Universitätsklinikum Ulm

Zentrum für Innere Medizin

Klinik für Innere Medizin III

Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie und Infektionskrankheiten

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Hartmut Döhner

# Inzidenz und prognostische Bedeutung von *RUNX1* Mutationen bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) und normalem Karyotyp

---

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

**Andreas Steffen Zimmermann**

**Bad Friedrichshall**

**[ 2014 ]**

Amtierender Dekan:
Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter:
Prof. Dr. Konstanze Döhner

2. Berichterstatter:
Prof. Dr. Wolfgang Kratzer

Tag der Promotion:
23.04.2015

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis ..... I

Abkürzungsverzeichnis ..... III

1 Einleitung ..... 1
1.1 Zytogenetische- und molekulargenetische Veränderungen als prognostisch relevante Faktoren bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) des Erwachsenen ..... 1
1.2 Prognostische Bedeutung der AML-assoziierten Genmutationen ..... 6
1.3 RUNT-related Protein 1 (RUNX1), Struktur und Funktion des Transkriptionsfaktors ..... 12
1.4 *RUNX1* Mutationen in der AML ..... 17
1.5 Zielsetzung ..... 22

2 Material und Methoden ..... 23
2.1 Material ..... 23
2.1.1 Patientenproben ..... 23
2.1.2 Zytogenetische und molekulargenetische Charakterisierung ..... 24
2.2 Methoden ..... 24
2.2.1 Zellisolation und -archivierung ..... 24
2.2.2 DNA-Extraktion ..... 25
2.2.3 Polymerasen-Ketten Reaktion (PCR) für die Amplifikation des *RUNX1* Gens ..... 26
2.2.4 Cycle Sequencing Reaktion (CSR) ..... 29
2.2.5 Prinzip der Sequenzierung ..... 32
2.2.6 Auswertung der Sequenzen ..... 33
2.3 Reagenzienliste ..... 34
2.4 Statistische Auswertung ..... 36

3 Ergebnisse ..... 37
3.1 *RUNX1* Mutationen: Inzidenz, Mutationstyp und Heterozygotie ..... 37
3.2 Korrelation mit klinischen Charakteristika ..... 40

3.3 Assoziation mit weiteren AML-assoiierten molekulargenetischen Aberrationen 42
3.4 Univariable Untersuchungen ... 43
3.4.1 Ansprechen auf die Induktionstherapie ... 43
3.4.2 Überlebensanalysen ... 44
3.5 Multivariable Untersuchungen ... 45

4 Diskussion ... 46
4.1 Inzidenzen an *RUNX1* Mutationen und deren Korrelation mit klinischen Charakteristika ... 46
4.2 Lokalisation der Mutationen im *RUNX1* Gen ... 49
4.3 Assoziation mit weiteren AML-assoziierten Genmutationen ... 51
4.3.1 Ansprechen auf die Induktionstherapie ... 51
4.3.2 Univariate und multivariate Überlebensanalysen ... 52

5 Zusammenfassung ... 57

6 Literaturverzeichnis ... 59

7 Publikation der Ergebnisse dieser Arbeit ... 73

8 Anhang ... 74

9 Danksagung ... 79

10 Lebenslauf ... 80

# Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| A | Nukleinbase: Adenin; Aminosäure: Alanin |
| ABL1 | c-abl oncogene 1, Tyrosinekinase |
| abh. | abhängig |
| ad | Aquadest, aqua destillata |
| add | Addition, Zugewinn von chromosomalen Anteilen |
| abn | Abnorm |
| AGM | Region des Aorto-Gonadalen-Mesonephros |
| ALY | Synonym: Aly/REF export factor |
| AML | akute myeloische Leukämie |
| AML1 | akute myeloid leukemia 1; Synonyme: RUNX1, CBFA2T1 |
| AML-ETO | Translokationsprodukt t(8;21) |
| AMLSG Ulm | AML Study Group Ulm |
| APL | akute Promyelozytenleukämie |
| AS | Aminosäure |
| ATRA | all trans retinoic acid |
| Bp | Basenpaare |
| BCR | breakpoint cluster region |
| BM | engl.: bone marrow; dt.: Knochenmark |
| C | Nukleinbase: Cytosin |
| CALGB | cancer and leukemia group B |
| CEBPA | CAAT/enhancer binding protein alpha |

| | |
|---|---|
| CBFA2T1 | core binding factor alpha subunit 2 |
| CBFβ | core binding factor betta |
| CBFβ-MYH11 | Fusionstranskript: Inversion 16(p13q22) oder Translokation (16;16) |
| CBP | CREB binding protein |
| CCD | charge-coupled device |
| CD | cluster of differentiation; immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen |
| cDNA | engl.: complementary DNA, dt.: komplementäre DNA |
| CDK1 | cyclin depend kinase1 |
| CDK2 | cyclin depend kinase2 |
| CDKN2A | cyclin depend kinase N2A |
| C/EBPα | Synonym: CEBPA; CCAAT/enhancer binding protein alpha |
| CIP1 | dk interacting protein |
| CKIT | Proto-Onkogen c-Kit; Thyrosin-Protein-Kinase |
| CMPD | chonisch myeloproliferative Erkrankung |
| CMML | chronisch myelomonozytäre Leukämie |
| CN-AML | AML mit normaler Zytogenetik |
| CpG | Cytosin-Phosphat-Guanin Dinukleotid |
| CR | engl.: complete remission; dt.: komplette Remission |
| CRD | engl.: complete remission duration; dt.:Rezidivwahrscheinlichkeit |
| CSF-1 R | colony-stimulating factor receptor |
| CSR | cycle sequencing reaktion |
| C-terminal | Richtung Carboxy-Terminus eines Proteins gelegen |
| D | Aminosäure: Aspartat |

| | |
|---|---|
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| dCTP | Desoxycytidintriphosphat |
| DEK | DEK Onkogen; Synonym: D6S231E |
| del | Deletion |
| DFS | engl.: disease-free survival; dt.: Krankheitsfreies Überleben |
| dGTP | Desoxyguanosintriphosphat |
| dTTP | Desoxythymidintriphosphat |
| dUTP | Desoxyuridintriphosphat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNMT3A | DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 alpha |
| dNTP/ddNTP | Desoxynukleosidtriphosphat/Didesoxynukleosidtriphosphat |
| dt | deutscher Sprachgebrauch |
| E | Aminosäure: Glutamat |
| Ear-2 | V-erbA related protein 2; Synonym: Nuclear receptor subfamily 2 group F member 6 (NR2F6) |
| EB | elution buffer |
| EFS | engl.: event-free survival; dt.: ereignisfreies Überleben |
| EGF | epidermal growth factor |
| Engl. | englischer Sprachgebrauch |
| ERK | Extracellular-signal regulated Kinase |
| ETO | Transkriptionsfaktor eight twenty one |
| ETS | Transkriptionsfaktor E-twenty-six |
| ETV6 | ETS variant 6 |

| | |
|---|---|
| EVI1 | ecotropic viral integration site 1 |
| Exon | expressed region |
| Fa. | Firma |
| FAB-Klassifikation | French-American-British Cooperative Group-Klassifikation |
| FISH | Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung |
| FLT3 | FMS-like tyrosin kinase 3 |
| FLT3-ITD | Interne Tandem Duplikation im *FLT3* Gen |
| FLT3-TKD | Tyrosin Kinase Domäne des FLT3 Proteins |
| FPD | familial platelet disorder; familiäre Thrombozytenstörung mit Neigung zum Übergang in eine AML |
| fs | frameshift |
| G | Nukleinbase: Guanin; Aminosäure: Glycin |
| G-CSF | granulocyte colony-stimulating factor |
| G-CSFR | granulocyte colony-stimulating factor receptor |
| GM-CSF | granulocyte/macrophage colony stimulating factor |
| GM-CSFRα | granulocyte/macrophage colony stimulating factor receptor α |
| G-Protein | Enzym/ Protein mit GTPase Aktivität |
| H | Aminosäure: Histidin |
| HAM | Chemotherapie: Hochdosis-Cytosin-Arabinosid, Mitoxantron |
| HD | Heidelberg |
| HDAC | Histondeacetylase |
| HSCT | hämatopoetische Stammzelltransplantation |
| ICE | Chemotherapie: Idarubicin, Cytosin-Arabinosid, Etoposid |
| IDH1 | Isocitrate dehydrogenase 1 |

| | |
|---|---|
| IDS | Iduronate 2-Sulfatase |
| IL3 | Interleukin 3 |
| ins | Insertion |
| inv | Inversion |
| ISCN | international system for human cytogenetics nomenclature |
| ITD | interne Tandemduplikation |
| JAK2 | Janus Kinase 2 |
| K | Aminosäure: Lysin |
| kD | atomare Masseneinheit: Kilodalton |
| KIT | Rezeptor-Tyrosinkinase; Synonym: CD117 |
| KM | Knochenmark |
| KMT | Knochenmarkstransplantation |
| Konz. | Abkürzung für Konzentration |
| KRAS | kirsten rat sarcoma 2 vital oncogene |
| L | Leucin |
| LDH | Lactatdehydrogenase |
| LOH | engl.: loss of heterocygosity; dt.: Verlust der Heterozygotie |
| M0-M7 | morphologische AML-Subtypen M0 bis M7 innerhalb der FAB-Klassifikation |
| MAP-Kinase | mitogen-activated protein kinase |
| M-CSF | macrophage colony stimulating factor |
| M-CSFR | macrophage colony stimulating factor receptor |
| MDS | Myelodysplastisches Syndrom |
| MKL1 | megakaryoblastic leukemia 1 |

| | |
|---|---|
| MLL | mixed-lineage-leukemia |
| MLLT3 | mixed-lineage leukemia translocated to chromosome 3 protein |
| MLL-PTD | Partielle Tandemduplikationen im mixed-lineage-leukemia-Gen |
| MPN | myeloproliferative Neoplasie |
| MPP1 | Membran protein palmitoylated 1; Synonym: p55 |
| MRC | medical research council Britain |
| MRD | engl.: minimal residual disease ;dt.: minimale Resterkrankung |
| mRNA | messenger ribonucleicacid |
| mSin3A | switch independent 3 protein |
| mut. | mutiert |
| Myb | myeloblastosis viral oncogene homolog |
| MYH | myosin heavy chain |
| N-CoR | nuclear receptor corepressor |
| NF-κB | nuclear factor kappa B |
| NIH3T3 | Zelllinie embryonaler Fibroblasten der Maus |
| NOS | engl.: not otherwise specified; dt.: ohne genauere Kategorie |
| NPM1 | Nukleophosmin 1 oncogene |
| NRAS | Neuroblastoma RAS viral oncogene |
| N-terminal | Richtung Amino-Terminus eines Proteins gelegen |
| NUP214 | nucleoporin 214kDa; nuclear pore complex protein |
| ORF | engl.: open reading frame; dt.: offener Leserahmen |
| OS | engl.: overall survival; dt.:Gesamtüberleben |
| P | Aminosäure: Prolin |

| | |
|---|---|
| p | kurzer Arm des Chromosoms |
| p21 | Synonym: cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A) |
| P300 | P300/CBP-associated factor Histon Acetyltransferase |
| PB | peripheres Blut |
| PCR | engl.: polymerase chain reaction; dt.: Polymerase-Kettenreaktion |
| PML | Promyelozytenleukämie |
| PML-RARA | retinoic acid receptor alpha Gen |
| PTD | partielle Tandemduplikation |
| PU.1 | Transkriptionsfaktor PU.1 |
| Q | Aminosäure: Glutamin |
| q | langer Arm des Chromosoms |
| R | Aminosäure: Arginin |
| RAEB | refraktäre Anämie mit Blastenexzess |
| RAEBt | refraktäre Anämie mit Blastenexzess und beginnender Transformation |
| RARA | retinoic acid receptor alpha |
| RAS | raspberry Gen aus der Familie der RAS Protoonkogene |
| RBM15 | RNA binding motif protein 15 |
| RD | engl.: refractory disease; dt.: refraktäre Erkrankung |
| RFS | engl.: relapse-free survival; dt.: rezidivfreies Überleben |
| RHD | runx homology domain |
| RNA | engl.: ribonucleicacid; dt.: Ribonukleinsäure |
| rpm | engl.: rotations per minute; dt.: Drehungen pro Minute |
| RPN1 | ribophorin 1 |

| | |
|---|---|
| RT | Raumtemperatur |
| RUNX1 | RUNT-related transkription factor 1 |
| RUNX1-ID | Für die vorliegende Studie gewählte Identifikationsnummer |
| RUNX1T1 | runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related) Fusionstranskript |
| S | Aminosäure: Serin |
| s-AML | sekundäre AML |
| SCT | Stammzelltransplantation |
| SHP2 | Tyrosinphosphatase shatterproof 2 |
| SNP | single nucleotide polymorphism |
| STAT protein | signal transducers and activators of transcription protein |
| Syn. | Synonym |
| t | Translokation |
| T | Nukleinbase: Thymin; Aminosäure: Threonin |
| t(12;21) | Translokation zwischen Chromosom 12 und 21 |
| t(8;21) | Translokation zwischen Chromosom 8 und 21; Fusionstranskript AML1-ETO |
| t(3;21) | Translokation zwischen Chromosom 3 und 21; Fusionstranskript AML1-EVI1 |
| TAD | eng.: transactivation domain; dt.: Transaktivierungsdomäne |
| t-AML | engl.: therapy related AML; dt.: therapieassoziierte AML |
| Taq | Bakterium Thermophilus aquaticus |
| TEL | Transkriptionsfaktor telomere maintenance 2 |
| TLE | Corepressor transducin-like enhancer of split |

| | |
|---|---|
| V | Aminosäure Valin |
| VWRPY | VWRPY Peptidsequenz im RUNX1 Protein |
| WAF1 | wild-type p53 activated factor |
| wt | wildtyp Gen, nicht mutiertes Gen |
| WT1 | wilms-tumor 1 protein |
| YAP | Yes-associated protein |

# 1 Einleitung

## 1.1 Zytogenetische- und molekulargenetische Veränderungen als prognostisch relevante Faktoren bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) des Erwachsenen

Die akute myeloische Leukämie (AML) des Erwachsenen stellt sowohl biologisch als auch klinisch eine äußerst heterogene, klonale Erkrankung dar. Neuere Daten deuten darauf hin, dass dieser Heterogenität mit großer Wahrscheinlichkeit komplexe genetische Aberrationen zugrunde liegen. Die Akkumulation dieser erworbenen genetischen Aberrationen in den hämatopoetischen Vorläuferzellen beeinflusst die Proliferation und die Differenzierung, d.h. die Differenzierung myeloischer Progenitorzellen wird inhibiert während das Wachstum des myeloischen Klons gleichzeitig begünstigt wird (Döhner u. Döhner 2008). Folgen sind eine Verdrängung des normalen blutbildenden Systems mit nachfolgender Knochenmarkinsuffizienz und konsekutiver Anämie, Granulozytopenie, wie auch Thrombozytopenie (Löwenberg et al. 1999). Klinisch führend sind neben der Anämie und einer erhöhten Blutungsneigung auch eine vermehrte Infektanfälligkeit sowie Organinfiltrationen.

Im Laufe der Zeit entstanden, basierend auf den pathogenetischen Kenntnissen der Erkrankung, neue Klassifikationssysteme. Zu Beginn wurde die AML anhand morphologischer Kriterien entsprechend des Differenzierungsgrades des malignen Klons nach der French-American-British Cooperative Group-Klassifikation (FAB-Klassifikation) eingeteilt (Bennett et al. 1976). Die Einteilung beruht auf rein deskriptiven Verfahren und unterteilt die AML in 8 morphologische Subpopulationen (M1-M7). Der Einsatz neuer Methoden, wie z.B. der Immunphänotypisierung, sowie die Entwicklung weiterführender zytogenetischer und molekulargenetischer Techniken und die daraus resultierenden Ergebnisse, haben zu einer präziseren Klassifizierung der AML geführt. Über die Jahre hinweg kristallisierten sich die chromosomalen Aberrationen als der wichtigste Prognosefaktor von all den zur Klassifikation herangezogenen Kriterien der AML heraus (Bloomfield et al. 1998; Byrd et al. 2002; Grimwade et al. 1998; Marcucci et al. 2011; Mrózek u. Bloomfield 2006; Mrózek et al. 2001; Schlenk et al. 2003; Slovak et al. 2000).

Basierend auf über 200 bekannten strukturellen und numerischen Veränderungen wurden anhand des Karyotyps drei Risikogruppen definiert (low-risk, intermediate-risk und high-risk), anhand derer einerseits die Prognose der Patienten abgeschätzt, andererseits aber auch die an das individuelle Risiko des einzelnen Patienten angepasste Therapie ausgewählt werden kann (Döhner et al. 2010; Grimwade et al. 2010; Mrózek et al. 2001; Mrózek et al. 2009).

Mit Hilfe der konventionellen Chromosomenanalyse und der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) lassen sich bei ca. 50-60% der neu diagnostizierten AML Fälle klonale chromosomale Aberrationen nachweisen (Byrd et al. 2002; Grimwade 2001; Grimwade et al. 1998; Mrózek et al. 2001). Diese setzen sich aus balancierten Veränderungen, wie der reziproken Translokation t(8;21), oder Inversionen inv(3)/inv(16), aber auch aus chromosomalen Inbalancen, wie den numerischen Aneuploidien (z.B. Monosomie 7, Trisomie 8), Deletionen (z.B. Chromosom 5) und Amplifikationen zusammen.

Die sogenannte „low-risk" Gruppe ist mit einer günstigen Prognose assoziiert, die mit hohen Remissionsraten (complete remission; CR), einer geringen Rezidivwahrscheinlichkeit (remission duration; RD) und langen Überlebenszeiten (overall survival; OS) einhergeht.

Zu dieser Gruppe zählen sowohl Aberrationen wie die Translokationen t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q21) und Inversion als auch Translokation des Chromosoms 16 [inv16(p13;q22); t(16;16)(p13;q22)]. Mit einer sehr ungünstigen Prognose („high-risk") gehen Veränderungen mit Nachweis eines Philadelphia-Chromosoms [t(9;22)], diversen Aberrationen [abn(3q), -5/5q-, -7, t(6;9), abn(12p), abn(17p)], sowie eines komplexen Karyotyps einher. Ein komplexer Karyotyp definiert sich durch das Vorhandensein von drei oder mehr chromosomalen Veränderungen in den Blasten. Zu diesen Veränderungen zählen alle chromosomalen Aberrationen, ausgeschlossen der oben erwähnten prognostisch günstigen Veränderungen [t(8;21), inv(16), t(16;16);t(15;17)] (Mrózek 2008). Alle anderen Patienten werden der Gruppe „intermediate-risk" zugeteilt, welche u.a. die chromosomalen Veränderungen t(9;11) und die Deletion des Y-Chromosoms beinhaltet. Darüber hinaus gehören Patienten, welche keine chromosomalen Aberrationen und somit einen normalen Karyotyp (CN) aufweisen, ebenfalls in diese Gruppe.

Diese zytogenetische Risikoeinteilung spiegelt jedoch nicht die klinische Heterogenität der AML Patienten wieder. Dies gilt vor allem für die große Gruppe der Patienten mit CN-AML; diese Gruppe macht ca. 50% aller AML Patienten aus und wird, wie bereits erwähnt, der „intermediate-risk group“ zugeordnet. CN-AML Patienten zeigen hinsichtlich des klinischen Verlaufs deutliche Unterschiede (Döhner et al. 2002; Schnittger et al. 2000) und diese klinische Heterogenität lässt vermuten, dass weitere genetische Aberrationen vorliegen, welche mit den herkömmlichen Chromosomenanalysen nicht detektiert werden können, aber besonderen Einfluss auf den klinischen Verlauf und somit auf die Prognose des Patienten haben (Byrd et al. 2002; Döhner u. Gaidzik 2011; Gaidzik et al. 2011; Grimwade 2001; Grimwade et al. 1998; Schnittger et al. 2011; Slovak et al. 2000; Tang et al. 2009).

Gegenstand laufender Untersuchungen ist es, insbesondere die heterogene Gruppe von Patienten mit normalem Karyotyp anhand molekularer Marker in prognostisch unterschiedliche genetische Subgruppen aufzuteilen. Abhängig vom jeweiligen Genotyp können diese Patienten dann einer individuellen, risikoadaptierten Behandlung zugeführt werden, was die Prognose dieser Patienten deutlich verbessern könnte (Baldus et al. 2003; Döhner et al. 2002; Fröhling et al. 2002; Kottaridis et al. 2001; Schlenk et al. 2008; Thiede et al. 2002).

Vor diesem eben beschriebenen Hintergrund erschien Anfang der neunziger Jahre eine neue Klassifikation, welche von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) erarbeitet wurde. Sie war die erste Einteilung für Tumore des blutbildenden und lymphatischen Systems, welche genetische, morphologische, zytochemische, immunphänotypische, sowie auch klinische Gesichtspunkte berücksichtigte (Vardiman et al. 2002; Vardiman et al. 2009). Im Jahre 2008 wurde die bisher bestehende WHO Klassifikation neu überarbeitet und aktuelle zytogenetische sowie erstmals auch molekulargenetische Daten (Swerdlow et al. 2008) mit aufgenommen (siehe Tabelle 1).

**Tabelle1**. WHO Klassifikation der akut myeloischen Leukämie (AML), verwandte Vorläufer-Neoplasien und akute Leukämie mit unklarer Linienzugehörigkeit: ABL1: Gen, Abkürzung für c-abl *oncogene 1*; AML: akut myeloische Leukämie; *BCR*: Gen, Abkürzung für *breakpoint cluster region*; *CEBPA*: Gen, Abkürzung für *CAAT/enhancer binding protein alpha*; *CBFB*: Gen, Abkürzung für *core binding faktor betta*; *DEK*: Abkürzung für *DEK* Onkogen; *EVI1*: Gen, Abkürzung für *ecotropic viral integration site 1*; inv(16)(p13.1q22): Inversion zwischen dem langen und kurzem Arm des Chromosoms 16; inv(3)(q21q26.2): Inversion zwischen den langen Armen des Chromosoms 3; *MKL1*: Gen, Abkürzung für *megakaryoblastic leukemia 1*; *MLL*: Gen, Abkürzung für *mixed-lineage-leukemia*; *MLLT3*: Gen, Abkürzung für *mixed-lineage leukemia translocated to chromosome 3*; *MYH*: Gen, Abkürzung für *myosin heavy chain*; NOS: engl.: not otherwise specified, dt.: unklare Linienzugehörigkeit; *NPM1*: Gen, Abkürzung für *Nukleophosmin 1*; *NUP214*: Gen, Abkürzung für *nucleoporin 214kDa*; *PML*: Gen, Abkürzung für *pro myelocytic leukemia*; *RARA*: Gen, Abkürzung für *retinoic acid receptor alpha*; *RBM15*: Gen, Abkürzung für *RNA binding motif protein 15*; *RPN1*: Gen, Abkürzung für *ribophorin 1*; *RUNX1*: Gen, Abkürzung für *RUNT-related transkription factor 1*; t(8;21)(q22;q22): Translokation zwischen den beiden langen Armen der Chromosome 8 und 21; t(16;16)(p13.1;p22): Translokation zwischen den langen Armen des Chromosoms 16; t(15;17)(q22;q12): Translokation zwischen den beiden langen Armen der Chromosome 15 und 17; t(9;11)(p22;q23): Translokation zwischen dem kurzen Arm des Chromosoms 9 und dem langen Arm des Chromosoms 11; t(6;9)(p23;q34): Translokation zwischen dem kurzen Arm des Chromosoms 6 und dem langen Arm des Chromosoms 9; t(3;3)(q21;q26.2): Translokation zwischen den langen Armen des Chromosom 3; t(1;22)(p13;q13): Translokation zwischen dem kurzen Arm des Chromosoms 1 und dem langen Arm des Chromosoms 22 (Bhargava u. Dalal 2010)

| | |
|---|---|
| 1 | AML with recurrent genetic abnormalities |
| | AML with t(8;21)(q22;q22) |
| | RUNX1-RUNX1T1 |
| | AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;p22); CBFB-MYH11 |
| | Acute promyelocytic leukemia with t(15;17)(q22;q12); PML-RARA |
| | AML with t(9;11)(p22;q23)MLLT3-MLL |
| | AML with t(6:9)(p23;q34); DEK-NUP214 |
| | AML with inv(3)(q21q26.2) or t(3.3)(q21;q26.2); RPN1-EVl1 |
| | AML (megakaryoblastic) with t(1:22)(p13;q13); RBM15-MKL1 |
| | Provisional AML with mutated NPM1 |
| | Provisional AML with mutated CEBPA |
| 2 | AML with myelodysplasia-related changes |
| 3 | Therapy-related myeloid neoplasms |
| 4 | Acute myeloid leukemia, NOS |
| | AML with minimal differentiation |
| | AML without maturation |
| | AML with maturation |
| | Acute myelomonocytic leukemia |
| | Acute monoblastic and monocytic leukemia |
| | Acute erythroid leukemia |
| | Acute megakaryoblastic leukemia |
| | Acute basophilic leukemia |
| | Acute panmyelosis with myelofibrosis |
| | Myeloid sarcoma |
| | Myeloid proliferations related to Down syndrome |
| | Transient abnormal myelopoiesis |
| | Myeloid leukemia associated with Down syndrome |
| | Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm |

Zunächst wurde die Hypothese unterstützt, dass die Genmutationen in zwei funktionell unterschiedliche Hauptgruppen eingeteilt werden können, sogenannte Klasse-I und Klasse-II Mutationen. Zu den Klasse-I Mutationen zählen Genmutationen, die zu einem Proliferationsvorteil führen und eine verminderte Apoptoseneigung der myeloischen Vorläuferzellen aufweisen (Dicker et al. 2007; Döhner u. Döhner 2008; Gaidzik u. Döhner 2008; Gilliland u. Griffin 2002). In diese Gruppe gehören unter anderem Mutationen der Gene *FMS-like tyrosin kinase3* (*FLT3*), des *Rat sarcoma (Ras)* G-Proteins, der *Janus Kinase2 (Jak2)*, der Tyrosinkinase *KIT*, sowie der Tyrosinphosphatase *SHP2*. Die inaktivierend wirkenden Klasse-II Mutationen betreffen hämatopoetische Transkriptionsfaktoren oder Komponenten des transkriptionalen Koaktivator-Komplexes, wodurch die Differenzierung hämatopoetischer Progenitorzellen massiv kompromittiert wird (Kelly u. Gilliland 2002).

