

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde
-Pädiatrische Hämatologie und Onkologie-
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. Heribert Jürgens-

**‘Single Nucleotide Polymorphisms’
des Asparaginsynthetase-Gens**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Catrin Frodermann, geb. Plewe

aus Detmold

2010

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Joachim Boos

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Steffen Koschmieder

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2010

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde
-Pädiatrische Hämatologie und Onkologie-
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. Heribert Jürgens-
Referent: Univ.-Prof. Dr. Joachim Boos
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Steffen Koschmieder

Zusammenfassung

'Single Nucleotide Polymorphisms' des Asparaginsynthetase-Gens

von Catrin Frodermann, geb. Plewe

'Single nucleotide Polymorphisms' (SNPs) spielen in der Pharmakogenetik eine immer größere Rolle. Medikamentennebenwirkungen aufgrund individueller Verstoffwechslung von Pharmaka lassen sich zum Teil auf Genpolymorphismen einzelner Enzyme zurückführen. In der Therapie der ALL und des NHL kommt die Asparaginase (ASPase) zum Einsatz. Die unterschiedlich starke zytotoxische Wirkung von ASPase auf verschiedene hämato-onkologische Krankheitsbilder wird in Zusammenhang mit unterschiedlicher Expression und Aktivität des Enzyms Asparaginsynthetase (AS) gebracht. In dieser Untersuchung wurden Methoden zum Nachweis von drei nicht-synonymen SNPs im AS-Gen etabliert. Mit Hilfe von Restriktionsenzymen wurden die Vorkommen der SNP rs1049674 und rs3179866 des Gens der AS untersucht. Der SNP rs2070159 wurde mittels Allelspezifischer-Real-Time-PCR analysiert, da kein passendes Restriktionsenzym zum Nachweis eines Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus vorhanden war. Das Untersuchungsmaterial entstammte 36 pädiatrisch hämato-onkologischen Patienten, die eine ASPase-Therapie erhielten und teilweise Nebenwirkungen erlitten, acht leukämischen Zelllinien sowie einem Kontrollkollektiv aus 31 erwachsenen Blutspendern. Die SNPs rs2070159 und rs3179866 ließen sich in keiner der Proben nachweisen. Der SNP rs1049674 war bezogen auf alle DNA-Proben zu 48 %, im hämato-onkologischen Kollektiv zu 44 % und im Kontrollkollektiv zu 48 % vorhanden. Im Nebenwirkungskollektiv ergab sich eine SNP-Rate von 60 %, im Kollektiv der nebenwirkungsfreien Patienten hingegen nur von 20 %. Von 13 heterozygoten DNA-Proben wurden in 12 Fällen beide Allele transkribiert. Nur eine Hybridleukämie zeigte die alleinige Transkription des SNP tragenden Allels. Eine Korrelation von ASPase-Resistenz, AS-Expressionslevel und SNP der AS konnte nicht gefunden werden. Diese Studie offenbart eine hohe Prävalenz des SNP rs1049674. Das deutliche Signal der Häufung des SNP rs1049674 im Nebenwirkungskollektiv sollte anhand einer größeren Fallzahl überprüft werden. Im Fall der Assoziation von ASPase-Nebenwirkungen und dem Vorhanden sein des SNP rs1049674, könnte der SNP-Nachweis im Vorfeld der ASPase-Therapie Patienten mit einem erhöhten Risiko für ASPase-assoziierte Nebenwirkungen identifizieren.

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2010

Soli Deo Gloria

1	EINLEITUNG	1
1.1	Asparaginase.....	1
1.2	Nebenwirkungen der Asparaginase-Therapie.....	3
1.3	Asparaginsynthetase	4
1.4	Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs).....	8
1.5	Zielsetzung dieser Doktorarbeit.....	11
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Theoretischer Hintergrund der für diese Studie verwendeten Methoden	13
2.1.1	Die Polymerasekettenreaktion (PCR).....	13
2.1.2	Restriktionsverdau.....	13
2.1.3	Allel-spezifische PCR mit SNP-spezifischen fluoreszenzmarkierten Sonden	14
2.1.4	Sequenzierung	16
2.2	Untersuchungsmaterial.....	17
2.2.1	DNA leukämischer Zelllinien	17
2.2.2	DNA aus peripheren Leukozyten von pädiatrischen Patienten, die an einer Leukämie oder einem Lymphom erkrankt waren	18
2.2.3	DNA und RNA aus peripheren Leukozyten von erwachsenen Blutspendern	18
2.3	Materialien.....	18
2.3.1	Chemikalien/Kits.....	19
2.3.2	Primer	20
2.4	Versuchsprotokolle.....	21
2.4.1	Herstellung der Reagenzien, Puffer und Gele für die Elektrophorese	21
2.4.2	DNA-Isolation	23
2.4.3	RNA-Isolation	23
2.4.4	cDNA-Synthese.....	24
2.4.5	Allelspezifische-Real-Time-PCR.....	25
2.5	Statistik.....	25
3	ERGEBNISSE.....	26
3.1	Etablierung der Methoden	26
3.1.1	SNP rs1049674 (SNP rs3179866) PCR mit DNA	26
3.1.2	SNP rs1049674 (SNP rs3179866) PCR mit cDNA.....	27
3.1.3	Restriktionsverdau von DNA zur Detektion von SNP rs1049674 mit Rsa I.....	28
3.1.4	Restriktionsverdau zur Detektion des SNP rs3179866 mit Taq I.....	34
3.1.5	Sequenzierung von PCR-Produkten.....	39

3.2	Vorkommen des SNP rs1049674 des Asparaginsynthetasegens in DNA und cDNA peripherer Leukozyten erwachsener Blutspender (Kontrollkollektiv).....	44
3.3	Vorkommen des SNP rs1049674 des Asparaginsynthetasegens in DNA und cDNA peripherer Leukozyten von pädiatrisch hämato-onkologischen Patienten, die sich in Remission befanden	46
3.4	Vorkommen des SNP rs1049674 des Asparaginsynthetasegens in peripheren Leukozyten von pädiatrisch hämato-onkologischen Patienten, die an Nebenwirkungen unter Asparaginasetherapie litten	49
3.5	Vorkommen des SNP rs1049674 des Asparaginsynthetasegens in Zelllinien	50
3.6	Vorkommen der SNP rs3179866 und rs2070159 des Asparaginsynthetasegens	51
3.7	Allelverteilung des SNP rs1049674 der verschiedenen analysierten Kollektive	54
4	DISKUSSION	56
5	ZUSAMMENFASSUNG	65
6	LITERATURVERZEICHNIS	67
	LEBENS LAUF	75
	DANKSAGUNG	76
	ANHANG	I

1 Einleitung

Die akuten lymphatischen Leukämien (ALL) gehören zu den häufigsten malignen Tumorerkrankungen des Kindesalters. Durch die Einführung der Polychemotherapie konnten die Heilungschancen bei Kindern mit ALL deutlich gebessert werden. Die Fünfjahresüberlebensrate der ALL im Kindesalter liegt derzeit bei ca. 80 %. Ein wichtiges Medikament bei der Behandlung der ALL und auch des Non-Hodgkin-Lymphoms ist das Enzym Asparaginase (ASPase).

1.1 Asparaginase

Auf der Suche nach Besonderheiten neoplastischer Zellen ist der Asparaginstoffwechsel der Lymphomzelllinien ein klinisch relevanter Ansatzpunkt. Als Kidd et al. 1953 entdeckten, dass Meerschweinenserum auf Lymphome von Ratten und Mäusen zytotoxisch wirkt, legten sie den Grundstein dieses Zweigs der Antitumortherapie [40]. In dem Wissen, dass Meerschweinenserum hohe ASPase-Spiegel aufweist [16], untersuchten Broom et al. den genauen Wirkmechanismus des Serums und kamen 1961 zu dem Schluss, dass die ASPase des Meerschweinenserums für dessen Zytotoxizität verantwortlich ist [9]. Bei der anschließenden Suche nach Quellen für die ASPase-Gewinnung wurde man bei mehreren Mikro- und Makroorganismen fündig. Beispiele hierfür sind *Penicillium camemberti*, *Aspergillus niger*, Hefen, *Mycobacterium Phlei*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus coagulans*, *Brucella abortus*, *Serratia marcescens*, *Erwinia caratovora*, einige Fischarten, Vögel, Nagetiere, Schweine und Pferde [1]. Ein weiterer Durchbruch in der Erforschung der ASPase gelang allerdings erst 1964, als Mashburn und Wriston nachweisen konnten, dass auch die *Escherichia coli*-ASPase (*E. Coli*-ASPase) einen Antitumoreffekt aufweist [46]. Diese Entdeckung machte eine weitere Erforschung des zytostatischen Effekts der ASPase wesentlich einfacher, da mehr Enzym zur klinischen und präklinischen Testung zur Verfügung stand. Die nähere Betrachtung ergab, dass *E. coli* zwei ASPasen exprimiert, von denen nur eine zur Antilymphomtherapie geeignet ist. Eine Auftrennung der *E. coli*-ASPase mittels Chromatographie auf einem DEAE-Zellulosegel ergibt zwei Peaks. Nur die Peak-I-ASPase hat ein pH-Optimum (pH 6,3 - 8,6), das sich auf Grund der Annäherung an den menschlichen Blut-pH-Wert zur Antilymphomtherapie eignet [62]. Rein biochemisch betrachtet katalysiert die ASPase die Hydrolyse der Aminosäure L-Asparagin zu Asparaginsäure und Ammoniak [14]. Durch die Hydrolyse kommt es zu einer Verarmung des Extrazellulärraums an Asparagin. Damit werden Zellen und Gewebe von der exogenen Zufuhr von Asparagin abgeschnitten. In Zellen, die diesem Mangel nicht durch die Synthese von Asparagin begegnen können, kommt es zu einer Verarmung von Asparagin.

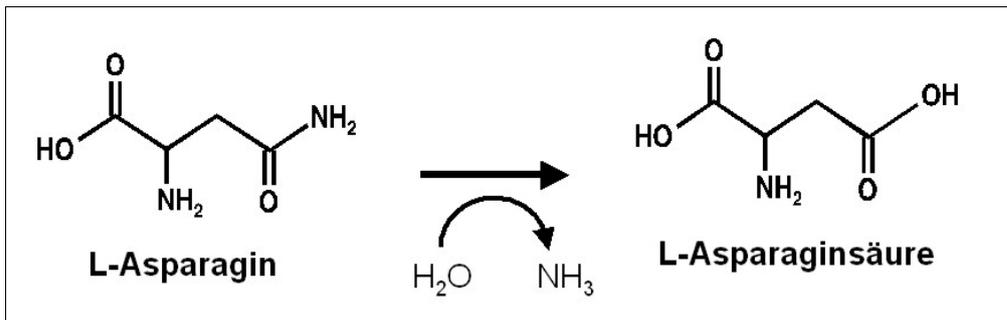


Abbildung 1: Die Asparaginase katalysiert den Abbau von L-Asparagin zu L-Asparaginsäure und Ammoniak

Wie bereits erwähnt ist die ASPase heutzutage ein wesentlicher Bestandteil der ALL-Therapie im Kindesalter. Durch alleinige Anwendung von ASPase lassen sich 60-80 % der erkrankten Kinder in eine komplette Remission bringen. Durch Kombination mit Vincristin und Prednisolon lässt sich die Zahl der kompletten Remissionen sogar auf 95 % steigern [23, 36]. Diese erfreulichen Zahlen werden durch die hohe Anzahl an Rezidiven relativiert, welche dann häufig ASPase-resistent sind.

Auf zellbiologischer Ebene konnten verschiedene zytotoxische Effekte der ASPase-Therapie festgestellt werden. Diskutiert wird eine unmittelbare Inhibition der Protein-Biosynthese (PBS) und zeitlich verzögert auch eine Inhibition der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Ribonukleinsäure (RNA) Synthese ausgelöst durch Asparaginmangel [68]. Ueno et al. beschrieben einen Einfluss der ASPase auf den Zellzyklus. Sensible Zellen arretierten scheinbar induziert durch einen Asparaginmangel in der G1-Phase und gingen dann in die Apoptose über [74, 76].

Unabhängig von der Therapie mit ASPase zeigten Studien über Signaltransduktionswege in der Apoptose, dass diese im Falle eines DNA-Schadens oder auch Wachstumsfaktorenmangels durch das Tumorsupressorgen p53 reguliert wird [49].

Ryan et al. konnten nachweisen, dass erythroleukämische Zellen von Nagetieren unter Isoleucindeprivation nicht in die Apoptose übergingen, wenn sie durch Mutation kein p53 exprimierten [64]. Auch ein Anstieg der Aktivität der sauren und alkalischen Ribonuklease unter ASPase-Therapie konnte nachgewiesen werden [47, 48].

Woods et al. beschrieben einen direkten Zusammenhang der Synthese von Pyrimidin mit Asparagin [79]. Ein weiterer Ansatzpunkt der Toxizität von ASPase stellt die Abnahme der Glycinkonzentration in ASPase-sensiblen Tumorzellen dar. Dies wirkt sich negativ auf die Purinbiosynthese aus. In ASPase-resistenten Zellen war eine Abnahme der Glycinkonzentration und damit eine negative Auswirkung auf die Purinbiosynthese nicht nachweisbar [65, 66].

Kessel et al. untersuchten die Wirkung der ASPase-Therapie auf Zellmembranen und die Glycoproteinsynthese. Asparaginy-Glycoproteine gehören zu den gewöhnlichen Bestandteilen von Zellmembranen. Unter ASPase-Therapie wird die Synthese von Asparaginy-Glycoproteinen inhibiert. Es besteht somit die Hypothese, dass es durch den Asparaginy-Glycoproteinmangel bei ASPase-sensiblen Zellen zu Membranstabilitäts- bzw. synthesesstörungen kommt, was sich auf Zellen mit hohen Teilungsraten besonders negativ auswirkt. Bei ASPase-resistenten Zellen spielen die Asparaginy-Glycoproteine kaum bis gar keine Rolle im Aufbau der Zellmembran [7, 39]. Folglich muss eine stabile Zellmembran anscheinend nicht unbedingt Asparaginy-Glycoproteine enthalten und ist damit nicht so anfällig für eine ASPase-Therapie und die Verminderung der Asparaginy-Glycoproteine.

Broome et al. schreiben der intrazellulären Akkumulation von L-Aspartat um das 12fache unter ASPase-Therapie eine zytotoxische Wirkung zu. Hohe intrazelluläre Konzentrationen an L-Aspartat haben inhibitorische Effekte auf den Zellenergiehaushalt [10, 11].

Durch mehrere Zelllinienstudien konnte gezeigt werden, dass die ASPase-Resistenz im Zusammenhang mit erhöhter Asparaginsynthetase-Aktivität einiger Zelllinien steht [41, 55].

Dies konnte auch im Rahmen von Therapieerfolgen bei Tumoren mit niedriger Asparaginsynthetase-Aktivität und den dementsprechenden schlechten Therapieergebnissen bei Tumoren mit hoher Asparaginsynthetase-Aktivität bestätigt werden [35, 51].

Die Wirkungsweisen der ASPase sind komplex und vielschichtig. Die dargestellten unterschiedlichen Hypothesen könnten synergistische Effekte auf die zytostatische Wirkung der ASPase haben. Ein einzelner Wirkmechanismus ist offenbar nicht allein verantwortlich und aufgrund der bisher existierenden Forschungsergebnisse nicht sehr wahrscheinlich. Die Funktion der Asparaginsynthetase scheint jedoch eine zentrale Rolle zu spielen, da sie als Gegenspieler der ASPase fungiert.

1.2 Nebenwirkungen der Asparaginase-Therapie

Unter Therapie mit ASPase wurden verschiedene unerwünschte Nebenwirkungen beschrieben. Neben allgemein gültigen Dosis-Wirkungsbeziehungen zu einzelnen Nebenwirkungen entwickeln empfindliche Patienten schon bei relativ geringen ASPase-Dosen schwere Nebenwirkungen. Dies scheint mit einer individuellen Reaktion dieser Patienten auf das fremde Protein zusammenzuhängen. Allergische Reaktionen nehmen unter Umständen vital bedrohliche Ausmaße an. Auch der Asparaginmangel und der dadurch ausgelöste zelluläre Stress durch die erschwerte Proteinsynthese spielen eine Rolle in der Genese von Nebenwirkungen [13]. Die eingeschränkte Proteinsynthese und reduzierte metabolische

Aktivität der Leber kann zu starken Hypoalbuminämien führen [13, 30], wobei die Entwicklung massiver Anasarca beschrieben wurde. Auch ein Mangel an hepatisch synthetisierten Gerinnungsfaktoren wie zum Beispiel Antithrombin III ist beschrieben worden [30].

Pankreatitiden unterschiedlichster Schweregrade können durch die mangelnde Proteinsynthese auch ohne erhöhte Serum-Amylase und Lipase in Erscheinung treten [13, 30].

Die Entstehung eines reversiblen Diabetes mellitus wird auf mehrere Ursachen zurückgeführt. So wird zum einen diskutiert, dass es zu einer verminderten Bildung von Insulin in Folge der reduzierten Proteinsynthese kommt. Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Vermutung, dass durch die ASPase die Freisetzung von Glukose aus der Leber beeinflusst wird.

1.3 Asparaginsynthetase

Das Enzym Asparaginsynthetase (AS) katalysiert die Bildung von L-Asparagin (siehe Abbildung 2) [14].

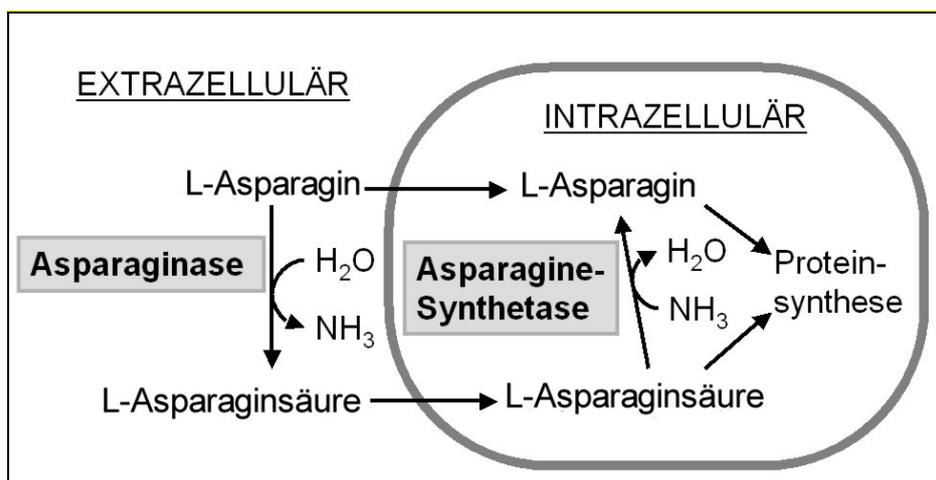


Abbildung 2: Schematische Darstellung des enzymatisch katalysierten L-Asparaginstoffwechsels

Die Expression der AS wird von zwei verschiedenen 'nutrient-sensing response elements' (NSRE), welche sich im Bereich -68 bis -60 (NSRE-1) [31] und im Bereich -48 bis -43 (NSRE-2) der Promotorregion der AS befinden, reguliert. Zusammen bilden sie die 'nutrient-sensing response unit' (NSRU) [4, 5].

Beide NSRE liegen in cis Konfiguration vor und sind nur 11 Basenpaare (bp) beziehungsweise eine DNA-Windung voneinander entfernt [12]. Die Distanz von 11 bp zwischen NSRE 1 und 2 scheint für die Funktionalität des NSRU absolut notwendig und legt die Hypothese einer spezifischen Multiproteinbindung zur Enzyminduktion nahe. Auch ist bekannt, dass die Funktionalität des NSRU nicht an die AS-Promoterregion gebunden ist [83].

Durch Modifikation der NSRE 1-Gensequenz an verschiedenen Stellen fand ein Erlöschen der Reagibilität des NSRE 1 auf Aminosäurenmangel statt [24, 31, 67].

Das NSRE 2 ist unter anderem als Verstärker zu NSRE 1 zu sehen, da das NSRE 1 alleine funktional schwach ist [12]. Die beschriebene spezifische Konfiguration der NSRU des AS-Gens lässt sich erstaunlicherweise in vielen Säugergenomen nachweisen [83]. Der genaue Mechanismus der Induktion der AS ist noch unklar.

Bei Asparagin-unabhängigen (prototrophen) Zellen gibt es verschiedene Trigger für eine Erhöhung der AS-Expression. So scheint der Mangel an mehreren Aminosäuren (wie zum Beispiel Asparagin, Cystein, Glutamin, Histidin, Isoleucin, Leucin und Methionin [24, 29]) als auch eine Unterversorgung von einigen Zuckern (wie Fruktose, Galaktose, Mannose, 2-Deoxyglukose und Xylitol) Auslöser für eine erhöhte Expression der AS zu sein [6].

Verschiedene Regulationsmechanismen der AS werden derzeit intensiv untersucht. Erstaunlicherweise induziert der Mangel an nur einer Aminosäure, wie zum Beispiel Histidin, die AS stärker als ein gleichzeitiger Mangel an allen 20 Aminosäuren [3].

Weitere Komponenten in der Signalkaskade scheinen der 'Activating Transcription Factor 4' (ATF4) und das 'CCAAT/Enhancer Binding Protein β ' (C/EBP β) zu sein. Durch Einsatz einer inhibitorischen dominant negativen ATF4-Mutante konnte gezeigt werden, dass sowohl die basale als auch die durch Aminosäurenmangel ausgelöste AS-Induktion geblockt wurde. Durch Nukleotidaustausche an dem NSRE 1 ließ sich darstellen, dass die ATF4-Komplexe zurückgehen und nicht mehr binden können. Dies deutet auf ein Zusammenspiel der ATF4-Komplexe mit dem NSRE 1 hin, wobei das NSRE 1 wie bereits beschrieben sehr spezifisch ist und keinen Basenaustausch toleriert [67]. ATF4-mRNA-Spiegel steigen ebenso wie die der AS-mRNA bei Aminosäure- und Kohlenhydratmangel an [26, 67]. Der AS-mRNA-Spiegel steigt erst nach einer Latenzzeit von ca. 4 Stunden nach Aminosäuren- oder Kohlenhydratmangel mittels spezieller Zellnährmedien, was eine de Novo-Synthese eines Mediators vermuten lässt [3]. Ein in Frage kommender Mediator wäre das ATF4, was in dieser Zeit gebildet werden könnte, bevor die AS-mRNA deutlich ansteigt [67].

Neben dem Anstieg der ATF4-mRNA durch Kohlenhydrat- und Aminosäurenmangel spielt ein weiterer Induktor eine Rolle: das 'Endoplasmatic Reticulum Stress Response Element' (ERSE). Das ERSE wird durch zelluläre Stresssituationen, durch die die Bildung vieler Proteine induziert wird, aktiv, da diese Proteine im Endoplasmatischen Retikulum (ER) akkumulieren. Das ERSE stellt einen intrazellulären Schutzmechanismus dar, der die Überschwemmung des ER mit ungefalteten Proteinen verhindert [12]. Durch die Aktivierung des ERSE wird auch die AS induziert [12].

Diese komplexen Zusammenhänge sind allerdings bisher nur bruchstückhaft bekannt. Ein in sich schlüssiger und zusammenhängender Signaltransduktionsweg zur Induktion der AS ist bisher noch nicht beschrieben.

In menschlichen Zellen kann Asparagin nur über die AS gebildet werden, es gibt keinen Bypass-Mechanismus, es sei denn über die exogene Aufnahme von Asparagin. Gewebe, die eine hohe AS-Aktivität aufweisen, sind durch ihre Autonomie in der Asparagin-Versorgung zum einen selbst ASPase-resistent und zum anderen ein Rückzugsort für ASPase-sensible leukämische Zellen unter Chemotherapie mit ASPase. Als ein solches Organ konnte die Leber von Woods und Handschumacher et al. herausgestellt werden [78]. Auch mesenchymale Zellen des Knochenmarks scheinen Nischen für ASPase-sensible Zellen bilden zu können. Durch die Abgabe von Asparagin an das sie umgebende Gewebe bilden sie einen möglichen Rückzugsort für asparaginabhängige Tumorzellen [38].

Auf zellbiologischem Niveau konnte herausgefunden werden, dass die AS-Expression differenzierter Zellen mit niedriger Teilungsrate geringer ist als bei weniger differenzierten Zellen mit höheren Zellteilungsraten. So zeigte sich bei der Zelllinie HL60, dass durch die experimentell induzierte Ausdifferenzierung der Zellen die AS-Aktivität reduziert werden konnte [34]. Entartete Zellen können trotz hoher Zellteilungsraten jedoch geringe AS-Expressionslevel aufweisen und ASPase-sensitiv sein [34].

Eine mögliche Ursache niedriger AS-Expression ist die Hypermethylierung der CpG-Region des Promoters des AS-Gens. Ren et al. beschreiben einen Zusammenhang zwischen einem spezifischen Protein (Asparaginsynthetase methyl binding protein- ASMB) und der Regulierung der AS durch das NSRU. Die Existenz des ASMB in leukämischen Zellen mit lymphatischem oder auch myeloischem Ursprung ist nicht von deren Methylierungsstatus abhängig. Ist jedoch der AS-Promoter methyliert, so könnte das ASMB um die Bindungsstelle von ATF4 und C/EBP β konkurrieren und zu einer Repression der Expressierung der AS führen [60].

Peng et al. zeigten einen Zusammenhang von niedriger AS-Expression und Hypermethylierung der CpG-Region durch Experimente mit Nagetierzellen, von denen eine Gruppe AS synthetisieren konnten (prototroph) und eine Vergleichsgruppe nicht (auxotroph). Hierbei ließ sich eine Korrelation von mangelnder AS-Expression und Hypermethylierung in auxotrophen Zellen feststellen [54]. Eine partielle Methylierung der Promoterregion des AS-Gens wiesen jedoch auch die prototrophen Zellen auf.

Bei Milzzellen scheint ein Zusammenhang zwischen dem Alter der Zellen und dem Grad der Methylierung zu bestehen. Dieser Zusammenhang von Zellalter und Ausmaß der Methylierung wurde auch von Issa et al. beschrieben [37]. Interessant ist auch die Entdeckung, dass das Ausmaß an DNA-Methylierung organ- bzw. zellspezifisch ist. Leberzellen haben generell eine

wesentlich niedrigere Methylierungsrate als Milzzellen. Dies passt zu der Beobachtung, dass die Leber als asparagin-prototrophes Organ ein Rückzugsort der auxotrophen Lymphomzellen unter ASPase-Therapie ist [78].

Ding et al. beschreiben eine Induktion der AS bei auxotrophen leukämischen Zelllinien durch Zellkontakt zu prototrophen Zellen. Dieser Wandel von auxotrophen zu prototrophen Zellen ließ sich über mehrere Zellgenerationen aufrechterhalten. Mit Beendigung des Zellkontaktes zu prototrophen Zellen jedoch wurden die Zelllinien wieder auxotroph. Parallel zu diesem Phänomen wurde eine Demethylierung der Promoterregion der AS beschrieben, welche im Rahmen des Rückfalls in die Auxotrophie wieder reversibel war [20].

Holleman et al. untersuchten den Zusammenhang von Apoptosefaktoren und zellulärer Resistenz von Chemotherapeutika. Es gibt einen intrinsischen und einen extrinsischen Apoptoseweg. Beide haben jedoch eine gemeinsame Endstrecke und beinhalten daher gemeinsame Apoptosefaktoren. Ein Faktor in der Apoptose ist die 'Poly Adenosine Diphosphate Ribose' (PARP). Die Expression der PARP scheint bei Prednisolon-, Vincristin- und ASPase-resistenten Zellen im Vergleich zu sensiblen Zellen um das Vierfache reduziert zu sein. Dies könnte mitverantwortlich sein für das Unvermögen dieser Zellen, mittels Apoptose abzusterben [33]. Ein weiterer Aspekt der ASPase-Resistenz scheint die Expression von Apoptosegenen zu sein. Bei Untersuchungen der Expression von 70 Apoptosegenen bei Kindern mit ALL zeigte sich ein Zusammenhang von ASPase-Resistenz und der Expression von BCL2L und TNF [32].

Hutson et al. beschreiben eine Proportionalität von ASPase-Resistenz und hoher AS-Aktivität, welche durch gleichzeitig erhöhte AS-mRNA-Spiegel auf eine erhöhte de Novo-Synthese von AS schließen lässt [36].

Auch Stams et al. gehen von einer erhöhten AS-Expression aus, im Zusammenhang mit ASPase-Resistenz. Eine Ausnahme in diesem Zusammenhang scheinen jedoch die Zellen mit TEL/AML-Translokation zu bilden. Die TEL/AML-Translokation stellt einen prognostisch günstigen Faktor dar. Die betroffenen Zellen scheinen generell eine erhöhte AS-Expressionsrate zu haben, obwohl sie in vitro signifikant sensibler auf die Behandlung mit ASPase reagieren [42, 70, 72]. TEL/AML-positive Zellen arretieren aufgrund ihrer Translokation vermehrt in der G0/G1-Phase. Dies könnte auch der Grund für ihre generell erhöhte AS-Expression sein [71]. Die AS-Expressionsrate liegt bei TEL/AML-positiven Zellen fünffach höher als bei anderen Zellen [69]. Eine hohe AS-Expression scheint bei TEL/AML-negativen Blasten in Korrelation zu ASPase-Resistenz zu stehen. Bei TEL/AML-positiven Blasten hingegen scheint es keinen Zusammenhang von hoher AS-Expression und ASPase-Resistenz zu geben.

Die Mechanismen der Asparaginase-Resistenz sind nicht abschließend geklärt. Abgesehen von dem Sonderfall der TEL/AML-Translokation besteht die These einer Korrelation von ASPase-Resistenz und erhöhter AS-Expression. Auch an Zelllinien konnte beobachtet werden, dass die AS-Expression mit der ASPase-Sensitivität bzw. Resistenz zu korrelieren scheint.

1.4 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

Durch die weitgehende Entschlüsselung des humanen Genoms ergibt sich die Möglichkeit, DNA-Sequenzen auf Polymorphismen zu untersuchen. Besondere Aufmerksamkeit wird derzeit auf Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs, engl. 'Single Nucleotide Polymorphisms') gelegt. Sie sind durch ihre Mutationsstabilität besonders interessant in Bezug auf diverse Pathomechanismen [22] und machen den größten Anteil der DNA-Variationen aus [18].

SNPs sind definiert als Variationen einzelner Basen in Allelen, wobei das am seltensten auftretende Allel mit einer Wahrscheinlichkeit von über 1 % in der Normalbevölkerung vertreten sein muss [8]. Im humanen Genom treten SNPs mit einem Verhältnis von 1 zu 1000 bis 3000 Basen auf [19]. Tritt ein SNP im Exon eines Gens auf, spricht man von einem kodierenden SNP (coding). Im Intron eines Gens ist ein SNP ein nicht-kodierendes SNP (non-coding). Kodierende SNPs können zu einem Aminosäureaustausch führen, so dass man von nicht-synonymen SNPs spricht. Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes müssen Basenaustausche in kodierenden Regionen nicht unbedingt einen Aminosäureaustausch nach sich ziehen, in diesem Fall spricht man von synonymen SNP.

Verschiedene Proteine, Enzyme, extrazelluläre Matrixbestandteile oder Zytoskelettelemente können durch einen Polymorphismus eine andere Tertiär- oder Quartärstruktur annehmen, die ihre Funktionalität positiv oder negativ beeinflusst. Ein derartiger Zusammenhang konnte z.B. bei der Funktionalität antioxidativer Enzyme beobachtet werden. Bei der Untersuchung der Vorkommen verschiedener Polymorphismen in Genen antioxidativer Enzyme stellte sich heraus, dass diese gehäuft bei Patienten mit multikausalen Erkrankungen wie zum Beispiel der familiären amyotrophen Lateralsklerose, Morbus Parkinson und der nonfamiliären idiopathischen Kardiomyopathie auftreten [22, 28]. Die durch einen Polymorphismus veränderten antioxidativen Enzyme scheinen vermindert wirksam zu sein und die Entstehung von oben genannten Erkrankungen zu begünstigen.

Auch in der Pharmakologie wird die Relevanz von Polymorphismen zunehmend entdeckt. Durch die individuell unterschiedliche Metabolisierung von Pharmaka können unerwünschte Nebenwirkungen auftreten. Einige Nebenwirkungen werden heute auf SNP von Enzymen oder Transportproteinen zurückgeführt, die in der Metabolisierung und Kinetik von speziellen

Pharmaka eine Rolle spielen. Von steigender Relevanz ist daher der Forschungsbereich der Pharmakogenetik, welcher pharmakologisch relevante SNP erforscht. Dies ermöglicht die zunehmend individuellere Gestaltung der Pharmakotherapie durch vorausgehende spezielle Screeningverfahren zur Detektion von bekannten therapierelevanten SNP.

Ein bekannter und relevanter Polymorphismus betrifft die Wirksamkeit und Toxizität von Thiopurinen [56]. Besondere Bedeutung hat dies beispielsweise bei der Therapie der ALL mit dem Thiopurinpräparat Mercaptopurin (MP). Dieses wird als Prodrug verabreicht, welches durch das Enzym Hypoxanthinphosphoribosyl-Transferase (HPRT) in Thioguaninnucleotide (TGN) umgewandelt wird.

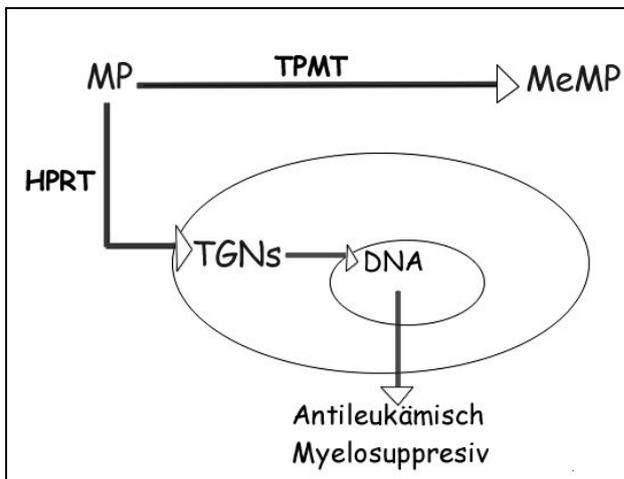


Abbildung 3: Schematischer Wirkmechanismus von Mercaptopurin (MP). Die Hypoxanthinphosphoribosyl-Transferase (HPRT) metabolisiert Mercaptopurin in Thioguaninnucleotide (TGN), welche in die DNA eingebaut werden und antileukämisch sowie myelosuppressiv wirken. Alternativ wird Mercaptopurin von der Thiopurin-Methyltransferase (TPMT) in Methylmercaptopurine (MeMP) metabolisiert, welche inaktive Metaboliten darstellen.

Diese werden in DNA und RNA eingebaut und wirken als Purinantagonisten antileukämisch und myelosuppressiv. Neben der HPRT wird Mercaptopurin auch von der Thiopurin-Methyltransferase (TPMT) metabolisiert. Die TPMT wandelt Mercaptopurin im Gegensatz zu der HPRT zu inaktiven Metaboliten, den Methylmercaptopurinen (MeMP), um. Besteht ein TPMT-Polymorphismus, der die enzymatische Aktivität der TPMT herabsetzt, so kann dies zur vermehrten Metabolisierung von Mercaptopurin durch die HPRT führen. Die resultierende vermehrte Bildung von Thioguaninnucleotiden erhöht den myelosuppressiven Effekt von Mercaptopurin, was zu unerwünscht starken myelotoxischen Schäden führen kann [56].

