levine et al., 2005). Diese Beobachtung läßt die Vermutung zu, daß von LOH betroffene Regionen in Neoplasien nicht nur TSG sondern auch Onkogene tragen können.

#### **4.6. Das *CUTL1* Gen ist nicht bei Patienten mit Monosomie 7 mutiert**

Meine Arbeit stellt die erste Mutationsanalyse des *CUTL1* Gens bei Patienten mit Monosomie 7 dar. In der SSCP basierten Mutationsanalyse an DNA aus 13 Leukämieproben mit 7q-Aberration konnte ich keine pathologischen *CUTL1* Mutationen nachweisen. In Exon 13, 14 und 20 identifizierte ich Variationen, die zu keiner Veränderung in der Aminosäuresequenz führen. Daher handelt es sich bei diesen Veränderungen, die in zwei Fällen auch bei Kontrollpersonen identifiziert wurden, um Polymorphismen (Tabelle 5). Darüber hinaus fand ich außerhalb der kodierenden Sequenz 3 intronische Variationen, die ebenfalls in DNA von Kontrollpersonen nachweisbar waren und daher ebenfalls keine Mutationen darstellen.

Die SSCP Analyse dient der Erkennung von Punktmutationen (Komminoth et al., 1994; Kratz et al., 2001). Allgemein geht man davon aus, daß die Wahrscheinlichkeit, eine beliebige Mutation mittels SSCP zu entdecken, bei 60-80% liegt (Hayashi et al. 1993). Andere Inaktivierungsmechanismen, wie Deletionen oder Inversionen, werden von dieser Methode nicht erkannt. Neben Mutationen und Deletionen (genetische Veränderungen) konnte die aberrante Methylierung (epigenetische

Veränderung) von normalerweise unmethylierten Bereichen der Promotorregion von TSG als weiterer Mechanismus für die Funktionsreduktion oder Inaktivierung dieser Gene bei verschiedenen malignen Erkrankungen identifiziert werden (Jones et al., 2002). DNA-Methylierung von Genen wurde beispielsweise in primären Lungen- und Mammakarzinomen beschrieben (Zöchbauer-Müller et al., 2001). Im Gegensatz zu genetischen Mutationen sind Epimutationen reversibel und können beispielsweise durch Inhibition der DNA-Methylierung wieder ausgelöscht werden. Diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit bei *CUTL1* nicht untersucht.

Es besteht darüber hinaus die Möglichkeit, daß in dieser Arbeit Mutationen im *CUTL1* Gen nicht gefunden wurden, da dieses Gen nur in einem geringen Prozentsatz der Patienten mutiert sein könnte. In diesem Fall wäre es denkbar, daß ich aufgrund einer zu geringen Probenzahl keine Mutationen identifiziert habe.

Auch wenn *CUTL1* als haploinsuffizientes Gen agieren würde, würde ich mit meinem Analyseansatz keine Mutationen identifizieren. Aktuelle noch unveröffentlichte Arbeiten zielen darauf, murine Regionen, die den humanen kritischen Regionen in Bande 7q22 entsprechen, zu deletieren. Mit dieser Methode könnte es gelingen, auch ein haploinsuffizientes TSG im Mausmodell zu erkennen (Shannon, unveröffentlichte Daten).

#### **4.7. Fazit**

Das häufige Auftreten der Monosomie 7 bei sowohl primären als auch sekundären myeloischen Neoplasien weist darauf hin, daß der Verlust eines oder mehrerer Gene auf Chromosom 7 eine entscheidende Rolle bei der Entstehung dieser Neoplasien haben. Mutationsanalysen in Chromosom 7 Kandidatengenen haben bisher keine

pathologischen Mutationen identifiziert. Diese Arbeit beschreibt die erste Mutationsanalyse des Gens *CUTL1*. Das Fehlen von Mutationen bei 13 Patienten deutet darauf hin, daß *CUTL1* in myeloischen Zellen wahrscheinlich nicht als klassisches TSG oder als Onkogen agiert. Meine Arbeit schließt jedoch nicht die Möglichkeit aus, daß *CUTL1* durch andere, z.B. epigenetische Mechanismen inaktiviert wird. Ferner konnte ich nicht ausschließen, daß *CUTL1* als haploinsuffizientes TSG fungiert. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob möglicherweise eines der übrigen nicht analysierten Gene im Bereich der kritischen Deletionsregion einer Inaktivierung in Leukämiezellen unterliegt. Die Aufklärung der Funktion von molekularen Veränderungen auf Chromosom 7 auf die Wachstumskontrolle hämatopoetischer Zellen wird dazu beitragen, die schlechte Prognose und das mangelhafte Therapieansprechen auf molekularer Ebene zu verstehen. Dies könnte die Entwicklung innovativer gezielter Therapeutika vorantreiben.