Gene dieser Gruppe sind beispielsweise *RUNT-related protein 1 (RUNX1)* (Dicker et al. 2007), *CCAAT/enhancer binding protein alpha (CEBPA)* (Nerlov 2004), *mixed-lineage-leukemia (MLL)* (Ernst et al. 2002), Fusionstranskripte aus Translokationen, wie z.B. t(8;21) und sehr wahrscheinlich auch das *nucleophosmin 1* (*NPM1)* Gen (Grisendi et al. 2006). Im Jahre 2004 postulierte Gilliland et al. ein Modell, indem ein zweistufiger Prozess der Leukämogenese beschrieben wird. Diese sogenannte „Two-hit" Hypothese geht davon aus, dass je eine Mutation in beiden Mutationsklassen erworben werden muss, um eine AML entstehen zu lassen. Demzufolge ist der „Second Hit" das genetische Ereignis, welches die Leukämie generiert (Fröhling et al. 2005; Gilliland et al. 2004). Von diesem Modell wurde jedoch mit wachsendem Einblick in die Pathogenese von Leukämien zunehmend Abstand genommen, da weitere Mutationen gefunden wurden, welche nicht in eine der beiden Gruppen eingeteilt werden können.

## 1.2 Prognostische Bedeutung der AML-assoziierten Genmutationen

Eines der Gene, dessen prognostische Bedeutung in den letzten Jahren im Rahmen zahlreicher Studien gezeigt werden konnte, ist das *FMS-like tyrosin kinase3* (*FLT3*) Gen. In zwei Domänen dieses membranständigen Klasse III Rezeptors sind Mutationen zu finden (Fröhling et al. 2005). Die interne Tandemduplikation (ITD), zum Großteil in der juxtamembranären (JM) Domäne des *FLT3* Gens, wird in ca. 30% der CN-AML Patienten gefunden (Döhner u. Döhner 2008; Marcucci et al. 2011). Sie führt zu einer konstitutiven Aktivierung des FLT3-Rezeptors und der nachgeschalteten Signalwege (Dicker et al. 2007). Patienten mit einer *FLT3*-ITD Mutation weisen im peripheren Blut und Knochenmark höhere Blastenzahlen auf. *FLT3*-ITD$^{pos}$ sind mit einer kürzeren RD und einem schlechteren OS assoziiert (Fröhling et al. 2002; Gaidzik u. Döhner 2008; Gale et al. 2008; Kayser et al. 2009; Kottaridis et al. 2003; Mrózek et al. 2007; Schlenk et al. 2008; Thiede et al. 2002). Kayser et al. konnte zeigen, dass die Insertionsstelle der *FLT3*-ITD$^{pos}$ im „ß1-sheet“ des Rezeptors in ca. 25% der Patienten mit *FLT3*-ITD$^{pos}$ lokalisiert und mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert ist. In den multivariaten Analysen zeigten sich ein signifikant schlechteres Rezidiv-freies-Überleben (RFS) und OS, sowie ein schlechteres Therapieansprechen mit niedrigerer CR Rate bei Insertion der *FLT3*-ITD$^{pos}$ im ß1-sheet (Kayser et al. 2009). Des Weiteren werden in 7-10% der CN-AML Patienten Punktmutationen in der Tyrosinkinasedomäne (TKD) des *FLT3* Gens gefunden (Marcucci et al. 2011; Abu-Duhier et al. 2001). Die Datenlage über die prognostische Bedeutung von Mutationen der *FLT3*-TKD ist noch unklar und Gegenstand laufender Untersuchungen (Bacher et al. 2008; Döhner u. Döhner 2008; Mrózek et al. 2007; Whitman et al. 2008).

Das *nucleophosmin 1* (*NPM1*) Gen stellt ein weiteres, prognostisch relevantes Gen dar. Es codiert ein Protein, welches an der Regulation von Tumorsuppressorgenen beteiligt ist (Colombo et al. 2002). Eine *NPM1* Mutation kann in über 50% der CN-AML Patienten gefunden werden (Döhner u. Döhner 2008; Falini et al. 2005; Marcucci et al. 2011) und stellt die häufigste genetische Veränderung in dieser Patientenpopulation dar.

Analysen klinischer Charakteristika ergaben, dass Patienten mit *NPM1*$^{mut}$ Status häufig weiblichen Geschlechts waren, einen erhöhten Blastenanteil im Knochenmark, höhere Lactatdehydrogenase- (LDH) und Leukozytenkonzentrationen aufwiesen und häufig CD33$^{+}$, selten CD34$^{+}$ (engl.: cluster of differentiation; dt.: immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen) exprimierten. Univariate Überlebensanalysen zeigten ein besseres Ansprechen auf die Induktionstherapie, ein längeres DFS und ein längeres OS bei *NPM1*$^{mut}$ Patienten (Döhner et al. 2005; Schlenk et al. 2008; Thiede et al. 2006). In einer aktuellen Studie konnten durch das Messen der minimalen Resterkrankung (MRD) anhand des molekularen Markers *NPM1*$^{mut}$ Patienten mit einem hohen Rezidivrisiko identifiziert werden (Krönke et al. 2011).

Es besteht eine statistisch signifikante Assoziation von *NPM1* Mutationen mit *FLT3*-ITD$^{pos.}$, sowie Mutationen im Gen der *isocitrate dehydrogenase* (*IDH1* und *IDH2*) und der *DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 alpha* (*DNMT3A*) (Abbas et al. 2010; Döhner et al. 2005; Döhner u. Döhner 2008; Falini et al. 2005; Green et al. 2010; Ley et al. 2010; Marcucci et al. 2010; Mrózek et al. 2007; Paschka et al. 2010; Schlenk et al. 2008; Thol et al. 2011; Verhaak et al. 2005; Wagner et al. 2010). Ein Beispiel der Relevanz von Interaktionen einzelner Genmutationen ist die Kombination einer *FLT3*-ITD$^{pos}$ mit einer Mutation im *NPM1* Gen. Bei einem *NPM1*$^{mut}$/*FLT*-ITD$^{pos}$ Genotyp kann keiner der oben genannten Vorteile im klinischen Verlauf beobachtet werden (Döhner u. Döhners 2008; Döhner et al. 2005). Schlussfolgernd konnte nur für CN-AML Patienten mit *NPM1*$^{mut}$ Status in Abwesenheit einer *FLT3*-ITD$^{pos}$, eine höhere Überlebensrate beschrieben werden.

Mutationen im *CCAAT/enhancer binding protein alpha* (*CEBPA*) Gen zählen im Gegensatz zu *MLL* und *FLT3* Mutationen zu den Veränderungen, welche mit einer verbesserten Prognose einhergehen. In ca. 15% der CN-AML liegt eine Mutation in diesem myeloischen Transkriptionsfaktor vor (Marcucci et al. 2011). Patienten mit *CEBPA* Mutation weisen eine signifikant längere RD und ein besseres OS auf (Fröhling et al. 2004; Marcucci et al. 2008; Mrózek et al. 2007; Schlenk et al. 2008).

Aktuelle Studien haben gezeigt, dass biallelische *CEBPA* Mutationen (Vorhandensein von 2 *CEBPA* Mutationen) mit einer sehr günstigen Prognose assoziiert sind, während die Prognose der Patienten mit einer monoallelischen *CEBPA* Mutation im Wesentlichen durch konkurrente Genmutationen beeinflusst wird (Koschmieder et al. 2009; Pabst et al. 2009; Taskesen et al. 2011; Wouters et al. 2009). Die *CEBPA* Mutation und *NPM1* Mutation wurden aufgrund ihrer Assoziation mit bestimmten klinischen Charakteristika und ihrer prognostischen Wertigkeit als sogenannte „provisional entity" in die neue WHO-Klassifikation aufgenommen (Döhner et al. 2010; Marcucci et al. 2011; Schlenk et al. 2008). *CEBPA* Mutationen finden sich interessanterweise in wenigen AML Patienten in der Keimbahn. In allen bislang berichteten Fällen erwarben diese Patienten eine weitere *CEBPA* Mutation auf dem zweiten Allel, die zum Zeitpunkt der Diagnose der AML dann nachweisbar war. Diese Mutationen des zweiten Allels werden als zweites „Schlüsselereignis" angesehen, dessen Folge die Progression in eine AML darstellt (Corbacioglu et al. 2007). Ebenfalls interessant ist, dass diese AML Fälle eine familiäre Häufung aufweisen und die Berichte über $CEBPA^{mut}$ familiäre AML lassen vermuten, dass Keimbahnmutationen von *CEBPA* ein prädisponierendes Ereignis in der Leukämogenese darstellen (Corbacioglu et al. 2007; Sellick et al. 2005). Aufgrund der klinischen Bedeutung wurde die *CEBPA* wie auch die *NPM1* Mutation als provisorische Entität in die aktuelle WHO-Klassifikation aufgenommen (Döhner et al. 2010; Marcucci et al. 2011; Schlenk et al. 2008).

Mutationen des *Wilms Tumor 1* (*WT1)* Gens werden in ca. 10-13% der Patienten gefunden und liegen meist in Exon 7 und 9 (Gaidzik et al. 2009; Owen et al. 2010; Paschka et al. 2008; Summers et al. 2007; Virappane et al. 2008). Patienten mit *WT1* Mutationen sind jünger, weisen höhere LDH Werte und höhere Leukozytenzahlen im peripheren Blut auf. Mutationen des *WT1* Gens sind signifikant mit *FLT3*-$ITD^{pos}$ und *CEBPA* Mutationen assoziiert. Die prognostische Wertigkeit von *WT1* Mutationen ist noch nicht abschließend geklärt. In einer Studie des MRC (British Medical Research Council) wurden *WT1* Mutationen als unabhängiger prognostischer Faktor in Bezug auf *FLT3*-ITD und *NPM1* Mutationen beschrieben (Virappane et al. 2008). Die Studie der Cancer and Leukemia Group B (CALGB) konnte ein kürzeres DFS und schlechteres OS bei Patienten mit dem Genotyp $WT1^{mut}$/*FLT3*-$ITD^{pos}$ zeigen (Paschka et al. 2008).

In der Studie der deutsch-österreichischen Studiengruppe AMLSG waren *WT1* Mutationen mit einem schlechteren Ansprechen auf die Induktionstherapie und folgend mit niedrigeren CR Raten und häufigerem Auftreten einer RD vergesellschaftet. Darüber hinaus zeigte sich ein signifikant geringeres RFS, jedoch kein Unterschied im OS (Gaidzik et al. 2009). Eine mögliche Ursache hierfür könnten die unterschiedlichen Therapieregime in den jeweiligen Studienpopulationen darstellen: die Patienten der AMLSG waren mit signifikant höheren Cytarabin Dosen (Ara-C Dosen) behandelt worden.

Eine weitere wichtige Familie onkogener Proteine, welche zu den AML-assoziierten Genmutationen gehört, stellen die *RAS* Proto-Onkogene dar. Es bestehen drei funktionell unterschiedliche RAS Proteine: NRAS, KRAS und HRAS, wobei erst genanntes am häufigsten mutiert vorgefunden wird. *NRAS* Mutationen treten in 10-15% der CN-AML Patienten auf (Gaidzik u. Döhner 2008; Mrózek et al. 2007; Schlenk et al. 2008). Bei den RAS Proteinen handelt es sich um Membran assoziierte G-Proteine, welche in der Regulation der Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Zelle eine elementare Rolle spielen. Mutationen im *RAS* Gen führen zu einer erhöhten Proliferation und erniedrigten Apoptoserate. Die Ergebnisse der Studien, welche die prognostische Bedeutung von Mutationen im *NRAS* Gen untersuchten, stehen teilweise kontrovers zueinander. Einige Studien scheinen zu belegen, dass sich Mutationen des *NRAS* Gens negativ auf das Überleben der Patienten auswirken (Padua u. West 2000; Paquette et al. 1993). Bacher et al. konnten an einer großen Kohorte von Patienten zeigen, dass sich der klinische Verlauf von Patienten mit und ohne *NRAS* Mutation im Wesentlichen nicht unterscheidet (Bacher et al. 2006).

Eines der zuerst entdeckten Gene, dessen Aberration einen deutlichen Einfluss auf den klinischen Verlauf des AML Patienten hat, ist das *mixed-lineage-leukemia (MLL)* Gen. Die Partielle Tandemduplikation im *MLL* Gen (*MLL*-PTD$^{pos}$) führt zu einer signifikanten Verkürzung der RD und ist bei 8-11% aller CN-AML Patienten nachweisbar (Caligiuri et al. 1998; Döhner et al. 2002; Döhner u. Döhner 2008; Gaidzik u. Döhner 2008; Mrózek et al. 2007; Schnittger et al. 2000).

Durch die Anwendung neuer methodischer Ansätze, wie das „whole genome sequencing“ wurden weitere neue Genmutationen in der AML entdeckt, die vor allem Einfluss in die epigenetische Regulation haben. Zu diesen Genen gehören das *tet oncogene family member 2* (*TET2*) Gen, das *isocitratdehydrogenase 1* bzw. *2* (*IDH1*; *IDH2*) Gen und das Gen der *DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha* (*DNMT3A*).

Das auf Chromosom 4q24 gelegene *TET2* Gen wirkt als Tumorsuppressorgen und besitzt eine tragende Funktion in epigenetischen Regulationssystemen, wie z.B. der DNA-Demythelierung (Ko et al. 2010). *TET2* überführt Methylcytosin zu 5-Hydroxymethylcytosin, welches in der Regulation der Myelopoese durch Beeinflussung der Chromatinstruktur und Rekrutierung spezifischer Transkriptionsfaktoren entscheidend wirkt (Döhner u. Gaidzik 2011). Aberrationen von *TET2* spielen eine wesentliche Rolle in der Entwicklung von myelodysplastischen Syndromen (MDS), chronisch myeloproliferativen Erkrankungen (CMPD), chronisch myelomonozytären Leukämien (CMML) und der AML. Die Inzidenz heterozygoter Mutationen liegt bei der AML zwischen 10-25%, in Abhängigkeit des untersuchten Patientenkollektivs (Metzeler et al. 2011) und insbesondere des Patientenalters. Die klinische Relevanz und prognostische Wertigkeit von Aberrationen des beschrieben Gens wird in aktuell laufenden Studien untersucht (Bacher et al. 2010; Delhommeau et al. 2009; Gaidzik et al. 2012; Langemeijer et al. 2009).

Mutationen von *IDH1* und *IDH2* werden mit einer Inzidenz von 16% in CN-AML Patienten gefunden (Mardis et al. 2009). Abhängig von der Studie und der untersuchten zytogenetischen Subpopulation können Genaberrationen in 5-25% der AML Fälle nachgewiesen werden (Abbas et al. 2010; Marcucci et al. 2010; Paschka et al. 2010). Die Inzidenz umfasst hauptsächlich drei wiederkehrende Aberrationen im *IDH1*/*2* Gen (*IDH1*$^{R132}$, *IDH2*$^{R140}$ und *IDH2*$^{R172}$). *IDH1*$^{R132}$ und *IDH2*$^{R140}$ sind häufig bei CN-AML Patienten mit zusätzlicher *NPM1* Mutation zu finden (Abbas et al. 2010; Green et al. 2010; Paschka et al. 2010). Bisherige Studien zeigen bisweilen keine konsistenten Ergebnisse im Hinblick auf die prognostische Wertigkeit von Aberrationen des *IDH1* Gens bei CN-AML Patienten. Eine Übereinstimmung der publizierten Daten besteht in der Aussage, dass *IDH1* Mutationen mit einem schlechteren Überleben der Patienten assoziiert sind.

Hierbei müssen zusätzlich bestehende Mutationen anderer prognostisch relevanter Gene beachtet werden. Die prognostische Relevanz von Mutationen des *IDH2* Gens scheint abhängig vom mutierten Codon im Gen (*IDH2*$^{R140}$ oder *IDH2*$^{R172}$) zu sein. Die AMLSG konnte zeigen, dass *IDH2*$^{R140}$ Mutationen bei Patienten mit CN-AML mit molekulargenetisch günstiger Prognose zu einer Verschlechterung des OS führen (Paschka et al. 2010). Weitere Studien mit *IDH2*$^{R172}$zeigen negative Effekte auf die CR und das OS (Green et al. 2010; Marcucci et al. 2010). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der AMLSG steht die Schlussfolgerung von Green et al., welche *IDH2*$^{R140}$ Mutationen als unabhängige Prognosefaktoren für ein verbessertes RFS und OS definieren konnte (Green et al. 2010). Die Kombination von Mutationen des *IDH1/2* Gens mit Mutationen der Gene *FLT3* oder *NPM1* beeinflussen die Prognose signifikant (Abbas et al. 2010; Boissel et al. 2010; Green et al. 2010; Marcucci et al. 2010; Paschka et al. 2010; Patel et al. 2011; Ravandi et al. 2012)

DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 alpha (DNMT3A) katalysiert die Methylierung von Cytosinresten von CpG Dinukleotiden der DNA. Die Inzidenz an Mutationen des *DNMT3A* Gens beträgt in Abhängigkeit der zytogenetischen Subgruppe bis zu 25%. *DNMT3A* Mutationen sind mit erhöhten Leukozyten- und Thrombozytenzahlen, einem erhöhten Patientenalter sowie mit *NPM1*, *FLT3* oder *IDH1* Mutationen assoziiert (Gaidzik et al. 2013; Ley et al. 2010; Thol et al. 2011). In den ersten kleineren und teils hoch selektierten Studien scheinen *DNMT3A* Mutationen mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet zu sein, wobei der Effekt in bestimmten Subtypen z.B. *DNMT3A*$^{mut}$/ *FLT3*-ITD$^{pos}$ größer zu sein scheint (Marková et al. 2012; Thol et al. 2011). In der bisher größten Studie von 1770 AML Patienten zeigte sich ein prognostischer Einfluss nur für spezielle genetische Subgruppen (Gaidzik et al. 2013).

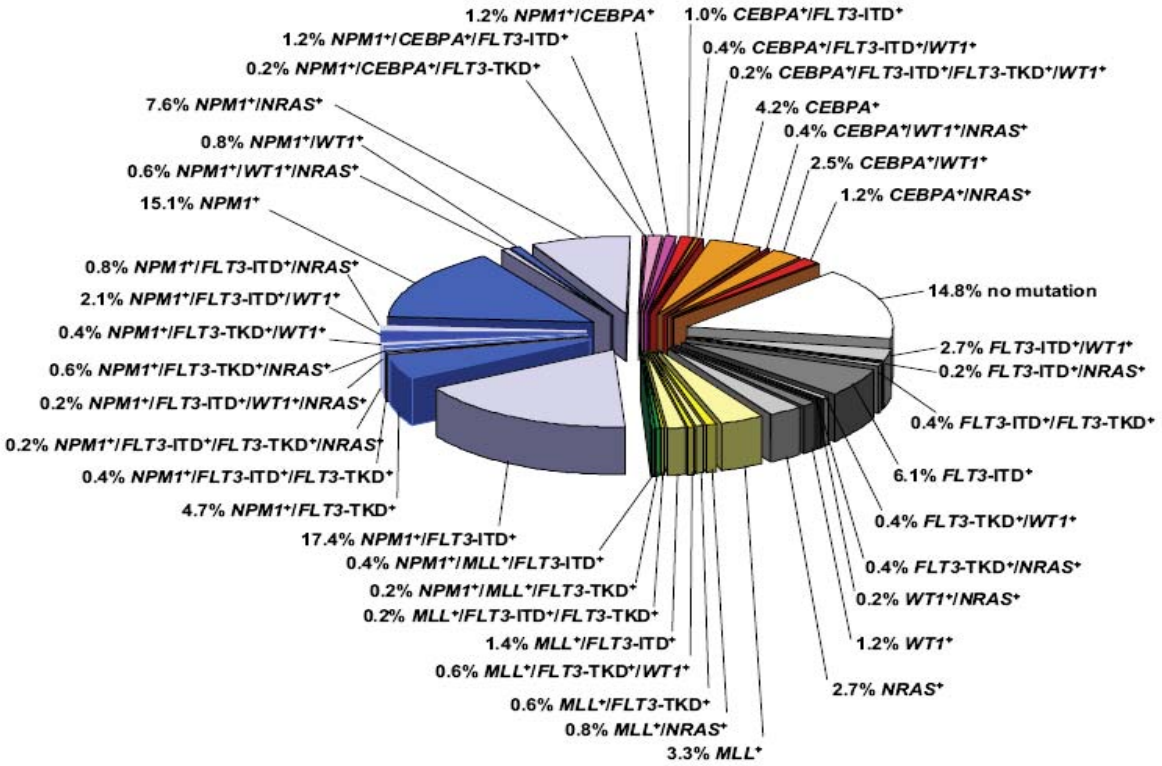


**Abbildung 1:** Molekulare Heterogenität von Patienten mit akut myeloischer Leukämie (AML) und normalem Karyotyp (Döhner et al. 2010). Kreisdiagramm zur Darstellung der Mutationsverteilung. Daten der AML Study Group Ulm (AMLSG) von 485 Patienten mit zytogentisch normaler AML. *CEBPA*: Abkürzung für *CAAT/enhancer binding protein alpha* Gen; *FLT3*-ITD: interne Tandemduplikation (ITD) der juxtamembranären (JM) Domäne des *FMS-like tyrosin kinase3* Gens; *FLT3*-TKD: Punktmutationen in der Tyrosinkinasedomäne des *FLT3* Gens; *MLL*-PTD: Partielle Tandemduplikation des *mixed-lineage-leukemia* Gens; no mutation: keine Mutation vorliegend; *NPM1* Abkürzung für *Nukleophosmin 1* Gen; *NRAS*: *raspberry* Gen ursprünglich in der Drosophila melanogaster beschrieben, aus der Familie der *RAS* Protoonkogene; *WT1*: Abkürzung für *Wilms-Tumoren1* Gen; $^{-}$: keine Mutation vorliegend; $^{+}$: Mutation vorliegend

## 1.3 RUNT-related Protein 1 (RUNX1), Struktur und Funktion des Transkriptionsfaktors

Zur Ausdifferenzierung von myeloischen Progenitorzellen in reife funktionstüchtige Zellen sind komplexe Interaktionen diverser Transkriptionsfaktoren und Regulatoren entscheidend (Shivdasani et al. 1996; Tenen 2003; Tenen et al. 1997). Das RUNT-related protein1 (RUNX1), auch acute myeloid leukemia 1 (AML1) genannt, ist ein zur Gruppe der RUNT Protein-Familie gehörender Transkriptionsfaktor (Kurokawa u. Hirai 2003). Die auf Chromosom 21q22 liegende kodierende Sequenz des *RUNX1* Gens umfasst 10 Exons (Exon1-6; 7A-C; 8).

Das *RUNX1* Gen besitzt 2 Promotorstrukturen, jeweils eine vor dem Initiationscodon von Exon 1 und Exon 3. Die Länge des Proteins wechselt zwischen 453 und 480 Aminosäuren (AS), in Abhängigkeit davon, welcher Promotor die Initiation startet (Osato 2004).

Die RUNT-Proteinfamilie von Säugetieren besteht aus drei Mitgliedern: AML1/RUNX1, AML2/RUNX3 und AML3/RUNX2. Letzt genannter Transkriptionsfaktor spielt eine entscheidende Rolle in der Osteogenese. Eine Haploinsuffizienz führt zur Dysregulation der skelettalen Entwicklung und zum klinischen Bild der cleidocranialen Dysplasie. RUNX3 besitzt multiple Funktionen; es nimmt eine wichtige regulatorische Funktion für das Zellwachstum von Magenepithelzellen ein, reguliert die Entwicklung axonaler Projektionen von Ganglienzellen der Hinterwurzeln und die Ausreifung von T-Zellen (Lutterbach u. Hiebert 2000). RUNX1 besitzt wiederum 3 Isoformen (RUNX1a; b; c), welche durch posttranslationales alternatives Splicing entstehen. RUNX1b und c haben C-terminal zur runx homology domain (RHD) hin eine weitere funktionell aktive Domäne, die sogenannte Transaktivierungsdomäne, welche im RUNX1a Protein fehlt. Der Unterschied zwischen RUNX1b und c besteht in der Deletion der letzten 27 N-terminalen Aminosäuren. Unter den Isoformen besteht ein begrenzt funktioneller Antagonismus, da RUNX1b myeloische Progenitorzellen aus einem RUNX1a vermittelten Differenzierungsblock ausklinken und deren Differenzierung vorantreiben kann (Kurokawa u. Hirai 2003).

