

Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin III
(Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie, Infektionskrankheiten)
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Hartmut Döhner

**Inzidenz und prognostischen Bedeutung von C/EBP α -Mutationen
bei der akuten myeloischen Leukämie
des älteren Patienten (> 60 Jahre) mit normalem Karyotyp
im Rahmen der AML-06-04-Studie**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der
Medizinischen Fakultät
der
Universität Ulm

vorgelegt von
Corinna Mendla
aus Heidelberg
2012

Dekan: Professor Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Professor Dr. Konstanze Döhner

2. Berichterstatter: Professor Dr. Holger Cario

Tag der Promotion: 11.07.2013

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung	1
1.1 Etablierte Klassifikationssysteme der AML.....	1
1.2 Bedeutung molekularer Marker für Prognose und Therapie der AML	3
1.3 CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP α).....	5
1.4 Somatische Mutationen und Dysregulation von C/EBP α in der AML	7
1.5 Keimbahnmutationen des <i>CEBPA</i> -Gens.....	9
1.6 <i>CEBPA</i> -Polymorphismen	11
1.7 Prognostische Bedeutung von <i>CEBPA</i> -Mutationen	11
1.8 Besonderheiten der AML des älteren Patienten (> 60 Jahre)	12
1.9 Zielsetzung.....	14
2 Patienten, Material und Methoden	15
2.1 Reagenzienverzeichnis	15
2.2 Patientenkollektiv und Proben.....	18
2.3 Therapieprotokoll der Patienten	19
2.4 Materialgewinnung	22
2.5 Übersicht über die angewandten Methoden.....	23
2.6 DNA-Extraktion	24
2.7 Primerbestimmung und -verdünnung	26
2.8 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	26
2.9 Agarose-Gel-Elektrophorese.....	30
2.10 Aufreinigung der PCR-Produkte.....	31
2.11 Cycle Sequencing Reaction (CSR)	33
2.12 Aufreinigung der CSR-Produkte.....	35
2.13 Sequenzierung	37
2.14 FTA-Cards.....	39
2.15 Statistische Auswertungen	40
3 Ergebnisse	42
3.1 Inzidenz von <i>CEBPA</i> -Mutationen	42
3.2 Molekulare Charakterisierung der <i>CEBPA</i> -Mutationen und Poly- morphismen.....	45
3.3 Untersuchung auf Keimbahnmutationen	50
3.4 Assoziation mit anderen Mutationen	54

3.5	Biologische und klinische Charakteristika der untersuchten Patienten ...	56
3.6	Einfluss des Mutationsstatus auf das Chemotherapieansprechen	59
3.7	Korrelation des <i>CEBPA</i> -Mutationsstatus mit dem klinischen Verlauf	59
4	Diskussion.....	69
5	Zusammenfassung.....	77
6	Literaturverzeichnis	79
7	Anhang.....	89
7.1	<i>CEBPA</i> Referenz-Sequenz (GenBank: U34070.1)	89
7.2	Analyse der <i>CEBPA</i> -Gensequenz U34070.1 mittels ORF Finder	90
7.3	Verzeichnis der Aminosäuren und Nukleinbasen.....	92
7.4	Haematopoese-Differenzierungsschema	93
8	Danksagung	94
9	Lebenslauf.....	95

Abkürzungsverzeichnis

A, ...Y	Verzeichnis der Aminosäure- und Nukleinbasen-Symbole: siehe 7.3
Allo-PBSCT	Allogeneic peripheral blood stem cell tansplant (allogene periphere Blutstammzelltransplantation)
AML	Akute myeloische Leukämie
<i>AML1-ETO</i>	<i>Acute myeloid leukemia 1 (Runx-1)- eight twenty-one (MTG8)</i> Fusionsgen
<i>AML1-MDS- EVI1</i>	<i>Acute myeloid leukemia 1-myelodysplastic syndrome 1-ecotropic viral integration site 1</i> Fusionsgen
ATRA	All-trans retinoic acid
bp	(Anzahl der) Basenpaare
bZIP	Basic region leucine zipper
CALGB	Cancer and Leukemia Group B
CBFB	Core-binding factor β
C/EBP α	CCAAT/enhancer-binding protein alpha
<i>CEBPA</i>	<i>CCAAT/enhancer-binding protein alpha</i> Gen
CD	Cluster of differentiation (Zelloberflächen-Marker)
CN	Cytogenetically normal
CR	Complete remission
CSR	Cycle sequencing reaction
C-terminal	In Richtung Carboxy-Terminus des Proteins
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
del(x)	Deletion des Nukleotids x
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease

dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFS	Event-free survival
FAB	French-American-British (Cooperative Group)
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HAM	Hochdosis-Cytarabin-Mitoxantrone (Therapie)
HCT-CI	Hematopoietic Cell Transplantation-specific Comorbidity Index
hnRNP-E2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E2
HPLC	High performance liquid chromatography
HSC	Hematopoetic stem cell
HLA	Human Leukocyte Antigen
IADL	Instrumental Activities of Daily Living
IC	Idarubicin-Cytarabin (Therapie)
IE	Idarubicin-Etoposid (Therapie)
ins(x)	Insertion (des Nukleotids x)
inv(x)	Inversion (auf Chromosom x)
ISCN	International System for Cytogenetic Nomenclature
ITD	Interne Tandem Duplikation
kDa	Kilo-Dalton (Molmasse)
KM	Knochenmark
LDH	Lactatdehydrogenase
LSC	Leukemic stem cell
MAPK	Mitogen-activated protein (MAP) kinase
mCCI	modifizierter Charlson Comorbidity Index
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MD/MPD	myelodysplastic/ myeloproliferative disease
MDR1	Multidrug resistance-associated protein 1 (P-glycoprotein)
MDS	Myelodysplastic syndrome
MLL	Mixed lineage leukemia
MPD	Myelodysplastic disease

MRC	(British) Medical Research Council
MUT	mutiert
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NPM1	Nucleophosmin, member 1
N-terminal	In Richtung Amino-Terminus des Proteins
ORF	Open reading frame (offener Leserahmen)
OS	Overall survival
p30	30 kDa große Form des C/EBP α
p42	42 kDa große (Volllängen-) Form des C/EBP α
PB	Peripheres Blut
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PCR	Polymerase chain reaction
PR	Partielle Remission
PTD	Partielle Tandemduplikation
Ras	Rat sarcoma (Mitglied der small GTPase Superfamilie)
RD	Resistant disease (refraktäre Erkrankung)
RFS	Relapse-free survival
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
SIRP α	Signal regulatory protein alpha
SMMHC	Smooth muscle myosin heavy chain
SNP	Single nucleotide polymorphism
Src	Sarcoma (Protoonkogen, Tyrosinkinase)
SWOG/ECOG	Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group
t(x;y)	Translokation (Chromosom x \rightarrow y)
TAD	Transaktivierungsdomäne
TE (-Puffer)	Tris-EDTA
TKD	Tyrosinkinase-Domäne
TNF	Tumor necrosis factor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Die akute myeloische Leukämie (AML) stellt eine genetisch heterogene, klonale Erkrankung des hämatopoetischen Systems dar, bei der hämatopoetische Stammzellen und/oder myeloische Vorläuferzellen verschiedene genetische Veränderungen akkumulieren. Dabei verlieren diese Zellen die Kontrolle über ihre Selbsterneuerung und ihre normale Fähigkeit zur Differenzierung in reife Blutzellen und entfalten eine unkontrollierte proliferative Aktivität (Döhner et al. 2008; Chan et al. 2008). Die AML ist charakterisiert durch eine Akkumulation von unreifen Granulozyten- und Monozyten-Vorstufen im Knochenmark, die häufig mit einer hämatopoetischen Insuffizienz (Granulozytopenie, Thrombozytopenie oder Anämie), mit oder ohne Leukozytose, assoziiert ist (Löwenberg et al. 1999). Die AML ist mit 80% die häufigste akute Leukämieform im Erwachsenenalter (Laubach et al. 2008) und mit einer Prävalenz von 3,8 Fällen pro 100.000 die häufigste Form der myeloischen Leukämien. Die Prävalenz der AML steigt mit zunehmendem Alter deutlich an und erreicht in der Population der über 65-jährigen 17,9 Fälle pro 100.000 (Bloomfield et al. 2008; Horner et al. 2009).

1.1 Etablierte Klassifikationssysteme der AML

Bis in die siebziger Jahre des vorigen Jahrhunderts beruhte die Diagnose der AML ausschließlich auf der pathologischen und zytologischen Untersuchung von Knochenmark und peripherem Blut. Im Jahre 1976 wurde von der French-American-British (FAB) Cooperative Group ein Klassifizierungssystem vorgestellt, welches vorwiegend auf morphologischen Kriterien und dem Differenzierungsgrad myeloischer Zellen basiert und die AML in die Subtypen M0 bis M7 einteilt (Bennett et al. 1976). Zusätzlich wurden später noch immunologische und zytogenetische Charakteristika der leukämischen Blasten mit in die diagnostischen Kriterien für einige der FAB-Subgruppen einbezogen (Löwenberg et al. 1999). Ein wesentlicher Fortschritt auf dem Wege von einer zuvor eher morphologisch ausgerichteten Sichtweise hin zu einer stärker zellbiologisch orientierten Klassifizierung der AML unter Einbeziehung zytogenetischer Faktoren stellte die 1999 von der World Health Organization (WHO) eingeführte Klassifikation dar (Harris et al. 1999). Danach werden myeloische Erkrankungen in die vier Hauptgruppen myeloproliferative Erkrankungen (MPD), myelodysplastische/myeloproliferative Erkrankungen (MD/MPD), myelodysplastische Syndrome (MDS)

und akute myeloische Leukämien (AML) eingeteilt. Letztere werden wiederum in vier Subtypen unterteilt: AML mit rekurrenten zytogenetischen Translokationen, AML mit Myelodysplasie-verwandten Eigenschaften, Therapie-bedingte AML, MDS sowie ansonsten nicht näher spezifizierte AML. Im Jahre 2008 erfolgte eine Überarbeitung dieses Klassifizierungssystems, das nun auch kürzlich gewonnene molekulargenetische Erkenntnisse berücksichtigt (Swerdlow et al. 2008; Weinberg et al. 2009; Heerema-McKenney et al. 2009).

Strukturelle und numerische klonale Chromosomen-Aberrationen (z.B. reziproke Translokationen, Inversionen, Deletionen, Insertionen, Trisomien und Monosomien) werden bei 55% der adulten AML-Patienten bei Diagnosestellung gefunden. Diese zytogenetischen Veränderungen stellen nicht nur diagnostische Marker für spezifische AML-Subtypen dar, sondern gelten auch als die wichtigsten prognostischen Faktoren für das Ansprechen auf therapeutische Maßnahmen und die Überlebensrate (Bloomfield 2002; Mrózek et al. 2000).

Die gegenwärtig am meisten verwendeten zytogenetischen Klassifikationssysteme für die AML sind die der Cancer and Leukemia Group B (CALGB), der Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group (SWOG/ECOG) und des United Kingdom Medical Research Council (MRC) (Mrózek et al. 2004). Alle drei Systeme ordnen AML-Patienten einer von drei Risikogruppen zu, nämlich einer solchen mit günstiger, mit intermediärer oder mit ungünstiger Prognose. Die meisten Patienten-Stratifikationssysteme stufen die Translokationen t(8;21) und t(15;17) sowie die Inversion inv (16) als prognostisch günstigen Karyotyp ein, wohingegen Chromosomen-Aberrationen wie -5/del (5q), -7, abn(3q) und komplexe Karyotypen (im Allgemeinen definiert als Fälle mit drei oder mehr chromosomalen Veränderungen) als prognostisch ungünstig klassifiziert werden. Alle übrigen Patienten, einschließlich derjenigen mit normalem Karyotyp, werden der bei weitem größten Subgruppe mit einem intermediären Risiko zugerechnet (Fröhling et al. 2006). Etwa 40 bis 50% der AML-Patienten weisen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung einen normalen Karyotyp (cytogenetically normal; CN) auf und fallen somit in die intermediäre Risikogruppe. Dennoch ist der klinische Verlauf bei dieser Patientenpopulation recht heterogen. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass dieser klinischen Heterogenität eine Reihe molekularer Veränderungen zugrunde liegen, die eine prognostische Relevanz besitzen (Schlenk et al. 2008).

1.2 Bedeutung molekularer Marker für Prognose und Therapie der AML

In den letzten Jahren sind einige Gen-Mutationen bzw. Änderungen in der Gen-Expression identifiziert worden, die der Pathogenese der AML zugrunde liegen und deren prognostische Relevanz in verschiedenen Studien untersucht wurde (Baldus et al. 2008; Gregory et al. 2009). Diese molekulargenetischen Veränderungen lassen sich im Wesentlichen zwei verschiedenen Mutationsgruppen zuordnen: Die erste Gruppe (Klasse I) beinhaltet Mutationen, die zu einer Aktivierung von Signaltransduktionswegen führen und in einer gesteigerten Proliferation und/oder einer erhöhten Überlebensrate von Leukämie-Stammzellen resultieren. Zu den bekanntesten Beispielen hierfür zählen Mutationen, die zu einer Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3) oder des RAS-Signaltransduktionsweges führen. Die zweite Mutationsgruppe umfasst Mutationen, die Transkriptionsfaktoren oder Komponenten des Transkriptions-Co-Aktivierungs-Komplexes betreffen und in einer gestörten Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen resultieren. Hierzu zählen Mutationen in C/EBP α (CCAAT/enhancer-binding protein alpha), MLL (myeloid/lymphoid oder mixed lineage leukemia) und möglicherweise auch NPM1 (nucleophosmin, member 1) (Gaidzik et al. 2008).

FLT3 zählt zur Familie der Klasse III Rezeptor-Tyrosinkinasen. Das Enzym wird von hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark exprimiert und spielt eine wichtige Rolle für das Überleben und die Differenzierung von multipotenten Stammzellen (Gilliland et al. 2002). Interne Tandem-Duplikationen (ITD) des *FLT3*-Gens stellen mit die häufigste genetische Anomalität in der AML dar. Etwa 30% der CN-AML-Patienten weisen eine *FLT3*-ITD auf. Darüber hinaus werden in 5 bis 14% der CN-AML-Patienten Punktmutationen im Aktivierungs-Loop der Tyrosinkinase-Domäne (TKD) gefunden (Mrózek et al. 2007). Durch die *FLT3*-ITD und *FLT3*-TKD Mutationen entsteht eine konstitutiv-aktive Tyrosinkinase, die Signaltransduktionswege initiiert, die für die Zellproliferation und Differenzierung von Bedeutung sind. Zahlreiche Studien in CN-AML-Patienten haben gezeigt, dass Patienten mit *FLT3*-ITD eine signifikant schlechtere Prognose aufweisen als Patienten ohne eine solche Mutation. Dagegen wird die prognostische Bedeutung von *FLT3*-TKD-Mutationen kontrovers diskutiert (Döhner et al. 2008). Über seine Bedeutung als molekularer Marker hinaus stellt FLT3 ein mögliches

therapeutisches Target dar: Zurzeit befinden sich mehrere FLT3-Inhibitoren in klinischer Entwicklung.

Das Ras-Protoonkogen zählt zur Familie der GTPasen und kommt in drei Isoformen (N-Ras, K-Ras und H-Ras) vor. *NRAS*-Mutationen werden in 9-14% der jüngeren Erwachsenen mit CN-AML gefunden. Diese Mutationen führen zu einem Verlust der GTPase-Aktivität und zur konstitutiven Aktivierung des Ras-Proteins. Ein Einfluss von *NRAS*-Mutationen auf die Prognose von AML-Patienten konnte bislang jedoch nicht nachgewiesen werden (Döhner et al. 2008; Tyner et al. 2009).

Bei *NPM1* handelt es sich um ein ubiquitär exprimiertes nukleoläres Phosphoprotein, das vielfältige Funktionen ausübt. Unter anderem ist es beteiligt an der Ribosomen-Biogenese, der Regulation der Stabilität und transkriptionellen Aktivität von p53 als Reaktion auf unterschiedliche Stress-Stimuli, sowie als molekulares Chaperon zur Verhinderung der Proteinaggregation im Nukleolus (Falini et al. 2005). Aufgrund dieser Funktionen spielt *NPM1* eine wichtige Rolle in der Proliferation, Wachstumshemmung und Differenzierung von Zellen. *NPM1*-Mutationen sind die häufigsten genetischen Veränderungen in erwachsenen AML-Patienten: Sie werden in 45-64% der CN-AML-Patienten gefunden (Döhner et al. 2008). Mutationen im *NPM1*-Gen sind häufig vergesellschaftet mit anderen genetischen Aberrationen. Etwa 40% der Patienten mit *NPM1*-Mutationen weisen zusätzlich eine *FLT3*-ITD auf. Mehrere Studien haben gezeigt, dass der Genotyp 'mutiertes *NPM1* ohne *FLT3*-ITD' einen günstigen prognostischen Marker darstellt, wohingegen *NPM1*-Mutationen keinen Einfluss auf die ungünstige Prognose von AML-Patienten mit *FLT3*-ITDs haben (Schlenk et al. 2008).

Das *MLL*-Protein stellt eine katalytische Untereinheit des mixed lineage leukemia (*MLL*)-Komplexes dar, welcher eine Histon H3 Methyltransferase-Aktivität aufweist (Song et al. 2008). In 5-11% der CN-AML-Patienten kommen partielle Tandemduplikationen (PTD) des *MLL*-Gens vor (Mrózek et al. 2007). AML-Patienten mit einer *MLL*-PTD weisen eine verkürzte Remissionsdauer sowie ein schlechteres rezidivfreies (relapse-free survival; RFS) und ereignisfreies Überleben (event-free survival; EFS) auf. Jedoch beeinflusst das Vorliegen einer *MLL*-PTD nicht die Gesamt-Überlebensrate (overall survival; OS) (Döhner et al. 2002).

Kürzlich wurde gezeigt, dass eine erhöhte Expression des Immunglobulin-ähnlichen Zelloberflächenproteins CD47 in AML-Patienten mit einem schlechteren klinischen Outcome assoziiert ist (Jaiswal et al. 2009; Majeti et al. 2009). CD47 wird von den Leukämie-Stammzellen exprimiert. Durch Interaktion mit dem Makrophagen-Rezeptor SIRP α hemmt CD47 die Aktivität von Makrophagen und trägt damit zu einer erhöhten Überlebensrate der Tumorzellen in der AML bei. Durch Gabe eines monoklonalen anti-CD47-Antikörpers konnte in einem Mausmodell die Phagozytose von transplantierten AML-LSCs stimuliert und ihr Anwachsen im Knochenmark verhindert werden. Somit könnte sich CD47 nicht nur als ein weiterer prognostischer Marker, sondern auch als therapeutisches Target für die Behandlung der AML eignen.

1.3 CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP α)

Die C/EBP-Proteine bilden eine Familie von homologen bZIP (basic region leucine zipper)-Transkriptionsfaktoren mit sechs Mitgliedern (C/EBP α , β , γ , δ , ϵ und ζ).

Das intronlose *CEBPA*-Gen mit einer GC-reichen (über 70%) kodierenden Region ist auf dem Chromosom 19q13.1 lokalisiert. Durch die Nutzung verschiedener AUG-Startcodons im selben offenen Leserahmen werden bei der Translation der mRNA hauptsächlich zwei Protein-Isoformen gebildet: Das 358 Aminosäuren lange und 42 kDa große Vollängen-Protein p42 und eine N-terminal um 117 Aminosäuren verkürzte, 30 kDa große Isoform (p30). Das p42 C/EBP α -Protein enthält zwei Transaktivierungsdomänen (TAD1 und TAD2), eine basische DNA-Bindungsdomäne, sowie eine für Homo- und Heterodimersierungen benötigte C-terminale Leucine Zipper Region. Die Transaktivierungsdomäne TAD1 fehlt in der p30 Isoform.

C/EBP α wird in zahlreichen Geweben und Zelltypen exprimiert, darunter Leber, Fettgewebe, Atemwegsepithelzellen und myeloiden Zellen (Antonson et al. 1995). Dabei ist die Expression in postmitotischen, terminal differenzierten Zellen am höchsten. Innerhalb des hämatopoetischen Systems wird C/EBP α in hämatopoetischen Stammzellen (HSCs), in myeloiden Progenitorzellen und in Granulozyten (aber nicht in Makrophagen) exprimiert (Zhang et al. 2004) und spezifisch während der Differenzierung zu Granulozyten hochreguliert (Koschmieder et al. 2009; Müller et al. 2006; vgl. Differenzierungs-Schema in 7.4).

In diesem Prozess induziert C/EBP α die Entwicklung von Granulozyten aus bipotenten myeloiden Progenitorzellen und reguliert die Transkription einer Reihe von Myelozyten-spezifischen Genen, wie z.B. die Rezeptoren für G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor), M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) und GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) (Radomska et al. 1998). Die Induktion der Granulozytendifferenzierung durch C/EBP α wird durch die Ras-vermittelte Phosphorylierung von Serin 248 verstärkt (Behre et al. 2002).

Einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung der zentralen Bedeutung von C/EBP α für die Hemmung der Zellproliferation und die Stimulation der terminalen Differenzierung von hämatopoetischen Zellen haben Untersuchungen in Mäusen mit einem konditionellen C/EBP α Knockout (C/EBP α -/-) geliefert: Diese Mäuse weisen einen Phänotyp auf, der dem M2-Subtyp (nach der FAB-Klassifikation) von AML-Patienten ähnelt. In den Tieren findet sich eine normale Anzahl von myeloischen Vorläuferzellen (common myeloid progenitor cells; CMPs), jedoch fehlen Granulozyten-Monozyten Vorläuferzellen (granulocyte-monocyte progenitors; GMPs) sowie reife Granulozyten vollständig, während Myeloblasten im Knochenmark akkumulieren, was auf eine frühe Blockade im myeloischen Reifungsprozess hindeutet. (Zhang et al. 1997). Somit ist C/EBP α essentiell für die Reifung von CMPs zu GMPs. Dagegen erlaubt die Deletion von C/EBP α in GMPs eine normale Entwicklung von Granulozyten in vitro, was zeigt, dass dieser letzte Differenzierungsschritt C/EBP α -unabhängig verläuft. Darüber hinaus konnte durch Transplantationsstudien in Mäusen gezeigt werden, dass C/EBP α -defiziente HSCs ein gesteigertes Selbsterneuerungspotential besitzen und C/EBP α somit eine wichtige Kontrollfunktion bei der Selbsterneuerung von HSCs zukommt (Zhang et al. 2004). Die Entwicklung von Zellen der erythrozytären und megakaryozytären Linie sowie die Bildung von Monozyten, Lymphozyten und NK-Zellen verläuft in den C/EBP α -/- Mäusen ungestört (Zhang et al. 1997).

1.4 Somatische Mutationen und Dysregulation von C/EBP α in der AML

Da C/EBP α ein essentieller Faktor für die granulozytäre Differenzierung ist und Zellen von AML-Patienten einen Differenzierungsblock aufweisen, lag die Vermutung nahe, dass C/EBP α bei dieser Erkrankung fehlen oder mutiert sein könnte. Tatsächlich weisen etwa 5-14% aller Patienten mit AML Mutationen im *CEBPA*-Gen auf (Pabst et al. 2001a; Fröhling et al. 2004; Pabst et al. 2008). Interessanterweise kommen *CEBPA*-Mutationen vorwiegend in AML-Patienten mit den FAB-Subtypen M1 und M2 vor, wohingegen in Patienten mit den Karyotypen t(8;21), inv(16) oder t(15;17) keine derartigen Mutationen gefunden wurden (Pabst et al. 2007; Koschmieder et al. 2009). In der Gruppe der CN-AML-Patienten wurden sogar bei bis zu 15% der Fälle *CEBPA*-Mutationen nachgewiesen (Fröhling et al. 2004). *CEBPA*-Mutationen scheinen relativ spezifisch für die AML zu sein und wurden ansonsten bisher nur beim Myelodysplastischen Syndrom beobachtet. Mutationen im *CEBPA*-Gen können im Wesentlichen in zwei Typen unterteilt werden: N-terminale frameshift-Mutationen und C-terminale in-frame-Mutationen. Die C-terminalen in-frame-Mutationen (Insertionen bzw. Deletionen) sind häufig im Übergangsbereich zwischen der basischen DNA-Bindungsdomäne und der Leucine Zipper-Domäne lokalisiert und führen zu Veränderungen sowohl in der DNA-Bindung wie auch in der Dimerisierung mit Partnerproteinen (Pabst et al. 2001a; Nerlov 2004). Die N-terminalen frameshift-Mutationen verursachen eine vorzeitige Termination der Translation der 42 kDa-Volllängen-Form des C/EBP α -Proteins (unter Bildung eines verkürzten, nicht funktionellen Proteins), während p30 normal gebildet wird. Letzteres übt einen dominant-negativen Effekt aus und inhibiert somit die Funktion des verbleibenden p42, welches von dem nicht mutierten Allel exprimiert wird (Pabst et al. 2007). Funktionelle Studien haben gezeigt, dass p30 eine deutlich reduzierte Affinität zu den C/EBP α -Zielpromotoren besitzt und diese in wesentlich geringerem Umfang transaktiviert. Der Mechanismus der Leukämogenese durch *CEBPA*-Mutationen wurde in homozygoten Knockin-Mäusen, die p30, aber kein p42 exprimieren, untersucht: Diese Mäuse zeigten initial eine Neutropenie und entwickelten später das komplette Bild einer AML (Kirstetter et al. 2008). Ähnlich wie bei AML-Patienten mit *CEBPA*-Mutationen weisen die Myeloblasten dieser Tiere eine erhöhte proliferative Aktivität auf und besitzen einen normalen Karyotyp. Während in

C/EBP α Knockout-Mäusen der Reifungsschritt von CMPs zu GMPs blockiert ist, werden in präleukämischen p30-Knockin-Mäusen noch GMPs gebildet, was zeigt, dass p30 für die Reifung von CMPs zu GMPs ausreichend ist. Während aus dem Knochenmark gewonnene myeloide Progenitorzellen aus heterozygoten Wildtyp/p30-Mäusen nur eine geringfügig gesteigerte proliferative Aktivität aufweisen, zeigen p30/p30 homozygote GMPs eine hohe proliferative Aktivität, eine erhöhte Immortalität und eine gesteigerte Selbsterneuerung. Somit ist p30 notwendig und hinreichend für die Festlegung auf die myeloische Linie, während p42 für den Zellzyklus-Arrest benötigt wird und die Tumorsuppressor-Eigenschaften besitzt (Kirstetter et al. 2008). Insgesamt deuten diese Befunde darauf hin, dass das Verhältnis von p30 zu p42 von entscheidender Bedeutung für die Bildung von Granulozyten ist.

In der Mehrzahl (72%) der AML-Patienten mit *CEBPA*-Mutationen wurde mehr als eine Mutation des *CEBPA*-Gens nachgewiesen (Pabst et al. 2007). Beim größten Teil dieser Patienten kommt eine N-terminale frameshift-Mutation zusammen mit einer C-terminalen in-frame-Mutation vor, wobei die beiden Mutationen typischerweise auf verschiedenen Allelen lokalisiert sind. Das häufige Vorkommen einer zweiten *CEBPA*-Mutation könnte erklären, warum in AML-Patienten mit *CEBPA*-Mutationen selten weitere genetische Anomalitäten gefunden werden: Der nach der two-hit-Hypothese für die Onkogenese notwendige second hit wird bereits durch die zweite *CEBPA*-Mutation hervorgerufen.

Außer durch somatische Mutationen kann in der AML die Funktionalität des C/EBP α -Proteins auch durch epigenetische Faktoren beeinträchtigt sein. So führt die Hypermethylierung des *CEBPA*-Promotors zu einer verringerten Expression von C/EBP α (Hackanson et al. 2008; Koschmieder et al. 2009; Jost et al. 2009). Ferner supprimiert das Fusionsprotein AML1-ETO die Transkription von C/EBP α (Pabst et al. 2001b). Außerdem wird die C/EBP α -Translation durch das RNA-bindende Protein hnRNP-E2, welches durch die onkogene Kinase BCR-ABL in einem MAPK-abhängigen Mechanismus induziert wird, gehemmt (Chang et al. 2007). In ähnlicher Weise wird bei den AML-Subtypen mit core-binding factor β -smooth muscle myosin heavy chain-Fusion (CBFB-SMMHC) bzw. AML1-MDS-EVI1-Fusion (beides infolge einer Translokation) das RNA-bindende Protein Calreticulin hochreguliert und die Translation von C/EBP α gehemmt (Helbling et

al. 2004; Helbling et al. 2005). Schließlich können posttranslationale Modifizierungen von C/EBP α , wie die Phosphorylierung von Serin-21 durch die onkogene Kinase FLT3-ITD, zu einer Hemmung der granulozytären Differenzierung (verbunden mit einem Shift zu einem monozytären Phänotyp) führen (Radomska et al. 2006).