90 % der klinisch relevanten TPMT-Mutationen lassen sich auf drei nicht-synonyme SNP zurückführen [53, 75, 81]. Ein homozygoter TPMT-Polymorphismus tritt im Verhältnis 1/300 auf [77]. Ohne oben genannte medikamentöse Interventionen träte er phänotypisch nicht in Erscheinung, da ein TPMT-Polymorphismus ansonsten keine metabolisch relevanten Konsequenzen hat. Jedoch höchstrelevant wird ein TPMT-Polymorphismus bei einer

Mercaptopurintherapie, da nur durch eine unbedingt nötige Dosisanpassung schwerwiegende Nebenwirkungen verhindert werden können [56]. Studien haben gezeigt, dass ALL-Patienten, die auf einem Allel einen relevanten TPMT-SNP tragen, besser auf eine Mercaptopurintherapie ansprechen als ALL-Patienten mit zwei Wildtyp-Allelen, da die daraus resultierenden höheren TGN-Spiegel einen besseren Therapieerfolg mit sich bringen [43, 57].

Durch erhöhte TGN-Spiegel unter Mercaptopurintherapie scheint aber auch das Risiko von Spätschäden in Form von Gehirntumoren durch Radiatio und das Entwickeln einer akuten myeloischen Leukämie durch Etoposidtherapie erhöht zu sein [58, 59].

TPMT-Polymorphismen haben somit sowohl einen Einfluss auf die akute Wirksamkeit bzw. Toxizität der ALL-Therapie mit Mercaptopurin als auch auf die Langzeitfolgen nach Mercaptopurintherapie in Zusammenhang mit Radiatio und Etoposidtherapie.

Neben den Polymorphismen der Thiopurinmethyltransferase gibt es noch zahlreiche weitere Beispiele von Polymorphismen, die die Wirksamkeit von Arzneimittel beeinflussen [61]. Mit der Sequenzierung des humanen Genomes wurden zahlreiche Polymorphismen gefunden, deren Einfluss auf die Pathogenese von Erkrankungen sowie auf die Arzneimittelwirkung bislang noch nicht untersucht wurde.

Gegenstand dieser Untersuchung sind SNP des AS-Gens, welches auf Chromosom 7, Region q21.3, liegt und 35 kb umfasst [82]. Im Gen der humanen AS sind derzeit acht Polymorphismen beschrieben (Stand März 2007), welche in kodierenden Bereichen liegen. Fünf dieser SNP (rs1803163, rs11554428, rs1049674, rs2070159 und rs3179866) sind nicht-synonym und führen zu einem Aminosäureaustausch in der Primärstruktur des Enzyms. Die restlichen drei SNP sind synonym und haben daher keinen Aminosäureaustausch zur Folge (rs1049677, rs11554429 und rs11554431).

SNP-Nummer	rs1049674	rs2070159	rs3179866
Basen WT/SNP	Adenin/Thymin	Adenin/Guanin	Cytosin/Thymin
Codon WT/SNP	GAA/GTA	ACC/GCC	CGA/TGA
Aminosäure WT/SNP	Glutamin/Valin	Threonin/Alanin	Arginin/Kettenende

Table 1: Dargestellt sind die untersuchten Polymorphismen mit SNP-Nummer, Basenaustausch, kodierendem Triplet und der bei der Translation daraus resultierenden Aminosäure, WT entspricht dem Wildtyp, SNP entspricht dem Polymorphismus

Zu Beginn dieser Untersuchung waren nur drei der derzeit fünf nicht-synonymen SNP bekannt. Daher sind nur die SNP rs1049674, rs2070159 und rs3179866 Gegenstand dieser Studie. Weitere Daten der SNP erhält man unter folgenden Internetadressen: ``http://www.genecards.org`` oder ``http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP``.

Durch den jeweiligen Basenaustausch könnten SNPs eine Veränderung des Enzyms zur Folge haben, was sich auf die AS-Aktivität und die Wirksamkeit bzw. unerwünschte Wirksamkeit der zytostatischen Therapie mit ASPase niederschlagen könnte.

Ob SNPs des AS-Gens eine Korrelation zu leukämisch und lymphoblastischen Malignomen haben oder deren Therapie mit ASPase beeinflussen, ist bisher nicht näher untersucht.

Um SNPs eines Gens wirklich wissenschaftlich zu verwenden, muss klar sein, welches Allel am häufigsten in der Normalbevölkerung vorhanden ist. Nur Schlüsselgene, die auf einer breiten Populations-Basis bekannt sind, können wissenschaftlich auf SNP hin untersucht werden [15].

Polymorphismen, die mit einem Aminosäureaustausch einhergehen, könnten die Funktion und die Stabilität des Enzyms sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Ein Großteil der SNP, die im Rahmen der Sequenzierung des humanen Genoms identifiziert wurden, sind nicht validiert und auch nicht näher charakterisiert, d.h. es existieren keine Informationen, wie häufig diese SNP überhaupt in der Bevölkerung vorkommen.

Ein Anfang der Analyse von SNP des AS-Gens ist mit dieser Untersuchung gemacht.

1.5 Zielsetzung dieser Doktorarbeit

Die Wirksamkeit der ASPase-Therapie bei der Behandlung von akuten lymphatischen Leukämien und Non-Hodgkin-Lymphomen beruht zu einem wesentlichen Teil auf einer eingeschränkten bzw. fehlenden Asparaginsynthese dieser Zellen. Durch einen unter ASPase-Therapie entstehenden Asparaginmangel dieser Zellen gehen sie aufgrund verschiedenster diskutierter Mechanismen in die Apoptose über. Die AS katalysiert die Bildung von Asparagin aus Asparaginsäure und Ammoniak. Eine reduzierte Expression der AS bzw. eine verminderte katalytische Aktivität konnte in vielen Fällen mit Sensitivität gegenüber einer ASPase-Therapie assoziiert werden. Ob genetische Polymorphismen im AS-Gen einen Einfluss auf die ASPase-Therapie von akuten lymphatischen Leukämien und Non-Hodgkin-Lymphomen haben, ist bisher nicht untersucht.

Für die Bestimmung dieser Polymorphismen im AS-Gen existierten vor dieser Untersuchung keine etablierten Nachweismethoden. Deshalb mussten zunächst Methoden etabliert werden, die den Nachweis dieser Polymorphismen ermöglichten.

Die vorliegende Untersuchung befasst sich daher mit folgenden Fragestellungen:

- Wie häufig kommen die SNP rs1049764, rs2070159 und rs3179866 bei gesunden Probanden und bei Patienten, die an einer Leukämie erkrankt waren, vor?
- Gibt es unterschiedliche Inzidenzen dieser SNPs zwischen Gesunden und Patienten, die an einer Leukämie erkrankt waren?

- Gibt es eine Häufung der SNP-Vorkommen bei Patienten, die unter ASPase-Therapie schwere Nebenwirkungen entwickelt haben?
- Treten die betreffenden Polymorphismen bei Leukämiezellen auf (untersucht anhand von Zelllinien)?
- Ist die Asparaginsynthetase-mRNA-Expression bei SNP tragenden Leukozyten gesteigert oder gemindert im Vergleich zu den nicht SNP tragenden Leukozyten der unterschiedlichen Kollektive?
- Welche Ausblicke ergeben sich anhand der gewonnenen Erkenntnisse im Bezug auf die Vorkommen der SNPs rs1049764, rs2070159 und rs3179866?

2 Material und Methoden

2.1 Theoretischer Hintergrund der für diese Studie verwendeten Methoden

2.1.1 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Kary B. Mullis entwickelte die Polymerasekettenreaktion (PCR) in den 1980ern und erhielt dafür 1993 den Nobelpreis für Chemie. Das Originalprotokoll der Firma Cetus Corporation, Emeryville, CA, USA wurde zuerst von Saiki et al. als Methode zur Vervielfältigung des β -Globulins zur Pränatalen Diagnostik der Sichelzellanämie 1985 in Science veröffentlicht. Das Prinzip der PCR stellt eine Möglichkeit dar, DNA in vitro zu replizieren und einen DNA-Strang nahezu exponentiell zu amplifizieren. Dieser Replikationsvorgang verläuft in drei Schritten:

1. Denaturierung

Die DNA-Doppelhelixstruktur wird bei 90 °C eingeschmolzen, so dass zwei komplementäre Einzelstränge entstehen, die jeweils als Matrize der Amplifikation dienen.

2. Annealing

Künstlich synthetisierte Oligonucleotidprimer hybridisieren als Startmoleküle an den flankierenden Stellen der zu replizierenden DNA Fragmente. Folglich werden immer ein 5'Primer und ein 3'Primer eingesetzt, jeweils für den 5'-und 3' DNA-Matrizenstrang. Die benötigte Temperatur richtet sich nach der Zusammensetzung der Primer.

3. Polymerisation

Eine möglichst hitzestabile Polymerase z.B. von *Thermophilus aquaticus* (Taq) bindet bei 72 °C an den freien 3'Hydroxylrest der Primer und fügt Desoxyribonucleotidtriphosphate an, so dass sich ein neuer DNA-Strang entwickelt.

Bei jedem Durchlauf dieser drei Schritte verdoppelt sich die DNA-Menge.

2.1.2 Restriktionsverdau

Im Rahmen der Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus(RFLP)-Analyse werden Restriktionsenzyme eingesetzt. Restriktionsenzyme schneiden DNA an spezifischen Stellen einer DNA-Basensequenz. Mit Hilfe der RFLP-Analyse können z.B. rezessive Erbkrankheiten und deren Vererbungsmuster in betroffenen Familien nachgewiesen werden. Um zu ermitteln, welche gesunde Person innerhalb einer Familie heterozygoter Träger und damit Überträger der Erbkrankheit ist, kann man die DNA der gesunden Familienmitglieder untersuchen. Mit Hilfe

einer PCR wird die DNA zunächst vervielfacht. Im zweiten Schritt kann die nun in ausreichender Menge vorliegende DNA auf Veränderungen des der Krankheit zugrunde liegenden Gens untersucht werden.

Bestimmte Restriktionsenzyme schneiden dabei die DNA an für sie typischen Stellen einer DNA-Basensequenz in zwei Fragmente. Sucht man eine bestimmte Nukleotidsequenz, kann man diese mit Hilfe von spezifischen Restriktionsenzymen detektieren. Angewendet wird diese Technik besonders in der Analyse von Vererbungsmustern rezessiver Erbkrankheiten. Liegt zum Beispiel die einer Krankheit zugrunde liegende Genvariante innerhalb der spezifischen Schnittstelle eines Restriktionsenzym, kann dadurch verhindert werden, dass das Enzym die gesuchte Nukleotidsequenz schneidet. Eine weitere Möglichkeit der Auswirkung eines Basenaustausches der DNA ist die Entstehung einer neuen Schnittstelle, welche auf dem homologen Chromosom ohne Genmutation nicht vorhanden ist. Veränderungen der Schnittmuster der Restriktionsenzyme werden mit Hilfe von Gelelektrophoresen sichtbar gemacht. Durch die Auftrennung der entstandenen DNA Fragmente entstehen je nach Anzahl der Schnittstellen unterschiedlich viele Banden in dem Elektrophoresegel. Vergleicht man nun die entstandenen Bandenmuster verschiedener Individuen untereinander, wird deutlich, ob im untersuchten Gen Basenaustausche vorliegen, die im Schnittbereich des angewandten Restriktionsenzym liegen. Da es viele verschiedene Restriktionsenzyme gibt, kann man mit ihrer Hilfe viele verschiedene Basenaustausche detektieren.

In dieser Studie wurden zwei verschiedene Restriktionsenzyme zur Detektion zwei verschiedener SNP genutzt. Die Analyse des SNP rs1049674 wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym Rsa I durchgeführt. Es entstammt dem Bakterium *Rhodospseudomonas sphaeroides* und schneidet DNA-Sequenzen an der Stelle GT/AC.

Der SNP rs3179866 ließ sich mit dem Restriktionsenzym Taq I detektieren. Es schneidet an der Stelle T/CGA und entstammt dem Bakterium *Thermus aquaticus* YT 1.

2.1.3 Allel-spezifische PCR mit SNP-spezifischen fluoreszenzmarkierten Sonden

Da sich kein Restriktionsenzym finden ließ, welches den SNP rs2070159 darstellen könnte, wurde auf die Methode der Allel-spezifischen PCR zurückgegriffen. Für die Analyse verwendeten wir ein ABI Prism® 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland). Die Methode beruht darauf, dass dem Reaktionsmix neben den Primern mit denen der Genabschnitt, in dem der SNP liegt, amplifiziert wird, SNP-spezifische Sonden beigemischt sind. In diesem Fall wurden zwei verschiedene SNP-spezifische Sonden

verwendet, die sich nur in einem Nucleotid unterscheiden. Die Sonden waren mit VIC- und FAM-Fluoreszenzfarbstoff markiert.

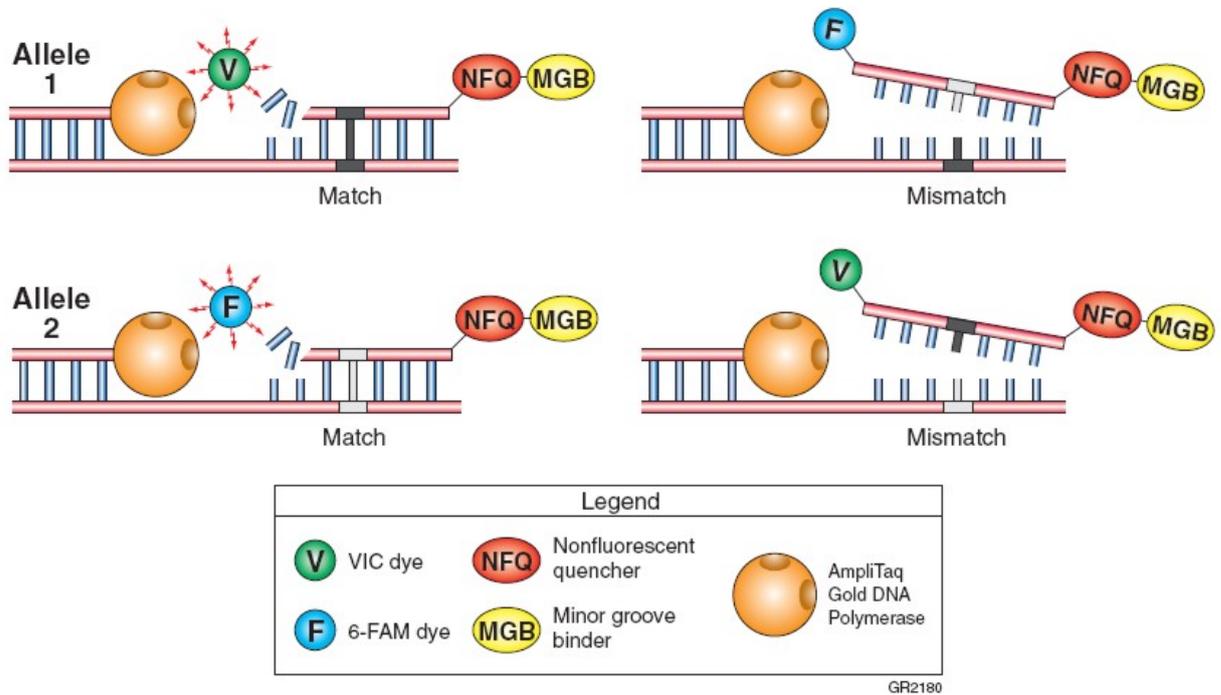


Abbildung 4: Schematische Darstellung der allelspezifischen PCR, entnommen aus Assays-by-Design Service Protocol, Applied Biosystems (Part Number 4334431 Rev. C 07/2003)

Die Allel-1-spezifische Sonde (VIC-Sonde) hybridisiert mit dem Wildtyp, wohingegen die Allel-2-spezifische Sonde (FAM-Sonde) mit dem SNP hybridisiert. Eine solche korrekte Bindung nennt sich Match. Hybridisiert die VIC-Sonde fälschlicherweise mit dem mutierten Allel, kommt es zu einem Mismatch. Um zu verhindern dass die Sonden auch ohne eine korrekte Hybridisierung fluoreszieren, sind ihnen fluoreszenzauslöschende Moleküle (Nonfluorescent quencher - NFQ) angehängt (Abbildung 4).

Im Verlauf der PCR binden die Allel-spezifischen Sonden an den jeweiligen Allelen. Kommen die spezifischen Sonden (VIC oder FAM) mit der Polymerase in Kontakt, wird bei einem Match der fluoreszierende Farbstoff abgespalten. Durch die nicht mehr vorhandene Nähe zum NFQ-Molekül beginnt es zu fluoreszieren. Im Falle eines Mismatches löst sich die Sonde von der DNA, ohne dass der fluoreszierende Farbstoff aktiviert wird. Die Intensitäten der entstehenden Fluoreszenzsignale ermöglichen eine semiquantitative Auswertung der Allel-Verteilung im Probenmaterial.

2.1.4 Sequenzierung

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden einzelne Proben zusätzlich sequenziert. Die von Sanger entwickelte Sequenzierung beruht auf dem Prinzip des basenspezifischen Abbruchs der DNA-Synthese durch Dideoxynukleotide.

Für die Reaktion werden zwei verschiedene Arten von Nukleotiden verwendet. Zum einen die üblichen (ATP, GTP, CTP und TTP) und zum anderen Dideoxynukleotide, die an ihrem 3`Ende im Zuckermolekül statt der OH-Gruppe nur ein H-Atom enthalten und mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind. Wird nun an einer Stelle der DNA-Synthese ein Dideoxynucleotid eingefügt, erfolgt dort ein Kettenabbruch und eine weitere Anbindung von Nukleotiden am 3`Ende ist nicht möglich. Zur Visualisierung der Sequenzierung erfolgt eine Kapillarelektrophorese, bei der die entstandenen Fragmente der Länge nach aufgetrennt werden. Über die unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe der Dideoxynukleotide, die den Abbruch der PCR-Reaktion induzieren, und die unterschiedlichen Längen der PCR-Fragmente lassen sich Rückschlüsse auf die Basensequenz ziehen.

2.2 Untersuchungsmaterial

2.2.1 DNA leukämischer Zelllinien

Untersucht wurden acht leukämische Zelllinien auf das Vorkommen von drei bekannten SNP des AS-Gens. Vier dieser Zelllinien waren lymphatischen und vier Zelllinien waren myeloischen Ursprungs (MOLT-4, CCRF-CEM, REH, BLIN, HL-60, M-07e, MEG-01 und K562).

Die Zelllinie **MOLT-4** wurde aus peripheren Blasten eines an T-ALL erkrankten 19jährigen Mannes etabliert [50].

Die Ursprungszellen der Zelllinie **CCRF-CEM** entstammen einem an einer T-ALL erkrankten 3jährigen Mädchen und wurden im Jahre 1964 gewonnen. Dies ist die älteste kontinuierlich bestehende humane T-ALL-Zelllinie.[27]

Die Zelllinie **REH** wurde aus Blasten des peripheren Blutes eines 15jährigen nordafrikanischen Mädchens etabliert und steht Modell für die humane pre-B-ALL mit TEL/AML1-Translokation [63].

Die Zelllinie **BLIN** entstammt dem Knochenmarkspirat eines 11jährigen Jungens der an einer pre-B-ALL erkrankt war. Charakteristisch für diese Zelllinie ist, dass einzelne Zellen sich spontan durch Genrearrangements von pre-B-Zellen zu reifen B-Zellen entwickeln können [80].

Die Zelllinie **HL-60** besteht aus tetraploiden AML-M2-Zellen, die in hohem Maße das Onkogen c-myc exprimieren. Ursprünglich stammen die Zellen aus dem peripheren Blut einer 35-jährigen Frau, welche an einer AML-M2 erkrankt war [17].

Die Zelllinie **M-07e** entstammt Zellen des peripheren Blutes eines 6 Monate alten Mädchens, welches an einer AML-M7 erkrankt war [2].

Die Zelllinie **MEG-01** entstammt dem Knochenmark eines 55jährigen Mannes, der an einer CML erkrankt war. Charakteristisch stehen diese Zellen Modell für die megakariozytische Blastenkrise der CML [52].

Auch die Zelllinie **K-562** steht Modell für die megakariozytische Blastenkrise der CML. Als Besonderheit tragen diese Zellen das Philadelphia-Chromosom. Ursprünglich entstammen die Zellen einer an CML erkrankten 53jährigen Frau in einer Blastenkrise. Sie wurden 1970 aus einem malignen Pleuraerguss gewonnen [44, 45].

2.2.2 DNA und RNA aus peripheren Leukozyten von pädiatrischen Patienten, die an einer Leukämie oder einem Lymphom erkrankt waren

Für die Untersuchungen wurden pseudonymisierte Rückstellproben der Studie „Compliance in der Kinderonkologie im Rahmen der Dauertherapie bei AML/ALL“ verwendet, die auch pharmakogenetische Analysen an den Proben von Patienten mit akuter Leukämie unter der Vorgabe des potentiellen direkten Gruppennutzens vorsah. Die Ethikkommission der Ärztekammer Westfalen Lippe gab dazu am 02.04.1998 ihr uneingeschränkt positives Votum unter der Reg. Nr. 78/98. Die verwendete DNA und RNA stammte aus peripheren Leukozyten von 36 Kindern, die an einer Leukämie erkrankt waren und sich im Kontext der Dauertherapie zum Zeitpunkt der Materialgewinnung in Remission befanden. Der Zeitpunkt der Erstdiagnosen des Patientenkollektivs erstreckt sich von 1991 bis 2001. Klinische Daten in zeitlichem Zusammenhang zu Asparaginase waren in dem Projekt nicht erhoben worden und ein Bruch der Pseudonymisierung für die hier dargestellte Untersuchung der SNP-Vorkommen nicht durch das Ethikvotum gedeckt.

Zur Korrelation der klinisch beobachtbaren Nebenwirkungen mit SNP-Vorkommen bei Patienten unter Asparaginase, konnte auf 10 vorhandene pseudonymisierte Rückstellproben der Studie „Asparaginsynthetase-Expression peripherer Leukozyten unter Asparaginase-Behandlung bei pädiatrischen Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL).“ zurückgegriffen werden. Auch für diese Studie, die ebenfalls genetische Untersuchungen gezielt einschloss und die klinische Datenerfassung ermöglicht, lag ein uneingeschränkt positives Votum der Ethikkommission der Ärztekammer Westfalen Lippe vom 14.06.2000 unter der Reg.Nr.: 0VIboo vor.

2.2.3 DNA und RNA aus peripheren Leukozyten von erwachsenen Blutspendern

Untersucht wurde die DNA und RNA von 31 Blutspendern, die als nicht onkologische Kontrollgruppe dienen. Das Material wurde vom Institut für Transfusionsmedizin und Transplantationsimmunologie des UKMs vollständig anonymisiert zur Verfügung gestellt, so dass nur Alter und Geschlecht der Probanden bekannt war. Eine Rückverfolgung und Identifizierung auf Namen der Probanden ist ausgeschlossen.

2.3 Materialien

- Handschuhe, Satin Plus AQL 1,5 (SafeSkin, Neufahrn)
- Zentrifuge, Biofuge pico (Heraeus Instruments)
- Thermocycler Trio-Thermoblock (Biometra, Goettingen)

- Agarosegelkammer Model 40-0911 (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen)
- Acrylamidgelkammer, Gel Electrophoresis Apparatus, Mod V15.17 (Gibco BRL, Eggenstein)
- Mikrowelle, AEG Micromat (AEG, Nürnberg)
- UV Kamera, Gel Doc 2000 (Bio Rad, München)
- Voltmeter, Power Pac 300 (Bio-Rad, München)
- Pipetten, Research 10µl, 100µl, 1000µl (Eppendorf, Hamburg)
- Standardtips, 10 µl, 100 µl, 1000 µl (Eppendorf, Hamburg)
- Pipette P 20 Pipetman (Gilson, Middleton, WI, USA)
- Kapillarspitzen 200 µl (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf)
- PCR Softtubes 0,5 ml einzeln (Biozym Scientific)
- PCR Softtubes 1,5 ml einzeln (Biozym Scientific)
- 15 ml PP-Testtubes, steril, CELLSTAR (Greiner bio-one, Frickenhausen)
- Erlenmeyerkolben 250 ml Duran (Schott Jena^{er} Glas, Jena)
- Parafilm, 4 in. x 125 ft. Roll, Laboratory Film, (Pechiney Plastic Packaging, Neenah, WI, USA)
- ABI Prism® 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Darmstadt)

2.3.1 Chemikalien/Kits

- Puregene DNA-Isolation Kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA)
- RNA Isolation Kit (Quiagen, Hilden)
- TRIzol (Invitrogen, Karlsruhe)
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck, Darmstadt)
- Borsäure (Boric Acid - Molecular Biology Grade; CALBIOCHEM, San Diego, CA, USA)
- 99 % EDTA (Sigma-ALDRICH Chemie, Steinheim)
- Essigsäure (Eisessig) 100 % reinst (Merck)
- First-strand cDNA synthesis kit (GE Healthcare, Freiburg)
- dNTP's 20 mM (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Agarose, Electrophoresis Grade (Invitrogen, Karlsruhe)
- Restriktionsenzym Taq I 20.000 U/ml (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
- Restriktionsenzym Rsa I 10 U/µl, 1000 U (Promega, Mannheim)
- BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- 30 % Acrylamide/Bis Solution (Bio-Rad Laboratories, München)
- Ammonium Persulfate (Sigma, Deisenhofen)
- TEMED (NNNN'-Tetramethylethylenediamine, Sigma, Deisenhofen)
- Ethidiumbromid (SERVA Electrophoresis, Heidelberg)

- Blaumarker (Bromphenolblau, Merck, Darmstadt)
- Ethanol $\geq 99,8$ % (Roth, Karlsruhe)
- Isopropanol; 2-Propanol $\geq 99,7$ % (Roth, Karlsruhe)
- 10 bp DNA Ladder 50 μg (1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Invitrogen, Karlsruhe)
- 100 bp DNA Ladder (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen)
- 123 bp DNA Ladder (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen)
- DNA - Hyperladder IV (Bioline, Luckenwalde)
- Montagé DNA Gel Extraktion Filtersystem (Montagé DNA Gel Extraktion Kit,
Millipore Corporation, Bedford, MA, USA)

2.3.2 Primer

-PCR-Primersequenzen zur Amplifikation des DNA-Fragmentes mit dem SNP rs1049674
(Invitrogen)

F: AAATGGCAAAGTTGCATCCGT

R: AATAGGTGGGTGGGTGTCTGCTA

-PCR-Primersequenzen zur Amplifikation des cDNA-Fragmentes mit dem SNP rs1049674
(Invitrogen)

F: TACATTGAAGCACTCCGCGAC

R: TCCAGAGAAGATCACCACGCTATC

-PCR-Primersequenzen zur Amplifikation des DNA-Fragmentes mit dem SNP rs3179866
(Invitrogen)

F: TCCTTCTCCTGAAAAAGCCGA

R: GCAGCAGTAGTTCGATCTGCG

-PCR-Primersequenzen zur Amplifikation des cDNA-Fragmentes mit dem SNP rs3179866
(Invitrogen)

F: ATGGAAGACAGCCCCGATTAC

R: CTGAAGGCTTCTTTTGGTTCGC

-PCR-Primersequenzen zur Amplifikation des DNA-Fragmentes mit dem SNP rs2070159
(Applied Biosystems)

F: GTTGCTGCCACTCTGTTGAAG

R: TTGCAAATGTCTGGAGAGGATACTG

-Allel spezifische PCR-fluoreszenzmarkierte Sonden

für SNP rs2070159 (Applied Biosystems)

VIC CTTGGGCTTCTTTC NFQ

FAM TACTTGGGTTTCTTTC NFQ Reverse

-Sequenzierung Primersequenzen

rs1049674 RNA - F: AAATGGCAAAGTTGCATCCGT

rs1049674 RNA - R: AATAGGTGGGTGGGTGTCTGCTA

rs3179866 nested - F: GAAAAAGCCGAGGAGGAGAG

rs3179866 DNA nested - R: ACCATGGGCAGCAGTAGTTC

rs2070159 - F: CATGTAGGGGGCTTGGACT

rs2070159 - R: CCAATTGCAAATGTCTGGAG

2.4 Versuchsprotokolle

2.4.1 Herstellung der Reagenzien, Puffer und Gele für die Elektrophorese

2 % Agarosegel

2 g Agarose wurden in 100 ml 1x TAE-Puffer suspendiert. Die Suspension wurde in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sie klar war und keine Klumpen mehr sichtbar waren. Nachdem die Lösung ein wenig abgekühlt war, fügte man 10 µl Etidiumbromid hinzu. Dieses Gemisch wurde in die Elektrophoresekammer gegossen, mit einem Kamm versehen und ca. 20 min zur Aushärtung unter dem Abzug stehen gelassen. Nach der Aushärtung wurde der Kamm entfernt - die fertigen Slots blieben bestehen.

10x TBE-Puffer

121,4 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan,

51,3 g Borsäure und

3,72 EDTA (99 %) wurden in 900 ml destilliertem Wasser gelöst und auf 1 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

50x TAE-Puffer für Agarose-Gele

121,0 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan,

28,6 ml Essigsäure,

50 ml 0,5 M EDTA (73,063 g EDTA in 500 ml Wasser gelöst)

wurden in 450 ml destilliertem Wasser gelöst, anschließend wurde der pH-Wert mit Essigsäure auf 8,0 eingestellt und mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 500 ml aufgefüllt.

8 %iges Polyacrylamid-Gel

Ein Gel mit einer Stärke von 0,8 mm wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen, die zuvor mit ddH₂O und Ethanol gereinigt worden waren. Zwecks Abstandhaltung der beiden Glasplatten wurden Spacer angebracht, mit Klemmen fixiert und einem Klebgel abgedichtet.

Das Klebgel bestand aus:

- 3 ml ddH₂O,
- 2 ml 30 % Polyacrylamid - Stammlösung,
- 50 µl 10 % Ammonium-Persulfate,
- 5 µl -TEMED.

Das Trenngel setzte sich zusammen aus:

- 15,7 ml ddH₂O,
- 6,6 ml 30 % Acrylamide/Bis-Solution,
- 2,5 ml 10x TBE,
- 175 µl 10 % Ammonium-Persulfate,
- 12 µl TEMED.

Die Gellösung wurde luftblasenfrei zwischen die beiden Glasplatten gegossen und ein Probenkamm eingeführt. Nach der 45 min dauernden Polymerisierung konnte das Gel in die Gelkammer eingespannt und der Probenkamm entfernt werden.

Zur Dokumentation der durch die Elektrophorese entstandenen Banden wurde das Gel für 10 min in einer Ethidiumbromidlösung geschwenkt und dann unter UV-Licht fotografiert.

Ethidiumbromidlösung:

40 µl Ethidiumbromidstammlösung (10 mg Ethidiumbromid gelöst in 1 ml H₂O)

wurden mit 400 ml TBE-Pufferlösung aufgefüllt.

2.4.2 DNA-Isolation

Das Probenmaterial wurde mit 600 µl Lyse (Purgene DNA Isolation Kit) vermischt und bei 37 °C inkubiert, bis sich eine homogene Lösung gebildet hat. Nun wurden 3 µl RNase-Solution (Puregene) zum Ansatz hinzugefügt, durch 25faches Umschütteln vermischt und bei 37 °C für 15-60 min inkubiert.

Nach Abkühlen des Ansatzes auf Raumtemperatur wurde 200 µl Protein-Precipitation-Solution hinzu pipettiert, 20 sec geschüttelt und für 3 min bei 13000-16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorfreagiergefäße mit 600 µl Isopropanol 100 % pipettiert. Diese Lösung wurde 50x geschüttelt, bis Präzipitate sichtbar wurden. Bei der anschließenden erneuten Zentrifugierung entstand ein DNA-Pellet, das nach Abnahme des Überstandes an der Luft getrocknet wurde. Der Überstand wurde verworfen.

Das Pellet wurde nun mit 600 µl Ethanol vermischt und für 1 min bei 13000-16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet für 15 min getrocknet. Zum Abschluß wurden 100 µl „DNA Hydratation Solution“ zum Pellet gegeben und die DNA für 1 h bei 65 °C hydratisiert. Alternativ konnte sie auch über Nacht bei Raumtemperatur hydratisieren. Die Lagerung der DNA erfolgte bei 2-8 °C.

2.4.2.1 Quantifizierung und Verdünnung der DNA

Das DNA-Pellet wurde bei 55 °C für 10 min aufgetaut. 1 µl Material wurden mit 99 µl Aqua dest. vermischt. Mit Hilfe eines Photometers wurde dann die DNA-Konzentration der Proben per Absorbtionsmessung bei 260 nm bestimmt.

2.4.3 RNA-Isolation

Auf das Probenmaterial wurde 1 ml TRIzol (Invitrogen), sowie 100 µl 1-Brom-3-Chlorpropan gegeben und die Lösung 15 sec geschüttelt. Danach wurde das 1,5-ml-Reagiergefäß 15 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Dabei bildeten sich drei Phasen aus: oben eine klare Schicht mit der RNA, dann eine dünne Interphase und unten eine Phase mit der gelösten DNA.

In einem neuen Reagiergefäß wurden 500 µl Isopropanol vorgelegt und mit 500 µl des klaren RNA-Überstandes vermischt. Der Rest des zentrifugierten Materials wurde verworfen.

Die Lösung im neuen Reagiergefäß wurde kurz geschüttelt und dann bei -80 °C für 10 min ausgefällt. Alternativ konnte die RNA auch über Nacht bei -20 °C ausgefällt werden.

Anschließend wurde die Lösung bei 4 °C und 12.000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und das verbleibende RNA-Pellet zweimal mit 70 %igem Ethanol

gewaschen, indem jeweils 500 µl des Ethanols hinzugegeben, kurz geschüttelt, bei 7.500 g 5 min lang bei 4 °C zentrifugiert wurden und der Überstand anschließend wieder abgeschüttet wurde.

Der Restüberstand wurde mit einer 100-µl-Pipette vorsichtig abgenommen und die RNA für 15 min im geöffneten Reagiergefäß unter einem Abzug getrocknet.

Zur weiteren Lagerung der RNA wurde 15-35 µl DEPC-H₂O auf die getrocknete RNA gegeben und auf Eis gelagert. Das DEPC(Diethylpyrocarbonat)-H₂O modifiziert Histidinreste in Proteinen zu N-Carboethoxyhistidin und führt dadurch zur Hemmung von Enzymen, die unter anderem RNA zersetzen könnten.

2.4.3.1 Quantifizierung und Lagerung der RNA

Das RNA-Pellet wurde bei 55 °C für 10 min aufgetaut. 1 µl Material wurden mit 99 µl Aqua dest. vermischt. Mit Hilfe eines Photometers wurde dann die DNA-Konzentration der Proben per Absorbionsmessung bei 260 nm bestimmt. Nach der Messung wurde die RNA bei -80 °C eingefroren und gelagert.