Mitglieder der RUNX-Familie sind durch eine spezifische Sequenz der DNA-bindenden Domäne, der sogenannten RHD-Domäne, gekennzeichnet, welche Homologien zu einem in der Drosophila melanogaster gefundenen Protein besitzt. Dieses ist essentiell für die Segmentation, sexuelle Ausreifung und Nervenentwicklung in der sich entwickelnden Fliege (Kurokawa u. Hirai 2003).

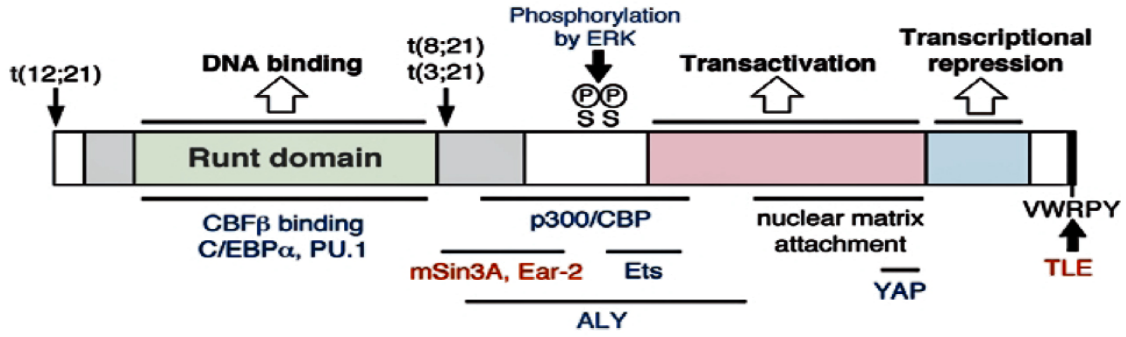


**Abbildung 2:** Graphische Darstellung des RUNT-related transkription factor 1 (RUNX1) Proteins (Kurokawa u. Hirai 2003). Farblich gekennzeichnete Unterteilung der einzelnen funktionell unterschiedlichen Proteinabschnitte. Breite Pfeile nach oben beschreiben die Funktion der dazugehörigen Domäne. Dünne, schwarz gefüllte, nach unten zeigende Pfeile zeigen die jeweiligen Proteinabschnitte an, welche durch chromosomale Aberrationen verändert werden. Unter dem RUNX1 Protein stehende Abkürzungen zeigen die interagierenden Proteinabschnitte mit den jeweiligen Transkriptionsfaktoren (blau, rot) an. ALY: Abkürzung von Ally, interagiert mit RUNX1 und LEF-1; CBFß: core binding factor betta; C/EBPalpha: Abkürzung für CAAT/enhancer binding protein alpha; DNA: Desoxyribonukleinsäure; Ear-2: V-erbA related protein 2 (Synonym: NR2F6); ERK: Extracellular-signal regulated kinase; ETS: Transkriptionsfaktor E-twenty-six (E26); mSin3A: switch independent 3 protein; PU1: Transkriptionsfaktor PU.1 (Synonym: SPI1); P300/CBP: P300/CBP-associated factor; P: Symbol für Phosphorylierung, Anhängen einer Phosphatgruppe an ein Protein; RUNT domain: DNA-bindenden Domäne, entspricht Runx homology domain (RHD)-Domäne; S: Aminosäure Serin; kann phosphoryliert werden und spielt bei der Aktivierung bzw. Inaktivierung von Enzymen eine Rolle; TLE: transducin-like enhancer of split (Corepressor); t(3;21): Translokation zwischen Chromosom 3 und 21; t(8;21): Translokation zwischen Chromosom 8 und 21, bildet das Fusionstranskript AML1-ETO; t(12;21): Translokation zwischen Chromosom 12 und 21; VWRPY: VWRPY Sequenz, Bindung des Corepressors TLE zur transkriptionellen Repression; YAP: Yes-associated protein

Proteinuntersuchungen konnten mehrere funktionelle Domänen des RUNX1-Transkriptionsfaktors aufzeigen. Am carboxy-terminalen Ende (C-Terminus) des Proteins liegt eine VWRPY Sequenz, welche zur Bindung des Corepressors, transducin-like enhancer of split (TLE) (Lutterbach u. Hiebert 2000) dient und eine transkriptionelle Repression hervorruft. In der Nachbarschaft findet man eine weitere hemmenden Domäne und die sogenannte Transaktivationsdomäne. Sie dient der Bindung der Faktoren E-twenty-six (ETS), Aly/REF export factor (ALY), Yes associated protein (YAP) und CREB binding Protein (CBP), welche als Aktivatoren der Transkription fungieren (Kurokawa u. Hirai 2003). Darüber hinaus vermittelt die Transaktivationsdomäne die Bindung des RUNX1-Proteins an die Matrix des Zellkerns. Die amino-terminal (N-terminal) gelegene, hoch konservierte, 128 Aminosäuren lange RHD-Domäne dient der Bindung an die DNA und ist in den Exons 3 bis 5 lokalisiert (Osato 2004).

Ihre S-Typ Immunglobulinstruktur ist identisch zu der DNA-Bindungsdomäne von p53, nuclear factor kappaB (NF-κB) und von den signal transducers and activators of transcription (STAT) Proteinen (Lutterbach u. Hiebert 2000; Perry et al. 2002).

Eine sogenannte PEBP2-Erkennungssequenz in der RHD-Domäne erkennt die zu bindende Consensus DNA Sequenz (RUNT domain binding element) im Cis Element der Zielgene, um von dort aus die Transkription initiieren zu können (siehe Abbildung 2). Diese Genregion bindet die Transkriptionsfaktoren, was wiederum essentiell für die Myelopoese zu sein scheint (Perry et al. 2002). Eine weitere Funktion der RHD-Domäne ist die Bindung des core-binding factor β (CBFβ), welche die Bindung an die DNA als heterodimeren Komplex ermöglicht. Der CBFβ ist ein 187 Aminosäuren langes Protein, das keine Domäne zur Bindung der Promotorstrukturen besitzt, aber die Affinität des Komplexes an die DNA erhöht (Lutterbach u. Hiebert 2000). Die Heterodimerisation hemmt die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse von RUNX1/CBFβ im Proteasom.

Im adulten Lebewesen ist *RUNX1* in allen hämatopoetischen Zellreihen exprimiert und reguliert die Entwicklung unreifer Vorläuferzellen im Knochenmark zu terminal differenzierten Zellen des peripheren Blutes. RUNX1 scheint ein eher schwächerer Aktivator der Transkription zu sein: so ist zwar die Bindung des CBF an die Promotorstruktur der Zielgene nötig, aber für die Initialisierung der Gene nicht ausreichend (Kurokawa u. Hirai 2003). Das RUNX1 Protein wird als „Organisator“ betrachtet, welcher die Zusammenlagerung der einzelnen transkriptionsaktivierenden Komplexe koordiniert. Dafür spricht auch, dass die PEBP2 Sequenz häufig benachbart zu Bindungsstellen von anderen hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. ETS, CEBPA und myeloblastosis viral oncogene homolog (Myb) liegt (Kurokawa u. Hirai 2003; Perry et al. 2002). RUNX1 interagiert darüber hinaus mit Cofaktoren, welche selbst die DNA nicht binden können. Dazu gehören P300/CBP-associated factor histon acetyltransferase (p300), CBP, YAP und ALY (siehe Abbildung 2). Diese Faktoren stimulieren die Transkription durch Acetylierung von Histonen (CBP) oder Rekrutierung des Initiierungskomplexes der Transkription für die RNA Polymerase 2 (Kurokawa u. Hirai 2003).

Gene, deren Transkription gefördert werden sind Interleukin 3 (IL3), Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), Kolonie-stimulierender Faktor Rezeptor (CSF-1 Rezeptor), Myeloperoxidase, neutrophile Elastase, Defensin, Granzym B und Untereinheiten des T- und B-Zell Rezeptors (Ichikawa et al. 2004; Kurokawa u. Hirai 2003). Um eine Hemmung der Transkription eines Zielgens zu erreichen, fördert RUNX1 die Anlagerung von Corepressoren. Zu den inhibierten Genen gehört unter anderem *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A* (Synonym: *p21*), *wild-type p53 activated factor* (*WAF1*), *dk interacting protein* (*CIP1*) in NIH3T3 Zellen und CD4 Thymozyten (Kurokawa u. Hirai 2003; Lutterbach u. Hiebert 2000).

Die Wirkung von RUNX1 ist abhängig vom Gleichgewicht an wachstumsstimulierenden oder -hemmenden Reizen, dem zu regulierenden Gen und von posttranslationellen Modifikationen am Protein. Die posttranslationelle Regulation des RUNX1 Proteins durch Phosphorylierung spezifischer Serin- und Threoninreste durch die cyclin-depend-Kinase (CDK1 und CDK2) und die extracellular signal-related-Kinase (ERK) als Endstrecke des Mitogen aktivierte (MAP)-Kinasen Signalwegs ist ein möglicher Regulationsmechanismus von RUNX1 (Biggs et al. 2006). Darüber hinaus wirkt die Bindung von Coaktivatoren antagonisierend auf die weitere Anlagerung von Corepressoren an das RUNX1 Protein (Alcalay et al. 2001).

Untersuchungen an *RUNX1* defizienten Mäusen (*RUNX1*$^{-/-}$) zeigen, dass *RUNX1* in der definitiven Hämatopoese eine zentrale Rolle spielt. Diese Tiere sind in ihrer Morphogenese und in der Entwicklung der primitiven Hämatopoese aus dem Dottersack nicht kompromittiert. Es fehlen aber die Progenitorzellen der definitiven Hämatopoese in der Leber, sodass die Tiere aufgrund massiver Blutungen in den Stammganglien des zentralen Nervensystems in der Mitte der Schwangerschaft versterben (Ichikawa et al. 2004; Kurokawa u. Hirai 2003; Lutterbach u. Hiebert 2000). Dies kann auf die stark verminderte Thrombozytenzahl bei unzureichender Reifung der Megakaryozyten zurückgeführt werden. Diese weisen deutliche Zeichen der Unreife, wie beispielsweise eine verminderte Zellgröße, Hypoploidie und eine abnorme Ultrastruktur auf (Ichikawa et al. 2004).

Durch Generieren von transgenen Mäusen, welche konditional *AML1-ETO* [t(8; 21)] exprimieren, was dominant negativ auf die RUNX1 Funktion wirkt, konnte die Funktion von RUNX1 in der Hämatopoese weiter untersucht werden.

AML1-ETO wirkt durch die erhaltene DNA Bindung auf die cis-Elemente der Promotorstrukturen des *RUNX1* Gens und blockiert diese. Zusätzlich wird der nuclear receptor corepressor (N-CoR) rekrutiert, welcher zu einer Hemmung der RUNX1 Zielgene führt, indem weitere Repressoren wie switch independent 3 protein (mSin3A) und Histondeacetylasen (HDACs) aktiviert werden. Dies führt zu einer verminderten Differenzierung der primären hämatopoetischen Vorläuferzellen (Bushweller et al. 2003; Gelmetti et al. 1998; Kurokawa u. Hirai 2003). Als Folge bildet sich in diesen Individuen ein *RUNX1*$^{-/-}$ Phänotyp aus. Higuchi et al. konnten zeigen, dass bei transgenen Mäusen neben dem *RUNX1*$^{-/-}$ Phänotyp die Exposition mit kanzerogenen Stoffen nötig ist, um hämatopoetische Neoplasien auszulösen (Higuchi et al. 2002). Durch eine erhöhte Selbsterneuerungskapazität der Stammzellen expandiert der hämatopoetische Progenitorzellpool und weist eine verminderte Differenzierung auf.

## 1.4 *RUNX1* Mutationen in der AML

*RUNX1* ist eines der häufigsten Gene, dessen physiologische Funktion in hämatologischen Neoplasien durch Translokationen, Punktmutationen und Amplifikationen verändert ist. In der AML ist *RUNX1* am häufigsten an chromosomalen Translokationen beteiligt (Pabst u. Mueller 2007), welche zur Bildung von chimären Proteinen führen. Die Translokation t(8;21) bildet das Fusionstranskript *AML1-ETO* und kommt in Abhängigkeit der Kohortencharakteristik in ca. 8% der AML vor (Schnittger et al. 2006). Andere Translokationen wie die *RUNX1-EVI1* (*ecotropic virus integration site 1*) (3q26) oder *RUNX1-ETV6* (*ets variant 6*) (12p13) werden deutlich seltener gefunden (Dicker et al. 2007). *RUNX1-ETV6* ist unfähig zur Transaktivierung und inhibiert darüber hinaus die Aktivierung der RUNX1 Zielgene. Das Fusionstranskript ist schwach leukämogen, d.h. eine Leukämie entsteht erst durch den Erwerb weiterer Mutationen in Protoonkogenen (Fischer et al. 2005; Golub et al. 1995; Kurokawa u. Hirai 2003).

Somatische Mutationen von *RUNX1* wurden in MDS als auch in der AML beschrieben. *RUNX1* Mutationen sind in CN-AML Patienten in Abhängigkeit der Kohortencharakteristik in bis zu ca. 10% zu finden (Gaidzik et al. 2011; Tang et al. 2009).

Die Inzidenz ist abhängig vom untersuchten Patientenkollektiv (Alter, FAB Subtyp, MDS in der Anamnese). Als Mutationstyp wurden sog. „in frame“ Mutationen (keine Veränderung des Leserasters) und „frameshift“ Mutationen (Verschiebung des Leserasters und ggf. Veränderung des RUNX1 Proteins) detektiert. Zu den „in frame“ Mutationen zählen sog. „nonsense“ Mutationen (die Translation bricht aufgrund eines neu entstandenen Stopp Codons ab), „missense“ Mutationen (Entstehung einer neuen AS) oder „silent“ Mutationen (dieselbe AS wird trotz veränderter Nukleotidsequenz eingefügt). Als frameshift Mutationen werden Insertionen bzw. Deletionen von Nukleotiden beschrieben, die in Abhängigkeit der Anzahl der inserierten oder deletierten Nukleotide zu einer Verschiebung des Leserasters führen. Dies hat eine Veränderung der gesamten C-terminal gelegenen AS Struktur des Proteins zur Folge. Hierdurch wird das ursprüngliche Stopcodon zerstört und die Translation wird erst durch ein späteres, neu generiertes Stopcodon terminiert (Harada et al. 2004; Harada u. Harada 2009).

Die somatischen *RUNX1* Mutationen klustern innerhalb der RHD-Domäne. Man findet wiederkehrend Basentripletts (drei Nukleotide, welche für eine AS codieren), die eine erhöhte Mutationsinzidenz zu haben scheinen (Osato 2004; Roumier et al. 2003). Die primäre Nukleotidsequenz dieser Basentripletts besteht beispielsweise aus einer Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG) Dinukleotid-Abfolge und ist primär in den Sequenzabschnitten lokalisiert, welche die Proteinschleifen für die DNA Bindung codieren (Harada et al. 2004; Harada u. Harada 2009; Osato 2004; Tahirov et al. 2001). Die Mutationen verändern weder die Proteinfaltung noch die Heterodimerisation mit CBFβ, was zu einem dominant negativen Effekt führt. Das mutierte RUNX1 Protein bindet den CBFβ stärker als die wildtyp (wt) Form. Folgend wird ein Großteil der freien CBFβ-Proteine durch das mutierte Protein gebunden, was in einer verminderten Aktivierung der Zielgene resultiert (Osato 2004). Zusätzlich schützt die Komplexbildung mit CBFβ das mutierte Protein vor seinem Ubiquitin-Proteasom vermittelten Abbau und verlängert dessen Halbwertszeit und Wirkung (Huang et al. 2001). Die Mehrzahl der Mutationen führen zu einem Verlust der Transaktivierungsfähigkeit („loss of function“) (Harada et al. 2004; Harada u. Harada 2009).

Bei der *de novo* AML kommen *RUNX1* Mutationen in Abhängigkeit der Selektion des Patientenkollektives bei CN-AML Patienten in ca. 5-13,2% vor (Dicker et al. 2007; Harada et al. 2004; Tang et al. 2009). Eine hohe Inzidenz an somatischen Punktmutationen im *RUNX1* Gen findet man bei wenig differenzierten AML Formen (M0 Subtyp: 12-46%), bei strahlungs- und therapieassoziierten AML (t-AML) Fällen bzw. MDS (42%) oder bei sekundären AML (s-AML), welche aus einem MDS (MDS/AML) (10-20%) hervorgehen (Dicker et al. 2007; Harada et al. 2004; Harada u. Harada 2009; Osato 2004; Schnittger et al. 2011).

Neben der Assoziation mit FAB M0 sind *RUNX1* Mutationen mit spezifischen chromosomalen Aberrationen wie Trisomie 21 und Trisomie 13 assoziiert (Schnittger et al. 2011).

In einer Studie von Dicker und Kollegen mit 156 AML Fällen, welche nach spezifischen FAB-Kriterien selektiert waren, wurden *RUNX1* Mutationen in ca. 46% der FAB M0 Fälle und in ca. 80% der Fälle mit Trisomie 13 detektiert (Dicker et al. 2007). Betrachtet man die Lokalisation der *RUNX1* Mutationen, so lassen sich deutliche Unterschiede in ihrer Verteilung feststellen. Im Vergleich zu der C-terminalen Region, welche in ca. 11% der Fälle mutiert ist, zeigt die N-terminal gelegene RHD-Domäne mit einer Mutationsrate von ca. 81% eine deutliche Präferenz im FAB Subtyp M0 (Dicker et al. 2007; Harada et al. 2004). Die N-terminale Region, unter Ausschluss der RHD-Domäne, weist deutlich seltener Mutationen auf. Hier findet man nur bei ca. 9% der *RUNX1* mutierten Fälle ($RUNX1^{mut}$) eine Sequenzaberration im FAB Subtyp M0 (Dicker et al. 2007; Osato 2004). In der Gruppe außerhalb des FAB M0 Subtyps, konnte eine Mutationsverteilung auf die gesamte kodierende Region des *RUNX1* Gens gezeigt werden (Dicker et al. 2007).

Die Arbeiten von Preudhomme et al. und Osato konnten zeigen, dass die Mutationen des *RUNX1* Gens im M0 Subtyp häufig biallelisch lokalisiert sind (Preudhomme et al.: 88,9%; Osato: 56,4%). Das untersuchte Kollektiv von Preudhomme et al. beinhaltete jedoch Patienten mit AML, MDS, chronischer myeloischer Leukämie (CML), akuter lymphatischer Leukämie (ALL) und essentieller Thrombozythämie (ET). Untersucht wurde die kodierende Sequenz von Exon 3 bis 5. Osato untersuchte Patienten kaukasischen Ursprungs und bezieht sich im Vergleich auf AML von FAB Subtyp M0.

Osato weitete seine Untersuchung auf die Sequenzabschnitte der Exone 3 bis 8 aus (Preudhomme et al. 2000; Osato 2004).

In einer Arbeit von Tang et al. konnten *RUNX1* Mutationen mit ca. 13% in 470 *de novo* AML Patienten (15-90 Jahre) beobachtet werden, welche meist heterozygot vorkamen [53/62 Mutationen (85,5%)]. In der Gruppe FAB M0 konnten signifikant mehr Mutationen gefunden werden (40%). Bezogen auf alle Patienten verteilten sich die Mutationen gleichmäßig auf das C- und N-terminale Ende (Tang et al. 2009), wobei sich die Mutationsanalyse auf die kodierende Sequenz von Exon 3 bis 8 beschränkte. In dieser Studie waren *RUNX1* Mutationen mit einer niedrigeren CR Rate und einem schlechterem DFS und OS assoziiert.

In einer aktuellen Studie von Schnittger et al. wurden 449 Patienten, selektiert nach Karyotyp, auf *RUNX1* Mutationen untersucht. Es konnten insgesamt in 32.7% der Fälle *RUNX1* Mutationen gefunden werden. Betrachtete man einzelne Untergruppen, so waren Mutationen bevorzugt im FAB Subtyp M0 (65.2%) und bei Patienten mit Trisomie 13 (90%) zu finden. Bei Patienten mit CN-AML war *RUNX1* in 26.3% der Fälle mutiert. Univariate Untersuchungen ergaben ein kürzeres OS und EFS für $RUNX1^{mut}$ CN-AML Patienten (Schnittger et al. 2011).

Ein weiterer interessanter Aspekt beruht auf dem Nachweis von *RUNX1* Keimbahnmutationen bei Patienten mit autosomal dominantem „familial platelet disorder“ (FPD) Syndrom. Das FPD Syndrom ist eine Erkrankung, die durch Thrombopenie, abnorme Thrombozyteneigenschaften sowie einer Prädisposition zur Entwicklung eines MDS und/ oder AML gekennzeichnet ist. Die *RUNX1* Keimbahnmutationen sind vorzugsweise in der N-terminalen Region des Gens zu finden, meist Exon 3 bis 5 betreffend, wodurch die RHD-Domäne in ihrer DNA-Bindungsfähigkeit beeinträchtigt wird. Die klinische Präsentation wie auch das Erkrankungsalter sind stark variabel. Jedoch bestärkt die lange Latenzzeit bis zur Entwicklung eines MDS/AML die Hypothese, dass sekundäre Mutationen für die Entstehung einer MDS/AML notwendig sind. Heterozygote *RUNX1* Mutationen scheinen insuffizient zu sein, eine MDS/AML auszulösen. Die durchschnittliche Inzidenz für die Entwicklung MDS/AML unter *RUNX1* Mutationsträgern beläuft sich auf ca. 35%.

Eine Stammzelltransplantation (HSCT) ist der einzige kurative Therapieansatz, wobei hier eine hohe therapieassoziierte Morbidität und Mortalität beachtet werden muss (Owen et al. 2008; Song et al. 1999).

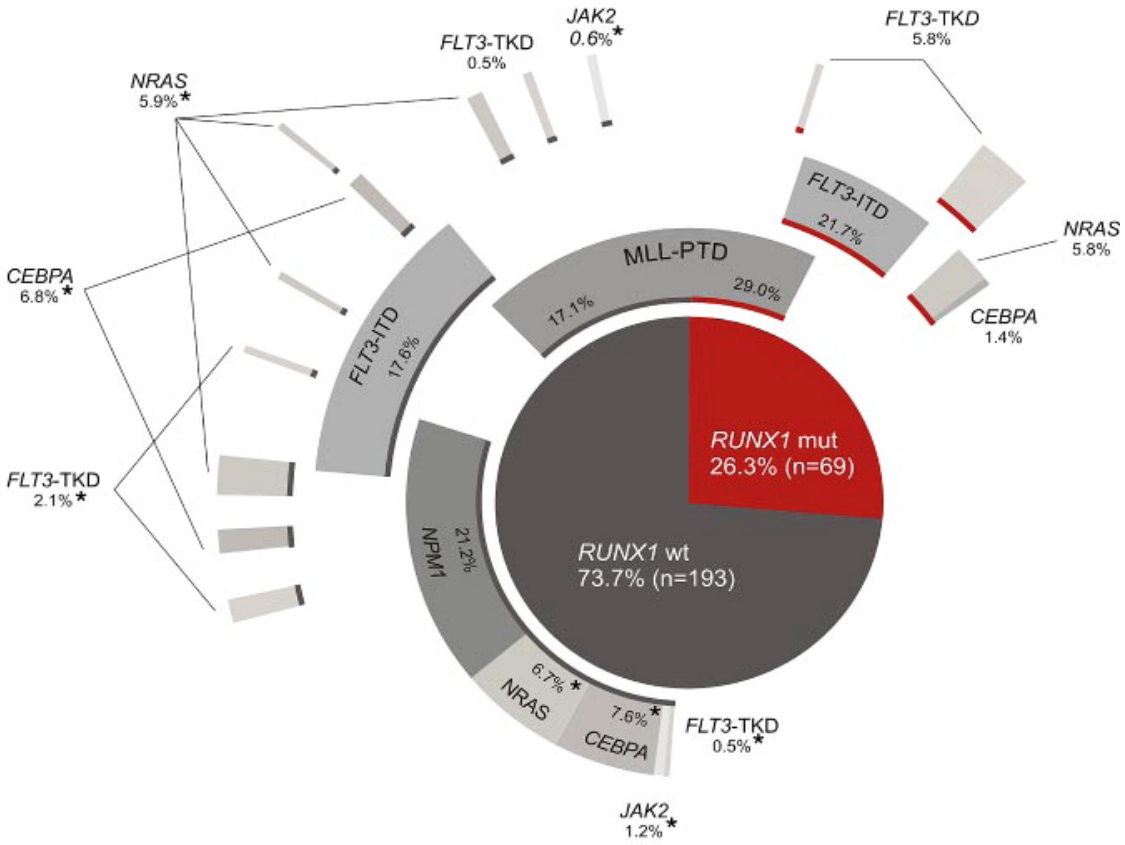


**Abbildung 3:** Häufigkeit von interagierenden Mutationen bei Patienten mit akut myeloischer Leukämie mit normalem Karyotyp (CN-AML) und *RUNT-related transkription factor 1* Mutation (*RUNX1*$^{mut}$) bzw. ohne Mutation (*RUNX1*$^{wt}$) (Schnittger et al. 2011). Studiencharakteristik: Studie der MLL Munich Leukemia Laboratory for diagnosis of AML Group; Kohortengröße 262 Patienten, davon 69 mit *RUNX1* Mutation und 193 mit *RUNX1*$^{wt}$ Sequenz. Patientenproben aus dem Zeitraum zwischen August 2005 und Mai 2009. Alle Patienten hatten eine *de novo* AML. *CEBPA*: *CAAT/enhancer binding protein alpha* Gen; *FLT3*-ITD: interne Tandemduplikation (ITD) der juxtamembranären (JM) Domäne des *FMS-like tyrosin kinase 3* Gens; *FLT3*-TKD: Mutationen in der Tyrosinkinasedomäne des *FLT3* Gens; *JAK2*: *Janus Kinase 2* Gen; *MLL*-PTD: Partielle Tandemduplikation des *mixed-lineage-leukemia* Gens; n: Anzahl der Patienten; *NPM1*: *Nukleophosmin 1* Gen; *NRAS*: *raspberry* Gen ursprünglich in der Drosophila melanogaster beschrieben, aus der Familie der *RAS* Protoonkogene; *RUNX1*$^{mut}$: mutiertes *RUNT-related transkription factor 1* Gen; *RUNX1*$^{wt}$: wildtyp *RUNT-related transkription factor 1* Gen, nicht mutiertes Gen; %: Anteil der dargestellten Population an der Gesamtzahl der untersuchten Patienten

Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass ein *RUNX1*$^{mut}$ Status mit dem Vorhandensein weiterer genetischer Aberrationen einhergeht (siehe Abbildung 3). Im Patientenkollektiv von Schnittger et al., welches ausschließlich *de novo* AML Fälle mit nicht komplexem Karyotypen enthielt, konnten in bis zu 40,8% der *RUNX1*$^{mut}$ Patienten weitere Mutationen in Transkriptionsfaktoren gefunden werden. Abbildung 3 veranschaulicht die Ergebnisse, in denen eine positive Korrelation mit *MLL*-PTD$^{pos}$, *FLT3*-ITD$^{pos}$ und *FLT3*-TKD$^{mut}$ Status bestand.