1.5 Keimbahnmutationen des *CEBPA*-Gens

Neben den zuvor erwähnten somatischen Mutationen wurden in Patienten mit AML auch Keimbahnmutationen des *CEBPA*-Gens nachgewiesen. Diese familiären Formen der AML erlauben interessante Einblicke in die pathogenetische Bedeutung von *CEBPA*-Mutationen in der Leukämogenese (Owen et al. 2008). Bisher wurden in der Literatur mehrere Familien mit *CEBPA*-Keimbahnmutationen beschrieben: In der ersten Familie (Smith et al. 2004) erkrankten drei Mitglieder (zwei Kinder und deren Vater) an einer AML und wiesen alle eine identische N-terminale Deletion eines Cytosinrestes an der Nukleotidposition 212 (212delC) des *CEBPA*-Gens auf. Zusätzlich zeigte sich bei einem der betroffenen Kinder im Diagnosematerial eine C-terminale, somatische Mutation (36-bp *CEBPA*-Genduplikation). In einer weiteren Familie (Sellick et al. 2005) erkrankten ein Vater, zwei Söhne und ein Enkelsohn an AML. Alle waren von der gleichen Keimbahnmutation (217_218insC) betroffen. Zusätzlich wiesen die beiden erkrankten Söhne C-terminale Insertionen an der Nukleotidposition 1071 auf. In einer dritten Publikation (Nanri et al. 2006) wird eine Familie beschrieben, in der bei einem an AML erkrankten Vater, einem ebenfalls betroffenen Sohn sowie bei einem weiteren (noch) gesunden Sohn eine identische N-terminale Keimbahnmutation (350_351insCTAC) nachgewiesen wurde. Bei dem betroffenen Vater wurde bei der Diagnose zusätzlich zu seiner Keimbahnmutation eine somatische 18-bp Insertion an der Nukleotidposition 1063 sowie bei Auftreten eines Rezidivs eine somatische 3-bp Insertion an der Position 1079 festgestellt. Auch der erkrankte Sohn wies eine zusätzliche 3-bp Insertion an der Position 1085 auf. Pabst et al. (2008) untersuchten 18 Patienten mit *CEBPA*-Mutationen bei Diagnosestellung auf die Anwesenheit von Keimbahnmutationen. Tatsächlich wurden bei zwei Patienten N-terminale Keimbahnmutationen nachgewiesen: Bei der ersten Patientin lag eine N-terminale Deletion (291delC) in Kombination mit einer C-terminalen somatischen Mutation (1086_1087insCAG) vor. Auch ihre

bereits verstorbene Mutter, sowie ein (noch) nicht erkrankter Sohn zeigten die identische Keimbahnmutation. Bei der zweiten Patientin wurde ebenfalls eine N-terminale *CEBPA*-Mutation in der Keimbahn (465_466insT) identifiziert, welche wiederum mit einer C-terminalen somatischen Mutation (1089_1090insAAG) vergesellschaftet war. In archiviertem Material des verstorbenen Vaters dieser Patientin konnte ebenfalls die identische Keimbahnmutation sowie zwei zusätzliche C-terminale Punktmutationen nachgewiesen werden. Renneville et al. (2009a) beschrieben den Fall einer Mutter und ihres 5-jährigen Sohnes, die beide an AML erkrankten und bei denen jeweils eine N-terminale Keimbahnmutation und eine erworbene C-terminale *CEBPA*-Mutation nachgewiesen wurde. Die N-terminale Keimbahnmutation bestand bei beiden Patienten aus einer Insertion (217_218insC), die interessanterweise genau der von Sellick et al. (2005) in einer anderen Familie beschriebenen Mutation entspricht (s.o.). Zusätzlich wies die erkrankte Mutter im C-terminalen Bereich bei der Diagnose eine 3-bp Deletion (1083_1085delAAG) und der erkrankte Sohn eine 3-bp Insertion (1065_1066insGGG) auf. Beide C-terminalen Mutationen wurden nicht mehr im Remissions-Material gefunden, so dass es sich hierbei um somatische Mutationen handelte.

Bei den bislang bekannten Fällen von AML mit *CEBPA*-Keimbahnmutationen fallen etliche Gemeinsamkeiten auf: Alle Betroffenen wiesen N-terminale out-of-frame Mutationen auf, die zu einer trunkierten Form des C/EBP α -Proteins sowie einer bevorzugten Produktion der dominant-negativen p30-Isoform führten. Von den insgesamt 13 erkrankten Familienmitgliedern zeigten sieben bei der Diagnosestellung eine zusätzliche erworbene C-terminale in-frame *CEBPA*-Mutation, die bei allen Patienten auf dem jeweils anderen Allel lag. Dabei wiesen alle sieben Betroffenen bei der Diagnose einen normalen Karyotyp auf. Typischerweise verschwanden diese C-terminalen Mutationen in Remission (Pabst et al. 2008). Insgesamt scheinen *CEBPA*-Keimbahnmutationen eine vollständige Penetranz aufzuweisen, da mit Ausnahme zweier sehr junger Mutationsträger (14 bzw. 21 Jahre alt) alle von der Keimbahnmutation betroffenen Individuen an AML erkrankten.

Zusammen genommen deuten diese Befunde darauf hin, dass N-terminale *CEBPA*-Keimbahnmutationen für die Entwicklung einer AML prädisponieren und

eine zweite, C-terminale, somatische Mutation nach einer individuell unterschiedlich langen Latenzperiode als second hit den Krankheitsausbruch initiiert.

1.6 *CEBPA*-Polymorphismen

Neben den zuvor beschriebenen AML-assoziierten Mutationen wurde für das *CEBPA*-Gen eine Reihe von Sequenzvariationen (Polymorphismen) beschrieben (Fuchs et al. 2008; Leecharendkeat et al. 2008). So identifizierten Fröhling et al. (2004) in einer Kohorte von 236 AML-Patienten mit normaler Zytogenetik (CN-AML) sechs verschiedene Polymorphismen, darunter mit einer Häufigkeit von 3% den Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) 1164C>T und mit einer Häufigkeit von 1% die Variante 993G>A. Beide Nukleotidaustausche haben keinen Einfluss auf die C/EBP α -Primärstruktur. Darüber hinaus wurde von verschiedenen Gruppen als weiterer, relativ häufiger Polymorphismus eine in-frame-Insertion von sechs Nukleotiden beschrieben, die zu einer Histidin-Prolin Duplikation (HP196-197ins) in der Transaktivierungsdomäne TAD2 führt (Wouters et al. 2007).

Allerdings scheint es auch Polymorphismen des *CEBPA*-Gens zu geben, die durchaus pathogenetische Relevanz besitzen: Olofsson et al. (2008) beschrieben eine Variante des *CEBPA*-SNP rs12691, die signifikant mit erhöhten Serum-Triglycerid-Spiegeln in Patienten mit metabolischem Syndrom assoziiert ist.

1.7 Prognostische Bedeutung von *CEBPA*-Mutationen

Mutationen im *CEBPA*-Gen werden im Allgemeinen mit einer günstigen Prognose für AML (hauptsächlich CN-AML)-Patienten in Verbindung gebracht (Preudhomme et al. 2002; Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al. 2003; Fröhling et al. 2004; Marcucci et al. 2008). Dabei scheint sich der prognostisch günstige Effekt von *CEBPA*-Mutationen auf Doppelmutationen (typischerweise zwei verschiedene Mutationen auf unterschiedlichen Allelen; s.o.) zu beschränken, während sich in den selteneren Fällen mit *CEBPA*-Einfachmutationen das klinische Outcome nicht von dem der Patienten ohne *CEBPA*-Mutation unterschied (Pabst et al. 2009; Wouters et al. 2009). Darüber hinaus wurde der positive Einfluss von *CEBPA*-Mutationen nur in AML-Patienten mit einem normalen Karyotyp und ohne *FLT3*-ITD beobachtet (Renneville et al. 2009b). Aufgrund ihrer günstigen Prognose scheinen AML-Patienten mit einer *CEBPA*-

Doppelmutation in erster Remission nicht von einer allogenen Stammzelltransplantation zu profitieren. Für diese Patientengruppe kommt daher eher eine konsolidierende Chemotherapie in Betracht (reviewed in: Marcucci et al. 2011; Burnett et al. 2011).

1.8 Besonderheiten der AML des älteren Patienten (> 60 Jahre)

Während ein besseres Verständnis molekulargenetischer Risikofaktoren und eine dementsprechend optimierte Therapie bei jüngeren AML-Patienten im Laufe der Zeit zu einem allmählichen Anstieg der Überlebensrate geführt hat, ist die Prognose für ältere Patienten (im Allgemeinen definiert als ≥ 60 Jahre) in den letzten Jahren unverändert schlecht geblieben (Kuendgen et al. 2009; Büchner et al. 2009). Dabei ist die AML typischerweise eine Erkrankung des höheren Alters: Mit 17,6 Fällen pro 100.000 liegt die Inzidenz bei ≥ 65 -Jährigen wesentlich höher als in der Population der < 65 -Jährigen mit 1,8 Fällen pro 100.000. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt bei etwa 67 Jahren (Kuendgen et al. 2009; Laubach et al. 2008). Ältere Patienten mit AML zeigen nach intensiver Chemotherapie eine wesentlich niedrigere Remissionsrate (CR), eine deutlich höhere Rückfallrate (relapse rate), und eine geringere Gesamt-Überlebenszeit (OS). So zeigte zum Beispiel eine retrospektive Analyse von fünf Studien der Southwest Oncology Group an insgesamt 968 Patienten mit AML, dass sich der Therapieerfolg altersabhängig signifikant verschlechtert: In der Gruppe der < 56 -jährigen Patienten lag die Remissionsrate bei 64% (OS: 18,8 Monate), in der Gruppe der 56- bis 65-Jährigen bei 46% (OS: 9,0 Monate), in der Gruppe der 66- bis 75-Jährigen bei 39% (OS: 6,9 Monate), und in der Gruppe der > 75 -Jährigen schließlich nur noch bei 33% (OS: 3,5 Monate) (Appelbaum et al. 2006). Bisher wird das schlechtere Outcome älterer AML-Patienten in Therapiestudien nur unzureichend verstanden; jedoch werden als mögliche Ursachen sowohl altersabhängige Unterschiede in der Tumorbilogie als auch Patienten-spezifische Faktoren (wie z.B. bestimmte Komorbiditäten) diskutiert (Laubach et al. 2008; Klepin et al. 2009). So weisen ältere AML-Patienten deutlich häufiger als jüngere Patienten prognostisch ungünstige zytogenetische Veränderungen (wie z.B. Anomalien der Chromosomen 5 und 7; komplexe Karyotypen) auf (Appelbaum et al. 2006; Farag et al. 2006). Zudem sprechen Tumorzellen von älteren Patienten aufgrund einer verstärkten Expression von Multidrug Resistance Genen (wie

MDR1) weniger gut auf Chemotherapeutika an (Leith et al. 1997; Leith et al. 1999). Darüber hinaus kommt es bei älteren Patienten im Vergleich zu jüngeren Patienten signifikant verstärkt zu einer Aktivierung bestimmter onkogener Signaltransduktionswege (darunter Ras, Src und TNF), welche mit für das schlechtere Chemotherapie (Anthracyclin)-Ansprechen und das geringere Überleben der älteren Patienten verantwortlich gemacht werden (Rao et al. 2009). Schließlich entwickelt sich in älteren Patienten häufig eine AML aus einem vorangegangenen myelodysplastischen Syndrom (MDS) (Nimer 2008; Kuendgen et al. 2009), wobei sich eine derartige sekundäre AML in der Regel als besonders resistent gegenüber einer Standard-Chemotherapie erweist (Figueroa et al. 2009).

Neben den erwähnten tumorbiologischen Faktoren sind Patienten-spezifische Faktoren von erheblicher prognostischer Bedeutung bei der AML. Dabei haben komorbide Erkrankungen sowie der physische und kognitive Funktions-Status des Patienten großen Einfluss auf den Therapieerfolg in älteren AML-Patienten (Klepin et al. 2009). In einer Studie an 133 AML-Patienten im Alter von ≥ 70 Jahren, die eine Induktions-Chemotherapie erhielten, wurde das Ausmaß an Komorbidität (modifizierter Charlson Comorbidity Index; mCCI) als unabhängiger ungünstiger prognostischer Faktor für eine komplette Remission ermittelt (Etienne et al. 2007). In einer ähnlichen Studie korrelierte ein hoher Hematopoietic Cell Transplantation-specific Comorbidity Index (HCT-CI) mit einer geringeren Überlebensrate bei älteren AML-Patienten (≥ 60 Jahre), die eine Induktions-Chemotherapie erhielten (Giles et al. 2008). Neben Komorbidität wurde auch ein schlechter physischer Funktions-Status (ermittelt mittels Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Performance Status bzw. Instrumental Activities of Daily Living (IADL)) von mehreren Gruppen als unabhängiger Risikofaktor für eine kürzere Überlebenszeit identifiziert (Appelbaum et al. 2006; Kantarjian et al. 2006; Wedding et al. 2006). Eine Analyse von prognostischen Faktoren in 2483 älteren (≥ 60 Jahre) AML-Patienten ergab, dass vor Allem die Zytogenetik des Patienten (günstige, intermediäre bzw. ungünstige Risikogruppe), in der Bedeutung gefolgt von der Leukozytenzahl, dem Alter, dem AML-Typ (de novo oder sekundäre AML) und dem WHO Performance Status, jeweils signifikant mit dem Überleben (OS) korrelierten (Wheatley et al. 2009). Durch eine gewichtete Kombination dieser fünf prognostischen Faktoren generierten die Autoren einen vereinfachten „Risiko-

Index“, der eine Einteilung von AML-Patienten in drei Risikogruppen (gute, Standard- und schlechte Überlebensprognose) ermöglicht.

Während – wie bei jüngeren Patienten – zytogenetische Veränderungen einen wesentlichen Einfluss auf das klinische Outcome älterer AML-Patienten haben (Fröhling et al. 2006), ist bislang unklar, in wie weit sich die bei den jüngeren Patienten als prognostisch relevant erwiesenen molekularen Marker auch bei älteren AML-Patienten nachweisen lassen, und ob ihnen in dieser Altersgruppe die gleiche prognostische Bedeutung zukommt.

1.9 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, im Rahmen der AMLSG 06-04 Studie in einer größeren Serie von älteren (> 60 Jahre) AML-Patienten mit normalem Karyotyp die Inzidenz von *CEBPA*-Mutationen zu untersuchen und die prognostische Bedeutung von *CEBPA*-Mutationen in dieser Patientenpopulation zu evaluieren. Dabei sollte eine detaillierte molekulare Charakterisierung der Mutationen vorgenommen und evaluiert werden, welchen Einfluss diese Mutationen auf die Funktionalität des C/EBP α -Proteins ausüben. In den Fällen, in denen Untersuchungsmaterial aus Wangenschleimhaut-Abstrichen zur Verfügung stand, sollte untersucht werden, ob die entsprechende Mutation auch in nicht-myeloischen Zellen vorkommt und somit eine mögliche Keimbahnmutation darstellt. Neben dem Auftreten von *CEBPA*-Mutationen sollte auch die Häufigkeit des *CEBPA*-Polymorphismus 993G>A in dieser Kohorte älterer CN-AML-Patienten untersucht und mit derjenigen in jüngeren Patienten verglichen werden.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Reagenzienverzeichnis

Material

Material	Hersteller
Agarose (Type I, low EEO)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agarose	Roth, Karlsruhe
AllPrep DNA/RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Blue Juice Gel loading buffer	Invitrogen, Groningen, Niederlande
DNAzol-Lösung	Gibco BRL, Eggenstein
dNTP (dATP, dTTP, dGPT, dCPT)	Roche Diagnostics, Mannheim
DyeEx 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden
DyeEx 96 Kit	Qiagen, Hilden
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (70% / 100%)	Sigma Aldrich, Seelze
Ethidiumbromidlösung	Eurobio, Courtaboeuf, Frankreich
FTA Classic Card with 4 sample areas per card	Whatman, Maidstone, UK
FTA-Purification Reagent	Whatman, Maidstone, UK
Hot Star Taq DNA Polymerase Kit	Qiagen, Hilden
HPLC-Wasser (LiChrosolv Wasser für die Chromatographie)	Merck, Darmstadt

Material	Hersteller
MicroAmp Optical 8-Cap Strip	Applied Biosystems, Darmstadt
MicroAmp Optical 8-Tube Strip (0,2 ml)	Applied Biosystems, Darmstadt
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Darmstadt
MicroAmp Reaction Tube with Cap, 0,2 ml	Applied Biosystems, Darmstadt
Natrium-Acetat	Merck, Darmstadt
Natrium-Heparin	Braun, Melsungen
Pipettenspitzen: - ohne Filter: Unitips (10µl, 200 µl, 1000µl) - mit Filter: ART Pipette Tips (10 Reach, 20P, 100E, 200, 1000)	High tech lab, Warschau, Polen Molecular Bio Products, San Diego, USA
Primer: - CF9, CR9, CR10 - CF7, CR7, CF10, CR13, CF14	MWG, Ebersberg Thermo Scientific, Ulm
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Qiagen, Hilden
Reaktionsgefäß Falcon 15 ml	Falcon-Becton Dickinson, Franklin
RNase-Free DNase Set	Quiagen, Hilden
RNase A	Roche Diagnostics, Mannheim
Safe Lock Tubes (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Skalpell (steril)	Aesculap, Tuttlingen
Sterile foam tipped applicators	Whatman, Maidstone, UK
Sterile Omni Swabs	Whatman, Maidstone, UK
Suprase-Inhibitor	Applied Biosystems, Darmstadt
TE-Puffer	
TrackIt 100 bp DNA Ladder	Invitrogen, Groningen, Niederlande

Material	Hersteller
Tris-Acetate	USB, Cleveland, USA
UVette	Eppendorf, Hamburg

Geräte

Gerät	Hersteller
Elektrophorese-Kammer und Zubehör: - Electrophoresis Power Supply 301 - Horizon 11.14 - Owl B2 EasyCast Mini Gel System	Amersham Pharmacia Biotech, München Life Technologies, Gaithersburg, USA Owl Separation Systems, Portsmouth, USA
Eppendorf Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg
Geldokumentation: Gene Genius	Syngene, Cambridge, UK
Heizblöcke: Thermomixer 5436 Aluminiumblock QBT2	Eppendorf, Hamburg Grant Instruments Ltd., Cambridge, GB
Magnetrührgerät	Heidolph, Schwabach
Mikrowelle	Siemens, München
Pipetten - Abimed Einkanalpipette (2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl) - Eppendorf Reference (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl) - Transferpipette-8 electronic	Abimed, Langenfeld Eppendorf, Hamburg Brand, Wertheim
Sequenziergeräte: ABI PRISM 310 Genetic Analyzer ABI PRISM 3130 XL Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt Applied Biosystems, Darmstadt

Gerät	Hersteller
Thermocycler: GeneAmp System 2700 GeneAmp System 2720 GeneAmp System 9700	Applied Biosystems, Darmstadt Applied Biosystems, Darmstadt Applied Biosystems, Darmstadt
Vortex-Gerät REAX 2000	Heidolph, Schwabach
Waage	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen: Heraeus Biofuge pico Heraeus Biofuge fresco Heraeus Multifuge 4 KR	Kendro Laboratory Products, Langenselbold Kendro Laboratory Products, Langenselbold Kendro Laboratory Products, Langenselbold

2.2 Patientenkollektiv und Proben

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 189 ältere Patienten (Alter über 60 Jahre) mit akuter myeloischer Leukämie und normalem Karyotyp auf das Vorliegen von Mutationen des *CEBPA*-Gens analysiert. Alle untersuchten Patienten wurden aus der prospektiven multizentrischen Phase III-Therapiestudie AMLSG 06-04 rekrutiert, nachdem bei ihnen mittels zytogenetischer und molekularzytogenetischer Methoden zentral im Referenzlabor der AMLSG ULM ein normales Karyogramm ermittelt wurde. Die Diagnose AML musste zunächst als Einschlusskriterium für jeden Studienteilnehmer jeweils morphologisch, zytochemisch und mittels Immunphänotypisierung gemäß den Kriterien der French-American-British Cooperative Group (FAB; Bennett et al. 1985) gesichert werden. Bei Diagnosestellung und Studieneinschluss wurden von jedem Patienten Proben aus Knochenmark und/oder peripherem Blut gewonnen und von den teilnehmenden Zentren an das zentrale Referenzlabor der AMLSG ULM gesendet, welches die entsprechende DNA isolierte. Zur Bestimmung der Karyotypen wurden konventionelle zytogenetische Analysen mit Hilfe der G-Bänderung durchgeführt und die ermittelten Chromosomenaberrationen nach den Richtlinien des International System for Cytogenetic Nomenclature (ISCN; Mitelman 1995)

dokumentiert. Innerhalb der 588 Personen umfassenden AMLSG 06-04-Studie (davon 562 auswertbar) wiesen 252 Patienten einen normalen Karyotyp auf, 14 hatten eine inv(16), 7 eine t(8;21) und 4 eine t(11q23). Entsprechend der zytogenetischen Risikoklassifikation des British Medical Research Council (MRC) wurden alle Patienten mit normalem Karyotyp der intermediate-risk-Gruppe zugeordnet (Grimwade et al. 1998).

Bei der AMLSG 06-04-Studie handelt es sich um eine offene, multizentrische Phase III Studie, in der alle Patienten zur Standard-Induktions- und Konsolidierungstherapie (mit hochdosiertem Cytarabin) All-trans-Retinsäure (ATRA) erhielten. Eingeschlossen wurden ältere Patienten (über 60 Jahre) mit neu diagnostizierter akuter myeloischer Leukämie. Es wurden sowohl Patienten mit de novo AML als auch Patienten mit sekundärer AML nach myelodysplastischem Syndrom (s-AML) oder nach geheiltem Primärmalignom (t-AML) aufgenommen. Die Rekrutierung erfolgte im Zeitraum vom 24.08.2004 bis zum 05.06.2008.

Alle Patienten wurden über den Charakter der Studie aufgeklärt. Gemäß der Helsinki-Deklaration lagen sowohl für die Behandlung, wie auch für die Aufbewahrung der KM- bzw. PB-Proben und deren Verwendung für Studienzwecke schriftliche Einverständniserklärungen vor.

2.3 Therapieprotokoll der Patienten

Das AMLSG 06-04-Protokoll sah zunächst eine Randomisierung der Patienten auf einen Standardarm und einen Prüfarm vor. Bei beiden Therapiearmen basierte die therapeutische Strategie auf einer intensiven Doppelinduktionstherapie, bei Erreichen einer kompletten Remission gefolgt von zwei Chemotherapie-Zyklen zur Konsolidierung. Alle Patienten bekamen über den kompletten Zeitraum der Therapie ATRA in oraler Form zugeführt. Für den Prüfarm war zusätzlich eine kontinuierliche Gabe von Valproat während der gesamten Therapiedauer vorgesehen, da erste Untersuchungen Hinweise auf eine starke Wirksamkeit auf epigenetische Regulationsmechanismen und einen synergistischen Effekt in Kombination mit ATRA gaben. In einer Zwischenauswertung der Studie im Februar 2006 zeigte sich jedoch in allen relevanten Endpunkten (Remissionsrate, ereignisfreies Überleben, Gesamtüberleben) eine Unterlegenheit des Prüfarms gegenüber dem Standardarm, so dass die Randomisation in den Prüfarm abgebrochen wurde. Von diesem Zeitpunkt an wurde die Studie einarmig

fortgeführt mit dem Ziel, den Effekt von ATRA und einer intensivierten Konsolidierung zu evaluieren. Insbesondere werden die differentiellen Krankheitsverläufe in Bezug auf das molekulare Markerprofil untersucht. Abbildung 1 gibt einen Überblick über das Therapieprotokoll der AMLSG 06-04-Studie:

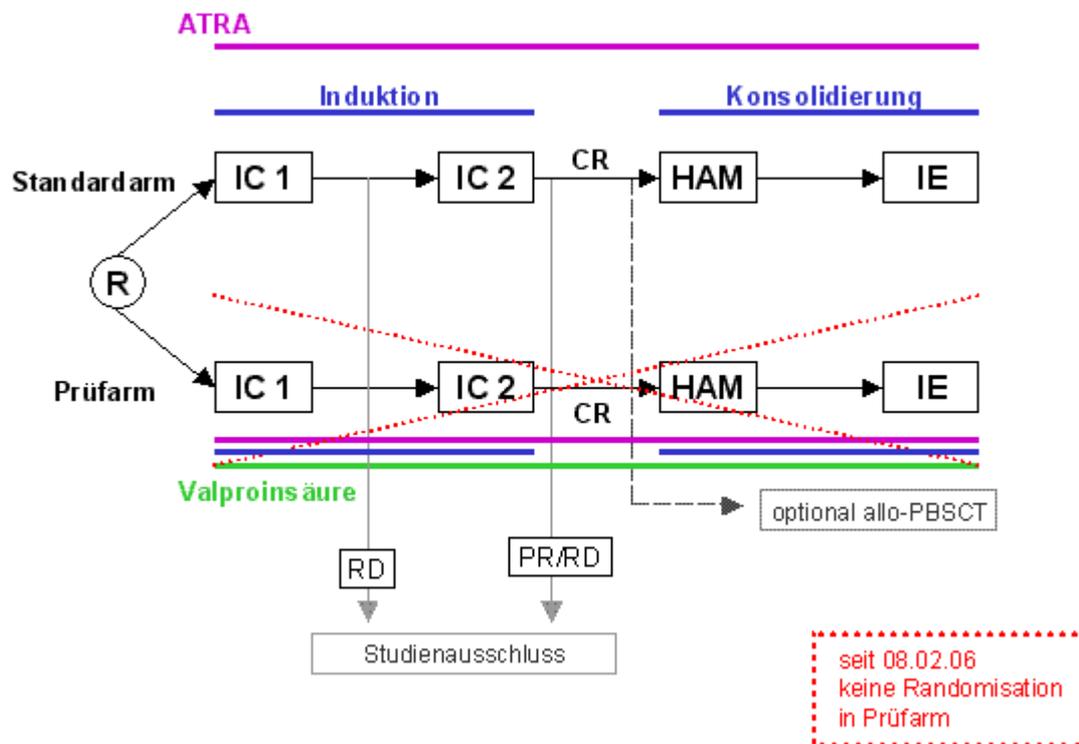


Abb. 1: Gesamttherapieplan bei AMLSG 06-04

CR: Complete Remission; IC: Idarubicin/Cytarabin (Therapie); IE: Idarubicin/Etoposid (Therapie); HAM: Hochdosis-Cytarabin-Mitoxantrone (Therapie); allo-PBSCT: Allogeneic peripheral blood stem cell tansplant (allogene periphere Blutstammzelltransplantation); PR: Partielle Remission; R: Randomisierung; RD: Resistant disease (refraktäre Erkrankung)

Bei den Patienten beider Therapiearme begann die Doppelinduktion am Tag 1 mit einem Zyklus IC (Idarubicin 12 mg/m² i.v. an Tag 1 und 3; Cytarabin 100 mg/m² kontinuierlich i.v. Tag 1 bis 5). Ab dem vierten Tag erhielten alle Patienten zusätzlich ATRA in oraler Form (Tag 4 bis 6: 45 mg/m² p.o.; Tag 7 bis 28: 15 mg/m² p.o.; jeweils verteilt auf 3 Tagesdosen). Anschließend erfolgte zwischen Tag 28 bis maximal Tag 35 eine erste Evaluation mit Blutbild, Differentialblutbild,

Knochenmarkaspirationszytologie bzw. Knochenmarkstanze. Ergab die Bewertung des Krankheitsstatus eine komplette Remission der AML (CR, d.h. keine Blasten im peripheren Blut, Blastenanteil im Knochenmark < 5%) oder eine partielle Remission (PR, d.h. Reduktion des initialen Blastenanteils im Knochenmark auf Werte zwischen 5 und 25%; bzw. – bei initialen Werten zwischen 20 und 49% – Reduktion des Blastenanteils im Knochenmark um mindestens 50%) und bestand keine Kontraindikation für eine weitere Chemotherapie, so wurde zwischen Tag 29 und 36 der zweite Zyklus der Induktionstherapie mit gleicher Chemotherapeutika-Kombination gestartet. Patienten ohne Ansprechen auf die erste Induktionstherapie und somit refraktärer Erkrankung (resistant disease, RD: Blasten-Reduktion < 50% im Knochenmark gegenüber den Ausgangswerten bzw. persistierende extramedulläre Manifestation) galten als off-study, wurden aber im Rahmen des Protokolls nachbeobachtet. Am 28. Tag nach zweiter Induktionstherapie erfolgte eine weitere Evaluation des Therapieansprechens nach den oben genannten Kriterien. Als Bedingung für die Konsolidierungstherapie im Rahmen des Protokolls wurde das Erreichen einer kompletten Remission nach Doppelinduktion vorausgesetzt. Wurde dieses Kriterium erfüllt, so konnte zwischen Tag 43 und 50 der zweiten Induktionstherapie die erste Konsolidierungstherapie gestartet werden. Patienten, die diese Anforderungen nicht erfüllten, wurden ebenfalls von der Studie ausgeschlossen. Auch sie wurden im Rahmen des Protokolls nachbeobachtet. Der erste Teil der Konsolidierung bestand aus einem Zyklus HAM (Cytarabin 0,5 bzw. 1 g/m² i.v. Tag eins bis drei, Mitoxantrone 10 mg/m² i.v. Tag 2-3). Seit April 2006 wurde die Cytarabin-Dosis von anfangs 0,5 mg/m² auf 1 g/m² verdoppelt, da Untersuchungen gezeigt hatten, dass die Behandlung mit hochdosiertem Cytarabin (definiert als kumulative Dosis von mehr als 6 g/m²) mit einem signifikant besseren rezidivfreien Überleben einhergingen. Die zweite Konsolidierungstherapie wurde nach erneuter Evaluation nach den oben genannten Parametern zwischen Tag 43 und 50 der ersten Konsolidierungstherapie gestartet. Hierbei kamen die Chemotherapeutika Idarubicin (12 mg/m² iv. Tag eins und drei) und Etoposid (100 mg/m² i.v. Tag eins bis fünf) zum Einsatz. Auch während der gesamten Konsolidierungsphase bekamen alle Studien-Patienten ATRA in oraler Form zugeführt. Falls ein HLA-identer Familienspender verfügbar war, so konnte optional eine allogene

Blutstammzelltransplantation anstelle der Postremissionstherapie durchgeführt werden.