2.4.4 cDNA-Synthese

Um aus der gewonnenen RNA die Messenger-RNA (mRNA) der gesuchten Gene mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifizieren und quantifizieren zu können, musste die RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase zu cDNA transkribiert werden.

Zur Initiation der reversen Transkription wurde ein mRNA-bindender Primer verwendet, der im 'First-Strand cDNA Synthesis Kit' von GE Healthcare (Freiburg) enthalten war.

Für einen 15-µl-Ansatz wurden 8 µl cDNA-Synthesis-Mix benötigt.

Der Mix bestand aus

- 5 µl 'Bulk First-Strand cDNA Reaction Mix',
- 1 µl 200 mM wässriger DTT-Solution,
- 1 µl Not I-d(T)₁₈ Bifunctional Primer,
- 1 µl DEPC - H₂O.

Zu dem Mix wurden 2 µg RNA-Lösung in 7 µl DEPC- H₂O gegeben und 1 bis 1,5 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde die cDNA sofort auf Eis gestellt und bei -20 °C gelagert oder direkt in einer PCR eingesetzt.

2.4.5 Allelspezifische-Real-Time-PCR

Zur Untersuchung der Vorkommen des SNP rs2070159 der AS wurde die allelspezifische PCR verwendet. Wie unter 2.1.3 beschrieben wurden für die PCR folgende spezifische Primer eingesetzt:

ASNS SNP rs2070159 (Genbank Accession # AC005326.2)			
	Position	Länge (Basen)	GC (%)
F 5'-GTTGCTGCCACTCTGTTGAAG-3'	84942 R	21 bp	52,4
R 5'-TTGCAAATGTCTGGAGAGGATACTG-3'	84876	25 bp	44
Product	84876 - 84942	67 bp	

Zur allelspezifischen Hybridisierung wurden die entsprechenden mit fluoreszierenden Farbstoffen versehenen Sonden eingesetzt:

VIC 5'-CTTGGGCTTCTTTC-3' NFQ - entspricht dem Wildtyp
FAM 5'-TACTTGGGTTTCTTTC-3' NFQ Reverse - entspricht dem SNP

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

	1x
TaqMan Universal Mix	12,5 µl
40x Assay Mix	0,625 µl
DNA	(1-20 ng)
H ₂ O	ad 11,825 µl

Die Amplifikation des betreffenden Genabschnittes wurde wie folgt durchgeführt:

1. Schritt: Enzym Aktivierung: 10 Min 95 °C
 2. Schritt: Denaturierung: 15 Sec 92 °C
 3. Schritt: Annealing/Polymerisation: 1 Min 60 °C
- Vervielfältigung: 40 x Wiederholung der Schritte 2-3

2.5 Statistik

Die statistische Auswertung wurde unter Anwendung des Chi-Quadrat Tests mit Yates-Korrektur durchgeführt. Die Grenze der statistischen Signifikanz war ein P-Wert von <0,05. Die statistische Analyse wurde mit dem 'JUMBO statistical package' der Universität Münster durchgeführt.

3 Ergebnisse

Polymorphismen können durch Sequenzierung der betreffenden Genabschnitte, mittels Allel-spezifischer-PCR oder über den Nachweis von Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen nachgewiesen werden. Die Restriktionsfragmentlängenanalyse stellt im Vergleich zur Sequenzierung und zur Allel-spezifischen PCR eine preiswerte Alternative dar, so dass initial geprüft wurde, welche der SNPs mit dieser Methode nachweisbar waren. Das waren die SNPs rs1049674 und rs3179866. Für den Nachweis des SNP rs2070159 konnte keine Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus Analyse etabliert werden, da kein Restriktionsenzym existiert, welches spezifisch den Wildtyp bzw. die Mutante an der betreffenden Stelle schneiden konnte. Deshalb wurde hier das Verfahren der Allel-spezifischen PCR angewandt (siehe 2.1.3. und 2.4.5). Um zu überprüfen, ob die Methoden die Polymorphismen sicher nachweisen, wurden die Ergebnisse der Allel-spezifischen PCR und des Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus an einem Teil der Proben durch die Sequenzierung der Genabschnitte überprüft.

3.1 Etablierung der Methoden

3.1.1 SNP rs1049674 (SNP rs3179866) PCR mit DNA

Die Amplifizierung der DNA zur Detektion der SNP rs1049674 und SNP rs3179866 wurde mit spezifischen Oligonucleotidprimern durchgeführt. Zu 45 µl Reaktionsgemisch bestehend aus

- 5 µl Puffer,
- 5 µl dNTP's (10 mM),
- 0.25 µl rTaq,
- 0,5 µl Forward Primer (0,2 mM),
- 0,5 µl Rewind Primer (0,2 mM),
- 33,75 µl H₂O

wurden 5 µl DNA pipettiert. Als Schutz vor Verdunstung wurden die Proben mit jeweils 2 Tropfen Mineralöl überschichtet. Das verwendete Thermocyclerprogramm bestand aus folgenden Schritten:

1. Denaturierung: 4 min bei 94 °C
 2. Denaturierung: 30 sec bei 94 °C
 3. Annealing: 30 sec bei 65 °C (bei SNP rs3179866, 59 °C)
 4. Polymerisation: 45 sec bei 72 °C
- Vervielfältigung: 29x Schritte 2-4 (bei SNP rs3179866, 35x Schritte 2-4)
5. Pause: 4 °C

Folgende Primer wurden verwand:

ASNS SNP rs1049674 (Genbank Accession # AC005326.2)			
	Position	Länge (Basen)	GC (%)
F 5'-AAATGGCAAAGTTGCATCCGT-3'	85867 R	21	42,9
R 5'-AATAGGTGGGTGGGTGTCTGCTA-3'	85746	23	52,2
Produkt	85867-85746	122	

ASNS SNP rs3179866 (Genbank Accession # L35943 M16763)			
	Position	Länge (Basen)	GC (%)
F 5'-AAAAATACACCATGGGCAGC-3'	120 R	20 bp	45,0
R 5'-GAAAAAGCCGAGGAGGAGAG-3'	23	20 bp	55
Produkt	23-120	98 bp	

3.1.2 SNP rs1049674 (SNP rs3179866) PCR mit cDNA

Die Amplifizierung der cDNA zur Detektion der SNP rs1049674 und SNP rs3179866 wurde mit spezifischen Oligonucleotidprimern durchgeführt. Zu 18 µl Reaktionsgemisch bestehend aus

- 2 µl Puffer,
- 2 µl dNTP's (10 mM),
- 0.1 µl rTaq,
- 0,2 µl Forward Primer (0,2 mM),
- 0,2 µl Rewind Primer (0,2 mM),
- 13,5 µl H₂O

wurden 2 µl cDNA pipettiert. Als Schutz vor Verdunstung wurden die Proben mit jeweils 2 Tropfen Mineralöl überschichtet. Das verwendete Thermocyclerprogramm bestand aus folgenden Schritten:

1. Denaturierung: 4 min 94 °C
 2. Denaturierung: 30 sec 94 °C
 3. Annealing: 30 sec 65 °C (bei SNP rs3179866, 60 °C)
 4. Polymerisation: 45 sec 72 °C
- Vervielfältigung: 40x Schritte 2-4 (bei SNP rs3179866, 35x Schritte 2-4)
5. Pause: 4 °C

Folgende Primer wurden verwendet:

cDNA - ASNS SNP rs1049674 (Genbank Accession # NM_001673.2)			
	Position	Länge (Basen)	GC (%)
F 5'-TACATTGAAGCACTCCGCGAC-3'	675	21 bp	52,4
R 5'-TCCAGAGAAGATCACCACGCTATC-3'	1272 R	24 bp	50,0
Produkt	675 - 1272	598 bp	

cDNA - ASNS SNP rs3179866 (Genbank Accession # NM_001673.2)			
	Position	Länge (Basen)	GC (%)
F 5'-ATGGAAGACAGCCCCGATTTAC-3'	1048	22 bp	50,0
R 5'-CTGAAGGCTTCTTTTGGTCGC-3'	1592 R	21 bp	52,4
Produkt	1048 - 1592	545 bp	

3.1.2.1 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

Die Amplifikate wurden mit Hilfe eines mit TAE-Puffer überschichteten 2 %igen Agarosegels (siehe 2.4.1) aufgetrennt. Zur Beurteilung der Laufstrecke der Proben wurden zu 5 µl PCR-Produkt jeweils 1 µl Blaumarker hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde dann in jeweils einen Slot pipettiert und bei 108 V für ca. eine Stunde aufgetrennt. Als Referenz zur Analyse der aufgetrennten Banden wurden 1 µl Blaumarker mit 5 µl eines 123-bp-Standards eingesetzt. Zur weiteren Dokumentation wurden die unter UV-Bestrahlung fluoreszierenden Banden fotografiert. PCR-Reaktionen, in denen ein amplifiziertes PCR-Fragment der entsprechenden Länge nachweisbar war, wurden nachfolgend einem entsprechenden Restriktionsverdau unterworfen.

3.1.3 Restriktionsverdau von DNA zur Detektion von SNP rs1049674 mit Rsa I

Das Restriktionsenzym Rsa I entstammt dem Bakterium *Rhodopseudomonas sphaeroides* und schneidet an der Stelle GT/AC. Der 5-µl-Ansatz bestehend aus

- 3,4 µl H₂O,
- 1 µl Puffer,
- 0,1 µl BSA-1C,
- 0,5 µl Rsa I

wurde mit 5µl der PCR-Produkte vermischt und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Auftrennung der bei dem Restriktionsverdau entstandenen Banden erfolgte mittels Acrylamidgel-

Elektrophorese. Rsa I schnitt die SNP tragende DNA in zwei Fragmente, die Wildtyp tragende DNA wurde nicht geschnitten.

3.1.3.1 Restriktionsverdau von: DNA, mit dem Ausschluß des SNP rs1049674

Länge des PCR-Amplifikats: 122 bp, Sequenz nach Accession-Nr. AC005326

Restriktionsenzym: RsaI

Schnittstellen: GTAC, keine

entstehende Fragmente: keine

```

1  AATAGGTGGGTGGGTGCTCTGCTACCTGGAAAGAGTTTCTCCACATTGTCATAGAGGGCGT 60
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TTATCCACCCACCCACAGACGATGGACCTTTCTCAAAGAGGTGTAACAGTATCTCCCGCA

61  GCAGGGGTTTCATCCCCGACAGTGATGATATTTAACCATTTCCACGGATGCAACTTTGCCAT 120
   -----+-----+-----+-----+-----+
   CGTCCCCAAGTAGGGCTGTCACTACTATAAATTGGTAAAGGTGCCTACGTTGAAACGGTA

   TT
121 -- 122
   AA

```

3.1.3.2 Restriktionsverdau von: DNA, mit dem Nachweis des SNP rs1049674

Länge des PCR-Amplifikats: 122 bp, Sequenz nach Accession-Nr. AC005326

Restriktionsenzym: RsaI

Schnittstellen: GTAC, Position 69

entstehende Fragmente: 69 bp, 53bp

```

1  AATAGGTGGGTGGGTGCTCTGCTACCTGGAAAGAGTTTCTCCACATTGTCATAGAGGGCGT 60
   -----+-----+-----+-----+-----+
   TTATCCACCCACCCACAGACGATGGACCTTTCTCAAAGAGGTGTAACAGTATCTCCCGCA

61  GCAGGGGTACATCCCCGACAGTGATGATATTTAACCATTTCCACGGATGCAACTTTGCCAT 120
   -----+-----+-----+-----+-----+
   CGTCCCCATGTAGGGCTGTCACTACTATAAATTGGTAAAGGTGCCTACGTTGAAACGGTA
           RsaI

   TT
121 -- 122
   AA

```

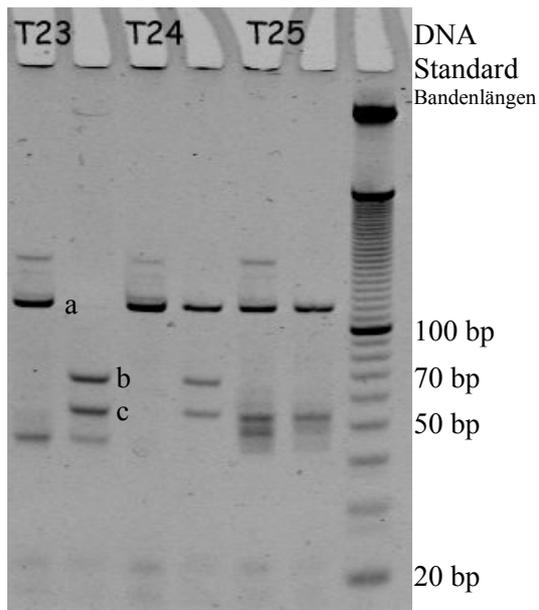


Abbildung 5: Acrylamidgel DNA rs1049674 Bandenlänge a) 122 bp, b) 69 bp, c) 53 bp, Der erste Slot einer Probe ist mit der unverdauten DNA beladen, die verdaute DNA stellt sich hier immer im zweiten Slot einer Probe dar. Anhand der Banden der Probe T23 lässt sich erkennen, dass die gesamte DNA verdaut wurde. Somit lässt sich ableiten, dass beide Allele den SNP tragen. Die DNA der Probe T25 hingegen wird nicht verdaut. Beide Allele der Probe T25 tragen somit den Wildtyp. Wird nur ein Teil der DNA verdaut, sind sowohl ein Wildtyp als auch ein SNP-tragendes Allel vorhanden. Dies stellt sich bei der Probe T24 dar.

3.1.3.3 Restriktionsverdau von: cDNA, mit dem Nachweis des SNP rs1049674

Länge des PCR-Amplifikats: 598 bp, Sequenz nach Accession-Nr. NM_001673.2

Restriktionsenzym: RsaI

Schnittstellen: GTAC, Positionen 136, 343

drei entstehende Fragmente: 255 bp, 207 bp, 136 bp

```
1   TACATTGAAGCACTCCGCGACTCCCTTTTTAAAAGTGGAGCCTTTTCTTCCCTGGACACTA   60
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATGTAACTTCGTGAGGCGCTGAGGGAAAAATTTTCACCTCGGAAAAGAAGGACCTGTGAT

61  TGAAGTTTTGGATTTAAAGCCAAATGGCAAAGTTGCATCCGTGGAAATGGTTAAATATCA   120
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACTTCAAAACCTAAATTTTCGGTTTACCGTTTCAACGTAGGCACCTTTACCAATTTATAGT

121 TCACTGTCGGGATGTACCCCTGCACGCCCTCTATGACAATGTGGAGAAACTCTTTCCAGG   180
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGTGACAGCCCTACATGGGGACGTGCGGGAGATACTGTTACACCTCTTTGAGAAAGGTCC
      RsaI

181 TTTTGAGATAGAACTGTGAAGAACAACCTCAGGATCCTTTTTAATAATGCTGTAAAGAA   240
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAAACTCTATCTTTGACACTTCTTGTGGAGTCCTAGGAAAAATTATTACGACATTTCTT

241 ACGTTTGATGACAGACAGAAGGATTGGCTGCCTTTTATCAGGGGGCTTGGACTCCAGCTT   300
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGCAAACACTACTGTCTGTCTTCCCTAACCGACGAAAAATAGTCCCCGAACCTGAGGTGCAA

301 GGTGCTGCCACTCTGTTGAAGCAGCTGAAAGAAGCCCAAGTACAGTATCCTCTCCAGAC   360
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCAACGACGGTGAGACAACTTCGTGACTTTCTTTCGGGTTTCATGTCATAGGAGAGGTCTG
      RsaI

361 ATTTGCAATTGGCATGGAAGACAGCCCCGATTTACTGGCTGCTAGAAAGGTGGCAGATCA   420
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAAACGTTAACCGTACCTTCTGTGCGGGCTAAATGACCGACGATCTTTCCACCGTCTAGT

421 TATTGGAAGTGAACATTATGAAGTCCTTTTTAACTCTGAGGAAGGCATTCAGGCTCTGGA   480
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATAACCTTCACTTGTAACTTTCAGGAAAAATTGAGACTCCTTCCGTAAGTCCGAGACCT

481 TGAAGTCATATTTTCCCTTGAAAACCTTATGACATTACAACAGTTTCGTGCTTCAGTAGGTAT   540
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACTTCAGTATAAAAAGGAACCTTTGAATACTGTAATGTTGTCAAGCACGAAGTCATCCATA

541 GTATTTAATTTCCAAGTATATTCGGAAGAACACAGATAGCGTGGTGATCTTCTCTGGA   598
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CATAAATTAAAGGTTTCATATAAGCCTTCTTGTGTCTATCGCACCCTAGAAGAGACCT
```

3.1.3.4 Restriktionsverdau von: cDNA, mit dem Ausschluß des SNP rs1049674

Länge des PCR-Amplifikats: 598 bp, Sequenz nach Accession-Nr. NM_001673.2

Restriktionsenzym RsaI

Schnittstelle: GTAC, Position 343

zwei entstehende Fragmente: 343 bp, 255 bp

```
1   TACATTGAAGCACTCCGCGACTCCCTTTTTAAAAGTGGAGCCTTTTCTTCCCTGGACACTA   60
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATGTAACTTCGTGAGGCGCTGAGGGAAAAATTTTCACCTCGGAAAAGAAGGACCTGTGAT

61  TGAAGTTTTGGATTTAAAAGCCAAATGGCAAAGTTGCATCCGTGGAAATGGTTAAATATCA   120
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACTTCAAAACCTAAATTTTCGGTTTACCGTTTCAACGTAGGCACCTTTACCAATTTATAGT

121 TCACTGTCGGGATGGAACCCCTGCACGCCCTCTATGACAATGTGGAGAAACTCTTTCCAGG   180
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGTGACAGCCCTACTTGGGGGACGTGCGGGAGATACTGTTACACCTCTTTGAGAAAGGTCC

181 TTTTGAGATAGAACTGTGAAGAACAACCTCAGGATCCTTTTTAATAATGCTGTAAAGAA   240
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAAACTCTATCTTTGACACTTCTTGTGGAGTCTTAGGAAAAATTATTACGACATTTCTT

241 ACGTTTGATGACAGACAGAAGGATTGGCTGCCTTTTATCAGGGGGCTTGGACTCCAGCTT   300
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGCAAACACTACTGTCTGTCTTCTTAACCGACGAAAAATAGTCCCCCGAACCTGAGGTGCAA

301 GGTGCTGCCACTCTGTTGAAGCAGCTGAAAGAAGCCAAGTACAGTATCCTCTCCAGAC   360
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCAACGACGGTGAGACAACTTCGTGACTTTCTTCGGGTTCATGTCATAGGAGAGGTCTG
                                     RsaI

361 ATTTGCAATTGGCATGGAAGACAGCCCCGATTTACTGGCTGCTAGAAAGGTGGCAGATCA   420
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAAACGTTAACCGTACCTTCTGTGCGGGCTAAATGACCGACGATCTTTCCACCGTCTAGT

421 TATTGGAAGTGAACATTTATGAAGTCTTTTTAACTCTGAGGAAGGCATTCAGGCTCTGGA   480
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATAACCTTCACTTGTAATACTTCAGGAAAAATTGAGACTCCTTCCGTAAGTCCGAGACCT

481 TGAAGTCATATTTTCCCTTGAAACTTATGACATTACAACAGTTCGTGCTTCCAGTAGGTAT   540
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACTTCAGTATAAAAAGGAACCTTTGAATACTGTAATGTTGTCAAGCACGAAGTCATCCATA

541 GTATTTAATTTCCAAGTATATTCGGAAGAACACAGATAGCGTGGTGATCTTCTCTGGA   598
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CATAAATTAAGGTTTCATATAAGCCTTCTTGTGTCTATCGCACCCTAGAAGAGACCT
```

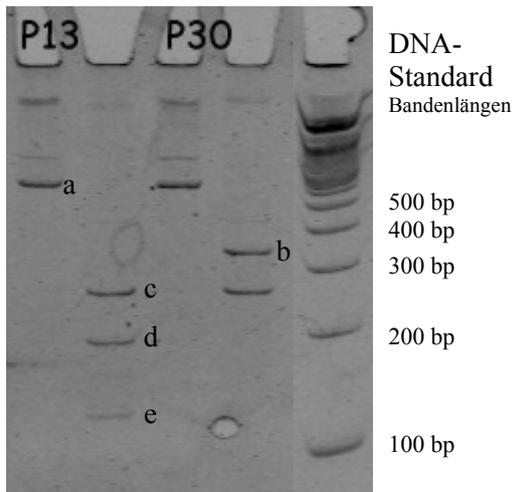


Abbildung 6: Acrylamidgel cDNA rs1049674 Bandenlänge a) 598 bp, b) 343 bp, c) 255 bp, d) 207 bp, e) 136 bp. Der erste Slot einer Probe ist mit der unverdauten cDNA beladen. Die verdauten cDNA stellt sich hier immer im zweiten Slot einer Probe dar. Anhand der Banden lässt sich erkennen, dass die Probe P13 ausschließlich den SNP exprimiert. P30 hingegen exprimiert ausschließlich den Wildtyp.

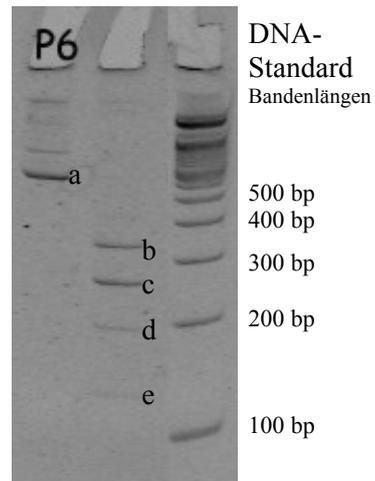


Abbildung 7: Acrylamidgel cDNA rs1049674 Bandenlänge a) 598 bp, b) 343 bp, c) 255 bp, d) 207 bp, e) 136 bp. Anhand der Banden lässt sich ersehen, dass die Probe P6 ein Wildtyp und ein SNP-Allel enthält, die beide transkribiert werden.

3.1.4 Restriktionsverdau zur Detektion des SNP rs3179866 mit Taq I

Das Restriktionsenzym Taq I entstammt dem Bakterium *Thermus aquaticus* YT I (Taq I) und schneidet an der Stelle T/CGA.

Der 5µl-Ansatz, bestehend aus

- 3,4µl H₂O,
- 1µl Puffer,
- 0,1µl BSA-1C,
- 0,5µl Taq I,

wurde mit 5 µl der DNA-Amplifikate vermischt und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Auftrennung der bei dem Restriktionsverdau entstandenen Banden erfolgte mittels Acrylamidgel-Elektrophorese. Taq I schneidet den Wildtyp in zwei Fragmente, das SNP tragende Allel wird nicht geschnitten.

3.1.4.1 Restriktionsverdau von: DNA mit Ausschluss des SNP rs3179866

Länge des PCR-Amplifikats: 98 bp, Sequenz nach Accession-Nr. L35943 M16763

Restriktionsenzym TaqI

Schnittstelle: TCGA, Position 70

zwei entstehende Fragmente: 70 bp, 28 bp

```
1  GAAAAAGCCGAGGAGGAGAGTGAGAGGCTTCTGAGGGAAGCTCTATTTGTTTGATGTTCTC 60
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CTTTTTCGGCTCCTCCTCTCACTCTCCGAAGACTCCCTTGAGATAAACAACTACAAGAG

61  CGCGCAGATCGAACTACTGCTGCCCATGGTGTATTTTT 120
   -----+-----+-----+-----+-----+
   GCGCGTCTAGCTTGATGACGACGGGTACCACATAAAAA
           TaqI
```

3.1.4.2 Restriktionsverdau von: DNA mit dem Nachweis des SNP rs3179866

Länge des PCR-Amplifikats: 98 bp, Sequenz nach Accession-Nr. L35943 M16763

Restriktionsenzym TaqI

Schnittstelle: TCGA, Position 0

entstehende Fragmente: keine

```
1  GAAAAAGCCGAGGAGGAGAGTGAGAGGCTTCTGAGGGAAGCTCTATTTGTTTGATGTTCTC 60
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CTTTTTCGGCTCCTCCTCTCACTCTCCGAAGACTCCCTTGAGATAAACAACTACAAGAG

61  CGCGCAGATCAAAGCTACTGCTGCCCATGGTGTATTTTT 120
   -----+-----+-----+-----+-----+
   GCGCGTCTAGTTTGATGACGACGGGTACCACATAAAAA
```

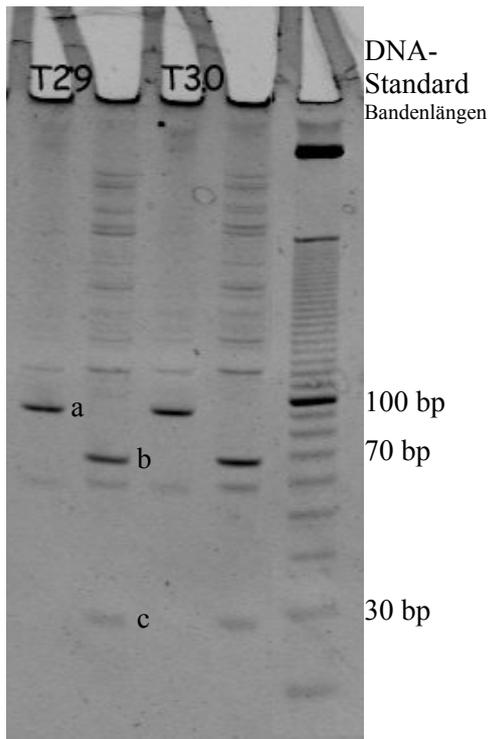


Abbildung 8: Acrylamidgel-DNA rs3179866
 Bandenlänge a) 100 bp, b) 70 bp, c) 30 bp.
 Der erste Slot einer Probe ist mit der unverdauten DNA
 beladen. Die verdaute DNA stellt sich im zweiten Slot
 einer Probe dar. Anhand der Banden lässt sich
 exemplarisch erkennen, dass die Proben T29 und T30
 ausschließlich Wildtyp-Allele enthalten.

3.1.4.3 Restriktionsverdau von: cDNA , mit dem Ausschluss des SNP rs3179866

Länge des PCR-Amplifikats: 545 bp, Sequenz nach Accession-Nr. NM_001673.2

Restriktionsenzym: TaqI

Schnittstellen: TCGA, Positionen 352, 403

drei entstehende Fragmente: 352 bp, 142 bp, 51 bp

```
1   ATGGAAGACAGCCCCGATTTACTGGCTGCTAGAAAGGTGGCAGATCATATTGGAAGTGAA   60
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACCTTCTGTCTGGGGCTAAATGACCGACGATCTTTCCACCGTCTAGTATAACCTTCACTT

61  CATTATGAAGTCCTTTTTAACTCTGAGGAAGGCATTCAGGCTCTGGATGAAGTCATATTT   120
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTAATACTTCAGGAAAAATGAGACTCCTTCCGTAAGTCCGAGACCTACTTCAGTATAAA

121 TCCTTGAAAACCTTATGACATTACAACAGTTCGTGCTTCAGTAGGTATGTATTTAATTTCC   180
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGGAACCTTTGAATACTGTAATGTTGTCAAGCACGAAGTCATCCATACATAAAATTAAGG

181 AAGTATATTCGGAAGAACACAGATAGCGTGGTGATCTTCTCTGGAGAAGGATCAGATGAA   240
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCATATAAGCCTTCTTGTGTCTATCGCACCAC TAGAAGAGACCTCTTCCTAGTCTACTT

241 CTTACGCAGGGTTACATATATTTTCACAAGGCTCCTTCTCCTGAAAAAGCCGAGGAGGAG   300
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAATGCGTCCCAATGTATATAAAAAGTGTTCGAGGAAGAGGACTTTTTTCGGCTCCTCCTC

301 AGTGAGAGGCTTCTGAGGAACTCTATTTGTTTTGATGTTCTCCGCGCAGATCGAACTACT   360
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCACTCTCCGAAGACTCCCTTGAGATAAACAACTACAAGAGGCGGTCTAGCTTGATGA
                                   TaqI

361 GCTGCCCATGGTCTTGAAGTCTGAGAGTCCCATTTCTAGATCATCGATTTTCTTCCTATTAC   420
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGACGGGTACCAGAACTTGACTCTCAGGGTAAAGATCTAGTAGCTAAAAGAAGGATAATG
                                   TaqI

421 TTGTCTCTGCCACCAGAAATGAGAATTCCAAAGAATGGGATAGAAAAACATCTCCTGAGA   480
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AACAGAGACGGTGGTCTTTACTCTTAAGTTTTCTTACCCTATCTTTTTGTAGAGGACTCT

481 GAGACGTTTGAGGATTCCAATCTGATACCCAAAGAGATTCCTCTGGCGACCAAAGAAGCC   540
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTCTGCAAACCTCCTAAGGTTAGACTATGGGTTTTCTCTAAGAGACCGCTGGTTTTCTTCGG

541 TTCAG
----- 545
AAGTC
```

3.1.4.4 Restriktionsverdau von: cDNA, mit dem Nachweis von SNP rs3179866

Länge des PCR-Amplifikats: 545 bp, Sequenz nach Accession-Nr. NM_001673.2

Restriktionsenzym TaqI

Schnittstelle: TCGA, Position 403

zwei entstehende Fragmente: 403 bp, 142 bp

```
1   ATGGAAGACAGCCCCGATTTACTGGCTGCTAGAAAGGTGGCAGATCATATTGGAAGTGAA   60
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACCTTCTGTCTGGGGCTAAATGACCGACGATCTTTCCACCGTCTAGTATAACCTTCACTT

61  CATTATGAAGTCCTTTTTAACTCTGAGGAAGGCATTCAGGCTCTGGATGAAGTCATATTT   120
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTAATACTTCAGGAAAAATGAGACTCCTTCCGTAAGTCCGAGACCTACTTCAGTATAAA

121 TCCTTGAAACTTATGACATTACAACAGTTCGTGCTTCAGTAGGTATGTATTTAATTTCC   180
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGGAACCTTTGAATACTGTAATGTTGTCAAGCACGAAGTCATCCATACATAAAATTAAGG

181 AAGTATATTCGGAAGAACACAGATAGCGTGGTGATCTTCTCTGGAGAAGGATCAGATGAA   240
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCATATAAGCCTTCTTGTGTCTATCGCACCAC TAGAAGAGACCTCTTCCTAGTCTACTT

241 CTTACGCAGGGTTACATATATTTTCACAAGGCTCCTTCTCCTGAAAAAGCCGAGGAGGAG   300
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAATGCGTCCAATGTATATAAAAAGTGTTCGAGGAAGAGGACTTTTTTCGGCTCCTCCTC

301 AGTGAGAGGCTTCTGAGGAACTCTATTTGTTTGATGTTCTCCGCGCAGATTGAACTACT   360
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCACTCTCCGAAGACTCCCTTGAGATAAACAAACTACAAGAGGCGCTCTAACTTGATGA

361 GCTGCCCATGGTCTTGAACTGAGAGTCCCATTTCTAGATCATCGAATTTTCTTCCTATTAC   420
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGACGGGTACCAGAACTTGACTCTCAGGGTAAAGATCTAGTAGCTTAAAAGAAGGATAATG
                                     TaqI

421 TTGTCTCTGCCACCAGAAATGAGAATTCCAAAGAATGGGATAGAAAAACATCTCCTGAGA   480
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AACAGAGACGGTGGTCTTTACTCTTAAGGTTTCTTACCCTATCTTTTTGTAGAGGACTCT

481 GAGACGTTTGAGGATTCCAATCTGATACCCAAAGAGATTTCTCTGGCGACCAAAGAAGCC   540
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTCTGCAAACCTCTAAGGTTAGACTATGGGTTTCTCTAAGAGACCGCTGGTTTTCTTCGG

541 TTCAG
----- 545
AAGTC
```

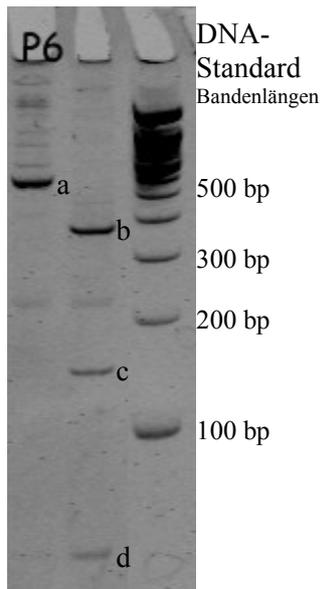


Abbildung 9: Acrylamidgel-cDNA rs3179866
 Bandenlänge a) 545 bp, b) 352 bp, c) 142 bp, d) 51 bp.
 Der erste Slot einer Probe ist mit der unverdauten cDNA
 beladen. Die verdaute cDNA stellt sich im zweiten Slot
 einer Probe dar. Anhand der Banden lässt sich
 exemplarisch erkennen, dass die Probe P6 ausschließlich
 Wildtyp-Allele exprimiert.

3.1.5 Sequenzierung von PCR-Produkten

Zur Bestätigung der mit Hilfe des Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) gefundenen Ergebnisse wurde ein Teil der PCR-Produkte zusätzlich sequenziert. Ebenso wurden die Ergebnisse der allelspezifischen PCR mit den SNP-spezifischen Sonden durch Sequenzierung der Region mit dem SNP rs2070159 an einer Auswahl an Proben überprüft.

Durchführung:

Für die Untersuchung von Polymorphismen in der transkribierten RNA wurde zunächst die mRNA mit Hilfe der 'Moloney Murine Leukemia Virus(MoMLV)'-reversen-Transkriptase und einem oligo dT-Primer in cDNA umgeschrieben (First-Strand cDNA Synthesis Kit, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg).

Aus der cDNA wurde das Fragment, in dem der zu untersuchende SNP lag, mit Hilfe von sequenzspezifischen Primern in einer Polymerasekettenreaktion amplifiziert.

Des Weiteren wurden aus genomischer DNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung sequenzspezifischer Primer die Fragmente der DNA amplifiziert, in denen die betreffenden SNP auftreten können.

Von jeder PCR-Reaktion wurde das gesamte Amplifikat auf ein 1,25 %iges Agarosegel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid aufgetragen und einer Elektrophorese über 30 min bei 75 Volt unterzogen. Das Agarosegel und der Elektrophoresepuffer wurden mit einem modifizierten TAE-Puffer hergestellt. Im Gegensatz zum üblicherweise eingesetzten TAE-Puffer enthielt der modifizierte TAE-Puffer nur 1/10 der üblicherweise eingesetzten Konzentration an Dinatrium-EDTA und setzte sich wie folgt zusammen:

TRIS-Acetat: 40 mM

Na₂EDTA: 0,1 mM pH 8,0.

Die im Agarosegel aufgetrennten PCR-Fragmente wurden unter kurzweiligem UV-Licht sichtbar gemacht, mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein autokalviertes und zuvor austariertes Eppendorf-Gefäß überführt. Das ausgeschnittene Agarosegel wurde gewogen und anschließend in ein Montage-DNA-Gel-Extraktion-Filterssystem (Montage DNA Gel Extraktion Kit, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) überführt. Anschließend wurde das Gel 10 min mit 5000 g bei Raumtemperatur durch das Filtersystem zentrifugiert.