## 5. Literaturverzeichnis

- (1) Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ East C; Fourouclas N; Swanton S; Vassiliou GS; Bench AJ, Boyd EM; Curtin N et al. (2005). Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365, 1054 -1061.
- (2) Coqueret O, Berube G, Nepveu A (1998). The mammalian Cut homeodomain protein functions as a cell-cycle-dependent transcriptional repressor which downmodulates p21WAF1/CIP1/SDI1 in S phase. *Embo J* 17, 4680 -4694.
- (3) Coqueret O, Berube G, Nepveu A (1996). DNA binding by cut homeodomain proteins is down-modulated by protein kinase C. *J Biol Chem* 271, 24862 - 24868.
- (4) Curtiss NP, Bonifas JM, Lauchle JO, Balkman JD, Kratz CP, Emerling BM, Green ED, Le Beau MM, Shannon KM (2005). Isolation and analysis of candidate myeloid tumor suppressor genes from a commonly deleted segment of 7q22. *Genomics* 85, 600 -607.
- (5) Ellis T, Gambardella L, Horcher M, Tschanz S, Capol J, Bertram P, Jochum W, Barrandon Y, Busslinger M (2001). The transcriptional repressor CDP (*Cutl1*) is essential for epithelial cell differentiation of the lung and the hair follicle. *Genes Dev* 15, 2307 -2319.
- (6) Emerling BM, Bonifas J, Kratz CP, Donovan S, Taylor BR, Green ED, Le Beau MM, Shannon KM (2002). MLL5, a homolog of *Drosophila trithorax* located within a segment of chromosome band 7q22 implicated in myeloid leukemia. *Oncogene* 21, 4849 -4854.

- (7) Fenaux P, Preudhomme C, Lai JL, Morel P, Beuscart R, Bauters F (1989). Cytogenetics and their prognostic value in de novo acute myeloid leukemia: A report on 283 cases. *Br J Haematol* 73, 61-67.
- (8) Fero ML, Randel E, Gurley KE, Roberts JM, Kemp CJ (1998). The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature* 396, 177 - 180.
- (9) Fischer K, Frohling S, Scherer SW, Brown JM, Scholl C, Stilgenbauer S, Tsui LC, Lichter P, Dohner H (1997). Molecular cytogenetic delineation of deletions and translocations involving chromosome band 7q22 in myeloid leukemias. *Blood* 89, 2036-2041.
- (10) Goulet B, Watson P, Poirier M, Leduy L, Berube G, Meterissian S, Jolicoeur P, Nepveu A (2002). Characterization of a tissue-specific CDP/Cux isoform, p75, activated in breast tumor cells. *Cancer Res* 62, 6625 -6633.
- (11) Harada R, Berube G, Tamplin OJ, Denis-Larose C, Nepveu A (1995). DNA-binding specificity of the cut repeats from the human cut-like protein. *Mol Cell Biol* 15, 129 -140.
- (12) Hasle H, Arico M, Basso G et al. (1999). Myelodysplastic syndrome, juvenile myelomonocytic leukemia, and acute myeloid leukemia associated with complete or partial monosomy 7. European Working Group on MDS in Childhood (EWOG-MDS). *Leukemia* 13, 376 -385.
- (13) Hayashi K und Yandell DW (1993). How sensitive is PCR-SSCP?  
  