2.4 Materialgewinnung

Peripheres Blut (PB) wurde durch Venenpunktion gewonnen, Knochenmark (KM) durch Punktion des Beckenkamms. Direkt im Anschluss an die Entnahme wurden die Proben heparinisiert (Natrium-Heparin, Verhältnis 1:10). Als Ausgangsmaterial für die Untersuchungen dienten mononukleäre Zellen, die mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen wurden:

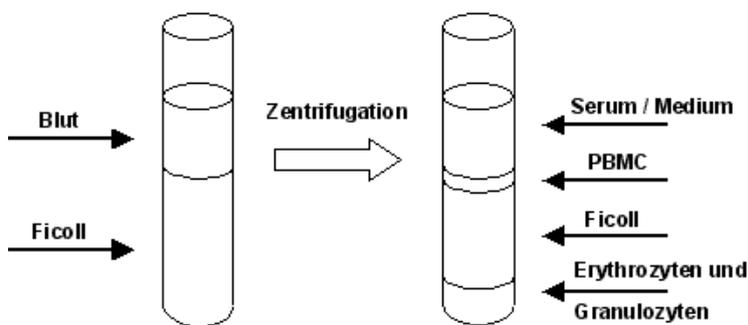


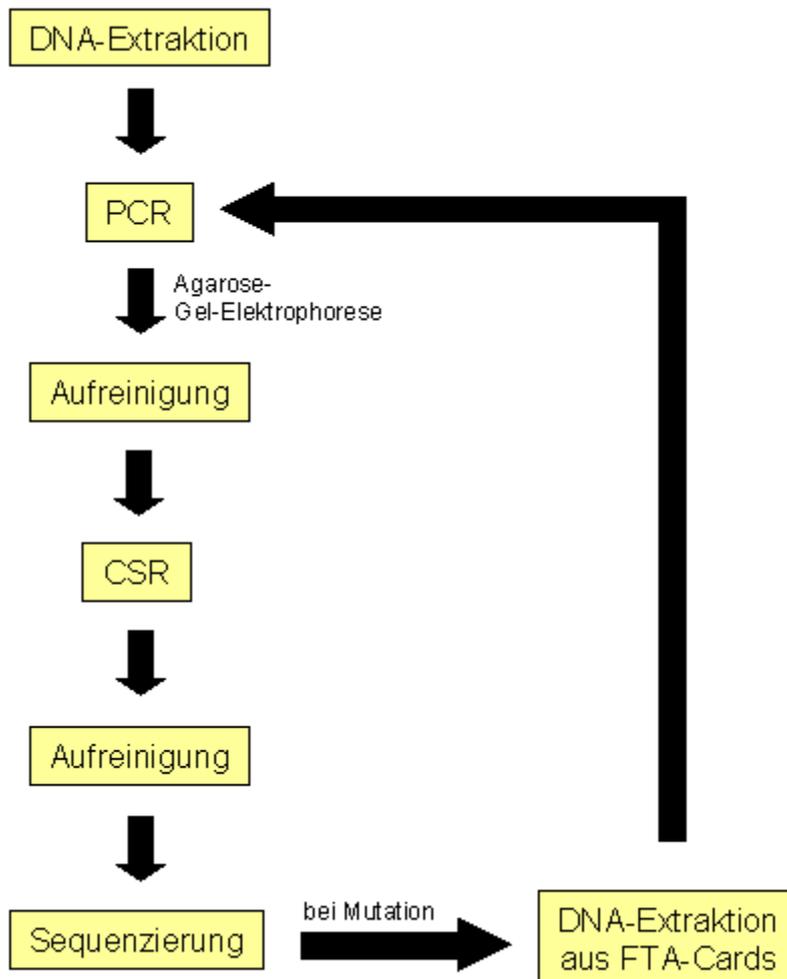
Abb. 2: Anreicherung von mononukleären Zellen mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

PBMC: Peripheral blood mononuclear cells

Ficoll Medium (Ficoll Separating Solution) hat mit 1,077 g/ml eine größere Dichte als Lymphozyten und Monozyten, jedoch eine kleinere als Erythrozyten und Granulozyten. Zur Separation wurden PB bzw. KM vorsichtig im Verhältnis 1:2 über das Ficoll-Medium geschichtet, wobei sich beide Flüssigkeitsschichten nicht vermischen sollten. Anschließend wurde das 2-Phasen-Gemisch bei 2800 U/min für 20 Minuten bei Raumtemperatur (ohne Bremse) zentrifugiert. KM bzw. PB mit hohen Leukozytenzahlen wurden zuvor in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:3 mit RPMI 1640 Kulturmedium verdünnt. Während der Zentrifugation wanderten Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten und tote Zellen auf den Boden des Röhrchens. Die mononukleären Zellen reichert sich in einer Schicht zwischen Ficoll-Medium und Plasma an und wurden mit einer sterilen Pipette abpipettiert. Im Anschluss wurden die isolierten Zellen zweimal mit je 50 ml RPMI 1640 Medium gewaschen (Zentrifugation bei 1200 U/min für 10 Minuten bei RT und mit Bremse),

um sie von Ficollresten und Verunreinigungen durch Erythrozyten und Thrombozyten zu reinigen. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer im Lichtmikroskop bestimmt. Die Archivierung der mononukleären Zellen erfolgte bei -80°C als Zellpellet mit je $5 \cdot 10^5$ bis $5 \cdot 10^7$ Zellen.

2.5 Übersicht über die angewandten Methoden



Dieses Flussdiagramm beschreibt die Abfolge der nachfolgend (in den Kapiteln 2.6 - 2.14) näher beschriebenen Methoden.

2.6 DNA-Extraktion

Die zur Mutationsanalyse benötigte DNA wurde aus den mononukleären Knochenmarkszellen bzw. peripheren mononukleären Blutzellen mit Hilfe zweier unterschiedlicher Methoden isoliert. Bis Juli 2006 erfolgte die DNA-Extraktion vorwiegend mittels DNAzol-Reagenz (Fa. Gibco BRL, Eggenstein), danach erfolgte schrittweise die Umstellung auf AllPrep DNA/RNA Mini Kits (Qiagen, Hilden).

Extraktion der DNA mittels DNAzol-Reagenz

Bei dieser Methode wurden die Zellpellets mit jeweils 2 ml DNAzol-Lösung versetzt und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren sorgfältig mit dem Reagenz vermischt. Hierdurch konnte eine Zellwandlyse herbeigeführt werden. Durch Zugabe von 2 ml 100%igem Ethanol (Sigma Aldrich, Seelze) unter kurzem Schwenken präzipitierten die DNA-Stränge zu kleinen Knäulen. Anschließend wurde dieses Gemisch in zwei Eppendorf-Tubes transferiert und 15 Minuten lang bei 13.000 U/min und 4°C zentrifugiert (Heraeus Biofuge fresco). Nach Abdekantieren des Überstandes wurde das DNA-Präzipitat zweimal mit je 1 ml 95%igem Ethanol gewaschen. Hierzu wurde das Gemisch jeweils für 10 Minuten bei 13.000 U/min und 4°C zentrifugiert und der Überstand im Anschluss abdekantiert. Nach diesem Wasch-Vorgang erfolgte ein 5-minütiger Trocknungsschritt unter inverser Lagerung der Eppendorf-Gefäße. Das Pellet wurde danach in 100-200 µl destilliertem Wasser resuspendiert und unter leichtem Schütteln bei 37°C über Nacht inkubiert (Thermomixer 5436, Eppendorf). Am nächsten Tag wurden durch kurzes Abzentrifugieren und Inkubation der resuspendierten DNA mit 5 µl RNase A für 30 Minuten bei 37°C auf einem Heizblock (Aluminiumblock QBT2, Grant Instruments) verbliebene RNA-Fragmente verdaut. Nach erneuter kurzer Zentrifugation und Durchmischung der Lösung mittels Pipette erfolgte die photometrische Konzentrationsbestimmung der extrahierten genomischen DNA (Eppendorf Bio Photometer). Abschließend wurden die Proben bis zu ihrer Verwendung im Rahmen von zyto- und molekulargenetischen Untersuchungen bei -20°C gelagert.

AllPrep DNA/RNA Mini Kit

Zur DNA-Präparation wurden folgende Kit-Bestandteile verwendet:

AllPrep DNA Mini Spin Columns
Collection Tubes (1,5 ml)
Collection Tubes (2 ml)
Buffer RLT Plus
Buffer AW1 (concentrate)
Buffer AW2 (concentrate)
Buffer EB

Bei dieser Methode wurden zunächst 600 µl RLT-Puffer-Plus mit 6 µl β-Mercaptoethanol versetzt, um ein geeignetes Denaturierungsmittel herzustellen. RLT-Puffer enthält Guanidiniumthiocyanat, welches als chaotropes Salz Wasserstoffbrückenbindungen zerstört. Das zugesetzte β-Mercaptoethanol spaltet zusätzlich Disulfidbrücken, sodass durch Kombination dieser beiden Reagenzien Zellmembranen zerstört und Proteine (und damit auch DNasen) denaturiert werden. Die bei -80°C gelagerten Zellpellets wurden in 600 µl des zuvor hergestellten RLT-Mercaptoethanol-Gemisches durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren auf Eis lysiert und auf die Shredder-Säule (QIAshredder spin column, Qiagen) gegeben. Durch 2-minütige Zentrifugation bei 13.000 U/min erfolgte eine Homogenisierung der Zellsuspension, um die durch Denaturierung entstandene hohe Viskosität herabzusetzen und die Bindungseigenschaften der DNA zu verbessern. Das entstandene Lysat wurde anschließend auf die im Kit enthaltenen AllPrep DNA spin columns pipettiert und die Säulen bei 13.000 U/min für eine Minute zentrifugiert. Die in die Säule integrierte Matrix hält hierbei die im Lysat enthaltene DNA zurück, wohingegen die RNA im Durchfluss zu finden ist.

Zur weiteren Aufbereitung der DNA wurde die Säule in ein neues Sammel tube gestellt und 500 µl AW1-Waschpuffer auf die Matrix gegeben. Dieser Puffer enthält ein chaotropes Salz, so dass Proteine denaturiert und bei der anschließenden einminütigen Zentrifugation aus der Säule gespült werden. Nach Verwerfen des Durchflusses wurde die in der Matrix gebundene DNA mit 500 µl AW2-Waschpuffer durch zweiminütige Zentrifugation gereinigt. Der AW2-Puffer auf Ethanolbasis hat die Funktion, verbliebene Salze auszuwaschen. Wiederum wurde der entstandene Durchfluss verworfen und die Säule in einem neuen

Sammeltube positioniert. Die Matrix wurde für eine Minute bei 13.000 U/min trocken zentrifugiert. Zur Elution der noch immer gebundenen DNA wurden 70 µl EB-Puffer in die Mitte der Membran pipettiert. Nach Inkubation für ein bis drei Minuten wurde die Säule nochmals für eine Minute zentrifugiert. Das Eluat enthielt nun die gereinigten Desoxyribonukleinsäuren.

Zur Überprüfung der DNA-Qualität (Ausschluss einer Degradierung) wurden im nächsten Schritt je 2 µl der präparierten DNA auf ein 2%-iges Agarose-Gel aufgetragen (siehe 2.9). Um die Konzentration und Qualität des jeweiligen DNA-Präparats zu bestimmen, wurde im Anschluss eine photometrische Messung (Eppendorf Bio Photometer) durchgeführt. Auch hier erfolgte die Lagerung der DNA bis zu ihrer Verwendung bei -20°C.

2.7 Primerbestimmung und -verdünnung

Die benötigten Primer (synthetische Oligonukleotide) wurden nach dem von Fröhling et al. (2004) beschriebenen Protokoll ausgewählt und über die Firmen MWG (Ebersberg) und Thermo Scientific (Ulm) bezogen.

Durch Verdünnung wurden aus den jeweiligen Primer-Stammlösungen fertige Gebrauchslösungen hergestellt. Zur Verwendung für die Polymerase Chain Reaction (PCR) aus genomischer DNA wurden 10 µl Stammlösung in 90 µl Aqua ad injectabilia zugegeben, um eine Gebrauchslösung der Konzentration 10 pmol/µl zu erzeugen. Für die Cycle Sequencing Reaction wurde hingegen nur eine Primer-Konzentration von 3 pmol/µl benötigt, sodass 3 µl Stammlösung mit 97 µl Aqua ad injectabilia vermischt wurden. Die verdünnten Primer-Lösungen wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.8 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Prinzip

Um Mutationen im *CEBPA*-Gen untersuchen zu können, wurde die entsprechende Gensequenz gezielt mittels PCR amplifiziert. Hierbei diente die zuvor extrahierte genomische DNA aus archivierten mononukleären Zellen als Ausgangsmaterial. Obwohl das *CEBPA*-Gen nur aus einem einzigen Exon (ohne Introns) besteht, ist die kodierende Region mit 2783 Basen zu lang für eine Amplifizierung des gesamten Genabschnitts. Aus diesem Grund wurden drei teils überlappende Primer-Paare (CF7/CR7, CF10/CR10, CF14/CR13) ausgewählt, um die für die

Mutationsanalyse relevanten Bereiche abzudecken. Das in vorangegangenen Experimenten noch verwendete vierte Primerpaar CF9/CR9 wurde im Rahmen der AMLSG 06-04-Studie nicht mehr eingesetzt, da in dem von ihm abgedeckten Gen-Abschnitt praktisch keine Mutationen auftraten. In zwei Fällen wurden jedoch die Primer CF9 und CR9 verwendet, um Mutationen in Randbereichen der regulär abgedeckten Abschnitte besser charakterisieren zu können.

Primer

Pro Patient wurden im Regelfall folgende Primerpaare für die PCR eingesetzt: CF7 und CR7; CF14 und CR13; CF10 und CR10.

Bei zwei Patienten (ID 374 und 476) wurde – zur näheren Charakterisierung der mit Hilfe der anderen Primerpaare identifizierten Mutationen – zusätzlich eine PCR mit dem Primerpaar CF9 und CR9 durchgeführt.

„F“ kennzeichnet hierbei die forward (5'→3')- und „R“ die reverse (3'→5')- Leserichtung.

Primer	Position im <i>CEBPA</i> -Gen	Primer-Sequenz
CF7	500 - 519	5'-GGCGAGCAGGGTCTCCGGGT-3'
CF14	824 - 844	5'-TGTGCTGGAACAGGTCGGCCA-3'
CF14	744 - 761	5'-GCTGGGCGGCATCTGCGA-3'
CR13	1026 - 1045	5'-CCCCGACGCGCTCGTACAGG-3'
CF9	998 - 1017	5'-CCGGCTACCTGGACGGCAGG-3'
CR9	1414 - 1441	5'-CGTTGCTGTTCTTGTCCACCGACTTCTT-3'
CF10	1312 - 1328	5'-CTCGGTGCCGCCGGCCT-3'
CR10	1706 - 1726	5'-AACCACTCCCTGGGTCCCCGC-3'

Die jeweilige Position der Primerpaare innerhalb des *CEBPA*-Gens ist in Abb. 3 dargestellt.

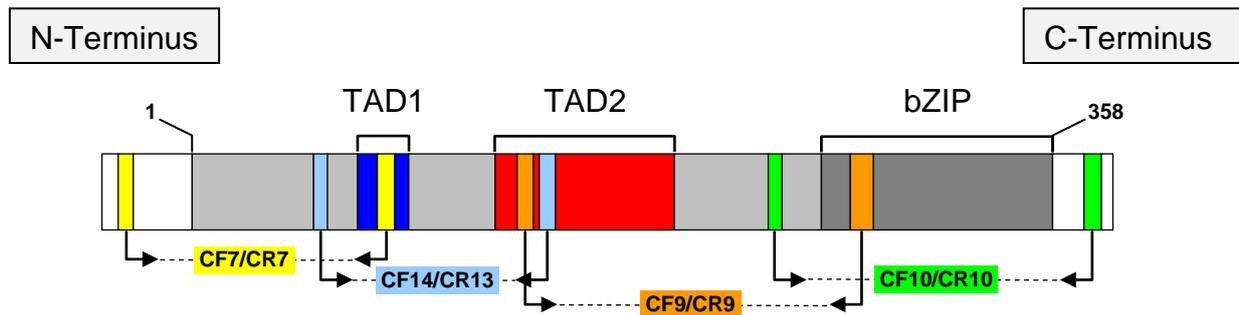


Abb. 3: Anordnung der PCR-Primer relativ zum kodierenden Bereich des CEBPA-Gens (gezeigt ist die entsprechende Aminosäuresequenz)
 Die mit Hilfe der jeweiligen Primerpaare (dünne Banden in den Farben Gelb, Hellblau, Orange und Grün kennzeichnen die Primer-Bindungsregion) amplifizierten Bereiche sind durch Pfeile und gestrichelte Linien wiedergegeben
 bZIP: Basic region leucine zipper; TAD: Transaktivierungsdomäne

Somit wurden mit den verwendeten Primern neben kodierenden Bereichen auch 92 Nukleotide der 5'-untranslatierten Region und 58 Nukleotide der 3'-untranslatierten Region erfasst (vgl. 7.1).

DNA-Polymerase und Lösungen

Zur Durchführung der PCR wurde das Hot Star Taq DNA Kit der Firma Qiagen, Hilden verwendet.

Folgende Kit-Bestandteile kamen zur Anwendung:

Hot Star Taq DNA Polymerase (5 U/μl)
10x PCR-Puffer (enthält TrisCl, KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , 15 mM MgCl ₂ , pH 8,7 bei 20°C
Q-Solution, 5x

Die HotStar Taq DNA-Polymerase ist eine modifizierte Form einer rekombinanten 94-kDa DNA-Polymerase, welche ursprünglich aus *Thermus aquaticus* isoliert wurde. Das Enzym befindet sich bei Raumtemperatur in einem inaktiven Zustand und muss vor Beginn der eigentlichen PCR zur Aktivierung für 15 Minuten bei

95°C inkubiert werden. Bei dieser hohen Temperatur wird auch die Bildung von Primer-Dimeren verhindert, ebenso wie die Entstehung von unspezifischen PCR-Produkten bei niedrigeren Temperaturen.

Der eingesetzte PCR-Puffer dient der möglichst spezifischen Primer-Bindung auch im Rahmen eines breiteren Spektrums von Annealing-Temperaturen. Durch den Einsatz von Q-Solution wird das Schmelzverhalten der DNA verändert. Hierdurch kann ein besseres Ergebnis bei GC-reichen Templates sowie bei der Amplifizierung von DNA-Strängen mit ausgeprägter Sekundärstruktur erzielt werden.

Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen

Jeder PCR-Ansatz von insgesamt 50 µl enthält:

- 30,5 µl Aqua destillata
 - 10 µl Q-Solution
 - 5 µl 10x PCR-Puffer
 - 1 µl dNTP
 - 1 µl Forward-Primer-Lösung
 - 1 µl Reverse-Primer-Lösung
 - 0,5 µl Hot Star Taq DNA
 - 1 µl genomische DNA
- } Master-Mix

Pro hergestelltem Master-Mix wurde jeweils ein Ansatz ohne Zugabe von DNA als Negativkontrolle mitgeführt. Die Herstellung der Reaktionsansätze erfolgte auf Eis, um so eine möglichst gute Funktionsfähigkeit der Taq-Polymerase zu erhalten und eine Degradation von DNA zu verhindern.

Der fertige Ansatz wurde zügig in einen Thermocycler (GeneAmp System 2700 / 2720 / 9700, Applied Biosystems) transferiert und die DNA nach folgendem Protokoll amplifiziert:

1. initiale verlängerte Denaturierung	95°C	15 Minuten
2. Denaturierung	94°C	1 Minute
3. Annealing	68°C	3 Minuten
4. Synthese (Elongation)	68°C	3 Minuten
5. Kühlung bis zur Weiterverarbeitung	4°C	

Die Schritte 2-4 wurden für 35 Zyklen wiederholt. Bei Proben, die mehrfach in ihrer Sequenz nicht auswertbar waren, sowie bei der Verwendung von DNA-Material aus FTA-Cards, wurde die Zyklen-Anzahl auf 40 erhöht.

2.9 Agarose-Gel-Elektrophorese

Im Anschluss an die PCR wurden jeweils 8 µl der entstandenen Produkte elektrophoretisch aufgetrennt. Diese Methode diente zum einen der Kontrolle, ob der gewünschte Genabschnitt auch tatsächlich amplifiziert wurde. Zum anderen konnte hiermit auch eine akzidentelle Verunreinigung des PCR-Ansatzes mit relevanten Mengen von Fremd-DNA-Material ausgeschlossen werden.

Herstellung des Agarose-Gels

Folgende Materialien wurden hierfür verwendet:

TAE-Puffer, 1x <ul style="list-style-type: none">- 0,04 mol/l Tris-Acetat, 0,001 mol/l EDTA, pH 8,0- Lagerung bei Raumtemperatur
Agarose <ul style="list-style-type: none">- Lagerung bei Raumtemperatur
BlueJuice Gel Loading Buffer, 10x <ul style="list-style-type: none">- 65% Saccharose, 10 mmol/l Tris-HCl (pH 7.5), 10 mmol/l EDTA, 0.3% Bromphenol-Blau- Lagerung bei 4°C
TrackIt 100 bp DNA Ladder <ul style="list-style-type: none">- enthält 16 verschiedene Längen stumpf endender DNA-Fragmente: 15 Vielfache von 100 Basenpaaren (⇒100 -1500 bp) sowie ein Fragment der Länge 2072 bp- Lagerung bei 4°C

In einem Erlenmeyerkolben wurden 150 ml TAE-Puffer mit 3 g Agarose unter Schwenken vermischt für ca. eine Minute in der Mikrowelle aufgekocht. Anschließend wurde die erhitzte Mischung für etwa 10 Minuten mit Hilfe eines Magnet-Rührgerätes verrührt und leicht abgekühlt. Nach Fixierung der Kämme in den Schlitten der Elektrophorese-Kammer wurde das noch flüssige Gel gleichmäßig eingefüllt. Nach Abkühlen für einige Minuten bei Raumtemperatur

entstand eine feste, transparente Gelmatrix, aus der die Kämme vorsichtig herausgezogen wurden.

Auftragen der Proben und Elektrophorese

In einer 96-well Platte wurden jeweils 8 µl des entsprechenden PCR-Produktes mit 2 µl Blue Juice durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Dieser Puffer erhöht die Dichte der Proben und verhindert so das Auslaufen der DNA-Lösung aus den Geltaschen. Das fertige Agarose-Gel wurde auf einem Schlitten in die mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer gehängt. Die mit Lade-Puffer vermischten PCR-Produkte wurden vorsichtig in die Geltaschen eingefüllt, wobei jeweils die erste und letzte Tasche unbesetzt blieb. Hierhin wurden jeweils 4 µl der TrackIt 100-bp DNA Ladder pipettiert, um so später die Länge der aufgetrennten DNA-Fragmente bestimmen zu können. Pro Master-Mix wurde jeweils eine Negativkontrolle (siehe 2.8) aufgetragen, um eine etwaige Kontamination mit Fremd-DNA auszuschließen. Die Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 120 V und bei einer Stromstärke von 500 mA innerhalb von 30-40 Minuten.

Fotographieren des Gels

Zur Detektion der Nukleinsäuren wurden die Gele 15 bis 20 Minuten in einem Ethidiumbromid-Bad (1 µg/ml) inkubiert. Durch anschließendes Spülen des Gels mit Wasser wurde das überschüssige Ethidiumbromid entfernt und dadurch der Kontrast gesteigert. Die DNA konnte aufgrund der Fluoreszenz des interkalierenden Ethidiumbromids mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die charakteristische Bandenanordnung der amplifizierten Fragmente wurde mittels eines UV-Transluminator-Systems (Gene Genius, Syngene) fotografisch dokumentiert. Die Größe der erwarteten Wildtyp-*CEBPA*-Banden variierte – abhängig vom verwendeten Primer-Paar – zwischen 301 und 443 Basenpaaren.

2.10 Aufreinigung der PCR-Produkte

Nur die PCR-Amplifizierungs-Produkte, die in der Elektrophorese die erwartete Bande gezeigt hatten, wurden anschließend mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt. Dieses Kit dient der Aufreinigung von Einzel- oder Doppelstrang-PCR-Produkten der Größe 100 bp bis 10 kb.

Das Kit enthält folgende Komponenten:

- QIAquick Spin Columns
- Buffer PBI
- Buffer PE (Konzentrat)
- Buffer EB
- Collection Tubes (2 ml)

Da es sich bei dem PE-Puffer um ein Konzentrat handelt, wurden vor Gebrauch jeweils 55 ml der Ausgangslösung mit 220 ml 100%igem Ethanol versetzt.

Prinzip

In Anwesenheit einer hohen Konzentration an chaotropen Salzen, welche die Struktur von Wasser modifizieren, sowie eines pH-Wertes $< 7,5$, bindet DNA effektiv an eine Silikagel-Membran (Adsorption). Kontaminierungen wie Primerreste, ungebundene Nukleotide, Enzyme und Salze fließen hingegen ungehindert durch die Gelmatrix der Säule. Die anschließende DNA-Elution (Desorption) findet am effizientesten in einem basischen Milieu und bei geringen Salz-Konzentrationen statt. Die jeweils optimalen Bedingungen werden durch die Verwendung von Puffern mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen und pH-Werten erreicht.

Praktische Durchführung

Vorbereitend wurden die QIAquick-Aufreinigungssäulen in die zugehörigen Sammel-Tubes gesteckt. Im Anschluss wurden 200 μ l des bei einem optimalen pH-Wert (pH $< 7,5$) gelb gefärbten Bindungspuffers PB mit 50 μ l des PCR-Produktes durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt. Das entstandene Gemisch wurde auf die jeweilige Säule aufgetragen und anschließend für 60 Sekunden bei 13.000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss, der ungebundene Primer sowie andere Verunreinigungen enthielt, wurde verworfen. Danach wurden 700 μ l PE-Puffer auf die Gel-Matrix gegeben und ein erneuter einminütiger Zentrifugationsschritt bei 13.000 U/min durchgeführt. Der Ethanol-haltige Puffer wäscht besonders effektiv Salze aus der Membran. Um eine Interferenz mit nachfolgenden Enzym-Reaktionen auszuschließen, wurden Puffer-Reste besonders gründlich durch eine zweite Zentrifugation entfernt. Anschließend wurden die Säulen jeweils in ein Eppendorf-Tube (1,5 ml) mit abgeschnittenem Deckel transferiert. Um die gebundene DNA zu eluieren, wurden nun 30 μ l des

basischen EB-Puffers in die Mitte der Silikagel-Säule pipettiert. War im Agarose-Gel lediglich eine schwache DNA-Bande zu erkennen, so wurde durch Verwendung von lediglich 10 µl Elutions-Puffer eine Aufkonzentrierung vorgenommen. Nach Inkubation für eine Minute wurde ein weiteres Mal für 60 Sekunden mit 13.000 U/min zentrifugiert. Im daraufhin entstanden Durchfluss befand sich die aufgereinigte DNA. Das Eluat wurde in eine neues 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt und bis zu seiner weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.11 Cycle Sequencing Reaction (CSR)

Prinzip

Bei der CSR handelt es sich um eine vor dem eigentlichen Sequenzierungs-Schritt stattfindende lineare PCR-Amplifikation. Der Primer bindet an das 3'-Ende der Einzelstrang-DNA, und die Polymerase synthetisiert den komplementären DNA-Strang. Im Gegensatz zur klassischen PCR wird nur ein Primer verwendet, sodass die Amplifizierung nur entweder in forward- oder in reverse-Richtung erfolgt. Zusätzlich werden dem Reaktionsansatz jedoch neben den regulär eingesetzten dNTPs auch noch 4 verschiedene Didesoxynukleosidtriphosphate (2'3'-ddNTPs) zugefügt, welche abhängig von ihrem Nukleosid mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Aus diesem Grund baut die Polymerase nach dem Zufallsprinzip ddNTPs statt dNTPs ein. Dies führt zu einem Abbruch der Elongation, da an einem Didesoxynukleosid kein freies 3'-OH für die weitere Polymerisation zur Verfügung steht. Wird das korrekte Verhältnis von ddNTPs zu dNTPs eingesetzt, so entsteht nach einigen Zyklen eine Vielzahl unterschiedlich langer DNA-Fragmente, die sich insgesamt in ihrer Länge jeweils um ein Nukleotid unterscheiden und mit dem jeweiligen fluoreszenzmarkierten A, T, C oder G enden (Sanger et al. 1977). Nach elektrophoretischer Auftrennung der Fragmente kann auf diese Weise die Basensequenz des zu untersuchenden Genabschnittes mittels eines automatischen Sequenziergerätes ermittelt werden (siehe 2.13).

Primer

Pro Reaktionsansatz wurde jeweils nur ein Primer zugesetzt. Bei der Herstellung der fertigen Gebrauchslösungen wurden die gleichen Primer-Stammlösungen (CF7, CR7, CF14, CR13, CF9, CR9, CF10, CR10) verwendet, wie sie auch bei

der PCR verwendet wurden, jedoch reichte für die Benutzung bei der CSR eine Primer-Konzentration von 3 pmol/µl aus.

Lösungen

Folgende Bestandteile des BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystems wurden für die Durchführung des verwendeten CSR-Protokolls benötigt:

ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix ("Big Dye"): A-Dye Terminator labeled with dichloro [R6G] (ddATP, grün markiert) C-Dye Terminator labeled with dichloro [ROX] (ddCTP, rot markiert) G-Dye Terminator labeled with dichloro [R110] (ddGTP, blau markiert) T-Dye Terminator labeled with dichloro [TAMRA] (ddTTP, schwarz markiert) dNTPs: dATP, dCTP, dITP, dUTP Ampli Taq DNA Polymerase, FS MgCl ₂ Tris-HCl Puffer, pH 9,0 ➔ Lagerung bei -20°C
BigDye Terminator v.1.1 Sequencing Buffer (5x) ➔ Lagerung bei 4°C

Reaktionsansatz und CSR-Bedingungen

Verwendung von Einzel-Tubes (MicroAmp Reaction Tube; 0,2 ml):

Jeder Reaktionsansatz von 20 µl enthielt bei diesem Vorgehen:

4,0 µl Big Dye

13,0 µl HPLC-Wasser

1,0 µl F- oder R-Primerlösung (3 pMol)

2,0 µl Template (entspricht aufgereinigtem PCR-Produkt aus 2.10)

Verwendung von Platten (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate):

Bei dieser Variante wurde ein leicht verändertes Protokoll angewandt:

2,0 µl Big Dye

9,3 µl Aqua destillata

1,7 µl BigDye Terminator v.1.1 Sequencing Buffer (5x)

1,0 µl F- oder R-Primerlösung (3 pMol)

1,0 µl Template (siehe 2.10)

Durch den Einsatz von BigDye Terminator v.1.1 Sequencing Buffer konnten die Reaktionsbedingung soweit optimiert werden, dass pro Ansatz nur noch die Hälfte des relativ kostspieligen Big Dyes benötigt wurde.

Insbesondere aufgrund der Wärmeinstabilität des Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix erfolgte auch hier die Herstellung des Reaktionsansatzes unter Kühlung auf Eis.