Von dem Eluat wurden 4 µl auf ein 2 % iges Agarosegel aufgetragen und einer 30minütigen Elektrophorese bei 75 Volt unterzogen. Neben dem eluierten PCR-Produkt wurde zum Vergleich ein DNA-Längenstandard elektrophoretisch aufgetrennt, der nach Anfärbung mit Ethidiumbromid eine Abschätzung des DNA-Gehaltes des eluierten PCR-Produktes erlaubte. Die Menge an eluiertem PCR-Produkt sollte > 300 ng sein.

Von dem Eluat wurden 7,5 µl für die Sequenzierungsreaktion eingesetzt.

Sequenzierungsreaktionen:

+ Strang

<u>Mix</u>	<u>1 x</u>
Puffer	1 µl
Big Dye 3.1	1 µl
Sense Primer (3 µM)	0,5 µl
aufgereinigtes PCR-Produkt	7,5 µl

rs1049674 RNA - sense: AAATGGCAAAGTTGCATCCGT

rs3179866 DNA nested - sense: GAAAAAGCCGAGGAGGAGAG

- Strang

<u>Mix</u>	<u>1 x</u>
Puffer	1 µl
Big Dye 3.1	1 µl
Antisense Primer (3 µM)	0,5 µl
aufgereinigtes PCR-Produkt	7,5 µl

rs1049674 RNA - antisense: AATAGGTGGGTGGGTGTCTGCTA

rs3179866 DNA nested - antisense: ACCATGGGCAGCAGTAGTTC

Das Cycle-Sequencing wurde mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

Step 1: 4 min bei 96 °C

Step 2: 20 sec bei 96 °C

Step 3: 10 sec bei 50 °C

Step 4: 2 min bei 60 °C

Wiederholung 35x Step 2 bis 4

Pause bei 4 °C

Die Analyse der Fragmente erfolgte in der Abteilung für Molekulare Diagnostik des Zentrallaboratoriums am Universitätsklinikum Münster. Die Proben wurden an Silicagelsäulen gereinigt und anschließend am ABI-3730-Sequencer kapillarelektrophoretisch aufgetrennt.

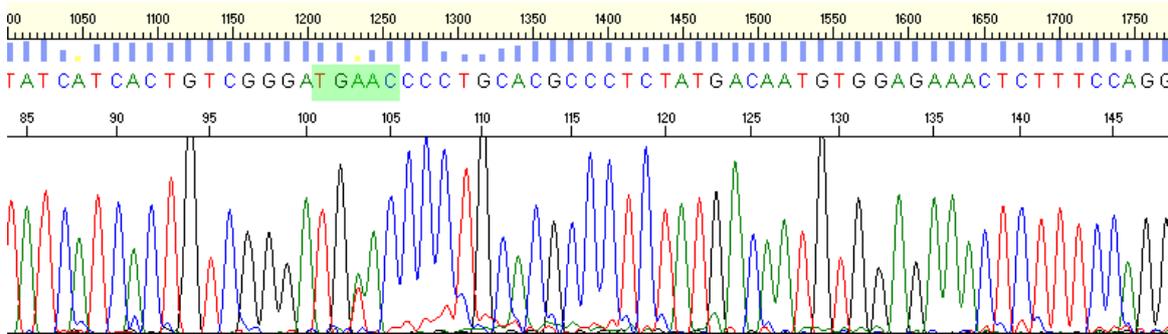


Abbildung 10: Probe: T30 - Proband Transfusionsmedizin

Ausgangsmaterial RNA/cDNA

Ergebnis: Proband heterozygot für SNP rs1049674 im Exon 4 des Asparaginsynthetase-Gens + Strang. Das A in der markierten Sequenz ist mit einem gelben Balken markiert, was eine niedrige Lesegenauigkeit angibt. Das heißt, dass an dieser Stelle die Base Adenin nicht eindeutig zugeordnet werden kann. In diesem Fall ist das darauf zurückzuführen, dass an der gleichen Stelle im Elektropherogramm auch ein T nachgewiesen werden konnte.

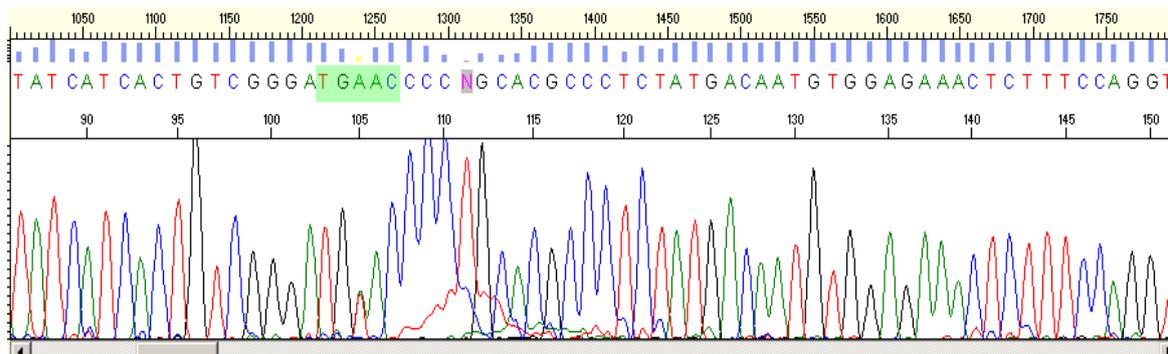


Abbildung 11: Probe: T18 - Proband Transfusionsmedizin

Ausgangsmaterial RNA/cDNA

Ergebnis: Proband heterozygot für SNP rs1049674 im Exon 4 des Asparaginsynthetase-Gens + Strang. Anmerkung: (siehe Abbildung 10) Leseungenauigkeiten können auch durch „Verunreinigungen“ in einem Lauf auftreten. So findet sich nach dem SNP eine Base, die von der Auswerte-Software nicht eindeutig zugeordnet werden konnte und deshalb mit „N“ bezeichnet wurde. Die ist darauf zurückzuführen, dass an der Stelle in dem Elektropherogramm Hintergrundrauschen auftritt, welches die automatische Peakzuordnung durch die Auswertungssoftware erschwert. Die visuelle Prüfung der Sequenz erlaubt allerdings eine eindeutige Zuordnung, die durch den Vergleich der Sequenz und der Elektropherogramme mit anderen Proben (siehe Abbildung 10) bestätigt wird.

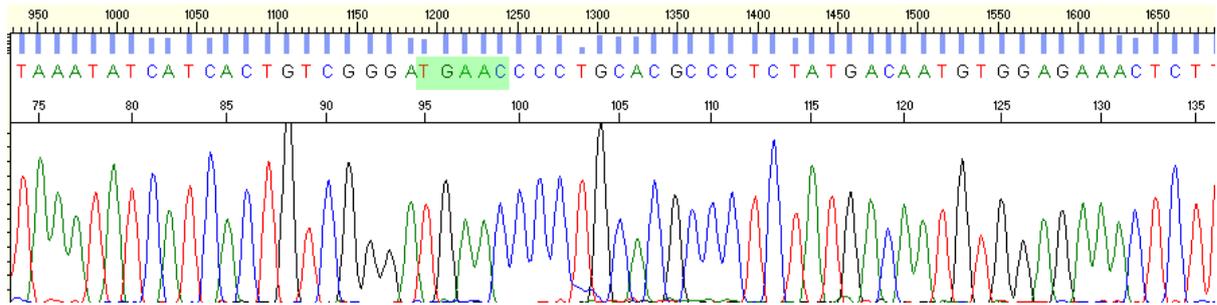


Abbildung 12: Probe: Zelllinie MEG-01
 Ausgangsmaterial RNA/cDNA
 Ergebnis: Zelllinie homozygot für den Wildtyp, kein SNP rs1049674 im Exon 4 nachweisbar
 + Strang

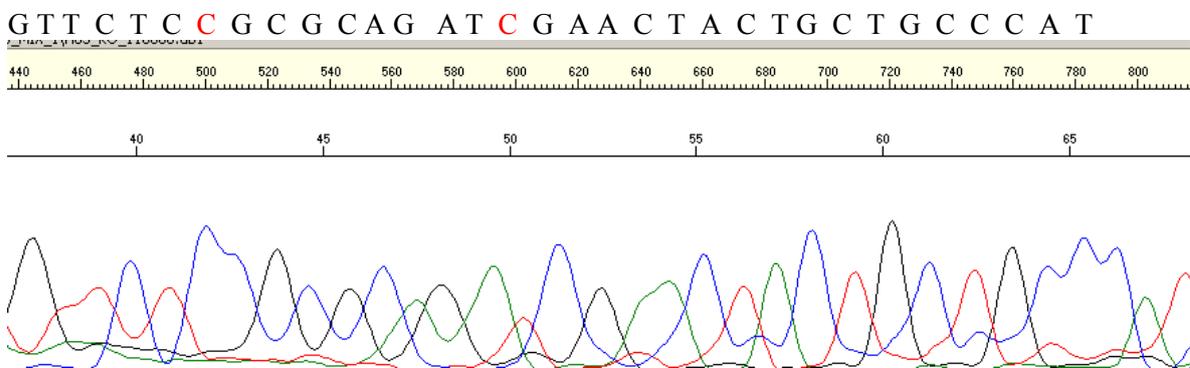


Abbildung 13: Probe: P33 Proband Hämatonkologie
 Ausgangsmaterial DNA
 Ergebnis: Proband homozygot für den Wildtyp, kein SNP rs3179866 im Exon 9 in Position nachweisbar
 + Strang

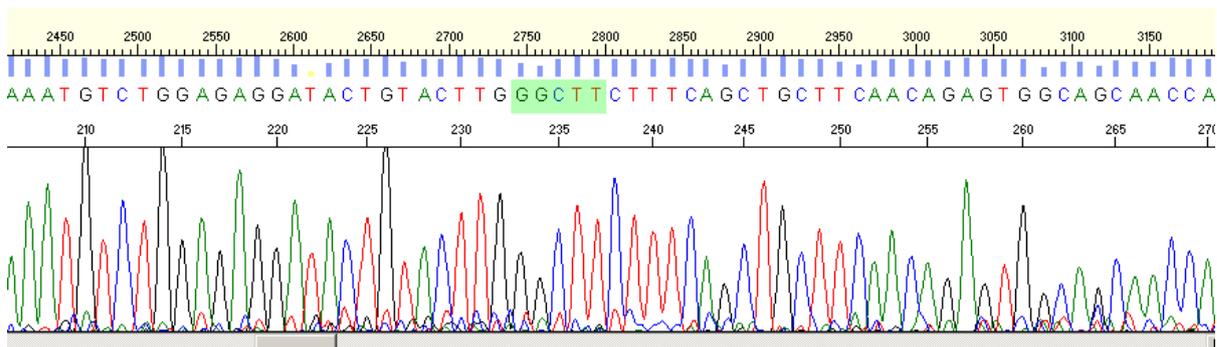


Abbildung 14: Probe: T18
 Ausgangsmaterial RNA/cDNA
 Ergebnis: Proband homozygot für den Wildtyp, kein SNP rs2070159 im Exon 6 in Position nachweisbar
 - Strang. In dieser Sequenz ist ein Hintergrundrauschen zu beobachten. Aufgrund des Hintergrundes konnte die Auswerte Software das „T“ in Position 223 der auswertbaren Sequenz nicht mit hoher Validität zugeordnet werden. Die visuelle Prüfung bestätigt allerdings die Zuordnung durch die Auswertungssoftware. Der Vergleich mit dem Elektropherogramm und der Sequenz einer anderen Probe (Abbildung 15) bestätigen die Auswertung ebenfalls.

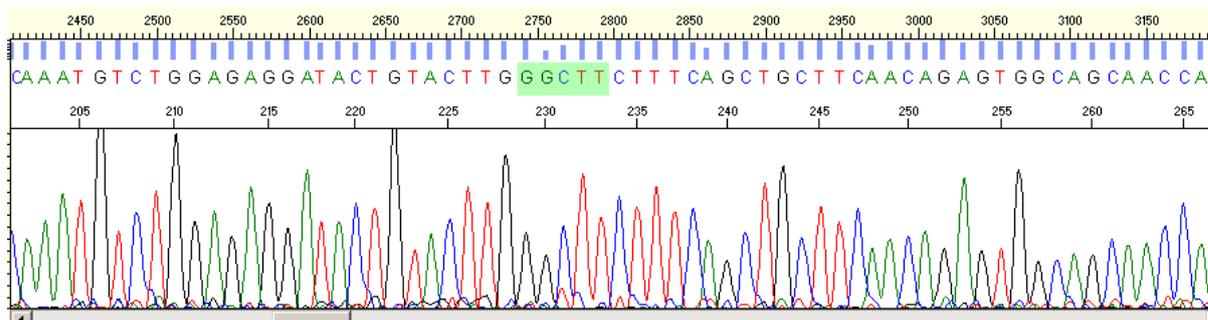


Abbildung 15: Probe: T30
 Ausgangsmaterial RNA/cDNA
 Ergebnis: Proband homozygot für den Wildtyp, kein SNP rs2070159 im Exon 6 in Position nachweisbar
 - Strang

Probe	Alter (in Jahren)	Geschlecht	Leukämie/ Lymphom	Phänotyp	DNA SNP rs1049674	cDNA SNP rs1049674	Sequenzierung DNA (cDNA) SNP rs1049674
P33	1,6	w	ALL	B-Vorläufer-ALL	WT/SNP	- ^a	WT/SNP
P22	16,5	m	ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	- ^a	WT
P32	5,9	w	ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	WT	WT
P36	5,7	w	ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	- ^a	WT
P16	7,7	w	ALL	c-ALL	- ^a	WT	WT (cDNA)
P12	11,8	w	Hybrid	H-Leukämie	WT/SNP	SNP	SNP (cDNA)
P13	11,3	w	Hybrid	Hybridleukämie	- ^a	SNP	SNP (cDNA)
P30	8,4	m	NHL	T-NHL	- ^a	WT	WT (cDNA)
P9	14,1	m	ALL	c-ALL	WT	WT	WT (cDNA)
T18	40	w	-	-	WT/SNP	WT/SNP	WT/SNP
T30	21	w	-	-	WT/SNP	WT/SNP	WT/SNP
HL-60	-	-	-	-	WT/SNP	- ^a	WT/SNP

Tabelle 2: Auflistung der sequenzierten Proben aller Kollektive, gesucht wurde der SNP rs1049674

-^a= kein Material

Probe	Alter (in Jahren)	Geschlecht	Leukämie/ Lymphom	Phänotyp	DNA SNP rs3179866	cDNA SNP rs3179866	Sequenzierung cDNA SNP rs3179866	DNA SNP rs2070159	cDNA SNP rs2070159	Sequenzierung cDNA SNP rs2070159
P22	16,5	m	ALL	B-Vorläufer- ALL	WT	_ ^a	WT	WT	_ ^a	_ ^b
P32	5,9	w	ALL	B-Vorläufer- ALL	WT	WT	WT	WT	WT	_ ^b
P33	1,6	w	ALL	B-Vorläufer- ALL	WT	_ ^a	WT	WT	_ ^a	_ ^b
P36	5,7	w	ALL	B-Vorläufer- ALL	WT	_ ^a	WT	_ ^a	_ ^a	_ ^a
T18	40	w	-	-	WT	WT	_ ^b	WT	WT	WT
T30	21	w	-	-	WT	WT	_ ^b	WT	WT	WT

Tabelle 3: Auflistung der sequenzierten Proben, gesucht wurden die SNPs rs3179866 und rs2070159

_^a= kein Material, -^b= nicht durchgeführt

Die Ergebnisse, die mit dem Restriktionsverdau ermittelt wurden, konnten durch die Sequenzierungen ausnahmslos bestätigt werden, was die Validität des Nachweises der Polymorphismen rs1049674 und rs3179866 mittels PCR und anschließend Restriktionsverdau sowie die Validität der allelspezifischen PCR für den SNP rs 2070159 belegt. Da allelspezifische PCR und Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen im Gegensatz zu Sequenzierungen kostengünstiger und einfacher durchzuführen sind, wurde die Sequenzierung nur zur Validierung dieser Methoden eingesetzt.

3.2 Vorkommen des SNP rs1049674 des Asparaginsynthetasegens in DNA und cDNA peripherer Leukozyten erwachsener Blutspender (Kontrollkollektiv)

Die DNA-Proben des Kontrollkollektives entstammten 31 erwachsenen Blutspendern. Der jüngste Blutspender war zum Zeitpunkt der Blutspende 20 Jahre, der älteste 55 Jahre alt. Der Altersmedian des Kollektivs lag bei 29 Jahren. Die Geschlechterverteilung der Gruppe betrug 14 männliche und 17 weibliche Teilnehmer. Den SNP rs1049674 trugen 15 Proben (48 %), davon waren 13 Proben (42 %) heterozygot. Neun männliche und 4 weibliche Blutspender waren heterozygot für den SNP rs1049674. Je ein weiblicher und ein männlicher Blutspender

waren homozygot für den SNP rs1049674 (siehe Tabelle 4), was einem Anteil von 6 % homozygoter Probanden im untersuchten Kollektiv entspricht.

Probe	Alter (in Jahren)	Geschlecht	DNA SNP rs1049674	cDNA SNP rs1049674	Sequenzierung cDNA SNP rs1049674
T1	49	m	WT	- ^a	- ^b
T2	47	m	WT	WT	- ^b
T3	37	m	WT	- ^a	- ^b
T4	37	m	WT/SNP	- ^a	- ^b
T5	34	m	WT/SNP	WT/SNP	- ^b
T6	32	m	WT/SNP	WT/SNP	- ^b
T7	32	m	WT/SNP	WT/SNP	- ^b
T8	29	m	WT/SNP	WT/SNP	- ^b
T9	27	m	WT/SNP	WT/SNP	- ^b
T10	25	m	SNP	SNP	- ^b
T11	25	m	WT/SNP	WT/SNP	- ^b
T12	23	m	WT	- ^a	- ^b
T13	22	m	WT/SNP	WT/SNP	- ^b
T14	20	m	WT/SNP	WT/SNP	- ^b
T15	55	w	WT	WT	- ^b
T16	44	w	WT	WT	- ^b
T17	41	w	WT/SNP	WT/SNP	- ^b
T18	40	w	WT/SNP	WT/SNP	WT/SNP
T19	40	w	WT	WT	- ^b
T20	40	w	WT	- ^a	- ^b
T21	31	w	WT	WT	- ^b
T22	30	w	WT	WT	- ^b
T23	26	w	SNP	SNP	- ^b
T24	25	w	WT/SNP	WT/SNP	- ^b
T25	23	w	WT	WT	- ^b
T26	22	w	WT	WT	- ^b
T27	22	w	WT	WT	- ^b
T28	21	w	WT	- ^a	- ^b
T29	21	w	WT	WT	- ^b
T30	21	w	WT/SNP	WT/SNP	WT/SNP
T31	20	w	WT	WT	- ^b

Tabelle 4: Ergebnisübersicht der SNP-Vorkommen im Kontrollkollektiv. WT entspricht dem Wildtyp, SNP dem Polymorphismus. Heterozygote Formen sind mit WT/SNP bezeichnet. -^a= kein Material, -^b= nicht durchgeführt

Zu den 31 DNA-Proben der Blutspender lagen zusätzlich 25 RNA-Proben vor, die auf das Vorhandensein des SNPs rs1049674 analysiert wurden. Für die RNA-Proben ergaben sich die gleichen Ergebnisse, die bereits für die DNA-Proben erhalten wurden. Von den 25 RNA-Proben waren 12 Proben, wie die DNA-Proben, heterozygot für den SNP rs1049674, während bei 13 RNA-Proben der SNPs rs1049674 nicht nachweisbar war. Da Heterozygotie des SNP rs1049674 sowohl auf DNA als auch auf RNA-Ebene nachweisbar war, ist davon auszugehen, dass beide Allele exprimiert wurden.

3.3 Vorkommen des SNP rs1049674 des Asparaginsynthetasegens in DNA und cDNA peripherer Leukozyten von pädiatrisch hämatologischen Patienten, die sich in Remission befanden

Zur Bestimmung der Inzidenz und der Verteilung des SNPs rs1049674 bei Patienten, die im Vorfeld der Untersuchung an einer Leukämie erkrankt waren, lag insgesamt Material von 36 Patienten vor. 19 Patienten waren an einer prä-B-ALL erkrankt, 8 an einer sogenannten 'common ALL' (c-ALL), je 2 an einer Hybrid-ALL und an einem T-NHL und jeweils einer an einem T-Lymphom, einer ALL-FAB1, einer T-ALL und einer AML-M5. Von einem Patienten war nur die Diagnose einer B-ALL ohne weitere Subklassifikation bekannt. Sechzehn Patienten waren weiblich, 18 männlich. Von 2 Patienten war das Geschlecht nicht bekannt. Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Untersuchung 1,6 bis 16,4 Jahre alt. Der Altersmedian des Kollektivs lag bei 5,7 Jahren, wobei von einem Patienten das Alter nicht ermittelt werden konnte.

Von den 36 Patienten lag bei 28 genomische DNA zur Untersuchung vor. Von 8 Patienten stand keine genomische DNA, sondern nur RNA als Ausgangsmaterial zur Verfügung. In den genomischen DNA-Proben konnten in 13 Fällen von insgesamt 28 (46 %) der SNP rs1049674 nachgewiesen werden (Tabelle 5). Alle Patienten, bei denen dieser SNP nachgewiesen werden konnte, waren heterozygot.

Unter den 8 Patienten, von denen ausschließlich RNA untersucht werden konnte, waren 2 heterozygot und ein Patient homozygot für den SNP rs1049674. Von 3 der 36 Patienten stand sowohl RNA als auch DNA zur Verfügung. Bei zwei dieser Patienten konnte auf DNA- und RNA-Ebene der SNP rs1049674 nicht nachgewiesen werden. Ein Patient war heterozygot auf DNA-Ebene, exprimiert aber nur das mutierte Allel (Tabelle 5). Die ausschließliche Expression des mutierten Allels konnte bei diesem Patienten mittels Sequenzierung der cDNA bestätigt werden.

Bei den 8 Patienten, von denen nur RNA zur Analyse zur Verfügung stand, konnten in 7 Fällen eindeutige Rückschlüsse auf den Genotyp gezogen werden. In der cDNA der Patienten war der SNP rs1049674 entweder nicht nachweisbar, oder aber es lag sowohl der Wildtyp als auch die

mutierte Form vor. Bei einem Patienten war in der RNA ausschließlich der SNP rs1049674 nachweisbar. Im Kollektiv der gesunden Blutspender waren zwei Probanden mit homozygotem Genotyp. In der RNA dieser Probanden war folglich ausschließlich der SNP rs1049674 nachweisbar. Der ausschließliche Nachweis des rs1049674 auf RNA-Ebene lässt allerdings nicht automatisch einen Rückschluss auf den Genotyp zu, wie anhand des Patienten P12 (Tabelle 5) ersichtlich.

Damit ließen sich insgesamt 35 Patienten dieses Kollektivs abschließend beurteilen. Von diesen Patienten waren 15 Patienten (43 %) heterozygot für den SNP rs1049674, während 57 % der Patienten (20 von 35) den SNP rs1049674 nicht aufweisen.

In der Gruppe der Patienten mit B-Vorläufer-ALL waren 8 von 19 Patienten (42 %) heterozygot und 58 % homozygot für den Wildtyp. Bei den cALL-Patienten war die Verteilung zwischen den Patienten mit und ohne Mutation geringfügig verschoben. 50 % der cALL Patienten waren homozygot für den Wildtyp und 50 % heterozygot für den SNP rs1049674.

Bei den beiden Patienten, die an einer Hybridleukämie erkrankt waren, war in der RNA ausschließlich der SNP rs1049674 nachweisbar, wobei ein Patient (P13) einen heterozygoten Genotyp aufwies und demzufolge nur das mutierte Allel exprimiert wurde. Von dem anderen Patienten mit Hybridleukämie lag nur RNA zur Analyse vor, so dass hier keine Rückschlüsse auf den Genotyp gezogen werden konnten.

Probe	Alter (in Jahren)	Geschlecht	Leukämie/ Lymphom	Phänotyp	DNA SNP rs1049674	cDNA SNP rs1049674	Sequenzierung DNA (cDNA) SNP rs1049674
P35	3,2	m	ALL	ALL-FAB1	WT/SNP	- ^a	- ^b
P5	11,1	n.b.	ALL	B-ALL	WT	- ^a	- ^b
P21	4,0	m	ALL	B-Vorläufer-ALL	WT/SNP	- ^a	- ^b
P24	2,2	m	ALL	B-Vorläufer-ALL	WT/SNP	- ^a	- ^b
P29	4,2	m	ALL	B-Vorläufer-ALL	WT/SNP	- ^a	- ^b
P8	3,7	w	ALL	B-Vorläufer-ALL	WT/SNP	- ^a	- ^b
P27	11,5	w	ALL	B-Vorläufer-ALL	WT/SNP	- ^a	- ^b
P33	1,6	w	ALL	B-Vorläufer-ALL	WT/SNP	- ^a	WT/SNP
P37	n.b.	w	ALL	B-Vorläufer-ALL	WT/SNP	- ^a	- ^b
P3	4,2	m	ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	- ^a	- ^b
P4	2,3	m	ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	- ^a	- ^b
P15	1,6	m	ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	- ^a	- ^b
P17	16,4	w	ALL	B-Vorläufer-ALL	- ^a	WT	- ^b
P19	3,1	m	ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	- ^a	- ^b
P20	7,9	m	ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	- ^a	- ^b
P22	16,5	m	ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	- ^a	WT
P23	5,4	w	ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	- ^a	- ^b
P25	2,0	w	ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	- ^a	- ^b
P32	5,9	w	ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	WT	WT
P36	5,7	w	ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	- ^a	WT
P1	10,5	m	ALL	c-ALL	WT/SNP	- ^a	- ^b
P2	2,9	m	ALL	c-ALL	- ^a	WT	- ^b
P6	2,3	m	ALL	c-ALL	- ^a	WT/SNP	- ^b
P11	4,6	m	ALL	c-ALL	WT/SNP	- ^a	- ^b
P14	6,6	w	ALL	c-ALL	- ^a	WT	- ^b
P16	7,7	w	ALL	c-ALL	- ^a	WT	WT (cDNA)
P18	10,4	w	ALL	c-ALL	WT/SNP	- ^a	- ^b
P9	14,1	m	ALL	c-ALL	WT	WT	- ^b
P7	3,3	w	ALL	prä-B-ALL	WT/SNP	- ^a	- ^b
P28	13,1	w	ALL	T-ALL	WT	- ^a	- ^b
P26	14,6	m	AML	AML-M5	WT	- ^a	- ^b
P12	11,8	w	Hybrid	H-Leukämie	WT/SNP	SNP	SNP (cDNA)
P13	11,3	w	Hybrid	Hybridleukämie	- ^a	SNP	SNP (cDNA)
P38	5,6	n.b.	NHL	T-Lymphom	WT	- ^a	- ^b
P30	8,4	m	NHL	T-NHL	- ^a	WT	WT (cDNA)
P34	6,7	m	NHL	T-NHL	- ^a	WT/SNP	- ^b

Tabelle 5: Ergebnisübersicht der SNP rs1049674 Vorkommen im hämato-onkologischen Kollektiv. WT entspricht dem Wildtyp, SNP dem Polymorphismus. Heterozygote Formen sind mit WT/SNP bezeichnet. -^a= kein Material, -^b= nicht durchgeführt

3.4 Vorkommen des SNP rs1049674 des Asparaginsynthetasegens in peripheren Leukozyten von pädiatrisch hämato-onkologischen Patienten, die an Nebenwirkungen unter Asparaginasetherapie litten

Unter den insgesamt 36 Patienten befanden sich 5 Patienten, bei denen unter Asparaginase-Therapie schwere Nebenwirkungen auftraten.

Die fünf Patienten litten an einem reversiblen Diabetes mellitus im Rahmen der Pankreatiko-Hepatotoxizität. Als Kontrollkollektiv fungierten fünf pädiatrisch hämato-onkologische Patienten, die unter der Chemotherapie mit ASPase keine Nebenwirkungen entwickelten.

Nummerierung	Alter (in Jahren)	Geschlecht	Nebenwirkung *	Leukämie/ Lymphom	Phänotyp	DNA - SNP rs1049674	cDNA - SNP rs1049674	Sequenzierung cDNA (DNA) - SNP rs1049674
P34	6,7	m	-	NHL	T-NHL	- ^a	WT/SNP	- ^b
P1	10,5	m	+	ALL	c-ALL	WT/SNP	- ^a	- ^b
P2	2,9	m	-	ALL	c-ALL	- ^a	WT	- ^b
P9	14,1	m	-	ALL	c-ALL	WT	WT	WT _(DNA)
P14	6,6	w	-	ALL	c-ALL	- ^a	WT	- ^b
P16	7,7	w	-	ALL	c-ALL	- ^a	WT	WT
P30	8,4	m	+	NHL	T-NHL	- ^a	WT	WT
P13	11,3	w	+	Hybrid	Hybridleukämie	- ^a	SNP	SNP
P6	2,3	m	+	ALL	c-ALL	- ^a	WT/SNP	- ^b
P17	16,4	w	+	ALL	B-Vorläufer-ALL	- ^a	WT	- ^b

Tabelle 6: Dargestellt sind die Ergebnisse der Untersuchungen von DNA und cDNA der hämato-onkologischen Patienten der Nebenwirkungsstudie.*Litten sie unter Nebenwirkungen durch die ASPase Therapie, sind sie mit einem + gekennzeichnet. Ein - bedeutet, dass sie keine Nebenwirkungen entwickelten. WT entspricht dem Wildtyp, SNP dem Polymorphismus. Heterozygote Formen sind mit WT/SNP bezeichnet.

-^a= kein Material, -^b= nicht durchgeführt

Der Alters-Median dieses Kollektivs lag bei 8 Jahren, mit einem Range von 2,9 bis 16,4 Jahren. In beiden Gruppen waren jeweils 2 weibliche und 3 männliche Patienten. Der Altersrange in der Patientengruppe mit schweren Nebenwirkungen unter Asparaginase-Therapie lag zwischen 2,3 und 16,4 Jahren (Median: 10,5 Jahre). Der Altersrange der Patienten, die die Asparaginase-Therapie gut toleriert haben, lag zwischen 2,9 und 14,1 Jahre (Median: 6,7 Jahre). In der Gruppe der Patienten ohne schwere Nebenwirkungen waren 4 Patienten an einer cALL und ein Patient an einem T-NHL erkrankt. In der Gruppe der Patienten mit schwerer Pankreas- und Hepatotoxizität unter Asparaginase-Therapie waren 2 Patienten an einer cALL, ein Patient an einer B-Vorläufer-ALL, ein Patient an einem T-NHL und ein Patient an einer Hybridleukämie

erkrankt. Nur von 2 Patienten konnte DNA analysiert werden, während RNA-Proben von 9 Patienten zur Verfügung standen. Anhand der RNA-Ergebnisse konnten in 8 von 9 Fällen eindeutige Rückschlüsse auf den Genotyp gezogen werden. In der Gruppe der Patienten ohne Nebenwirkungen war ein Patient von 5 heterozygot für den SNP rs1049674. In der Gruppe der Patienten mit Nebenwirkungen waren 2 von 4 Patienten heterozygot für den SNP rs1049674. Bei dem fünften Patienten dieser Gruppe war der SNP rs1049674 ebenfalls nachweisbar. Aufgrund der fehlenden DNA konnte allerdings nicht entschieden werden, ob der Patient heterozygot oder homozygot für den SNP rs1049674 war. Aussagen zur Allelverteilung können an diesem insgesamt kleinen Patientenkollektiv nicht gemacht werden. Zusammenfassend lässt sich aber festhalten, dass bei den Patienten mit Nebenwirkung der SNP rs1049674 in 3 von 5 Fällen nachweisbar war, während er in der Gruppe der Patienten ohne Nebenwirkungen nur einmal auftrat (Tabelle 6).

Bei keinem der Patienten konnten die SNPs rs3179866 und rs2070159 nachgewiesen werden.

3.5 Vorkommen des SNP rs1049674 des Asparaginsynthetasegens in Zelllinien

Untersucht wurde DNA von acht leukämischen Zelllinien. Vier Zelllinien - CCRF-CEM, BLIN, MOLT-4, REH - waren lymphatischen Ursprungs und aus den Blasten von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie etabliert (ALL-Zelllinien). Die Zelllinien MEG-01, M-07e, K562 und HL-60 wurden von leukämischen Blasten myeloischen Ursprungs etabliert (AML-Zelllinien) (Tabelle 7). Der SNP rs1049674 ließ sich nur in den AML- Zelllinien HL-60 und M-07e finden. Beide Zelllinien waren heterozygot für den SNP rs1049674.

Zelllinien	Merkmale	DNA SNP rs1049674	Sequenzierung DNA SNP rs1049674
MOLT-4	T-ALL	WT	- ^b
CCRF-CEM	T-ALL	WT	- ^b
REH	pre B- ALL - TEL/AML1 positiv	WT	- ^b
BLIN	pre B-ALL/B-ALL	WT	- ^b
HL-60	AML - M2	SNP/WT	SNP/WT
M-07e	AML - M7	SNP/WT	- ^b
K562	CML	WT	- ^b
MEG-01	CML	WT	- ^b

Tabelle 7: Ergebnisübersicht der SNP-Vorkommen im Zelllinien-Kollektiv. WT entspricht dem Wildtyp, SNP dem Polymorphismus. Heterozygote Formen sind mit WT/SNP bezeichnet. -^b= nicht durchgeführt

3.6 Vorkommen der SNP rs3179866 und rs2070159 des Asparaginsynthetasegens

Untersucht wurde die DNA und cDNA peripherer Leukozyten von pädiatrisch hämatologisch- onkologischen Patienten, welche sich in kompletter Remission befanden, sowie DNA und cDNA aus peripheren Leukozyten gesunder Blutspender und DNA sowie cDNA ausgewählter Zelllinien. In allen Kollektiven ließ sich der SNP rs3179866 mittels Restriktionsverdau (siehe 2.1.2) nicht nachweisen.

Der SNP rs2070159 wurde mittels allelspezifischer Realtime-PCR (siehe 2.1.3) in den oben genannten Kollektiven analysiert. Er ließ sich mit dieser Methode in keiner der Proben detektieren (siehe Tabelle 8,9 und 10).

Probe	Alter (in Jahren)	Geschlecht	DNA SNP rs3179866	cDNA SNP rs3179866	DNA SNP rs2070159	cDNA SNP rs2070159	Sequenzierung cDNA SNP rs2070159
T1	49	m	WT	- ^c	WT	- ^c	- ^b
T2	47	m	WT	WT	WT	WT	- ^b
T3	37	m	WT	- ^c	WT	- ^c	- ^b
T4	37	m	WT	- ^c	WT	- ^c	- ^b
T5	34	m	WT	WT	WT	WT	- ^b
T6	32	m	WT	WT	WT	WT	- ^b
T7	32	m	WT	WT	WT	WT	- ^b
T8	29	m	WT	WT	WT	WT	- ^b
T9	27	m	WT	WT	WT	WT	- ^b
T10	25	m	WT	WT	WT	WT	- ^b
T11	25	m	WT	WT	WT	WT	- ^b
T12	23	m	WT	WT	WT	WT	- ^b
T13	22	m	WT	WT	WT	WT	- ^b
T14	20	m	WT	WT	WT	WT	- ^b
T15	55	w	WT	WT	WT	WT	- ^b
T16	44	w	WT	WT	WT	WT	- ^b
T17	41	w	WT	WT	WT	WT	- ^b
T18	40	w	WT	WT	WT	WT	WT
T19	40	w	WT	WT	WT	WT	- ^b
T20	40	w	WT	WT	WT	WT	- ^b
T21	31	w	WT	- ^c	WT	- ^c	- ^b
T22	30	w	WT	- ^c	WT	- ^c	- ^b
T23	26	w	WT	WT	WT	WT	- ^b
T24	25	w	WT	WT	WT	WT	- ^b
T25	23	w	WT	WT	WT	WT	- ^b
T26	22	w	WT	WT	WT	WT	- ^b
T27	22	w	WT	WT	WT	WT	- ^b
T28	21	w	WT	- ^c	WT	- ^c	- ^b
T29	21	w	WT	WT	WT	WT	- ^b
T30	21	w	WT	WT	WT	WT	WT
T31	20	w	WT	WT	WT	WT	- ^b

Tabelle 8: Ergebnisübersicht der SNP-Vorkommen im Kontroll-Kollektiv. WT entspricht dem Wildtyp, SNP dem Polymorphismus. Heterozygote Formen sind mit WT/SNP bezeichnet.