*Hum Mutat* 2, 338-346

- (14) Inoue K, Zindy F, Randle DH, Rehg JE, Sherr CJ (2001). Dmp1 is haplo-insufficient for tumor suppression and modifies the frequencies of Arf and p53 mutations in Myc-induced lymphomas. *Genes Dev* 15, 2934 -2939.
- (15) Ishwad CS, Ferrell RE, Hanley K, Davare J, Meloni AM, Sandberg AA, Surti U (1997). Two discrete regions of deletion at 7q in uterine leiomyomas. *Genes Chromosomes Cancer* 19, 156 -160.
- (16) James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W (2005). A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434, 1144 -1148.
- (17) Jones PA, Baylin SB (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3, 415 -428.
- (18) Kardos G, Baumann I, Passmore SJ, Locatelli F, Hasle H, Schultz KR, Stary J, Schmitt-Graeff A, Fischer A, Harbott J, Chessells JM, Hann I, Fenu S, Rajnoldi AC, Kerndrup G, Van Wering E, Rogge T, Nollke P, Niemeyer CM (2003). Refractory anemia in childhood: a retrospective analysis of 67 patients with particular reference to monosomy 7. *Blood* 102; 1997 -2003.
- (19) Kere J, Ruutu T, Davies KA, Roninson IB, Watkins PC, Winqvist R, de la Chapelle A (1989). Chromosome 7 long arm deletion in myeloid disorders: a narrow breakpoint region in 7q22 defined by molecular mapping. *Blood* 73, 230 -234.

- (20) Kere J, Ruutu T, Lahtinen R, de la Chapelle A (1987). Molecular characterization of chromosome 7 long arm deletions in myeloid disorders. *Blood* 70, 1349 -1353.
- (21) Knudson AG (1993). All in the (cancer) family. *Nat Genet* 5, 103 -104.
- (22) Knudson AG (1971). Mutation and Cancer - Statistical Study of Retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68, 820.
- (23) Komminoth P, Kunz E, Hiort O, Schroder S, Matias-Guiu X, Christiansen G, Roth J, Heitz PU (1994). Detection of RET proto-oncogene point mutations in paraffin-embedded pheochromocytoma specimens by nonradioactive single-strand conformation polymorphism analysis and direct sequencing. *Am J Pathol* 145, 922-929.
- (24) Kratz C, Emerling BM, Donovan S, Laig-Webster M, Taylor BR, Thompson P, Jensen S, Banerjee A, Bonifas J, Makalowski W, Green ED, Le Beau MM, Shannon KM (2000). A physical and transcript map of a 2 MB commonly deleted segment of 7q22 identified in myeloid malignancies. *Blood* 96, 704a.
- (25) Kratz CP, Emerling BM, Donovan S, Laig-Webster M, Taylor BR, Thompson P, Jensen S, Banerjee A, Bonifas J, Makalowski W, Green ED, Le Beau MM, Shannon KM (2001). Candidate gene isolation and comparative analysis of a commonly deleted segment of 7q22 implicated in myeloid malignancies. *Genomics* 77, 171-180.
- (26) Kratz CP, Emerling BM, Bonifas J, Wang W, Green ED, le Beau MM, Shannon KM (2002). Genomic structure of the PIK3CG gene on chromosome band

- 7q22 and evaluation as a candidate myeloid tumor suppressor. *Blood* 99, 372 -374.
- (27) Le Beau MM, Albain KS, Larson RA, Vardiman JW, Davis EM, Blough RR, Golomb HM, Rowley JD (1986). Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes and acute nonlymphocytic leukemia: further evidence for characteristic abnormalities of chromosomes no. 5 and 7. *J Clin Oncol* 4, 325 -345.
- (28) Le Beau MM, Espinosa R, III, Davis EM, Eisenbart JD, Larson RA, Green ED (1996). Cytogenetic and molecular delineation of a region of chromosome 7 commonly deleted in malignant myeloid diseases. *Blood* 88, 1930 -1935.
- (29) Ledford AW, Brantley JG, Kemeny G, Foreman TL, Quaggin SE, Igarashi P, Oberhaus SM, Rodova M, Calvet JP, Van den Heuvel GB (2002). Deregulated expression of the homeobox gene Cux-1 in transgenic mice results in downregulation of p27(kip1) expression during nephrogenesis, glomerular abnormalities, and multiorgan hyperplasia. *Dev Biol* 245, 157 -171.
- (30) Levine AJ (1993). The tumor suppressor genes. *Annu Rev Biochem* 62, 623 - 651.
- (31) Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Frohling S, Dohner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG (2005). Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7, 387 -397.