CSR-Programm

Der fertige Ansatz wurde wiederum zügig in einen Thermocycler (GeneAmp System 2700 / 2720 / 9700, Applied Biosystems, Darmstadt) überführt und die DNA nach folgendem Programm amplifiziert:

1. initiale verlängerte Denaturierung	96 °C	45 Sekunden
2. Denaturierung	96 °C	15 Sekunden
3. Annealing	54 °C	10 Sekunden
4. Synthese (Elongation)	60 °C	4 Minuten
5. Kühlung bis zur Weiterverarbeitung	4 °C	unendlich

Die Schritte 2 bis 4 wurden in 30 Zyklen wiederholt. Bis zu ihrer weiteren Verarbeitung wurden die CSR-Produkte bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Um die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe vor Lichteinfall zu schützen, wurden die Proben in Aluminiumfolie verpackt.

2.12 Aufreinigung der CSR-Produkte

Nach erfolgter CSR wurde der Sequenzieransatz mit Hilfe des DyeEx Prinzips (Qiagen, Hilden) von nicht in die amplifizierten DNA-Stränge integrierten fluoreszenzmarkierten Dye-Terminatoren (ddNTPs) gereinigt. In Abhängigkeit von der Vorgehensweise bei der CSR (Verwendung von Einzel-Tubes oder von Platten) kam entweder das DyeEx 2.0 Spin Kit oder das DyeEx 96 Kit zum Einsatz.

Das DyeEx 2.0 Spin Kit für Einzel-Tubes enthält folgende Materialien:

DyeEx Spin Columns (Einzel-Säulen)
Collection Tubes (Auffanggefäße), 2 ml

Für die Aufreinigung von CSR-Produkten in 96-well Platten wurden die nachstehenden Bestandteile des DyeEx 96 Kits benötigt:

DyeEx 96 Plates (Aufreinigungsplatten)
Collection Plates (Auffangplatten), 48 well

Prinzip

Die DNA-Aufreinigung mittels DyeEX Spin Kit beruht auf dem Prinzip der Gelchromatographie, bei der eine Auftrennung von Makromolekülen allein nach ihrer Molekülmasse mit Hilfe des gequollenen Netzwerks eines granulierten Gels erzielt wird. Während die kleinen Einzelmoleküle der Dye-Terminators tief in die Poren des Gels diffundieren und hier zurückgehalten werden, überschreiten die größeren DNA-Fragmente den Porendurchmesser des Gels und wandern an den Gelkörnern entlang. Die aufgereinigte DNA befindet sich schließlich im Durchfluss.

Praktische Durchführung

Verwendung von DyeEx Spin Columns

Bei diesem Vorgehen wurden zunächst durch Vortexen die festen Bestandteile des in der DyeExSpin Column befindlichen Gel-Flüssigkeits-Gemisches resuspendiert. Anschließend wurden die Deckel der Säulen durch eine Vierteldrehung gelockert und die Boden-Verschlüsse abgedreht. Die auf diese Weise präparierten Säulen wurden in Auffang-Tubes gesetzt und bei 3000 U/min für 3 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses enthielten die Spin Columns nun eine feste Gel-Matrix und wurden in ein neues Auffanggefäß überführt. Das gesamte Volumen des zuvor gewonnenen CSR-Produktes wurde in die Mitte des Gels pipettiert und die Säulen erneut für 3 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Durchfluss in ein 0,5-ml Eppendorf-Tube transferiert und bis zur endgültigen Sequenzierung bei -20°C gelagert.

Verwendung von DyeEx 96 Plates

Nach Ablösen der Metallfolien von Ober- und Unterseite der DyeEx 96 Plate wurde diese auf der 48-well Auffangplatte platziert und für 7 Minuten bei 2350 U/min (Bremse 5) zentrifugiert. Anschließend wurde der entstandene Durchfluss verworfen und die DyeEx Platte mit den nun festen Gel-Matrices auf eine passende 96-well Elutions-Platte gelegt. Mit Hilfe einer 8-fach Multipipette

(Transferpette-8 electronic, Brand, Wertheim) wurden die zuvor hergestellten CSR-Produkte langsam in die Mitte des jeweiligen Gelbetts pipettiert. Im Anschluss wurde die DyeEx Platte mit anhängender Elutionsplatte erneut für 3 Minuten bei gleichbleibenden Bedingungen zentrifugiert. Das die gereinigte DNA enthaltende Eluat wurde in eine 96-well Platte (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, Darmstadt) übertragen und bis zu seiner weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.13 Sequenzierung

Prinzip

Nach einer Hitze-Denaturierung werden die mittels CSR synthetisierten, unterschiedlich langen DNA-Einzelstränge in einer Polymer-gefüllten Glaskapillare elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Oligonukleotide auf ihrem Weg von der Anode zur Kathode an einem Argon-Ionen-Laserstrahl vorbei, der die Fluoreszenzfarbstoffe der jeweiligen Didesoxynukleoside anregt. Die emittierten Fluoreszenz-Signale werden über eine Charge-Coupled-Device-Kamera detektiert und die daraus ermittelten Rohdaten mittels einer Computer-Software in eine graphische Darstellung konvertiert. Da jeder Fluoreszenzfarbstoff ein ganz bestimmtes Nukleotid widerspiegelt, kann die entstandene Folge von Fluoreszenz-Peaks als Basen-Sequenz des jeweiligen Gen-Abschnittes interpretiert werden.

Praktisches Vorgehen

Der eigentliche Sequenziervorgang zur Bestimmung der Basenabfolge der amplifizierten DNA-Abschnitte wurde mit Hilfe eines automatischen Sequenziergerätes (ABI PRISM 310 bzw. 3130 XL Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Hierbei kamen folgende Materialien bzw. Geräte zum Einsatz:

Genetic Analyzer Buffer (10x) mit EDTA (Applied Biosystems, Darmstadt)
POP-6: Performance Optimized Polymer 6% (Applied Biosystems, Darmstadt)
HPLC-Wasser: LiChrosolv-Wasser für die Chromatographie (Merck, Darmstadt)
Kapillare: 310 bzw. 3130 XL Genetic Analyzer 47 cm x 10 µm Capillaries (Applied Biosystems, Darmstadt)
Heizblock: Aluminiumblock QBT2 (Grant Instruments Ltd., Cambridge, GB)

Computer: Power Macintosh 7500/100 (Apple Computer, Ismaning)
Software: ABI PRISM DNA Sequencing Analysis Software Version 3.4 (Applied Biosystems, Darmstadt)

Die bei der CSR gewonnenen Produkte wurden aufgetaut und zu Denaturierungszwecken für 2 Minuten bei 95°C auf dem Heizblock erhitzt. Bei der Verwendung von Einzeltubes (0,5 ml) mussten die Deckel der Reaktionsgefäße abgeschnitten und durch spezielle Sequenzier-Deckel ersetzt werden. Alle Gerätefunktionen des Sequenzierers wurden auf Ausgangsposition eingestellt. Der im Verhältnis 1:10 mit HPLC-Wasser verdünnte Sequenzierpuffer, sowie auch reines HPLC-Wasser, wurde in die dafür vorgesehenen Gefäße gefüllt. Nach Aufziehen von POP-6 in die Geräte-Spritze erfolgte auch die Auffüllung des Blocks mit diesem Polymer. Vor dem Start jedes Sequenzier-Durchgangs wurde ein neues Sequence Sample Sheet sowie eine Sequence Injection List erstellt. Die anschließend gestarteten Läufe wurden mit einer Injektionszeit von 20 Sekunden und bei einer Temperatur von 50°C durchgeführt. Für die Rohdaten-Auswertung und Konversion in eine Graphik-Datei wurde das Computerprogramm ABI PRISM DNA Sequencing Analysis Software Version 3.4 verwendet.

Zur Identifizierung von *CEBPA*-Mutationen wurde die Basenfolge jeder Probe mit einer Wildtyp-Sequenz (siehe 7.1) verglichen.

Interpretation des Ergebnisses auf Proteinebene

Mit Hilfe eines Programms des NCBI (National Center for Biotechnology Information) zur Detektion offener Leseraster (ORF Finder) wurden kodierende Sequenzen innerhalb der Nukleotidsequenz des *CEBPA*-Gens ermittelt. Der Open Reading Frame Finder ist ein Analyse-Werkzeug, welches alle sechs möglichen Leseraster eines DNA-Doppelstranges mit einer selektierbaren minimalen Länge innerhalb einer eingegebenen Nukleotidsequenz findet. Diese Software ist über die Homepage des NCBI zugänglich (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Die Auswirkungen der *CEBPA*-Mutationen auf das C/EBP α -Protein wurden auf diese Weise theoretisch abgeleitet. Als Referenz diente die GenBank *CEBPA*-Nukleotidsequenz U34070.1 (siehe Anhang 7.1), durch deren Eingabe in den ORF Finder die Aminosäuresequenz des Wildtyp-Proteins abgeleitet wurde: Die Translation des offenen Leserahmens +1 zwischen den Nukleotiden 592 und 1668 ergab ein Wildtyp-C/EBP α -Protein von 358 Aminosäuren Länge (siehe 7.2). Nach

Anwendung der ORF Finder Funktion auf die durch Mutation veränderte Nukleotidsequenz konnten durch Vergleich mit der Referenzsequenz Veränderungen auf Proteinebene detektiert werden.

2.14 FTA-Cards

Prinzip

FTA-Karten wurden zur Sammlung, zum Transport, zur Archivierung und zur Aufreinigung von Nukleinsäuren bei Raumtemperatur entwickelt, sowie zur anschließenden PCR-Analyse. Sie sind mit einer Reagenzmischung beschichtet, welche Zellmembranen lysiert und Proteine denaturiert. Auf diese Weise werden Nukleinsäuren aus den Zellen freigesetzt und an den Cellulose-Fasern der Kartenmatrix immobilisiert. DNA-protective Chemikalien schützen die Nukleinsäuren vor UV-Schäden. Mikrobielle Kontamination und Pilzbefall werden durch Inaktivierung von in der Probe enthaltenen infektiösen Erregern bei Applikation auf die FTA-Karte verhindert. Nach Auftragen des zu analysierenden Materials sowie Lufttrocknung können kleine Proben-Plättchen entnommen werden. Durch mehrmalig durchgeführte Waschkvorgänge können Zell-Debris und Inhibitoren nachgeschalteter Analysen entfernt werden, wohingegen die DNA im feinen Cellulose-Netzwerk der FTA-Matrix zurückgehalten wird und als Template bei der PCR-Analyse eingesetzt werden kann.

Material

Whatman FTA Karten CLASSIC mit Farbindikator
Whatman FTA-Purification Reagent (Aufreinigungsreagenz)
TE Puffer, pH 8,0 10 mM Tris-HCl 0,1 mM EDTA
Whatman sterile foam tipped applicator (Schwammapplikator)
FTA Tasche MAXI
Desiccant packs (Trockenmittelbeutel)

Wangenschleimhautabstriche und Applikation auf FTA-Karten

Zum Sammeln und Auftragen bukkaler Zellproben wurde zunächst die FTA-Karte mit der jeweiligen Probenbezeichnung versehen. Der Schwammapplikator wurde

in den geöffneten Mund des Patienten eingebracht und mit dem Schwammkopf für ca. 30 Sekunden an jeder Wangeninnenseite mit leichtem Druck gerieben. Der Applikatorkopf wurde auch entlang des Zahnfleisches und unter die Zunge geführt, um hierbei möglichst viel Speichelflüssigkeit aufzunehmen. Anschließend wurde der Schwammkopf des Applikators mit seiner flachen Oberfläche innerhalb der rosaroten Probenkreise der FTA-Karte ausgedrückt bis das Feld vollständig durchtränkt war und der Indikator eine weiße Färbung zeigte. Die auf FTA-Karten aufgetragenen Proben wurden bis zur weiteren Verwendung kühl in einer Multi-Barrier-Tasche mit einem Trockenmittel archiviert.

Vorbereitung eines FTA-Plättchens für die DNA-Analyse

Mit Hilfe eines Einmalskalpells wurden pro benötigtem PCR-Template jeweils ca. 1 mm² des Probenfeldes der FTA-Karte ausgeschnitten und in ein 1,5 ml-Eppendorf-Tube transferiert. Anschließend wurden 200 µl FTA-Aufreinigungsreagenz hinzugefügt und die FTA-Plättchen durch kurzes Vortexen von der Wandung des Tubes gelöst. Der durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 13.000 U/min erhaltene Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Dieser Waschschrift wurde zweimal mit jeweils 200 µl FTA-Reagenz wiederholt. Anschließend wurde die DNA-Probe auf die gleiche Weise zweimal mit je 200 µl TE-Puffer gereinigt. Nach dem letzten Abpipettieren der Waschlösung wurden die FTA-Plättchen in einem offenen Eppendorf-Tube für etwa 30 Minuten bei Raumluft getrocknet. Danach konnte das Plättchen mit der enthaltenden DNA direkt als Template für eine PCR eingesetzt werden.

PCR der Keimbahn-DNA

Die Amplifikation der Keimbahn-DNA erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie unter 2.8 beschrieben, mit Ausnahme der Zyklenzahl, die von 35 auf 40 Zyklen erhöht wurde. Auch die weiteren Schritte erfolgten analog dem Vorgehen bei der Analyse somatischer DNA.

2.15 Statistische Auswertungen

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf dem experimentellen Nachweis von Mutationen des *CEBPA*-Gens in der Population der über 60 Jahre alten AML-Patienten im Rahmen der AMLSG 06-04-Studie. Da jedoch v.a. auch die Inzidenz und prognostische Bedeutung dieser Genmutationen betrachtet werden sollten,

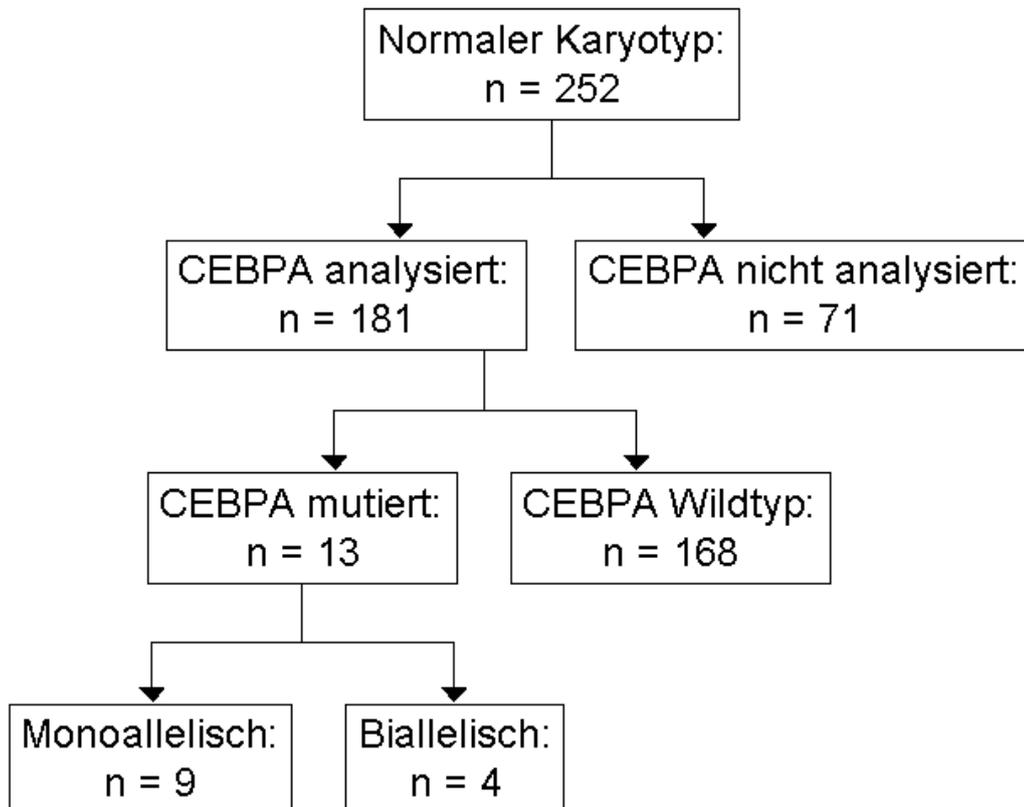
wurde auf statistische Analysen zurückgegriffen, die in der Studienzentrale der AMLSG unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Schlenk durchgeführt wurden. In die Analysen wurden alle bis Juni 2008 verfügbaren Patientenproben und -daten einbezogen. Hierbei wurde das primäre Studienziel „Verbesserung des ereignisfreien Überlebens“ konfirmativ analysiert, wobei zweiseitige Tests mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ verwendet wurden. Die Analyse aller übrigen Parameter erfolgte deskriptiv bzw. explorativ. Es wurde keine Adjustierung des Signifikanzniveaus in Hinblick auf eine Multiplizität der Analysen durchgeführt. Vorrangig kamen zweiseitige Tests zur Anwendung. Bei der Endauswertung für die primäre Zielgröße „Ereignisfreies Überleben“ wurden multivariable Analysen mittels des Proportional Hazards-Regressionsmodells durchgeführt. Vor Beginn der Therapie wurden demographische, laborchemische, zytogenetische, molekulargenetische und epigenetische Ausgangswerte erhoben und bei der Auswertung tabellarisch dokumentiert. Der Patientenanteil mit kompletter Remission nach Induktionstherapie wurde mit exakten 95%-Konfidenzintervallen dargestellt. Es erfolgte eine Aufführung aller unerwünschten Ereignisse, die nach Therapiebeginn auftraten. Des Weiteren wurden auch alle vorbestehenden pathologischen Untersuchungsbefunde, die während und nach Therapie an Intensität zunahmen, als unerwünschte Ereignisse gewertet. Die Anzahl und der Anteil an Patienten mit unerwünschten Ereignissen, unerwünschte Ereignisse im Zusammenhang mit der Studienmedikation und pathologische Laborwerte wurden nach NCI CTC Version 3.0 kategorisiert und visualisiert.

Bei den Analysen der sekundären Studienziele kamen Fisher's exakter Test, logistische Regression, Cox Regression, Log-rank-Test und k-sample Tests zum Vergleich kumulativer Inzidenzen zum Einsatz.

3 Ergebnisse

3.1 Inzidenz von *CEBPA*-Mutationen

Das folgende Flussdiagramm gibt einen Überblick über das hier untersuchte Patientenkollektiv:



Von den insgesamt 181 untersuchten älteren AML-Patienten mit normalem Karyotyp wiesen 13 (7,2%) eine *CEBPA*-Mutation auf.

Bei vier dieser Patienten (30,8%; entsprechend 2,2% der untersuchten Patientenpopulation) wurden biallelische *CEBPA*-Mutationen gefunden (ein Patienten mit homozygoter biallelischer Mutation, drei Patienten mit jeweils zwei verschiedenen *CEBPA*-Mutationen).

Keiner der Patienten zeigte mehr als zwei Mutationen des *CEBPA*-Gens.

Die folgenden Abbildungen zeigen jeweils ein Beispiel für *CEBPA*-Einfachmutation (Patient 128), eine *CEBPA*-Doppelmutation (Patient 421), sowie eine homozygote (biallelische) *CEBPA*-Mutation (Patient 305).

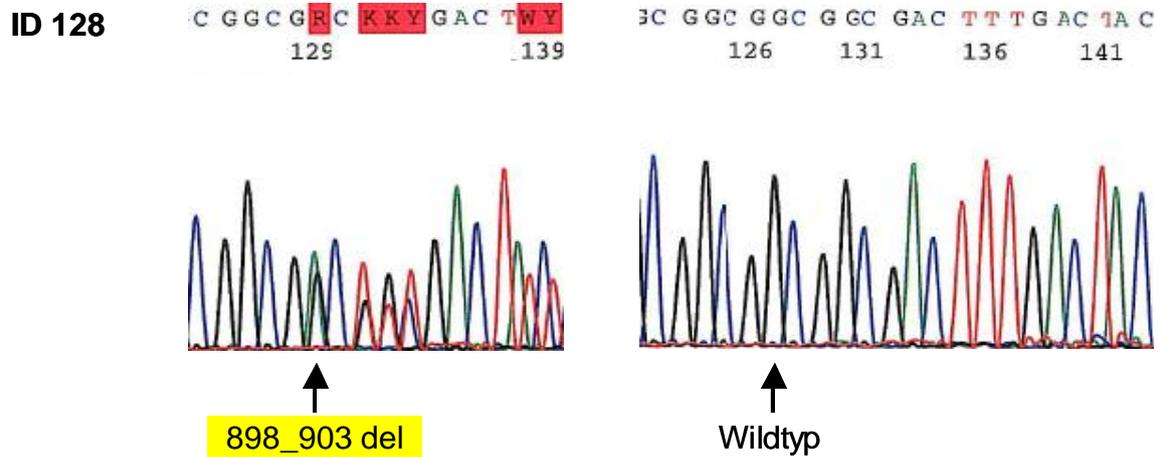


Abb. 4a: Ausschnitt aus der Gensequenz des Patienten 128 mit einer *CEBPA*-Einfachmutation, bestehend aus der N-terminalen in-frame-Mutation 898_903 del

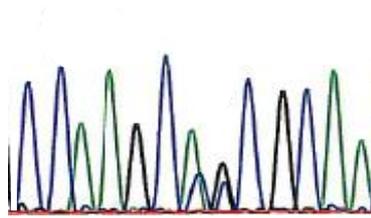
Zum Vergleich ist neben der mutierten Gensequenz rechts die Wildtyp-Sequenz des gleichen Genabschnitts dargestellt. Neben der mutierten Gen-Sequenz lässt sich bei diesem Patienten auch die Wildtyp-Sequenz nachweisen, d.h. nur ein Allel trägt die Mutation.

898_903 del: Deletion der Nukleotide 898-903 der Wildtyp-*CEBPA*-Gensequenz (vgl. 7.1).

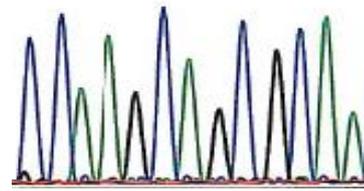
ID 421

C CAAGC **M**S C GCAA
165 169 173

C CAAGCAGC GCAA
163 166 169 172



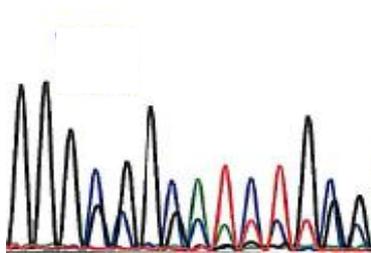
1505_1506 AG>CA



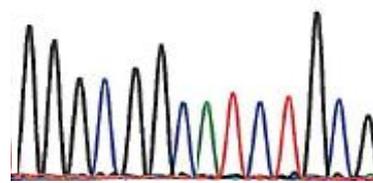
Wildtyp

GGG **S**SG **S**MT **Y**Y **G**SS
226 231

GGG C GGC A T C T G C G
226 231



749_750 ins G



Wildtyp

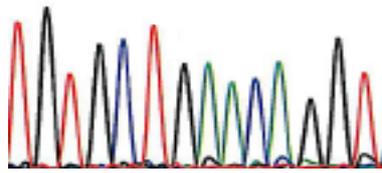
Abb. 4b: Ausschnitte aus der Gensequenz des Patienten 421 mit einer *CEBPA*-Doppelmutation, bestehend aus einer N-terminalen frameshift-Mutation (749_750 ins G) und einer C-terminalen in-frame-Mutation (1505_1506 AG >CA)

Zum Vergleich ist jeweils neben der mutierten Gensequenz rechts die Wildtyp-Sequenz des gleichen Genabschnitts dargestellt. Neben der mutierten Gen-Sequenz lässt sich jeweils auch die Wildtyp-Sequenz nachweisen, d.h. nur ein Allel trägt die Mutation.

1505_1506 AG>CA: Austausch der Nukleotide A und G durch die Nukleotide C und A in der Position 1505 bzw. 1506 der Wildtyp-*CEBPA*-Gensequenz (vgl. 7.1); 749_750 ins G: Insertion des Nukleotids G zwischen den Positionen 749 und 750 der Wildtyp-*CEBPA*-Gensequenz.

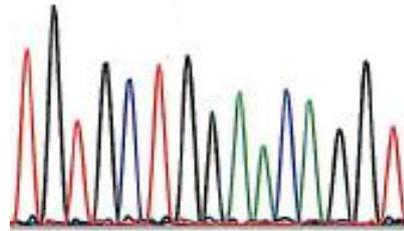
ID 305

T G T G C T G A A C A G G T
177 181 185



838 del

T G T G C T G G A A C A G G T
189 193 197 201



Wildtyp

Abb. 4c: Ausschnitt aus der Gensequenz des Patienten 305 mit einer homozygoten (biallelischen) *CEBPA*-Mutation, bestehend aus der N-terminalen frameshift-Mutation 838 del

Zum Vergleich ist neben der mutierten Gensequenz rechts jeweils die Wildtyp-Sequenz des gleichen Genabschnitts dargestellt. Neben der mutierten Gen-Sequenz lässt sich in diesem Fall keine Wildtyp-Sequenz mehr nachweisen, d.h. beide Allele tragen die gleiche Mutation.

838 del: Deletion des Nukleotids 838 der Wildtyp-*CEBPA*-Gensequenz (vgl. 7.1).

3.2 Molekulare Charakterisierung der *CEBPA*-Mutationen und Polymorphismen

Die molekularen Charakteristika der *CEBPA*-Mutationen sind in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 1) zusammengestellt.

Tab. 1: Charakteristika der *CEBPA*-Mutationen und deren Auswirkung auf das C/EBP α -Protein

Pat.-ID	DNA-Mutation	Aminosäureveränderung des Proteins	Konsequenz	Mutationstyp
113	945 del	V119fsX159 → 158 aa	N-terminaler Stopp in TAD2	N-terminale nonsense-Mutation
128	898_903 del	G103_G104 del → 356 aa	Deletion zw. TAD1 und TAD2	N-terminale in-frame-Mutation
189	659_660 ins C	H24fsX107 → 106 aa	N-terminaler Stopp	N-terminale nonsense-Mutation
205	1651_1652 dup	M354fsX422 → 421 aa	Duplikation in bZIP	C-terminale nonsense-Mutation
206	1343_1344 dup	L253fsX318 → 317 aa	Frameshift zw. TAD2 und bZIP und Stopp in bZIP	C-terminale nonsense-Mutation
227	789 del	Y67fsX159 → 158 aa	N-terminaler Stopp	N-terminale nonsense-Mutation
305	838 del	Q83fsX159 → 158 aa	N-terminaler Stopp	N-terminale nonsense-Mutation
329	1535_1536 dup	E316fsX318 → 317 aa	C-terminaler Stopp in bZIP	C-terminale nonsense-Mutation

Tab. 1 (Fortsetzung)

Pat.-ID	DNA-Mutation	Aminosäureveränderung des Proteins	Konsequenz	Mutationstyp
362	1498 G>C	A303P → 358 aa	Substitution in basic region und fork	C-terminale in-frame-Mutation
362	915 C>A	Y108X → 107 aa	N-terminaler Stopp	N-terminale nonsense-Mutation
374	1013_1014 ins G	R142fsX169 → 168 aa	N-terminaler Stopp	N-terminale nonsense-Mutation
421	749_750 ins G 1505_1506 AG>CA	G54fsX107 → 106 aa Q305P → 358 aa	N-terminaler Stopp Substitution in basic region und fork	N-terminale nonsense-Mutation C-terminale in-frame-Mutation
476	766 G>T 1356_1357 ins G	E59X → 58 aa L256fsX320 → 319 aa	N-terminaler Stopp Frameshift zw. TAD2 und bZIP und Stopp in bZIP	N-terminale nonsense-Mutation C-terminale nonsense-Mutation
583	1027_1028 ins CC	L146fsX160 → 159 aa	N-terminaler Stopp	N-terminale nonsense-Mutation

Tab. 1 (Fortsetzung)

aa: Amino acids (Aminosäuren); bZIP: Basic region leucine zipper; del: Deletion;
dup: Duplikation; ins: Insertion; Pat.-ID: Patienten-Identifizierungsnummer;
TAD: Transaktivierungsdomäne;

Im N-terminalen Bereich wurden Mutationen zwischen den Nukleotiden 659 und 1028 identifiziert, im C-terminalen Bereich zwischen den Nukleotiden 1343 und 1652 (Bezugssequenz: GenBank U34070.1; vgl. 7.1).

Wie in Abb. 5 dargestellt, ließen sich die Mutationen einem N-terminalen und einem C-terminalen Cluster zuordnen.

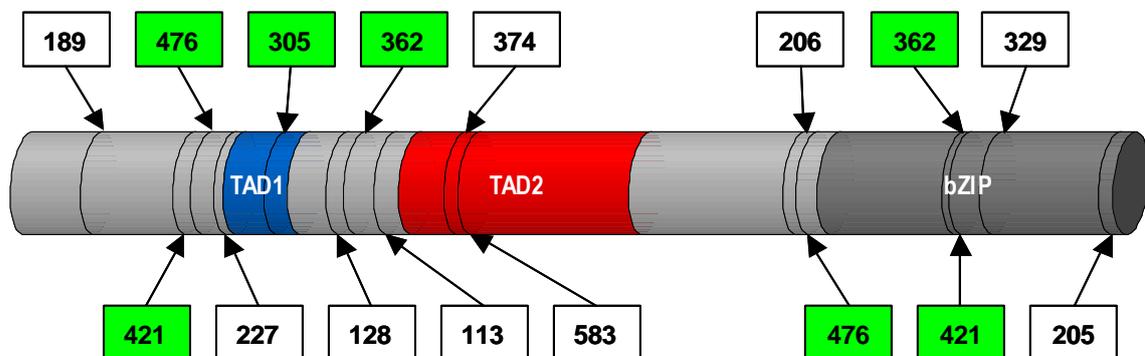


Abb. 5: Position der identifizierten Mutationen innerhalb der kodierenden Region des *CEBPA*-Gens

Eingerahmte Nummern: Patienten-ID; die Patienten 305, 362, 421 und 476 (grün hervorgehoben) tragen biallelische Mutationen.

bZIP: Basic region leucine zipper; TAD: Transaktivierungsdomäne.

Von den zehn N-terminalen Mutationen waren neun frameshift (nonsense)-Mutationen, die zur Translation eines verkürzten C/EBP α -Proteins von 58 bis 168 Aminosäuren Länge führten (siehe Abb. 6). Dies resultierte in einem Verlust eines Großteils der funktionellen Domänen des C/EBP α -Proteins. Lediglich eine der N-terminalen Mutationen erwies sich als in-frame-Mutation: Diese führte zur Bildung eines nahezu unveränderten, um zwei Glycin-Reste im Bereich zwischen TAD1 und TAD2 verkürzten C/EBP α -Proteins von 356 Aminosäuren Länge.