-^b= nicht durchgeführt, -^c= keine Amplifikation

Probe	Alter (in Jahren)	Geschlecht	Nebenwirkung	Leukämie/ Lymphom	Phenotyp	DNA SNP rs3179866	Sequenzierung DNA SNP rs3179866	cDNA SNP rs3179866	DNA SNP rs2070159	cDNA SNP rs2070159
P1	10,5	m	+	ALL	c-ALL	-. ^a	-. ^b	WT	-. ^a	WT
P2	2,9	m	-	ALL	c-ALL	-. ^a	-. ^b	WT	-. ^a	WT
P3	4,2	m		ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	-. ^b	-. ^a	WT	-. ^a
P4	2,3	m		ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	-. ^b	-. ^a	WT	-. ^a
P5	11,1	n.b.		ALL	B-ALL	WT	-. ^b	-. ^a	WT	-. ^a
P6	2,3	m	+	ALL	c-ALL	-. ^a	-. ^b	WT	-. ^a	WT
P7	3,3	w		ALL	prä-B-ALL	WT	-. ^b	-. ^a	WT	-. ^a
P8	3,7	w		ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	-. ^b	-. ^a	WT	-. ^a
P9	14,1	m	-	ALL	c-ALL	-. ^a	-. ^b	WT	-. ^a	WT
P10	8,0	m	-	ALL	c-ALL	-. ^a	-. ^b	WT	-. ^a	WT
P13	11,3	w	+	Hybrid	Hybridleukämie	-. ^a	-. ^b	WT	-. ^a	WT
P14	6,6	w	-	ALL	c-ALL	-. ^a	-. ^b	WT	-. ^a	WT
P15	1,6	m		ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	-. ^b	-. ^a	WT	-. ^a
P17	16,4	w	+	ALL	B-Vorläufer-ALL	-. ^a	-. ^b	WT	-. ^a	WT
P18	10,4	w		ALL	c-ALL	WT	-. ^b	-. ^a	WT	-. ^a
P20	7,9	m		ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	-. ^b	-. ^a	WT	-. ^a
P22	16,5	m		ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	WT	-. ^a	WT	-. ^a
P23	5,4	w		ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	-. ^b	-. ^a	WT	-. ^a
P24	2,2	m		ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	-. ^b	-. ^a	WT	-. ^a
P25	2,0	w		ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	-. ^b	-. ^a	WT	-. ^a
P27	11,5	w		ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	-. ^b	-. ^a	WT	-. ^a
P28	13,1	w		ALL	T-ALL (kortical)?	WT	-. ^b	WT	WT	WT
P29	4,2	m		ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	-. ^b	-. ^a	WT	-. ^a
P30	8,4	m	+	NHL	T-NHL	-. ^a	-. ^b	WT	-. ^a	WT
P31	5,6	w	+	ALL	NB-ALL	-. ^a	-. ^b	WT	-. ^a	WT
P32	5,9	w		ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	WT	WT	WT	WT
P33	1,6	w		ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	WT	-. ^a	WT	-. ^a
P34	6,7	m	-	NHL	T-NHL	-. ^a	-. ^b	WT	-. ^a	WT
P35	3,2	m		ALL	ALL-FAB1	WT	-. ^b	-. ^a	WT	-. ^a
P36	5,7	w		ALL	B-Vorläufer-ALL	WT	WT	-. ^a	-. ^a	-. ^a
P38	5,6	n.b.		NHL	T-Lymphom	WT	-. ^b	-. ^a	WT	-. ^a

Tabelle 9: Ergebnisübersicht der SNP-Vorkommen im Patienten-Kollektiv. WT entspricht dem Wildtyp, SNP dem Polymorphismus. Heterozygote Formen sind mit WT/SNP bezeichnet.
^a= kein Material, ^b= nicht durchgeführt

Zelllinien	Merkmale	DNA SNP rs3179866	DNA SNP rs2070159
MOLT-4	T-ALL - Lymphozyten	WT	WT
CCRF-CEM	T-ALL - peripheres Blut	WT	WT
REH	pre B- ALL - TEL/AML1 positiv	- ^c	WT
BLIN	pre B-ALL/B-ALL [80]	WT	WT
HL-60	AML - M2 - c-myc Gen Tetraploid	WT	WT
M07	AML - M7 - akut megakaryoblastisch, peripheres Blut	- ^c	WT
K562	CML - Blastenkrise, Philadelphia Chromosom	WT	WT
MEG-01	CML - megakaryozytische Blastenkrise	- ^c	WT

Tabelle 10: Ergebnisübersicht der SNP-Vorkommen im Zelllinien-Kollektiv. WT entspricht dem Wildtyp, SNP dem Polymorphismus. Heterozygote Formen sind mit WT/SNP bezeichnet. -^c= kein Amplifikat

3.7 Allelverteilung des SNP rs1049674 der verschiedenen analysierten Kollektive

Aussagen zur Allelfrequenz des SNP rs1049674 können innerhalb des Blutspenderkollektives bei allen 31 Probanden gemacht werden. Die Allele verteilten sich wie folgt: 45 Wildtyp-Allele und 17 mutierte Allele. Der Anteil der mutierten Allele lag damit bei 27 %. Innerhalb des Kollektivs von Patienten, die an einer Leukämie erkrankt waren, konnten in 35 von 36 Fällen Aussagen gemacht werden. In dem auswertbaren Patientenkollektiv waren 55 Wildtyp-Allele und 15 mutierte Allele nachgewiesen worden, was einem prozentualen Anteil mutierter Allele von 21 % entspricht.

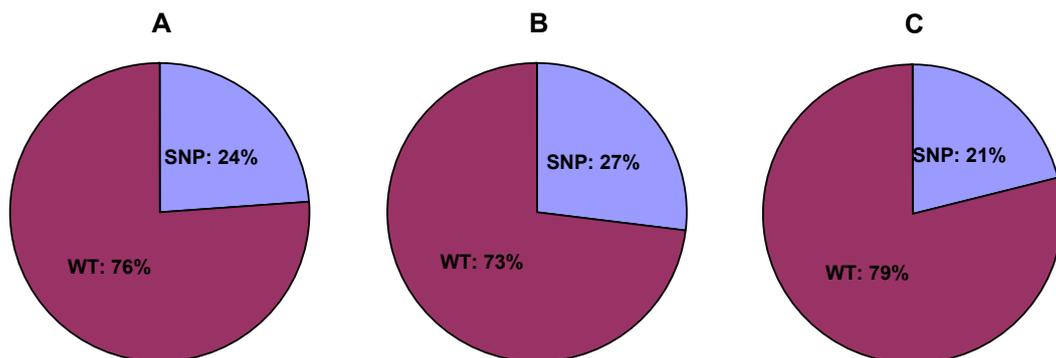


Abbildung 16: Dargestellt ist die Allelfrequenz des SNP rs1049674 in unterschiedlichen Kollektiven, A= alle untersuchten DNA-Proben isoliert aus peripheren Leukozyten, B= DNA-Proben aus peripheren Leukozyten von erwachsenen Blutspendern, C= DNA-Proben aus peripheren Leukozyten von Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie in Remission

Betrachtet man die Allelfrequenz der beiden Kollektive, so zeigt sich bei der Gruppe der pädiatrischen hämato-onkologischen Patienten (n = 70 Allele) ein Verhältnis von 15 SNP

tragenden Allelen zu 55 Wildtyp-Allelen. Im Kontrollkollektiv der gesunden Blutspender (n = 62 Allele) zeigt sich ein Verhältnis von 45 Wildtyp-Allelen zu 17 SNP tragenden Allelen. Im Chi-Quadrat-Test mit Yates-Korrektur ergibt sich ein Wert von 0.35772 mit einem p-Wert von 0,55. Ein signifikanter Unterschied der Allelfrequenz lässt sich somit nicht ausmachen.

Im Hinblick auf die Frequenz des SNP rs1049674 innerhalb einer Population konnte der SNP rs1049674 in 32 von 67 Fällen nachgewiesen werden, was einem prozentualen Anteil von 48 % entsprach. In der Gruppe der pädiatrisch hämato-onkologischen Patienten konnte in 16 von 36 Fällen der SNP nachgewiesen werden (44 %). Bei den gesunden Blutspendern war der SNP rs1049674 in 15 von 31 Fällen nachweisbar (48 %). Im Chi-Quadrat-Test mit Yates-Korrektur ergibt sich ein Wert von 0,00593 mit einem p-Wert von 0,94. Somit ergab sich kein signifikanter Unterschied in den SNP rs1049674 Vorkommen der beiden Kollektive.

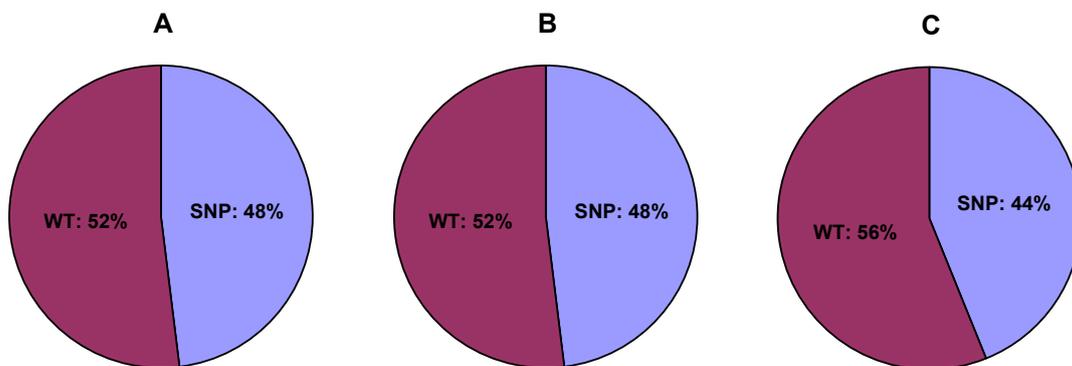


Abbildung 17: Dargestellt ist die Häufigkeit des SNP rs1049674 in den einzelnen Kollektiven, A= alle untersuchten DNA-Proben isoliert aus peripheren Leukozyten, B= DNA-Proben aus peripheren Leukozyten von erwachsenen Blutspendern, C= DNA-Proben aus peripheren Leukozyten von Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie in Remission

4 Diskussion

‘Single nucleotide Polymorphisms’ (SNPs) können die Wirksamkeit von Arzneimitteln beeinflussen. Mögliche Auswirkungen von SNPs sind die Abschwächung oder auch Verstärkung der Wirkung von Arzneimitteln, sowie die Verstärkung oder Abschwächung von Nebenwirkungen [25]. Ein klassisches Beispiel in diesem Zusammenhang ist der TPMT-Polymorphismus, welcher die Wirkung der Zytostatika Mercaptopurin und Thioguanin verstärkt und zu vermehrten Nebenwirkungen führen kann (siehe 1.4).

Gegenstand dieser Untersuchung ist die erstmalige Analyse der Inzidenz von drei kodierenden SNPs des Gens der Asparaginsynthetase (AS), sowie die Etablierung des Restriktionsverdaus als Methodik zur Detektion von SNP des AS-Gens. Wie bereits unter 1.3 beschrieben spielt die AS eine wichtige Rolle in der ASPase-Therapie. Polymorphismen der AS könnten demnach einen Einfluss auf die ASPase-Therapie haben und deren Wirkungen und Nebenwirkungen entscheidend beeinflussen. Möglich wäre in diesem Zusammenhang eine Beeinträchtigung der AS-Aktivität, welche sowohl gesunde als auch entartete Gewebe empfindlicher gegenüber der Behandlung mit Asparaginase machen könnte. Daraus könnten sowohl vermehrte Nebenwirkungen als auch höhere Therapieeffizienzen resultieren. Bevor weiter gehende Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung dieser Polymorphismen durchgeführt werden können, ist es sinnvoll, die Verteilung der SNPs in bestimmten Subpopulationen wie zum Beispiel Leukämiepatienten zu untersuchen.

Das Gen der AS liegt auf dem langen Arm von Chromosom 7 (q21.3). Derzeit sind acht SNPs in kodierenden Bereichen beschrieben. Von den acht Polymorphismen, die in kodierenden Bereichen liegen, führen fünf zu einem Basenaustausch und sind somit nicht-synonym. Zum Zeitpunkt der Untersuchungsdurchführung lagen noch keine Daten zur Inzidenz dieser Polymorphismen vor. Diese Untersuchung befasst sich mit dem Vorkommen von drei der fünf derzeit bekannten nicht-synonymen SNPs in kodierenden Genabschnitten des AS-Gens im Genom der kaukasischen Bevölkerung. Diese drei SNPs führen zu einem Aminosäureaustausch und damit zu Änderungen der Proteinsequenz, welches möglicherweise Auswirkungen auf die Proteinfaltung, Proteinfunktion und/oder Proteinstabilität gegenüber Proteasen hat.

Untersucht wurden zwei Populationen. Die eine Population bestand aus Kindern im Alter von 1,6 bis 16,5 Jahren, die an einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) erkrankt waren, und die andere Population bestand aus gesunden, erwachsenen Probanden im Alter von 20 bis 55 Jahren. Ergänzend wurden die Untersuchungen auch an leukämischen Zelllinien durchgeführt.

Die Fragestellungen dieser Untersuchung lauten:

- Wie häufig kommen die SNP rs1049674, rs2070159 und rs3179866 bei gesunden Probanden und bei Patienten, die an einer Leukämie erkrankt waren, vor?
- Gibt es unterschiedliche Inzidenzen dieser SNPs zwischen Gesunden und Patienten, die an einer Leukämie erkrankt waren?
- Gibt es eine Häufung der SNP-Vorkommen bei Patienten, die unter ASPase-Therapie schwere Nebenwirkungen entwickelt haben?
- Treten die betreffenden Polymorphismen bei Leukämiezellen auf (untersucht anhand von Zelllinien)?
- Ist die Asparaginsynthetase-mRNA-Expression bei SNP tragenden Leukozyten gesteigert oder gemindert im Vergleich zu den nicht SNP tragenden Leukozyten der unterschiedlichen Kollektive?
- Welche Ausblicke ergeben sich anhand der gewonnenen Erkenntnisse im Bezug auf die Vorkommen der SNPs rs1049674, rs2070159 und rs3179866?

Etablierung des Nachweises der SNPs rs1049674 und rs3179866 mittels RFLP

Zur Analyse der Vorkommen der SNP rs1049674 und rs3179866 wurden zwei verschiedene Restriktionsenzyme eingesetzt. Der SNP rs1049674 wurde wie unter 3.1.3 beschrieben mit Hilfe des Restriktionsenzym Rhodopseudomonas spaeroides (RsaI) detektiert. Die Kontrolle der Restriktionsverdauergebnisse wurde wie unter 3.1.5 dargestellt mittels Sequenzierung durchgeführt (Tabelle 2). Es bestätigten sich alle Ergebnisse.

Der SNP rs3179866 wurde wie unter 3.1.4 dargestellt mit dem Restriktionsenzym des Bakteriums Thermus aquaticus YT I (Taq I) untersucht. Auch hier bestätigte die spätere Sequenzierung alle Ergebnisse (Tabelle 3).

Der Gebrauch der Restriktionsenzyme Rsa I und Taq I ist somit eine valide und im Vergleich zur Sequenzierung einfachere und kostengünstigere Methode zur Detektion der SNP rs1049674 und rs3179866 des AS-Gens.

Wie häufig kommen die SNP rs1049764, rs2070159 und rs3179866 bei gesunden Probanden und bei Patienten, die an einer Leukämie erkrankt waren, vor?

Zur Untersuchung der Vorkommen von SNPs des AS-Gens wurde DNA und RNA von pädiatrisch hämato-onkologischen Patienten mit ALL und gesunden, erwachsenen Probanden auf das Vorkommen der beschriebenen drei nicht-synonymen SNP rs1049674, rs2070159 und rs3179866 hin analysiert.

In den gesamten Kollektiven wurde nur der SNP rs1049674 gefunden. Die SNPs rs3179866 und rs2070159 hatten bezogen auf alle untersuchten Kollektive eine Inzidenz <0,67 %.

Der SNP rs1049674 ließ sich insgesamt in beiden untersuchten Kollektiven zusammen (ohne Zelllinien) zu 48 % nachweisen. Im Patientenkollektiv trat der SNP mit einer Häufigkeit von 44 % auf, im Kontrollkollektiv gesunder erwachsener Blutspender mit einer Häufigkeit von 48 %. Dies zeigt, dass der SNP rs1049674 im Genom der kaukasischen Bevölkerung mit knapp 50 % relativ häufig vorkommt. Eine Assoziation dieses SNP mit der Inzidenz von akuten lymphatischen Leukämien im Kindesalter scheint nicht vorzuliegen, da die SNP-Raten des Kontrollkollektivs und des Patientenkollektivs nahe zu gleich sind.

Die Allelfrequenz, bezogen auf alle Proben, lag für den SNP rs1049674 bei 24 %. Im Kontrollkollektiv lag die Allelfrequenz bei 27 %, im Patientenkollektiv bei 21 %.

Von den insgesamt 28 SNP tragenden DNA-Proben waren 26 heterozygot.

Im Kontrollkollektiv wurden von den 13 heterozygoten SNP tragenden DNA-Proben 12 auch auf cDNA-Ebene analysiert. In allen 12 analysierten Proben zeigte sich, dass beide Allele transkribiert wurden. Im Patientenkollektiv waren 13 Proben auf DNA-Ebene heterozygot für den SNP rs1049674. Nur eine dieser 13 Proben wurde auch auf cDNA-Ebene analysiert (P12).

Insgesamt wurden im Patientenkollektiv 11 cDNA-Proben untersucht. Von diesen 11 Proben war bei sieben der Polymorphismus nicht nachweisbar. In zwei Fällen wurden beide Allele transkribiert (P6, P34) und in 2 Fällen nur das SNP tragende Allel (P12, P13). In einem dieser Fälle (P12) wurde zusätzlich DNA analysiert, wobei sich herausstellte, dass der Patient auf DNA-Ebene heterozygot war, aber nur ein Allel transkribierte. Bei dem anderen Patienten (P13) lag keine DNA vor, so dass keine Rückschlüsse auf Homo- oder Heterozygotie möglich sind. Interessanterweise entstammte das Material der Proben P12 und P13 Patienten, die an einer Hybridleukämie erkrankt waren. Hybridleukämien sind dadurch charakterisiert, dass sie verschiedene Proteine exprimieren, welche in 'Cluster of Differentiation' (CD) eingeteilt werden, die sowohl für den Phänotyp der ALL als auch für den Phänotyp der AML sprechen. Da sie weder der einen noch der anderen Gruppierung vollends entsprechen, bilden sie eine eigene Gruppe.

Vielfach wird in gesunden Zellen nur ein Allel eines Gens exprimiert. Dieses Phänomen wird Prägung oder auch Imprinting genannt. In diesen Fällen wird das zweite Allel zum Beispiel durch Methylierung stillgelegt. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu prüfen, ob der Promotor des AS Gens auf dem Allel mit dem Wildtyp bei dem Patienten P12 durch Methylierung stillgelegt wurde und bei diesem Allel wirklich ein Imprinting vorlag. Wäre dies der Fall, könnte das Tragen des SNPs trotz Heterozygotie einem homozygoten Träger des SNPs entsprechen, da der SNP sich bei ungestörter Translation auf der Proteinebene darstellt.

Nur bei den beiden von uns untersuchten Proben, der Patienten, die an einer Hybridleukämie erkrankt waren, ließ sich auf cDNA-Ebene nur ein SNP rs1049674 tragendes Allel nachweisen. Bei der Kontrollgruppe der gesunden erwachsenen Blutspender hatten wir in 25 von 31 Fällen sowohl RNA als auch DNA zur Analyse zur Verfügung. Unter den 15 DNA-Proben mit SNP waren zwei homozygote SNP-Träger zu finden. Alle 13 heterozygoten DNA-Proben zeigten auf RNA-Ebene die Transkription von beiden Allelen, so dass sich hier kein Imprinting vermuten lässt.

Sollte ein SNP die Funktion der AS verändern, so käme es in diesen Fällen nicht voll zum Tragen, da neben dem SNP tragenden Allel auch das Wildtyp-Allel transkribiert wird. Jedoch könnte, wenn bei Heterozygotie beide Allele exprimiert werden, dennoch eine Stoffwechsel beeinflussende Wirkung daraus resultieren, siehe TPMT-Polymorphismen (1.4).

Ob eine stoffwechselbeeinflussende Wirkung bei Heterozygotie von dem SNP ausgeht, hängt davon ab, ob der SNP zu einer Beeinträchtigung der Enzymexpression bzw. der Enzymfunktion führt.

Die quantitative Verteilung der Transkription der Allele mit und ohne SNP sowie die Stabilität der verschiedenen RNAs wäre in diesen Fällen eine interessante Fragestellung, der in weiterer Forschung nachgegangen werden könnte.

Gibt es unterschiedliche Inzidenzen der SNP zwischen gesunden Probanden und Patienten, die an einer Leukämie erkrankt waren?

Im Patientenkollektiv kommt der SNP rs1049674 zu 46 % vor. In der Kontrollgruppe der Blutspender wurde der SNP auf DNA-Ebene in 48 % der Fälle nachgewiesen. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen gesunden Probanden und Patienten, die an einer Leukämie erkrankt waren, feststellen ($p = 1$).

Die Ergebnisse der Patienten, die an einer Leukämie erkrankt waren, und der Probanden der Transfusionsmedizin legen nahe, dass der SNP rs1049674 mit einer Inzidenz von 46 - 48 % in der kaukasischen Bevölkerung auftritt und nichts mit der Pathogenese einer ALL zu tun hat. Es ist zu vermuten, dass der SNP auch in den Blasten zu finden ist, da die peripheren Leukozyten wie die leukämischen Blasten aus den Stammzellen des Knochenmarks entstehen.

Gibt es eine Häufung der SNP-Vorkommen bei Patienten, die unter Asparaginase-Therapie schwere Nebenwirkungen entwickelt haben?

Im Patientenkollektiv befanden sich 10 Proben, welche im Rahmen einer Nebenwirkungsstudie gewonnen wurden [73]. Fünf dieser Patienten entwickelten unter ASPase-Therapie schwere Nebenwirkungen (Pankreatitis, Hepatitis, insulinpflichtiger Diabetes). Da die SNP rs2070159 und rs3179866 im Nebenwirkungskollektiv nicht gefunden werden konnten, ist zu vermuten, dass sie in der Genese der hier vertretenen Nebenwirkungen keine wesentliche Rolle spielen. Diese Annahme könnte in einem größeren Kollektiv überprüft werden, wenn Proben mit den SNP rs2070159 und rs3179866 tatsächlich gefunden und auf Nebenwirkungen der Patienten unter ASPase-Therapie hin analysiert würden.

Der SNP rs1049674 konnte bei drei von fünf Proben des Nebenwirkungskollektivs nachgewiesen werden. Dies entspricht einer SNP-Häufigkeit von 60 %. Von den drei Patienten, die den SNP rs1049674 trugen, konnte bei einem Patienten nur die DNA analysiert werden. Hierbei zeigte sich eine Heterozygotie (SNP/WT). Die zwei weiteren SNP tragenden Proben wurden auf cDNA-Ebene detektiert und lagen zum einen als isolierter SNP und zum anderen als Kombination von Wildtyp und SNP tragendem Allel vor. Eine dieser Proben entstammte dem Patienten P13, der an einer Hybridleukämie erkrankt war und nur den SNP exprimierte. Die zweite Probe (P6) entstammte einem Patienten, der an einer cALL erkrankt war und beide Allele auf cDNA-Ebene exprimierte.

Von den fünf Patienten, bei denen bekannt war, dass sie keine Nebenwirkungen unter ASPase-Therapie hatten, hat nur ein Patient (P34) den SNP auf cDNA-Ebene zusammen mit dem Wildtyp exprimiert. Hier liegt mit 20 % die SNP-Rate niedriger als bei der Gruppe der Nebenwirkungspatienten mit 60 % SNP-Rate, was auf eine mögliche Assoziation hindeutet. Die hier auszumachenden Tendenzen müssten an einer größeren Fallzahl untersucht werden. Bei normaler Stoffwechsellage ist davon auszugehen, dass das Tragen des SNP rs1049674 keine Relevanz hat. Unter einer Asparaginasetherapie hingegen könnte dies ein Grund für das Auftreten von Nebenwirkungen sein.

Für weiter gehende Untersuchungen diesbezüglich wäre es hilfreich, das Enzym in mutierter und nicht-mutierter Form isolieren zu können. Dies wäre mit Hilfe von entsprechenden Zelllinien, die homozygot für den SNP rs1049674 sind, durchzuführen.

Da die SNP rs2070159 und rs3179866 im Nebenwirkungskollektiv nicht gefunden werden konnten, ist zu vermuten, dass sie in der Genese der hier vertretenen Nebenwirkungen keine wesentliche Rolle spielen.

Treten die betreffenden SNPs in Leukämiezellen bzw. in leukämischen Zelllinien auf?

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden erstmalig SNPs der AS in Zelllinien nachgewiesen. Der Nachweis der SNPs könnte Hinweise liefern, ob diese SNP in der Leukämogenese und bei der ASPase-Sensitivität eine Rolle spielen. Bei den hier untersuchten Zelllinien stellte sich heraus, dass in zwei der acht Zelllinien der SNP rs1049674 nachweisbar war. Die hierbei erhobenen Daten diskriminieren jedoch nicht zwischen ASPase-sensiblen und resistenten Zelllinien. Der SNP rs1049674 ließ sich bei zwei AML-Zelllinien detektieren, welche nicht ASPase-sensibel sind. Des Weiteren trat in diesen beiden Fällen der SNP rs1049674 nur heterozygot mit dem Wildtyp auf. Die SNP rs2070159 sowie rs3179866 wurden in den analysierten Zelllinien nicht gefunden. Es scheint daher keinen direkten Zusammenhang zur ASPase-Sensibilität zu geben. Die Ergebnisse der Zelllinien lassen vermuten, dass der SNP rs1049674 keine Bedeutung für die ASPase-Empfindlichkeit der ALL-Blasten hat, da nicht die ASPase-sensiblen ALL-Zelllinien, sondern die ASPase-resistenteren AML-Zelllinien den SNP tragen (HL-60 und M-07e). Da die betreffenden Zelllinien jedoch nicht homozygot für den SNP sind, lässt sich keine sichere Aussage bezüglich des Zusammenhangs von SNP und ASPase-Empfindlichkeit machen. Eine Zelllinie, die homozygot für den SNP rs1049674 ist, konnte nicht gefunden werden. Ob eine Zelllinie, die den SNP rs1049674 homozygot trägt, ASPase-sensibel ist, wäre eine interessante Fragestellung, die an einem größeren Kollektiv von Zelllinien nachgegangen werden sollte.

Ist die Asparaginsynthetase-mRNA-Expression bei SNP tragenden Leukozyten gesteigert oder gemindert im Vergleich zu den nicht SNP tragenden Leukozyten der unterschiedlichen Kollektive?

Weiterführende Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe ermittelten die AS-mRNA-Expression mittels Real-time-PCR durch Taqman-Analyse [73]. Die Ergebnisse wurden in Zusammenhang mit dem Vorkommen des SNP rs1049674 im gesunden Blutspenderkollektiv gestellt und zeigten keine wesentlichen Unterschiede zwischen dem Tragen oder Nicht-Tragen des SNP und der Höhe der AS-mRNA-Expression dieser Zellen. Auch die beiden Fälle, in denen der SNP homozygot vorlag, zeigten keine auffälligen AS-mRNA-Expressionslevel. Somit scheint der SNP keinen großen Einfluss auf die Expression der AS zu haben (siehe Abbildungen 18 und 19).

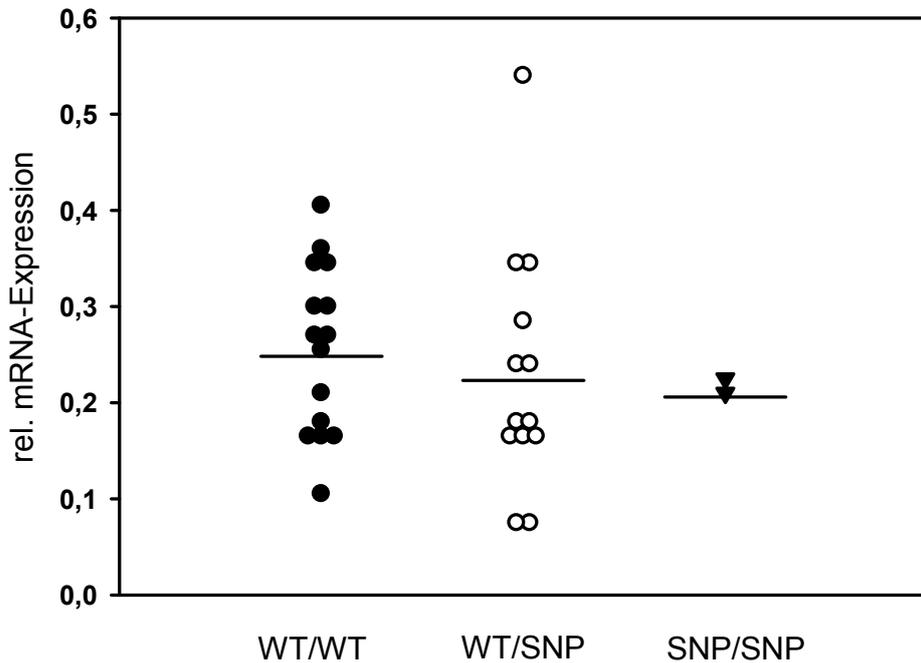


Abbildung 18: Dargestellt ist die Asparaginsynthetase-mRNA-Expression der Leukozyten der gesunden Blutspender, in Korrelation zu dem Tragen bzw. Nicht-Tragen des SNP rs1049674. WT bedeutet Wildtyp, SNP bedeutet das Tragen des Polymorphismus, zwei Proben tragen den SNP homozygot.

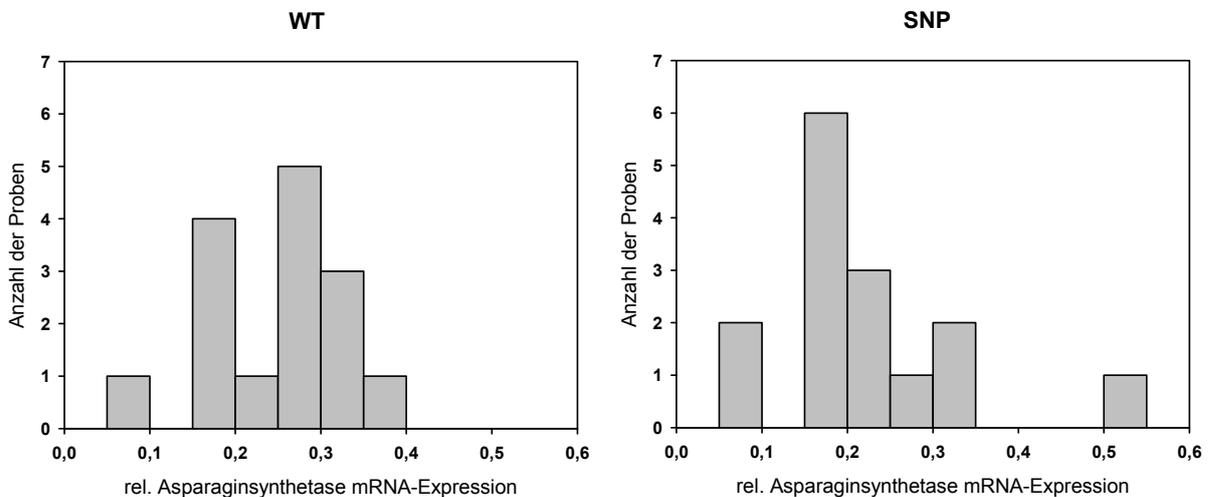


Abbildung 19: Dargestellt ist die Asparaginsynthetase-mRNA-Expression der Leukozyten des gesunden Blutspendekollektivs. Die Grafik WT entspricht der Verteilung der Höhe der mRNA-Expression bei den Wildtyp tragenden Zellen, die Grafik SNP zeigt die Verteilung der mRNA-Expressionslevel der Polymorphismus tragenden Zellen.

Im Rahmen weiterer Analysen dieser Arbeitsgruppe wurden Untersuchungen zur Korrelation von AS-Aktivität und AS-mRNA-Expression in den oben angegebenen Zelllinien gemacht. Die Enzymaktivität wurde wie bei Dübbers et al. [21] erläutert analysiert. Dies zeigte, dass von den

acht untersuchten Zelllinien, die zwei Zelllinien mit SNP rs1049674 bei geringer mRNA-Expression eine vergleichsweise höhere Asparaginaseaktivität haben (siehe Abbildung 20).

Ergebnisse – leukämische Zelllinien Vergleich mit mRNA-Expression und Enzymaktivität

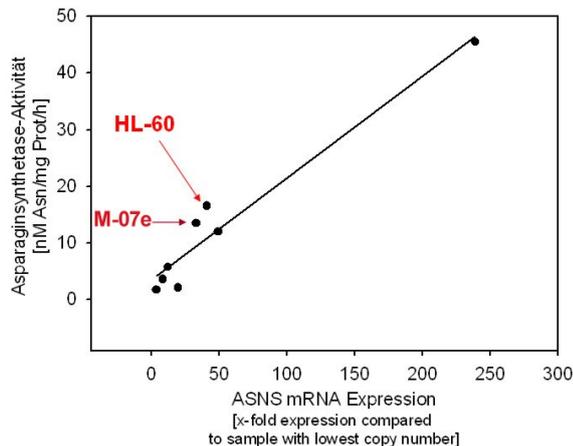


Abbildung 20: Dargestellt ist die Korrelation von AS-Aktivität und AS-mRNA-Expression. HL-60 und M-07e zeigen zu ihrer mRNA-Expression eine hohe Enzymaktivität.