Eine inverse Korrelation konnte bei Mutationen des *RUNX1* Gens unter anderem für *NPM1* und *CEBPA* Mutationen gezeigt werden (Schnittger et al. 2011; Tang et al. 2009). Dicker et al. konnte zusätzlich eine inverse Korrelation von *NRAS*$^{mut}$ bei *RUNX1*$^{mut}$ Status im unselektierten Patientenkollektiv zeigen (Dicker et al. 2007).

## 1.5 Zielsetzung

In den letzten Jahren konnten eine Reihe genetischer Aberrationen in hämatopoese-assoziierten Genen identifiziert werden, die in der AML sowohl pathogenetische als auch prognostische Relevanz haben. Dies hat zu einer verbesserten Klassifizierung der AML und einer Individualisierung der Therapie, basierend auf dem genetischen Risikoprofil, geführt. Der Transkriptionsfaktor *RUNX1* ist in der AML durch Genmutationen und durch die Generierung verschiedener AML-assoziierter Fusionsgene (z.B. *RUNX1/ RUNX1T1*) involviert. Ziel dieser Arbeit ist es, die prognostische Bedeutung von *RUNX1* Mutationen in der CN-AML zu evaluieren: Zunächst sollte die Inzidenz von *RUNX1* Mutationen in einer größeren Gruppe homogen behandelter jüngerer CN-AML Patienten (16-60 Jahre) untersucht werden, die im Rahmen der prospektiven multizentrischen Phase III Studien, AML HD98-A und AMLSG 07-04 der AMLSG, behandelt wurden. Weitere Ziele dieser Arbeit waren, die Evaluation einer möglichen Assoziation von *RUNX1* Mutationen mit weiteren AML-assoziierten Genmutationen, sowie die prognostische Bedeutung von *RUNX1* Mutationen, insbesondere im Kontext mit den molekularen Markern wie z.B. *NPM1*$^{mut}$, aktivierenden *FLT3*-ITD$^{pos}$, *CEBPA*$^{mut}$, *WT1*$^{mut}$, *MLL*-PTD$^{pos}$ und *RAS*$^{mut}$ zu untersuchen.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

### 2.1.1 Patientenproben

Für die Mutationsanalyse des *RUNX1* Gens wurden insgesamt 538 CN-AML Patienten im Alter von 16 bis 60 Jahren untersucht. 498 Patienten hatten eine *de novo* AML, 20 Patienten eine s-AML und 15 Patienten eine t-AML. Die Patienten waren in den prospektiven multizentrischen Phase III Studien AML HD98-A (NCT00146120) und AMLSG 07-04 der AMLSG (NCT00151242) behandelt worden. Die Gewinnung des Patientenmaterials erfolgte entweder mittels Knochenmarkpunktion oder Punktion einer peripheren Vene. Die Diagnose wurde anhand klinischer, morphologischer, immunphänotpischer und zyto- bzw. molekulargenetischer Befunde nach WHO Kriterien gestellt. Zusätzlich zu den untersuchten Patientenmaterialien wurden Proben aus peripherem Blut von gesunden Kontrollen (n=29) untersucht, um auszuschließen, dass es sich bei den gefundenen Veränderungen um mögliche Polymorphismen (Single nucleotide polymorphisms, SNP) handelt, welche keine AML-assoziierte Bedeutung haben.

Das Therapieprotokoll für die Studie AML HD98A beinhaltete eine Induktionstherapie mit zunächst einem Zyklus ICE (Idarubicin, Cytarabin, Etoposid), gefolgt von einem zweiten Zyklus ICE bei Patienten mit kompletter oder partieller Remission entsprechend dem Prinzip der Doppelinduktion. Patienten mit ICE-therapierefraktärer Erkrankung erhielten stattdessen im zweiten Zyklus eine Hochdosischemotherapie mit Cytarabin. Die angeschlossene Konsolidierungstherapie beinhaltete einen Zyklus HAM (Cytarabin, Mitoxantron), danach wurden die Patienten randomisiert einer zweiten Konsolidierungstherapie mit HAM oder einer myeloablativen Konditionierung, gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation (HSCT) zugeführt. Im Therapieprotokoll der AMLSG 07-04 Studie wurden die Patienten randomisiert in insgesamt vier Studienarme aufgeteilt. Das erste Patientenkollektiv erhielt die Induktionstherapie mit ICE, im zweiten Kollektiv wurde eine Therapie mit ATRA (all-trans-Retinsäure) nachgeschaltet.

Die Patienten des dritten Studienarms erhielten die Induktionstherapie mit Idarubicin, Cytosin-Arabinosid, Etoposid (ICE) gefolgt von einer Therapie mit Valproinsäure (VPA). Der vierte Arm erhielt nach der Induktionstherapie mit ICE zunächst eine Therapie mit VPA und nachgeschaltet eine Therapie mit all-trans-Retinsäure (ATRA). Die Konsolidierungstherapie bestand aus drei Zyklen Hochdosischemotherapie mit Cytarabin. Patienten mit passendem HLA Familienspender wurden einer allogenen Stammzelltransplanation zugeführt.

### 2.1.2 Zytogenetische und molekulargenetische Charakterisierung

Nach Abnahme des Diagnosematerials [Knochenmark (BM) oder peripheres Blut (PB)] wurde dieses mit Heparin versetzt und an das zentrale Referenzlabor der AMLSG in Ulm bzw. Hannover versandt. Die Bestimmung des Karyotyps erfolgte mittels G-Bänderungstechnik. Die weitere Charakterisierung wurde anhand der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und/ oder Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) durchgeführt. Hierbei wurde das Material hinsichtlich der Fusionstranskripte *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFβ-MYH11*, *MLL-MLLT3* und *PML-RARA* untersucht. Molekulargenetische Untersuchungen beinhalteten die Analysen der Gene *FLT3*-ITD, *FLT3*-TKD, *NPM1*, *CEBPA*, *MLL*, *NRAS* und *WT1*.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellisolation und -archivierung

Zur Gewinnung mononukleärer Zellen wurde das Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation angewandt. PB bzw. BM wurden hierzu über ein Ficoll-Medium (Ficoll Separating Solution) im Verhältnis 1:2 geschichtet und anschließend bei 2800 Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute: rpm) für 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. BM bzw. PB mit hohen Leukozytenzahlen wurden zuvor in einem Verhältnis 1:2 bis 1:3 mit RPMI 1640 Kulturmedium verdünnt. Die mononukleären Zellen befanden sich nach der Zentrifugation zwischen Plasma und Ficollschicht und wurden mit einer sterilen Pipette abgenommen.

Nach zweimaligem Waschen mit 50 ml RPMI 1640 Medium (Zentrifugation bei 1200 rpm für 10 Minuten bei RT) wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Archivierung der mononukleären Zellen erfolgte als Zellpellet, in Abhängigkeit von der erhaltenen Zellzahl, mit je $5x10^5$ bis $5x10^7$ Zellen bei -80°C.

### 2.2.2 DNA-Extraktion

Die RNA/DNA Isolierung wurde mit dem ALLPrep Mini Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Dieses System ermöglicht die gleichzeitige, standardisierte Extraktion und Aufreinigung von genomischer DNA und Gesamt-RNA aus einer Probe. Zur Vorbereitung der DNA-Extraktion wurden das Pellet mit einem denaturierenden RLT plus Puffer (mit Guanidin-Isothiocyanat) lysiert und homogenisiert. Dieser Puffer inaktiviert vorhandene DNasen und RNasen und stabilisiert somit die DNA und RNA. Das Zelllysat wurde in eine QIAshredder Säule überführt und 2 Minuten lang bei 13 000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das homogenisierte Lysat in die ALLPrepDNAspin Säule überführt und bei 13 000 rpm erneut eine Minute zentrifugiert. Der dabei entstandene Durchfluss enthielt die benötigte RNA und konnte bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C tiefgefroren werden.

Es folgten zwei Waschschritte mit jeweils 500µl AW1 bzw. AW2 Puffer mit anschließender Zentrifugation bei 13 000 rpm. Mit einer vorgeschalteten Trockenzentrifugation konnte die DNA reeluiert werden. Dabei mussten 50-100µl TE-Puffer, abhängig von der Pelletgröße, auf die Säulenmembran überführt werden. Nach 1-3 Minuten konnte die Säule mit neuem Eppendorfröhrchen, zum Auffangen der DNA, bei 13 0000 rpm 1 Minute zentrifugiert werden. Die gewonnene DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C bzw. -20°C archiviert.

## 2.2.3 Polymerasen-Ketten Reaktion (PCR) für die Amplifikation des *RUNX1* Gens

### 2.2.3.1 Prinzip

Analysiert wurde der gesamte kodierende Bereich des *RUNX1* Gens, repräsentiert durch die Exons 1-8, und mittels PCR Reaktion amplifiziert. Insgesamt waren 8 PCR Reaktionen notwendig um die gesamte codierende Sequenz des *RUNX1* Gens zu untersuchen.

Als Primer-Paare [bestehend aus einem Vorwärts und dem entsprechenden Rückwärts-Primer (siehe Tabelle 2)] wurden intron-exonflankierende Primer gewählt, so dass zusätzlich ein Teil des angrenzenden Introns mit vervielfältigt wurde, um mögliche Mutationen in den Intron/Exon-Übergängen, den sogenannten Splicing-sides, detektieren zu können.

Zusätzlich wurde zu jedem Exon eine „no template control“ pipettiert. Diese enthielt alle Reagenzien, jedoch keine zu amplifizierende DNA. Diese Methode diente als Kontrolle für mögliche Kontaminationen, d.h. eine Verunreinigung der verwendeten Reagenzien mit DNA Spuren. Bei einer möglichen Verunreinigung wurde an dieser Stelle in der folgenden Gelelektrophorese eine Bande detektiert und daraufhin die PCR-Reaktion wiederholt.

**Tabelle 2:** Basensequenz der Primer für die Amplifikation der Exons 1 bis 8 des *RUNT-related transkription factor 1*(*RUNX1*) Gens. A: Adenin; C: Cytosin; Exon: Teil des eukaryoten Gens der nach dem Spleißen erhalten bleibt; G: Guanin; M13: speziefische Erkennungssequenz für den in der CSR Reaktion verwendeten M13-Primer; Primer: Oligonukleotid das als Startpunkt für DNA-replizierende Enzyme, wie die DNA-Polymerase dient; T: Thymin

| | Vorwärts-Primer | Rückwärts-Primer |
|---|---|---|
| **Exon1** | M13-TGAGGCTGAAACAGTGACCTG | GAGAGGAATTCAAACTGAGGCA |
| **Exon2** | AACCACGTGCATAAGGAACAG | M13-CAGCGTTTACCATAGGTGCA |
| **Exon3** | M13-GAGCTGCTTGCTGAAGATCC | GGGTCGGTCTTCCTAGCTTG |
| **Exon4** | M13-CATTGCTATTCCTCTGCAACC | GATGGAATCCCTAGAAACTCGG |
| **Exon5** | M13-GTAACTTGTGCTGAAGGGCTG | GGACCATGTCTCAGATTCCTTG |
| **Exon6** | CCCAAATTCAGCTGGCATATC | M13-CACACACCTTCCCAGACCAAC |
| **Exon7** | AAACCCTGGTACATAGGCCAC | M13-GCATGAAGGAGTTGGCAGAA |
| **Exon8** | M13-TCCGCTCCGTTCTCTTGC | CTCCTGTTCGCGACAAGC |

### 2.2.3.2 Reaktionslösung

PCR Ansatz für die Amplifikation des Exons 1 bis 8 mit je 25µl:

- 1µl genomische DNA
- 1µl Vorwärts-Primer (10µmol/l; Thermo Fischer Scientific, Ulm)
- 1µl Rückwärts-Primer (10µmol/l; Thermo Fischer Scientific, Ulm)
- 0,25µl dNTP (je 10µmol/l: dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Roche Diagnostics, Mannheim )
- 0,25µl Hotstar Taq Plus Polymerase (Qiagen, Hilden)
- 2,5µl PCR Puffer (Qiagen, Hilden)
- 0,6µl Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma Aldrich, München)
- 18,4µl Aqua dest. (Aqua ad iniectabilia, Braun, Berlin)

Das DMSO erleichtert den „Annealing“ Schritt der PCR Reaktion (Frackman et al. 1998), dies beinhaltet auch das Aufbrechen von Sekundärstrukturen, welche häufig durch GC-reiche Regionen verursacht werden.

### 2.2.3.3 PCR- Bedingungen:

Das Fast-PCR-Gerät (9800 Fast Thermal Cycler der Fa. Applied Biosystems, Darmstadt) wurde wie folgt programmiert:

- Initiale Denaturierung: 2min bei 97°C
- Denaturierung: 2min bei 97°C
- Annealing: 1min bei 63°C
- Synthese/ Elongation: 1min bei 72°C

} 35 Zyklen

- Syntheseschritt: 5min bei 72°C
- Ende: ∞ bei 4°C

Die PCR Produkte wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

### 2.2.3.4 Produktkontrolle mittels Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese wurden die PCR-Amplifikate auf einem 2% Agarose-Gel aufgetrennt. Die Herstellung des Gels erfolgte mit 6g LE-Agarose (Seakem; Lonza; Rockland, USA), welche in 300ml TAE Puffer [Gemisch aus TRIS-Puffer (Delta Select), konzentrierter Essigsäure, EDTA-Puffer und Aquadest] gelöst und anschließend bei 900 Watt 4 Minuten lang in einer Mikrowelle erhitzt wurde. Nach Abkühlung auf 60°C und Einsetzen der Kämme in den Schlitten der Elektrophoresekammer wurde das Gel gegossen.

Jeweils 5µl des entsprechenden PCR Produkts wurde auf einer Microtitterplatte mit 5µl Gel-Loading-Puffer [bestehend aus: Orange G (Sigma-Aldrich, München), Glycerol (Sigma-Aldrich, München) und Aquadest] vermischt und anschließend in die Taschen des ausgehärteten Agarose-Gels eingegeben. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte bei 130-135 Volt und 400 Milliampère über 45 Minuten lang in der mit TAE Puffer gefüllten Elektrophoresekammer (Elektrophoresis Power Supply EPS100, Amersham pharmacia biotech, Freiburg). Zur Kontrolle der Fragmentgröße wurden bei jeder Gelelektrophorese eine leere Gel-Tasche mit Tracklt 100bp DNA-Ladder (Invitrogen) befüllt, der während der Elektrophorese mit aufgetrennt wurde. Im Anschluss wurde das Gel in einer Ethidiumbromid Lösung 15 Minuten eingelegt, um die aufgetrennten, amplifizierten PCR-Produkte zu färben. Die Produktkontrolle und photographische Dokumentation erfolgte mit Hilfe des Bio Imaging System [Syngene, Frederick (USA)], welches die aufgetrennten und durch Ethidiumbromid angefärbten DNA Banden mittels UV-Licht sichtbar machte (siehe Abbildung 4).

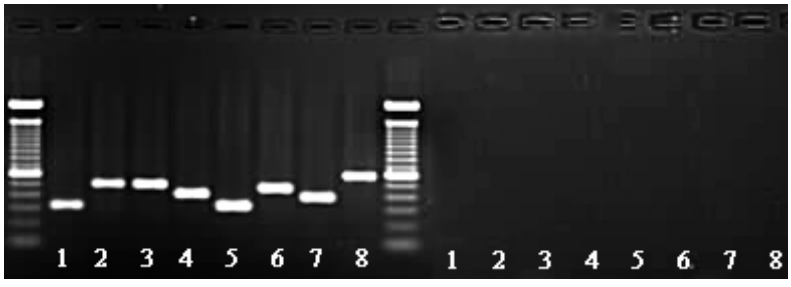


**Abbildung 4:** Gelelektrophorese für die Auftrennung der DNA Polymerase-Kettenreaktions (PCR) Produkte des *RUNT-related transkription factor 1*(*RUNX1*) Gens für die Exone 1 bis 8 (links), flankiert von einem 100 Basenpaar langen (bp) DNA-Ladder. Auf der rechten Seite (1-8) befinden sich die „no template controls“ der jeweiligen Exons (1 bis 8) um mögliche Verunreinigungen detektieren zu können

#### 2.2.3.5 Aufreinigung der PCR Produkte

Unter Verwendung des QIAquick PCR-Purification-Kit (Qiagen, Hilden) wurden die PCR-Amplifikate aufgereinigt. Prinzip dieses Systems ist die Bindung der DNA Fragmente an eine Silikagel-Membran in der Säule, wodurch im folgenden Zentrifugationsschritt ein DNA-freier Durchfluss entsteht, welcher überschüssige Enzyme, Nukleotide, Primer und Reaktionssalze der PCR Reaktionslösung enthält; dieser wurde verworfen. Die in der Säule zurückbleibende DNA konnte mittels eines EB-Puffers von der Membran in reiner Form eluiert werden. Zunächst wurde jede Probe mit 200 µl PB Puffer (binding buffer) vermischt und in die Mitte jeder Säule auf die Membran pipettiert. Anschließend wurden die Säulen 1 Minute lang bei 13 000 rpm zentrifugiert und der dabei entstehende Durchfluss verworfen. Danach wurden 750µl PE-Puffer auf die Säule gegeben, um die Membran bei der darauffolgenden Zentrifugation zu reinigen. Der Durchfluss wurde bei dieser und der nachgeschalteten Trockenzentrifugation jeweils verworfen. Vor der Elution der DNA von der Membran wurden neue Eppendorfröhrchen als Auffangbehältnisse unter die Säulen gestellt. Die Wiedergewinnung der DNA aus den Säulen erfolgte mittels 40µl EB Puffer (elution buffer). Dieser wurde in die Mitte der Säulen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute wurde die Säule erneut zentrifugiert. Das dabei von den Eppendorfröhrchen aufgefangene Eluat enthielt die amplifizierten DNA Produkte. Nach Beschriftung der Auffangbehältnisse mit den entsprechenden, den Patienten zugeordneten RUNX1-IDs, konnten die aufgereinigten DNA Produkte, bis zur weiteren Verwendung, bei -20°C tiefgefroren werden.

### 2.2.4 Cycle Sequencing Reaktion (CSR)

#### 2.2.4.1 Prinzip

Im Unterschied zur PCR enthält das Reaktionsgemisch der CSR zusätzlich Fluoreszenzfarbstoff markierte Didesoxyribonukleotide (ddNTP), welche beim Einbau in das Amplifikat durch die DNA-Polymerase einen Abbruch der Extensionsreaktion bewirken. Die Polymerase kann die Elongation nicht weiterführen, infolge des fehlenden 3´OH Endes der ddNTPs. Durch den herbeigeführten Strangabbruch entstehen DNA-Doppelstrangfragmente, welche sich jeweils nur in einer Basenlänge unterscheiden.

Das Ende jedes Amplifikats wird durch ein fluoreszenzmarkiertes Nukleotid gekennzeichnet (Sanger et al. 1977).

### 2.2.4.2 Reaktionslösung

CSR Ansatz für die Amplifikation des Exons 1 bis 8 mit je 15µl:

- 2µl der aufgereinigten DNA Fragmente
- 1µl M13 Primer (10µmol/l; Thermo Fischer Scientific, Schwerte)
- 1,7µl Big Dye Terminator Puffer (10µmol/l; Applied Biosystems; Darmstadt)
- 2µl Big Dye Terminator v1.1 (Cycle Sequencing RR-100; Applied Biosystems; Darmstadt)
- 8,3µl HPLC Wasser (Aqua ad iniectabilia, Braun, Berlin)

Die Big Dye Terminator Lösung beinhaltet auch die vier mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Didesoxy-Ribonukleotide. Dabei sind:

- 2´3´ddATP grün
- 2´3´ddCTP rot
- 2´3´ddGTP blau
- 2´3´ddTTP schwarz markiert.

Zusätzlich beinhaltet das Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems; Darmstadt): unmarkierte Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP; dCTP; dGTP, dUTP), Ampli Taq DNA Polymerase, $MgCl_2$, Tris-HCL Puffer (pH 9,0).

### 2.2.4.3 CSR Bedingungen

Das PCR-Gerät (Gene amp, PCR system 2700; Applied Biosystems) wurde wie folgt für die CSR programmiert:

- Initiale Denaturierung: 2 Minuten bei 96°C
- Denaturierung: 1 Minute bei 94°C
- Annealing: 1 Minute bei 55°C } 35 Zyklen
- Synthese/ Elongation: 3 Minute bei 60°C
- Ende: ∞ bei 4°C

In der CSR Reaktion war es möglich, alle PCR Produkte mit demselben M13 Primer zu amplifizieren. Der theoretische Hintergrund stützte sich auf der Tatsache, dass der M13 Primer durch seine spezifische Basensequenz an jedes Exon, welches zuvor mit speziellen Primern mit einer M13-Erkennungssequenz am Beginn und am Ende in der PCR Reaktion amplifiziert wurde, binden konnte. Von dieser Erkennungssequenz aus konnte nach Bindung des M13 Primers die Elongation gestartet werden (siehe Tabelle 3).

Die CSR Produkte wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C in lichtundurchlässiger Verpackung im Kühlschrank gelagert.

**Tabelle 3:** Sequenz des für die Cycle Sequencing Reaktion (CSR) verwendeten M13 Primers. A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanin; M13: verwendeter M13-Primer; Primer: Oligonukleotid das als Startpunkt für DNA-replizierende Enzyme, wie die DNA-Polymerase dient; 5´-3´Sequenz: Leserichtung vom 5´Ende Richtung 3´Ende der Sequenz des PCR Produkts; T: Thymin

| Primer | 5`- 3` Sequenz |
|---|---|
| M13 | GTA AAA CGA CGG CCA GT |

### 2.2.4.4 Aufreinigung der CSR

Die fluoreszenzmarkierten Nukleotide, welche während der CSR Reaktion nicht gebundenen wurden, mussten mit den anderen überschüssigen Bestandteilen des Big Dye Terminator Kits von den CSR Produkten getrennt werden, da diese den Sequenziervorgang störten. Das DyeEx2.0-Spin-Kit (Qiagen, Hilden) beruht auf dem Prinzip der Gel-Filtrations-Chromatographie, bei der die überzähligen Bestandteile mit kleinerem Molekulargewicht in den Poren des Gels zurückgehalten werden. Die größeren DNA Fragmente können während der Zentrifugation ungehindert durch die Chromatographiesäule fließen.

Für die Herstellung des Chromatographiegels musste die DyeEx 96 Platte 6 Minuten bei 2350 rpm zentrifugiert werden. Dabei wurde die überschüssige Flüssigkeit abgepresst, wodurch das Chromatographiegel in den Säulen der Platte entstand. Die CSR Produkte konnten dann vorsichtig auf die Oberfläche des Gels überführt werden.

Bei dem angeschlossenen Zentrifugationsschritt wurden die überschüssigen Bestandteile der CSR Reaktion in der Chromatographiesäule zurückgehalten.

Der entstandene Durchfluss enthielt dabei nur die für die Sequenzierung benötigten DNA Fragmente und keine weiteren eventuell störend wirkenden Rückstände der CSR Reaktion. Die Lagerung der aufgereinigten CSR Produkte erfolgte bei -20°C und lichtgeschützten Verhältnissen.