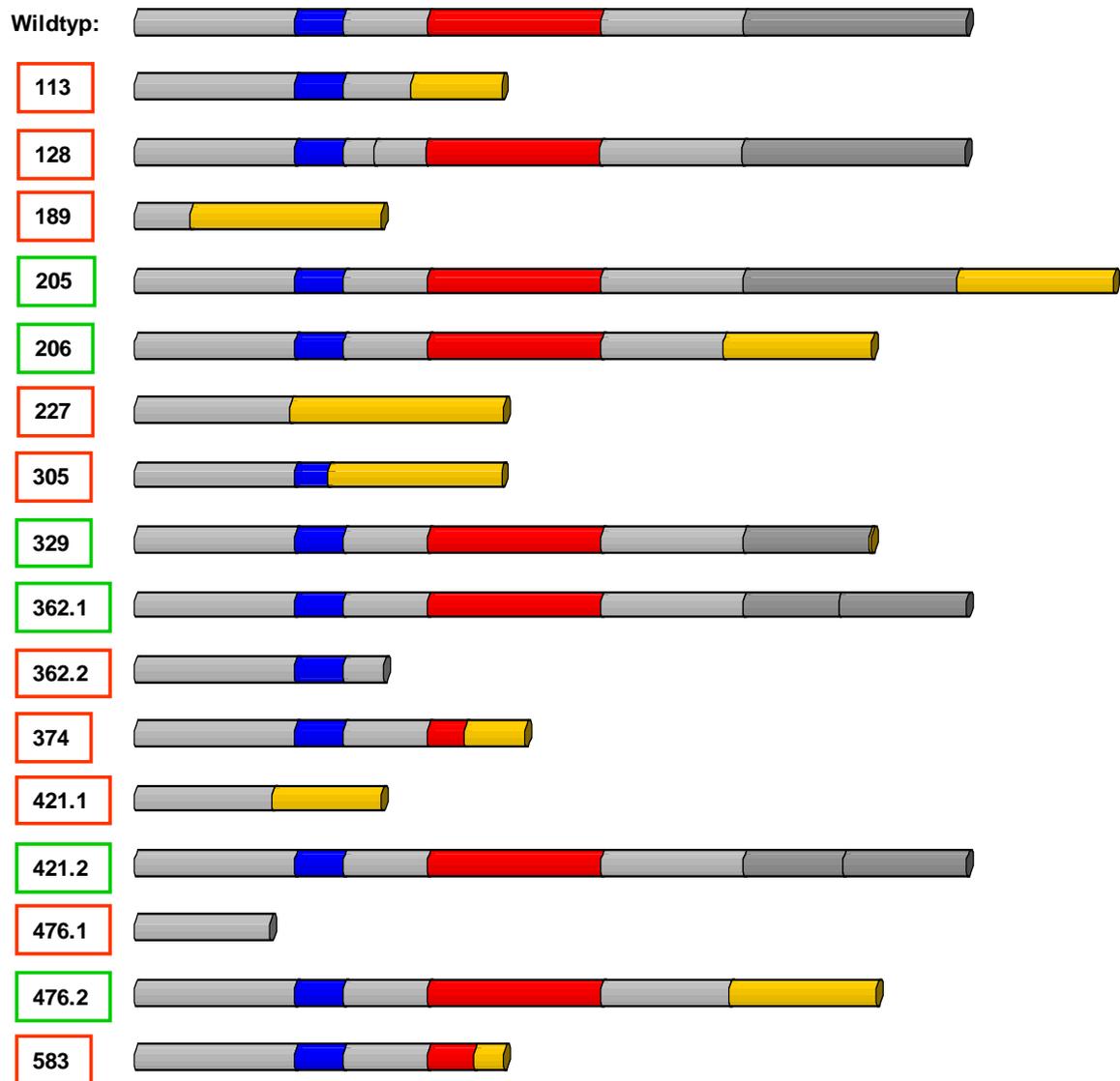


Abb. 6: Veränderung der Primärstruktur des C/EBP α -Proteins in den Patienten mit *CEBPA*-Mutation (Zahl in Kästchen = Patienten-ID; ID.1 und ID.2 = Patient mit Doppelmutation; rotes Kästchen: Patient mit N-terminaler Mutation; grünes Kästchen: Patient mit C-terminaler Mutation)

■ = TAD1-Domäne

■ = TAD2-Domäne

■ = bZIP-Domäne

■ = durch *Frameshift*-Mutation neu entstandene Proteinsequenz

Von den sechs Mutationen im C-terminalen Cluster waren vier frameshift (nonsense)-Mutationen und zwei in-frame-Mutationen. Alle diese C-terminalen Mutationen resultierten in einer Modifikation der bZIP-Domäne, die bei zwei Patienten vollständig deletiert und bei den übrigen vier Patienten mehr oder weniger stark strukturell verändert wurde (vgl. Abb. 6). Bei zwei der vier Doppel-Mutationen lag eine N-terminale frameshift-Mutation in Kombination mit einer C-terminalen in-frame-Mutation vor. Bei einer weiteren Doppel-Mutation handelte es sich sowohl bei der N- wie auch bei der C-terminalen Mutation um eine nonsense-Mutation (Patient 476). Schließlich wies ein Patient (305) eine biallelische homozygote nonsense-Mutation im N-terminalen Bereich auf.

Neben den oben beschriebenen Mutationen wurde bei drei Patienten (1,7%) ein 993 G>A Polymorphismus gefunden. Keiner dieser drei Patienten wies eine zusätzliche *CEBPA*-Mutation auf.

3.3 Untersuchung auf Keimbahnmutationen

Von 4 der 13 Patienten mit *CEBPA*-Mutation stand Untersuchungsmaterial aus Wangenschleimhaut-Abstrichen (buccal swabs) zur Verfügung, so dass bei diesen Patienten untersucht werden konnte, ob die entsprechende Mutation auch in nicht-myeloischen Zellen vorkommt und somit eine mögliche Keimbahnmutation darstellt.

Außer bei einem Patienten (Patient 476; siehe weiter unten) konnten die jeweiligen *CEBPA*-Mutationen nur in Leukämiezellen aus dem peripheren Blut bzw. aus dem Knochenmark, nicht jedoch in Zellen aus der Wangenschleimhaut nachgewiesen werden, was für das Vorliegen von somatischen *CEBPA*-Mutationen bei diesen Patienten spricht.

Dagegen wurde beim Patienten 476 die gleiche *CEBPA*-Doppelmutation (766 G>T und 1356_1357 ins G) sowohl in peripheren Blut- und Knochenmarkszellen als auch in Wangenschleimhaut-Zellen festgestellt. Allerdings ist einschränkend anzumerken, dass sich dieser Patient zum Zeitpunkt der Probenentnahme nicht in kompletter Remission befand, so dass das Ergebnis der Wangenschleimhaut-Analyse als nicht auswertbar interpretiert wurde.

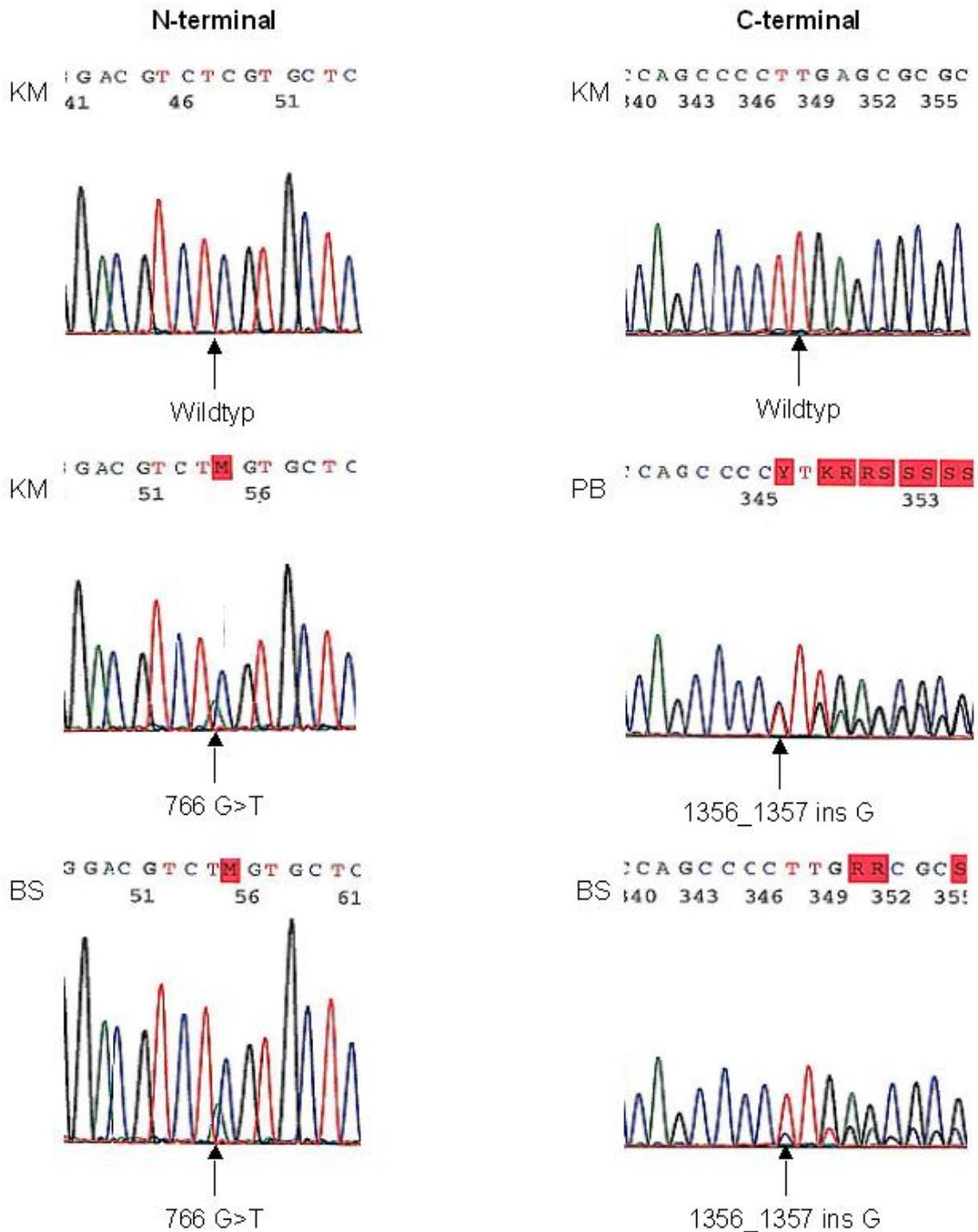


Abb. 7

N- und C-terminale Ausschnitte der CEBPA-Gensequenzen von Patient 476.

KM = Knochenmark

PB = peripheres Blut,

BS = buccal swab (Wangenschleimhautabstrich).

Gezeigt sind jeweils die N-terminale (linke Spalte) und C-terminale (rechte Spalte) Mutationen in der DNA, die aus unterschiedlichen Gewebeproben des Patienten

476 isoliert wurde. Als Referenz sind im oberen Teil der Abbildung die entsprechenden Wildtyp-Gensequenzen in den mutierten Bereichen des *CEBPA*-Gens dargestellt.

766 G>T: Austausch des Nukleotids G durch das Nukleotid T in der Position 766 der Wildtyp-*CEBPA*-Gensequenz (vgl. 7.1); 1356_1357 ins G: Insertion des Nukleotids G zwischen den Positionen 1356 und 1357 der Wildtyp-*CEBPA*-Gensequenz.

Zum Vergleich sind die analogen *CEBPA*-Gensequenzen des Patienten 421 – beispielhaft für eine somatische Doppelmutation des *CEBPA*-Gens – in Abb. 8 dargestellt.

Während Patient 476 in seinen Wangenschleimhaut-Zellen die gleiche Doppelmutation aufweist wie in den Knochenmarkszellen, zeigt Patient 421 in den Wangenschleimhaut-Zellen – im Gegensatz zu den Knochenmarkszellen – keine Mutation.

Um den Verdacht einer Keimbahnmutation des *CEBPA*-Gens weiter zu erhärten wurde versucht, Knochenmarkszellen des Patienten 476 mittels Durchflusszytometrie (FACS; fluorescence activated cell sorting) in Zellen, die den **T-Zell**-Co-Rezeptor CD3 exprimieren (CD3-positive Zellen; CD3+) und Zellen, die den für die **myeloische** Linie charakteristischen Transmembran-Rezeptor CD33 exprimieren (CD33-positive Zellen; CD33+), zu fraktionieren. Leider gelang es jedoch nicht, die einzelnen Fraktionen sauber zu trennen.

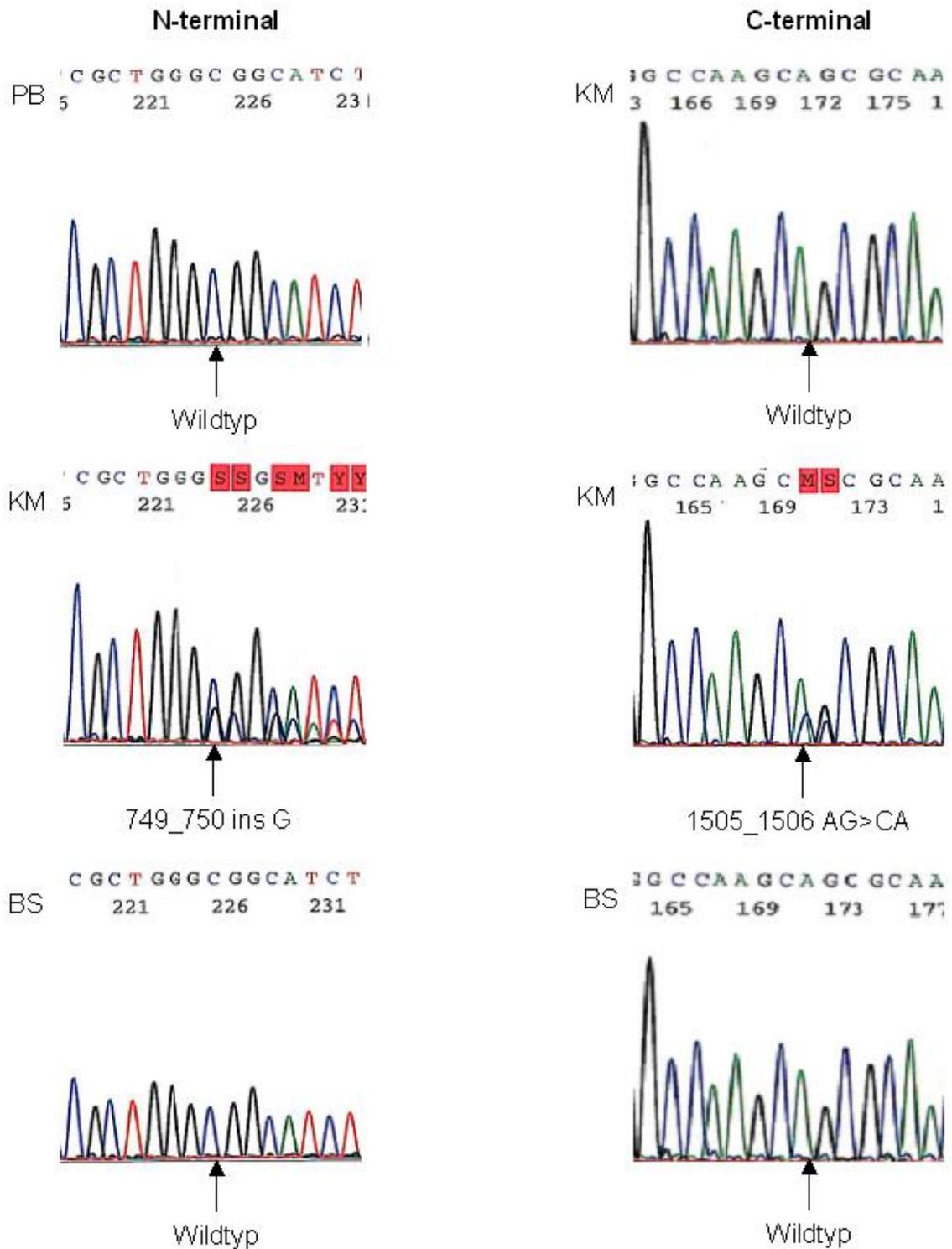


Abb. 8

N- und C-terminale Ausschnitte der CEBPA-Gensequenzen von Patient 421.

KM = Knochenmark

PB = peripheres Blut,

BS = buccal swab (Wangenschleimhautabstrich).

Abb. 8 (Fortsetzung)

1505_1506 AG>CA: Austausch der Nukleotide A und G durch die Nukleotide C und A in der Position 1505 bzw. 1506 der Wildtyp-*CEBPA*-Gensequenz (vgl. 7.1);
749_750 ins G: Insertion des Nukleotids G zwischen den Positionen 749 und 750 der Wildtyp-*CEBPA*-Gensequenz.

3.4 Assoziation mit anderen Mutationen

Bei den Patienten der AMLSG 06-04 Studie mit normalem Karyotyp wurden neben dem *CEBPA*-Mutationsstatus als weitere molekulare Marker *FLT3*-ITD, *FLT3*-TKD, *NPM1* und *MLL*-PTD untersucht. Die Untersuchungsergebnisse zum Mutationsstatus bezüglich des *FLT3*- und *NPM1*-Gens wurden im Rahmen der AMLSG ULM Studien erhoben und lagen deshalb bereits vor. Da zum Zeitpunkt der statistischen Auswertung der *MLL*-PTD-Status noch nicht vollständig bei allen einbezogenen Patienten analysiert war, ging dieser Parameter nicht in die statistische Betrachtung mit ein. In der nachfolgenden Tabelle ist der *CEBPA*-Mutationsstatus den oben genannten molekularen Markern gegenüber gestellt.

Tab. 2: Koinzidenz von *CEBPA*-Mutationen und *FLT3*- und *NPM1*-Mutationen

	Alle Patienten n = 181 (%)	<i>CEBPA</i>		p-Wert (Fisher)
		WT n = 168 (%)	MUT n = 13 (%)	
<i>FLT3-ITD</i>, no. (%)				0,1825
- WT:	121 (67)	110 (65)	11 (85)	
- MUT:	46 (25)	45 (27)	1 (8)	
- keine Daten:	14 (8)	13 (8)	1 (8)	
<i>FLT3-TKD</i>, no. (%)				0,687
- WT:	109 (60)	99 (59)	10 (77)	
- MUT:	7 (4)	7 (4)	0 (0)	
- keine Daten:	65 (36)	62 (37)	3 (23)	
<i>NPM1</i>, no. (%)				0,04601
- WT:	104 (750)	93 (55)	11 (85)	
- MUT:	76 (42)	74 (44)	2 (15)	
- keine Daten:	1 (1)	1 (1)	0 (0)	

Zahlen in Klammern: Anteil der Patienten (%) mit dem jeweiligen *FLT3*- bzw. *NPM1*-Mutationsstatus an allen Patienten, sowie den Patienten mit dem entsprechenden *CEBPA*-Mutationsstatus; *FLT3-ITD*: FMS-like tyrosine kinase 3 interne Tandem-Duplikation; *FLT3-TKD*: FMS-like tyrosine kinase 3 Tyrosinkinase-Domäne; MUT: mutiert; *NPM1*: Nucleophosmin, member 1; WT: Wildtyp.

Eine signifikante Korrelation ($p = 0,046$) fand sich lediglich zwischen dem Vorhandensein einer *CEBPA*-Mutation und der gleichzeitigen Abwesenheit einer *NPM1*-Mutation.

Im Weiteren wurde die Assoziation von *FLT3*- und *NPM1*-Mutationen mit einer *CEBPA*-Einzel- bzw. -Doppelmutation analysiert.

Tab. 3: Assoziation von *FLT3*- und *NPM1*-Mutationen mit dem *CEBPA*-Mutationsstatus

<i>CEBPA</i>- Mutationsstatus	Weitere Gen-Mutationen		
	<i>FLT3-ITD</i>, no. (%)	<i>FLT3-TKD</i>, no. (%)	<i>NPM1</i>, no. (%)
WT	45 (29)	7 (7)	74 (44)
Einzelmutation	0 (0)	0 (0)	2 (22)
Doppelmutation	1 (25)	0 (0)	0 (0)

Zahlen in Klammern: Anteil der Patienten (%) mit dem jeweiligen *CEBPA*-Mutationsstatus, welche die entsprechende weitere Gen-Mutation aufweisen; *FLT3-ITD*: FMS-like tyrosine kinase 3 interne Tandem-Duplikation; *FLT3-TKD*: FMS-like tyrosine kinase 3 Tyrosinkinase-Domäne; *MUT*: mutiert; *NPM1*: Nucleophosmin, member 1; *WT*: Wildtyp;

3.5 Biologische und klinische Charakteristika der untersuchten Patienten

Von allen Patienten der AMLSG 06-04 Studie mit normalem Karyotyp, bei denen eine Analyse des *CEBPA*-Mutationsstatus erfolgte, wurden die folgenden biologischen und klinischen Parameter erfasst: Alter, Geschlecht, Hämoglobinwert, Thrombozytenzahl, Leukozytenzahl, Blastenanteil im peripherem Blut und im Knochenmark, sowie die Höhe der LDH- im Plasma. Des Weiteren wurde festgehalten, ob die Patienten von einem extramedullären Gewebe-Befall mit leukämischen Zellen betroffen waren oder nicht.

Alle oben genannten Parameter wurden mit dem *CEBPA* Mutationsstatus korreliert und auf signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit *CEBPA*-Mutation und Patienten mit Wildtyp-*CEBPA* untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tab. 4: Korrelation von biologischen und klinischen Parametern mit dem CEBPA-Mutationsstatus

Parameter	Alle Patienten n = 181	CEBPA		p-Wert	
		WT n = 168	MUT n = 13	Wilcoxon	Fisher
Alter, Jahre				0,7046	
Median	68,32	68,07	68,54		
Bereich	61,14-83,72	61,14-83,72	64,37-73,53		
Geschlecht, No.					0,7741
weiblich	83 (46)	78 (46)	5 (38)		
männlich	98 (54)	90 (54)	8 (62)		
Hämoglobinwert, g/L				0,8817	
Median	9,4	9,5	9		
Bereich	4,4-14,5	4,4-14,5	7,2-10,8		
keine Daten	7	7	0		
Thrombozytenzahl, x 10⁹/L				0,9977	
Median	63	64	57		
Bereich	5-390	5-390	14-235		
keine Daten	7	7	0		
Leukozytenzahl, x 10⁹/L				0,3305	
Median	18,8	20,5	7,2		
Bereich	0,1-439	0,1-314,7	1,1-439,5		
keine Daten	7	7	0		

Tab. 4 (Fortsetzung)

Parameter	Alle Patienten n = 181	CEBPA		p-Wert	
		WT n = 168	MUT n = 13	Wilcoxon	Fisher
% Blasten im PB				0,7723	
Median	32	34	27		
Bereich	0-100	0-100	0-92		
keine Daten	15	13	2		
% Blasten im KM				0,9681	
Median	70	70	60		
Bereich	0-100	0-100	38-90		
keine Daten	18	18	0		
LDH, U/L				0,2538	
Median	352	353	326		
Bereich	62-5760	62-5760	127-485		
keine Daten	9	9	0		
Extramedullärer Befall, No.					0,6022
nein	162 (90)	149 (89)	13 (100)		
ja	13 (7)	13 (8)	0 (0)		
keine Daten	6 (3)	6 (4)	0 (0)		

Angaben in Klammern: Anteil der Patienten (%); KM: Knochenmark; MUT: mutiert; PB: peripheres Blut; WT: Wildtyp;

Bezüglich der oben aufgeführten biologischen und klinischen Parameter zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten mit und ohne CEBPA-Mutation.

3.6 Einfluss des Mutationsstatus auf das Chemotherapieansprechen

Zur Abschätzung der prognostischen Relevanz von *CEBPA*-Mutationen wurde analysiert, ob sich das Therapieansprechen in der Gruppe der Patienten mit *CEBPA*-Mutation von dem der Patienten mit Wildtyp-*CEBPA* unterschied. Hierzu wurde der Remissionsstatus betrachtet, welcher nach dem zweiten Induktionszyklus der Chemotherapie erhoben wurde. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

In dieser univariaten Analyse zeigten Patienten mit und ohne *CEBPA*-Mutation keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf das Erreichen einer kompletten Remission, refraktäre Erkrankung und frühen Tod, so dass sich aus dieser Analyse keine signifikante Korrelation zwischen dem *CEBPA*-Mutationsstatus und dem Therapieansprechen ableiten ließ.

Tab. 5: Assoziation des Chemotherapieansprechens mit dem *CEBPA*-Mutationsstatus

Remissionsstatus	Alle Patienten n = 181 (%)	<i>CEBPA</i>		p-Wert (Fisher)
		WT n = 168 (%)	MUT n = 13 (%)	
Remission, No.				0,766
Komplette Remission	98 (54)	91 (54)	7 (54)	
Refraktäre Erkrankung	61 (34)	57 (34)	4 (31)	
Früher Tod	16 (9)	14 (8)	2 (15)	
keine Daten	6 (3)	6 (4)	0 (0)	

Angaben in Klammern: Anteil der Patienten (%); KM: Knochenmark; MUT: mutiert; PB: peripheres Blut; WT: Wildtyp.

3.7 Korrelation des *CEBPA*-Mutationsstatus mit dem klinischen Verlauf

Eine mögliche Korrelation zwischen dem *CEBPA*-Mutationsstatus und dem klinischen Verlauf (Outcome) der Patienten wurde mit Hilfe von

Überlebenszeitkurven nach der Kaplan-Meier-Methode überprüft. Dabei wurde die Population der Patienten mit Wildtyp-*CEBPA* (je nach analysiertem Parameter n = 105-168) mit der wesentlich kleineren Gruppe der Patienten mit *CEBPA*-Mutation (n = 9-13) verglichen (Abb. 9).

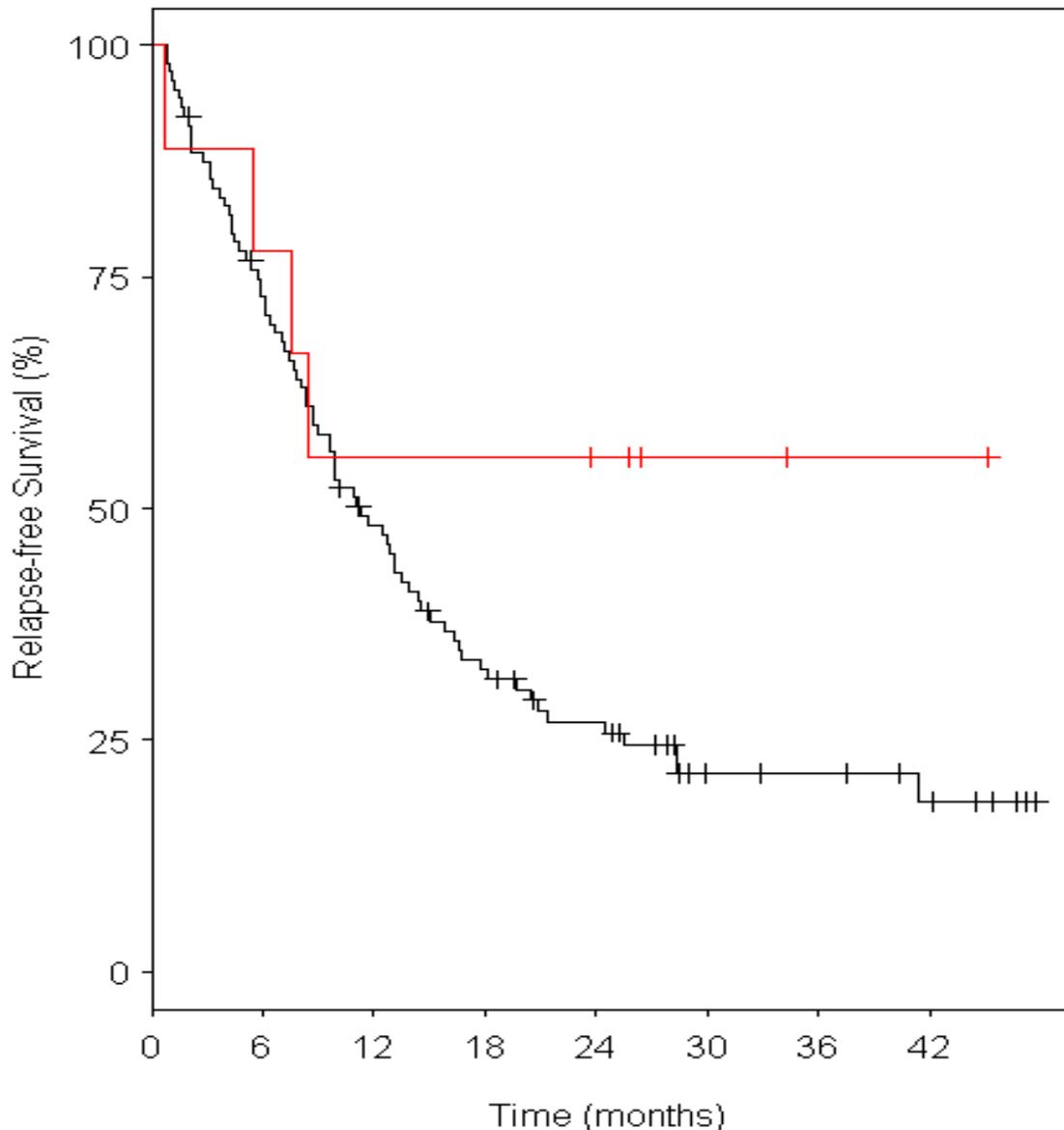


Abb. 9: Kaplan-Meier-Diagramm für die Betrachtung des rezidivfreien Überlebens bei Patienten mit und ohne *CEBPA*-Mutation

Die rote Kurve zeigt das rezidivfreie Überleben für Patienten, bei denen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine *CEBPA*-Mutation nachweisbar war, die schwarze das rezidivfreie Überleben für Patienten ohne *CEBPA*-Mutation.