Diese Beobachtung, dass der Polymorphismus die Aktivität des Enzyms steigert, würde der Hypothese widersprechen, dass das Auftreten von schweren Nebenwirkungen unter Asparaginase-Therapie auf eine Funktionsbeeinträchtigung der endogenen Asparaginsynthese zurückzuführen ist, die mit dem Polymorphismus rs1049674 im Asparaginsynthetase-Gen assoziiert ist. Um diesbezüglich eine gesicherte Aussage zu treffen, müssten allerdings noch weiter gehende Untersuchungen, z.B. an isoliertem Wildtyp und mutierten Enzymen durchgeführt werden. Diese Zusammenhänge sollten an einer größeren Zahl von Zelllinien überprüft werden. Interessant wäre es hierbei, Blasten die homozygot für den SNP rs1049674 sind, zu untersuchen. Auch wäre die Analyse der Transkriptions- und Translationsraten der verschiedenen RNAs von Interesse. Das Wissen, ob die DNA mit SNP weniger transkribiert wird oder ob RNA des SNP tragenden Allels weniger stabil oder stabiler als die RNA des Allels ohne SNP ist, gäbe Hinweise auf das Vordringen der nicht-synonymen Polymorphismen auf Proteinebene. Sollte die SNP tragende RNA zum Beispiel instabiler als die Wildtyp-RNA sein, so wäre eine höhere Transkriptionsrate nötig, um die verminderte Translation zu kompensieren. Eine Untersuchung der RNA-Stabilität von SNP und Wildtyp tragender RNA würde in dieser Frage weiterhelfen.

Auf Proteinebene bleibt zu klären, ob ein Polymorphismus der AS, der einem der drei untersuchten nicht-synonymen SNP zugrunde liegt, die Funktionalität der AS beeinträchtigt oder verbessert. SNPs können zu einer schnelleren oder langsameren Degradation von Proteinen durch Proteinasen führen und somit die HWZ von Proteinen verändern. Ob dies bei einem der hier untersuchten SNPs der Fall ist, müsste in weiteren Untersuchungen an in vitro-Modellen, z.B. Zelllinien, die nur das mutierte Protein oder nur den Wildtyp exprimieren, geklärt werden.

Welche Ausblicke ergeben sich anhand der gewonnenen Erkenntnisse im Bezug auf die Vorkommen der SNPs rs1049764, rs2070159 und rs3179866?

Bevor weiter gehende Untersuchungen bezüglich der Auswirkungen der hier untersuchten SNPs durchgeführt werden sollten, wäre das Vorkommen der SNPs mit Hilfe größerer Kollektive zu überprüfen. Insbesondere die auffällig hohe SNP-Rate des Nebenwirkungskollektivs wirft Fragen bezüglich eines Zusammenhangs von SNP rs1049674 und dem verstärkten Auftreten von Nebenwirkungen unter ASPase-Therapie auf. In dieser Untersuchung wurde mit Hilfe von Rückstellproben anderer Studien ein Anfang in der Analyse der SNP des AS-Gens gemacht und die dafür notwendigen Methoden etabliert. Dem deutlichen Signal der Häufung des SNP rs1049674 im Nebenwirkungskollektiv könnte nun in einer größer angelegten prospektiven Studie nachgegangen werden. Man könnte dann eruieren, ob das homozygote oder auch heterozygote Vorhandensein des SNP rs1049674 mit dem Eintreffen von Nebenwirkungen unter ASPase-Therapie assoziiert werden kann.

Ein weiterer Aspekt, der näher untersucht werden könnte, ist das Phänomen des Imprintings. In der Mehrheit der untersuchten Proben wurden bei Heterozygotie beide Allele exprimiert. Es wäre interessant zu analysieren, wie häufig ein Imprinting zu Gunsten des SNP tragenden Allels in einem größeren Kollektiv auftritt. Der einzige Fall in dieser Untersuchung, bei dem nur der SNP transkribiert wurde, betraf eine Hybridleukämie. Daher erscheint es sinnvoll, anhand einer größeren Fallzahl zu prüfen, ob der SNP bei Patienten, die an einer Hybridleukämie erkrankt waren, gehäuft vorkommt und ob dieser SNP auch in den Blasten der Patienten mit Hybridleukämie nachweisbar ist.

5 Zusammenfassung

'Single nucleotide Polymorphisms' (SNPs) spielen in der Pharmakogenetik eine immer größere Rolle. Medikamentennebenwirkungen aufgrund individueller Verstoffwechslung von Pharmaka lassen sich zum Teil auf Genpolymorphismen einzelner Enzyme zurückführen. In der Therapie hämato-onkologischer Krankheitsbilder kommt die Asparaginase (ASPase) bei der Behandlung der ALL und des NHL zum Einsatz. Die unterschiedlich starke zytotoxische Wirkung von ASPase auf verschiedene Entitäten der hämato-onkologischen Krankheitsbilder wird unter anderem in Zusammenhang mit unterschiedlicher Expression und Aktivität des Enzyms Asparaginsynthetase (AS) gebracht.

In dieser Untersuchung wurden Methoden zum Nachweis von drei nicht-synonymen SNPs im AS-Gen etabliert. Mit Hilfe von Restriktionsenzymen wurden die Vorkommen der SNP rs1049674 und rs3179866 des Gens der AS untersucht. Der SNP rs2070159 wurde mittels Allelspezifischer-Real-Time-PCR analysiert, da kein passendes Restriktionsenzym zum Nachweis eines Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus vorhanden war. Das Untersuchungsmaterial entstammte 36 pädiatrisch hämato-onkologischen Patienten, die eine ASPase-Therapie erhielten und teilweise Nebenwirkungen erlitten, acht leukämischen Zelllinien sowie einem Kontrollkollektiv aus 31 erwachsenen Blutspendern. Die SNPs rs2070159 und rs3179866 ließen sich in keiner der Proben nachweisen. Der SNP rs1049674 war bezogen auf alle DNA-Proben zu 48 % vorhanden. Das Kontrollkollektiv der Blutspender zeigte eine SNP-Rate von 48 %, das hämato-onkologische Kollektiv von 44 %. Im Nebenwirkungsstudienkollektiv ergab sich eine SNP-Rate von 60 % bei den Patienten, die unter Asparaginase schwere Nebenwirkungen entwickelten. Im Kollektiv der nebenwirkungsfreien Patienten betrug die SNP-Rate hingegen nur 20 %. Von 13 heterozygoten DNA-Proben konnten wir in 12 Fällen die Transkription beider Allele nachweisen. Nur bei einer Hybridleukämie zeigte sich die alleinige Transkription des SNP tragenden Allels. Eine Korrelation von ASPase-Resistenz und nicht-synonymen SNP der AS konnte nicht gefunden werden. Auch lässt sich kein Zusammenhang zwischen unterschiedlichen AS-Expressionsleveln und dem Vorhandensein des SNP rs1049674 herstellen.

Diese Studie offenbart eine hohe Prävalenz des SNP rs1049674. Das deutliche Signal der Häufung des SNP rs1049674 im Kollektiv der Nebenwirkungspatienten sollte anhand einer größeren Fallzahl überprüft werden. Sollte sich dann eine Assoziation zum Auftreten von Nebenwirkungen und dem SNP rs1049674 herausstellen, könnten der Nachweis dieses SNPs dazu dienen im Vorfeld einer Asparaginase-Therapie Patienten mit einem erhöhten Risiko für

Asparaginase-assoziierte Nebenwirkungen zu identifizieren. Auch sollte das Phänomen des potentiellen Imprintings näher untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Adamson RH, Fabro S (1968) Antitumor activity and other biologic properties of L-asparaginase (NSC-109229)-a review. *Cancer Chemother Rep.* 52: 617-626.
2. Avanzi GC, Lista P, Giovinazzo B, Miniero R, Saglio G, Benetton G, Coda R, Cattoretti G, Pegoraro L (1988) Selective growth response to IL-3 of a human leukaemic cell line with megakaryoblastic features. *Br J Haematol.* 69: 359-366.
3. Bain PJ, LeBlanc-Chaffin R, Chen H, Pali SS, Leach KM, Kilberg MS (2002) The mechanism for transcriptional activation of the human ATA2 transporter gene by amino acid deprivation is different than that for asparagine synthetase. *J Nutr.* 132: 3023-3029.
4. Barbosa-Tessmann IP, Chen C, Zhong C, Schuster SM, Nick HS, Kilberg MS (1999) Activation of the unfolded protein response pathway induces human asparagine synthetase gene expression. *J Biol Chem.* 274: 31139-31144.
5. Barbosa-Tessmann IP, Chen C, Zhong C, Siu F, Schuster SM, Nick HS, Kilberg MS (2000) Activation of the human asparagine synthetase gene by the amino acid response and the endoplasmic reticulum stress response pathways occurs by common genomic elements. *J Biol Chem.* 275: 26976-26985.
6. Barbosa-Tessmann IP, Pineda VL, Nick HS, Schuster SM, Kilberg MS (1999) Transcriptional regulation of the human asparagine synthetase gene by carbohydrate availability. *Biochem J.* 339 (Pt 1): 151-158.
7. Bosmann HB, Kessel D (1970) Inhibition of glycoprotein synthesis in L5178Y mouse leukaemic cells by L-asparaginase in vitro. *Nature.* 226: 850-851.
8. Brookes AJ (1999) The essence of SNPs. *Gene.* 234: 177-186.
9. Broome JD (1961) Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. *Nature.* 191: 1114-1115.
10. Broome JD (1968) Studies on the mechanism of tumor inhibition by L-asparaginase. Effects of the enzyme on asparagine levels in the blood, normal tissues, and 6C3HED lymphomas of mice: differences in asparagine formation and utilization in asparaginase-sensitive and -resistant lymphoma cells. *J Exp Med.* 127: 1055-1072.

11. Broome JD (1981) L-Asparaginase: discovery and development as a tumor-inhibitory agent. *Cancer Treat Rep.* 65 Suppl 4: 111-114.
12. Bruhat A, Averous J, Carraro V, Zhong C, Reimold AM, Kilberg MS, Fafournoux P (2002) Differences in the molecular mechanisms involved in the transcriptional activation of the CHOP and asparagine synthetase genes in response to amino acid deprivation or activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem.* 277: 48107-48114.
13. Capizzi RL, Bertino JR, Handschumacher RE (1970) L-asparaginase. *Annu Rev Med.* 21: 433-444.
14. Chakrabarti R, Schuster SM (1997) L-Asparaginase, Perspectives on the Mechanism of Action and Resistance. *International Journal of Pediatric Hematology/Oncology.* 4 (6): 597-611.
15. Chakravarti A (1998) It's raining SNPs, hallelujah? *Nature Genetics.* 19: 216-217.
16. Clementi A (1922) Désamidation enzymatique de l'asparagine chez les différentes espèces animales et la signification physiologique de sa présence dans l'organisme. *Arch Int Physiol.* 19: 369-398.
17. Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE (1977) Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature.* 270: 347-349.
18. Cooper DN, Ball EV, Krawczak M (1998) The human gene mutation database. *Nucleic Acids Research.* 26: 285-287.
19. Cooper DN, Smith BA, Cooke HJ, Niemann S, Schmidtke J (1985) An estimate of unique DNA sequence heterozygosity in the human genome. *Hum Genet.* 69: 201-205.
20. Ding Y, Li Z, Broome JD (2005) Epigenetic changes in the repression and induction of asparagine synthetase in human leukemic cell lines. *Leukemia.* 19: 1108.
21. Dubbers A, Wurthwein G, Müller HJ, Schulze-Westhoff P, Winkelhorst M, Kurzknabe E, Lanvers C, Pieters R, Kaspers GJ, Creutzig U, Ritter J, Boos J (2000) Asparagine synthetase activity in paediatric acute leukaemias: AML-M5 subtype shows lowest activity. *Br J Haematol.* 109: 427-429.

22. Emahazion T, Jobs M, Howell WM, Siegfried M, Wyoni PI, Prince JA, Brookes AJ (1999) Identification of 167 polymorphisms in 88 genes from candidate neurodegeneration pathways. *Gene*. 238: 315-324.
23. Ertel IJ, Nesbit ME, Hammond D, Weiner J, Sather H (1979) Effective dose of L-asparaginase for induction of remission in previously treated children with acute lymphocytic leukemia: a report from Childrens Cancer Study Group. *Cancer Res.* 39: 3893-3896.
24. Fafournoux P, Bruhat A, Jousse C (2000) Amino acid regulation of gene expression. *Biochem J.* 351: 1-12.
25. Fichtl B, Fülgraf G, Neumann H-G, Wollenberg P, Forth W, Henschler D, Rummel W (1998) Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie, In: Forth W, Henschler D, Rummel W and Starke K, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford. S. 9.
26. Fine BM, Kaspers GJ, Ho M, Loonen AH, Boxer LM (2005) A genome-wide view of the in vitro response to l-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 65: 291-299.
27. Foley GE, Lazarus H, Farber S, Uzman BG, Boone BA, McCarthy RE (1965) Continuous Culture of Human Lymphoblasts from Peripheral Blood of a Child with Acute Leukemia. *Cancer.* 18: 522-529.
28. Forsberg, Faure d, Morgenstern (2001) Oxidative Stress, Human Genetic Variation, and Disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 389: 84-93.
29. Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. *Mol Cell Biol.* 11: 6059-6066.
30. Graham ML, Asselin BL, Herndon JE, 2nd, Casey JR, Chaffee S, Ciocci GH, Daeschner CW, Davis AR, Gold S, Halperin EC, Laughlin MJ, Martin PL, Olson JF, Kurtzberg J (1998) Toxicity, pharmacology and feasibility of administration of PEG-L-asparaginase as consolidation therapy in patients undergoing bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 21: 879-885.

31. Guerrini L, Gong SS, Mangasarian K, Basilico C (1993) Cis- and trans-acting elements involved in amino acid regulation of asparagine synthetase gene expression. *Mol Cell Biol.* 13: 3202-3212.
32. Holleman A, den Boer ML, de Menezes RX, Cheok MH, Cheng C, Kazemier KM, Janka-Schaub GE, Gobel U, Graubner UB, Evans WE, Pieters R (2006) The expression of 70 apoptosis genes in relation to lineage, genetic subtype, cellular drug resistance, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 107: 769-776.
33. Holleman A, den Boer ML, Kazemier KM, Beverloo HB, von Bergh AR, Janka-Schaub GE, Pieters R (2005) Decreased PARP and procaspase-2 protein levels are associated with cellular drug resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 106: 1817-1823.
34. Hongo S, Sakagami H, Sato T (1990) Decrease in asparagine synthetase activity during cell differentiation of mouse and human leukemia cell lines. *Leukemia.* 4: 708-711.
35. Horowitz B, Madras BK, Meister A, Old LJ, Boyes EA, Stockert E (1968) Asparagine synthetase activity of mouse leukemias. *Science.* 160: 533-535.
36. Hutson RG, Kitoh T, Moraga Amador DA, Cosic S, Schuster SM, Kilberg MS (1997) Amino acid control of asparagine synthetase: relation to asparaginase resistance in human leukemia cells. *Am J Physiol.* 272: C1691-1699.
37. Issa JP (1999) Aging, DNA methylation and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 32: 31-43.
38. Iwamoto S, Mihara K, Downing JR, Pui CH, Campana D (2007) Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *J Clin Invest.* 117: 1049-1057.
39. Kessel D, Bosmann HB (1970) Effects of L-asparaginase on protein and glycoprotein synthesis. *FEBS Lett.* 10: 85-88.
40. Kidd J (1953) Regression of Transplantet Lymphomas Induced In Vivo by Means of Normal Guinea Pig Serum. *J. Exptl. Med.* 98: 565-581.
41. Kiriyama Y, Kubota M, Takimoto T, Kitoh T, Tanizawa A, Akiyama Y, Mikawa H (1989) Biochemical characterization of U937 cells resistant to L-asparaginase: the role of asparagine synthetase. *Leukemia.* 3: 294-297.

42. Krejci O, Starkova J, Otova B, Madzo J, Kalinova M, Hrusak O, Trka J (2004) Upregulation of asparagine synthetase fails to avert cell cycle arrest induced by L-asparaginase in TEL/AML1-positive leukaemic cells. *Leukemia*. 18: 434-441.
43. Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, Weinshilboum RM (1990) Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 336: 225-229.
44. Lozzio CB, Lozzio BB (1973) Cytotoxicity of a factor isolated from human spleen. *J Natl Cancer Inst*. 50: 535-538.
45. Lozzio CB, Lozzio BB (1975) Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. 45: 321-334.
46. Mashburn, Wriston (1964) Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia Coli*. *Arch Biochem Biophys*. 105: 450-452.
47. Mashburn LT, Landin LM (1968) Changes in ribonuclease activities in P1798 lymphosarcoma after asparaginase treatment. *Arch Biochem Biophys*. 125: 721-726.
48. Mashburn LT, Wriston JC, Jr. (1966) Change in ribonuclease concentrations in L-asparaginase-treated lymphosarcomata. *Nature*. 211: 1403-1404.
49. Meikrantz W, Schlegel R (1995) Apoptosis and the cell cycle. *J Cell Biochem*. 58: 160-174.
50. Minowada J, Onuma T, Moore GE (1972) Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J Natl Cancer Inst*. 49: 891-895.
51. Oetggen, Schulten (1969) Hemmung maligner Neoplasien des Menschen durch L-ASPase. *Klin. Wochenschr*. 47: 65.
52. Ogura M, Morishima Y, Ohno R, Kato Y, Hirabayashi N, Nagura H, Saito H (1985) Establishment of a novel human megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01, with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. 66: 1384-1392.
53. Otterness D, Szumlanski C, Lennard L, Klemetsdal B, Aarbakke J, Park-Hah JO, Iven H, Schmiegelow K, Branum E, O'Brien J, Weinshilboum R (1997) Human thiopurine

methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther.* 62: 60-73.

54. Peng H, Shen N, Qian L, Sun XL, Koduru P, Goodwin LO, Issa JP, Broome JD (2001) Hypermethylation of CpG islands in the mouse asparagine synthetase gene: relationship to asparaginase sensitivity in lymphoma cells. Partial methylation in normal cells. *Br J Cancer.* 85: 930-935.
55. Prager MD (1968) Asparagine synthetase in normal and malignant tissues; correlation with tumor sensitivity to asparaginase. *Arch Biochem Biophys.* 127: 645-654.
56. Relling MV, Dervieux T (2001) Pharmacogenetics and cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 1: 99-108.
57. Relling MV, Hancock ML, Boyett JM, Pui CH, Evans WE (1999) Prognostic importance of 6-mercaptopurine dose intensity in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 93: 2817-2823.
58. Relling MV, Rubnitz JE, Rivera GK, Boyett JM, Hancock ML, Felix CA, Kun LE, Walter AW, Evans WE, Pui CH (1999) High incidence of secondary brain tumours after radiotherapy and antimetabolites. *Lancet.* 354: 34-39.
59. Relling MV, Yanishevski Y, Nemecek J, Evans WE, Boyett JM, Behm FG, Pui CH (1998) Etoposide and antimetabolite pharmacology in patients who develop secondary acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 12: 346-352.
60. Ren Y, Roy S, Ding Y, Iqbal J, Broome JD (2004) Methylation of the asparagine synthetase promoter in human leukemic cell lines is associated with a specific methyl binding protein. *Oncogene.* 23: 3953-3961.
61. Robert J, Morvan VL, Smith D, Pourquier P, Bonnet J (2005) Predicting drug response and toxicity based on gene polymorphisms. *Crit Rev Oncol Hematol.* 54: 171-196.
62. Roberts JM, Prager MD, N. B (1966) The antitumor activity of *Escherichia Coli* L-asparaginase. *Cancer Res.* 26: 2213-2217.
63. Rosenfeld C, Goutner A, Choquet C, Venuat AM, Kayibanda B, Pico JL, Greaves MF (1977) Phenotypic characterisation of a unique non-T, non-B acute lymphoblastic leukaemia cell line. *Nature.* 267: 841-843.

64. Ryan JJ, Danish R, Gottlieb CA, Clarke MF (1993) Cell cycle analysis of p53-induced cell death in murine erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol.* 13: 711-719.
65. Ryan WL, Dworak JE (1970) Amino acids of the 6C3HED lymphosarcoma following treatment with asparaginase. *Cancer Res.* 30: 1206-1209.
66. Ryan WL, Sornson HC (1970) Glycine inhibition of asparaginase. *Science.* 167: 1512-1513.
67. Siu F, Bain PJ, LeBlanc-Chaffin R, Chen H, Kilberg MS (2002) ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. *J Biol Chem.* 277: 24120-24127.
68. Sobin LH, Kidd JG (1965) A Metabolic Difference between Two Lines of Lymphoma 6c3hed Cells in Relation to Asparagine. *Proc Soc Exp Biol Med.* 119: 325-327.
69. Stams WA, den Boer ML, Beverloo HB, Meijerink JP, Stigter RL, van Wering ER, Janka-Schaub GE, Slater R, Pieters R (2003) Sensitivity to L-asparaginase is not associated with expression levels of asparagine synthetase in t(12;21)+ pediatric ALL. *Blood.* 101: 2743-2747.
70. Stams WA, den Boer ML, Beverloo HB, Meijerink JP, van Wering ER, Janka-Schaub GE, Pieters R (2005) Expression levels of TEL, AML1, and the fusion products TEL-AML1 and AML1-TEL versus drug sensitivity and clinical outcome in t(12;21)-positive pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res.* 11: 2974-2980.
71. Stams WA, den Boer ML, Beverloo HB, van Wering ER, Pieters R (2005) Upregulation of asparagine synthetase and cell cycle arrest in t(12;21)-positive ALL. *Leukemia.* 19: 318-319; author reply 319-321.
72. Stams WA, den Boer ML, Holleman A, Appel IM, Beverloo HB, van Wering ER, Janka-Schaub GE, Evans WE, Pieters R (2005) Asparagine synthetase expression is linked with L-asparaginase resistance in TEL-AML1-negative but not TEL-AML1-positive pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 105: 4223-4225.
73. Stern C (2004) Untersuchungen zur Asparagin Synthetase-Expression als Surrogatparameter für das Therapieansprechen auf L-Asparaginase und für L-Asparaginase Toxizität.
URL: <http://miami.uni-muenster.de/servlets/DocumentServlet?id=1497>

74. Story MD, Voehringer DW, Stephens LC, Meyn RE (1993) L-asparaginase kills lymphoma cells by apoptosis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 32: 129-133.
75. Tai HL, Krynetski EY, Yates CR, Loennechen T, Fessing MY, Krynetskaia NF, Evans WE (1996) Thiopurine S-methyltransferase deficiency: two nucleotide transitions define the most prevalent mutant allele associated with loss of catalytic activity in Caucasians. *Am J Hum Genet.* 58: 694-702.
76. Ueno T, Ohtawa K, Mitsui K, Kodera Y, Hiroto M, Matsushima A, Inada Y, Nishimura H (1997) Cell cycle arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L-asparaginase. *Leukemia.* 11: 1858-1861.
77. Weinshilboum RM (1984) Human pharmacogenetics: Introduction. *Fed Proc.* 43: 2295-2297.
78. Woods J, Handschumacher R (1971) Hepatic homeostasis of plasma L-asparagine. *Am J Physiol.* 221: 1785-1790.
79. Woods JS, Dixon RL (1968) Uptake of asparagine C-14 into the pyrimidine synthesis pathway of guinea pig serum sensitive 6C3HED lymphosarcoma cells. *Proc West Pharmacol Soc.* 11: 67-68.
80. Wormann B, Anderson JM, Liberty JA, Gajl-Peczalska K, Brunning RD, Silberman TL, Arthur DC, LeBien TW (1989) Establishment of a leukemic cell model for studying human pre-B to B cell differentiation. *J Immunol.* 142: 110-117.
81. Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Tai HL, Pui CH, Relling MV, Evans WE (1997) Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann Intern Med.* 126: 608-614.
82. Zhang YP, Lambert MA, Cairney AE, Wills D, Ray PN, Andrulis IL (1989) Molecular structure of the human asparagine synthetase gene. *Genomics.* 4: 259-265.
83. Zhong C, Chen C, Kilberg MS (2003) Characterization of the nutrient-sensing response unit in the human asparagine synthetase promoter. *Biochem J.* 372: 603-609.

Lebenslauf

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Joachim Boos, Institut für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, für die freundliche Überlassung des interessanten Themas und seine hilfreichen Ideen und Anregungen.

Die Dissertation wäre nicht möglich gewesen ohne die sehr gute Betreuung von Frau Dr. Claudia Lanvers-Kaminsky. Mit ihrer unermüdlichen Hilfsbereitschaft, Geduld, Freundlichkeit und Aufmunterung hat sie mir zur Seite gestanden. Dafür bin ich ihr ganz besonders dankbar!

Bei der Einarbeitung in die verschiedenen Methoden und Experimente standen mir eine Vielzahl von Personen in den Laboren der pädiatrischen Hämatonkologie und des KMT, mit Ihrem Know-how und ihrer Geduld immer wieder treu zur Seite. Ihnen allen sei herzlich gedankt!

Elizabeth Omamo danke ich für ihre langjährige Freundschaft, viele Tassen Tee und gute, tiefgründige Gespräche. Freundlicherweise durfte ich einige ihrer Untersuchungsergebnisse zum weitergehenden Verständnis und Ausblick dieser Arbeit nutzen.

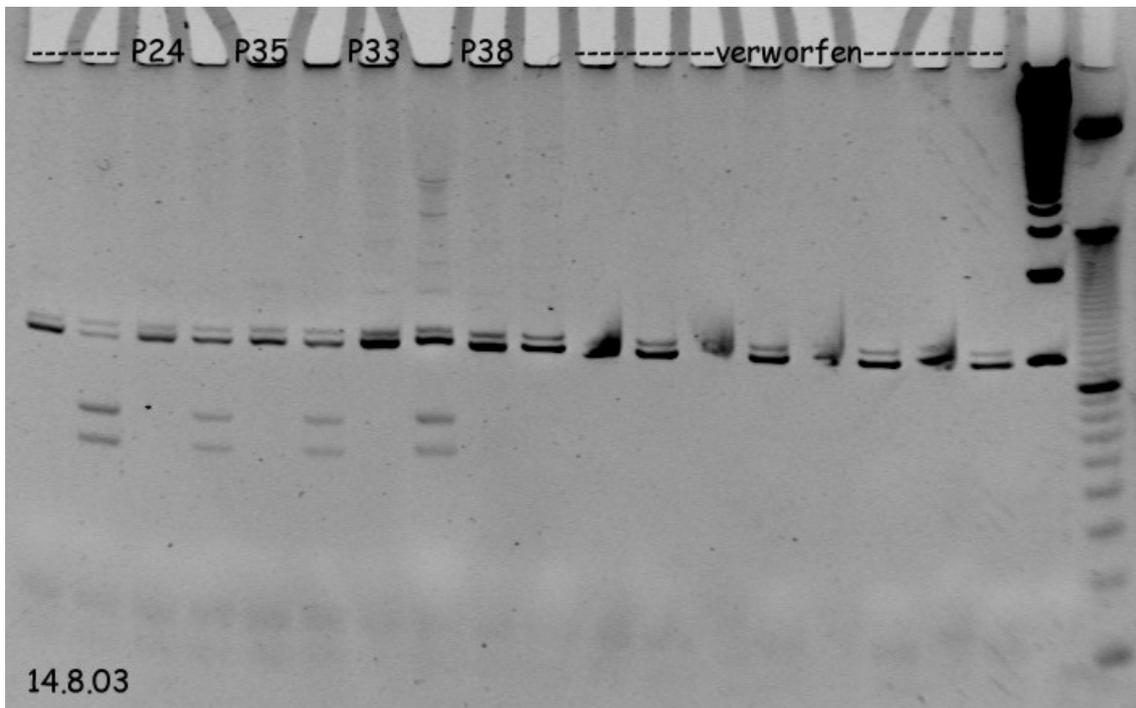
Von Herzen Danke ich meinem lieben Mann Dr. Bernd Frodermann, der mir an vielen Abenden den Rücken frei gehalten hat indem er sich trotz eigener Müdigkeit nach langen Arbeitstagen um unsere Kinder und den Haushalt gekümmert hat. Seine treue Unterstützung im Alltag, sein Know-How der Word-und Excel-Bedienung und seine liebevollen Aufmunterungen waren mir eine sehr große Hilfe!

Ein weiterer ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für Ihre liebevolle Begleitung meines Werdegangs. Sie haben mir mein Studium und die Promotion durch ihre langjährige Unterstützung ermöglicht und standen mir in schwierigen Zeiten zur Seite. Auch das liebevolle Betreuen ihrer Enkelkinder Jacob und Annemarie ermöglichte mir die Promotion erfolgreich zu Beenden.

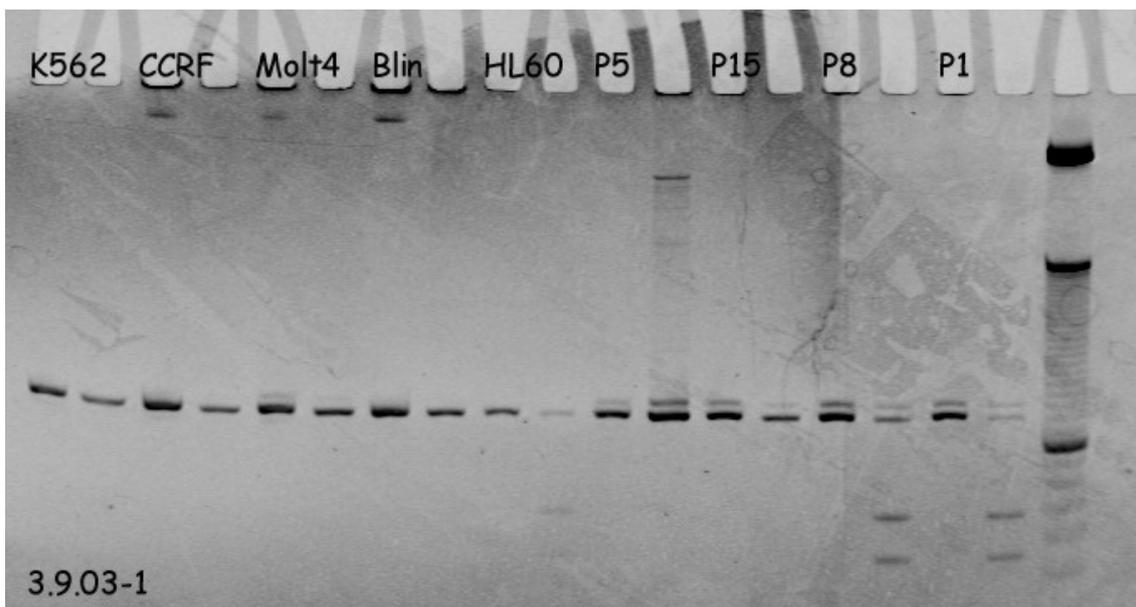
Last but not least bedanke ich mich ganz herzlich bei Peter Reichstein für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Anhang

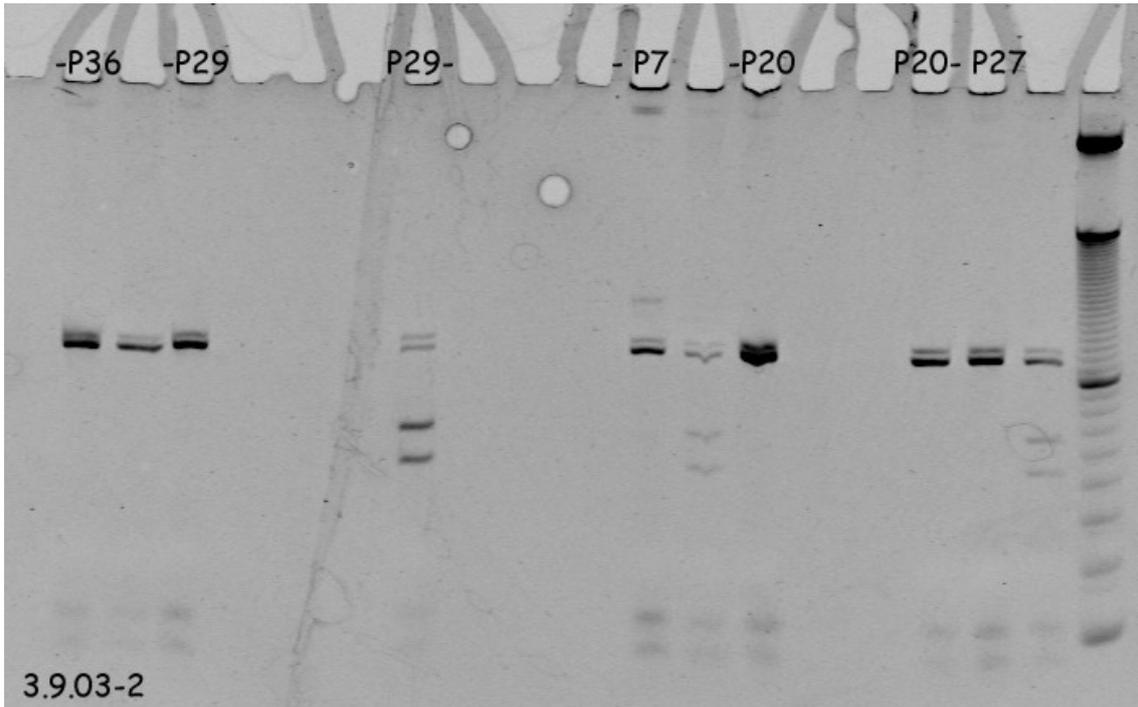
Acrylamidgelbilder der Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen Analysen:



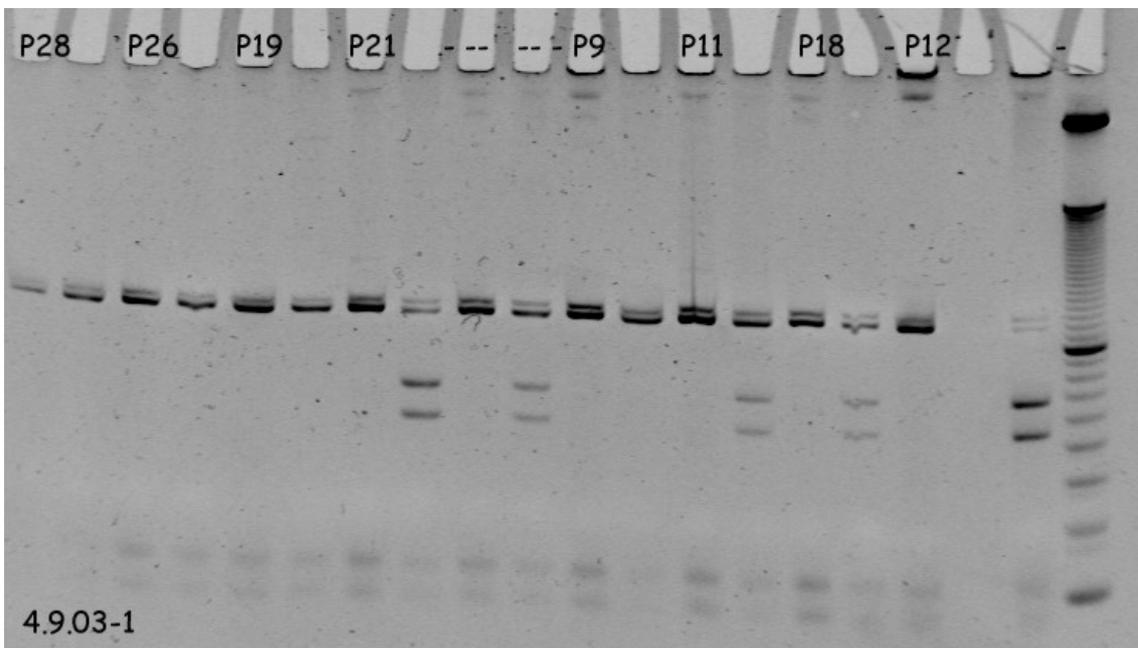
Acrylamidgelbild 1: DNA Verdau mit Rsa I