### 2.2.5 Prinzip der Sequenzierung

Vor der Eingabe der Proben in das Sequenziergerät mussten zunächst die Proben 5 Minuten bei 95°C denaturiert werden. Das Prinzip der Sequenzierung besteht darin, die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Oligonukleotide im elektrischen Feld einer mit Polymer gefüllten Kapillare zwischen Anode und Kathode nach ihrer Größe aufzutrennen. Am Ende dieser Kapillare befindet sich ein Argon-Ionen-Laser, welcher den Farbstoff des endständigen Nukleotids dazu anregt, sein basenspezifisches Fluoreszenzspektrum zu emitieren. Die dabei entstehenden Fluoreszenzstrahlen werden von einer CCD (Charge-coupled device) Kamera detektiert. Die elektronischen Signale wurden verarbeitet und als Abfolge von Fluoreszenz-Peaks mit der dazugehörigen Base dargestellt (siehe Abbildung 5).

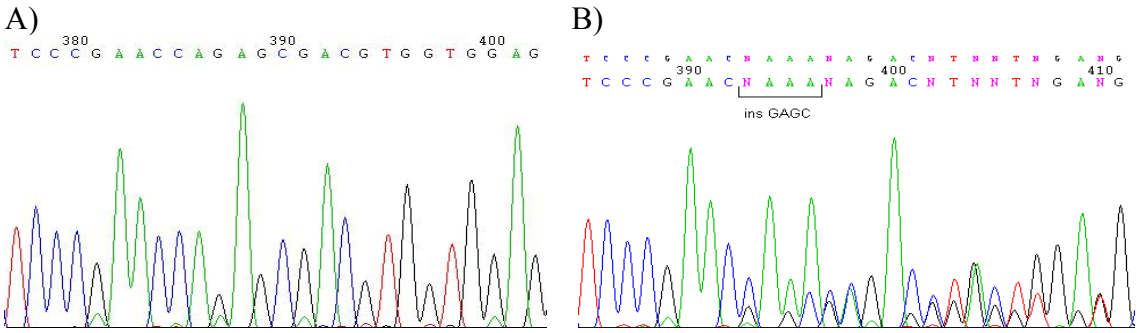


**Abbildung 5:** Darstellung des basenspezifischen Fluoreszenzspektrums der Nukleotidsequenz der Cycle Sequencing Reaktion (CSR) Produkte des Exons 8 des *RUNT-related transkription factor 1*(*RUNX1*) Gens; A) *RUNX1* Wildtyp (WT) Sequenz Exon 8; B) *RUNX1* Sequenz Exon 8 mit Nachweis einer Mutation: Insertion von vier Nukleotiden (ins GAGC). Folge: Verschiebung des Leserasters und Veränderung aller C-terminal gelegenen Aminosäuren im Protein. Obere Sequenzabfolge: wildtyp Sequenz; untere Sequenzabfolge: durch Mutation entstandene Sequenz (Patientencharakteristik: Runx1-ID: 22; aus der Studie AML HD98-A (NCT00146120), AML Study Group Ulm; Mutation: Q438fsX482; ins1535 [GAGC]/WT; A: Adenin (grün); C: Cytosin (blau); G: Guanin (schwarz); N: mehr als eine Base detektiert (lila); T: Thymin (rot), 380-410: Lokalisation innerhalb des CSR Produkts

### 2.2.6 Auswertung der Sequenzen

Die Auswertung der Sequenzen der Exons 1 bis 8 erfolgte durch den Vergleich mit den in der Gen-Datenbank erhaltenen Bezugssequenz Gen Bank Eingangsnummer X79549.1 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/861) für das *RUNX1* Gen. Der Abgleich der Sequenzen erfolgte per Hand, um mögliche kleinste Aberrationen wie SNP nicht zu übersehen, welche möglicherweise bei einem Software unterstützen Vergleich übersehen worden wären. Die Auswirkung der mutierten Sequenzabschnitte im späteren Protein wurden gemäß des open reading frame (ORF)-Finders (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html) dokumentiert.

## 2.3 Reagenzienliste

| | |
|---|---|
| ALLPrepDNAspin Säule | Qiagen, Hilden |
| ALLPrep Mini Kit | Qiagen, Hilden |
| Aqua dest. (Aqua ad iniectabilia) | Braun, Berlin |
| AW1 bzw. AW2 Puffer | Qiagen, Hilden |
| Big Dye Terminator Puffer (10µmol/l) | Applied Biosystems, Darmstadt |
| Big Dye Terminator v1.1 (Cycle Sequencing RR-100 ) | Applied Biosystems, Darmstadt |
| Bio Imaging System, Dokumentation der Gelbilder | Syngene, Frederick, USA |
| denaturierenden RLT plus Puffer (mit Guanidin-Isothiocyanat) | Qiagen, Hilden |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma Aldrich, München |
| dNTP (je 10µmol/l: dATP, dCTP, dGTP, dTTP ) | Roche Diagnostics, Mannheim |
| DyeEx 96 Platte (DyeEx2.0-Spin-Kit) | Qiagen, Hilden |
| EB Puffer (elution buffer) (QIAquick PCR-Purification-Kit) | Qiagen, Hilden |
| Ethidiumbromid Lösung | Eurobio, Courtaboeuf, Frankreich |
| Ficoll-Medium (Ficoll Separating Solution) | Seromed, Biochrom, Berlin |
| Gel-Loading-Puffer [bestehend aus: OrangeG und Glycerol] | Sigma-Aldrich, München |

Fortsetzung auf Seite 35

**Fortsetzung Reagenzienliste:**

| | |
|---|---|
| Hotstar Taq Plus Polymerase | Qiagen, Hilden |
| HPLC Wasser (Aqua ad iniectabilia) | Braun, Berlin |
| LE Agarose | Seakem; Lonza; Rockland, USA |
| M13 Primer (10µmol/l) | Thermo Fischer Scientific, Schwerte |
| PB Puffer (binding buffer), (QIAquick PCR-Purification-Kit) | Qiagen, Hilden |
| PCR Puffer | Qiagen, Hilden |
| PE-Puffer (QIAquick PCR-Purification-Kit) | Qiagen, Hilden |
| QIAshredder Säule | Qiagen, Hilden |
| RPMI 1640 Kulturmedium | Invitrogen, Groningen, Niederlande |
| Rückwärts-Primer (10µmol/l) | Thermo Fischer Scientific, Ulm |
| TAE Puffer (Gemisch aus TRIS-Puffer (Delta Select, konzentrierter Essigsäure, EDTA-Puffer und Aquadest) | USB, Cleveland, USA |
| TE-Puffer | Qiagen, Hilden |
| Tracklt 100bp DNA-Ladder | Invitrogen, Groningen, Niederlande |
| Vorwärts-Primer (10µmol/l) | Thermo Fischer Scientific, Ulm |

## 2.4 Statistische Auswertung

Die Dokumentation der Patientendaten im Rahmen der jeweiligen Studie und die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte über die Studienzentrale der Abteilung unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. F. Schlenk. Das mediane follow-up (durchschnittlicher Nachbeobachtungszeitraum) für Überlebensanalysen wurde entsprechend nach der Methode nach Korn berechnet. Der Vergleich der Patientencharakteristika erfolgte für kontinuierliche Variablen (Lebensalter etc.) mittels Mann-Whitney-Test oder Kruskal-Wallis-Test und mittels Fischer-Exakt-Test für kategoriale Variablen (Geschlecht etc.). Die entsprechenden Signifikanzwerte (P-Werte) sind im Ergebnisteil zu finden. Die Kaplan-Meier Methode wurde zu uni- und multivariaten Analysen der Verteilung der Daten zum RFS und OS genutzt. Die Konfidenzintervalle der Überlebensanalysen wurden anhand der Greenwoods formula zur Abschätzung des Standartfehlers berechnet. Der Zusammenhang zwischen den Patientencharakteristika und dem Erreichen einer kompletten Remission wurde unter Berücksichtigung des zugrunde liegenden Behandlungsprotokolls mittels einer logistischen Regressionsanalyse berechnet. Die Auswertung der Überlebenszeiten im Bezug zur durchgeführten Therapie erfolgte mittels Cox-Regressionsanalyse.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 *RUNX1* Mutationen: Inzidenz, Mutationstyp und Heterozygotie

In der vorliegenden Arbeit wurden 538 CN-AML Patienten auf Mutationen des *RUNX1* Gens untersucht. Darüber hinaus wurden 29 Proben gesunder Probanden untersucht, um ausschließen zu können, dass die gefundenen Mutationen Polymorphismen in der Normalbevölkerung darstellen. Von jeder Probe wurde die gesamte kodierende Sequenz des *RUNX1* Gens (Exon 1 bis 8), inklusive den Exons angeschlossenen Intron-Abschnitten, mittels PCR, gefolgt von direkter Sequenzierung untersucht. Insgesamt wurden 39 *RUNX1* Mutationen in 34 (6.3%) der mutierten Patienten gefunden. Fünf (14,7%) der 34 Patienten wiesen mehr als eine Mutation auf. Wenn man die Verteilung der Mutationen betrachtet, fällt auf, dass die Mehrzahl der Mutationen (n=39) in der RHD-Domäne [Exon 3 (n=9); Exon 4 (n=5) und Exon 5 (n=2)] und in Exon 8 (n=19) vorkamen. Darüber hinaus konnten Mutationen in Exon 6 (n=3) und Exon 7 (n=1) des *RUNX1* Gens gefunden werden (siehe Tabelle 4).

In unserer Kohorte wurden 20 frameshift Mutationen gefunden, welche zu einer Verschiebung des Leserahmens und Generierung eines neuen Stopcodons führten (siehe Abbildung 6). Darüber hinaus wurden sowohl nonsense (n=8), missense (n=5), als auch eine stille Mutation (n=1) gefunden. Zusätzlich fand man Duplikationen die keine Verschiebung des Leserasters zur Folge hatten (n=5). In der vorliegenden Untersuchung waren alle (n=39) Mutationen heterozygot.

In 8 Fällen konnte der Polymorphismus (L56S) in Exon 3 der CN-AML Patienten detektiert werden. Es kommt zu einer misssense Mutation des Nukleotids, was zu einem Austausch der Aminosäure Leucin in die Aminosäure Serin im Protein führt. In 8 Fällen stand uns Keimbahnmaterial (Mundschleimhautabstrich bzw. KM oder PB in kompletter Remission) zur Verfügung. 3 der 8 Patientenproben wiesen den vorbeschriebenen Polymorphismus im Keimbahnmaterial auf.

Publizierte Daten von Dicker et al. 2007, Langabeer et al. 2002 und Tang et al. 2009 konnten den Polymorphismus (L56S) bereits nachweisen. In einer Untersuchung von Langabeer et al. konnte diese genetische Veränderung sowohl bei AML Patienten als auch bei Gesunden (Inzidenz von 3 bis 5%) detektiert werden (Langabeer et al. 2002). Zusätzlich zu den untersuchten Patientenmaterialien wurden in dieser Arbeit Proben aus peripherem Blut von gesunden Kontrollen (n=29) untersucht. In diesen konnte die Veränderung nicht nachgewiesen werden. In Zusammenschau der publizierten Daten und der Tatsache, dass diese Veränderung in der Database of single nucleotide polymorphisms (SNPs) gelistet ist, gehen wir von einem SNP aus. Folglich zogen wir diesen Polymorphismus nicht in die statistische und prognostische Auswertung unserer Ergebnisse mit ein.

**Tabelle 4:** Lokalisation der Mutationen im *RUNT-related transkription factor 1* (*RUNX1*) Gen mit entsprechendem Mutationstyp. Patientencharakteristik: Patienten aus den prospektiven multizentrischen Phase III Studien AML HD98-A (NCT00146120) und AMLSG 07-04 (NCT00151242) der AML Study Group Ulm (AMLSG); RUNX1: RUNT-related transkription factor 1; RUNX1-ID: Für die vorliegende Studie gewählte Identifikationsnummer; Aminosäuren: A: Alanin; C: Cystein; D: Aspartat; E: Glutamat; F: Phenylalanin; G: Glycin; H: Histidin; K: Lysin; L: Leucin; N: Asparagin; P: Prolin; Q: Glutamin; R: Argenin; S: Serin; T: Threonin; V: Valin; Y: Tyrosin; Del: Deletion; ins: Insertion; dup: Duplikation; fs: frameshift; X: Stopp (Abbruch der Aminosäurensynthese); XX: weibliches Geschlecht; XY: männliches Geschlecht; 46: Karyotyp mit 46 Chromosomen; Nummerierung der Sequenzen: Bezugssequenz Gen Bank Eingangsnummer X79549.1; Aminosäurensequenz gemäß ORF-Finder (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html)

| RUNX1-ID | Mutation im Exon | Mutationstyp | Karyotyp |
|---|---|---|---|
| 1 | 3 | A63fsX | 46,XY |
| 2 | 3 | H105fsX541 | 46,XY |
| 3 | 3 | P95fsX117 | 46,XY |
| 4 | 3 | R107C | 46,XY |
| 5 | 4 | A142fsX170 | 46,XY |
| 6 | 8 | A338fsX482 | 46,XY |
| 7 | 8 | G394fsX482 | 46,XY |
| 8 | 8 | L382fsX482 | 46,XY |
| 9 | 8 | G394_L406dup | 46,XY |
| 10 | 8 | I342fsX | 46,XY |
| 11 | 8 | E422fsX | 46,XY |
| 12 | 8 | H427fsX | 46,XY |
| 13 | 3;4 | L98fsX; S141fsX | 46,XY |
| 14 | 3;5 | P113A; R201G | 46,XY |
| 15 | 4;5 | T148fsX170; R201Q | 46,XY |
| 16 | 3 | L112fsX117 | 46,XX |
| 17 | 3 | H105_F116dup | 46,XX |
| 18 | 3;4 | I114fsX117; T148fsX170 | 46,XX |
| 19 | 4 | A142_A149dup | 46,XX |
| 20 | 6 | S226fsX269 | 46,XX |
| 21 | 6 | A251fsX | 46,XX |
| 22 | 8 | Q438fsX482 | 46,XX |
| 23 | 8 | R346fsX482 | 46,XX |
| 24 | 8 | Y382fsX482 | 46,XX |
| 25 | 8 | P464P | 46,XY |
| 26 | 8 | F411fsX482 | 46,XX |
| 27 | 8 | Q335_L339dup | 46,XX |
| 28 | 8 | N448_V452dup | 46,XX |
| 29 | 8 | R346fsX | 46,XX |
| 30 | 8 | P345R | 46,XX |
| 31 | 8 | S388fsX481 | 46,XX |
| 32 | 6;7 | S256fsX269; S322fsX323 | 46,XX |
| 33 | 8 | Y380fsX482 | 46,XX |
| 34 | 8 | D326fsX481 | 46,XX |

Der folgende Sequenzausschnitt der *RUNX1* Sequenz zeigt eine Insertion von vier Nukleotiden, was zu einer Verschiebung des Leserasters (ORF) im Vergleich zur wildtyp Sequenz führt.

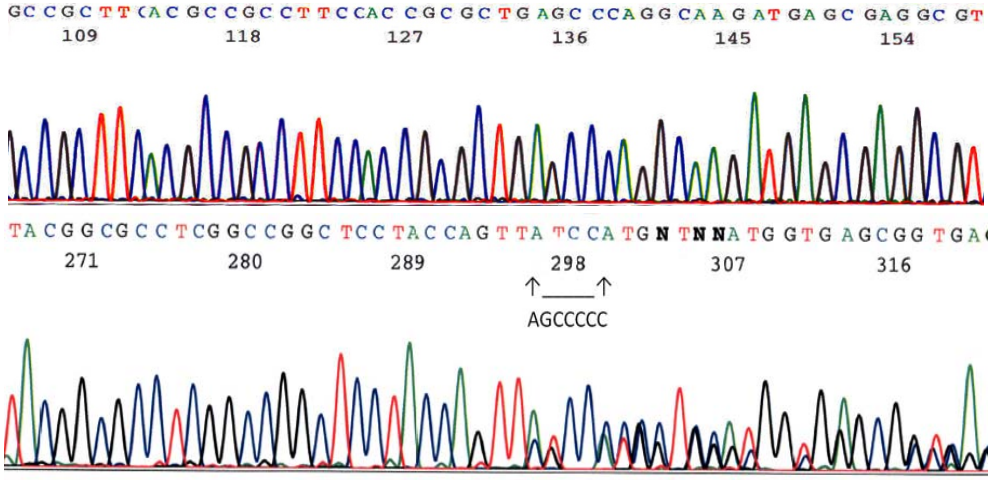


**Abbildung 6:** Beispiel einer Mutation in der Nukleotidsequenz des *RUNT-related transkription factor 1* (*RUNX1*) Gens mit entsprechendem basenspeziefischem Fluoreszensspektrum; (oben) wildtyp (wt) Sequenz des *RUNX1* Gens (Exon 8); (unten) Ausschnitt einer Gensequenz mit *RUNX1* Mutation: Insertion von 7 Nukleotiden AGCCCCC [RUNX1-ID 26: F411fsX482, Nr. 1437-1438 im *RUNX1* Gen; Patient aus der prospektiven multizentrischen Phase III Studien AML HD98-A (NCT00146120)]. Diese Deletion führt zur Verschiebung des Leserasters und zu einer Veränderung aller C-terminal gelegenen Aminosäuren im späteren Protein (Exon8). Abkürzungen: RUNX1: RUNT-related transkription factor 1; A: Adenin (grün); C: Cytosin (blau); G: Guanin (schwarz); N: mehrere Nukleinbasen detektierbar; T: Thymin (rot); 109-316: Lokalisation innerhalb des CSR Produkts

## 3.2 Korrelation mit klinischen Charakteristika

In Bezug auf klinische Charakteristika der *RUNX1*$^{mut}$ Patienten zeigte sich im Vergleich zu den *RUNX1*$^{wt}$ Patienten kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf das Alter (*P*=.61) und das Geschlecht (*P*=.86), die Leukozyten- (WBC) (*P*=.19) und Thrombozytenzahl (*P*=.39), den Hämoglobinwerten (*P*=.52), dem Anteil der Blasten im peripheren Blut (PB) (*P*=.43) bzw. Knochenmark (BM) (*P*=.56).

Ebenso fand sich keine Assoziation zwischen dem Vorliegen einer *RUNX1* Mutation und der Art der AML: *de novo* AML (30/498); s- AML (2/20); t-AML (2/15).

Darüber hinaus untersuchten wir die Inzidenz von *RUNX1* Mutationen in den FAB-Subtypen der AML. Ein vollständiger Datensatz für die FAB-Subtypen war für 251 Patienten der AML HD98-A Studie verfügbar. *RUNX1* Mutationen konnten in verschiedenen morphologischen Subgruppen gefunden werden [$RUNX1^{mut}$ vs $RUNX1^{wt}$: M0 (3/18 vs 15/18); M1 (3/47 vs 44/47); M2 (0/77 vs 77/77); M3 (0/2 vs 2/2); M4 (6/69 vs 63/69); M5 (3/32 vs 29/32); M6 (1/6 vs 5/6)] und waren signifikant mit dem FAB-Subtyp M0 assoziiert (*P*=.02) (siehe Tabelle 5).

**Tabelle 5:** Vergleich der klinischen Parameter von *RUNT-related transkription factor 1* mutierten ($RUNX1^{mut}$) versus wildtyp ($RUNX1^{wt}$) Patienten. Patientendaten aus den prospektiven multizentrischen Phase III Studien AML HD98-A (NCT00146120) und AMLSG 07-04 (NCT00151242) der AML Study Group Ulm (AMLSG); AML: Akut myeloische Leukämie; BM: Knochenmark (bone marrow); FAB: french-american-british cooperative group; Konz.: Konzentration; männl.: männliches Geschlecht; n: Anzahl der Patienten; Pat.: Patient; PB: Peripheres Blut (peripheral blood); P-Wert: probability-value, Signifikanzwert; s-AML: Sekundäre AML; t-AML: Therapie assoziierte AML; WBC Konz.: Konzentration der Leukozyten; w.: weibliches Geschlecht; *Auf HD 98 A Studie beschränkte Analyse

| | ***RUNX1*$^{wt}$ Status (n=504)** | ***RUNX1*$^{mut}$ Status (n=34)** | **P-Wert** |
|---|---|---|---|
| Alter, Jahre (Einheit)<br>• Medianes Alter<br>• Messbereich | <br>48,6<br>18-60 | <br>48,2<br>19-60 | 0,61 |
| Geschlecht: Anzahl männl. Pat. | 237 | 17 | 0,86 |
| WBC Konz., $x10^9$/L (Einheit)<br>• Mediane WBC<br>• Messbereich | <br>20,8<br>0,2-372,0 | <br>10,4<br>1,6-235,0 | 0,19 |
| Thrombozyten Zahl, $x10^9$/L (Einheit)<br>• Median Anzahl<br>• Messbereich | <br>59<br>4-746 | <br>71<br>9-242 | 0,39 |
| Hämoglobin Konz., g/dl (Einheit)<br>• Mediane Konzentration<br>• Messbereich | <br>9,1<br>3,1-17,6 | <br>8,6<br>4,8-13,5 | 0,52 |
| Konz. an Blasten im PB, % (Einheit)<br>• Median Konzentration<br>• Messbereich | <br>38<br>0-100 | <br>42,5<br>0-98 | 0,43 |
| Konz. an Blasten im BM, % (Einheit)<br>• Mediane Konzentration<br>• Messbereich | <br>75<br>2-100 | <br>80<br>20-96 | 0,56 |

Fortsetzung Seite 42

**Fortsetzung Tabelle 5:** Vergleich der klinischen Parameter von *RUNT-related transkription factor 1* mutierten (*RUNX1*$^{mut}$) versus wildtyp (*RUNX1*$^{wt}$) Patienten

| | ***RUNX1*$^{wt}$ Status (n=504)** | ***RUNX1*$^{mut}$ Status (n=34)** | **P-Wert** |
|---|---|---|---|
| **WHO Subtyp der AML** | | | 0,49 |
| *De novo* AML | 468 | 30 | |
| s-AML | 18 | 2 | |
| t-AML | 13 | 2 | |
| Fehlende Typisierung | 5 | 0 | |
| **FAB Klassifikation; n= 252* (nur AMLHD98A-Studie)** | | | |
| M0 | 15 | 3 | 0,02 |
| M1 | 44 | 3 | |
| M2 | 77 | 0 | |
| M3 | 2 | 0 | |
| M4 | 63 | 6 | |
| M5 | 29 | 3 | |
| M6 | 5 | 1 | |
| M7 | 0 | 0 | |
| Fehlende Typisierung | 1 | 0 | |

## 3.3 Assoziation mit weiteren AML-assoiierten molekulargenetischen Aberrationen

Für die untersuchten CN-AML Patienten stand der Mutationsstatus der Gene *CEBPA*, *FLT3*, *MLL*, *NPM1*, *NRAS* und *WT1* zur Verfügung. Aufgrund dessen war es möglich eine Assoziation der *RUNX1* Mutationen mit Mutationen dieser Gene zu prüfen.

CN-AML Patienten mit *RUNX1* Mutationen waren signifikant seltener mit *NPM1* Mutationen korreliert (*P*= <.001; 4/30 vs 270/230), wohingegen signifikant häufiger eine *MLL*-PTD$^{pos}$ (*P*=.0003; 9/24 vs 29/439) vorlag.

Darüber hinaus waren *RUNX1* Mutationen im Trend negativ mit *CEBPA* Mutationen korreliert (*P*=.10; 1/32 vs 64/396) (Tabelle 6, siehe Anhang); nur ein einziger CN-AML Fall wies gleichzeitig eine *RUNX1* und eine *CEBPA* Mutation auf, wobei die *CEBPA* Mutation monoallelisch war.

Für die Genmutationen *FLT3*-ITD$^{pos}$ (*P*=.58: 10/24 vs 176/320), *FLT3*-TKD$^{mut}$ (*P*=.50: 1/33 vs 37/444), *WT1*$^{mut}$ (*P*=.55: 4/20 vs 51/332) und *NRAS*$^{mut}$ (*P*=.60: 5/23 vs 63/356) lagen keine signifkanten Assoziationen mit *RUNX1*$^{mut}$ vor.

## 3.4 Univariable Untersuchungen

### 3.4.1 Ansprechen auf die Induktionstherapie

Für die uni- und multivariablen Analysen konnten die klinischen Daten von 533 CN-AML Patienten herangezogen werden. Vergleicht man das Ansprechen auf die Induktionstherapie zwischen *RUNX1*$^{mut}$ mit *RUNX1*$^{wt}$ CN-AML Patienten, so zeigen sich folgende Ergebnisse:

*RUNX1*$^{mut}$ Patienten hatten im Trend eine niedrigere CR Rate (22/34 vs 388/499; *P*=.09). Im Weiteren wiesen *RUNX1*$^{mut}$ Patienten eine signifikant höhere Rate an RD (10/32 vs 77/499; *P*=.05) nach Induktionstherapie auf (Tabelle 6, siehe Anhang).

Vergleicht man die Inzidenz eines frühzeitigen Todes und/oder Tod als Folge der resultierenden Hypoplasie des blutbildenden Systems, sind keine wesentlichen Unterschiede zwischen *RUNX1*$^{mut}$ und *RUNX1*$^{wt}$ CN-AML Patienten zu erkennen (2/34 vs 34/499; *P*=1.00).

## 3.4.2 Überlebensanalysen

Die durchschnittliche Nachbeobachtungszeit (follow-up) der Patienten lag in unserer Studie bei 54 Monaten. Ein Vergleich der *RUNX1*$^{mut}$ mit *RUNX1*$^{wt}$ CN-AML Patienten zeigte signifikante Unterschiede im EFS (*P*=.0001). Patienten mit *RUNX1*$^{mut}$ Status, wiesen ein deutlich kürzeres EFS auf (10% vs 34%). Im Bezug auf das OS (*P*=.09) und das RFS (*P*=.21) konnte zwischen *RUNX1*$^{mut}$ und *RUNX1*$^{wt}$ Patienten kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (siehe Abbildung 7).