Die Auswertung von Abb. 9 ergab folgende Resultate für Patienten mit (MUT) und ohne (WT) *CEBPA*-Mutation:

<i>CEBPA</i>	Events	Median (Monate)	p-Wert
WT (n = 105)	78	11,2	0,141
MUT (n = 9)	4	INF	

Obwohl sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem *CEBPA*-Mutationsstatus und dem rezidivfreien Überleben der Patienten ergab ($p= 0,141$), lässt der Kaplan-Meier-Plot in Abb.4 einen klaren Trend erkennen: Anfänglich zeigten beide Patientengruppen ähnlich hohe Rezidivraten, doch nach etwa zehn Monaten Beobachtungszeit erlitt kein weiterer Patient aus der Population mit *CEBPA*-Mutation mehr ein Rezidiv, und die zuvor exponentiell abfallende Überlebens-Kurve ging in ein Plateau über. Dagegen kam es bei den *CEBPA*-Wildtyp-Patienten auch später noch zu weiteren Rezidiven, so dass die entsprechende Überlebens-Kurve ihren nahezu exponentiellen Verlauf fortsetzte. Nach 11,2 Monaten erreichte die Überlebenskurve der Wildtyp-Patienten den Median-Wert, d.h. zu diesem Zeitpunkt lebten nur noch 50% der Ausgangspopulation rezidivfrei. In der Patientengruppe mit *CEBPA*-Mutation wurde der entsprechende Median-Wert zum Zeitpunkt der statistischen Auswertung noch nicht erreicht. Demnach zeigte sich ein sehr deutlicher – wenngleich statistisch nicht signifikanter – Trend zu einem erhöhtem rezidivfreiem Überleben bei Patienten mit *CEBPA*-Mutation.

Im Weiteren wurde untersucht, ob sich der Effekt einer biallelischen *CEBPA*-Mutation auf das rezidivfreie Überleben von demjenigen einer monoallelischen *CEBPA*-Einfachmutation unterscheidet (Abb. 10).

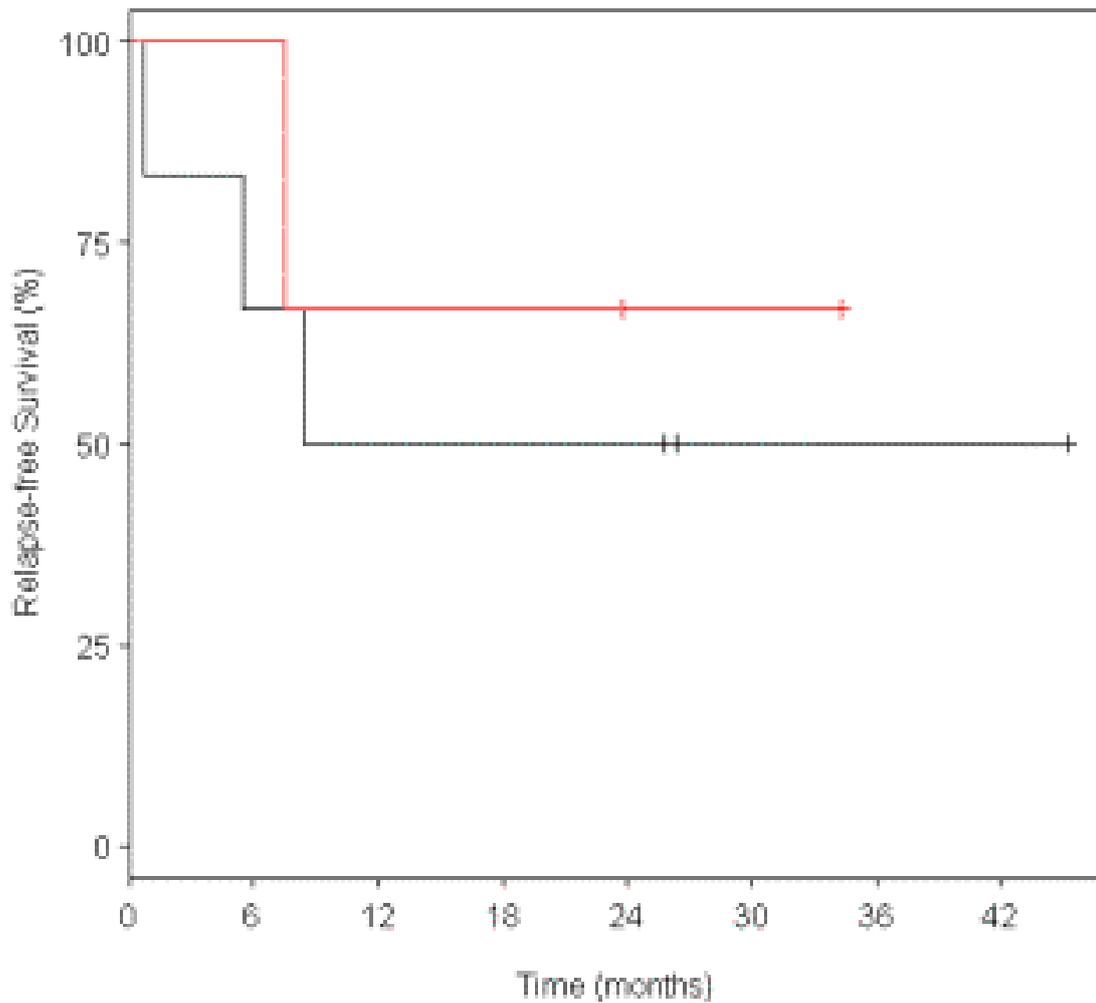


Abb. 10: Kaplan-Meier-Diagramm für die Betrachtung des rezidivfreien Überlebens bei Patienten mit biallelischer und monoallelischer *CEBPA*-Mutation

Die rote Kurve zeigt das rezidivfreie Überleben für Patienten mit einer *CEBPA*-Doppelmutation, die schwarze das rezidivfreie Überleben für Patienten mit einer *CEBPA*-Einfachmutation (Patienten mit einer *CEBPA*-Mutation, die keine Remission erreichten, konnten naturgemäß bei der Analyse des rezidivfreien Überlebens nicht berücksichtigt werden).

Die Auswertung von Abb. 10 ergab folgende Resultate für Patienten mit einer *CEBPA*-Doppelmutation (biallelisch) bzw. mit einer *CEBPA*-Einfachmutation (monoallelisch):

<i>CEBPA</i> MUT	Events	Median (Monate)	p-Wert
Monoallelisch (n = 6)	3	26,8	0,625
Biallelisch (n = 3)	1	INF	

Auch wenn sich aufgrund der geringen Fallzahlen kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen monoallelischer und biallelischer Mutation des *CEBPA*-Gens in Bezug auf das rezidivfreie Überleben ergab ($p = 0,625$), zeigte sich bei den Patienten mit biallelischer Mutation ein Trend zu längerem rezidivfreien Überleben. Nach 26,8 Monaten erreichte die Überlebenskurve der Patienten mit monoallelischer Mutation den Median-Wert, d.h. zu diesem Zeitpunkt lebten nur noch 50% der Ausgangspopulation rezidivfrei. In der Patientengruppe mit biallelischer *CEBPA*-Mutation wurde der Median-Wert zum Zeitpunkt der statistischen Auswertung noch nicht erreicht.

Ähnlich wie für das rezidivfreie Überleben beschrieben, wurde die Korrelation des *CEBPA*-Mutationsstatus mit dem ereignisfreien Überleben analysiert (Abb. 11).

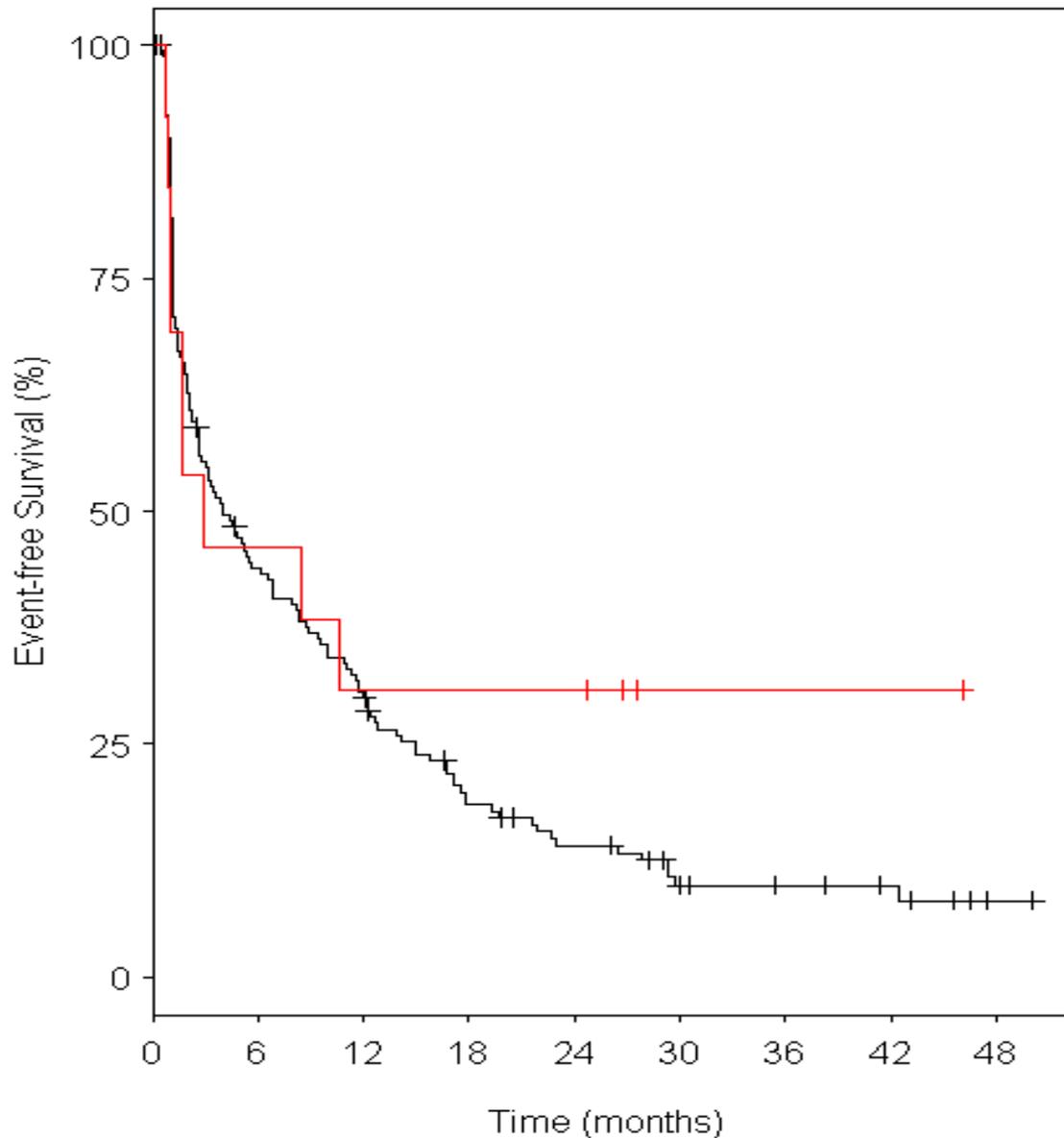


Abb. 11: Kaplan-Meier-Diagramm für die Betrachtung des ereignisfreien

Überlebens bei Patienten mit *CEBPA*-Mutation und Wildtyp-*CEBPA*

Die rote Kurve zeigt das ereignisfreie Überleben für Patienten, bei denen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine *CEBPA*-Mutation nachweisbar war, die schwarze das ereignisfreie Überleben für Patienten ohne *CEBPA*-Mutation.

Die Auswertung von Abb. 11 ergab folgende Resultate für Patienten mit (MUT) und ohne (WT) *CEBPA*-Mutation:

CEBPA	Events	Median (Monate)	p-Wert
WT (n = 168)	141	4,01	0,377
MUT (n = 13)	9	2,89	

Auch hier ergab der Vergleich der 13 Patienten mit *CEBPA*-Mutation mit den 168 Patienten ohne *CEBPA*-Mutation zwar keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,377$), doch es ließ sich erneut ein deutlicher Trend erkennen: Obwohl die Überlebenskurve der Patienten mit einer *CEBPA*-Mutation den Median-Wert des ereignisfreien Überlebens etwa einen Monat früher erreichte als die Überlebenskurve der Vergleichspopulation mit Wildtyp-*CEBPA* (2,89 Monate versus 4,01 Monate), scheinen *CEBPA*-Mutationen einen positiven Effekt auf das ereignisfreie Überleben der Patienten auszuüben.

Entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise wurde schließlich ein möglicher Einfluss des *CEBPA*-Mutationsstatus auf das Gesamtüberleben mit Hilfe eines Kaplan-Meier-Plots überprüft (Abb. 12).

Bei dem Vergleich der 13 Patienten mit einer *CEBPA*-Mutation mit den 168 Patienten *CEBPA*-Wildtyp-Patienten konnte – wie schon in Bezug auf das rezidiv- und ereignisfreie Überleben – kein signifikanter Einfluss des *CEBPA*-Mutationsstatus auf das Gesamtüberleben nachgewiesen werden ($p = 0,281$). Allerdings zeigt der Kaplan-Meier-Plot in Abb. 12 einen deutlichen Trend zu einer verbesserten Gesamtüberlebensrate bei den Patienten mit *CEBPA*-Mutation. Beide Patientenpopulationen wiesen in etwa den gleichen Median-Wert des Gesamtüberlebens auf (13,9 Monate bei Patienten mit Wildtyp-*CEBPA* versus 13,7 Monate bei Patienten mit *CEBPA*-Mutation).

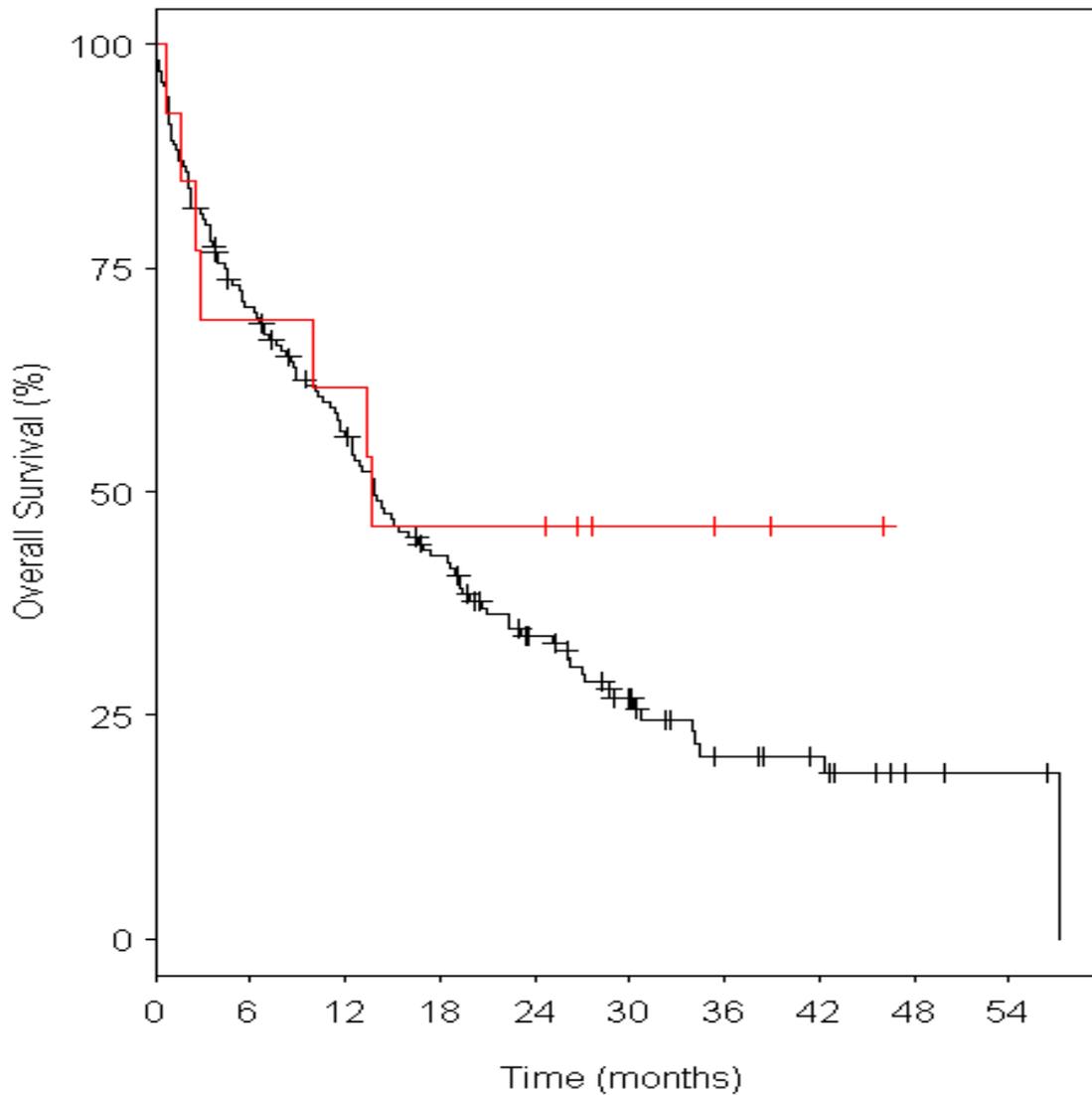


Abb. 12: Kaplan-Meier-Diagramm für die Betrachtung des Gesamtüberlebens bei Patienten mit *CEBPA*-Mutation und Wildtyp-*CEBPA*

Die rote Kurve zeigt das Gesamtüberleben für Patienten, bei denen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine *CEBPA*-Mutation nachweisbar war, die schwarze das Gesamtüberleben für Patienten ohne *CEBPA*-Mutation.

Die Auswertung von Abb. 12 ergab folgende Resultate für Patienten mit (MUT) und ohne (WT) *CEBPA*-Mutation:

CEBPA	Events	Median (Monate)	p-Wert
WT (n = 168)	119	13,9	0,281
MUT (n = 13)	7	13,7	

Bei den Patienten mit einer *CEBPA*-Mutation wurde zusätzlich untersucht, ob sich biallelische *CEBPA*-Mutationen hinsichtlich ihres Einflusses auf das rezidivfreie Überleben von monoallelischen *CEBPA*-Mutationen unterscheiden (Abb. 13).

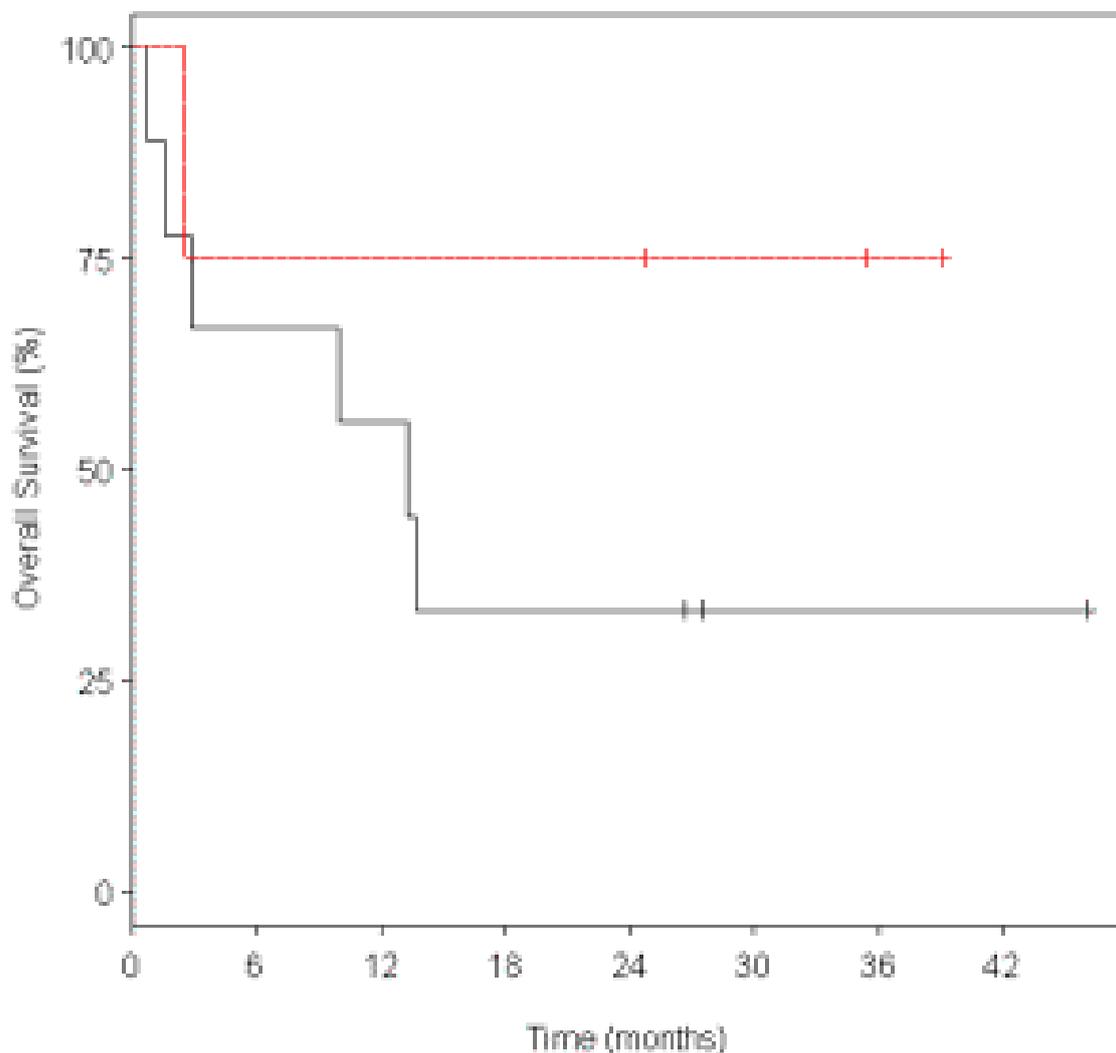


Abb. 13: Kaplan-Meier-Diagramm für die Betrachtung des Gesamtüberlebens bei Patienten mit biallelischer und monoallelischer *CEBPA*-Mutation
Die rote Kurve zeigt das Gesamtüberleben für Patienten mit einer *EBPA*-Doppelmutation, die schwarze das Gesamtüberleben für Patienten mit einer *CEBPA*-Einfachmutation.

Die Auswertung von Abb. 13 ergab folgende Resultate für Patienten mit einer *CEBPA*-Doppelmutation (biallelisch) bzw. mit einer *CEBPA*-Einfachmutation (monoallelisch):

<i>CEBPA</i> MUT	Events	Median (Monate)	p-Wert
Monoallelisch (n = 9)	6	13,3	0,251
Biallelisch (n = 4)	1	INF	

Wenngleich sich aufgrund der geringen Fallzahlen kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen monoallelischer und biallelischer Mutation des *CEBPA*-Gens in Bezug auf das Gesamtüberleben ergab ($p = 0,251$), zeigte sich bei den Patienten mit biallelischer Mutation ein deutlicher Trend zu einem besseren Gesamtüberleben. Nach 13,3 Monaten erreichte die Überlebenskurve der Patienten mit monoallelischer *CEBPA*-Mutation den Median-Wert, d.h. zu diesem Zeitpunkt überlebten nur noch 50% der Ausgangspopulation. In der Patientengruppe mit biallelischer *CEBPA*-Mutation wurde der Median-Wert zum Zeitpunkt der statistischen Auswertung noch nicht erreicht.

4 Diskussion

Während die Inzidenz und prognostische Bedeutung von *CEBPA*-Mutationen bei jüngeren AML-Patienten (< 60 Jahre) relativ gut untersucht wurde, existieren vergleichsweise wenige Studien zur Häufigkeit und prognostischen Relevanz derartiger Mutationen bei älteren Patienten (\geq 60 Jahre). Dabei stellt diese Gruppe mit etwa zwei Dritteln den größten Anteil an der Gesamt-AML-Patientenpopulation dar (Horner et al. 2009). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit, die im Rahmen der AMLSG 06-04-Studie durchgeführt wurde, die Inzidenz und prognostische Bedeutung von *CEBPA*-Mutationen bei 181 älteren AML-Patienten mit normalem Karyotyp evaluiert.

Insgesamt wiesen 7,2% der hier untersuchten AML-Patienten eine *CEBPA*-Mutation auf. Damit lag die Mutationsfrequenz in einer vergleichbaren Größenordnung wie von Schlenk et al. (2009) für eine ähnliche Patientenpopulation in der AML HD98B-Studie beschrieben (8,5%). Im Gegensatz dazu wurde bei jüngeren, zytogenetisch normalen Patienten mit etwa 10-15% eine höhere Inzidenz von *CEBPA*-Mutationen beobachtet (Fröhling et al. 2004; Schlenk et al. 2007, Green et al. 2010). In einer weiteren, groß angelegten Studie an Kindern und Jugendlichen mit CN-AML wurden *CEBPA*-Mutationen sogar bei 17% dieser Patienten gefunden (Ho et al. 2009). Somit scheint es bei AML-Patienten mit normalem Karyotyp eine altersabhängige Abnahme der Inzidenz von *CEBPA*-Mutationen zu geben. Da in der Literatur *CEBPA*-Mutationen häufig mit einer günstigeren Prognose assoziiert werden, könnte deren geringere Häufigkeit in der Kohorte der älteren AML-Patienten die in der Regel schlechtere Prognose dieser Patienten mit begründen.

Neben Mutationen des *CEBPA*-Gens wurde auch der Polymorphismus 993 G>A untersucht: Dieser wurde bei 1,7% aller untersuchten Patienten gefunden und trat damit in einer ähnlichen Häufigkeit auf wie bei Fröhling et al. (2004) für eine jüngere Patientenpopulation beschrieben (1%).

Von den insgesamt 16 verschiedenen *CEBPA*-Mutationen, die bei 13 Patienten identifiziert wurden, waren neun Einzelmutationen und vier Doppelmutationen. Bei dem größten Teil der Doppelmutationen (3/4) handelte es sich um eine Kombination aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Mutation, wobei derartige Doppelmutationen in der Regel biallelischer Natur sind (Dufour et al.

2010). Bei einem Patienten (ID 305) wurde eine N-terminale Mutation entdeckt, wobei die entsprechende Wildtyp-Gensequenz – anders als bei den übrigen Mutationen – nicht nachweisbar war. Dies spricht für das Vorhandensein der gleichen Mutation auf beiden Allelen, so dass diese Mutation als homozygot-biallelische (Doppel-) Mutation klassifiziert wurde.

Mit einem Anteil von nur 31% an allen *CEBPA*-Mutationen lag die Frequenz von Doppelmutationen in der vorliegenden Studie an älteren Patienten deutlich unter dem entsprechenden Anteil in einer jüngeren AML-Patientenpopulation: So fanden Green et al. (2010) und Taskesen et al. (2011) in der Subgruppe der jüngeren Patienten mit normalem Karyotyp bei 57% bzw. 60% der Individuen mit *CEBPA*-Mutation eine Doppelmutation. Bei Kindern mit AML traten sogar 82% der *CEBPA*-Mutationen als Doppelmutation auf (Ho et al. 2009). Tatsächlich weisen neuere Arbeiten (Dufour et al. 2010; Taskesen et al. 2011) darauf hin, dass sich die günstigere Prognose für Patienten mit *CEBPA*-Mutation weitgehend auf die Fälle mit einer Doppelmutation beschränkt. Somit könnte der deutlich geringere Anteil von *CEBPA*-Doppelmutationen ein kritischer Faktor für das schlechtere klinische Outcome von älteren CN-AML-Patienten sein.

In Übereinstimmung mit der Literatur resultierte der bei weitem größte Teil (9/10) der **N-terminalen Mutationen** in einem frameshift, in dessen Folge es zur Bildung eines mehr oder weniger stark verkürzten C/EBP α -Proteins kam. Bei der Hälfte (5/10) der N-terminalen Mutationen lag die TAD1-Domäne noch intakt vor, während bei den restlichen 50% die TAD1-Domäne entweder vollkommen fehlte oder stark trunziert war. Aufgrund des vollständigen Verlustes der basischen DNA-Bindungsdomäne und der Leucine Zipper Region sind jedoch auch die C-terminal verkürzten C/EBP α -Proteine mit intakter TAD1-Domäne nicht mehr in der Lage, Ziel promotoren zu transaktivieren, d.h. der Großteil der N-terminalen frameshift-Mutationen führte zu einem Funktionsverlust des mutierten C/EBP α -Proteins. Dagegen hatte die jeweilige Mutation bei den meisten (8/10) Patienten mit N-terminaler Mutation keine Auswirkung auf die Bildung von p30. Aufgrund des dominant-negativen Effekts von p30 auf die Funktion des verbliebenen p42 ist davon auszugehen, dass die C/EBP α -induzierte Granulozyten-Differenzierung bei diesen Patienten noch zusätzlich vermindert wurde.

Bei zwei Patienten (ID 374 und ID 583) resultierten frameshift-Mutationen in der TAD2-Domäne in der Bildung eines p30-Proteins mit C-terminal deutlich verkürzter TAD2-Domäne sowie Verlust der basischen DNA-Bindungsdomäne und des Leucine Zippers. Da es äußerst unwahrscheinlich ist, dass die trunkeierten p30-Proteine noch den dominant-negativen Effekt des Wildtyp-p30 Proteins ausüben können, ist bei diesen Patienten ein Funktionsverlust sowohl von p42 als auch von p30 zu erwarten.

Nur bei einem der 10 Patienten mit N-terminaler Mutationen (ID 128) lag keine frameshift-Mutation vor, sondern eine (in-frame) Deletion von zwei Glycin-Codons, durch die in dem mutierten C/EBP α -Protein der Abstand zwischen den beiden Transaktivierungsdomänen TAD1 und TAD2 nur geringfügig reduziert war. Obwohl diese Mutation nur zu einer vergleichsweise marginalen Veränderung der C/EBP α -Primärstruktur führt, kann dennoch eine signifikante Auswirkung auf die dreidimensionale Struktur des Proteins und dessen transaktivierende Eigenschaften nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund des vorliegenden Befundes wäre es sicher interessant, experimentell – z.B. in einem transienten Transfektions-Assay in Zelllinien mit einem Promotor-Reportergen-Konstrukt, wie von Nerlov et al. (1994) oder von Kato et al. (2011) beschrieben – zu untersuchen, wie sich die mutierte Spacer-Sequenz zwischen TAD1 und TAD2 auf die Funktionalität des C/EBP α -Proteins auswirkt.