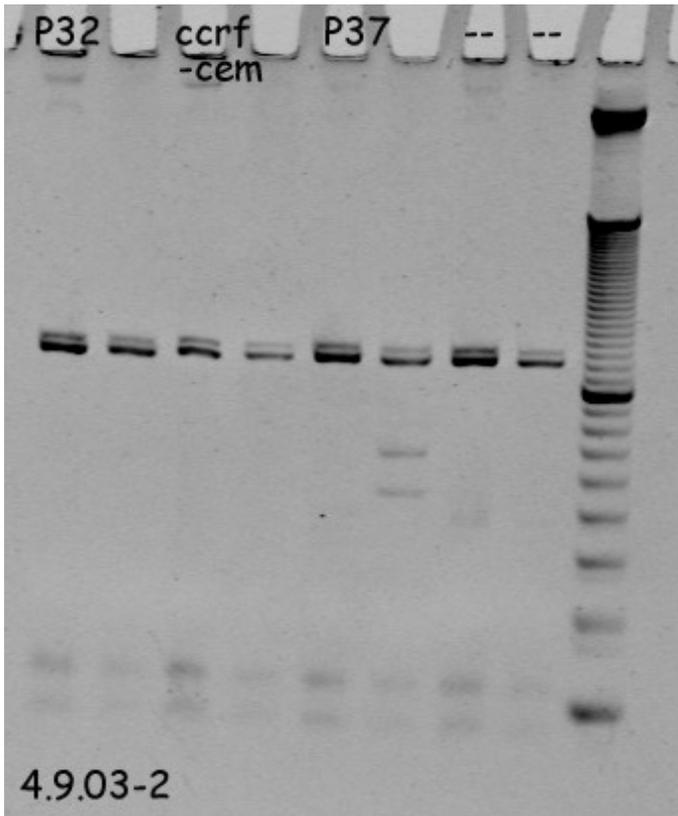
Acrylamidgelbild 2: DNA Verdau mit Rsa I



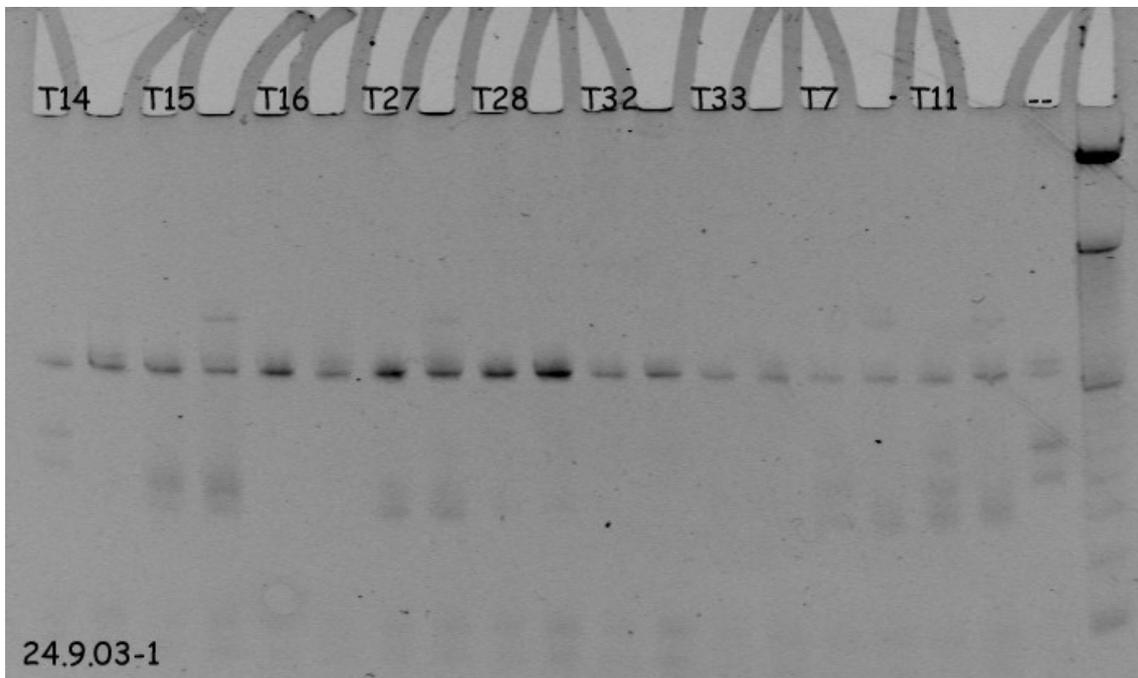
Acrylamidgelbild 3: DNA Verdau mit Rsa I



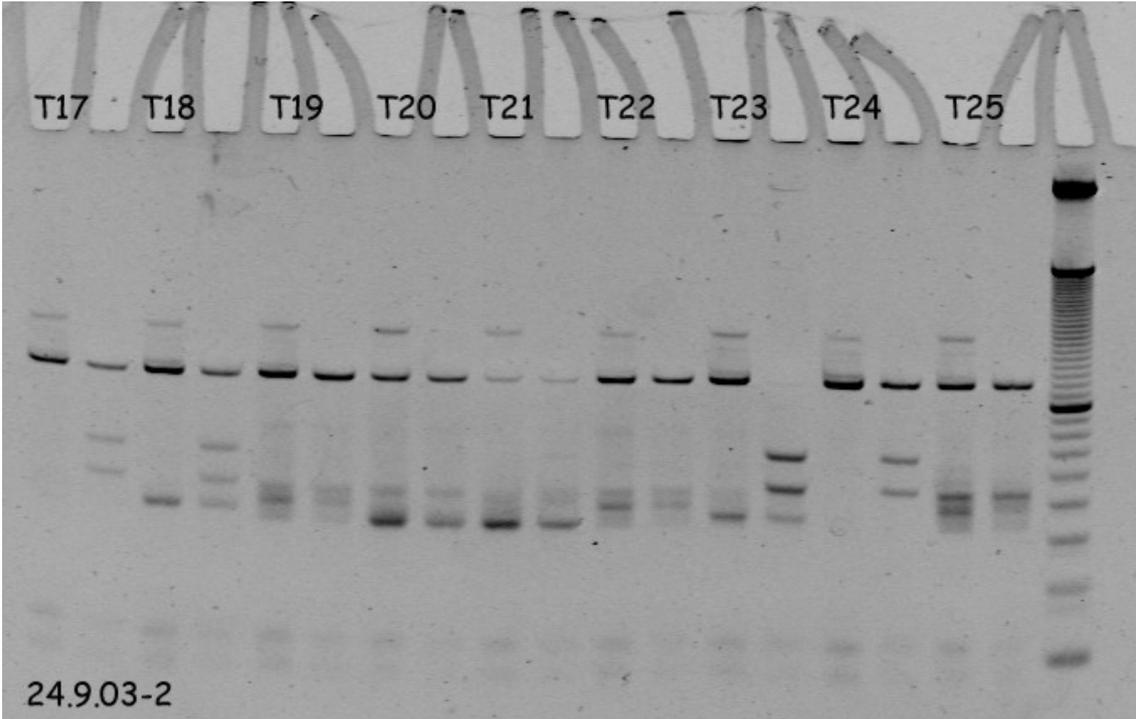
Acrylamidgelbild 4: DNA Verdau mit Rsa I



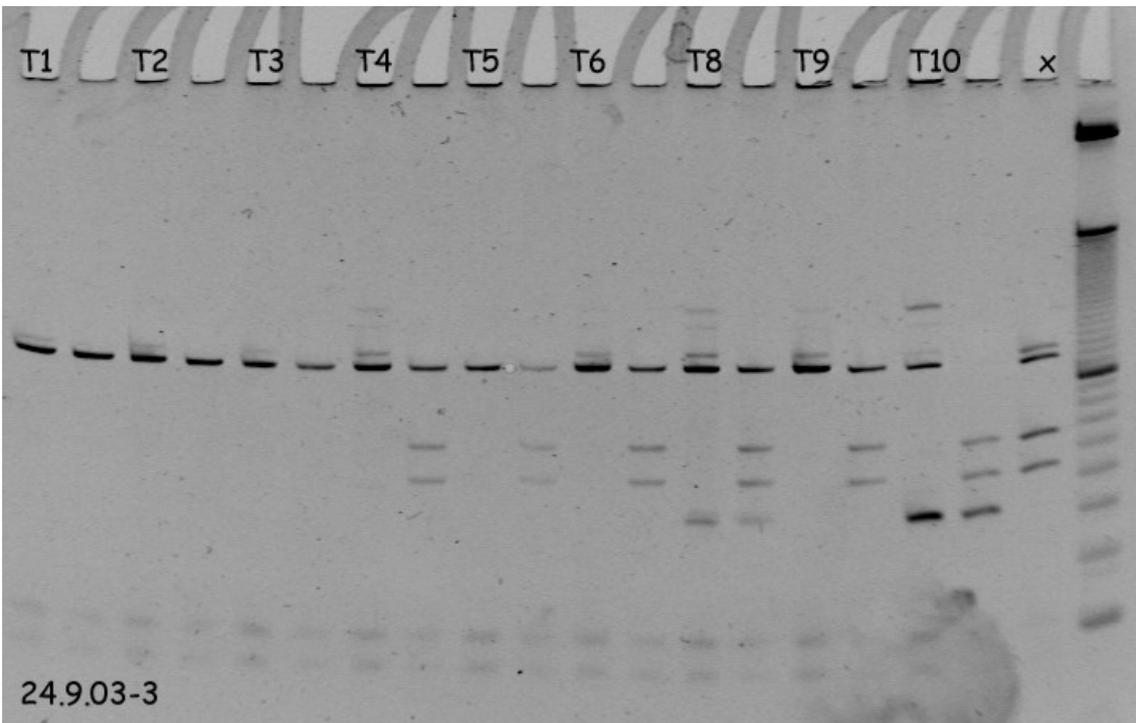
Acrylamidgelbild 5: DNA Verdau mit Rsa I



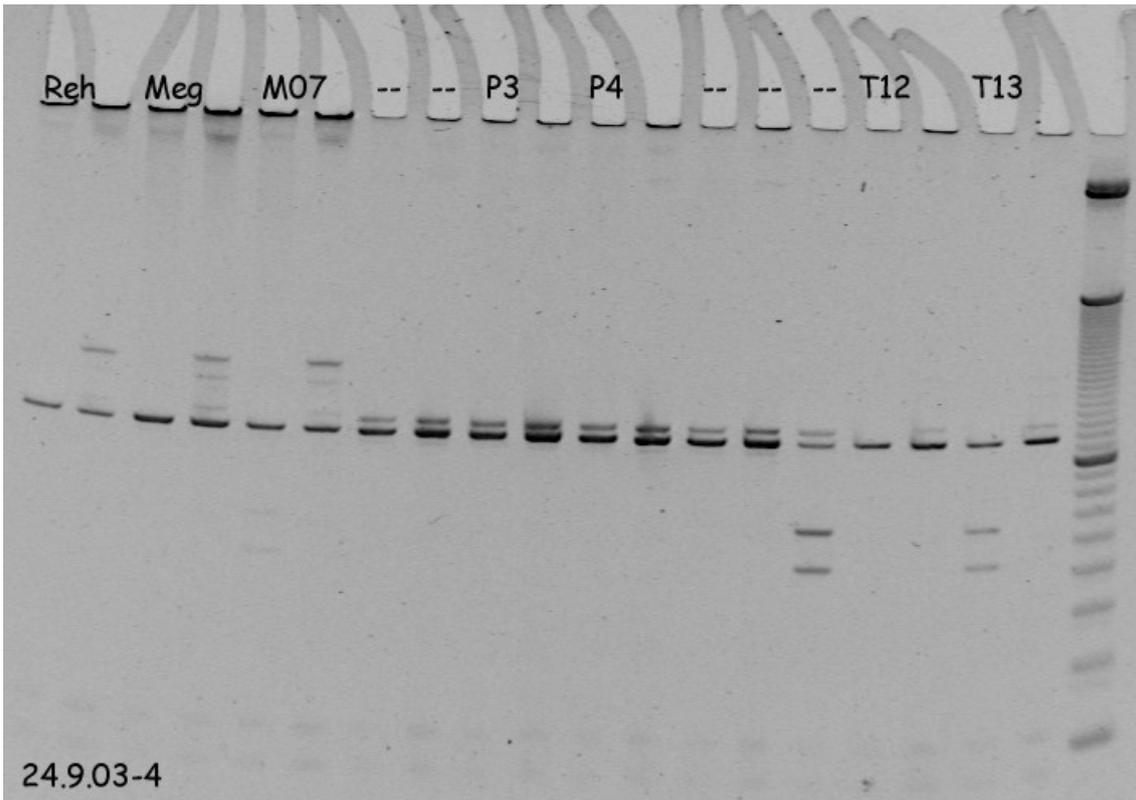
Acrylamidgelbild 6: DNA Verdau mit Rsa I



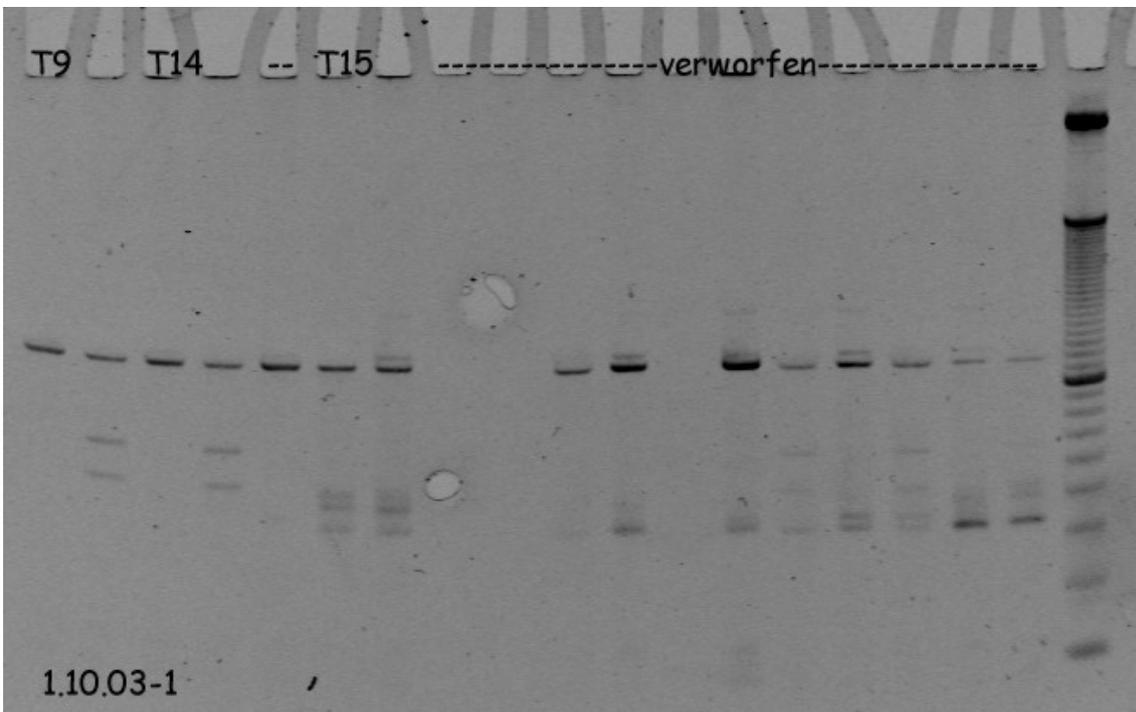
Acrylamidgelbild 7: DNA Verdau mit Rsa I



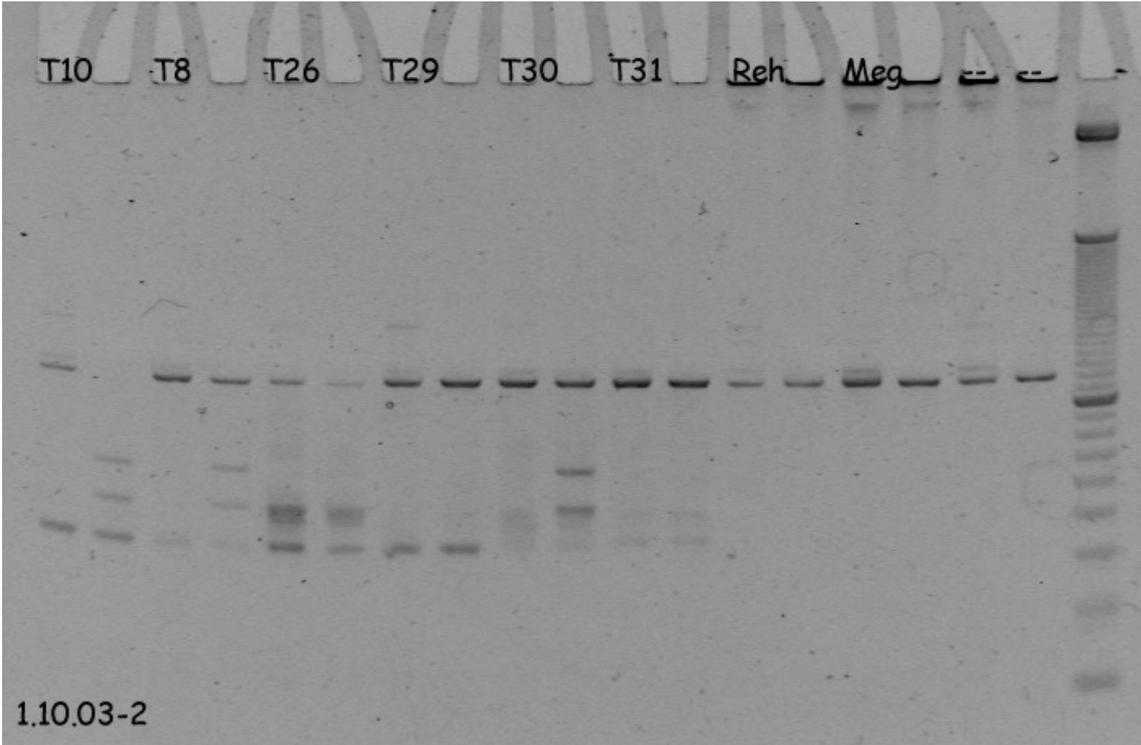
Acrylamidgelbild 8: DNA Verdau mit Rsa I



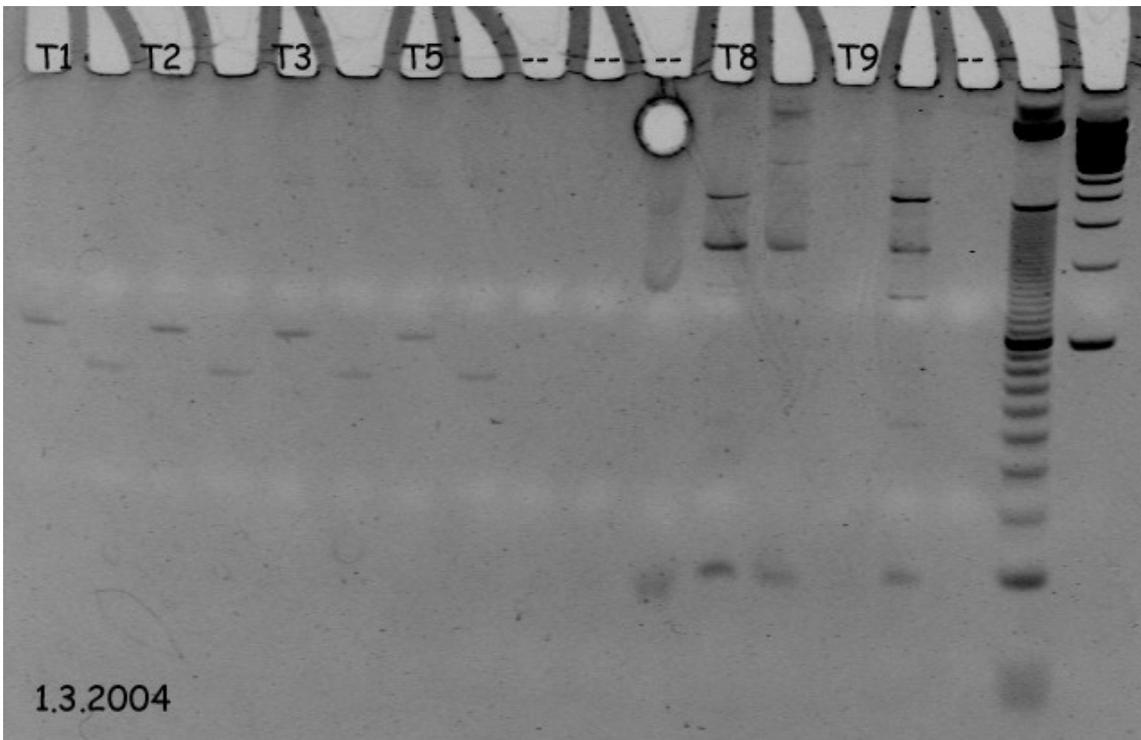
Acrylamidgelbild 9: DNA Verdau mit Rsa I



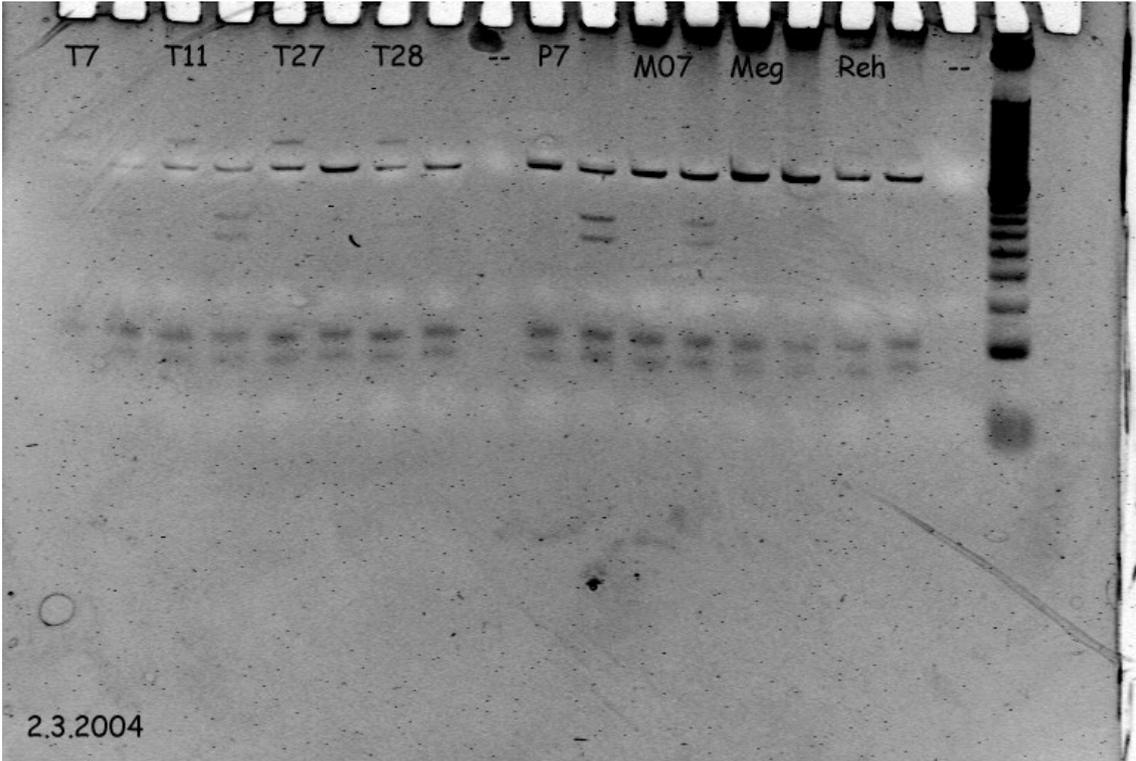
Acrylamidgelbild 10: DNA Verdau mit Rsa I



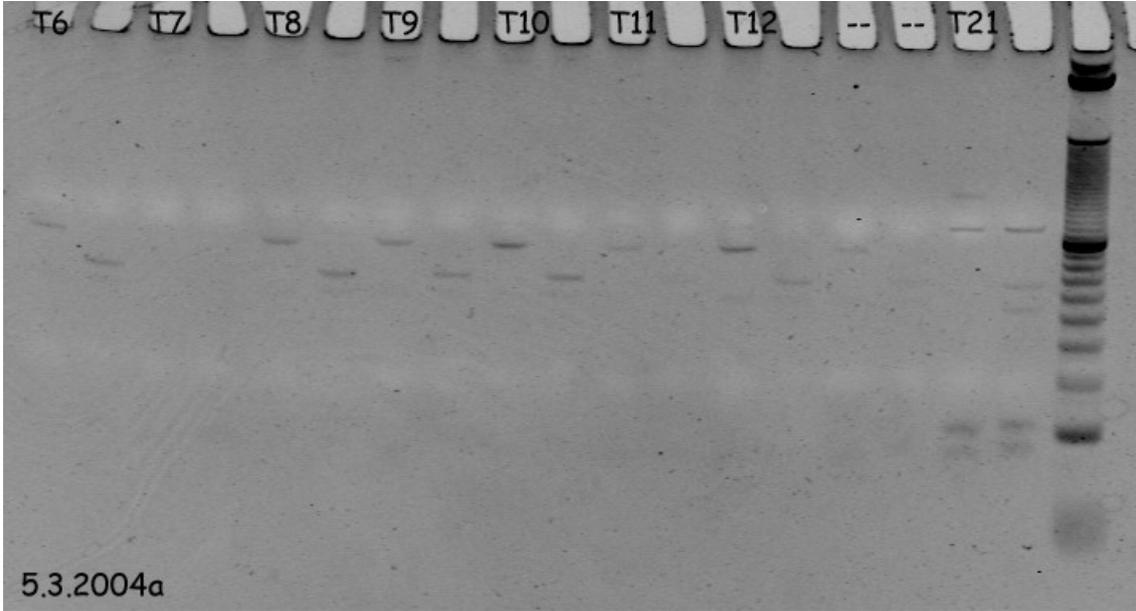
Acrylamidgelbild 11: DNA Verdau mit Rsa I



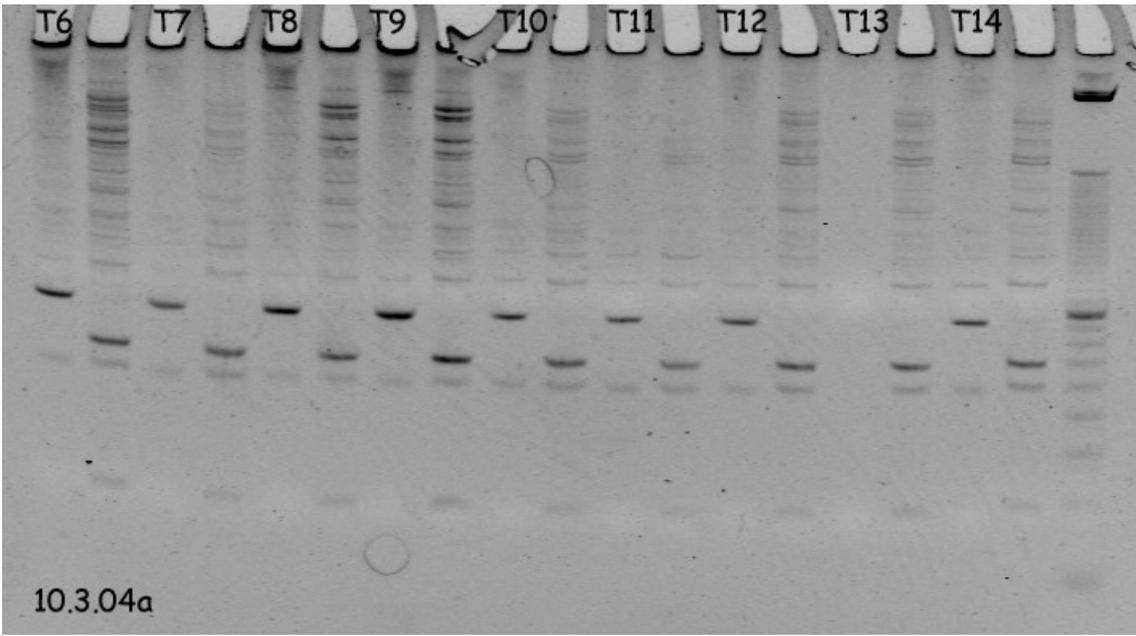
Acrylamidgelbild 12: DNA Verdau mit Taq I



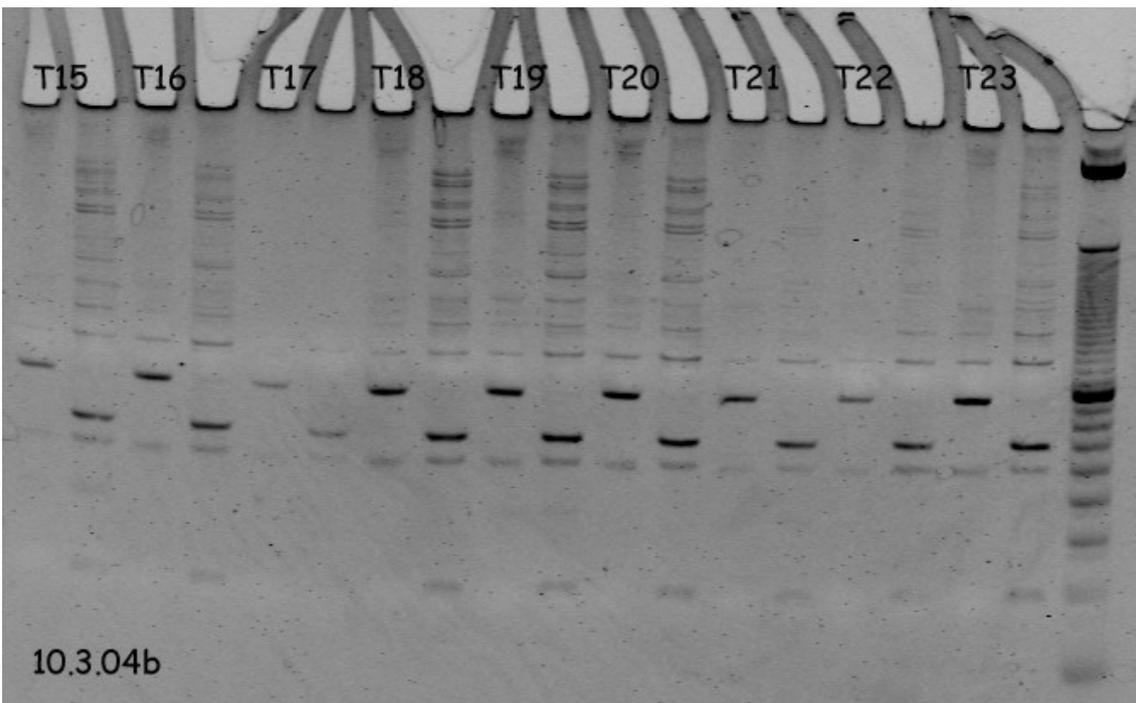
Acrylamidgelbild 13: DNA Verdau mit Rsa I



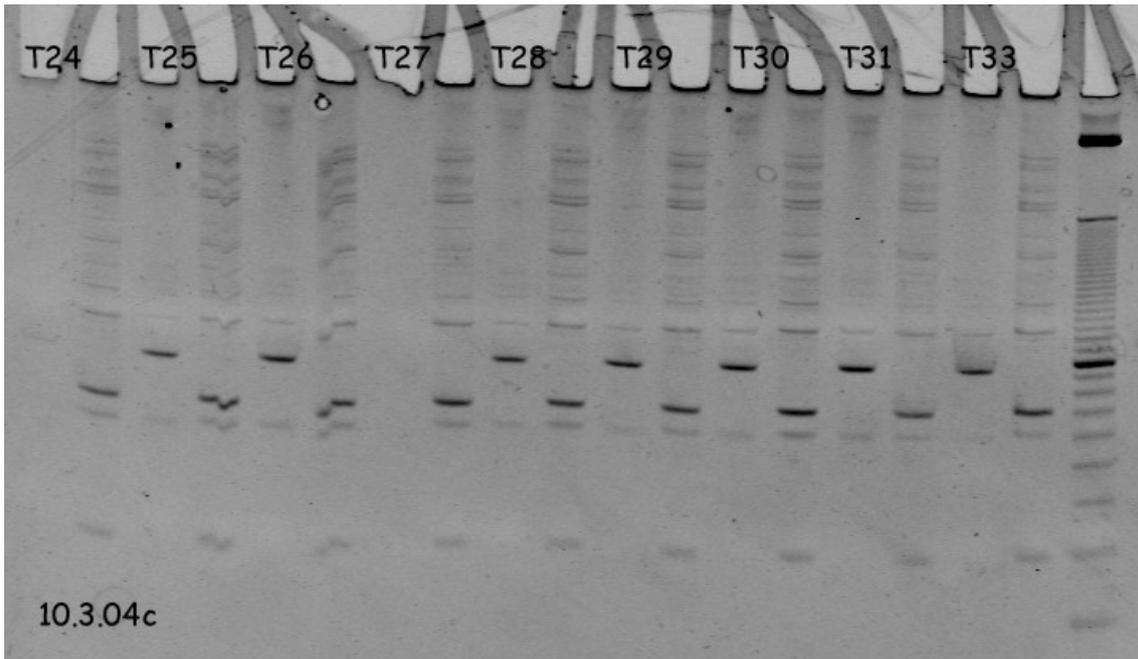
Acrylamidgelbild 14: DNA Verdau mit Taq I, Probe T21 mit Rsa I



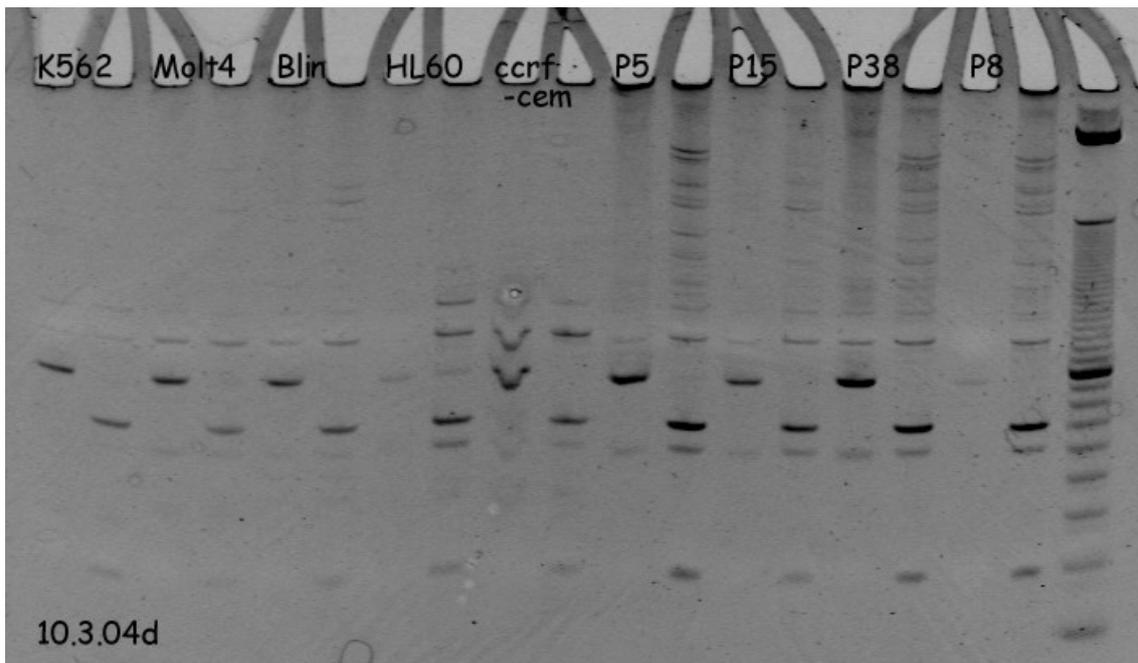
Acrylamidgelbild 15: DNA Verdau mit Taq I