- (32) Liang H, Fairman J, Claxton DF, Nowell PC, Green ED, Nagarajan L (1998). Molecular anatomy of chromosome 7q deletions in myeloid neoplasms: evidence for multiple critical loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3781 -3785.
- (33) Locatelli F, Nollke P, Zecca M, Korthof E, Lanino E, Peters C, Pession A, Kabisch H, Uderzo C, Bonfim CS, Bader P, Dilloo D, Stary J, Fischer A, Revesz T, Fuhrer M, Hasle H, Trebo M, van den Heuvel-Eibrink MM, Fenu S, Strahm B, Giorgiani G, Bonora MR, Duffner U, Niemeyer CM (2005). Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML): results of the EWOG-MDS/EBMT trial. *Blood* 105, 410 -419.
- (34) Luna-Fineman S, Shannon KM, Lange BJ (1995). Childhood monosomy 7: epidemiology, biology and mechanistic implications. *Blood* 85, 1985 -1999.
- (35) Luong MX, van der Meijden CM, Xing D, Hesselton R, Monuki ES, Jones SN, Lian JB, Stein JL, Stein GS, Neufeld EJ, van Wijnen AJ (2002). Genetic ablation of the CDP/Cux protein C terminus results in hair cycle defects and reduced male fertility. *Mol Cell Biol* 22, 1424 -1437.
- (36) Michl P, Ramjaun AR, Pardo OE, Warne PH, Wagner M, Poulsom R, D'Arrigo C, Ryder K, Menke A, Gress T, Downward J (2005). *CUTL1* is a target of TGF $\beta$  signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness. *Cancer Cell* 7, 521 -532.
- (37) Nepveu A (2001). Role of the multifunctional CDP/Cut/Cux homeodomain transcription factor in regulating differentiation, cell growth and development. *Gene* 270, 1-15.

- (38) Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989a). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2766 -2770.
- (39) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989b). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5, 874 -879.
- (40) Pedersen-Bjergaard J, Specht L, Larsen SO, Ersboll J, Struck J, Hansen MM, Hansen HH, Nissen NI (1987). Risk of therapy-related leukemia and preleukemia after Hodgkin's disease. *Lancet* 2, 83-88
- (41) Pedersen-Bjergaard J, Philip P (1991). Two different classes of therapy-related and de-novo acute myeloid leukemia? *Cancer Genet Cytogenet* 55, 119-124.
- (42) Pedersen-Bjergaard J, Rowley JD (1994). The balanced and the unbalanced chromosome aberrations of acute myeloid leukemia may develop in different ways and may contribute differently to malignant transformation. *Blood* 83, 2780 -2786.
- (43) Rong ZW, Soucie E, Sung MN, Sung Moon N, Martin-Soudant N, Berube G, Leduy L, Nepveu A (2000). Exon/intron structure and alternative transcripts of the *CUTL1* gene. *Gene* 241, 75 -85.
- (44) Santaguida M, Ding Q, Berube G, Truscott M, Whyte P, Nepveu A (2001). Phosphorylation of the CCAAT displacement protein (CDP)/Cux transcription factor by cyclin A-Cdk1 modulates its DNA binding activity in G(2). *J Biol Chem* 276, 45780 -45790

- (45) Shannon K, Van Etten RA (2005). JAKing up hematopoietic proliferation. *Cancer Cell* 7, 291 -293.
- (46) Sinclair AM, Lee JA, Goldstein A, Xing D, Liu S, Ju R, Tucker PW, Neufeld EJ, Scheuermann RH (2001). Lymphoid apoptosis and myeloid hyperplasia in CCAAT displacement protein mutant mice. *Blood* 98, 3658 -3667.
- (47) Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, Hutchings S, Tan X, Kufrin D, Ratajczak J, Resende IC, Haworth C, Hock R, Loh M, Felix C, Roy DC, Busque L, Kurnit D, Willman C, Gewirtz AM, Speck NA, Bushweller JH, Li FP, Gardiner K, Poncz M, Maris JM, Gilliland DG (1999). Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet* 23, 166 -175.
- (48) Thirman MJ, Larson RA (1996). Therapy-related myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 10, 293 -320.
- (49) Tosi S, Scherer SW, Giudici G, Czepulkowski B, Biondi A, Kearney L (1999). Delineation of multiple deleted regions in 7q in myeloid disorders. *Genes Chromosomes & Cancer* 25, 384-392.
- (50) Troup S, Njue C, Kliewer EV, Parisien M, Roskelley C, Chakravarti S, Roughley PJ, Murphy LC, Watson PH (2003). Reduced expression of the small leucine-rich proteoglycans, lumican, and decorin is associated with poor outcome in node-negative invasive breast cancer. *Clin Cancer Res* 9, 207 - 214.

- (51) Truscott M, Raynal L, Premdas P, Goulet B, Leduy L, Berube G, Nepveu A (2003). CDP/Cux stimulates transcription from the DNA polymerase alpha gene promoter. *Mol Cell Biol* 23, 3013 -3028.
- (52) van Wijnen AJ, van Gurp MF, de Ridder MC, Tufarelli C, Last TJ, Birnbaum M, Vaughan PS, Giordano A, Krek W, Neufeld EJ, Stein JL, Stein GS (1996). CDP/cut is the DNA-binding subunit of histone gene transcription factor HiNF-D: a mechanism for gene regulation at the G1/S phase cell cycle transition point independent of transcription factor E2F. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11516 -11521.
- (53) Venkatachalam S, Shi YP, Jones SN, Vogel H, Bradley A, Pinkel D, Donehower LA (1998). Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation. *Embo J* 17, 4657 -4667.
- (54) Weinberg RA (1991). Tumor suppressor genes. *Science* 254, 1138 -1146.
- (55) Zeng WR, Scherer SW, Koutsilieris M, Huizenga JJ, Filteau F, Tsui LC, Nepveu A (1997). Loss of heterozygosity and reduced expression of the *CUTL1* gene in uterine leiomyomas. *Oncogene* 14, 2355 -2365.
- (56) Zeng WR, Watson P, Lin J, Jothy S, Lidereau R, Park M, Nepveu A (1999). Refined mapping of the region of loss of heterozygosity on the long arm of chromosome 7 in human breast cancer defines the location of a second tumor suppressor gene at 7q22 in the region of the *CUTL1* gene. *Oncogene* 18, 2015 -2021.

- (57) Zochbauer-Muller S, Fong KM, Maitra A, Lam S, Geradts J, Ashfaq R, Virmani AK, Milchgrub S, Gazdar AF, Minna JD (2001). 5' CpG island methylation of the FHIT gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer. *Cancer Res* 61, 3581 -3585.

## 6. Zusammenfassung

### Genetische Analyse zur Rolle des *CUTL1* Gens auf Chromosom 7 Bande q22 bei Patienten mit myeloischen Neoplasien und Monosomie 7

Der komplette Verlust von Chromosom 7 (Monosomie 7) oder eine Deletion des langen Arms von Chromosom 7 (Deletion 7q) gehören zu den häufigsten zytogenetischen Veränderungen bei Patienten mit myeloischen Neoplasien. Da Bande 7q22 von den meisten 7q-Deletionen betroffen ist, wird hier ein Tumorsuppressorgen für myeloische Neoplasien vermutet.

Im Bereich häufig beschriebener Deletionsregionen innerhalb Chromosom 7 Bande q22 liegt das Gen *CUTL1*. Das *CUTL1* Genprodukt, CDP, ist ein an Regulation von Zellwachstum, Entwicklung und Zellzyklusprogression beteiligter Transkriptionsregulator. Die Aktivität von *CUTL1* ist mit einer gesteigerten Migration und Invasion von Tumorzelllinien assoziiert. Aufgrund der Lokalisation sowie der Rolle bei der Transformation stellt *CUTL1* ein Kandidatengen für myeloische Neoplasien mit Monosomie 7 dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine SSCP basierte *CUTL1* Mutationsanalyse an DNA aus 13 Leukämieproben mit myeloischen Neoplasien und 7q-Aberrationen durchgeführt. Auffällige PCR-Produkte, deren Einzelstränge ein vom Wildtyp abweichendes Wanderungsmuster aufwiesen, wurden nach Alleltrennung durch Klonierung unter Anwendung eines automatisierten Verfahrens sequenziert.

Dabei fanden sich keine pathologischen Mutationen. In Exons 13, 14 und 20 konnte jeweils ein konservativer Basenaustausch identifiziert werden, ein Aminosäurenwechsel fand jedoch nicht statt. Bei den gefundenen Basenveränderungen handelt es sich am ehesten um Polymorphismen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, daß Mutationen im *CUTL1* Gen nicht an der Pathogenese myeloischer Neoplasien beteiligt sind.

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. U. Göbel, Direktor der Klinik für Kinder -Onkologie, -Hämatologie, und –Immunologie, für die Möglichkeit, meine Dissertation in Kooperation mit PD Dr. med. C. Kratz, jetzt Oberarzt der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Freiburg, durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gebührt PD Dr. med. C. Kratz für die Bereitstellung des Themas, seine stets vorhandene Diskussionsbereitschaft sowie seine engagierte Unterstützung bei der Niederschrift der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. U. Germing aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferates.

Ein besonderes Dankeschön gilt Herrn Dr. rer. nat. O. Feyen für seine uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und wertvollen Ratschläge sowie allen Mitarbeitern des KMT-Labors für das freundliche Arbeitsklima, das zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen hat.

Von Herzen möchte ich meiner Familie, meinem Freund Lars und meinen Freunden danken, die mich immer auf meinem Weg unterstützt haben. Vielen lieben Dank.

## Curriculum Vitae

### Persönliche Angaben:

Name:	Simone Hindersin
Geburtsdatum	02. Juli 1978
Geburtsort	Marburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Schulbildung:

1985- 1989	Grundschule in Wuppertal
1989- 1998	Wilhelm-Dörpfeld-Gymnasium, Wuppertal
	Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulbildung:

Oktober 1998- April 2005	Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (HHU) Drittes Staatsexamen im April 2005
--------------------------	--

### Praktisches Jahr:

April 2004- März 2005	HNO	Universitätsklinik Düsseldorf
	Chirurgie	Universitätsklinik Düsseldorf Allgemein- und Viszeralchirurgie Thorax- und Kardiochirurgie
	Innere Medizin	Spital Wetzikon (Schweiz)

### Promotion:

seit Mai 2002	Experimentelle Arbeit im KMT-Labor des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin, Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf; Prof. U. Göbel
---------------	---

### Aktuelle Tätigkeit:

seit Juli 2005	wissenschaftliche Mitarbeiterin der HNO-Klinik der Universitätsklinik Düsseldorf
----------------	---

*Düsseldorf, im Juni 2006*

## **Genetische Analyse zur Rolle des *CUTL1* Gens auf Chromosom 7 Bande q22 bei Patienten mit myeloischen Neoplasien und Monosomie 7**

Simone Hindersin

Der komplette Verlust von Chromosom 7 (Monosomie 7) oder eine Deletion des langen Arms von Chromosom 7 (Deletion 7q) gehören zu den häufigsten zytogenetischen Veränderungen bei Patienten mit myeloischen Neoplasien. Da Bande 7q22 von den meisten 7q-Deletionen betroffen ist, wird hier ein Tumorsuppressorgen für myeloische Neoplasien vermutet.

Im Bereich häufig beschriebener Deletionsregionen innerhalb Chromosom 7 Bande q22 liegt das Gen *CUTL1*. Das *CUTL1* Genprodukt, CDP, ist ein an Regulation von Zellwachstum, Entwicklung und Zellzyklusprogression beteiligter Transkriptionsregulator. Die Aktivität von *CUTL1* ist mit einer gesteigerten Migration und Invasion von Tumorzelllinien assoziiert. Aufgrund der Lokalisation sowie der Rolle bei der Transformation stellt *CUTL1* ein Kandidatengen für myeloische Neoplasien mit Monosomie 7 dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine SSCP basierte *CUTL1* Mutationsanalyse an DNA aus 13 Leukämieproben mit myeloischen Neoplasien und 7q-Aberrationen durchgeführt. Auffällige PCR-Produkte, deren Einzelstränge ein vom Wildtyp abweichendes Wanderungsmuster aufwiesen, wurden nach Alleltrennung durch Klonierung unter Anwendung eines automatisierten Verfahrens sequenziert.

Dabei fanden sich keine pathologischen Mutationen. In Exons 13, 14 und 20 konnte jeweils ein konservativer Basenaustausch identifiziert werden, ein Aminosäurenwechsel fand jedoch nicht statt. Bei den gefundenen Basenveränderungen handelt es sich am ehesten um Polymorphismen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, daß Mutationen im *CUTL1* Gen nicht an der Pathogenese myeloischer Neoplasien beteiligt sind.



Prof. Dr. med. U. Göbel