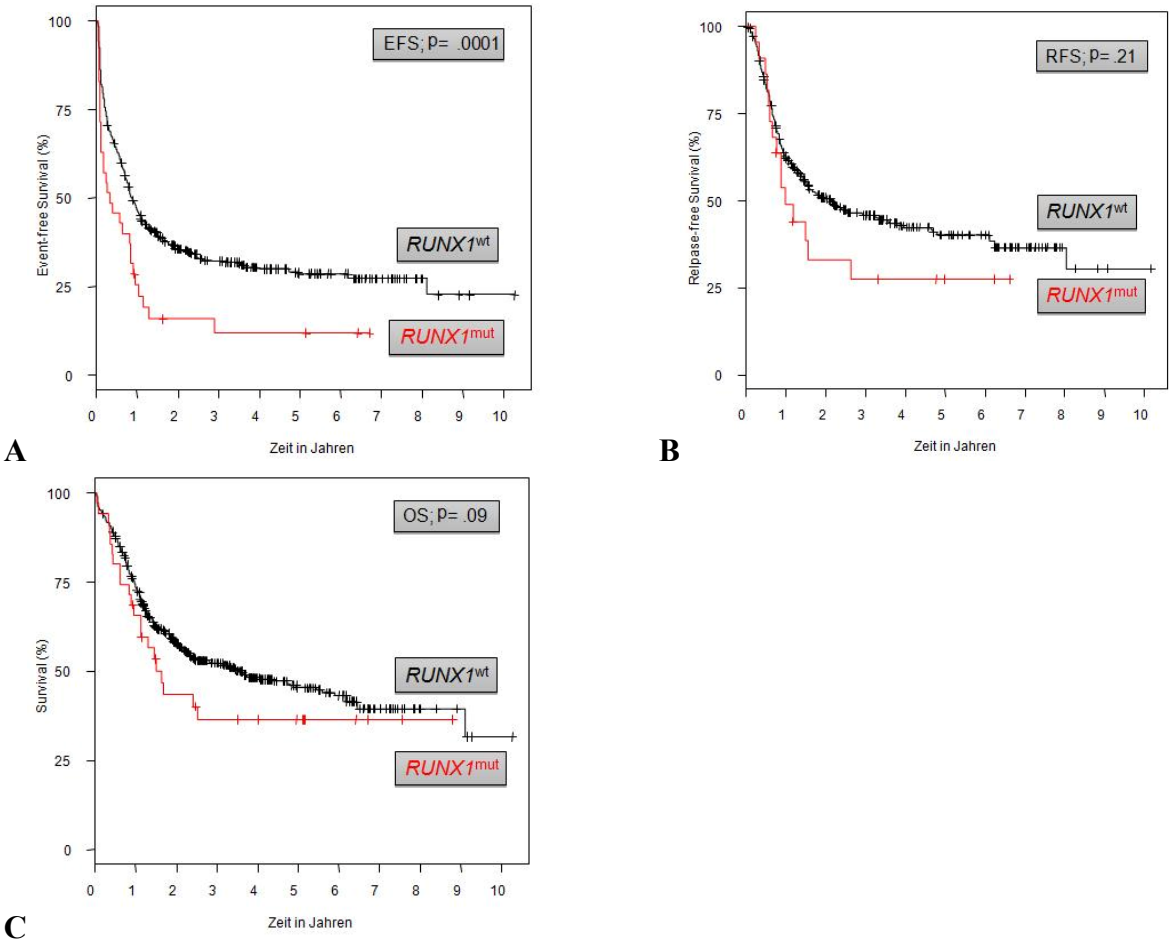


**Abbildung 7:** Kaplan Meier Kurven der univariaten Analysen der akut myeloischen Leukämie-Patienten mit normalem Karyotyp (CN-AML) mit und ohne Mutationen des *RUNT-related transkription factor 1* (*RUNX1*) Gens, für die Endpunkte: A) Ereignis freies Überleben (event free survival, EFS); B) Rezidiv freies Überleben (relapse-free survival, RFS); C) Gesamtüberleben (overall survival, OS); Patientencharakteristik: Patienten aus den prospektiven multizentrischen Phase III Studien AML HD98-A (NCT00146120) und AMLSG 07-04 (NCT00151242) der AML Study Group Ulm (AMLSG); Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte über die Studienzentrale der Abteilung unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. F. Schlenk;.Abkürzungen: P-Wert: probability-value, Signifikanzwert; *RUNX1*: *RUNT-related transkription factor 1* Gen; *RUNX1*$^{mut}$: mutiertes *RUNX1* Gen; *RUNX1*$^{wt}$: nicht mutiertes *RUNX1* Gen (wildtyp); survival %: Überleben der Patienten in Prozent, wt: wildtyp

## 3.5 Multivariable Untersuchungen

Betrachtet man *RUNX1*$^{mut}$ CN-AML Patienten in multivariaten Analysen in Bezug auf das Ansprechen auf die Induktionstherapie, so kann keine signifikante Auswirkung der Mutationen auf die Ansprechrate und das Erreichen einer CR gezeigt werden (*P*=.27).

In weiterführenden Analysen konnte für die *RUNX1*$^{mut}$ CN-AML Patienten gezeigt werden, dass der *RUNX1*$^{mut}$ Status im multivariaten Modell kein prognostisch signifikanter Marker für die beiden Endpunkte RFS und OS ist (*P*=.88 und *P*=.83). Im Trend zeigte sich ein *RUNX1*$^{mut}$ Status als prognostischer Faktor für das EFS (*P*=.04) (Tabelle 6, siehe Anhang).

Die einzigen unabhängigen Variablen mit statistischer Signifikanz auf das EFS, RFS nach allogener Stammzelltransplantation und dem OS, waren die Leukozytenzahl (WBC: *P*<.002), das Alter (*P*<.02) sowie Mutationen des *NPM1* Gens (*P*<.01) und Abwesenheit einer *FLT3*-ITD$^{pos}$ (*P*<.001). Mutationen der *FLT3*-TKD$^{mut}$ hatten ausschließlich auf das OS einen signifikanten Einfluss (*P*=.008).

# 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine große Kohorte homogen behandelter, jüngerer CN-AML Patienten auf Mutationen im *RUNX1* Gen untersucht. Gegenstand dieser Untersuchung war es, die Inzidenz sowie eine mögliche prognostische Bedeutung von *RUNX1* Mutationen zu untersuchen, insbesondere im Kontext weiterer bekannter AML-assoziierter Mutationen.

## 4.1 Inzidenzen an *RUNX1* Mutationen und deren Korrelation mit klinischen Charakteristika

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 538 CN-AML Patienten auf Mutationen des *RUNX1* Gens untersucht. Das mediane Alter betrug 48 Jahre (18 bis 60 Jahre). Die untersuchte Patientenkohorte umfasste Patienten mit *de novo* AML (n=498), s-AML (n=20) und t-AML (n=15). Insgesamt detektierten wir 39 Mutationen in 34 der 538 untersuchten Patienten (6,3%) (siehe Tabelle 4).

Damit war die Inzidenz geringer als in der publizierten Studie von Tang et al., die bis dato die größte Serie an CN-AML Patienten beinhaltete. Untersucht wurden in dieser Studie 470 *de novo* AML Patienten, ausgeschlossen des FAB M3 Subtyps, sowie Patienten mit s-AML und t-AML; 230 Patienten hatten eine CN-AML. In der CN-AML Gruppe konnten in 32 von 230 untersuchten Patienten (13.9%.) *RUNX1* Mutationen detektiert werden. Die einzelnen FAB Subpopulationen getrennt betrachtet, bestand für die Gesamtkohorte (n=470) eine deutliche Akkumulation an *RUNX1* Mutationen im FAB M0 Subtyp: Patienten mit FAB M0 Subtyp hatten zu 40% einen *RUNX1*$^{mut}$ Status (Tang et al. 2009). In der FAB Subtyp M2 lag die niedrigste Inzidenz für *RUNX1* Mutationen (6.3%) vor (Tabelle 6, siehe Anhang). Eine Subanalyse der Verteilung für CN-AML Patienten bestand nicht. Der Anteil an Patienten mit zwei Mutationen innerhalb des *RUNX1* Gens belief sich in unserer Studie auf 14,7% (5/34). Dies ist vergleichbar mit den publizierten Daten von Tang et al., die in 9,7% (6/62) der *RUNX1*$^{mut}$ Fälle zwei Mutationen innerhalb des Gens finden konnte.

In der Studie von Dicker et al. wurden insgesamt 156 selektierte Patientenproben auf Mutationen des *RUNX1* Gens untersucht (Dicker et al. 2007). Darunter befanden sich 32 CN-AML Patienten ausschließlich des FAB M0 Subtyps, von denen 11 *RUNX1*$^{mut}$ (34,4%) waren (Tabelle 6, siehe Anhang). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass *RUNX1* Mutationen im M0 Subtyp bei CN-AML Patienten wahrscheinlicher waren (12,2%) als bei Patienten mit komplexem Karyotyp (2,2%). Innerhalb des M0 Subtyp lag bei CN-AML Patienten in 45,5% (5/11) eine homozygote Mutation vor. Hier waren beide Allele des Gens mit derselben Mutation verändert.

Die Arbeit von Preudhomme et al. bestätigt die hohe Inzidenz von 22% (9/41) an *RUNX1* Mutationen im FAB Subtyp M0. Preudhomme et al. beschreibt eine biallele Mutationsverteilung bei 8 von 9 *RUNX1*$^{mut}$ Patienten. Bei insgesamt drei dieser beschriebenen Fälle konnten auf beiden Allelen unterschiedliche Mutationen gefunden werden. Insgesamt hatten 4 der 9 *RUNX1*$^{mut}$ Patienten einen normalen Karyotyp. Die Gesamtzahl der CN-AML Patienten innerhalb der Studienkohorte wird von Preudhomme et al. nicht angegeben (Preudhomme et al. 2000). In unserer Arbeit lagen bei 5 der 34 *RUNX1*$^{mut}$ Patienten ebenfalls biallelische Mutationen vor, die jedoch in Bezug auf die beiden Allele unterschiedlich waren.

Gegensätzlich zu unseren Daten wird in der Studie von Langabeer et al. die Inzidenz für Mutationen im *RUNX1* Gen im AML M0 Subtyp auf 12% (5/41) angegeben. In Konsens mit unseren Ergebnissen fand sich eine monoallele Mutationsverteilung in 4 von 5 Patienten (Langabeer et al. 2002).

Osato diskutiert seine Analysen mit Ergebnissen der Arbeiten von Harada et al. 2003, Langabeer et al. 2002, Taketani et al. 2003 und Vegesna et al. 2002. Im Einklang mit unseren Ergebnissen steht die Schlussfolgerung, dass die Inzidenz abhängig vom vorherrschenden Differenzierungsgrad ist und der M0 Subtyp die höchste Inzidenz von 21% aufweist (39/185). Die Inzidenz eines *RUNX1*$^{mut}$ Status wird mit 8.6% angegeben, wenn der vorherrschende Differenzierungsgrad außer Acht gelassen wird (Osato 2004).

Studienergebnisse mit einer beachtlichen Inzidenz an *RUNX1* Mutationen konnten 2011 von Schnittger et al. vorgelegt werden. In einem vorselektierten Patientenkollektiv von *de novo* AML Patienten mit CN-AML und nicht komplexem Karyotyp (n=449), konnte eine Inzidenz von 32,7% (147/449) an *RUNX1* Mutationen gefunden werden.

In der Kohorte der CN-AML Patienten (n= 262) lag die Inzidenz an *RUNX1* Mutationen bei 26,3% (69/262) (Tabelle 6, siehe Anhang). Die hohe Inzidenz könnte durch die Selektion der Patientenkohorte erklärt werden. Entitäten mit t-AML und MDS/AML wurden im Vorfeld von der Studie ausgeschlossen (Schnittger et al. 2011).

Der Vergleich klinischer Charakteristika wie Leukozyten- und Thrombozytenzahl, Anteil der Blasten im KM und PB, Level der Laktatdehydrogenase und Alter, zeigte in der vorliegenden Arbeit keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der *RUNX1*$^{mut}$ und der *RUNX1*$^{wt}$ Gruppe.

Tang et al. konnte für die Gesamtkohorte der Studie deutliche Unterschiede in den klinischen Charakteristika abhängig vom *RUNX1*$^{mut}$ Status finden. *RUNX1* Mutationen waren signifikant mit dem männlichen Geschlecht, einem höheren Alter und niedrigeren LDH Werten assoziiert (Tabelle 6, siehe Anhang). Bei der Korrelation anderer klinischer Charakteristika ergaben sich keine signifikanten Assoziationen. Darüber hinaus beziehen sich die statistischen Korrelationen auf die Gesamtkohorte des untersuchten Patientenkollektivs. Daten zu den klinischen Charakteristika für CN-AML Patienten (n=230) werden nicht angegeben (Tang et al. 2009).

In einer Übersichtsarbeit fasst Roumier et al. verschiedene Studien zusammen, in denen die Inzidenz von *RUNX1* Mutationen untersucht worden war. *RUNX1* Mutationen wurden zwischen 10% und 21% abhängig von der untersuchten Patienten-Kohorte gefunden. Die Inzidenz von *RUNX1* Mutationen im FAB Subtyp M0 wurde mit 21.5% angegeben. Untersucht wurden jedoch nicht ausschließlich CN-AML Patienten, es waren auch AML-Patienten mit zytogenetischen Veränderungen, sowie unterschiedliche Entitäten (MDS, MPD) in der Gesamtkohorte mit eingenommen. Die Auswertung klinischer Charakteristika im Patientenkollektiv mit FAB M0 Subtyp ergab, dass *RUNX1* Mutationen signifikant mit höheren Leukozytenzahlen, einem höheren Blastenanteil im KM, höheren HLA-DR und niedrigeren $CD33^+$ Expressionsraten assoziiert waren. Keine signifikanten Unterschiede zwischen *RUNX1*$^{mut}$ und *RUNX1*$^{wt}$ Patienten bestanden im Geschlecht, Alter, Thrombozytenzahl, Hämoglobinwert und Anteil an Blasten im peripheren Blut (Roumier et al. 2003).

Schnittger et al. konnte entgegen Roumier et al. bei *RUNX1*$^{mut}$ Status höhere CD34+ Expressionsraten, einen höheren Blastenanteil im KM, ein höheres Lebensalter der Patienten und eine niedrigere Thrombozytenzahl in der Gesamtkohorte (n=449) finden. Unterschiede in der Leukozytenzahl fanden sich nicht (Schnittger et al. 2011).

## 4.2 Lokalisation der Mutationen im *RUNX1* Gen

Betrachtet man die Verteilung der gefundenen Mutationen innerhalb des *RUNX1* Gens zwischen den einzelnen Studien, können erhebliche Unterschiede ausgemacht werden. In unserer Studie häufte sich die Mehrzahl der Mutationen im Exon 3 (n=9) und in Exon 8 (n=19), wobei in allen kodierenden Sequenzabschnitten des Gens Mutationen gefunden werden konnten. Die prozentuale Verteilung der Mutationen kann mit jeweils 30% für die RHD-Domäne, Exon 8 und dem Rest des *RUNX1* Gens angegeben werden. In unserer Analyse wurden 20 frameshift Mutationen gefunden, diese führten zu einem Stop-Codon und somit zu einem trunkierten Protein. Als in Frame Mutationen konnten sowohl Duplikationen (n=5), als auch Substitutionen (n=6) von 3 Nukleotiden oder deren Vielzahl gefunden werden.

Eine ähnliche Verteilung der Mutationen konnte Tang et al. für die Gesamtkohorte zeigen. Die Mutationen verteilen sich in der Untersuchung zu gleich großen Anteilen auf den C- und N-Terminus des *RUNX1* Gens (Tang et al. 2009). Zu betonen ist, dass die Verteilung der Mutationen nur für die Gesamtkohorte und nicht explizit für die CN-AML Patienten angegeben wurde. Im Gegensatz zur Verteilung der Mutationen in unserer Studie und der von Tang et al., waren die gefundenen Aberrationen des *RUNX1* Gens in der Studie von Dicker et al. im M0 Subtyp der Gesamtkohorte größtenteils in der RHD-Domäne lokalisiert. In den anderen FAB Subtypen verteilten sich die Mutationen in den gesamten untersuchten Genabschnitten. Die Verteilung der Mutationen im *RUNX1* Gen bei CN-AML Patienten wurde nicht separat untersucht (Dicker et al. 2007).

Schnittger et al. beschreibt in der Gesamtkohorte eine Häufung der Mutationen innerhalb der RHD-Domäne (Exon 3, 4 und 5) gefolgt von Mutationen in der TA-Domäne (14,8%; Exon 7 und 8) und in den Genabschnitten zwischen beiden Domänen (16%). Bei „loss of heterozygosity“ (LOH) wurden die Mutationen hauptsächlich in der RHD-Domäne gefunden, gegensätzlich waren sie bei heterozygoten Mutationen im gesamten *RUNX1* Gen verteilt (Schnittger et al. 2011).

In 8 Fällen konnte der Polymorphismus (L56S) in Exon 3 der CN-AML Patienten detektiert werden und bei 3 der 8 Patientenproben war dieser auch im Keimbahnmaterial vorhanden. Langabeer et al. konnte diese genetische Veränderung sowohl zum Zeitpunkt der Diagnose, im Remissionsmaterial und im Rezidivmaterial von Patienten mit AML, als auch bei Normalkontrollen nachweisen. Die Inzidenz innerhalb des gesunden Kontrollkollektivs konnte bis 5% gezeigt werden (Langabeer et al. 2002). In unserer Studie konnte dieser Polymorphismus in Proben von gesunden Probanden (n=29) nicht nachgewiesen werden. In Zusammenschau mit den publizierten Daten von Dicker et al. 2007, Langabeer et al. 2002 und Tang et al. 2009, siehe auch Database of single nucleotide polymorphisms (SNPs), gehen wir bei dieser Veränderung davon aus, dass es sich um einen SNP handelt. Der Polymorphismus wurde bei der statistischen und prognostischen Analyse unserer Ergebnisse aufgrund der geringen Inzidenz nicht verwandt. Für einige Polymorphismen in malignen Tumoren ist ein Zusammenhang mit der Prognose und Prädisposition für ein bestimmtes Tumorleiden beschrieben. Ein Beispiel ist das Vorliegen der *Janus Kinase 2* (*JAK2*) V617F Mutation bei myeloproliferativen Neoplasien (MPN). Mit dieser Mutation gibt es ein signifikantes Auftreten eines Polymorphismus in x-chromosomal gelegenen Genen von *Iduronate 2-Sulfatase* (*IDS*) und *membran protein palmitoylated 1* (*MPP1;* Synonym: *p55*). Dieser kann gehäuft bei Patienten mit MPN nachgewiesen werden und wird in Analysen als Klonalitätsmarker der untersuchten Zellreihe genutzt (Kralovics et al. 2006).

## 4.3 Assoziation mit weiteren AML-assoziierten Genmutationen

In unserer Kohorte mit CN-AML Patienten konnte eine signifikante Häufung von *MLL*-PTD$^{pos}$ (*P*=.0003; 9/24 vs 29/439) bei *RUNX1*$^{mut}$ Status gezeigt werden. Eine inverse Korrelation bestand für *RUNX1* Mutationen mit *CEBPA* Mutationen (*P*=.10; 1/32 vs 64/396), als auch mit *NPM1* Mutationen (*P*= <.001; 4/30 vs 270/230). Signifikante Assoziationen von *RUNX1* Mutationen mit Aberrationen der Gene *FLT3* (*FLT3*-ITD$^{pos}$, Mutationen der *FLT3*-TKD), *WT1* und *NRAS* bestanden nicht.

Diese Daten stimmen überein mit den Beobachtungen von Tang et al. welcher für die Gesamtkohorte eine signifikante Assoziation von *RUNX1* Mutationen mit *MLL*-PTD$^{pos}$ (*P*= <.001; 9/62 vs 19/408) zeigen konnte. Ein *RUNX1*$^{mut}$ Status war signifikant invers mit *CEBPA* Mutationen (*P*= <.001; 2/62 vs 64/408) und *NPM1* Mutationen (*P*= <.001; 3/62 vs 103/408) korreliert (Tabelle 6, siehe Anhang). Gleichermaßen war keine Assoziation von *RUNX1* Mutationen mit Veränderungen der Gene *NRAS*, *KRAS*, *FLT3*, *PTPN11*, *KIT* und *WT1* zu finden (Tang et al. 2009).

Hier reihen sich die Ergebnisse von Schnittger et al. ein, der ebenfalls bei *RUNX1*$^{mut}$ Patienten eine signifikant inverse Korrelation von Mutationen der Gene *CEBPA* (*P*= <.001; 2/147 vs 39/290) und *NPM1* (*P*= <.001; 1/147 vs 57/302) nachweisen konnte (Tabelle 6, siehe Anhang). Assoziationen mit Mutationen anderer Gene (*NRAS*, *FLT3*, *MLL*-PTD$^{pos}$, *JAK2*) waren in der Studie nicht signifikant (Schnittger et al. 2011).

Dicker et al. konnte keine signifikante Assoziation von *RUNX1* Mutationen mit Veränderungen der Gene *NRAS*, *FLT3* oder *KIT* nachweisen (Dicker et al. 2007). In den Studien von Preudhomme et al. und Roumier et al. werden hierzu keine Angaben gemacht (Preudhomme et al. 2000; Roumier et al. 2003).

### 4.3.1 Ansprechen auf die Induktionstherapie

Die durchschnittliche Nachbeobachtungszeit (follow up) der Patienten lag in unserer Studie bei 54 Monaten. *RUNX1*$^{mut}$ CN-AML Patienten wiesen deutlich höhere Raten an RD (10/32 vs 77/499; *P*=.05), sowie im Trend geringere CR Raten (22/34 vs 388/499; *P*=.09) gegenüber den *RUNX1*$^{wt}$ Patienten auf.

Ein signifikant schlechteres Ansprechen auf die Induktionstherapie bei *RUNX1*$^{mut}$ Status konnte ebenfalls in der Studie von Tang et al. gezeigt werden [CR Rate (21/62 vs 227/408; *P*=.0087)] (Tang et al. 2009). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei den Untersuchungen von Roumier et al.. Die Untersuchungen ergaben eine signifikant geringere CR Rate infolge der (Induktions-) Chemotherapie bei *RUNX1*$^{mut}$ Status. Genauere Daten hierzu werden in der Publikation nicht aufgeführt (Roumier et al. 2003). In der Studie von Schnittger et al. werden keine Angaben über das Ansprechen auf die Induktionstherapie abhängig vom vorliegenden Mutationsstatus gemacht (Tabelle 6, siehe Anhang).

### 4.3.2 Univariate und multivariate Überlebensanalysen

Patienten mit *RUNX1* Mutationen weisen im Vergleich zu Patienten mit *RUNX1*$^{wt}$ Status ein deutlich schlechteres EFS (10% vs 34%) auf. Im Bezug auf das OS und RFS konnten in den univariaten Analysen zwischen *RUNX1*$^{mut}$ und *RUNX1*$^{wt}$ Patienten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Ebenso zeigte sich in den multivariaten Analysen für Mutationen des *RUNX1* Gens im Hinblick auf das RFS und OS keine prognostische Signifikanz. Im Trend zeigte sich ein *RUNX1*$^{mut}$ Status als prognostisch ungünstiger Faktor für das EFS (*P*=.04) (Tabelle 6, siehe Anhang).

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnte Tang et al. zeigen, dass für die Subgruppe der CN-AML Patienten *RUNX1* Mutationen sowohl mit einem signifikant kürzeren DFS (*P*=.001), als auch mit einem signifikant schlechteren OS (*P*=.001) assoziiert waren (Tang et al. 2009). Betrachtet man die Patientengruppe von Tang et al., die im Rahmen der Therapie eine allogene Stammzelltransplantation erhielt, bestand hinsichtlich des DFS und OS kein signifikanter Unterschied zwischen *RUNX1*$^{mut}$ und *RUNX1*$^{wt}$ Patienten, bezogen auf die Gesamtkohorte. In der multivariaten Analyse von Tang et al. war in der Gesamtkohorte ein *RUNX1*$^{mut}$ oder *WT1*$^{mut}$ Status neben dem Patientenalter, einer erhöhten Leukozytenzahl (WBC > 50 000 /µl) und LDH Werte (>920 U/L), sowie einem prognostisch ungünstigen Karyotyp ein unabhängiger Risikofaktor für das OS. (Tang et al. 2009). Für das DFS zeigten sich als unabhängige Risikofaktoren in der Gesamtkohorte ein prognostisch ungünstiger Karyotyp, ein *WT1*$^{mut}$ Status und ein erhöhtes Lebensalter (>50 Jahre) signifikant.

Prognostisch günstige Faktoren für das OS und DFS waren Mutationen im *CEBPA* Gen und ein *NPM1*$^{mut}$/*FLT3*-ITD$^{neg}$ Status (Tabelle 6, siehe Anhang).