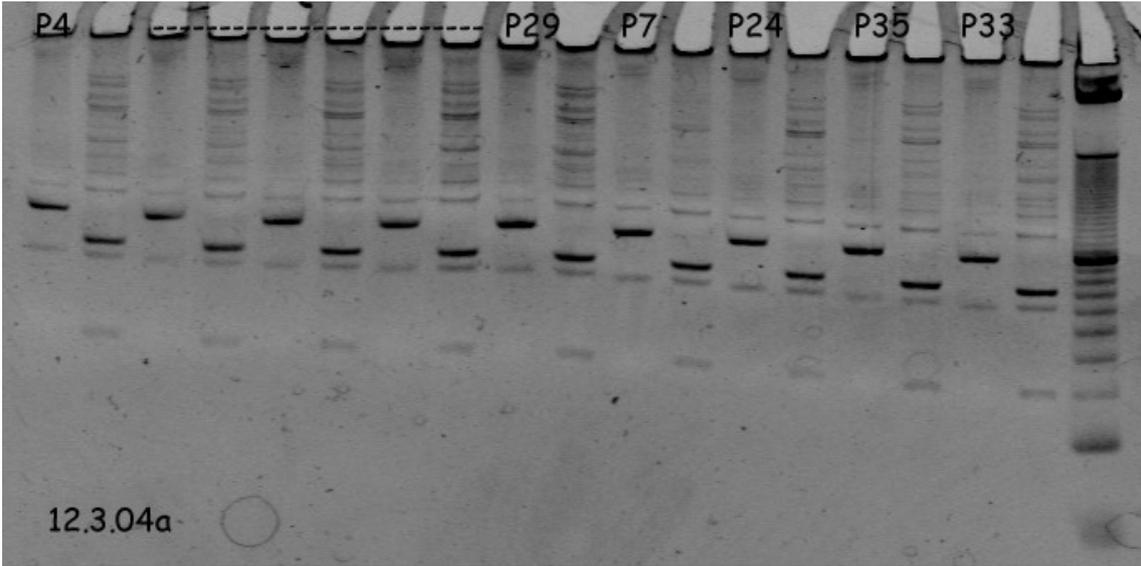
Acrylamidgelbild 16: DNA Verdau mit Taq I



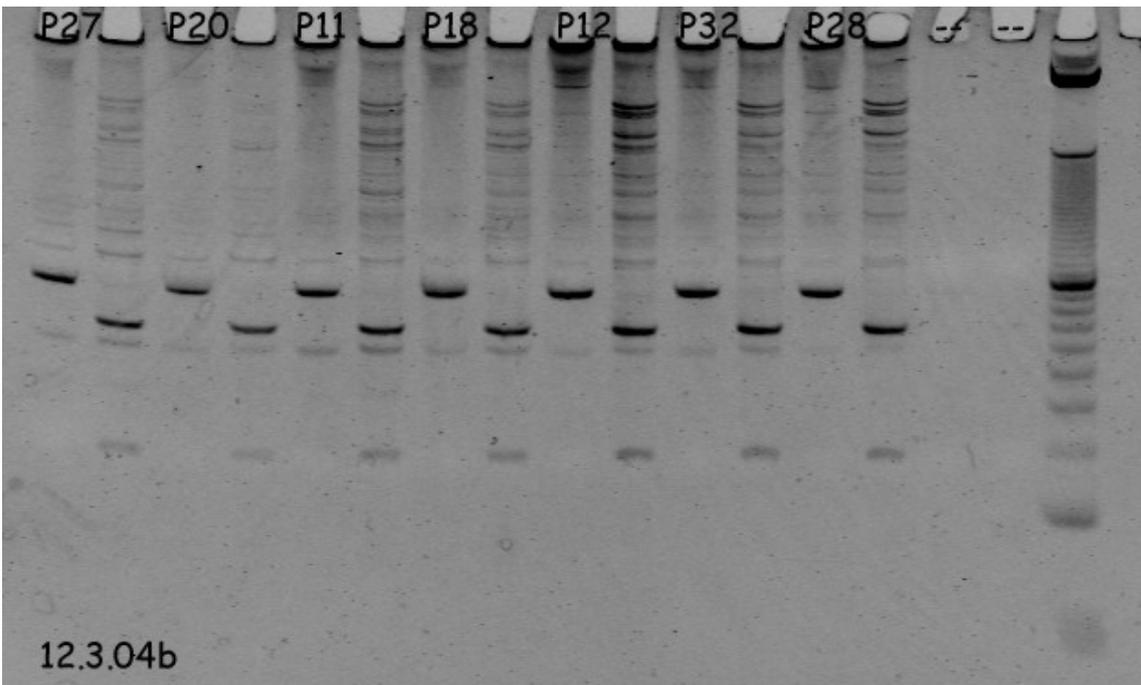
Acrylamidgelbild 17: DNA Verdau mit Taq I



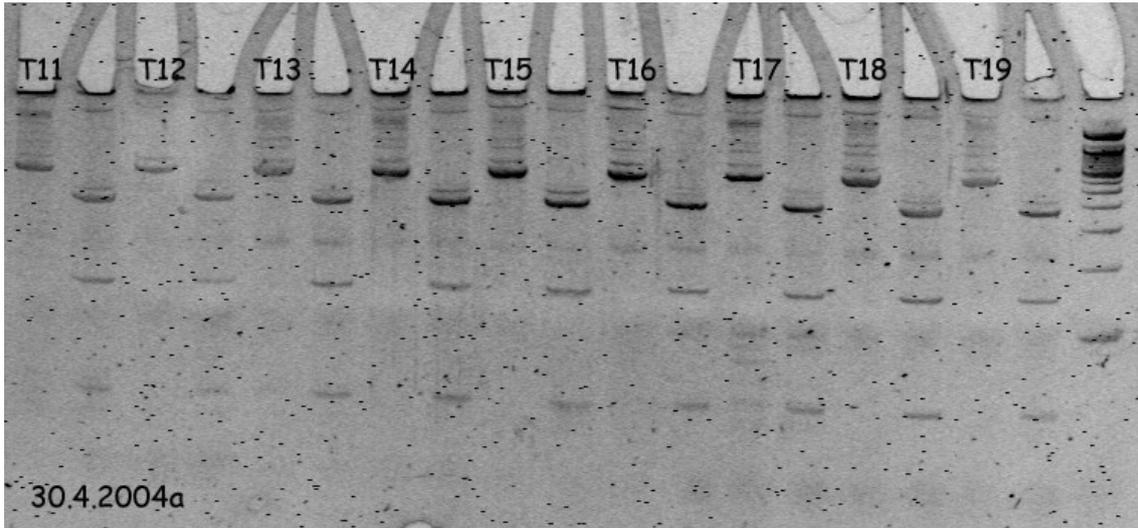
Acrylamidgelbild 18: DNA Verdau mit Taq I



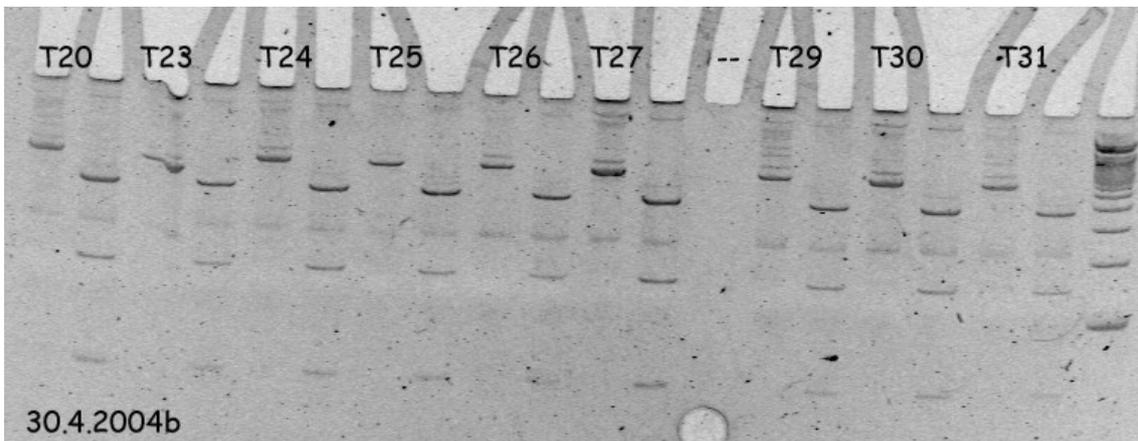
Acrylamidgelbild 19: DNA Verdau mit Taq I



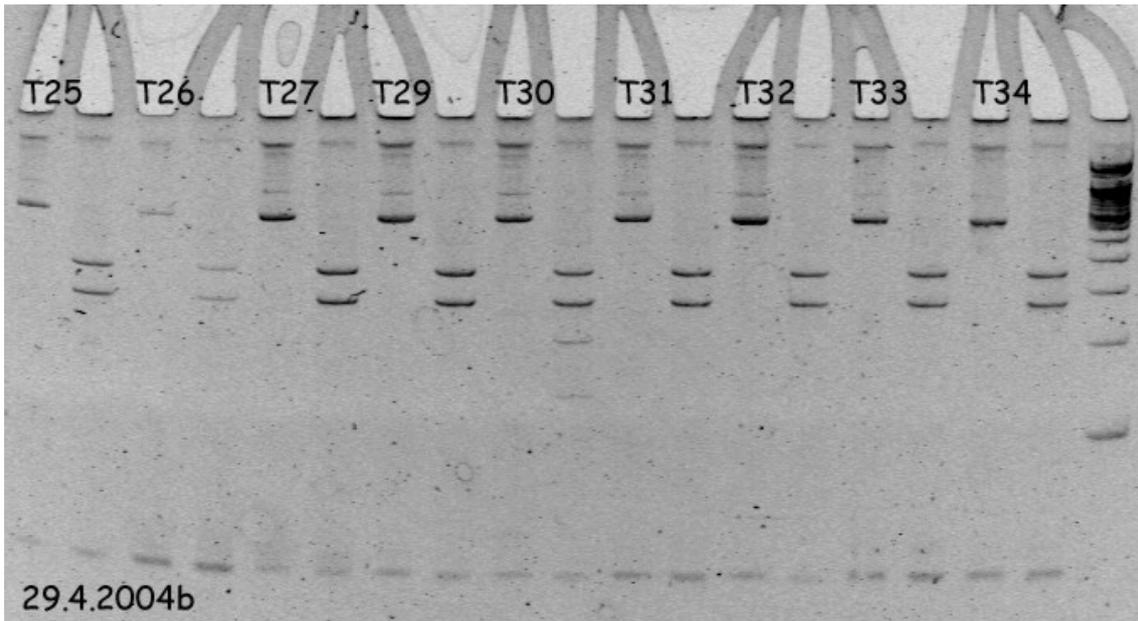
Acrylamidgelbild 20: DNA Verdau mit Taq I



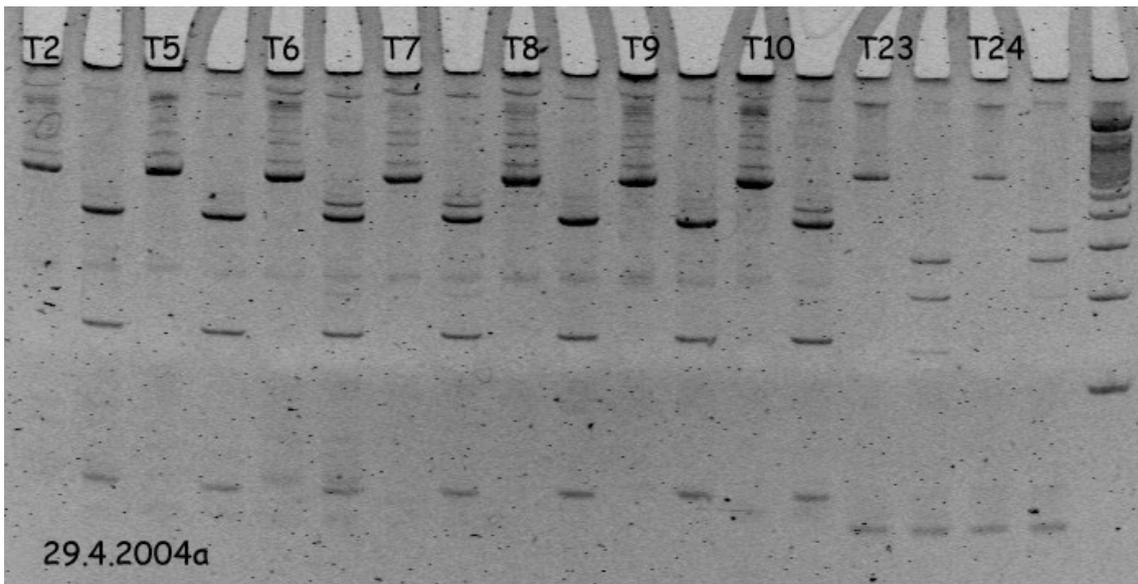
Acrylamidgelbild 21: cDNA Verdau mit Taq I



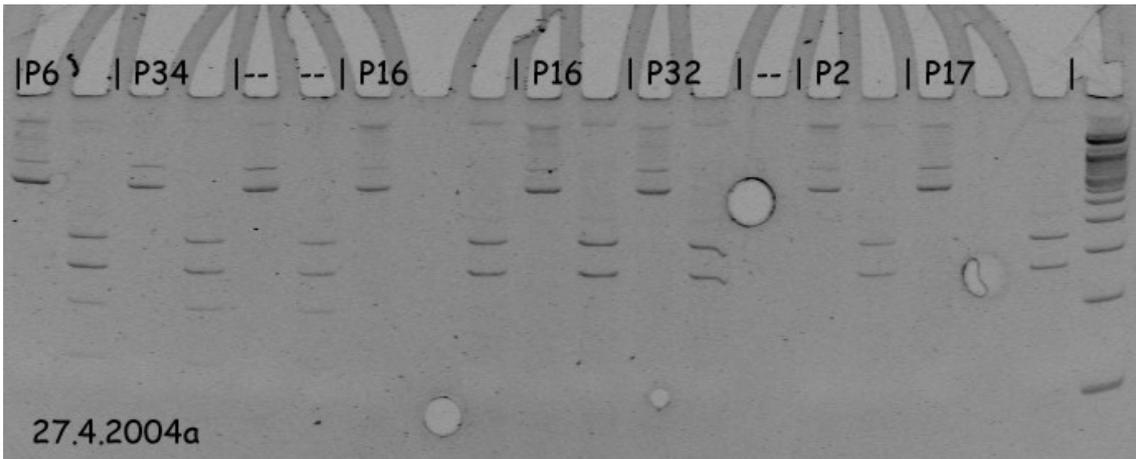
Acrylamidgelbild 22: cDNA Verdau mit Taq I



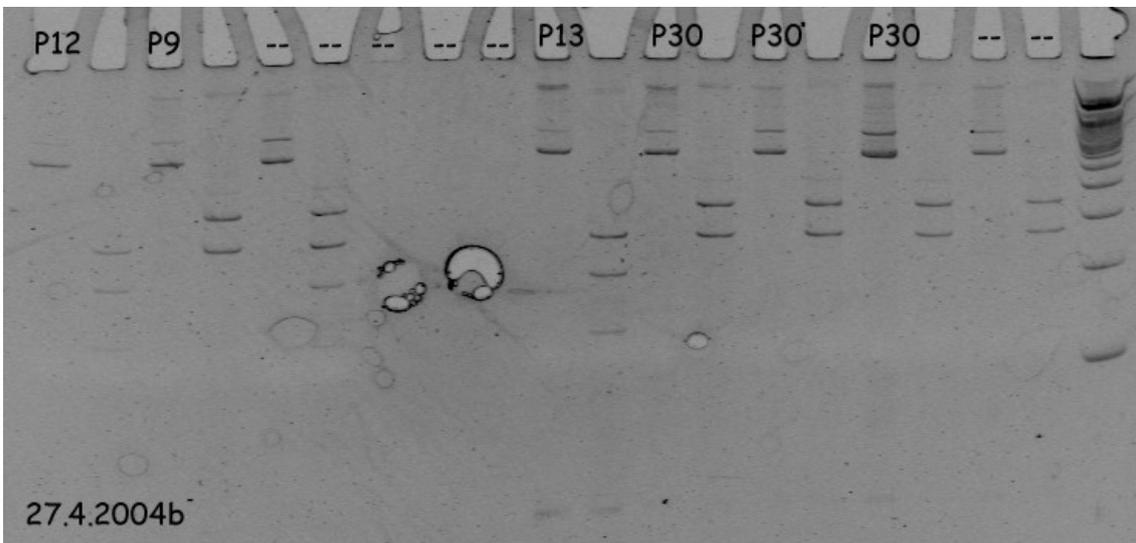
Acrylamidgelbild 23: cDNA Verdau mit Rsa I



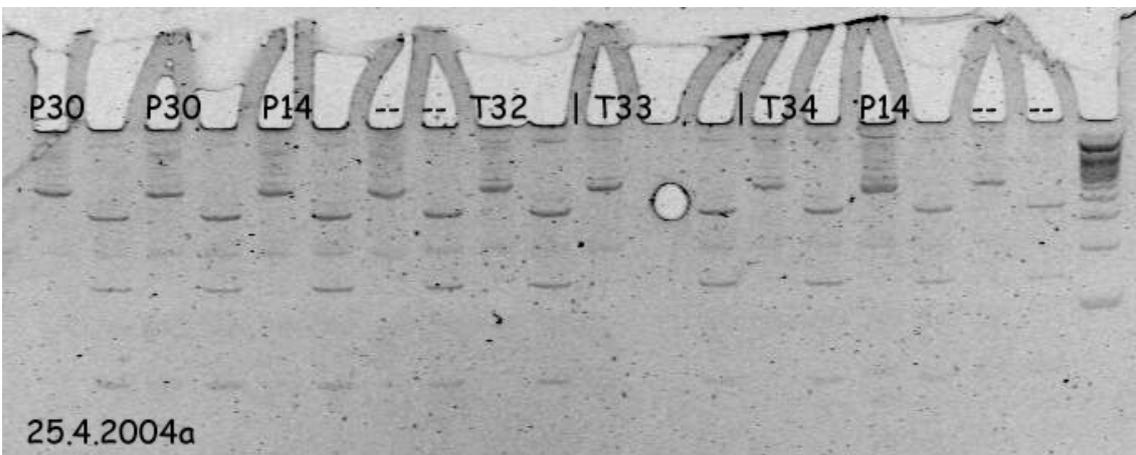
Acrylamidgelbild 24: cDNA Verdau rechtsseitig mit Taq I, linksseitig ab T23 mit Rsa I



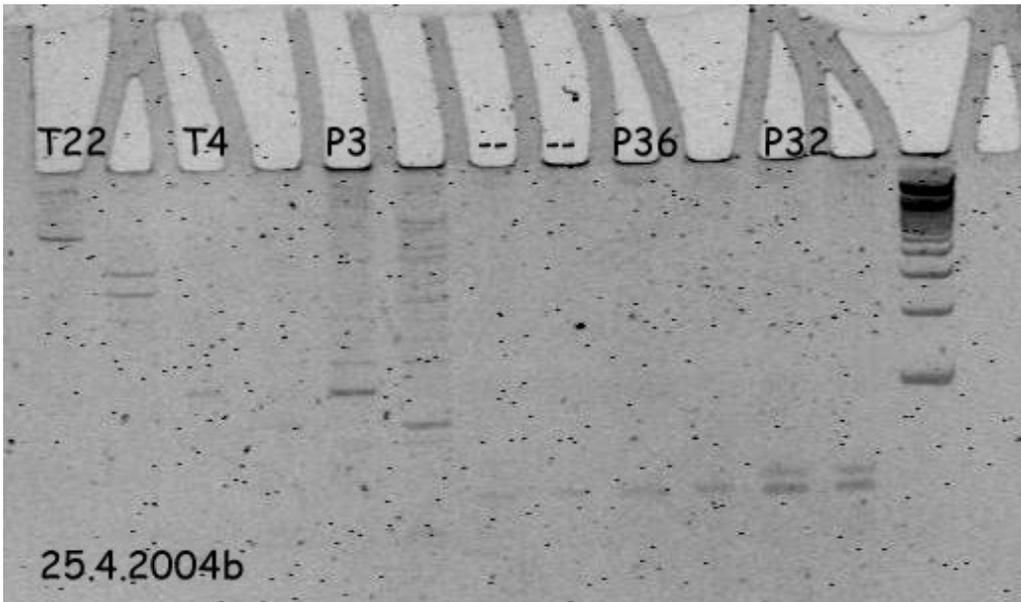
Acrylamidgelbild 25: cDNA Verdau mit Rsa I



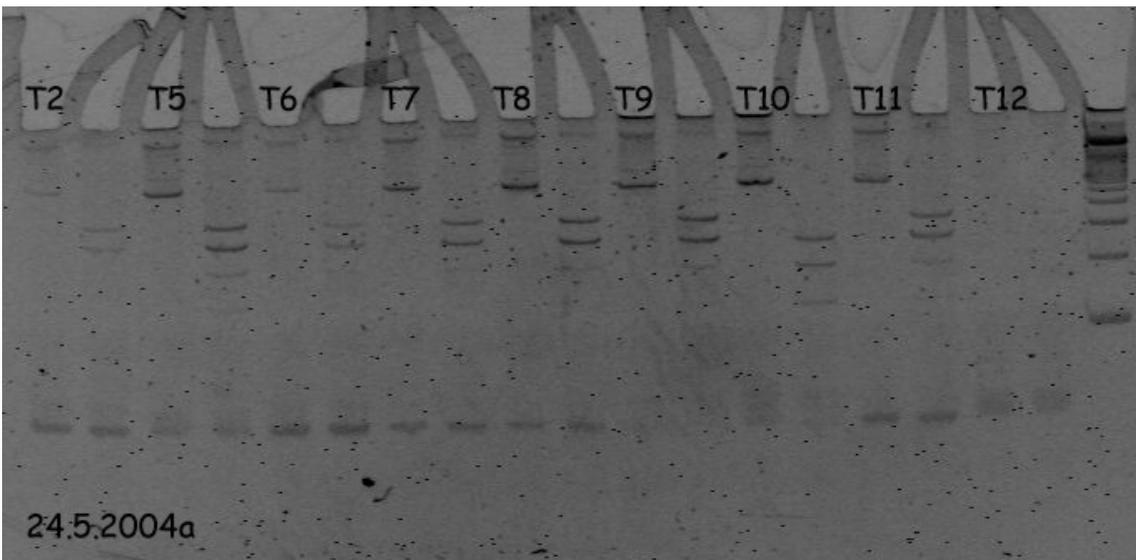
Acrylamidgelbild 26: cDNA Verdau mit Rsa I



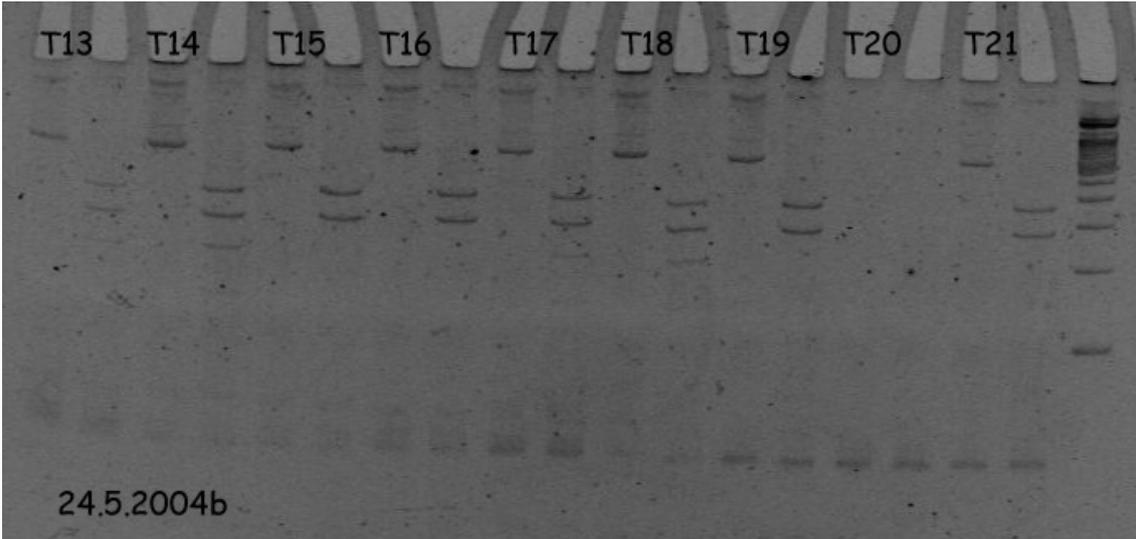
Acrylamidgelbild 27: cDNA Verdau mit Taq I



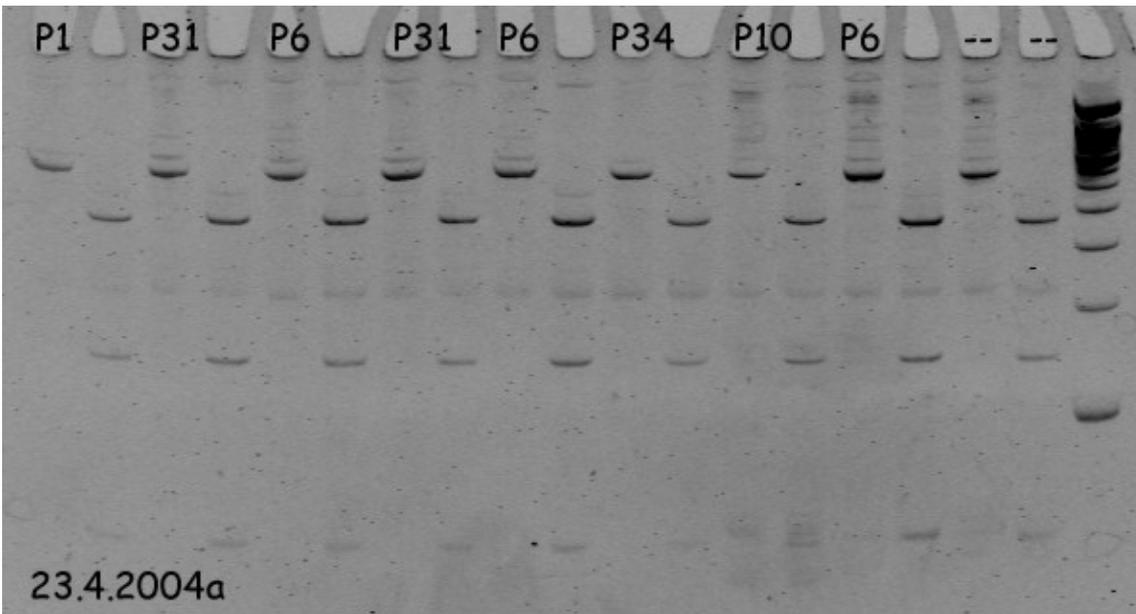
Acrylamidgelbild 28: rechtsseitig cDNA Verdau mit Rsa I, linksseitig ab P3 DNA Verdau mit Taq I



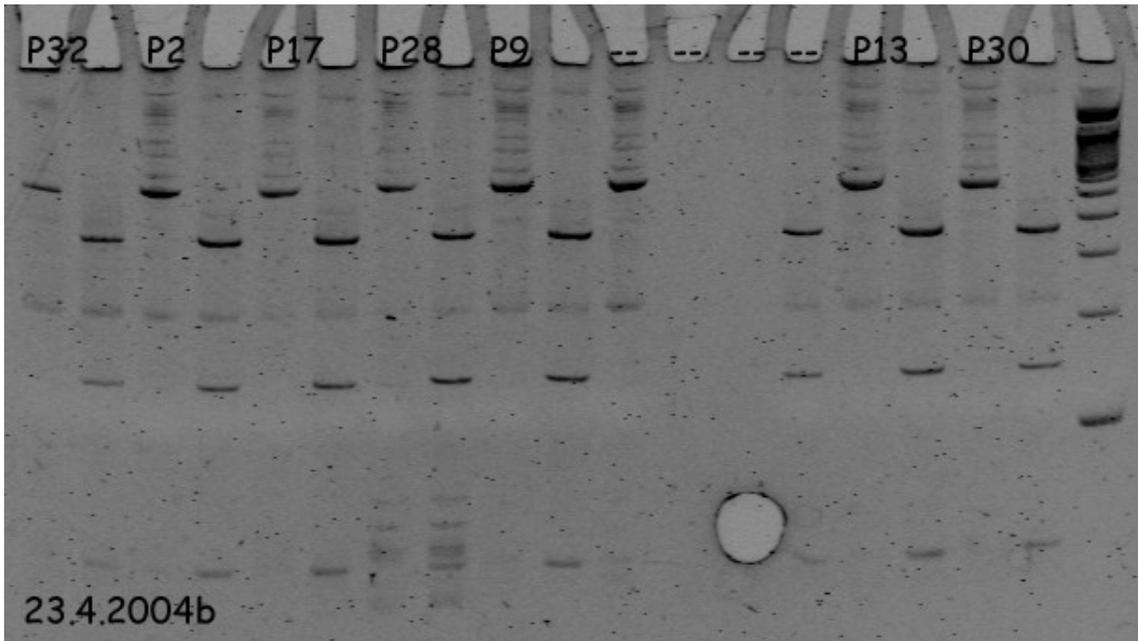
Acrylamidgelbild 29: cDNA Verdau mit Rsa I



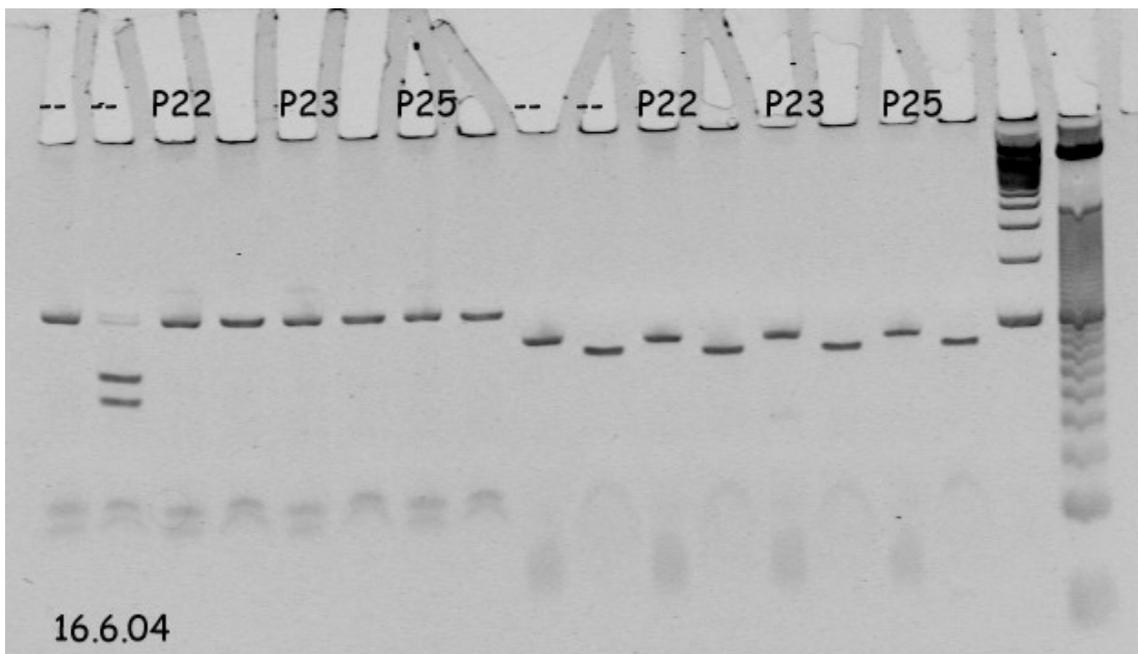
Acrylamidgelbild 30: cDNA Verdau mit Rsa I



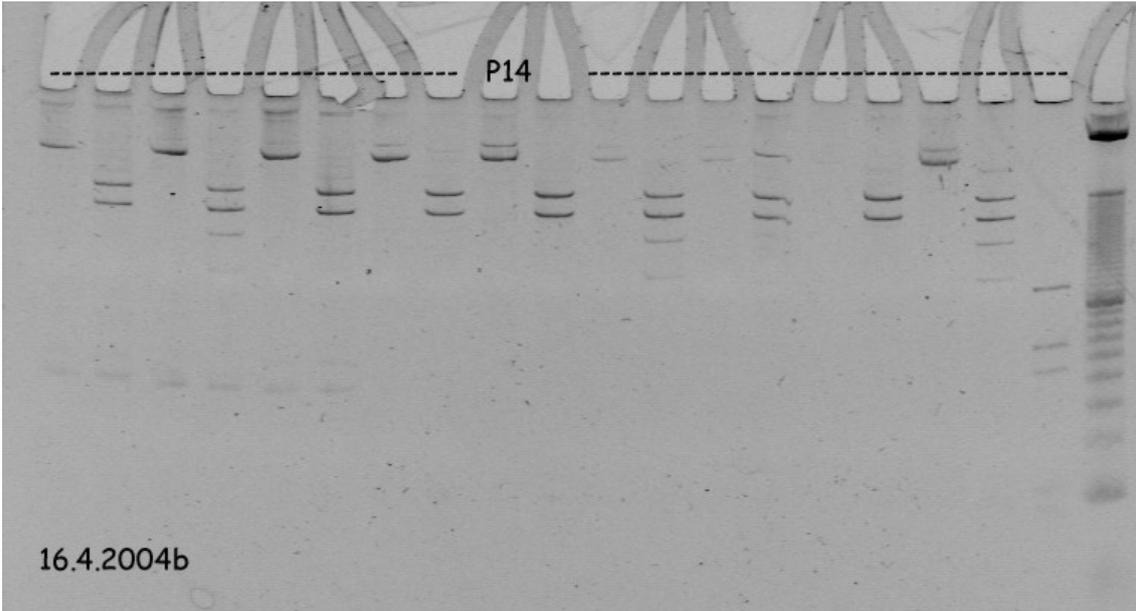
Acrylamidgelbild 31: cDNA Verdau mit Taq I



Acrylamidgelbild 32: cDNA Verdau mit Taq I



Acrylamidgelbild 33: DNA Verdau linksseitig mit Rsa I, rechtsseitig mit Taq I



Acrylamidgelbild 34: cDNA Verdau mit Rsa I