Sechs der insgesamt 16 in der vorliegenden Studie identifizierten *CEBPA*-Mutationen waren **C-terminale Mutationen**. Im Gegensatz zu jüngeren AML-Patienten mit normalem Karyotyp, bei denen C-terminale *CEBPA*-Mutationen hauptsächlich als in-frame-Mutationen vorkommen (Taskesen et al., 2011), wiesen die meisten (4/6) der hier untersuchten älteren CN AML-Patienten mit C-terminaler Mutationen einen frameshift auf. Bei den beiden in-frame Mutationen (Patienten 362 und 421) wurde jeweils eine Aminosäure (Alanin bzw. Glutamin) in der bZIP-Domäne durch Prolin ersetzt: Da Prolin (als „Helix-Strukturbrecher“) zu erheblichen Sekundärstruktur-Veränderungen führen kann, ist ein Funktionsverlust des resultierenden C/EBP α -Proteins (sowohl von p42 als auch von p30) sehr wahrscheinlich. Bei drei der Patienten mit C-terminaler frameshift Mutation fehlte die bZIP-Domäne entweder vollständig (ID 206 und ID 476) oder lag in erheblich verkürzter Form vor (ID 329). Der vierte Patient mit C-terminaler frameshift

Mutation (ID 205) wies eine weitgehend intakte bZIP-Domäne auf; lediglich der äußerste C-Terminus (fünf Aminosäuren) des C/EBP α -Proteins war infolge der Mutation (und der daraus resultierenden Deletion des Stopp-Codons) durch ein längeres, artifizielles Peptid ersetzt worden. Auch in diesem Fall wäre es interessant, experimentell – wie weiter oben beschrieben – zu untersuchen, wie sich eine derartige, scheinbar geringfügige C-terminale Modifikation auf die Funktionalität des C/EBP α -Proteins auswirkt.

Von besonderem Interesse war der Patient 476: Bei diesem Patienten wurde die N- und C-terminale Doppelmutation nicht nur in mononukleären Zellen aus dem peripherem Blut und Knochenmark nachgewiesen, sondern auch in nicht-hämatopoetischen Zellen aus der Wangenschleimhaut. Allerdings ist einschränkend anzumerken, dass sich dieser Patient zum Zeitpunkt der Probenabnahme nicht in kompletter Remission befand, weshalb wir dieses Ergebnis als „nicht auswertbar“ interpretierten. In der Regel werden Wangenschleimhaut-Abstriche in der kompletten Remission durchgeführt, da nur dann das Risiko einer Kontamination durch infiltrierte leukämische Zellen zu vernachlässigen ist. Um dennoch den Verdacht auf eine (eher seltene) Keimbahnmutation weiter zu erhärten wurde versucht, CD33-positive Zellen der myeloischen Reihe und CD3-positive T-Zellen aus dem Knochenmark des Patienten mittels FACS zu trennen und die aus ihnen gewonnene DNA jeweils auf *CEBPA*-Mutationen zu untersuchen. Im Falle einer somatischen Mutation sollte in den nicht-myeloischen Zellen keine *CEBPA*-Mutation zu finden sein, während bei einer Keimbahnmutation sämtliche Zellen die Mutation tragen sollten. Die Trennung der einzelnen Zell-Fractionen war jedoch nicht erfolgreich, so dass diese Methode als zusätzlicher Hinweis auf eine Keimbahnmutation nicht weiterführend war. Der hier erhobene Befund einer Keimbahn-Doppelmutation wäre insofern ungewöhnlich, als in der Regel nur eine, in der Regel N-terminale Mutation als Keimbahnmutation auftritt und die zweite, in der Regel C-terminale Mutation, als somatische Mutation erworben wird. Daher muss hier eher von einer Kontamination des Wangenschleimhaut-Abstrich-Materials mit leukämischen Zellen ausgegangen werden. Da der Patient zum Zeitpunkt der hier beschriebenen Untersuchungen bereits verstorben war und kein Remissionsmaterial zur Verfügung stand, waren weiterführende Untersuchungen nicht möglich.

Insgesamt waren Patienten mit einer *CEBPA*-Mutation weniger häufig von einer gleichzeitigen Mutation im *FLT3*-Gen (*FLT3-ITD*, *FLT3-TKD*) oder *NPM1*-Gen betroffen als Patienten mit Wildtyp-*CEBPA*. Allerdings erreichte dieser Unterschied aufgrund der geringen Fallzahl nur für den molekularen Marker *NPM1* statistische Signifikanz: Während 44% der Patienten mit Wildtyp-*CEBPA* eine *NPM1*-Mutation aufwiesen, waren dies unter den Patienten mit einer *CEBPA*-Mutation nur 15%. Insbesondere zeigte keiner der Patienten mit einer *CEBPA*-Doppelmutation eine zusätzliche *NPM1*-Mutation. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Beobachtung bei jüngeren Erwachsenen mit AML, dass Patienten mit einer *CEBPA*-Doppelmutation seltener *FLT3*-Mutationen und sehr viel seltener *NPM1*-Mutationen aufwiesen als Patienten mit Wildtyp-*CEBPA* (Green et al. 2010). Interessanterweise fanden Green et al. keinen Unterschied zwischen Patienten mit Wildtyp-*CEBPA* und Patienten mit einer *CEBPA*-Einfachmutation bezüglich der Häufigkeit von *NPM1*-Mutationen (39% bzw. 42% der Patienten mit Wildtyp-*CEBPA* bzw. *CEBPA*-Einfachmutation hatten eine *NPM1*-Mutation), wohingegen nur 3% der Patienten mit einer *CEBPA*-Doppelmutation gleichzeitig eine *NPM1*-Mutation zeigten. Die geringe Koinzidenz von *CEBPA*-Doppelmutationen mit weiteren genetischen Veränderungen ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der nach der two-hit-Hypothese für die Onkogenese notwendige second hit bereits durch die zweite *CEBPA*-Mutation zustande kommt. Darüber hinaus fanden Kohlmann et al. (2010) im Rahmen einer Genexpressions-Analyse in 251 CN-AML-Patienten, dass *NPM1*-Mutationen mit einer erhöhten Expression einer Reihe von *HOX*-Genen verbunden waren, während *CEBPA*-Mutationen in einer verringerten Expression dieser Gene resultierten. Da *HOX*-Gene (auch homöotische Selektorgene genannt) Transkriptionsfaktoren kodieren, welche u.a. für die Zellproliferation und -differenzierung eine wichtige Rolle spielen, besteht die Möglichkeit eines funktionellen Antagonismus von *CEBPA*- und *NPM1*-Mutationen, sodass deren Kombination nicht zu einem AML-Phänotyp führt.

In Bezug auf die biologischen Parameter Alter und Geschlecht sowie die klinischen Parameter Hämoglobinwert, Thrombozyten- und Leukozytenzahl, Blastenanteil im peripherem Blut und Knochenmark, LDH-Aktivität im Plasma und extramedullärer Gewebe-Befall mit leukämischen Zellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne *CEBPA*-Mutation. Im

Gegensatz dazu fanden Fröhling et al. (2004) bei jüngeren CN-AML-Patienten signifikant höhere Hämoglobinwerte und niedrigere Thrombozytenzahlen in Individuen mit einer *CEBPA*-Mutation im Vergleich zu solchen mit Wildtyp-*CEBPA*.

In der vorliegenden Studie zeigten Patienten mit und ohne *CEBPA*-Mutation kein unterschiedliches Chemotherapieansprechen in Bezug auf das Erreichen einer komplette Remission, refraktäre Erkrankung und frühen Tod. Dies stimmt überein mit früheren Beobachtungen in jüngeren CN-AML-Patienten (Fröhling et al. 2004; Green et al. 2010; Taskesen et al. 2011), die ebenfalls nicht auf ein signifikant besseres Therapieansprechen von Patienten mit *CEBPA*-Mutation hinwiesen. Allerdings fanden inzwischen mehrere Arbeitsgruppen (Green et al. 2010; Dufour et al. 2010; Taskesen et al. 2011) höhere Remissionsraten und niedrigere Raten von refraktärer Erkrankung in Patienten mit einer *CEBPA*-Doppelmutation im Vergleich zu Patienten mit einfach-mutiertem oder nicht mutiertem *CEBPA*.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt einer *CEBPA*-Mutation auf das rezidiv- und ereignisfreie Überleben sowie das Gesamtüberleben untersucht.

Obwohl sich aufgrund der zu geringen Fallzahl keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem *CEBPA*-Mutationsstatus und dem rezidivfreien Überleben der Patienten ergab, zeigte sich dennoch ein sehr deutlicher Trend zu einem erhöhten rezidivfreien Überleben bei Patienten mit einer *CEBPA*-Mutation. Während 74% der Patienten mit Wildtyp-*CEBPA* innerhalb des Beobachtungszeitraums von etwa vier Jahren ein Rezidiv erlitten, waren dies bei den Patienten mit einer *CEBPA*-Mutation nur 44%. Dabei war auffällig, dass die Kaplan-Maier-Kurve für Patienten ohne *CEBPA*-Mutation über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg den erwarteten exponentiellen Abfall zeigte, während die entsprechende Kurve für Patienten mit einer *CEBPA*-Mutation einen biphasischen Verlauf aufwies (in den ersten acht Monaten ähnliche prozentuale Rezidivrate wie Patienten mit Wildtyp-*CEBPA*, danach Erreichen eines stabilen Plateaus ohne weitere Rezidive; vgl. Abb. 9). Eine Subgruppen-Analyse von Patienten mit monoallelischer und biallelischer *CEBPA*-Mutation ergab für Patienten mit biallelischer Mutation einen Trend zu längerem rezidivfreien Überleben, der jedoch aufgrund der niedrigen Fallzahlen nicht signifikant war.

Auch im Hinblick auf das ereignisfreie Überleben war das Vorhandensein einer *CEBPA*-Mutation ein prognostisch günstiger Faktor: Während nur 16% der Patienten mit Wildtyp-*CEBPA* im Beobachtungszeitraum ereignisfrei überlebten, waren dies bei Patienten mit einer *CEBPA*-Mutation nahezu doppelt so viele (31%). Jedoch war wegen der geringen Fallzahl auch hier der Unterschied nicht statistisch signifikant.

Ebenso wie das rezidivfreie Überleben und das ereignisfreie Überleben wurde das Gesamtüberleben durch eine *CEBPA*-Mutation günstig beeinflusst: Mit 46% lag die Quote der Überlebenden in der Population der Patienten mit *CEBPA*-Mutation deutlich höher als bei Patienten mit Wildtyp-*CEBPA* (29%). Dabei zeigte sich bei Patienten mit biallelischer Mutation ein deutlicher Trend zu einem besseren Gesamtüberleben als bei Patienten mit monoallelischer Mutation (vgl. Abb. 13). Allerdings erreichte dieser Unterschied wegen der geringen Fallzahl keine Signifikanz.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass *CEBPA*-Mutationen bei älteren AML-Patienten deutlich seltener vorkommen als bei jüngeren Patienten. Zudem ist der Anteil von Doppelmutationen an allen *CEBPA*-Mutationen nur etwa halb so hoch wie bei jüngeren Patienten. Dennoch haben *CEBPA*-Mutationen auch in älteren CN-AML-Patienten einen prognostisch günstigen Effekt haben, der – ähnlich wie für jüngere Patienten beschrieben (Dufour et al. 2010; Taskesen et al. 2011) – bei *CEBPA*-Doppelmutationen stärker ausgeprägt zu sein scheint als bei Einfachmutationen. Wegen der geringen Inzidenz von *CEBPA*-Mutationen in der hier vorliegenden Studienpopulation bedarf es jedoch einer Bestätigung dieser Schlussfolgerung in größeren (multizentrischen) Studien bzw. einer retrospektiven Metaanalyse von Studien mit älteren CN-AML-Patienten. In analogen Untersuchungen an AML-Patienten mit *NPM1*-Mutationen konnte bereits gezeigt werden, dass sich der Genotyp “mutiertes *NPM1* ohne *FLT3-ITD*“ positiv auf das Therapieansprechen nicht nur bei jüngeren Patienten, sondern auch bei älteren Patienten auswirkt (Schlenk et al. 2009; Büchner et al. 2009; Becker et al. 2010). Sollte sich der in dieser Arbeit beschriebene prognostisch günstige Effekt von *CEBPA* (Doppel)-Mutationen bei älteren CN-AML-Patienten in weiteren Studien bestätigen, hätte dies Implikationen für künftige Therapie-Entscheidungen: Häufig erhalten ältere Patienten aus Sorge vor therapiebedingter Mortalität keine intensive Chemotherapie, da sie pauschal

als “physically unfit“ eingestuft werden. Jedoch haben neuere Studien den Nutzen einer intensivierten Chemotherapie in Patienten mit prognostisch günstigen molekular- und zytogenetischen Markern belegt (Döhner et al. 2010; Burnett et al. 2011). Nach den hier vorliegenden Ergebnissen wären ältere CN-AML-Patienten mit einer *CEBPA* (Doppel)-Mutation – ähnlich wie Patienten mit mutiertem *NPM1* (ohne *FLT3-ITD*) – einer günstigen Risikogruppe zuzuordnen und damit potenziell Kandidaten für eine intensivierte Chemotherapie.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Inzidenz und prognostische Bedeutung von Mutationen des CCAAT/enhancer-binding protein alpha ($CEBP\alpha$) Gens (*CEBPA*) bei 181 älteren (≥ 60 Jahre) Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) und normalem Karyotyp untersucht.

Bei 13 (7,2%) der Patienten wurden insgesamt 16 verschiedenen *CEBPA*-Mutationen identifiziert, wovon neun als Einzelmutation, drei als kombinierte N- und C-terminale Doppelmutation, und eine als N-terminale homozygot-biallelische (Doppel-) Mutation charakterisiert wurden. Mit einem Anteil von nur 31% an allen *CEBPA*-Mutationen lag die Frequenz von Doppelmutationen bei diesen älteren Patienten deutlich unter dem entsprechenden Anteil bei jüngeren AML-Patienten (je nach untersuchter Altersgruppe zwischen 57% und 82%).

Der weitaus größte Teil (9/10) der N-terminalen Mutationen resultierte in einem frameshift, in dessen Folge es zur Bildung eines mehr oder weniger stark verkürzten, (vermutlich) dysfunktionellen $C/EBP\alpha$ kam. Dagegen hatten die N-terminalen Mutationen in den meisten Fällen (8/10) keine Auswirkung auf die Bildung der dominant-negativen 30 kDa-Isoform des $CEBP\alpha$ (p30).

Sechs der *CEBPA*-Mutationen waren C-terminale Mutationen, die überwiegend (4/6) in einem frameshift resultierten. Bei den übrigen beiden Mutationen wurde jeweils eine Aminosäure in der bZIP-Domäne durch Prolin ersetzt, weswegen mit erheblichen Auswirkungen auf die Sekundärstruktur des resultierenden $C/EBP\alpha$ -Proteins zu rechnen ist. Bei nahezu allen (5/6) der hier charakterisierten C-terminalen Mutationen ist mit einem Funktionsverlust sowohl des $C/EBP\alpha$ als auch des p30 zu rechnen.

Insgesamt waren Patienten mit einer *CEBPA*-Mutation weniger häufig von einer gleichzeitigen Mutation des *FLT3*-Gens (*FLT3-ITD*, *FLT3-TKD*) oder *NPM1*-Gens betroffen als Patienten mit Wildtyp-*CEBPA*. Allerdings erreichte dieser Unterschied aufgrund der geringen Fallzahl nur für den molekularen Marker *NPM1* statistische Signifikanz. Keiner der Patienten mit einer *CEBPA*-Doppelmutation wies eine zusätzliche *NPM1*-Mutation auf.

In dieser Studie zeigten Patienten mit und ohne *CEBPA*-Mutation kein unterschiedliches Chemotherapieansprechen in Bezug auf komplette Remission, refraktäre Erkrankung und frühen Tod.

Obwohl sich aufgrund der zu geringen Fallzahl keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem *CEBPA*-Mutationsstatus und dem klinischen Verlauf ergab, zeigte sich dennoch ein sehr klarer Trend zu einer Verbesserung des rezidiv- und ereignisfreien Überlebens sowie des Gesamtüberlebens bei Patienten mit einer *CEBPA*-Mutation: Während 74% der Patienten mit Wildtyp-*CEBPA* innerhalb des Beobachtungszeitraums von etwa vier Jahren ein Rezidiv erlitten, waren dies bei den Patienten mit einer *CEBPA*-Mutation nur 44%. Eine Subgruppen-Analyse von Patienten mit monoallelischer bzw. biallelischer *CEBPA*-Mutation ergab für Patienten mit biallelischer Mutation einen Trend zu längerem rezidivfreiem Überleben. Auch im Hinblick auf das ereignisfreie Überleben war das Vorhandensein einer *CEBPA*-Mutation ein prognostisch günstiger Faktor: Während nur 16% der Patienten mit Wildtyp-*CEBPA* im Beobachtungszeitraum ereignisfrei überlebten, waren dies bei Patienten mit einer *CEBPA*-Mutation nahezu doppelt so viele (31%). Auch das Gesamtüberleben wurde durch eine *CEBPA*-Mutation günstig beeinflusst: Mit 46% überlebten deutlich mehr Patienten mit *CEBPA*-Mutation als Patienten mit Wildtyp-*CEBPA* (29%). Dabei zeigte sich bei Patienten mit biallelischer Mutation ein deutlicher Trend zu einem besseren Gesamtüberleben als bei Patienten mit monoallelischer Mutation.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass *CEBPA*-Mutationen auch bei älteren AML-Patienten mit normalem Karyotyp einen prognostisch günstigen Effekt haben, der wie bei jüngeren Patienten im Falle von *CEBPA*-Doppelmutationen stärker ausgeprägt zu sein scheint als bei Einfachmutationen. Wegen der geringen Inzidenz von *CEBPA*-Mutationen in der hier vorliegenden Studienpopulation bedarf es jedoch einer Bestätigung dieser Schlussfolgerung in größeren (multizentrischen) Studien bzw. einer retrospektiven Metaanalyse von Studien mit älteren CN-AML-Patienten. Sollte sich der in dieser Arbeit beschriebene prognostisch günstige Effekt von *CEBPA* (Doppel)-Mutationen bei älteren zytogenetisch normalen AML-Patienten in weiteren Studien bestätigen, hätte dies Implikationen für künftige Therapie-Entscheidungen: Neuere Studien haben klar den Nutzen einer intensivierten Chemotherapie in Patienten mit prognostisch günstigen molekular- und zytogenetischen Markern belegt. Nach den hier vorliegenden Ergebnissen wären ältere AML-Patienten mit normalem Karyotyp und einer *CEBPA* (Doppel)-Mutation einer günstigen Risikogruppe zuzuordnen und damit potenziell Kandidaten für eine intensivierte Therapie.

6 Literaturverzeichnis

1. Antonson P, Xanthopoulos KG: Molecular cloning, sequence, and expression patterns of the human gene encoding CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha). *Biochem Biophys Res Commun* 215: 106-113 (1995)
2. Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, Slovak ML, Willman CL, Godwin JE, Anderson JE, Petersdorf SH: Age and acute myeloid leukemia. *Blood* 107: 3481-3485 (2006)
3. Baldus CD, Bullinger L: Gene expression with prognostic implications in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Semin Oncol* 35: 356-364 (2008)
4. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, Meijer J, van Oosterhoud S, van Putten WL, Valk PJ, Berna Beverloo H, Tenen DG, Löwenberg B, Delwel R: Biallelic mutations in the *CEBPA* gene and low *CEBPA* expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML. *Hematol J* 4:31-40 (2003).
5. Becker H, Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Whitman SP, Wu YZ, Schwind S, Paschka P, Powell BL, Carter TH, Koltz JE, Wetzler M, Carroll AJ, Baer MR, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD: Favorable prognostic impact of *NPM1* mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene- and microRNA-expression signatures: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 28: 596-604 (2010)
6. Behre G, Singh SM, Liu H, Bortolin LT, Christopheit M, Radomska HS, Rangatia J, Hiddemann W, Friedman AD, Tenen DG: Ras signaling enhances the activity of C/EBP alpha to induce granulocytic differentiation by phosphorylation of serine 248. *J Biol Chem* 277: 26293-26299 (2002)
7. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C: Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103: 620-625 (1985)
8. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C: Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33: 451-8 (1976)
9. Bloomfield CD: Clinical importance of genetic findings in adult AML. *Int J Hematol* 76: 176-177 (2002)
10. Bloomfield CD, Marcucci G, Döhner K, Döhner H: Acute myeloid leukemia. Introduction. *Semin Oncol* 35: 324-325 (2008)

11. Büchner T, Berdel WE, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S, Müller-Tidow C, Braess J, Spiekermann K, Kienast J, Staib P, Grüneisen A, Kern W, Reichle A, Maschmeyer G, Aul C, Lengfelder E, Sauerland MC, Heinecke A, Wörmann B, Hiddemann W: Age-related risk profile and chemotherapy dose response in acute myeloid leukemia: a study by the German Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group. *J Clin Oncol* 27: 61-69 (2009)
12. Burnett A, Wetzler M, Löwenberg B: Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 29: 487-494 (2011)
13. Chan WI, Huntly BJ: Leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Semin Oncol* 35: 326-335 (2008)
14. Chang JS, Santhanam R, Trotta R, Neviani P, Eiring AM, Briercheck E, Ronchetti M, Roy DC, Calabretta B, Caligiuri MA, Perrotti D: High levels of the BCR/ABL oncoprotein are required for the MAPK-hnRNP-E2 dependent suppression of C/EBPalpha-driven myeloid differentiation. *Blood* 110: 994-1003 (2007)
15. Döhner K, Tobis K, Ulrich R, Fröhling S, Benner A, Schlenk RF, Döhner H: Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. *J Clin Oncol* 20: 3254-3261 (2002)
16. Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rücker FG, Corbacioglu A, Bullinger L, Fröhling S, Döhner H: Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 106: 3740-3746 (2005)
17. Döhner K, Döhner H: Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 93: 976-982 (2008)
18. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Löwenberg B, Bloomfield CD; European LeukemiaNet: Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 115: 453-474 (2010)
19. Dufour A, Schneider F, Metzeler KH, Hoster E, Schneider S, Zellmeier E, Benthaus T, Sauerland MC, Berdel WE, Büchner T, Wörmann B, Braess J, Hiddemann W, Bohlander SK, Spiekermann K: Acute myeloid leukemia with biallelic *CEBPA* gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome. *J Clin Oncol* 28: 570-577 (2010)

20. Etienne A, Esterni B, Charbonnier A, Mozziconacci MJ, Arnoulet C, Coso D, Puig B, Gastaut JA, Maraninchi D, Vey N: Comorbidity is an independent predictor of complete remission in elderly patients receiving induction chemotherapy for acute myeloid leukemia. *Cancer* 109: 1376-1383 (2007)
21. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, La Starza R, Diverio D, Colombo E, Santucci A, Bigerna B, Pacini R, Pucciarini A, Liso A, Vignetti M, Fazi P, Meani N, Pettirossi V, Saglio G, Mandelli F, Lo-Coco F, Pelicci PG, Martelli MF; GIMEMA Acute Leukemia Working Party: Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 352: 254-266 (2005)
22. Farag SS, Archer KJ, Mrózek K, Ruppert AS, Carroll AJ, Vardiman JW, Pettenati MJ, Baer MR, Qumsiyeh MB, Koduru PR, Ning Y, Mayer RJ, Stone RM, Larson RA, Bloomfield CD: Pretreatment cytogenetics add to other prognostic factors predicting complete remission and long-term outcome in patients 60 years of age or older with acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 8461. *Blood* 108: 63-73 (2006)
23. Figueroa ME, Skrabanek L, Li Y, Jiemjit A, Fandy TE, Paietta E, Fernandez H, Tallman MS, Grealley JM, Carraway H, Licht JD, Gore SD, Melnick A: MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood* 114: 3448-3458 (2009)
24. Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K: *CEBPA* mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol* 22: 624-633 (2004)
25. Fröhling S, Schlenk RF, Kayser S, Morhardt M, Benner A, Döhner K, Döhner H; German-Austrian AML Study Group: Cytogenetics and age are major determinants of outcome in intensively treated acute myeloid leukemia patients older than 60 years: results from AMLSG trial AML HD98-B. *Blood* 108: 3280-3288 (2006)
26. Fuchs O, Provaznikova D, Kocova M, Kostecka A, Cvekova P, Neuwirtova R, Kobylka P, Cermak J, Brezinova J, Schwarz J, Markova J, Salaj P, Klamova H, Maaloufova J, Lemez P, Novakova L, Benesova K: *CEBPA* polymorphisms and mutations in patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma. *Blood Cells Mol Dis* 40: 401-405 (2008)
27. Gaidzik V, Döhner K: Prognostic implications of gene mutations in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Semin Oncol* 35: 346-355 (2008)
28. Giles FJ, Borthakur G, Ravandi F, Faderl S, Verstovsek S, Thomas D, Wierda W, Ferrajoli A, Kornblau S, Pierce S, Albitar M, Cortes J, Kantarjian H: The haematopoietic cell transplantation comorbidity index score is predictive of early death and survival in patients over 60 years of age receiving induction therapy for acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 136: 624-627 (2007)

29. Gilliland DG, Griffin JD: The roles of *FLT3* in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 100: 1532-1542 (2002)
30. Green CL, Koo KK, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE: Prognostic significance of *CEBPA* mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double *CEBPA* mutations and the interaction with *FLT3* and *NPM1* mutations. *J Clin Oncol* 28: 2739-2747 (2010)
31. Gregory TK, Wald D, Chen Y, Vermaat JM, Xiong Y, Tse W: Molecular prognostic markers for adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *J Hematol Oncol* 2: 23 (2009)
32. Hackanson B, Bennett KL, Brena RM, Jiang J, Claus R, Chen SS, Blagitko-Dorfs N, Maharry K, Whitman SP, Schmittgen TD, Lübbert M, Marcucci G, Bloomfield CD, Plass C: Epigenetic modification of CCAAT/enhancer binding protein alpha expression in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 68: 3142-3151 (2008)
33. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD: World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 17: 3835-3849 (1999)
34. Heerema-McKenney A, Arber DA: Acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 23: 633-654 (2009)
35. Helbling D, Mueller BU, Timchenko NA, Hagemeyer A, Jotterand M, Meyer-Monard S, Lister A, Rowley JD, Huegli B, Fey MF, Pabst T: The leukemic fusion gene *AML1-MDS1-EVI1* suppresses *CEBPA* in acute myeloid leukemia by activation of Calreticulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13312-13317 (2004)
36. Helbling D, Mueller BU, Timchenko NA, Schardt J, Eyer M, Betts DR, Jotterand M, Meyer-Monard S, Fey MF, Pabst T: CFBF-SMMHC is correlated with increased calreticulin expression and suppresses the granulocytic differentiation factor *CEBPA* in AML with *inv(16)*. *Blood* 106: 1369-1375 (2005)
37. Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Howlander N, Altekruse SF, Feuer EJ, Huang L, Mariotto A, Miller BA, Lewis DR, Eisner MP, Stinchcomb DG, Edwards BK: SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006, National Cancer Institute. Bethesda, MD; <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html> (10.08.2009)
38. Jaiswal S, Jamieson CH, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R, Traver D, van Rooijen N, Weissman IL: CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell* 138: 271-285 (2009)
39. Jost E, do O N, Wilop S, Herman JG, Osieka R, Galm O: Aberrant DNA methylation of the transcription factor *C/EBPalpha* in acute myelogenous leukemia. *Leuk Res* 33: 443-449 (2009)

40. Juhl-Christensen C, Bomberg M, Melsvik D, Hokland P, Nyvold CG: Capillary gel electrophoresis: a simple method for identification of mutations and polymorphisms in the *CEBPA* gene in patients with acute myeloid leukaemia. *Eur J Haematol* 81: 273-280 (2008)
41. Kantarjian H, O'Brien S, Cortes J, Giles F, Faderl S, Jabbour E, Garcia-Manero G, Wierda W, Pierce S, Shan J, Estey E: Results of intensive chemotherapy in 998 patients age 65 years or older with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: predictive prognostic models for outcome. *Cancer* 106: 1090-1098 (2006)
42. Kato N, Kitaura J, Doki N, Komeno Y, Watanabe-Okochi N, Togami K, Nakahara F, Oki T, Enomoto Y, Fukuchi Y, Nakajima H, Harada Y, Harada H, Kitamura T: Two types of C/EBP α mutations play distinct but collaborative roles in leukemogenesis: lessons from clinical data and BMT models. *Blood* 117: 221-233 (2011)
43. Kirstetter P, Schuster MB, Bereshchenko O, Moore S, Dvinge H, Kurz E, Theilgaard-Mönch K, Månsson R, Pedersen TA, Pabst T, Schrock E, Porse BT, Jacobsen SE, Bertone P, Tenen DG, Nerlov C: Modeling of C/EBP α mutant acute myeloid leukemia reveals a common expression signature of committed myeloid leukemia-initiating cells. *Cancer Cell* 13: 299-310 (2008)
44. Klepin HD, Balducci L: Acute myelogenous leukemia in older adults. *Oncologist* 14: 222-232 (2009)
45. Kohlmann A, Bullinger L, Thiede C, Schaich M, Schnittger S, Döhner K, Dugas M, Klein HU, Döhner H, Ehninger G, Haferlach T: Gene expression profiling in AML with normal karyotype can predict mutations for molecular markers and allows novel insights into perturbed biological pathways. *Leukemia* 24: 1216-1220 (2010)
46. Koschmieder S, Halmos B, Levantini E, Tenen DG: Dysregulation of the C/EBP α Differentiation Pathway in Human Cancer. *J Clin Oncol* 27: 619-628 (2009)
47. Kuendgen A, Germing U: Emerging treatment strategies for acute myeloid leukemia (AML) in the elderly. *Cancer Treat Rev* 35: 97-120 (2009)
48. Laubach J, Rao AV: Current and emerging strategies for the management of acute myeloid leukemia in the elderly. *Oncologist* 13: 1097-1108 (2008)
49. Leecharendkeat A, Tocharoentanaphol C, Auewarakul CU: CCAAT/enhancer binding protein- α polymorphisms occur more frequently than mutations in acute myeloid leukemia and exist across all cytogenetic risk groups and leukemia subtypes. *Int J Cancer* 123: 2321-2326 (2008)

50. Leith CP, Kopecky KJ, Godwin J, McConnell T, Slovak ML, Chen IM, Head DR, Appelbaum FR, Willman CL: Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. *Blood* 89: 3323-3329 (1997)
51. Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, Eijdens L, Slovak ML, McConnell TS, Head DR, Weick J, Grever MR, Appelbaum FR, Willman CL: Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood* 94: 1086-1099 (1999)
52. Löwenberg B, Downing JR, Burnett A: Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 341: 1051-1062 (1999)
53. Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, Pang WW, Jaiswal S, Gibbs KD Jr, van Rooijen N, Weissman IL: CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* 138: 286-299 (2009)
54. Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Vukosavljevic T, Paschka P, Whitman SP, Langer C, Baldus CD, Liu CG, Ruppert AS, Powell BL, Carroll AJ, Caligiuri MA, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD: Prognostic significance of, and gene and microRNA expression signatures associated with, *CEBPA* mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with high-risk molecular features: A Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 26: 5078-5087 (2008)
55. Marcucci G, Haferlach T, Döhner H: Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 29: 475-486 (2011)
56. Mrózek K, Heinonen K, Bloomfield CD: Prognostic value of cytogenetic findings in adults with acute myeloid leukemia. *Int J Hematol* 72: 261-271 (2000)
57. Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD: Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 18: 115-136 (2004)
58. Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD: Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood* 109: 431-448 (2007)
59. Mueller BU, Pabst T: C/EBPalpha and the pathophysiology of acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol* 13: 7-14 (2006)
60. Nanri T, Uike N, Kawakita T, Iwanaga E, Hoshino K, Mitsuya H, Asou N: A pedigree harboring a germ-line N-terminal C/EBPalpha mutation and development of acute myeloblastic leukemia with a somatic C-terminal C/EBPalpha mutation: *Blood* 108: Abstract 1916 (2006)

61. Nerlov C, Ziff EB: Three levels of functional interaction determine the activity of CCAAT/enhancer binding protein-alpha on the serum albumin promoter. *Genes Dev* 8: 350-362 (1994)
62. Nerlov C: C/EBPalpha mutations in acute myeloid leukaemias. *Nat Rev Cancer* 4: 394-400 (2004)
63. Nimer SD: Myelodysplastic syndromes. *Blood* 111: 4841-4851 (2008)
64. Olofsson LE, Orho-Melander M, William-Olsson L, Sjöholm K, Sjöström L, Groop L, Carlsson B, Carlsson LM, Olsson B: CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBPalpha) in adipose tissue regulates genes in lipid and glucose metabolism and a genetic variation in C/EBPalpha is associated with serum levels of triglycerides. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 4880-4886 (2008)
65. Owen C, Barnett M, Fitzgibbon J: Familial myelodysplasia and acute myeloid leukaemia – a review. *Br J Haematol* 140: 123-132 (2008)
66. Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S, Behre G, Hiddemann W, Tenen DG. (2001a): Dominant-negative mutations of *CEBPA*, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 27: 263-270 (2001)
67. Pabst T, Mueller BU, Harakawa N, Schoch C, Haferlach T, Behre G, Hiddemann W, Zhang DE, Tenen DG. (2001b): AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat Med* 7: 444-451 (2001)
68. Pabst T, Mueller BU: Transcriptional dysregulation during myeloid transformation in AML. *Oncogene* 26: 6829-6837 (2007)
69. Pabst T, Eyholzer M, Haefliger S, Schardt J, Mueller BU: Somatic *CEBPA* mutations are a frequent second event in families with germline *CEBPA* mutations and familial acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 26: 5088-5093 (2008)
70. Pabst T, Eyholzer M, Fos J, Mueller BU: Heterogeneity within AML with *CEBPA* mutations; only *CEBPA* double mutations, but not single *CEBPA* mutations are associated with favourable prognosis. *Br J Cancer* 100: 1343-1346 (2009)
71. Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, Cayuela JM, Tigaud I, de Botton S, Thomas X, Raffoux E, Lamandin C, Castaigne S, Fenaux P, Dombret H; ALFA Group: Favorable prognostic significance of *CEBPA* mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood* 100: 2717-2723 (2002)
72. Radomska HS, Huettner CS, Zhang P, Cheng T, Scadden DT, Tenen DG: CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Mol Cell Biol* 18: 4301-4314 (1998)

73. Radomska HS, Bassères DS, Zheng R, Zhang P, Dayaram T, Yamamoto Y, Sternberg DW, Lokker N, Giese NA, Bohlander SK, Schnittger S, Delmotte MH, Davis RJ, Small D, Hiddemann W, Gilliland DG, Tenen DG: Block of C/EBP alpha function by phosphorylation in acute myeloid leukemia with FLT3 activating mutations. *J Exp Med* 203: 371-381 (2006)
74. Rao AV, Valk PJ, Metzeler KH, Acharya CR, Tuchman SA, Stevenson MM, Rizzieri DA, Delwel R, Buske C, Bohlander SK, Potti A, Löwenberg B: Age-specific differences in oncogenic pathway dysregulation and anthracycline sensitivity in patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 27: 5580-5586 (2009)
75. Renneville A, Mialou V, Philippe N, Kagialis-Girard S, Biggio V, Zobot MT, Thomas X, Bertrand Y, Preudhomme C.: Another pedigree with familial acute myeloid leukemia and germline *CEBPA* mutation. *Leukemia* 23: 804-806 (2009a)
76. Renneville A, Boissel N, Gachard N, Naguib D, Bastard C, de Botton S, Nibourel O, Pautas C, Reman O, Thomas X, Gardin C, Terré C, Castaigne S, Preudhomme C, Dombret H: The favorable impact of *CEBPA* mutations in patients with acute myeloid leukemia is only observed in the absence of associated cytogenetic abnormalities and *FLT3* internal duplication. *Blood* 113: 5090-5093 (2009b)
77. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467 (1977)
78. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Döhner H; German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group: Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 358: 1909-1918 (2008)
79. Schlenk RF, Döhner K, Kneba M, Götze K, Hartmann F, Del Valle F, Kirchen H, Koller E, Fischer JT, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Groner S, Krebs B, Kayser S, Corbacioglu A, Anhalt A, Benner A, Fröhling S, Döhner H; German-Austrian AML Study Group (AMLSG): Gene mutations and response to treatment with all-trans retinoic acid in elderly patients with acute myeloid leukemia. Results from the AMLSG Trial AML HD98B. *Haematologica* 94: 54-60 (2009)
80. Sellick GS, Spendlove HE, Catovsky D, Pritchard-Jones K, Houlston RS: Further evidence that germline *CEBPA* mutations cause dominant inheritance of acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 19: 1276-1278 (2005)
81. Smith ML, Cavenagh JD, Lister TA, Fitzgibbon J: Mutation of *CEBPA* in familial acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 351: 2403-2407 (2004)
82. Song JJ, Kingston RE: WDR5 Interacts with Mixed Lineage Leukemia (MLL) Protein via the Histone H3-binding Pocket. *J Biol Chem* 283: 35258-35264 (2008)

83. Stelljes M, Corbacioglu A, Schlenk RF, Döhner K, Frühwald MC, Rossig C, Ehler K, Silling G, Müller-Tidow C, Juergens H, Döhner H, Berdel WE, Kienast J, Koschmieder S: Allogeneic stem cell transplant to eliminate germline mutations in the gene for CCAAT-enhancer-binding protein α from hematopoietic cells in a family with AML. *Leukemia* 25: 1209-1210 (2011)
84. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Theile J, Vardiman JW: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, Lyon, S. 109-138 (2008)
85. Taskesen E, Bullinger L, Corbacioglu A, Sanders M, Erpelinck CA, Wouters BJ, van der Poel-van de Luytgaarde S, Damm F, Krauter J, Ganser A, Schlenk RF, Löwenberg B, Delwel R, Döhner H, Valk PJ, Döhner K: Prognostic impact, concurrent genetic mutations and gene expression features of AML with *CEBPA* mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML: further evidence for *CEBPA* double mutant AML as a distinctive disease entity. *Blood* 117: 2469-2475 (2011)
86. Tyner JW, Erickson H, Deininger MW, Willis SG, Eide CA, Levine RL, Heinrich MC, Gattermann N, Gilliland DG, Druker BJ, Loriaux MM: High-throughput sequencing screen reveals novel, transforming RAS mutations in myeloid leukemia patients. *Blood* 113: 1749-1755 (2009)
87. Wedding U, Röhrig B, Klippstein A, Fricke HJ, Sayer HG, Höffken K: Impairment in functional status and survival in patients with acute myeloid leukaemia. *J Cancer Res Clin Oncol* 132: 665-671 (2006)
88. Weinberg OK, Seetharam M, Ren L, Seo K, Ma L, Merker JD, Gotlib J, Zehnder JL, Arber DA: Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system. *Blood* 113: 1906-1908 (2009)
89. Wheatley K, Brookes CL, Howman AJ, Goldstone AH, Milligan DW, Prentice AG, Moorman AV, Burnett AK: United Kingdom National Cancer Research Institute Haematological Oncology Clinical Studies Group and Acute Myeloid Leukaemia Subgroup: Prognostic factor analysis of the survival of elderly patients with AML in the MRC AML11 and LRF AML14 trials. *Br J Haematol* 145: 598-605 (2009)
90. Wouters BJ, Louwers I, Valk PJ, Löwenberg B, Delwel R: A recurrent in-frame insertion in a *CEBPA* transactivation domain is a polymorphism rather than a mutation that does not affect gene expression profiling-based clustering of AML. *Blood* 109: 389-390 (2007)
91. Wouters BJ, Löwenberg B, Erpelinck-Verschueren CA, van Putten WL, Valk PJ, Delwel R: Double *CEBPA* mutations, but not single *CEBPA* mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood* 113: 3088-3091 (2009)

92. Zhang DE, Zhang P, Wang ND, Hetherington CJ, Darlington GJ, Tenen DG: Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 569-574 (1997)
93. Zhang P, Iwasaki-Arai J, Iwasaki H, Fenyus ML, Dayaram T, Owens BM, Shigematsu H, Levantini E, Huettner CS, Lekstrom-Himes JA, Akashi K, Tenen DG: Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. Immunity 21 :853-863 (2004)

7 Anhang

7.1 CEBPA Referenz-Sequenz (GenBank: U34070.1)

LOCUS HSU34070 3318 bp DNA linear PRI 27-OCT-1995
DEFINITION Human CCAAT/enhancer binding protein alpha gene, complete cds.
ACCESSION U34070
VERSION U34070.1 GI:1041732
KEYWORDS Transcription factor; DNA binding protein.
SOURCE Homo sapiens (human)
ORGANISM [Homo sapiens](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE 1 (bases 1 to 3318)
AUTHORS Antonson, P. and Xanthopoulos, K.G.
TITLE Molecular cloning, sequence, and expression patterns of the human
gene encoding CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha)
JOURNAL Biochem. Biophys. Res. Commun. 215 (1), 106-113 (1995)
PUBMED [7575576](#)
REFERENCE 2 (bases 1 to 3318)
AUTHORS Antonson, P. and Xanthopoulos, K.G.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (16-AUG-1995) Per Antonson, Department of Bioscience at
Novum, Karolinska Institute, Huddinge S-141 57, Sweden
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..3318
/organism="Homo sapiens"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:9606"
/chromosome="19"
/map="19q13.1"
/tissue_type="umbilical cord"
[promoter](#) 1..471
[TATA signal](#) 442..448
[CDS](#) 592..1668
/note="bZIP transcription factor; C/EBPa"
/codon_start=1
/product="CCAAT/enhancer binding protein alpha"
/protein_id="[AAC50235.1](#)"
/db_xref="GI:1041733"
/translation="MESADFYEAEP RP PMSSHLQSPHPAPSSAAF G FPRGAGPPKPPA
PPAAPEPLGGICEHETS IDISAYIDPAAFNDFLADLFQHSRQQEKAKAAVGP TGGGG
GGDFDYPGAPAGPGGAVMPGGAHGPPPGYGCAAAGYLDGRLEPLYERVGAPALRPLVI
KQEPREDEAKQLALAGLFPYQPPPPPPSHPHPHPPPAHLAAPHLQFQIAHCGQTTM
HLQPGHPTPPPTPVPSHPAPALGAAGLPGPGSALKGLGAAHPDLRASGGTGAGKAKK
SVDKNSNEYRVRRE RNNIAVRKSRDKAKQRNVETQQK VLELTSNDRLRKRVEQLSRE
LDTLRGIFRQLPESSLVKAMGNCA"
[polyA signal](#) 3249..3254
ORIGIN
1 ctgcagcctc cccgggacgc gggctccgga caggcctggt tctggctttg aaagagaatc
61 cgcgccccag cagctcaaga ccaagactcg ccctccgccc cccacccta ccccgctcag
121 cctcgggata ctctgggct cccggcctg gctggatacg ggcgcctag gcaggcagga
181 ggagggggcc cccgctaccg accacgtggg cgcgggggcg acggccgggc cgggggcgga
241 gcttgagcgc agcgccgcgc ctctgctggc cgcgctggag gcggtggcg ttgcgccgcg
301 gcctgcctgg ggagcgcgcg getgtgccg gtggttcgcc gccccatgcc ggccgcgcg
361 taggaccagc caggcgccgc gccgcgcag cccggggaca gaggccgct cggactctag
421 ggggagcgc gcctgcccgt gtataaaagc tgggcccgcg cgggcccggc cattcgcgac
481 ccggaggtgc gcgggcgcgc gcgagcagg tctccgggtg ggcggcgcgc acgccccgcg
541 caggctggag gccgccgagg ctcgccatgc cgggagaact ctaactcccc catggagtgc
601 gccgacttct acgaggcgga gccgcggccc ccgatgagca gccacctgca gagccccccg
661 cagcgcccca gcagcgcgcg cttcggcttt ccccgggcg cgggcccgcg gaagcctccc
721 gccccacctg ccgccccgga gccgctgggc gccatctgcy agcacgagac gtccatgac
781 atcagcgcct acatcgacct ggccgccttc aacgacgagt tcttgccga cctgttccag
841 cacagccgcg agcaggagaa ggccaaggcg gccgtgggcc ccacgggcgc cggcggcgcg
901 ggcgactttg actaccggg cgcgcccgcg ggccccgcg gcgcccgcg gcccggggga
961 gcgcacgggc ccccgcccgc ctacggctgc gcggccgcgc gctacctgga cggcaggctg

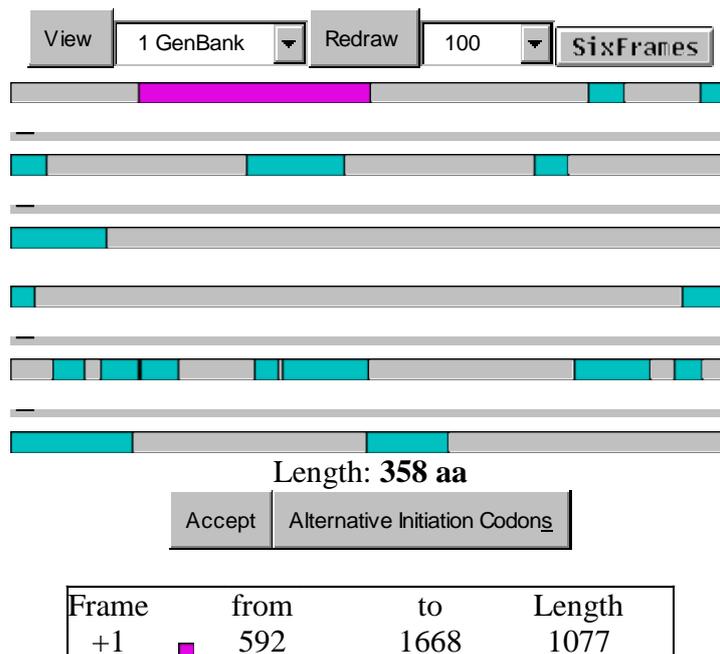
```

1021 gagcccctgt acgagcgcgt cggggcgccg gcgctgcggc cgctggtgat caagcaggag
1081 ccccgcgagg aggatgaagc caagcagctg gcgctggccg gcctcttccc ttaccagccg
1141 ccgcccgcgc cgccgcctc gcacccgcac ccgcacccgc cgcccgcgca cctggccgcc
1201 ccgcacctgc agttccagat cgcgcactg ccgcgcaacc ggccagacca ccatgcacct gcagccggtg
1261 caccacacgc cggcggccac gcccgctgcc agcccgcacc ccgcgcccgc gctcgggtgc
1321 gccggcctgc cgggcccctg cagcgcgctc aaggggctgg gcgcccgcga ccccgacctc
1381 cgcgcgagtg gcggcacggg cgcgggcaag gcccaagaag cggtggaaca gaacagcaac
1441 gagtaccggg tgcggcgcga gcgcaacaac atcgcggtgc gcaagagccg cgacaaggcc
1501 aagcagcgca acgtggagac gcagcagaag gtgctggagc tgaccagtga caatgaccgc
1561 ctgcgcaagc gggtggaaca gctgagccgc gaactggaca cgctgcgggg catcttccgc
1621 cagctgccag agagctcctt ggtcaaggcc atgggcaact gcgctgagc gcgcccgtg
1681 tgggaccgcc ctgggcccgc ctccggcggg gaccaggga gtggtttggg gtcgcccgat
1741 ctcgaggctt gcccgagccg tgcgagccag gactaggaga ttccgggtgc tctgaaagc
1801 ctggcctgct ccgctgttcc cctcccctcc tctgcgccgg acttggtgcg tctaagatga
1861 gggggccagg cggtggtctc tccctgcgag gaggggagaa ttcttggggc tgagctggga
1921 gcccggaac tctagtattt aggataacct tgtgccttgg aaatgcaaac tcaccgctcc
1981 aatgcctact gagtagggg agcaaactgt gccttgtcat tttatttga ggttctctg
2041 ctccctcccg aggctacagc agacccccat gagagaagga aggggagcag gcccgggca
2101 ggaggagggc tcagggagct gagatcccga caagcccgcc agcccagcc gctcctccac
2161 gcctgtcctt agaaaggggt ggaacatag ggacttgggg cttggaacct aaggttgttc
2221 ccctagttct acatgaaggt ggagggtctc tagttccacg cctctcccac ctcccctcg
2281 acacacccca ccccagcct gctataggct gggcttccct tggggggaac tcaactgcat
2341 gggggctacc aggtgaccag tgggagcccc caccgcagc cacaccagaa agctaggtcg
2401 tgggtcagct ctgaggatgt ataccctgg tgggagagg agacctagag atctggctgt
2461 ggggcccgca tgggggtga agggccactg ggaccctcag ccttgttgt actgtatcc
2521 ttcagcattg cctaggaaca cgaagcacga tcagtccatc ccagagggac cggagtattg
2581 acaagctttc caaatatttt gctttatcag ccgatatcaa cacttgtatc tggcctctgt
2641 gccccagcag tgccttgtgc aatgtgatg tgcgcgtctc tgctaaacca ccattttatt
2701 tgggttttgt tttgttttgg ttttgctcgg atacttgcca aaatgagact ctccgctggc
2761 agctggggga agggctctgag actccccttc cttttggtt tgggattact tttgatcctg
2821 ggggaccaat gaggtgagg gggttctcct ttgccctcag ctttcccag cccctccgc
2881 ctgggctgcc cacaaggctt gtccccaga ggccctggct cctggctggg aagggaggtg
2941 gcctcccgcc aacgcacac tggggctggg agcagggaag gacggcttgg ttctcttctt
3001 ttggggagaa cgtagagtct cactctagat gttttatgta ttatatctat aatataaaca
3061 tatcaaagtc aatgtcggtg tctttttaa accagaaaga agctacttcc aaggttgtct
3121 gtgggcccag tcacatttgt aaataataca gcattttccc tggcggcaat cctgacttcc
3181 atgagctctc catccatcct gagcccctct taccctaag gggtgacta cttcccagc
3241 gcaagacaaa taaatagcag aggacaagc tccaaatgga gtatgtccag agcctgaag
3301 cagtctcttg gcgtcagg

```

//

7.2 Analyse der CEBPA-Gensequenz U34070.1 mittels ORF Finder



Translatierte CEBPA-Gensequenz (U34070.1):

592 atggagtcggccgacttctacgaggcggagccgcgcccccgatg
M E S A D F Y E A E P R P P M
637 agcagccacctgcagagccccccgcacgcgcccagcagcgcgcc
S S H L Q S P P H A P S S A A
682 ttcggctttccccggggcgcgggcccgcgaagcctccccgcccc
F G F P R G A G P P K P P A P
727 cctgccgccccggagccgctgggcgggcatctgagcagcagagacg
P A A P E P L G G I C E H E T
772 tccatcgacatcagcgcctacatcgacccggcgccttcaacgac
S I D I S A Y I D P A A F N D
817 gagttcctggccgacctgttccagcacagccggcagcaggagaag
E F L A D L F Q H S R Q Q E K
862 gccaaaggcggccgtgggccccacgggcgggcgggcgggcgggc
A K A A V G P T G G G G G G D
907 ttgactaccgggcgcgccccgggccccggcgggcgccgctatg
F D Y P G A P A G P G G A V M
952 cccgggggagcgcacgggcccccgcccggctacggctgcgcgggc
P G G A H G P P P G Y G C A A
997 gccggctacctggacggcaggctggagcccctgtacgagcgcgct
A G Y L D G R L E P L Y E R V
1042 ggggcgccggcgctgcggccgctggtgatcaagcaggagccccgc
G A P A L R P L V I K Q E P R
1087 gaggaggatgaagccaagcagctggcgctggccggcctcttcct
E E D E A K Q L A L A G L F P
1132 taccagccgcccgcgcccgcgcccgcctcgaccccgacccgcac
Y Q P P P P P P P S H P H P H
1177 ccgcccggcgcgcacctggccgccccgcacctgcagttccagatc
P P P A H L A A P H L Q F Q I
1222 gcgcaactgcggccagaccaccatgacacctgcagcccggtcacccc
A H C G Q T T M H L Q P G H P
1267 acgcccggcccacgcccgtgccagcccgcaccccgcgcccgcg
T P P P T P V P S P H P A P A
1312 ctcggtgccgcccggcctgccgggcccctggcagcgcgctcaagggg
L G A A G L P G P G S A L K G
1357 ctgggcgccgcgcacccccgacctccgcgagtgggcgggcacgggc
L G A A H P D L R A S G G T G
1402 gcgggcaaggccaagaagtgcggtggacaagaacagcaacgagtac
A G K A K K S V D K N S N E Y
1447 cgggtgcggcgcgagcgcacaacaacatcgcggtgcgcaagagccgc
R V R R E R N N I A V R K S R
1492 gacaaggccaagcagcgcgaacgtggagacgcagcagaaggtgctg
D K A K Q R N V E T Q Q K V L
1537 gagctgaccagtgacaatgaccgcctgcgcaagcgggtggaacag
E L T S D N D R L R K R V E Q
1582 ctgagccggaactggacacgctgcggggcatcttccgcccagctg
L S R E L D T L R G I F R Q L
1627 ccagagagctccttggtaaggccatgggcaactgcgctga 1668
P E S S L V K A M G N C A *

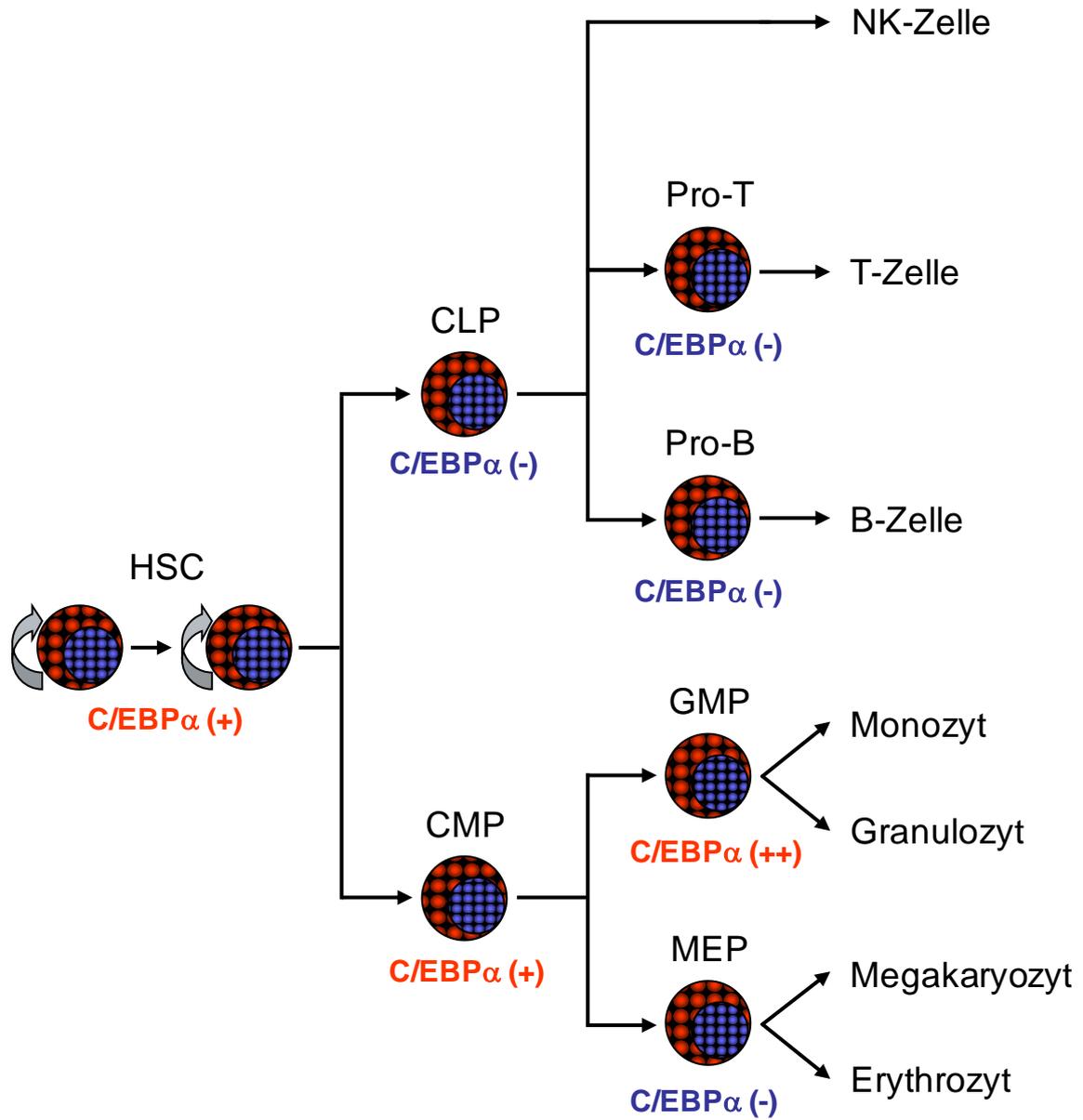
(atg: p42 Start-Codon; atg: p30 Start-Codon)

7.3 Verzeichnis der Aminosäuren und Nukleinbasen

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

Nukleinbase	Symbol
Adenin	A
Guanin	G
Cytosin	C
Thymin	T

7.4 Haematopoese-Differenzierungsschema



8 Danksagung

Herrn **Professor Dr. med. Hartmut Döhner** danke ich für die Möglichkeit, meine Promotionsarbeit in seiner Abteilung durchführen zu können.

Frau **Professor Dr. med. Konstanze Döhner** danke ich für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung meiner Promotionsarbeit. Ihre wertvollen Anregungen und Ratschläge sowie die stets optimalen Arbeitsbedingungen in ihrer Arbeitsgruppe waren außerordentlich förderlich für die Durchführung dieser Arbeit.

Ganz besonders danken möchte ich Frau **Dr. Andrea Corbacioglu**, die mich in hervorragender Weise während der experimentellen Phase meiner Arbeit betreut und mich bei der Abfassung der Dissertation beraten hat.

Im Übrigen gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Labors für zytogenetische und molekulare Diagnostik der Medizinischen Klinik III, insbesondere **Frau Karina Eiwien** und Frau **Marianne Habdank** für ihre ausgezeichnete fachliche Hilfe im Labor.

Schließlich danke ich **meinen Eltern** für die großzügige Unterstützung während meiner Doktorarbeit und des gesamten Studiums.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Corinna Mendla

Geboren am 23.02.1984 in Heidelberg

Verheiratet; 1 Kind

Schulbildung

Pestalozzi-Grundschule, Ingelheim am Rhein

08/90 – 07/94

Sebastian-Münster-Gymnasium, Ingelheim

08/94 – 03/03

Abitur (Note: 1,5)

17.03.03

Studium

Studium der Humanmedizin
an der Universität Ulm

10/03 – 12/09

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
(Physikum)

19.09.05

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
(Note: 1,5)

09.12.09

Famulaturen

Orthopädie
Prof. Dr. Reichel
Kreiskrankenhaus Biberach an der Riß

02/06 – 03/06

Unfallchirurgie
Dr. Lintner
Kreiskrankenhaus Biberach an der Riß

08/06

Praxis für Allgemeinmedizin, Innere Medizin und
Psychotherapie
Dr. Barth, Dr. Holland, Dr. Erni-Riesner
Biberach an der Riß

03/07

Gefäßchirurgie
Prof. Dr. Sunder-Plassmann
Uniklinik Ulm

08/07

Praktisches Jahr

1. Tertial: Kinderheilkunde
Dr. Wölfel
Klinik am Eichert, Göppingen

08/08 – 12/08

2. Tertial: Innere Medizin
Dr. Allmendinger
Klinik am Eichert, Göppingen

12/08 – 04/09

3. Tertial: Chirurgie
Prof. Ulrich, Prof. Riedl
Klinik am Eichert, Göppingen

04/09 – 07/09

Berufliche Tätigkeit

Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik (Innere
Medizin), Kreiskrankenhaus Biberach an der Riß

10/10 – 12/12

Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik (Innere
Medizin) der Sana Kliniken Landkreis Biberach

Seit 01/13