Schnittger et al. konnte ein schlechteres OS und EFS für CN-AML Patienten mit *RUNX1*$^{mut}$ Status zeigen (OS: *P*=.05; EFS: *P*=.038). Bezogen auf die Patientenpopulation jünger als 60 Jahre konnte entsprechend unseren Ergebnissen ebenfalls ein verkürztes EFS bei *RUNX1*$^{mut}$ Status (*P*=.011) beobachtet werden (Tabelle 6, siehe Anhang). Darüber hinaus wurde der antagonisch wirkende Effekt von *RUNX1* und *NPM1* Mutationen auf das OS und EFS für CN-AML Patienten untersucht. Es wurden drei Gruppen mit folgenden Konstellationen verglichen: *RUNX1*$^{mut}$/*NPM1*$^{wt}$, *RUNX1*$^{wt}$/*NPM1*$^{mut}$ und *RUNX1*$^{wt}$/*NPM1*$^{wt}$. Der *RUNX1*$^{mut}$/*NPM1*$^{wt}$ Mutationsstatus zeigte sich für das OS als signifikant ungünstiger im Vergleich zum *RUNX1*$^{wt}$/*NPM1*$^{mut}$ Status (*P*=.029). Der *RUNX1*$^{wt}$/*NPM1*$^{wt}$ Mutationsstatus zeigte das längste OS der drei verglichenen Konstellationen. Das EFS war nur im Trend signifikant (*P*=.062) in der Gruppe mit *RUNX1*$^{wt}$/*NPM1*$^{mut}$ Status im Vergleich zur Gruppe mit *RUNX1*$^{mut}$/*NPM1*$^{wt}$ Status verlängert (Schnittger et al. 2011). In der multivariaten Analyse waren neben der Ratio von *FLT3*-ITD$^{pos.}$/*FLT3*$^{wt.}$, ein *RUNX1*$^{mut}$ Status, eine erhöhte Leukozytenzahl und ein hohes Patientenalter als unabhängiger Risikofaktor für das OS definiert (Schnittger et al. 2011). Diese Angaben für die multivariate Analyse beziehen sich auf die Gesamtkohorte der Studie die ausschließlich *de novo* AML Fälle mit einbezog (Tabelle 6, siehe Anhang).

Im Einklang mit unseren Ergebnissen konnte Roumier et al. für Patienten mit FAB Subtyp M0 zeigen, dass sich das OS von Patienten mit *RUNX1*$^{mut}$ Status von denen mit *RUNX1*$^{wt}$ Status nicht signifikant unterschied (Roumier et al. 2003).

Aufgrund der Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der einzelnen Studien, stellt sich die Frage, warum Unterschiede zwischen den einzelnen Arbeiten bestehen. Diese können unter anderem als mögliche Folge des divergenten Patientenkollektivs, Studiendesigns und der angewandten Therapieregime angesehen werden. Die aufgeführten Studien beinhalten teils ein hochselektioniertes Patientenkollektiv. Tang et al. untersuchte Patienten kaukasischen Ursprungs ausschließlich mit *de novo* AML vom normalen und komplexen Karyotyp.

Subtypen wie FAB Typ M3, s-AML und t-AML wurden von der Studie ausgeschlossen. Prozentual machte der FAB Subtyp M1, M2 und M4 den größten Anteil der Studienkohorte aus.

Dicker et al. konnte Inzidenzen für *RUNX1* Mutationen von 34,4% für ein hochselektioniertes Patientenkollektiv mit ausschließlich CN-AML Patienten mit FAB Subtyp M0 zeigen. In der Studie von Schnittger et al. wurden ausschließlich *de novo* AML Formen untersucht, t-AML und MDS/AML wurden von der Studie ausgeschlossen. Die untersuchte Patientenkohorte von Preudhomme et al. umfasst Patienten mit AML, MDS, aber auch CML, ALL und ET mit unterschiedlichen Karyotypen.

Hervorzuheben ist, dass zusätzlich die Charakteristiken des Patientenkollektivs im Bezug auf die Therapie, das Patientenalter, der Nachbeobachtungszeitraum, die ethnische Herkunft, etc. zwischen den einzelnen Studien z.T. stark unterschiedlich sind (Tabelle 6, siehe Anhang).

Weiterhin war die Methode zur Feststellung der Inzidenz für *RUNX1* Mutationen unterschiedlich. Osato et al. verwendete in seiner Arbeit einen sogenannten nonisotopic RNA cleavage assay (NIRCA). Langabeer et al., Preudhomme et al. und Roumier et al. untersuchten das *RUNX1* Gen anhand einer single-strand conformation polymorphism Analyse (SSNP Analyse). Dicker et al. und Schnittger et al. dagegen verwendeten zur Detektion von Genaberrationen die denaturating High Performance Liquid Chromatography (DHPLC). Die dabei verwendete cDNA ist deutlich instabiler als die in unserer Untersuchung verwendete DNA. Als Methode der Wahl in der vorliegenden Arbeit wurde ein DNA-basierter PCR Assay mit anschließender direkter Sequenzierung gewählt (Tabelle 6, siehe Anhang).

Die Mutationen im *RUNX1* Gen häufen sich vorwiegend im Exon 3 bis 5. Im Gegensatz zu unserer Studie und der von Schnittger et al. wurde in einigen Studien (Dicker et al., Langabeer et al., Preudhomme et al. und Roumier et al.) nur der kodierende Sequenzabschnitt der RHD-Domäne bzw. Exon 3-5 untersucht. Diese Studien können somit eine falsch niedrige Inzidenz für Mutationen des *RUNX1* Gens aufweisen, auch wenn Mutationen außerhalb der RHD-Domäne nur mit niedrigerer Inzidenz gefunden werden.

Dennoch gibt es durchaus Konsense, sowohl zwischen den angeführten Studien im Bezug auf die Inzidenz und Lokalisation der gefundenen Mutationen, als auch zwischen den uni- und multivariaten Analysen. Zum Teil wurde im Rahmen der Studien die Gesamtkohorte in Subgruppen unterteilt. Dicker et al., Schnittger et al. und Tang et al. führten zum Teil Untersuchungen mit Kohorten durch, die ausschließlich Patienten mit normalem Karyotyp erfassten. Darüber hinaus gibt es Übereinstimmungen in Hinsicht auf die Verteilung der biallelischen Mutationen und Inzidenzen innerhalb des FAB-Subtyps M0. Tang et al. und Schnittger et al. führten zusätzlich Untersuchungen in Hinblick auf die prognostische Bedeutung von *RUNX1* Mutationen bei CN-AML Patienten durch. Entsprechend den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte Tang et al. ein signifikant schlechteres Ansprechen auf die Induktionstherapie bei *RUNX1*$^{mut}$ Status zeigen (Tang et al. 2009). Unser Ergebnis eines schlechteren EFS bei *RUNX1*$^{mut}$ Status in CN-AML Patienten wird durch die Ergebnisse der Studie von Schnittger et al. unterstützt (Schnittger et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine große homogen behandelte Patientengruppe von 538 Patienten mit CN-AML auf das Vorliegen von *RUNX1* Mutationen, sowie deren Assoziation mit klinischen und genetischen Charakteristika untersucht. Insgesamt konnten in 6,3% (34/538) der Patienten Mutationen des *RUNX1* Gens gefunden werden.

Entsprechend der publizierten Daten von Tang et al. und Schnittger et al. konnte bei *RUNX1*$^{mut}$ CN-AML Patienten eine signifikant negative Assoziation mit *NPM1* Mutationen ($P$= <.001; 4/30 vs 270/230) und im Trend negative Assoziation mit *CEBPA* Mutationen ($P$=.10; 1/32 vs 64/396) gezeigt werden. Die signifikante Assoziation mit *MLL*-PTD ($P$=.0003; 9/24 vs 29/439) bei *RUNX1*$^{mut}$ CN-AML Patienten korreliert mit den Daten von Tang et al.. Im Gegensatz zu anderen Studien bestand in der vorliegenden Arbeit keine Selektion für den FAB-Subtyp M0. Es konnte gezeigt werden dass ein *RUNX1*$^{mut}$ Status in CN-AML Patienten nicht mit bestimmten klinischen Charakteristika einher geht. In Übereinstimmung mit bisher publizierten Daten waren in den univariaten Überlebensanalysen *RUNX1* Mutationen im Trend mit einer verminderten CR (22/34 vs 388/499; $P$=.09) und erhöhten Raten an RD (10/32 vs 77/499; $P$=.05) sowie einem schlechteren EFS assoziiert.

Dies spiegelt sich auch in den multivariaten Überlebensanalysen wieder, in denen sich der *RUNX1*$^{mut}$ Status als unabhängiger Risikofaktor für ein signifikant schlechteres EFS (10% vs 34%; *P*<.0001) darstellt (Tabelle 6, siehe Anhang).

Die generierten Daten der vorliegenden Arbeit bildeten die Grundlage für eine weiterführende größere Studie, die im Anschluss erfolgte. Eine Patientenkohorte von insgesamt 945 AML Patienten im Alter von 16 bis 60 Jahren wurden auf Mutationen des *RUNX1* Gens untersucht. Die Studienkohorte beinhaltete neben den hier untersuchten CN-AML Patienten unter anderem Patienten mit komplexem Karyotyp und diversen zytogenetischen Veränderungen. Um die Bedeutung der *RUNX1* Mutationen in der Subgruppe „intermediate-risk“ aber auch bei Patienten mit anderen zytogenetischen Veränderungen noch genauer zu definieren, bilden diese Daten die Grundlage für weiterführende Analysen. Diese sollten insbesondere im Kontext mit unterschiedlichen Therapiekonzepten (z.B. allogene HSCT) verglichen werden. Die insgesamt gewonnenen Ergebnisse liefern einen wichtigen Beitrag zur verbesserten Charakterisierung und Klassifizierung der AML und deuten darauf hin, dass die *RUNX1*$^{mut}$ AML möglicherweise eine eigene AML Entität darstellen könnte.

# 5 Zusammenfassung

Die akut myeloische Leukämie (AML) des Erwachsenen stellt eine äußerst heterogene, klonale Erkrankung mit komplexen genetischen Aberrationen dar. Im Mittelpunkt der Studien der letzten Jahre stand die große Gruppe der AML mit normalem Karyotyp (CN-AML). Der Einsatz neuer molekulargenetischer Methoden sowie die Entwicklung weiterführender zytogenetischer und molekulargenetischer Techniken, erlauben eine präzisere Klassifizierung dieser AML Subgruppe. Es konnten genetische Veränderungen identifiziert werden, die z.T. prognostische Auswirkungen für den Krankheits- und Therapieverlauf haben. Ziel ist es, diese große heterogene Gruppe genauer zu klassifizieren, um die an das individuelle Risiko des einzelnen Patienten angepasste Therapie zu wählen. Ein Marker, der für die Differenzierung hämatopoetischer Zellen eine bedeutende Rolle spielt, ist der Transkriptionsfaktor *RUNT-related transkription factor 1* (*RUNX1*). Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war der Nachweis von *RUNX1* Mutationen in einer homogen behandelten Patientenpopulation mit CN-AML. Zunächst wurde ein zuverlässiger Assay zur Amplifikation und Sequenzierung des *RUNX1* Gens etabliert. Analysiert wurde der kodierende Bereich des *RUNX1* Gens (Exons 1-8) mit Hilfe von insgesamt 8 PCR Reaktionen. Nach der Sequenzierung erfolgte die Auswertung der Sequenzen durch den Vergleich mit der in der Gendatenbank erhaltenen Bezugssequenz für das *RUNX1* Gen.

Es wurde die Inzidenz von Mutationen des *RUNX1* Gens in 538 Patienten mit CN-AML untersucht sowie deren Assoziation mit klinischen und genetischen Charakteristika. Dies stellt die größte CN-AML Patientengruppe dar, die bislang auf *RUNX1* Mutationen untersucht wurde. Insgesamt konnten Mutationen des *RUNX1* Gens in 6,3% (34/538) gefunden werden. In 14,7% (5/34) dieser Patienten bestand mehr als eine Mutation im Gen des Transkriptionsfaktors (siehe Tabelle 4). Die Mutationen waren überwiegend in Exon 3, welches die RHD-Domäne kodiert und in Exon 8 lokalisiert. *RUNX1*$^{mut}$ CN-AML Patienten zeigten eine signifikante Assoziation mit *MLL*-PTD$^{pos}$ (9/24 vs 29/439; *P*=.0003). Darüber hinaus waren *RUNX1* Mutationen signifikant negativ mit *NPM1* Mutationen (4/30 vs 270/230; *P*= <.001) und im Trend negativ mit *CEBPA* Mutationen (1/32 vs 64/396; *P*=.10) korreliert.

Um die prognostische Relevanz von *RUNX1* Mutationen zu evaluieren, wurden die Ergebnisse mit klinischen Daten uni- und multivariat korreliert. In den univariaten Überlebensanalysen waren *RUNX1* Mutationen im Trend mit einer verminderten kompletten Remissionsrate (CR: 22/34 vs 388/499; *P*=.09) und erhöhten Raten an refraktären Erkrankungen (RD: 10/32 vs 77/499; *P*=.05), sowie einem schlechteren ereignisfreiem Überleben (EFS) assoziiert (siehe Abbildung 7). In den multivariaten Überlebensanalysen stellt sich der *RUNX1*$^{mut}$ Status als unabhängiger Risikofaktor für ein signifikant schlechteres EFS (10% vs 34%; *P*<.0001) dar. Diese Daten stimmen mit weiteren publizierten Daten aus anderen Studien überein (Siehe Anhang, Tabelle 6).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass *RUNX1* Mutationen mit distinkten biologischen und klinischen Merkmalen assoziiert sind. Klinisch sind *RUNX1* Mutationen mit einer Resistenz gegenüber Chemotherapien und folgend mit einem geringeren Ansprechen auf die Induktionstherapie und einem verringerten EFS vergesellschaftet. Dies hat zur Folge, dass innerhalb der CN-AML Patienten identifiziert werden können, die ein hohes Risiko aufweisen, refraktär auf die herkömmliche Therapie zu sein. Diese Patienten benötigen intensivere oder alternative Behandlungsschemata.

Die Daten dieser Promotionsarbeit bildeten einen wesentlichen Bestandteil für eine Studie die im Anschluss erfolgte. Die Ergebnisse dieser Studie wurden 2011 in dem international renommierten Journal of Clinical Oncology (JCO) publiziert (Gaidzik et al. 2011). Insgesamt konnten 945 AML Patienten auf Mutationen im *RUNX1* Gen untersucht werden. Die Studienkohorte beinhaltete neben den hier untersuchten CN-AML Patienten unter anderem Patienten mit komplexem Karyotyp und diversen zytogenetischen Veränderungen. Die Patienten waren in den prospektiven multizentrischen Phase III Studien AML HD98-A (NCT00146120) und AMLSG 07-04 der AMLSG (NCT00151242) behandelt worden. Diese Daten bildeten die Grundlage für weiterführende Analysen, um die Bedeutung der *RUNX1* Mutationen in der Subgruppe „intermediate-risk“ aber auch bei Patienten mit anderen zytogenetischen Veränderungen zu untersuchen. Dies sollte insbesondere im Kontext mit unterschiedlichen Therapiekonzepten (z.B. allogene HSCT) geschehen. Die insgesamt gewonnenen Ergebnisse liefern einen wichtigen Beitrag zur verbesserten Charakterisierung und Klassifizerung der AML und deuten stark darauf hin, dass die *RUNX1* mutierte AML möglicherweise eine eigene AML Entität darstellt.

# 6 Literaturverzeichnis

1) Abbas S, Lugthart S, Kavelaars FG, Schelen A, Koenders JE, Zeilemaker A, van Putten WJ, Rijneveld AW, Löwenberg B, Valk PJ: Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. Blood 116: 2122-2126 (2010)

2) Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT: Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. Br J Haematol 113: 983-988 (2001)

3) Alcalay M, Orleth A, Sebastiani C, Meani N, Chiaradonna F, Casciari C, Sciurpi MT, Gelmetti V, Riganelli D, Minucci S, Fagioli M, Pelicci PG: Common themes in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. Oncogene 20: 5680-5694 (2001)

4) Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S: Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters-an analysis of 3082 patients. Blood 111: 2527-2537 (2008)

5) Bacher U, Haferlach C, Schnittger S, Kohlmann A, Kern W, Haferlach T: Mutations of the TET2 and CBL genes: Novel molecular markers in myeloid malignancies. Ann Hematol 89: 643-652 (2010)

6) Bacher U, Haferlach T, Schoch C, Kern W, Schnittger S: Implications of NRAS mutations in AML: A study of 2502 patients. Blood 107: 3847-3853 (2006)

7) Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS, Whitman SP, Archer KJ, Marcucci G, Caligiuri MA, Carroll AJ, Vardiman JW, Powell BL, Allen SL, Moore JO, Larson RA, Kolitz JE, de la Chapelle A, Bloomfield CD: BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study. Blood 102: 1613-1618 (2003)

8) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C: Proposals for the classification of the acute leukemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol 33: 451-458 (1976)

9) Biggs JR, Peterson LF, Zhang Y, Kraft AS, Zhang DE: AML1/RUNX1 phosphorylation by cyclin-dependent kinases regulates the degradation of AML1/RUNX1 by the anaphase-promoting complex. Mol Cell Biol 26: 7420-7429 (2006)

10) Bhargava R, Dalal BI: Two steps forward, one step back: 4th WHO classification of myeloid neoplasms (2008). Indian J Pathol Microbiol 53: 391-394 (2010)

11) Bloomfield CD, Lawrence D, Byrd JC, Carroll A, Pettenati MJ, Tantravahi R, Patil SR, Davey FR, Berg DT, Schiffer CA, Arthur DC, Mayer RJ: Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. Cancer Res 58: 4173-4179 (1998)

12) Boissel N, Nibourel O, Renneville A, Gardin C, Reman O, Contentin N, Bordessoule D, Pautas C, de Revel T, Quesnel B, Huchette P, Philippe N, Geffroy S, Terre C, Thomas X, Castaigne S, Dombret H, Preudhomme C: Prognostic impact of isocitrate dehydrogenase enzyme isoforms 1 and 2 mutations in acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association group. J Clin Oncol 28: 3717-3723 (2010)

13) Bushweller, John H., Liu, Yizhou, Chruszcz, Maksymilian, Minor, Wladek, Speck, Nancy A: Structural and functional basis of the dominant negative phenotype of AML1-ETO, product of the t(8;21). Blood 102: 171a (2003)

14) Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, Pettenati MJ, Patil SR, Rao KW, Watson MS, Koduru PR, Moore JO, Stone RM, Mayer RJ, Feldman EJ, Davey FR, Schiffer CA, Larson RA, Bloomfield CD; Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461): Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Blood 100: 4325-4336 (2002)

15) Caligiuri MA, Strout MP, Lawrence D, Arthur DC, Baer MR, Yu F, Knuutila S, Mrózek K, Oberkircher AR, Marcucci G, de la Chapelle A, Elonen E, Block AW, Rao PN, Herzig GP, Powell BL, Ruutu T, Schiffer CA, Bloomfield CD: Rearrangement of ALL1 (MLL) in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. Cancer Res 58: 55-59 (1998)

16) Colombo E, Marine JC, Danovi D, Falini B, Pelicci PG: Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. Nat Cell Biol 4: 529-533 (2002)

17) Corbacioglu A, Fröhling S, Mendla C, Eiwen K, Habdank M, Döhner H, Schlenk R, Döhner K: CEBPA germline mutation screening in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with somatically acquired CEBPA mutations. Blood 110: Abstract 363 (2007) (ASH Annual Meeting Abstracts)

18) Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, Kosmider O, Le Couedic JP, Robert F, Alberdi A, Lécluse Y, Plo I, Dreyfus FJ, Marzac C, Casadevall N, Lacombe C, Romana SP, Dessen P, Soulier J, Viguié F, Fontenay M, Vainchenker W, Bernard OA: Mutation in TET2 in myeloid cancers. N Engl J Med 360: 2289-2301 (2009)

19) Dicker F, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S: Trisomy 13 is strongly associated with AML1/RUNX1 mutations and increased FLT3 expression in acute myeloid leukemia. Blood 110: 1308-1316 (2007)

20) 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)

21) Döhner H, Gaidzik VI: Impact of genetic features on treatment decisions in AML. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2011: 36-42 (2011)

22) 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)

23) 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)

24) Döhner K, Döhner H: Molecular characterization of acute myeloid leukemia. Haematologica 93: 976-982 (2008)

25) Ernst P, Wang J, Korsmeyer SJ: The role of MLL in hematopoiesis and leukemia. Curr Opin Hematol 9: 282-287 (2002)

26) 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: Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. N Engl J Med 352: 254-266 (2005)

27) Fischer M, Schwieger M, Horn S, Niebuhr B, Ford A, Roscher S, Bergholz U, Greaves M, Lohler J, Stocking C: Defining the oncogenic function of the TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) fusion protein in a mouse model. Oncogene 24: 7579-7591 (2005)

28) Frackman S, Kobs G, Simpson D; Storts D: Betaine and DMSO: Enhancing Agents for PCR. Promega Notes 65: S. 27 (1998)

29) Fröhling S, Schlenk RF, Breitruck J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K; AML Study Group Ulm: Acute myeloid leukemia. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. Blood 100: 4372-4380 (2002)

30) 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)

31) Fröhling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL: Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. J Clin Oncol 23: 6285-6295 (2005)

32) Gaidzik V, Döhner K: Prognostic implications of gene mutations in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. Seminars in Oncology 35: 346-355 (2008)

33) Gaidzik V, Bullinger L, Schlenk RF, Zimmermann AS, Röck J, Paschka P, Corbacioglu A, Krauter J, Schlegelberger B, Ganser A, Späth D, Kündgen A, Schmidt-Wolf IG, Götze K, Nachbaur D, Pfreundschuh M, Horst HA, Döhner H, Döhner K: RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia: results from a comprehensive genetic and clinical analysis from the AML study group. J Clin Oncol 29: 1364-1372 (2011)

34) Gaidzik V, Paschka P, Späth D, Habdank M, Köhne CH, Germing U, von Lilienfeld-Toal M, Held G, Horst HA, Haase D, Bentz M, Götze K, Döhner H, Schlenk RF, Bullinger L, Döhner K: TET2 mutations in acute myeloid leukemia (AML): results from a comprehensive genetic and clinical analysis of the AML study group. J Clin Oncol 30: 1350-1357 (2012)

35) Gaidzik V, Schlenk RF, Moschny S, Becker A, Bullinger L, Corbacioglu A, Krauter J, Schlegelberger B, Ganser A, Döhner H, Döhner K: Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study of the German-Austrian AML Study Group. Blood 113: 4505-4511 (2009)

36) Gaidzik V, Schlenk RF, Paschka P, Stölzle A, Späth D, Kuendgen A, von Lilienfeld-Toal M, Brugger W, Derigs HG, Kremers S, Greil R, Raghavachar A, Ringhoffer M, Salih HR, Wattad M, Kirchen HG, Runde V, Heil G, Petzer AL, Girschikofsky M, Heuser M, Kayser S, Goehring G, Teleanu MV, Schlegelberger B, Ganser A, Krauter J, Bullinger L, Döhner H, Döhner K: Clinical impact of DNMT3A mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: results of the AML Study Group (AMLSG). Blood 121: 4769-4777 (2013)

37) Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, Linch DC; Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party: The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. Blood 111: 2776-2784 (2008)

38) Gelmetti V, Zhang J, Fanelli M, Minucci S, Pelicci PG, Lazar MA: Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO. Mol Cell Biol 18: 7185-7191 (1998)

39) Gilliland DG, Griffin JD: The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. Blood 100: 1532-1542 (2002)

40) Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA: The molecular basis of leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 80-97 (2004)

41) Green CL, Evans CM, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE: The prognostic significance of IDH1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia is dependent on FLT3/ITD status. Blood 116: 2779-2782 (2010)

42) Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A: The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. Blood 92: 2322-2333 (1998)

43) Grimwade D: The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. Best Pract Res Clin Haematol 14: 497-529 (2001)

44) Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett AK; National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group: Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. Blood 116: 354-365 (2010)

45) Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP: Nucleophosmin and cancer. Nat Rev Cancer 6: 493-505 (2006)

46) Golub TR, Barker GF, Bohlander SK, Hiebert SW, Ward DC, Bray-Ward P, Morgan E, Raimondi SC, Rowley JD, Gilliland DG: Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 4917-4921 (1995)

47) Harada H, Harada Y, Niimi H, Kyo T, Kimura A, Inaba T: High incidence of somatic mutations in the AML1/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia. Blood 103: 2316-2324 (2004)

48) Harada H, Harada Y, Tanaka H, Kimura A, Inaba T: Implications of somatic mutations in the AML1 gene in radiation-associated and therapy-related myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia. Blood 101: 673-680 (2003)

49) Harada Y, Harada H: Molecular pathways mediating MDS/AML with focus on AML1/RUNX1 point mutations. J Cell Physiol 220: 16-20 (2009)

50) Higuchi M, O'Brien D, Kumaravelu P, Lenny N, Yeoh EJ, Downing JR: Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia. Cancer Cell 1: 63-74 (2002)

51) Huang G, Shigesada K, Ito K, Wee HJ, Yokomizo T, Ito Y: Dimerization with PEBP2beta protects RUNX1/AML1 from ubiquitin-proteasome-mediated degradation. EMBO J 20: 723-733 (2001)

52) Ichikawa M, Asai T, Chiba S, Kurokawa M, Ogawa S: Runx1/AMl-1 ranks as a master regulator of adult hematopoiesis. Cell Cycle 3: 722-724 (2004)

53) Kayser S, Schlenk RF, Londono MC, Breitenbuecher F, Wittke K, Du J, Groner S, Späth D, Krauter J, Ganser A, Döhner H, Fischer T, Döhner K; German-Austrian AML Study Group (AMLSG): Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. Blood 114: 2386-2392 (2009)

54) Kelly LM, Gilliland DG: Genetics of myeloid leukemias. Annu Rev Genomics Hum Genet 3: 179-198 (2002)

55) Ko M, Huang Y, Jankowska AM, Pape UJ, Tahiliani M, Bandukwala HS, An J, Lamperti ED, Koh KP, Ganetzky R, Liu XS, Aravind L, Agarwal S, Maciejewski JP, Rao A: Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. Nature 468: 839-843 (2010)

56) Koschmieder S, Halmos B, Levantini E, Tenen DG: Dysregulation of the C/EBPalpha differentiation pathway in human cancer. J Clin Oncol 27: 619-628 (2009)

57) Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, Walker H, Wheatley K, Bowen DT, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC: The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. Blood 98: 1752-1759 (2001)

58) Kottaridis PD, Gale RE, Linch DC: Prognostic implications of the presence of FLT3 mutations in patients with acute myeloid leukemia. Leuk Lymphoma 44: 905-913 (2003)

59) Kralovics R, Teo SS, Li S, Theocharides A, Buser AS, Tichelli A, Skoda RC: Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. Blood 108: 1377-1380 (2006)

60) Krönke J, Schlenk RF, Jensen KO, Tschürtz F, Corbacioglu A, Gaidzik VI, Paschka P, Onken S, Eiwen K, Habdank M, Späth D, Lübbert M, Wattad M, Kindler T, Salih HR, Held G, Nachbaur D, von Lilienfeld-Toal M, Germing U, Haase D, Mergenthaler HG, Krauter J, Ganser A, Göhring G, Schlegelberger B, Döhner H, Döhner K: Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. J Clin Oncol 29: 2709-2716 (2011)

61) Kurokawa M, Hirai H: Role of AML1/Runx1 in the pathogenesis of hematological malignancies. Cancer Sci 94: 841-846 (2003)

62) Langabeer SE, Gale RE, Rollinson SJ, Morgan GJ, Linch DC: Mutations of the AML1 gene in acute myeloid leukemia of FAB types M0 and M7. Genes Chromosomes Cancer 34: 24-32 (2002)

63) Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M, Stevens-Linders E, van Hoogen P, van Kessel AG, Raymakers RA, Kamping EJ, Verhoef GE, Verburgh E, Hagemeijer A, Vandenberghe P, de Witte T, van der Reijden BA, Jansen JH: Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. Nat Genet 41: 838-842 (2009)

64) Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Kandoth C, Payton JE, Baty J, Welch J, Harris CC, Lichti CF, Townsend RR, Fulton RS, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Zhang Q, Osborne JR, Lin L, O'Laughlin M, McMichael JF, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Magrini VJ, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Conyers JJ, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie T, Walker J, Kalicki J, Watson MA, Heath S, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Westervelt P, Tomasson MH, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Mardis ER, Wilson RK: DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. N Engl J Med 363: 2424-2433 (2010)

65) Löwenberg B, Downing JR, Burnett A: Acute myeloid leukemia. N Engl J Med 341: 1051-1062 (1999)

66) Lutterbach B, Hiebert SW: Role of the transcription factor AML-1 in acute leukemia and hematopoietic differentiation. Gene 245: 223-35 (2000)

67) 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)

68) Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Holland KB, Whitman SP, Becker H, Schwind S, Metzeler KH, Powell BL, Carter TH, Kolitz JE, Wetzler M, Carroll AJ, Baer MR, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD: IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. J Clin Oncol 28: 2348-2355 (2010)

69) Marcucci G, Haferlach T, Döhner H: Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. J Clin Oncol 29: 475-486 (2011)

70) Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, Koboldt DC, Fulton RS, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Locke DP, Magrini VJ, Abbott RM, Vickery TL, Reed JS, Robinson JS, Wylie T, Smith SM, Carmichael L, Eldred JM, Harris sCC, Walker J, Peck JB, Du F, Dukes AF, Sanderson GE, Brummett AM, Clark E, McMichael JF, Meyer RJ, Schindler JK, Pohl CS, Wallis JW, Shi X, Lin L, Schmidt H, Tang Y, Haipek C, Wiechert ME, Ivy JV, Kalicki J, Elliott G, Ries RE, Payton JE, Westervelt P, Tomasson MH, Watson MA, Baty J, Heath S, Shannon WD, Nagarajan R, Link DC, Walter MJ, Graubert TA, DiPersio JF, Wilson RK, Ley TJ: Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. N Engl J Med 361: 1058-1066 (2009)

71) Marková J, Michková P, Burčková K, Březinová J, Michalová K, Dohnalová A, Maaloufová JS, Soukup P, Vítek A, Cetkovský P, Schwarz J: Prognostic impact of DNMT3A mutations in patients with intermediate cytogenetic risk profile acute myeloid leukemia. Eur J Haematol 88: 128-135 (2012)

72) Metzeler KH, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Becker H, Curfman J, Holland KB, Schwind S, Whitman SP, Wu YZ, Blum W, Powell BL, Carter TH, Wetzler M, Moore JO, Kolitz JE, Baer MR, Carroll AJ, Larson RA, Caligiuri MA, Marcucci G, Bloomfield CD: TET2 mutations improve the new European Leukemia Net risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. J Clin Oncol 29: 1373-1381 (2011)

73) Mrózek K.: Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. Semin Oncol 35: 365-377 (2008)

74) Mrózek K, Bloomfield CD: Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 169-177 (2006)

75) Mrózek K, Döhner H, Bloomfield CD: Influence of new molecular prognostic markers in patients with karyotypically normal acute myeloid leukemia: recent advances. Curr Opin Hematol 14: 106-114 (2007)

76) Mrózek K, Heinonen K, Bloomfield CD. Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia. Best Pract Res Clin Haematol 14: 19-47 (2001)

77) Mrózek K, Radmacher MD, Bloomfield CD, Marcucci G: Molecular signatures in acute myeloid leukemia. Curr Opin Hematol 16: 64-69 (2009)

78) Nerlov C: C/EBPalpha mutations in acute myeloid leukaemias. Nat Rev Cancer 4: 394-400 (2004)

79) Osato M: Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX leukemia. Oncogene 23: 4284-4296 (2004)

80) Owen C, Fitzgibbon J, Paschka P: The clinical relevance of Wilms Tumour 1 (WT1) gene mutations in acute leukaemia. Hematol Oncol 28: 13-19 (2010)

81) Owen CJ, Toze CL, Koochin A, Forrest DL, Smith CA, Stevens JM, Jackson SC, Poon MC, Sinclair GD, Leber B, Johnson PR, Macheta A, Yin JA, Barnett MJ, Lister TA, Fitzgibbon J: Five new pedigrees with inherited RUNX1 mutations causing familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy. Blood 112: 4639-4645 (2008)

82) Padua RA, West RR. Oncogene mutation and prognosis in the myelodysplastic syndromes. Br J Haematol 111: 873-874 (2000)

83) 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)

84) Pabst T, Mueller BU: Transcriptional dysregulation during myeloid transformation in AML. Oncogene 26: 6829-6837 (2007)

85) Paquette RL, Landaw EM, Pierre RV, Kahan J, Lübbert M, Lazcano O, Isaac G, McCormick F, Koeffler HP: N-ras mutations are associated with poor prognosis and increased risk of leukemia in myelodysplastic syndrome. Blood 82: 590-599 (1993)

86) Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Habdank M, Krönke J, Bullinger L, Späth D, Kayser S, Zucknick M, Götze K, Horst HA, Germing U, Döhner H, Döhner K: IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. J Clin Oncol 28: 3636-3643 (2010)

87) Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Whitman SP, Mrózek K, Maharry K, Langer C, Baldus CD, Zhao W, Powell BL, Baer MR, Carroll AJ, Caligiuri MA, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD: Wilms' tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. J Clin Oncol 26: 4595-4602 (2008)

88) Patel KP, Barkoh BA, Chen Z, Ma D, Reddy N, Medeiros LJ, Luthra R: Diagnostic testing for IDH1 and IDH2 variants in acute myeloid leukemia an algorithmic approach using high-resolution melting curve analysis. J Mol Diagn 13: 678-686 (2011)

89) Perry C, Eldor A, Soreq H: Runx1/AML1 in leukemia: disrupted association with diverse protein partners. Leuk Res 26: 221-228 (2002)

90) Preudhomme C, Warot-Loze D, Roumier C, Grardel-Duflos N, Garand R, Lai JL, Dastugue N, Macintyre E, Denis C, Bauters F, Kerckaert JP, Cosson A, Fenaux P: High incidence of biallelic point mutations in the Runt domain of the AML1/PEBP2 alpha B gene in Mo acute myeloid leukemia and in myeloid malignancies with acquired trisomy 21. Blood 96: 2862-2869 (2000)

91) Ravandi F, Patel K, Luthra R, Faderl S, Konopleva M, Kadia T, Brandt M, Pierce S, Kornblau S, Andreeff M, Wang X, Garcia-Manero G, Cortes J, Kantarjian H: Prognostic significance of alterations in IDH enzyme isoforms in patients with AML treated with high-dose cytarabine and idarubicin. Cancer 118: 2665-2673 (2012)

92) Roumier C, Fenaux P, Lafage M, Imbert M, Eclache V, Preudhomme C: New mechanisms of AML1 gene alteration in hematological malignancies. Leukemia 17: 9-16 (2003)

93) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminatinginhibitors. ProcNatl Acad Sci USA 74: 5463-5467 (1977)

94) Schlenk RF, Benner A, Hartmann F, del Valle F, Weber C, Pralle H, Fischer JT, Gunzer U, Pezzutto A, Weber W, Grimminger W, Preiss J, Hensel M, Fröhling S, Döhner K, Haas R, Döhner H; AML Study Group Ulm (AMLSG ULM): Risk-adapted postremission therapy in acute myeloid leukemia: results of the German multicenter AML HD93 treatment trial. Leukemia 17: 1521-1528 (2003)

95) 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: Mutations and Treatment Outcome in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med 358: 1909-1918 (2008)

96) Schnittger S, Kinkelin U, Schoch C, Heinecke A, Haase D, Haferlach T, Büchner T, Wörmann B, Hiddemann W, Griesinger F: Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML. Leukemia 14: 796-804 (2000)

97) Schnittger S, Kohl TM, Haferlach T, Kern W, Hiddemann W, Spiekermann K, Schoch C: KITD816 mutations in AML1-ETO-positive AML are associated with impaired event-free and overall survival. Blood 107: 1791-1799 (2006)

98) Schnittger S, Dicker F, Kern W, Wendland N, Sundermann J, Alpermann T, Haferlach C, Haferlach T: RUNX1 mutations are frequent in de novo AML with noncomplex karyotype and confer an unfavorable prognosis. Blood 117: 2348-2357 (2011)

99) 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)

100) Shivdasani RA, Orkin SH: The transcriptional control of hematopoiesis. Blood 87: 4025-4039 (1996)

101) Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, Paietta E, Willman CL, Head DR, Rowe JM, Forman SJ, Appelbaum FR: Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. Blood 96: 4075-4083 (2000)

102) Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, Hutchings S, Tan X, Kufrin D, Ratajczak J, Resende IC, Haworth C, Hock R, Loh M, Felix C, Roy DC, Busque L, Kurnit D, Willman C, Gewirtz AM, Speck NA, Bushweller JH, Li FP, Gardiner K, Poncz M, Maris JM, Gilliland DG: Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. Nat Genet 23: 166-175 (1999)

103) Summers K, Stevens J, Kakkas I, Smith M, Smith LL, Macdougall F, Cavenagh J, Bonnet D, Young BD, Lister TA, Fitzgibbon J: Wilms' tumour 1 mutations are associated with FLT3-ITD and failure of standard induction chemotherapy in patients with normal karyotype AML. Leukemia 21: 550-551 (2007)

104) Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW: WHO Classification of hematopoietic neoplasm. In: WHO (Hrsg) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, fourth edition, 2. Aufl, IARC Press, Lyon, France, S. 1233-1237 (2008)

105) Tahirov TH, Inoue-Bungo T, Morii H, Fujikawa A, Sasaki M, Kimura K, Shiina M, Sato K, Kumasaka T, Yamamoto M, Ishii S, Ogata K: Structural analyses of DNA recognition by the AML1/Runx-1 Runt domain and its allosteric control by CBFbeta. Cell 104: 755-767 (2001)

106) Taketani T, Taki T, Takita J, Tsuchida M, Hanada R, Hongo T, Kaneko T, Manabe A, Ida K, Hayashi Y: AML1/RUNX1 mutations are infrequent, but related to AML-M0, acquired trisomy 21, and leukemic transformation in pediatric hematologic malignancies. Genes Chromosomes Cancer 38: 1-7 (2003)

107) Tang JL, Hou HA, Chen CY, Liu CY, Chou WC, Tseng MH, Huang CF, Lee FY, Liu MC, Yao M, Huang SY, Ko BS, Hsu SC, Wu SJ, Tsay W, Chen YC, Lin LI, Tien HF: AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations. Blood 114: 5352-5361 (2009)

108) Taskesen E, Bullinger L, Corbacioglu A, Sanders MA, Erpelinck CA, Wouters BJ, van der Poel-van de Luytgaarde SC, 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 patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity. Blood 117: 2469-2475 (2011)

109) Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang DE: Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. Blood 90: 489-519 (1997)

110) Tenen DG: Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. Nat Rev Cancer 3: 89-101 (2003)

111) Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhäuser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, Illmer T: Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. Blood 99: 4326-4335 (2002)

112) Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, Ehninger G: Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). Blood 107: 4011-4020 (2006)

113) Thol F, Damm F, Lüdeking A, Winschel C, Wagner K, Morgan M, Yun H, Göhring G, Schlegelberger B, Hoelzer D, Lübbert M, Kanz L, Fiedler W, Kirchner H, Heil G, Krauter J, Ganser A, Heuser M: Incidence and prognostic influence of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. J Clin Oncol 29: 2889-2896 (2011)

114) Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD: The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. Blood 100: 2292-2302 (2002)

115) Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD: The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood 114: 937-951 (2009)

116) Vegesna V, Takeuchi S, Hofmann WK, Ikezoe T, Tavor S, Krug U, Fermin AC, Heaney A, Miller CW, Koeffler HP: C/EBP-beta, C/EBP-delta, PU.1, AML1 genes: mutational analysis in 381 samples of hematopoietic and solid malignancies. Leuk Res 26: 451-457 (2002)

117) Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hugens W, Uitterlinden AG, Erpelinck CA, Delwel R, Löwenberg B, Valk PJ: Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. Blood 106: 3747-3754 (2005)

118) Virappane P, Gale R, Hills R, Kakkas I, Summers K, Stevens J, Allen C, Green C, Quentmeier H, Drexler H, Burnett A, Linch D, Bonnet D, Lister TA, Fitzgibbon J: Mutation of the Wilms' tumor 1 gene is a poor prognostic factor associated with chemotherapy resistance in normal karyotype acute myeloid leukemia: the United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. J Clin Oncol 26: 5429-5435 (2008)

119) Wagner K, Damm F, Göhring G, Görlich K, Heuser M, Schäfer I, Ottmann O, Lübbert M, Heit W, Kanz L, Schlimok G, Raghavachar AA, Fiedler W, Kirchner HH, Brugger W, Zucknick M, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Krauter J: Impact of IDH1 R132 mutations and an IDH1 single nucleotide polymorphism in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: SNP rs11554137 is an adverse prognostic factor. J Clin Oncol 28: 2356-2364 (2010)

120) Whitman SP, Ruppert AS, Radmacher MD, Mrózek K, Paschka P, Langer C, Baldus CD, Wen J, Racke F, Powell BL, Kolitz JE, Larson RA, Caligiuri MA, Marcucci G, Bloomfield CD: FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications. Blood 111: 1552-1559 (2008)

121) 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)

# 7 Publikation der Ergebnisse dieser Arbeit

Gaidzik VI, Bullinger L, Schlenk RF, **Zimmermann AS**, Röck J, Paschka P, Corbacioglu A, Krauter J, Schlegelberger B, Ganser A, Späth D, Kündgen A, Schmidt-Wolf IG, Götze K, Nachbaur D, Pfreundschuh M, Horst HA, Döhner H, Döhner K: RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia: results from a comprehensive genetic and clinical analysis from the AML study group. J Clin Oncol 29: 1364-1372 (2011)

# 8 Anhang

**Tabelle 6:** Übersicht der publizierten Studien zur Inzidenz und Bedeutung von *RUNT-related transkription factor 1 (RUNX1*) Mutationen in der akut myeloischen Leukämie (AML) im Vergleich zur vorliegenden Promotionsarbeit. Die Daten der vorliegenden Arbeit stammen aus den prospektiven multizentrischen Phase III Studien AML HD98-A (NCT00146120) und AMLSG 07-04 (NCT00151242) der AML Study Group Ulm (AMLSG); APL: akute Promyelozytenleukämie; CD $34^{+}$: cluster of differentiation 34 positiv, immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen; *CEBPA*$^{mut}$: Mutation des *CCAAT/enhancer binding protein alpha* Gens; complex caryotyps: komplexe Karyotypen; CN-AML: AML mit normaler Zytogenetik; CR: complete remission (komplette Remission); DFS: disease-free survival (krankheitsfreies Überleben); DHPLC: Denaturating high performance liquid chromatography; EFS: event-free survival (ereignisfreies Überleben); FAB Klassifikation: French-American-British Cooperative Group Klassifikation; FAB M0: Akute myeloische Leukämie mit minimaler Differenzierung; FAB M3: Akute Promyelozyten-Leukämie; M: männliches Geschlecht; KM: Knochenmark; LDH: Lactatdehydrogenase; MDS/AML: AML, welche sich aus einem MDS entwickelt; *MLL*/PTD$^{pos}$: Partielle Tandemduplikationen im *mixed-lineage-leukemia* Gen; Mut.: Mutation; *NPM1*$^{mut}$: Mutation im *Nukleophosmin 1* Gen; OS: overall survival (Gesamtüberleben); PCR: Polymerase Kettenreaktion; RD: refractory disease (refraktäre Erkrankung); *RUNX1*$^{mut}$: Mutation im *RUNT-related transkription factor 1 Protein* Gen; s-AML: sekundäre AML; t-AML: Therapie assoziierte AML;↑: erhöht; ↓: erniedrigt

| | **vorliegende Promotionsarbeit** | **Tang et al. 2009** | **Dicker et al. 2007** | **Schnittger et al. 2011** |
|---|---|---|---|---|
| **Studien und Kohorten Charakteristik** | | | | |
| **Ethnische Herkunft** | europäisch | kaukasisch | europäisch | europäisch |
| **Zytogenetik** | CN-AML | Keine Selektion für Karyotyp | Keine Selektion für Karyotyp | CN-AML + nicht komplexe Karyotypen |
| **Anhäufung von:** | Nicht bekannt | FAB M1/2/4 | FAB M0 | FAB M2 |
| **Anzahl CN-AML Patienten (n):** | 538 | 230 | 32 in FAB M0 | 262 |
| **Untersuchte klinische Entität** | *de novo* AML; s-AML; t-AML | *de novo* AML | Nicht bekannt | *de novo* AML |

Fortsetzung auf Seite 75

**Fortsetzung Tabelle 6:** Übersicht der publizierten Studien zur Inzidenz und Bedeutung von *RUNT-related transkription factor 1 (RUNX1*) Mutationen in der akut myeloischen Leukämie (AML) im Vergleich zur vorliegenden Promotionsarbeit

| | **vorliegende Promotionsarbeit** | **Tang et al. 2009** | **Dicker et al. 2007** | **Schnittger et al. 2011** |
|---|---|---|---|---|
| **Ausschluss Entitäten** | APL | FAB M3 Subtyp; s-AML; t-AML | Nicht bekannt | t-AML; MDS/AML |
| **Alter in Jahren (medianes Alter)** | 18-60 (48) | 15-90 (52) | 20-86 (63,3) | 18,3- 90,1 (67,7) |
| **Detektions-methode** | PCR + Direkte Sequenzierung | PCR + Direkte Sequenzierung | DHPLC | DHPLC |
| **Untersuchter Bereich** | Exon 1-8 | Exon 3-8 | Exon 3-5 | Exon 1-8 |
| **Inzidenz an Mutationen mutiert/gesamt (%); Pat.-Kollektiv** | Ausschließlich für CN-AML Patienten berechnet | 62/470 (13,2%) Gesamtkohorte | 41/90 (46%) Gesamtkohorte | 147/449 (32,7%) Gesamtkohorte |
| **CN-AML mutiert/ gesamt (%); Pat.-Kollektiv** | 34/538 (6,3 %) Alle FAB Subtypen | 32/230 (13,9%) Alle FAB Subtypen aus-geschlossen M3 | 11/32 (34,4%) In FAB M0 | 69/262 (26,3% ) Alle FAB Subtypen |

Fortsetzung auf Seite 76

**Fortsetzung Tabelle 6:** Übersicht der publizierten Studien zur Inzidenz und Bedeutung von *RUNT-related transkription factor 1 (RUNX1*) Mutationen in der akut myeloischen Leukämie (AML) im Vergleich zur vorliegenden Promotionsarbeit

| | **vorliegende Promotionsarbeit** | **Tang et al. 2009** | **Dicker et al. 2007** | **Schnittger et al. 2011** |
|---|---|---|---|---|
| **Verteilung der Mutationen (%)** | 23% Exon 2<br>48,7% Exon 8<br>28,3% Exon 1, 3-7 | 50% Exon 3-5;<br>50% Exon 6-8 | Mutationshäufung in Exon 3,4,5 | 60,5% Exon 3,4,5;<br>14,8% Exon 7,8;<br>16% zwischen Exon 5 und 7 |
| **Pat.-Kollektiv** | Alle FAB Subtypen | Alle FAB Subtypen ausgeschlossen M3 | FAB M0 | Alle FAB Subtypen |
| **Mehr als eine Mutation im Gen** | 5/39 | 12/63 | 2/41 | 14/147 |
| **Assoziationen bei *RUNX1* Mutationen** | | | | |
| **mit klinischen Charakteristika** | Keine signif. Unterschiede | Geschlecht (M), Alter↑, LDH↓, FAB M0↑ und M2 Subtyp↓ | Keine Angaben | Alter↑, CD $34^{+}$ Expression↑, Blastenanteil KM↑, Thrombozytenzahl↓ |
| **Pat.-Kollektiv** | CN-AML | Gesamtkohorte | | Gesamtkohorte |
| **mit anderen molekularen Markern** | ***MLL*-PTD$^{pos}$** | ***MLL*/PTD$^{pos}$** | Keine Signifikanz | Keine Signifikanz |
| **Pat.-Kollektiv** | CN-AML | Gesamtkohorte | Gesamtkohorte | Gesamtkohorte |

Fortsetzung auf Seite 77

**Fortsetzung Tabelle 6:** Übersicht der publizierten Studien zur Inzidenz und Bedeutung von *RUNT-related transkription factor 1 (RUNX1*) Mutationen in der akut myeloischen Leukämie (AML) im Vergleich zur vorliegenden Promotionsarbeit

| | **vorliegende Promotionsarbeit** | **Tang et al. 2009** | **Dicker et al. 2007** | **Schnittger et al. 2011** |
|---|---|---|---|---|
| **Inverse Korrelation mit molekularen Markern** | ***NPM1*$^{mut}$; *CEBPA*$^{mut}$** (im Trend) | ***NPM1*$^{mut}$**; ***CEBPA*$^{mut}$** | Keine Signifikanz | ***NPM1*$^{mut}$**; ***CEBPA*$^{mut}$** |
| **Pat.-Kollektiv** | CN-AML | Gesamtkohorte | Gesamtkohorte | Gesamtkohorte |
| **FAB Subtyp mit der höchsten Inzidenz (%)** | Keine Angaben | FAB M0 Subtyp (40%) | FAB M0 Subtyp (46%) FAB M0 + CN-AML: (34,4%) | FAB M0 Subtyp (65,2%); |
| **Klinische Charakteristika:** | | | | |
| *RUNX1*$^{mut}$ Status assoziiert mit (Inzidenz) | Ansprechen auf Induktions-therapie↓; **RD↑** (10/32 vs 77/499; *P*=.05); **CR↓** (22/34 vs 388/499; *P*=.09) | Ansprechen auf Induktions-therapie ↓; **CR↓** | Keine Angaben | Keine Angaben |
| **Pat.-Kollektiv** | CN-AML | Gesamtkohorte | | |

Fortsetzung auf Seite 78

**Fortsetzung Tabelle 6:** Übersicht der publizierten Studien zur Inzidenz und Bedeutung von *RUNT-related transkription factor 1 (RUNX1*) Mutationen in der akut myeloischen Leukämie (AML) im Vergleich zur vorliegenden Promotionsarbeit

| | **vorliegende Promotionsarbeit** | **Tang et al. 2009** | **Dicker et al. 2007** | **Schnittger et al. 2011** |
|---|---|---|---|---|
| **Überlebens-analyse** | | | | |
| **Univariat** | **EFS↓** | **DFS↓**; **OS↓** | Keine Angaben | **EFS↓** ; **OS↓** |
| ***RUNX1*$^{mut}$** | [10% vs 34% | | | |
| **CN-AML** | (*P*<.0001)]; | | | |
| **Pat.-Kollektiv** | CN-AML | Gesamtkohorte | | CN-AML |

# 9 Danksagung

Die Danksagung ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

# 10 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten