

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

# ***RAD21*-Genmutationen bei akuter myeloischer Leukämie (AML)**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universitätsklinik Ulm

Julian Alexander Mauch

Schwäbisch Hall

2016

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Lars Bullinger
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Patrick Schuler
Tag der Promotion:	15.12.2016

## Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>III</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Akute myeloische Leukämie (AML).....	1
1.1.1 Definition.....	1
1.1.2 Epidemiologie .....	1
1.1.3 Ätiologie.....	1
1.1.4 Klinische Präsentation .....	2
1.1.5 Diagnostik und Klassifikation.....	2
1.1.6 Prognosefaktoren .....	7
1.1.7 Therapie.....	9
1.2 Molekulargenetik.....	12
1.2.1 Molekulargenetische Analysen.....	12
1.2.2 FMS-like tyrosine kinase-3 (FLT3) .....	12
1.2.3 CCAAT/enhancer-binding protein $\alpha$ ( <i>CEBPA</i> ).....	13
1.2.4 Nucleophosmin (NPM1) .....	14
1.3 Verbesserte molekulare Charakterisierung der AML durch Hochdurchsatz-Sequenzierungs-Verfahren .....	16
1.4 Der Cohesin-Komplex .....	20
1.4.1 Definition.....	20
1.4.2 Struktur und Rolle von Cohesin bei der Segregation der Schwesterchromatiden	20
1.4.3 Die Rolle von Cohesin bei der DNA-Reparatur .....	22
1.4.4 Die Rolle von RAD21 bei der Telomerprotektion .....	22
1.5 Zielsetzung.....	24
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>25</b>
2.1 Reagenzien und Instrumente .....	25
2.1.1 DNA Extraktion .....	25
2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	25
2.1.3 Primer .....	25
2.1.4 Agarose Gelelektrophorese.....	27
2.1.5 Aufreinigung des PCR-Produktes.....	27
2.1.6 Cycle Sequencing-Reaktion (CSR) .....	28
2.1.7 Aufreinigung des CSR-Produktes.....	28
2.1.8 DNA-Sequenzierung.....	28

---

2.2	Patientenproben.....	28
2.3	Therapie.....	29
2.4	Methoden zur Analyse der <i>RAD21</i> - Genmutationen .....	30
2.4.1	Materialgewinnung.....	30
2.4.2	Methodenübersicht .....	30
2.4.3	DNA-Extraktion .....	30
2.4.4	Primertest mittels Gradienten-PCR .....	31
2.4.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	31
2.4.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	32
2.4.7	Aufreinigung der PCR-Produkte .....	32
2.4.8	Cycle Sequencing Reaktion (CSR) .....	33
2.4.9	Aufreinigung des CSR-Produktes.....	33
2.4.10	DNA Sequenzierung.....	34
2.4.11	Auswertung der Sequenzen .....	34
2.4.12	Statistische Analysen .....	35
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>36</b>
3.1	Optimierung der Exonamplifikation aus genomischer DNA.....	36
3.2	Inzidenz der <i>RAD21</i> -Genmutationen .....	37
3.3	Molekulare Charakterisierung der <i>RAD21</i> - Genmutationen .....	45
3.4	Lokalisation der gefundenen Mutationen .....	47
3.5	Assoziation mit anderen Mutationen .....	47
3.6	Korrelation mit klinischen Parametern.....	49
3.7	Beeinflussung des Chemotherapie-Ansprechens .....	53
3.8	Korrelation mit dem klinischen Verlauf .....	54
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>58</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>78</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>99</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>101</b>
<b>9</b>	<b>BISHERIGE VERÖFFENTLICHUNGEN.....</b>	<b>102</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
ALT	„alternative lengthening of telomeres“
AML	Akute myeloische Leukämie
APB	„ALT-associated promyelocytic leukemia body“
APL	Akute Promyelozytenleukämie
AraC	Cytosin-Arabinosid
ARDS	„Acute Respiratory Distress Syndrome“
ARF	„Alternate Reading Frame“
ASXL1	„Additional sex combs like transcriptional regulator 1“
ATM	Serin-Proteinkinase ATM
ATO	Arsentrioxid
ATRA	All-trans-Retinsäure
BCRA1+2	„BRCA1 and BRCA2“
BMI1	„Polycomb complex protein BMI-1“
BRIP1	„BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1“
ZIP	Leucin-Zipper-Domäne
CALGB	„Cancer and Leukemia Group B“
CBF	„Core-binding factor“
CBFB	„Core-binding factor subunit beta“
CD	„Cluster of differentiation“ (Zelloberflächen-Marker)
CDH1	Cadherin-1
CDH24	Cadherin-24
CEBPA	„CCAAT/enhancer binding protein alpha“
CGH	„high density comparative genomic hybridization“
CHEK2	„Checkpoint Kinase 2“
ChIP-Seq	„Chromatin ImmunoPrecipitation with massively parallel DNA sequencing“
c-KIT	Tyrosine-Protein Kinase Kit
CR	„Complete remission“ / komplette Remission
DEK	DEK Oncogen
del	Deletion

---

DNA	„Deoxyribonucleic Acid“
DNMT3A	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A
EBI2	„Epstein-Barr virus-induced G-protein coupled receptor 2“
ESRRB	„Estrogen-Related Receptor Beta“
EVI1	„Ecotropic Viral Integration Site 1“
EZH2	„Histone-lysine N-methyltransferase 2“
ESC	Embryonale Stammzellen
FAB	„French-American-British“ (Klassifikation)
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
FLT3	„Fms-Related Tyrosine Kinase 3“
GIMEMA	Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto
GO	Gemtuzumab-Ozogamicin
GPR123	„G Protein-Coupled Receptor 123“
GRINL1B	„Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-like 1B“
HLA	„Human Leukocyte Antigen / humanes Leukozytenantigen“
HR	homologe Rekombination
HSC	hämatopoetische Stammzelle
HSCT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
prä-HSC	präleukämische hämatopoetische Stammzelle
HUS1	„Checkpoint protein HUS1“
Ida	Idarubicin
IDH1/2	„Isocitrate dehydrogenase 1/2“
IFNG	Interferon, Gamma
inv	Inversion
ISWI	„Chromatin-remodeling complex ATPase chain ISWI“
ITD	interne Tandemduplikation
KLF4	„Kruppel-like factor 4“
KNDC1	„Kinase Non-Catalytic C-Lobe Domain Containing 1“
LDH	Laktatdehydrogenase
MDM2	„Mouse Double Minute 2 Oncogene, E3 Ubiquitin Protein Ligase“
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MKL1	Megakaryoblastische Leukämie mit Translokation 1
MLL	„Mixed-Lineage Leukemia“
MLLT3	„Mixed-Lineage Leukemia mit Tanslokation Chromosom 3“

---

MRD	„minimal residual disease“
MYH	„Myosin, Heavy Chain 1, Skeletal Muscle, Adult“
NANOG	„Homeobox Transcription Factor Nanog“
NGS	„next generation sequencing“
NIPBL	Nipped-B Homolog
CN-AML	Akute myeloische Leukämie mit zytogenetisch normalem Karyotyp
NPM1	„Nucleophosmin 1“
NUP214	nucleoporin 214 kiloDalton
NuRD	„Nucleosome Remodeling Deacetylase“
OCT4	„octamer-binding transcription factor 4“
P53	Tumor Protein P53
PALB2	„Partner and localizer of BRCA2“
PCLKC	Protocadherin-24
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE-Ca.	Plattenepithelkarzinom
PML	„Promyelocytic Leukemia“
PTEN	„Phosphatase and tensin homolog“
PTPRT	„Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, T“
PU1	„Transcription factor PU1“
RARA	„retinoic acid receptor-alpha“
RAS	„Rat sarcoma Proto-Onkogen“
RBM15	„RNA Binding Motif Protein 15“
RNA	„Ribonucleic acid“
RPN1	„Ribophorin I“
RUNX	„Runt-related transcription factor“
SCC	„Sister-Chromatid Cohesion“
SLC15A1	„Solute Carrier Family 15 (Oligopeptide Transporter), Member 1“
SMC	„Structural Maintenance of Chromosome“
SNP	„single nucleotide polymorphism“
SOX2	„SRY(sex determining region Y)-box 2“
STAG1+2	„Stromal Antigen 1+2“
STK11	„Serine/Threonine Kinase 11“
t	Translokation

---

t-AML	therapieassoziierte akute myeloische Leukämie
TET2	Tet Methylcytosine Dioxygenase 2
TRF	Transferrin
WAPL	„Wings Apart-Like Homolog“
WGS	„Whole-genome Sequenzierung“
WHO	„World Health Organisation“
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem



# 1 Einleitung

## 1.1 Akute myeloische Leukämie (AML)

### 1.1.1 Definition

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine heterogene maligne Erkrankung hämatopoetischer Stammzellen. Charakteristisch für die AML ist die klonale Ausbreitung von unreifen Zellen des myeloischen Systems in Knochenmark, Blut und anderen Organen. Die betroffenen Zellen unterliegen einer gestörten Differenzierung, unkontrollierter Proliferation, werden in verschiedenen Stadien ihrer Reifung unterbrochen und sind üblicherweise gegenüber programmiertem Zelltod resistent [80].

### 1.1.2 Epidemiologie

Die Inzidenz der AML liegt bei ca. 3,8 Fällen / 100000 Einwohner im Jahr. In Deutschland liegt die geschätzte Zahl an Neuerkrankungen pro Jahr bei 3597 [50]. Die Krankheit tritt gehäuft im höheren Lebensalter auf. Laut Krebsregisterdaten (Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) Cancer Statistics Review 1975-2009) bewegt sich das mediane Alter eines AML-Patienten bei Diagnosestellung in einem Zeitraum zwischen 66 und 71 Jahren [59, 120]. Bei Patienten > 65 Jahren liegt eine Häufigkeit von bis zu 17,9 Erkrankungen / 100000 Einwohner vor [35]. In den kommenden Jahren ist auf Grund der steigenden Lebenserwartung und einer besseren Registrierung von Leukämie-Patienten ein Anstieg der Gesamtinzidenz zu erwarten.

### 1.1.3 Ätiologie

Die konkreten Ursachen für die Entstehung einer AML sind bis heute noch nicht restlos geklärt. In mehreren Studien wurden eindeutige Risikofaktoren festgestellt, welche die Wahrscheinlichkeit für eine maligne Transformation von

myelo-poetischen Zellen beeinflussen können. Ein erhöhtes Erkrankungsrisiko besteht bei Exposition mit Benzol und ionisierender Strahlung. Eine starke Benzol-Exposition stellt das Rauchen dar. Bei Rauchern ist daher ein 1.2- bis 2.3-facher Anstieg der Inzidenz zu verzeichnen [61]. Beispiele für erhöhte Inzidenzen nach Einwirkung ionisierender Strahlung liefern Überlebende des Atombombenangriffs von Hiroshima und Nagasaki [92]. Einen weiteren Risikofaktor stellt die Behandlung mit Chemotherapeutika und Zytostatika wie zum Beispiel Alkylantien und Topoisomerasehemmstoffen dar. 10-15% aller AML Patienten entwickeln so die Erkrankung sekundär, also im Anschluss an die Behandlung einer vorhergehenden Tumorerkrankung [133].

#### **1.1.4 Klinische Präsentation**

Bei einer AML liegt oft ein unspezifisches Beschwerdebild und, im Gegensatz zu den chronischen Leukämien, ein kurzer schwerer Krankheitsverlauf vor. In 40% der Fälle beträgt die Dauer der Anamnese weniger als einen Monat [63]. Leukämische Blasten verursachen eine Verdrängung der physiologischen Hämatopoese aus dem Knochenmark und daraus folgend eine Anämie, eine Granulozyto- und eine Thrombozytopenie. Als Hauptsymptome sind deshalb Abgeschlagenheit mit Schwächegefühl, Blässe, grippeähnliche Beschwerden mit Fieber und Infekte der oberen Atemwege und der Harnwege zu nennen. Durch die verringerte Anzahl an Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren und oft gesteigerter Fibrinolyseaktivität kommt es bei den Patienten zu einer erhöhten Blutungsneigung. Es kann zu mukokutanen Blutungen am Zahnfleisch, Epistaxis, Ekchymosen und Petechien kommen. Eine erhöhte Nachblutungszeit nach einer zahnärztlichen Behandlung ist oft ein erstes manifestes Symptom.

#### **1.1.5 Diagnostik und Klassifikation**

Für die Wahl einer geeigneten Behandlung ist eine präzise Diagnosestellung und Klassifikation essentiell. Moderne zytogenetische, immunologische sowie molekulargenetische Verfahren ergänzen und ersetzen zunehmend ältere Einteilungskriterien wie die Zyto- und Histomorphologie [75]. Die Bestimmung des Blastenanteils im Knochenmark und ihre Differenzierung im Bezug zur

myeloischen Reihe spielen ebenfalls eine maßgebliche Rolle. Eine exakte Diagnose, und damit die Möglichkeit jedem Patienten eine spezifische und optimale Therapie zukommen zu lassen, ist nur durch großen labortechnischen Aufwand möglich [64].

Die bis 1999 am weitesten verbreitete Einteilung der AML ist die French-American-British-Klassifikation (FAB), welche auf dem Differenzierungsgrad und hauptsächlich morphologischen Gesichtspunkten beruht [10]. Die FAB-Subtypen M1-M7 werden hierbei im histologischen Bild des Knochenmarks durch mikroskopische Beurteilung der leukämischen Zellen unterschieden. Histo- und immunhistochemische Färbungen sowie bestimmte genetische Aberrationen geben weitere Anhaltspunkte für die Charakterisierung (Tabelle 1).

Tab.1: French-American-British (FAB) Klassifikation der AML  
(nach [75])

Kategorie	Morphologie	Häufigkeit (in %)
M0	Akute myeloblastische Leukämie mit minimaler Differenzierung	3
M1	Akute unreife Myeloblastenleukämie	15-20
M2	Akute reife Myeloblastenleukämie	25-30
M3	Akute Promyelozytenleukämie (APL)	5-10
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	20
M4eo	Akute myelomonozytäre Leukämie (mit anormalen Eosinophilen)	5-10
M5	Akute Monozytenleukämie	2-9
M6	Erythrozytenleukämie	3-5
M7	Akute megakaryozytäre Leukämie	3-12

Die neuere und heutzutage gebräuchliche World Health Organisation (WHO)-Klassifikation wurde entwickelt, um alte hauptsächlich morphologische Einteilungskriterien auf Basis zugrunde liegender zytogenetischer und molekularer Veränderungen mit neueren Erkenntnissen bezüglich Ätiologie, Pathogenese, Klinik und Prognose zu verknüpfen [27, 64] (Tabelle 2).

Als etablierte diagnostische und prognostische Marker gelten wiederholt auftretende strukturelle Veränderungen auf chromosomaler Ebene [z.B. t(15; 17), t(8; 21), inv(16), t(9; 21), t(9; 11), del(5), del(7), usw.]. Bei AML Fällen mit zytogenetisch normalem Karyotyp („cytogenetically normal karyotype“, CN-AML) wurden mithilfe hochauflösender Sequenzierungsmethoden wiederkehrende strukturelle Abweichungen wie Mikrodeletionen und uniparentale Disomien gefunden. Dies führt zu der Annahme, dass genetische Abweichungen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung einer Leukämie spielen [11]. Für diese genetischen Veränderungen wird eine bevorzugte Lokalisation in Genen angenommen, welche für die Proliferation und das Überleben von hämatopoetischen Progenitorzellen essentiell sind [15, 139, 154]. Durch gezielte Sequenzierungsverfahren wurden mehrere Mutationen mit diagnostischer und prognostischer Relevanz in den Genen *FLT3* (Fms-related tyrosine kinase 3), *NPM1* (Nucleophosmin 1), *KIT* (Tyrosine-protein kinase Kit), *CEBPA* (CCAAT/enhancer-binding protein alpha) und *TET2* (Tet methylcytosine dioxygenase 2) entdeckt [6, 138]. Die Möglichkeiten der Hochdurchsatzsequenzierungsmethoden führten zur Entdeckung weiterer wiederholt auftretender Mutationen in Genen wie *DNMT3A* [DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A] [70] und *IDH1* (Isocitrate dehydrogenase 1) [78]. Trotz der bisherigen Bemühungen zeigen über 25% der AML Patienten keine Mutationen in den leukämieassoziierten Genen [125] und die Einschätzung von häufigen Mutationen bezüglich ihrer Konsequenzen auf molekularer Ebene (Driver- oder Passenger-Mutationen) bleibt eine Herausforderung [158].

Tab. 2: Aktuelle WHO-Klassifikation der AML (nach [121])

**Erläuterungen:**

Für die Diagnose AML muss ein Knochenmarkblastengehalt von  $\geq 20\%$  vorliegen; Ausnahmen sind das Vorliegen der balancierten Translokationen t(15;17), t(8;21), inv(16) oder t(16;16) und spezielle Formen der Erythroleukämie.

<sup>1</sup> Andere rekurrente chromosomale Translokationen mit Einbeziehung von **RARA** sollten ebenfalls berichtet werden: t(11;17)(q23;q12)/**ZBTB16-RARA**; t(11;17)(q13;q12); **NUMA1-RARA**; t(5;17)(q35;q12); **NPM1-RARA**; **STAT5B-RARA**.

<sup>2</sup> Andere Translokationen mit Einbeziehung von **MLL** sollten berichtet werden: t(6;11)(q27;q23); **MLLT4-MLL**; t(11;19)(q23;p13.3); **MLL-MLLT1**; t(11;19)(q23;p13.1); **MLL-ELL**; t(10;11)(p12;q23); **MLLT10-MLL**.

<sup>3</sup>  $>20\%$  Blasten im Blut oder Knochenmark und mindestens eine der folgenden Charakteristika: vorangegangenes myelodysplastisches Syndrom oder myelodysplastisches/myeloproliferatives Syndrom; myelodysplasiassoziierte zytogenetische Veränderungen; multilineäre Dysplasie; keine vorangegangene Chemo-/Strahlentherapie; definierte zytogenetische Veränderungen der MDS-assoziierten AML:- komplexer Karyotyp ( $\geq 3$  Veränderungen);- nichtbalancierte Veränderungen: -7 oder del(7q); -5 oder del(5q); i(17q) oder t(17p); -13 oder del(13q); del(11q); del(12p) oder t(12p); del(9q); idic(X)(q13);- balancierte Veränderungen: t(11;16)(q23;p13.3); t(3;21)(q26.2;q22.1); t(1;3)(p36.3;q21.1); t(2;11)(p21;q23); t(5;12)(q33;p12); t(5;7)(q33;q11.2); t(5;17)(q33;p13); t(5;10)(q33;q21); t(3;5)(q25;q34).

<sup>4</sup> Zytotoxische Substanzen: Alkylanzien, Topoisomerase-II-Inhibitoren und andere.

<sup>5</sup> Die **BCR-ABL1**-positive Leukämie kann sich klinisch als Leukämie mit gemischtem Phänotyp präsentieren, sollte aber als **BCR-ABL1**-positive ALL behandelt werden.

**AML** Akute myeloische Leukämie; **APL** akute Promyelozytenleukämie; **NOS** nicht anderweitig spezifiziert.

<b>AML mit rekurrenten genetischen Veränderungen</b>	AML mit t(8;21)(q22;q22); <b>RUNX1-RUNX1T1</b>
	AML mit inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <b>CBFB-MYH11</b>
	APL mit t(15;17)(q22;q12); <b>PML-RARA</b> <sup>1</sup>
	AML mit t(9;11)(p22;q23); <b>MLLT3-MLL</b> <sup>2</sup>
	AML mit t(6;9)(p23;q34); <b>DEK-NUP214</b>
	AML mit inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); <b>RPN1-EVI1</b>
	AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13;q13); <b>RBM15-MKL1</b>
	Provisorische Entität: AML mit mutiertem <b>NPM1</b>
	Provisorische Entität: AML mit mutiertem <b>CEBPA</b>
<b>AML mit myelodysplasiassoziierten Veränderungen<sup>3</sup></b>	

Fortsetzung Tab. 2 auf Seite 6

Fortsetzung Tab. 2 von Seite 5

<b>Therapieassoziierte myeloische Neoplasien<sup>4</sup></b>	
AML, NOS	AML mit minimaler Differenzierung
	AML ohne Ausreifung
	AML mit Ausreifung
	Akute myelomonozytäre Leukämie
	Akute monoblastische/monozytäre Leukämie
	Akute erythrozytäre Leukämie
	Reine erythroide Leukämie
	Erythroleukämie, erythroid/myeloid
	Akute megakaryoblastische Leukämie
	Akute Basophilenleukämie
	Akute Panmyelose mit Myelofibrose (Synonyme: akute Myelofibrose, akute Myelosklerose)
	<b>Myeloides Sarkom (Synonyme: extramedullärer myeloischer Tumor, granulozytisches Sarkom, Chlorom)</b>
<b>Myeloische Proliferation assoziiert mit Down-Syndrom</b>	Transiente abnormale Myelopoese (Synonym: transiente myeloproliferative Erkrankung)
	Myeloische Leukämie assoziiert mit Down-Syndrom
<b>Blastische plasmazytoide dendritische Zellneoplasien</b>	
<b>Akute Leukämien unklarer Linienzugehörigkeit</b>	Akute undifferenzierte Leukämie
	Akute Leukämie, gemischter Phänotyp, mit t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL</i> 1 <sup>5</sup>
	Akute Leukämie, gemischter Phänotyp, mit t(v;11q23); MLL rearrangiert
	Akute Leukämie, gemischter Phänotyp, B/myeloid, NOS
	Akute Leukämie, gemischter Phänotyp, T/myeloid, NOS
	Provisorische Entität: Natural-killer(NK)-zelllymphoblastische Leukämie/Lymphom

### 1.1.6 Prognosefaktoren

Bei der Prognose einer AML sind sowohl klinische, als auch zytogenetische Faktoren von Bedeutung. Ungünstige klinische Prognosefaktoren sind ein hohes Alter der Patienten (>60), ein Befall des Zentralen Nervensystems (ZNS), eine schwere Erkrankung bei Diagnosestellung, eine erhöhte Zahl an weißen Blutkörperchen, das Vorliegen einer therapieassoziierten AML oder einer vorangegangenen hämatologischen Erkrankung wie z.B. eines myelodysplastischen Syndroms (MDS) [75]. Den zytogenetischen Risikofaktoren wird hinsichtlich der Prognose die größte Bedeutung zugeschrieben [16, 33]. Die verschiedenen zytogenetischen Variationen lassen sich prognostisch in drei Risikogruppen unterteilen [27, 74].

Als wichtiger prognostischer Faktor für Überleben und Heilung wird das Erreichen einer kompletten Remission (CR) nach Induktionstherapie angesehen [63]. Die verschiedenen prognostischen Gruppen zeigen deutliche Differenzen bezüglich der CR-Raten. Diese reichen von 80-95% für die Gruppe mit niedrigem Risiko, bis zu 31% für Träger einer *inv(3)*, welche zur ungünstigen Risikogruppe gehören [76]. Falls durch die Induktionstherapie keine CR erreicht werden kann steigt die Wahrscheinlichkeit innerhalb eines Jahres an AML zu versterben auf 75% [119]. Die aktuelle Risikostratifizierung wurde von einem internationalen Expertengremium definiert und ist in Tabelle 3 dargestellt [27].

Die Gruppe mit der besten Prognose und günstigen Aberrationen beinhaltet Core-Binding-Factor Leukämien und die Promyelozyten Leukämie. Bei der Promyelozytenleukämie kommt es zu einer transkriptionell unterdrückten Differenzierungs-Blockade und somit zu einer gestörten Zellreifung der Promyelozyten. [102] Core Binding Faktoren (CBF) sind heterodimere Transkriptionsfaktoren welche teilweise Kontrollfunktionen bei der Blutbildung übernehmen. Zu den sogenannten CBF-AML zählen solche mit einer Translokation *t(8;21)(q22;q22)* und einer *inv(16)(p13.1;q22)* bzw. *t(16;16)(p13.1;q22)* [73]. Speziell für Patienten, welche mittels hochdosiertem Cytarabin behandelt wurden, konnten bei Vorliegen einer CBF-AML bessere Behandlungsergebnisse bezüglich der CR-Rate erreicht werden [13].

Das Vorliegen einer *NPM1*- ohne *FLT3*-ITD-Mutation und das Vorliegen einer *CEBPA*-Mutation sind ebenfalls mit einer günstigen Prognose assoziiert. Diese

sind die einzigen molekularen Marker, welche derzeit auch für die klinische Praxis relevant sind [121].

Die schlechteste Prognose haben Patienten mit komplexen Karyotypen (mindestens 3 Aberrationen ohne Vorliegen einer AML-assoziierten rekurrenten genetischen Veränderung). Hier ist eine Rezidivrate von ca. 75% zu verzeichnen und nur bei 10% aller Patienten wurde eine anhaltende Remission nach 5 Jahren erreicht [27].

Ein mittleres Rezidivrisiko haben Patienten mit zytogenetisch normalem Karyotyp. Diese bilden zahlenmäßig die größte der drei Gruppen und ihre CR- und Überlebensrate ist besser als bei Patienten mit komplexem Karyotyp aber schlechter als bei den prognostisch „günstigen“ Aberrationen [88].

Die große Gruppe der AML mit zytogenetisch normalem Karyotyp macht 45% aller akuten myeloischen Leukämien aus und weist keine mikroskopisch nachweisbaren chromosomalen Veränderungen auf [37]. Jedoch können mittels neuerer Verfahren wie SNP-Chips und NGS bei einem Großteil dieser Patienten submikroskopische Veränderungen nachgewiesen werden. Da hier häufig ein stark heterogener klinischer Verlauf vorliegt [12], wird versucht auf molekulargenetischer Ebene Biomarker zu finden, welche eine weitere Verbesserung der risikoadaptierten Therapiestrategie ermöglichen.



Tab. 3: Risikostratifizierung der AML bezüglich zyto- und molekulargenetischen Veränderungen<sup>1</sup> (nach [121])

**Erläuterungen:**

<sup>1</sup> Häufigkeit, Ansprechraten und Überlebensdaten sollten entsprechend den genetischen Subgruppen berichtet werden.

<sup>2</sup> Beinhaltet alle akuten myeloischen Leukämien mit zytogenetisch normalem Karyotyp; ausgenommen sind Formen mit günstigem Risiko.

<sup>3</sup> Für die meisten dieser Veränderungen liegen zu kleine Fallzahlen vor, um belastbare Aussagen zur Prognose machen zu können.

<sup>4</sup> ≥3 Veränderungen in der Abwesenheit der balancierten Veränderungen t(15;17), t(8;21), inv(16) oder t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23), t(6;9), inv(3) oder t(3;3). **ITD** Interne Tandemduplikation.

Günstig	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
	Mutiertes <i>NPM1</i> ohne <i>FLT3-ITD</i> (normaler Karyotyp)
	Mutiertes <i>CEBPA</i> (normaler Karyotyp)
Intermediär I <sup>2</sup>	Mutiertes <i>NPM1</i> und <i>FLT3-ITD</i> (normaler Karyotyp)
	Wildtyp- <i>NPM1</i> und <i>FLT3-ITD</i> (normaler Karyotyp)
	Wildtyp- <i>NPM1</i> ohne <i>FLT3-ITD</i> (normaler Karyotyp)
Intermediär II	t(9;11)(p22;q23); <i>MLL3-MLL</i>
	Chromosomale Veränderungen nicht als günstig oder ungünstig klassifiziert <sup>3</sup>
Ungünstig	inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i>
	t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
	t(v;11)(v;q23); <i>MLL</i> rearrangiert
	-5 oder del(5q); -7; abnl(17p); komplexer Karyotyp <sup>4</sup>

### 1.1.7 Therapie

Die Standardbehandlung einer akuten myeloischen Leukämie beruht seit über 30 Jahren auf einer Kombination aus Cytosin-Arabinosid und einem Anthrazyklin. Diese Therapieoption durch Hinzunahme neuer Medikamente weiter zu verbessern ist derzeit Gegenstand vieler Studien. Die Behandlung eines AML-Patienten innerhalb einer solchen Studie stellt sicher, dass Patienten basierend auf ihrem individuellen Risikomuster, der jeweils besten und aktuellen Therapieoption zugeführt werden. Die verschiedenen Studien unterscheiden sich beim zeitlichen Ablauf, den eingesetzten Chemotherapeutika und ggf. der

Integration einer allogenen Knochenmark- oder peripheren Blutstammzelltransplantation [63].

Allgemein gliedert sich die Behandlung einer AML in zwei Abschnitte. Im ersten Abschnitt, der Induktionstherapie, soll eine CR erreicht werden. Angestrebt wird hierbei ein Blastenanteil im Knochenmark von unter 5%, eine Neutrophilenzahl größer als 1000/ $\mu$ l und eine Thrombozytenzahl von mehr als 100.000/ $\mu$ l. Nur auf Basis einer kompletten Remission kann eine Heilung oder zumindest eine verlängerte Überlebenszeit erreicht werden. Die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs sinkt nach 3 Jahren auf unter 10% [33]. Als Therapieschema für die Standardinduktionstherapie wird seit Jahren das „3+7“- Programm eingesetzt, bei dem für einen Zeitraum von 7 Tagen ein Cytosin-Arabinosid (AraC) und für 3 Tage eines von drei Anthrazyklinen (Daunorubicin, Mitoxantrone, Idarubicin) verabreicht werden. Die Wahl des Anthrazyklins spielt keine Rolle bezüglich der CR-Rate [114].

Im Anschluss an die Induktionstherapie mit kompletter Remission (CR) folgt der zweite Abschnitt der Behandlung, welcher in die Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie aufgegliedert wird. Das Ziel ist hierbei das Aufrechterhalten der Remission. Nach einer CR können einzelne, nicht lichtmikroskopisch nachweisbare Leukämiezellen persistieren. Dieser Zustand wird als minimale Resterkrankung (MRD) bezeichnet. Die Konsolidierung dient der vollständigen Elimination der MRD und führt damit zu einem signifikant längeren Überleben [63]. Für die übliche Konsolidierungstherapie werden mehrere Zyklen hochdosiertes AraC verabreicht [81]. Je nach Rezidivrisiko und Alter des Patienten wird die Chemotherapie in unterschiedlicher Intensität verabreicht. Für Patienten mit mittlerem bis hohem Rezidivrisiko kommt als intensivste Variante bei vorhandenem HLA-identischen Spender auch eine allogene Stammzelltransplantation ergänzend oder alternativ zur Chemotherapie in Frage. Die klinische Erfolgsrate für eine Heilung nach einer Standardtherapie liegt bei 40-45% für Patienten mit einem Lebensalter zwischen 18 und 60 Jahren und sinkt auf 15-20% für über 60-jährige Patienten [58].

Bei der Wahl der passenden und risikoadaptierten Behandlung zeigt sich insgesamt eine Entwicklung hin zu einer subtypspezifischen Therapiestrategie unter Berücksichtigung von zyto- und molekulargenetischen Besonderheiten [17, 126, 132]. Besonders das hohe mediane Erkrankungsalter von über 66 Jahren

und die damit verbundenen Komorbiditäten bedingen die Entwicklung neuer Therapieansätze, welche sich stärker an der molekularen Pathogenese orientieren und auch für Patienten geeignet sind, die für eine intensive Standardtherapie nicht infrage kommen. Diese molekularen Therapieansätze greifen an verschiedenen Mechanismen in der Pathogenese an.

Es eignet sich hierfür zum einen die pharmakologische Beeinflussung von mutierten oder deregulierten molekularen Zielstrukturen, sog. „Targets“, des Weiteren eine Inhibition von überaktivierten Signalwegen oder zellzyklusaktivierten Proteinen, die Einflussnahme auf epigenetische Regulationsmechanismen und als weitere Möglichkeit der Einsatz Myelopoese-assoziiierter Antikörper [121]. Durch die Deutsch-Österreichische Akute Myeloische Leukämie Studiengruppe (AMLSG) wurde ein entsprechend genotypspezifisches Therapieportfolio basierend auf einer zeitnahen molekularen Diagnostik der entsprechenden Targets innerhalb eines Zeitraums von 48 Stunden nach Diagnosestellung entwickelt (Abb.1) [121].

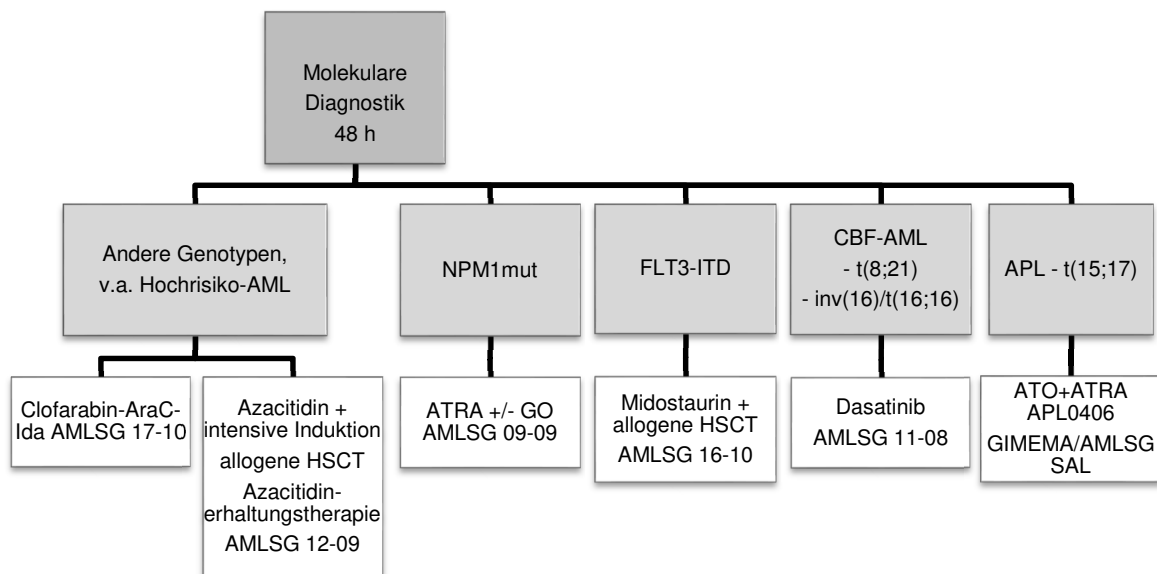


Abb. 1: Genotypadaptierte Therapiestrategie der AML Studiengruppe (AMLSG) (nach [121])

**Erläuterungen:** **AML** Akute myeloische Leukämie; **APL** akute Promyelozytenleukämie; **AraC** Cytarabin; **ATO** Arsenitrioxid; **ATRA** All-trans-Retinsäure; **CBF** „core-binding factor“; **GIMEMA** Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto; **GO** Gemtuzumab-Ozogamicin; **HSCT** hämatopoetische Stammzelltransplantation; **Ida** Idarubicin; **ITD** interne Tandemduplikation

## 1.2 Molekulargenetik

### 1.2.1 Molekulargenetische Analysen

Das Verständnis für die Pathogenese der AML ist Grundlage für neue risikoadaptierte Therapieformen. Molekulargenetische Untersuchungen konnten nicht nur eine große Heterogenität bei leukämischen Blasten von AML Patienten mit zytogenetisch normalem Karyotyp aufzeigen, sondern auch durch die Entdeckung spezifischer molekulargenetischer Veränderungen einen großen Beitrag zum Verständnis der Erkrankung leisten. Ein monokausaler Zusammenhang zwischen der Entstehung einer AML und einem Defekt in einem einzelnen Gen ist unwahrscheinlich. Vielmehr geht man heute von einer multifaktoriellen komplexen Pathogenese und dem Zusammenwirken unterschiedlicher molekulargenetischer Veränderungen aus [39].

Einige molekulare Marker, welche in den letzten Jahren gefunden wurden, stellen nicht nur interessante Prognosefaktoren dar, sondern kommen auch als Angriffspunkte für molekular zielgerichtete Medikamente in Frage. Zu diesen spezifischen Veränderungen gehören z.B. Mutationen in den Genen *FLT3*, *NPM1* und *CEBPA* [87].

### 1.2.2 FMS-like tyrosine kinase-3 (FLT3)

Das *FLT3* Gen ist auf Chromosom 13q12 lokalisiert. Es gehört zur Familie der Klasse III Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und ist damit aus fünf extrazellulären, einer transmembranären, einer juxtamembranären und einer Tyrosinkinasedomäne aufgebaut [42]. Es wird auf der Oberfläche von hämatopoetischen Stammzellen exprimiert und spielt hier eine Rolle für Differenzierung und Überleben dieser Zellen. Eine bereits bekannte Veränderung dieses Gens ist die interne Tandemduplikation (*FLT3-ITD*), welche in der juxtamembranären Domäne oder Tyrosinkinase-Domäne lokalisiert sein kann. Diese ist eine der häufigsten Mutationen der AML und besitzt prognostische Relevanz [74]. Der Verlust der autoinhibitorischen Funktion der juxtamembranären Domäne führt bei *FLT3-ITD* zu einer ligandenunabhängigen Dimerisierung, Autophosphorylierung und Aktivierung des Proteins und daraus folgend zu einer Beeinträchtigung der

Zellproliferation und -differenzierung [39]. Ein Patient mit ITD kann außerdem Träger eines Wildtyp-Allels (WT) sein und damit eine intakte Form der Tyrosinkinase besitzen. Hieraus ergeben sich drei Gruppen mit unterschiedlichen Voraussetzungen: Patienten ohne ITD ( $FLT3^{WT/WT}$ ), heterozygote Träger einer ITD ( $FLT3^{ITD/WT}$ ) und hemizygoter Träger ohne Wildtyp ( $FLT3^{ITD/ITD}$ ). Die beiden Gruppen mit funktionierendem Wildtyp  $FLT3^{WT/WT}$  und  $FLT3^{ITD/WT}$  unterscheiden sich wenig bezüglich der Gesamtüberlebenszeit und dem krankheitsfreien Intervall, während die hemizygoter Gruppe  $FLT3^{ITD/ITD}$  deutlich schlechtere Werte zeigt [160]. In weiteren Studien wurde gezeigt, dass  $FLT3$ -ITD mit einer erhöhten Leukozytenzahl und LDH assoziiert ist und die höchste prognostische Relevanz aufweist [12, 160].

$FLT3$ -Mutationen bieten auf Grund ihrer Häufigkeit und ihrer hohen prognostischen und pathogenen Relevanz einen Erfolg versprechenden pharmakologischen Angriffspunkt. In aktuellen Studien wurde durch die Inhibition der Tyrosinkinaseaktivität im Tiermodell mit Sorafenib in Kombination mit Cytarabin sowohl *in vitro* also auch *in vivo* eine starke anti-AML Wirkung erzielt [54].

### 1.2.3 CCAAT/enhancer-binding protein $\alpha$ (CEBPA)

CEBPA ist ein Transkriptionsfaktor in myelomonocytyären Zellen, welcher eine entscheidende Rolle bei der Granulozytendifferenzierung spielt, und im Rahmen der Granulozytopoese besonders stark exprimiert wird. Bei  $CEBPA$ -Knock-out-Mäusen konnte ein spezifischer Verlust von ausgereiften Granulozyten nachgewiesen werden, während andere hämatopoetische Zelllinien unverändert blieben [143]. Veränderungen des  $CEBPA$ -Gens betreffen entweder das N- oder das C-terminale Ende des Proteins und wurden zunächst in myeloischen Malignomen gezeigt [68]. C-terminale Mutationen führen zu einem reduzierten DNA-Bindungs- und Dimerisationspotential der Leucin-Zipper-Domäne (bZIP), während N-terminale Mutationen eine Überexpression einer dominant-negativen Isoform oder ein verkürztes Protein zur Folge haben. Beide Mutationsarten führen zu einer erheblichen Funktionseinschränkung des Proteins [77]. Neben seiner Rolle bei der Granulozytenreifung hat CEBPA auch eine wichtige Funktion als Regulator der Stammzellaktivität bei der Leukämieentstehung [167]. Ein

defektes oder fehlendes CEBPA führt in hämatopoetischen Stammzellen zu einer verstärkten Expression vom *BMI1*. Dieses Polycomb-Gen hat eine Selbsterhaltungsfunktion in hämatopoetischen und leukämischen Stammzellen [69].

Die Inzidenz von *CEBPA* Mutationen bei AML-Patienten beträgt zwischen 5 und 14% und ist oft mit den FAB-Subtypen M1, M2 und M4 assoziiert [68]. Mutationen in *CEBPA* wurden als eigenständige Subgruppe der CN-AML mit einem prognostisch günstigen Einfluss auf das Gesamtüberleben und die Dauer der CR angesehen [38]. Jedoch wurde in bisherigen Studien nicht zwischen heterozygoten einzelmutierten (*CEBPA*<sup>single-mut</sup>) und doppelmutierten (*CEBPA*<sup>double-mut</sup>) Fällen unterschieden. Laut Wouters et al. 2009 trägt die Großzahl aller AMLs mit *CEBPA* Mutation biallelische Doppelmutationen, während einzeln vorliegende heterozygote Mutationen weniger häufig beobachtet werden. Es wurden sowohl für die prognostische Relevanz, als auch für die Korrelation mit anderen molekularen Markern wie Mutationen in *FLT3*-ITD und *NPM1* bedeutende Unterschiede bezüglich des Vorliegens einer *CEBPA*<sup>single-mut</sup> oder *CEBPA*<sup>double-mut</sup> gefunden. Während sich ein günstiger prognostischer Einfluss nur für *CEBPA*<sup>double-mut</sup> Fälle bestätigte, wurde eine Tendenz zu einem gehäuftem Vorkommen von *FLT3*-ITD-, *FLT3*-TKD- und *NPM1*-Mutationen bei *CEBPA*<sup>single-mut</sup> im Vergleich zu *CEBPA*<sup>double-mut</sup> Fällen gezeigt [162]. Eine Erklärung für die bessere Prognose bei Vorliegen einer Doppelmutation könnte darin bestehen, dass eine einzelne Mutation nicht für die Entstehung einer Leukämie genügt, und in Folge dessen mit weiteren, die Prognose verschlechternden, Mutationen gemeinsam auftreten muss [162].

#### 1.2.4 Nucleophosmin (NPM1)

Das Shuttleprotein Nucleophosmin (NPM1) ist vorwiegend im Zellkern lokalisiert und bewerkstelligt dort den Transport von ribosomalen Proteinen durch die Zellkernmembran [31]. Außerdem ist NPM1 an der Regulation des ARF-p53 Tumorsuppressor-Signalweges beteiligt [34]. Mit einer Inzidenz von 50-60% sind *NPM1*-Mutationen die häufigsten Mutationen bei CN-AML Patienten. Eine Störung im *NPM1*-Gen wird meistens durch Mutation und selten durch Translokation ausgelöst, und führt über Veränderungen am C-Terminus und ein

gesteigertes Exportverhalten zu einer Verlagerung ins Zytoplasma. Die hieraus resultierende Konzentrations- und Funktionsminderung im Zellkern kann zu einer Beeinträchtigung des TP53-Tumorsuppressor-Signalweges führen [150, 161]. Es scheint oft eine gemeinsame Häufung von *NPM1*-Mutationen und *FLT3*-ITD vorzuliegen, was eine funktionelle Kopplung der beiden Marker wahrscheinlich macht [34]. Bei nicht vorhandener *FLT3*-ITD ist eine Mutation von *NPM1* als prognostisch günstiger Faktor anzusehen, da sie mit einer positiven Remissions- und einer höheren Gesamtüberlebensrate assoziiert ist [28].

### **1.3 Verbesserte molekulare Charakterisierung der AML durch Hochdurchsatz-Sequenzierungs-Verfahren**

Die in dieser Arbeit für die Validierung der NGS-Ergebnisse verwendete Methode der Sequenzierung nach Sanger wird als sogenannte „First-Generation“ Sequenzierungsmethode bezeichnet und führte zu vielen Erkenntnissen wie z.B. der Entschlüsselung des menschlichen Genoms im Rahmen des Human Genome Project [52]. Der Bedarf nach größeren Mengen an Sequenzierungsdaten in kürzerer Zeit führte im letzten Jahrzehnt zur Entwicklung neuer Technologien, welche die Methodik der Kettenabbruch-Synthese nach Sanger verlassen. Diese neuen Technologien werden als „Next Generation Sequencing“ (NGS) bezeichnet. Grundsätzlich werden hierbei Millionen kurzer Teilstücke (50-150 Basen) eines Genoms gleichzeitig und parallel sequenziert und danach einem humanen Referenzgenom zugeordnet, um so ein Bild über vorhandene genetische Abweichungen zu gewinnen [83]. Ältere Methoden zur Untersuchung von Krebsgenomen beschränken sich auf die gezielte Sequenzierung und Detektion bestimmter struktureller Variationen die bereits eine bekannte Rolle in der Krebsentstehung spielen und die sich als diagnostische und prognostische Marker bewährt haben. Bei fast 50% aller AML Fälle liegt jedoch ein zytogenetisch normaler Karyotyp vor. Hier bieten genomweite Untersuchungen eine Möglichkeit nach Mutationen zu suchen und deren Zusammenhang zu verstehen [159]. Die ersten vier Genome von AML Patienten, die mittels NGS entschlüsselt wurden, waren zwei Fälle einer FAB M1-AML [71, 78], ein Fall einer FAB M3-AML [159] und ein Fall einer therapieinduzierten AML mit komplexem Karyotyp [72].

In einer ersten Studie von Ley et al. [71] wurde mittels NGS die genomische DNA von Tumor- und normalen Hautzellen untersucht. Die Zellen stammten von einer Patientin mit einer typischen AML vom Subtyp M1 mit normaler Zytogenetik. Das diploide Tumorgenom enthielt 10 möglicherweise relevante, nicht-synonyme somatische Mutationen. Die gefundenen Mutationen umfassten unter Anderem



zwei bereits bekannte AML assoziierte Veränderungen im *NPM1*- und *FLT3*-Gen [62]. Weiterhin konnten 8 bis dahin unbekannte Mutationen entdeckt werden. Vier dieser neuen Mutationen betrafen Gene, welche stark mit der Krebspathogenese verbunden sind (*PTPRT*, *CDH24*, *PCLKC* und *SLC15A1*). Die restlichen vier Mutationen (in *KNDC1*, *GPR123*, *EBI2* und *GRINL1B*) traten in Genen auf, denen bis zu diesem Zeitpunkt noch keine Rolle in der Pathogenese der AML zugeschrieben wurde, deren Funktion in metabolischen Stoffwechselwegen jedoch eine Beteiligung an der Krebsentstehung möglich erscheinen lässt.

Mardis et al. 2009 beschreiben die Verwendung von NGS zur Entdeckung von zuvor unbekanntem rekurrenten Veränderungen in einem Krebsgenom mit einer Gesamtzahl von ca. 10-12 somatischen Mutationen im kodierenden Teil eines AML-Genoms. Es konnten Mutationen in Genen wie *NRAS* und *IDH1* gefunden werden, die wahrscheinlich nicht zufällig vorliegen, sondern eine Rolle in der Pathogenese spielen [78]. Da für einen großen Teil von den in dieser Studie gefunden somatischen Veränderungen keine eindeutige Differenzierung zwischen einer Pathogenese-relevanten Driver-Mutation oder einer zufälligen Hintergrundmutation möglich war, sind weitere funktionelle Validierungen nötig. Diese Erkenntnisse zeigen Möglichkeiten des WGS bezüglich der Entdeckung neuer somatischer Mutationen in Krebsgenomen, welche einerseits zur Krebsentstehung beitragen, aber andererseits durch gezielte Sequenzierung von bekannten Driver-Mutationen nicht entdeckt würden. Gleichzeitig wird die Notwendigkeit deutlich, noch hunderte weitere AML Genome zu sequenzieren, um die Relevanz der gefundenen Mutationen für die Pathogenese einschätzen zu können.

Ley et al. 2010 konnten durch eine erneute Analyse des bereits 2008 sequenzierten AML-Genoms Mutationen im DNA methyltransferase-3- $\alpha$  (*DNMT3A*) Gen identifizieren, welche bei Patienten mit mittlerem zytogenetischen Risiko eine hohe Inzidenz und damit prognostische Relevanz zeigten [70]. *DNMT3A* hat die *de novo* Methylierung und die Erhaltung von bereits methylierten DNA-Bereichen zur Funktion und spielt damit eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Genregulation [163]. Durch Validierung mittels Sanger Sequenzierung wurden Veränderungen von *DNMT3A* in 62 von insgesamt 281 (22%) untersuchten AML-DNA-Proben ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass *DNMT3A*-Mutationen ähnlich wie *NPM1*-, *IDH1*- und *IDH2*-Mutationen nicht in

Verbindung mit den klassischen und prognostisch günstigen AML-Translokationen t(15;17), t(8;21), und inv(16) vorkommen. Dennoch war eine Assoziation dieser Genveränderungen untereinander und mit *FLT3*-Mutationen feststellbar. Die Entdeckung der *DNMT3A*-Mutationen zusammen mit anderen molekulargenetischen Markern wie *FLT3*, *NPM1*, *IDH1*, und *IDH2* macht die strikte Trennung von Patienten mit mittlerem Rezidiv-Risiko und solchen mit einer schlechteren Prognose erst möglich. *DNMT3A*-Mutationen sind unabhängig vom Alter und der zytogenetischen Einteilung insgesamt mit schlechten klinischen Ergebnissen verbunden, während das Vorhandensein einer *FLT3*-ITD eine noch schlechtere Prognose mit sich bringt. Bis jetzt ist die *DNMT3A*-Mutation die häufigste genetische Veränderung welche bei AML mittels NGS-Technologie neu gefunden werden konnte [112].

Eine Veränderung des Zellstoffwechsels wurde schon früher als Ursache für onkogene Veränderungen diskutiert [124]. Eine solche Veränderung des Zellmetabolismus kann durch einen Defekt der Isozitat Dehydrogenasen (*IDH*) verursacht werden [23]. Diese Enzyme werden durch die *IDH1*- und *IDH2*-Gene kodiert und ihre Funktion besteht in einer oxidativen Decarboxylierung von Isozitat zu alpha-Ketoglutarat [22]. Von Mardis et al. wurden in einem FAB M1-AML Genom *IDH1*-Mutationen bei 16 Patienten nachgewiesen [78]. *IDH1* und *IDH2* Mutationen wurden in weiteren Studien bei AML Patienten mit einer Häufigkeit zwischen 7% und 16% bestätigt [99, 123]. Mutationen von *IDH1* oder *IDH2* führen zu einem hypermethylierenden Phänotyp mit einer gestörten Differenzierung der Hämatopoese und zu einer Funktionseinschränkung der Methylcytosin Dioxygenase *TET2*, welche eine wichtige Rolle bei der Myelopoese spielt und bei der AML ebenfalls von Mutationen betroffen ist [36].

Durch unsere Arbeitsgruppe wurden im Jahr 2010 mittels hochauflösender SNP Microarrays die Genome von 157 Patienten mit einer CN-AML untersucht, um die Vorteile der Microarray-Technologie für die Entdeckung neuer Kandidatengene und damit für eine verbesserte molekulare Charakterisierung von Patienten mit entsprechendem Karyotyp zu nutzen [15]. Zusammen mit den Daten aus weiteren Arraybasierten Projekten, welche sich mit der Analyse von AML-Patienten mit komplexem Karyotyp befassten [115, 116], wurden 1000

Gene für eine NGS-Analyse ausgewählt, für die auf Grund wiederkehrender genomischer Veränderungen eine mögliche Relevanz bezüglich der Pathogenese einer AML besteht. Diese Kandidatengene wurden gezielt mit Hilfe der Illumina NGS Technologie resequenziert. Neben häufigen Mutationen in Histon-modifizierenden Enzymen und bekannten Kandidaten wie *TET2*, *TET1*, *DNMT3A* und *DNMT1* wurden neue wiederholt auftretende Mutationen in Genen gefunden, welche Transkriptions- und Splice-Vorgänge beeinflussen [29]. Einer der betroffenen Regulatoren, *RAD21*, ist als Teil des Cohesin-Komplexes an vielfältigen Funktionen bezüglich Zellteilung, DNA-Reparatur und Gentranskription beteiligt. Ein tieferes Verständnis über seine Rolle bei der Leukämieentstehung zu gewinnen, stellt eine neue Herausforderung dar.

## 1.4 Der Cohesin-Komplex

### 1.4.1 Definition

Cohesin ist ein Proteinkomplex, welcher für Mitose und Meiose von entscheidender Bedeutung ist. Der Cohesin-Komplex, bestehend aus 4 Untereinheiten SMC1, SMC3, RAD21 und STAG1/STAG2, spielt für eine Vielzahl biologischer Prozesse wie Segregation der Schwesterchromatiden, DNA-Reparatur und Morphologie der Chromosomen eine wichtige Rolle [47, 51, 93, 98, 104]. Die physische Verbindung der verschiedenen DNA-Stränge, welche für diese biologischen Prozesse notwendig ist, wird durch eine ringartige Konformation von Cohesin erklärt, in welche die entsprechenden DNA-Abschnitte eingeschlossen sind [96]. In aktuellen Studien konnten noch weitere Funktionen aufgezeigt werden, welche Cohesin bei der Genregulation einnimmt.

### 1.4.2 Struktur und Rolle von Cohesin bei der Segregation der Schwesterchromatiden

Es werden mehrere Modelle zur Verbindung der Schwesterchromatiden durch den Cohesin-Komplex diskutiert, welche sich in drei Grundstrukturen einteilen lassen: eine Einfachring-, eine Doppelring (Handsellen)- und eine Kettenstruktur.

Im Doppelring-Modell wird jedes Schwesterchromatid durch eines der Heterodimere umfasst. Der Zusammenhalt der Chromatide entsteht wenn RAD21 die beiden SMC Heterodimere während der DNA-Replikation verbindet [131]. Zhang et al. haben die Protein-Protein Wechselwirkungen der Cohesin-Untereinheiten mithilfe verschiedener biochemischer und funktioneller Verfahren untersucht, und haben den Nachweis für ein Handsellen-Modell des Cohesin-Komplexes geliefert, welches aus zwei Ringen besteht. Jeder der Ringe besteht aus jeweils einem Molekül RAD21, SMC1 und SMC3. [166].

Während der Mitose, werden die Schwesterchromatiden über die Bindung von Mikrotubuli an ihr Kinetochor getrennt und zu den beiden Zellpolen transportiert [111]. Während der Pro- und Metaphase der Mitose, wirkt Cohesin als

Gegenspieler der vorzeitigen Trennung der Schwesterchromatiden durch die Mikrotubuli entgegen. Cohesin ermöglicht nicht nur die erforderliche Spannung um die Schwesterchromatiden im Bereich der Äquatorialplatte aufzureihen sondern sorgt möglicherweise auch dafür, dass Mikrotubuli aus entgegengesetzten Polen an die entsprechenden Kinetochor-Paare binden können. Man geht davon aus, dass die Trennung der Schwesterchromatiden während der Anaphase durch den plötzlichen Verlust der Kohäsion zwischen den Kinetochoren und entlang der Chromosomenarme ausgelöst wird [86, 146].

Für Hefen konnte gezeigt werden, dass Cohesin eng an die Chromosomen gebunden bleibt, bis am Übergang zur Anaphase eine Abspaltung durch Separase stattfindet [94]. Dieser Vorgang ermöglicht den Mikrotubuli nachfolgend die Segregation der Schwesterchromatiden in Richtung der entgegengesetzten Zellpole [147]. An temperatursensiblen Cohesin-Mutanten in Hefen konnten für eine Annäherung an die kritische Temperatur eine erhöhte Sterberate, abnormale Mitosen und eine erhöhte Anzahl von Chromosomenverlusten gezeigt werden. [45, 84, 141, 145].

Sonoda et al. beschreiben eine bedingte Inaktivierung von *RAD21* bei DT40 Zellen vom Huhn um die Rolle von *RAD21* bei höheren Eukaryoten *in vivo* zu beurteilen [135]. Es konnte gezeigt werden, dass *RAD21* ein essentielles Protein für die Segregation der Schwesterchromatiden, aber nicht für die Chromosomenkondensation darstellt. Vergrößerte Abstände zwischen Schwesterchromatiden während der Interphase konnten mittels FISH, Giemsa-Färbung und Mikroskopie für *RAD21* defiziente Zellen gezeigt werden. Jedoch blieben bei Abwesenheit von *RAD21* die Schwesterchromatiden in den meisten Zellen benachbart. Dies könnte auf einen weiteren alternativen Mechanismus zur Verbindung der Schwesterchromatiden hinweisen, oder durch geringe Restmengen von *RAD21* verursacht sein, welche nicht durch die verwendeten Tests registriert wurden. Obwohl der Vergleich von *RAD21*<sup>+</sup> und *RAD21*<sup>-</sup> Zellen eine deutliche Trennung der Schwesterchromatiden zeigte, führte diese bei *RAD21*<sup>-</sup> Zellen nicht zu einem Stopp des Zellzyklus. Dies weist darauf hin, dass durch die Abwesenheit von Cohesin bei der Replikation keine beträchtlichen DNA-Schäden entstanden sind. Weiterhin konnte nur eine geringe Steigerung von spontanen chromosomalen Anomalien durch die Abwesenheit von *RAD21*

festgestellt werden, was zu der Annahme führt, dass *RAD21* für die DNA-Replikation nicht unentbehrlich ist [135].

### **1.4.3 Die Rolle von Cohesin bei der DNA-Reparatur**

Die Rolle von Cohesin bei der DNA-Reparatur führt zu der Annahme, dass eine Beeinträchtigung von *RAD21* auch Auswirkungen auf die Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung haben könnte. Die Entdeckung von neuen radiosensitiven Genen und Stoffwechselwegen verspricht eine Verfeinerung der Behandlungsprotokolle und die Möglichkeit einer maßgeschneiderten Therapie. In der Arbeit von Xu et al. wird die Wirkung von *RAD21* auf die Toxizität von ionisierender Strahlung für normales Gewebe mittels eines Mausmodells untersucht. Während eine Deletion von *RAD21* in beiden Allelen zu einem frühen embryonalen Zelltod führt [45, 84] konnte bei Versuchstieren mit nur einem mutierten Allel immer noch eine stark erhöhte Radiosensitivität festgestellt werden. Dies äußerte sich, sowohl durch einen signifikanten Anstieg der Sterberate nach Strahlenexposition der entsprechenden Versuchstiere, als auch durch Störungen im Schwesterchromatidaustausch und bei der homologen Rekombination mittels Gene Targeting in *RAD21*-heterozygoten Zellen. Es konnten sowohl eine gestörte Regeneration von Knochenmarkstammzellen als auch eine Hypersensitivität des Gastrointestinaltraktes bei den *RAD21* Mutanten nachgewiesen werden [164].

### **1.4.4 Die Rolle von RAD21 bei der Telomerprotektion**

Telomerverkürzung kann eine Zellalterung hervorrufen, welche die weitere Zellteilung verhindert. Dieser Kontrollmechanismus kann in malignen Zellen durch zwei Mechanismen außer Kraft gesetzt werden: entweder durch Reaktivierung des Enzyms Telomerase oder durch sogenanntes alternative lengthening of telomeres (ALT) [49] ALT-positive Zellen zeichnen sich unter anderem durch das Vorliegen von ALT-associated promyelocytic leukemia bodies (APBs) aus. In diesen Strukturen liegen sowohl DNA als auch Telomer bindende Proteine vor, welche für Synthese und Rekombination des Erbmaterials verantwortlich sind [90]. Durch Zhao et al. konnte hRAD21 als neuer wesentlicher

Bestandteil dieser ABPs identifiziert werden [168]. Den Funktionen der Doppelstrangreparatur und Schwesterchromatidsegregation entsprechend, könnte auch die Annäherung und Separation von homologen Telomeren und deren Rekombination durch RAD21 als Teil von Cohesin gesteuert werden [168]. Weitere Proteine welche im Bereich von Doppelstrangbrüchen binden und in ABPs nachgewiesen werden konnten sind phosphoryliertes Histon H2AX, welches ein Marker für Doppelstrangbruchreparatur ist [91] und die Genprodukte hRAD9, hHUS1, HRad1 und BRCA1 [90, 91]. Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass *hRAD21* in ALT-positiven Zellen zur Bildung von ABPs und dort zur Instandhaltung der Telomere einen wichtigen Beitrag leistet [57]. Mittels ChIP-Seq konnte von Deng et al. gezeigt werden, dass ein Abbau des Zinkfingerproteins CTCF oder der Cohesin Untereinheit RAD21 zu Telomer-induzierten DNA-Schäden und zu einer verschlechterten Anlagerung der DNA-Bindeproteine TRF1 und TRF2 an Telomer-DNA und damit zu einer verschlechterten Telomerprotektion führt [25].

## 1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist eine verbesserte molekulare Charakterisierung der AML durch die Untersuchung von 170 Patienten bezüglich des Vorliegens einer *RAD21*-Genmutation. Die AML zeichnet sich als Erkrankung des blutbildenden Systems durch unkontrollierte Proliferation und eine gestörte Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen aus. Weiterhin zeigt die AML insbesondere bei Patienten mit mittlerem Risiko ein genetisch und molekular sehr heterogenes Erscheinungsbild. Auch durch neue Untersuchungen mithilfe von NGS-Technologie wurde die Heterogenität der Erkrankung bestätigt und es wurden unter Anderem wiederholt auftretende Mutationen in Genen des Cohesin-Komplex festgestellt. Die genaue Bedeutung dieser Mutationen für die Erkrankung und eine mögliche Rolle bei der Pathogenese oder bei Parametern wie Therapieansprechen und Outcome ist noch nicht geklärt. Ziel dieser Arbeit ist es, die Inzidenz von *RAD21*-Genmutationen in einem unabhängigen Patientenkollektiv mit zytogenetisch normalem Karyotyp zu untersuchen und die Ergebnisse mit demographischen, laborchemischen, zytogenetischen und molekulargenetischen Charakteristika, sowie mit prognostischen Daten bezüglich des Gesamtüberlebens und dem ereignisfreien Überleben zu korrelieren. Erkenntnisse über die genaue Rolle, welche *RAD21*-Genmutationen bei der Pathogenese einer AML spielen, könnten in Zukunft zu einer genaueren Risikostratifizierung und einer verbesserten und gezielteren Therapiestrategie für AML-Patienten beitragen.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Reagenzien und Instrumente

#### 2.1.1 DNA Extraktion

AllPrep DNA/RNA Mini Kit	Qiagen GMBH, Hilden, Deutschland
--------------------------	----------------------------------

#### 2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Reagenzien	
HotStar Taq DNA Polymerase Kit	Qiagen GMBH, Hilden, Deutschland
10mM dNTPs	Invitrogen, Life Technologies GMBH, Darmstadt, Deutschland
Nuklease-freies Wasser	Ambion Inc, Applied Biosystems, Austin, USA

Instrumente	
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Austin, USA
peqSTAR Thermocycler	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Centrifuge 5810	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

#### 2.1.3 Primer

Für die gezielte Vervielfältigung des RAD21-Gens aus genomischer DNA wurden 26 Oligonukleotide, mit einer zur angrenzenden Intronsequenz komplementären Basenabfolge, mit Hilfe des Genombrowsers UCSC (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) und der Software Primer3 Version 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) hergestellt. Alle DNA-Primer wurden von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland bezogen.

Aus der jeweiligen 100 pmol/ $\mu$ l Primerstocklösung wurden durch Verdünnung mit Nuklease-freiem Wasser (Ambion Inc, Applied Biosystems, Austin, USA) 10

pmol/µl Gebrauchslösungen hergestellt. Die fertigen Gebrauchslösungen wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Tab. 4: Nukleotidsequenzen der verwendeten DNA-Primer

Exon	Sequenz(5'-3')	Amplikonlänge
2	Sense:TCAGCTCTTAGTATTTTGGGGTCT	497
	Antisense:CACTCCAATGCCCTACCTA	
3	Sense:TGCTTGCTTCCTAGCTTCCT	349
	Antisense:CCCCAAGCCTTGCTCTATCT	
4	Sense:TGTGCTTCAAGGTATTTTGCAT	450
	Antisense:TGCTTATTGCAGACCAAGTCA	
5	Sense:TGGATTGTACTGGAATGTGTGA	346
	Antisense:TCTGGTTTTCTTTTGAAATTGCT	
6	Sense:GCTAGTCATGCCCCAGTGTT	496
	Antisense:GCAACTGTTTCCAAAACCTTACA	
7	Sense:TTTCCATTGATTGGCTGTTG	370
	Antisense:GGGAGGGGTGCAAGATTTAA	
8	Sense:TTTTCTCCTCCCCATTTGTG	467
	Antisense:CACAGCAACTTGACAGACA	
9	Sense:TTGTAGCTGTGTGTTCCATGC	400
	Antisense:TGTGCCATACAGTTGCAAAA	
10	Sense:CCTTTGGAAGATAGAAATCAGTGG	339
	Antisense:TGATTCCTCATTCTTTCACTCTG	
11	Sense:AAAATTTTATCTGGCCTTCTTCA	358
	Antisense:GCCTCCCTAAATACCACTTGC	
12	Sense:AAATTTTTCCTTGTGGGGAAG	349
	Antisense:GCATCAATTAAGTTAGCCCCAAT	
13	Sense:AAGTGATTGCTCAGCAGCAT	329
	Antisense:TGCTTTCTGTTTCCAGCATC	
14	Sense:TGAGATTTGGAGGGGACAAA	352
	Antisense:ACATGGGGGCAATTTGTAAG	

### 2.1.4 Agarose Gelelektrophorese

Reagenzien	
SeaKem LE Agarose	Lonza, Rockland, ME USA
DNA Ladder (100bp)	TrackIT Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Ethidium Bromid 0,025%	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Ladepuffer	0, 25% (w/v) Bromphenol blau 30% (v/v) Glycerol 50 mM EDTA 1-2 Tropfen 2M NaOH

Puffer und Lösungen	
Agarose Gel, 2%	2g Agarose in 100 ml 1x TAE Puffer
50x TAE Stock Lösung	2 M Tris-Acetate und 50 mM EDTA
1x TAE (Elektrophoresepuffer)	100 ml 50xTAE Stocklösung ddH <sub>2</sub> O auf 5 Liter Endvolumen

Geräte	
Elektrophorese-Gelkammer	Maxi VG, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Stromquelle	Power Pack P25, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
UV Licht Videokamera	G-Box, Syngene, Cambridge, UK

### 2.1.5 Aufreinigung des PCR-Produktes

ZR-96 DNA Clean-up Kit	Zymo Research Corporation, Irvine, USA
HiDi-Formamid	Applied Biosystems, Foster City, USA

### 2.1.6 Cycle Sequencing-Reaktion (CSR)

ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1	Applied Biosystems, Darmstadt, Germany
--	--

### 2.1.7 Aufreinigung des CSR-Produktes

ZR-96 DNA Sequencing Clean-up Kit	Zymo, Research Corporation, Irvine, USA
-----------------------------------	---

### 2.1.8 DNA-Sequenzierung

3500 xl Dx Genetic Analyzer AB Sequence Scanner Software v1.0	Applied Biosystems, Darmstadt, Germany
--	--

## 2.2 Patientenproben

Die in dieser Arbeit verwendeten Proben (n=170) wurden ausschließlich im Rahmen von prospektiven multizentrischen Phase III Studien der Deutsch-Österreichischen AML Studiengruppe (AMLSG) gewonnen. Proben Aus folgenden Studien wurden verwendet: **AMLSG-HD98-A** Antrag Nr. 181/99 – Risikoadaptierte Therapie der akuten myeloischen Leukämie des Erwachsenenalters (16-60J) gemäß zytogenetischem Befund-, Datum des Ethikvotums 29.11.1999, Ethikkommission der Universität Ulm; **AMLSG-07-04** Antrag Nr. 18/2004 – Randomisierte Phase II Studie zu Valproinsäure, All-trans-Retinol und deren Kombination bei der Induktions- und Konsolidierungstherapie sowie Pegfilgrastim in der Konsolidierungstherapie bei jüngeren Patienten mit neu diagnostizierter akuter myeloischer Leukämie, Datum des Ethikvotums 16.07.2004, Ethikkommission der Universität Ulm, und **AMLSG-06-04** Antrag Nr. 103/2004 -Phase 111-Studie zu Valproinsäure in Kombination mit All-trans-Retinol, Standard-Induktions- und Konsolidierungstherapie bei älteren Patienten mit neu diagnostizierter akuter myeloischer Leukämie, Datum des Ethikvotums 28.06.2004, Ethikkommission der Universität Ulm.

Ausgewählt wurden Proben von Patienten im Alter von 16,3 bis 69,7 Jahren mit einer *de novo*, einer sekundären, postmyelodysplastischen oder einer therapieinduzierten AML. Die Diagnose wurde zytologisch und mittels immunologischer Phänotypisierung gesichert und zusätzlich wurden alle Fälle im Labor der Klinik für Innere Medizin III durch eine zytogenetische und molekulargenetische Analyse charakterisiert. Die Patienten waren über den Charakter der Studie aufgeklärt und gaben ihre Einwilligung zur Studienteilnahme und den zugehörigen Begleituntersuchungen.

Die Patientenproben (n=170) wurden zufällig nach Materialverfügbarkeit und Vorliegen einer CN-AML ausgewählt. Bei Nachweis einer Mutation von *RAD21* in einer Diagnoseprobe wurde das zugehörige Remissionsmaterial (falls vorhanden) untersucht um somatische von nicht somatischen Veränderungen abzugrenzen.

## 2.3 Therapie

Begonnen wurde die Behandlung aller Patienten mit einer Doppelinduktionstherapie bestehend aus Idarubicin, Cytosin-Arabinosid und Etoposid (ICE). Bei einer partiellen Remission (PR) oder einer kompletten Remission (CR) nach erfolgter Doppelinduktionstherapie, unterliefen die Patienten einer Konsolidierungstherapie mit Cytosin-Arabinosid und Mitoxantrone (HAM). Die Weiterbehandlung erfolgte in Abhängigkeit vom zytogenetischen Risikoprofil. Patienten mit geringem Risiko erhielten einen weiteren Therapiezyklus (HAM) zur Konsolidierung, während bei Patienten mit hohem Risiko eine allogene Transplantation vom Familien- oder Fremdspender durchgeführt wurde. CN-AML Patienten mit Standardrisiko wurden, bei vorhandenem HLA-identischen Spender, auch einer allogenen Blutstammzell-Transplantation zugeführt. Wenn kein Familienspender vorhanden war erfolgte zufällig entweder ein weiterer Therapiezyklus mit HAM oder eine autologe Blutstammzell-Transplantation.

## 2.4 Methoden zur Analyse der *RAD21*- Genmutationen

### 2.4.1 Materialgewinnung

Als Ausgangsmaterial wurden Knochenmarkproben (KM) oder peripheres Blut (PB) verwendet. Aus diesen Proben wurden durch ein standardisiertes Verfahren mononukleäre Zellen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation auf Ficoll gewonnen und bei -80°C archiviert.

### 2.4.2 Methodenübersicht

Die gesamte experimentelle Arbeit bestand in den folgenden Arbeitsschritten. Nach einer DNA-Extraktion aus den mononukleären Zellen der gewonnenen Proben wurde eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation der relevanten Sequenzen durchgeführt. Mittels Gelelektrophorese wurde die Qualität der entstandenen PCR-Produkte überprüft. Bei negativem Ergebnis wurde die PCR wiederholt. Nach erfolgreicher PCR mit unauffälliger Gelkontrolle wurden die PCR-Produkte aufgereinigt und in eine Sequenzierreaktion (CSR) gegeben. Nach erneuter Aufreinigung erfolgte eine Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese.

### 2.4.3 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion wurde mit einem AllPrep DNA/RNA Mini Kit von Qiagen entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Für die Lysierung der Zellpellets wurden diese im noch gefrorenen Zustand zunächst in 600µl RTL-puffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgelöst und kurz gemischt. Das Lysat wurde auf eine Säule „QIAshredder“ gegeben, und für 3 Minuten bei 13000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert um das Lysat von Zelltrümmern zu reinigen. Das Homogenisat wurde auf die AllPrep DNA spin Säule übertragen und erneut für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. DNA wurde hierbei an die Säulenmatrix gebunden während RNA im Durchfluss verblieb. Zur DNA-Isolierung wurden im nächsten Arbeitsschritt 500µl AW1-Puffer auf die AllPrep DNA spin Säule gegeben und die Säule für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Ein weiterer

Waschschritt erfolgte mit 500µl AW2-Puffer bei 2 minütiger Zentrifugation mit 13000 rpm. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Um Reste von Pufferlösung zu beseitigen wurde ein weiterer Zentrifugationsschritt mit neuem Auffanggefäß durchgeführt. Die Elution der DNA erfolgte in ein neues Eppendorfgefäß mittels 100µl destilliertem H<sub>2</sub>O welches auf 67 °C erwärmt und direkt auf die Säulenmembran gegeben wurde. Nach einer Inkubationszeit von 3 Minuten bei Raumtemperatur folgte ein Zentrifugationsschritt mit 13000 rpm für 1 Minute. Die DNA-Konzentration wurde mittels Nanodrop gemessen und alle Proben wurden auf die Konzentration 20 ng/µl mit destilliertem Wasser verdünnt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die DNA Proben bei -20 °C aufbewahrt.

#### **2.4.4 Primertest mittels Gradienten-PCR**

Alle Primer wurden mittels Gradienten-PCR in einem peqSTAR Thermocycler und anschließender Agarose-Gelelektrophorese auf ihre Funktionalität und ihre optimale Annealing-Temperatur hin überprüft. Die Reaktionsabläufe entsprachen hierbei einer regulär durchgeführten PCR, jedoch wurden jeweils 12 gleichartige Proben pro zu testendem Primer mit unterschiedlichen Annealing-Temperaturen amplifiziert. (Annealing-Temperaturen: 45,1°C; 46°C; 47,5°C; 49,4°C; 51,6°C; 53,8°C; 55,9°C; 58,1°C; 60,3°C; 62,2°C; 63,6°C; 64,5°C)

#### **2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Amplifikation der *RAD21*-Exone wurde mit einer konventionellen PCR-Technik durchgeführt. Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug 25 µl und setzte sich zusammen aus 20ng DNA-Template, jeweils 5 pmol der spezifischen „sense“- und „antisense“-Primer, 0,5 µl der Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) mit einer Konzentration von 10 mmol/L, 2,5µl des 10xPCR Puffer und 0,125µl der HotStar Taq DNA Polymerase mit einer Konzentration von 5 units/µl. Folgende Bedingungen wurden für die PCR gewählt: einmalige Aktivierung der Polymerase bei 95°C für 15 min; danach Amplifikation mit 30 Zyklen à 94°C für 40s (Denaturierung), 55°C für 60s (Anlagerung, Annealing), 72°C für 60s (Synthese); abschließende einmalige Extension mit 72°C für 10 min.

### **2.4.6 Agarose-Gelelektrophorese**

Im Anschluss an die PCR wurden 10 µl des entstandenen PCR-Produkts zur Gelelektrophorese verwendet. Hiermit wurden die amplifizierten PCR Produkte sichtbar gemacht, eine Kontamination ausgeschlossen und überprüft, ob der gewünschte Genabschnitt amplifiziert wurde. Es wurde ein 2 prozentiges Agarosegel mit 100 µl Ethidiumbromid-Lösung (250 µg/ml) auf 100 ml 1xTAE Pufferlösung hergestellt. Dieses wurde befüllt, mit einer 100bp DNA-Leiter und 10µl PCR Produkt, zu dem 2 µl Ladepuffer hinzugefügt wurden. Die Elektrophorese wurde durchgeführt bei 120 mA für ca. 30 min. Zur Dokumentation wurden die DNA Banden mithilfe von UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Digitalkamera fotografiert.

### **2.4.7 Aufreinigung der PCR-Produkte**

Es wurden nur Produkte aufgereinigt, die in der Gelelektrophorese eine korrekte Negativ- und Positiv-Kontrolle gezeigt hatten und eine Bande in der erwarteten Fragmentlänge aufwiesen. Zur Aufreinigung der DNA Fragmente wurde ein Zymo Research DNA Clean-up Kit verwendet welches sich zur Aufreinigung von Doppelstrang-PCR-Produkten eignet. Das Kit enthält: DNA Binding Puffer, DNA Wash Puffer, Silicon-A Platten, Collection Platten und Elutions Platten. Ziel war es Primer-Reste, ungebundene Nukleotide, Enzyme und Salze, die noch im PCR-Produkt vorhanden sind, zu entfernen. Die DNA wird an die Matrix der Silicon-A Platte gebunden, kann dort gewaschen und danach mit destilliertem Wasser eluiert werden. Jede 25 µl Probe wurde mit 100 µl DNA Binding Puffer gemischt und auf eine Silicon A Platte gegeben. Die beladene Silicon A Platte wurde auf eine Collection Platte gestellt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt mit 4000 x g für 5 Minuten. Der Durchfluss wurde verworfen. Es folgten zwei Waschschrte bei denen jeweils 300 µl Wash Buffer hinzugegeben und mit 3000 x g für 3 Minuten zentrifugiert wurden. Die Silicon-A Platte wurde danach auf eine Elution Platte montiert und in jede Säule wurden jeweils 30 µl Nuklease-freies Wasser gegeben, welches vorher auf 67°C erwärmt wurde. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute wurde die Platte mit 3000 x g für 3 Minuten zentrifugiert um DNA mit hohem Reinheitsgrad zu erhalten.



### 2.4.8 Cycle Sequencing Reaktion (CSR)

Für eine Sequenzierung der zu untersuchenden *RAD21*-Exone musste zunächst eine Sequenzierreaktion (CSR) durchgeführt werden. Ausgangsmaterial waren hierfür die aufgereinigten PCR-Produkte. Die CSR ist eine lineare PCR-Amplifikation mit nur einem Primer. Bei der CSR werden nach dem Zufallsprinzip fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) durch die Polymerase in die entstehenden DNA-Fragmente eingebaut. ddNTPs besitzen eine Kettenabbruchfunktion und jeder Einbau eines ddNTP anstatt eines dNTP führt zum Stopp der Synthese. Ergebnis sind viele DNA-Fragmente mit unterschiedlichen Längen. Die Detektion der verschiedenen Fragmente mit unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Kettenabbruchnukleotiden geschieht durch elektrophoretische Auftrennung und computergestützte Analyse wie in Unterabschnitt 2.4.9 beschrieben. Die CSR wurde mit Hilfe eines ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1 durchgeführt. Dieses beinhaltet eine thermostabile AmpliTaq DNA-Polymerase, Tris-HCl Sequencing Buffer (pH 9,0), normale Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) und 4 verschiedene modifizierte farbstoffbeladene 2',3' Didesoxynukleosid-5'-Triphosphate (ddNTP) mit Kettenabbruchfunktion: Didesoxyadenosintriphosphat (ddATP), Didesoxycytidintriphosphat (ddCTP), Didesoxyguanosintriphosphat (ddGTP) und Didesoxythymidintriphosphat (ddTTP).

Das Gesamtvolumen der Reaktion von 15µl beinhaltete 1µl aufgereinigtes PCR Produkt, 1µl Primer (10pmol), 2µl BigDye Sequencing Mix, 1,7µl Tris-HCl Sequencing Buffer und 9,3 µl Nuklease-freies Wasser. Folgende Reaktionsbedingungen wurden gewählt: Aktivierung bei 96°C für 2 min und danach 30 Zyklen mit 40s bei 95°C (Denaturierung), 60s bei 55°C (Annealing) und 3 min bei 60°C (Elongation), abschließend wurden die Proben auf 8°C gekühlt. Im Anschluss wurde das entstandene CSR-Produkt bis zur Aufreinigung und Sequenzierung in Alufolie verpackt um eine Schädigung durch Licht zu vermeiden und im Kühlschrank gelagert.

### 2.4.9 Aufreinigung des CSR-Produktes

Für die Aufreinigung des CSR-Produkts wurde ein Zymo Research DNA Sequencing Clean-up Kit gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Überschüssige ddNTPs, welche beim Sequenzieren störend wirken würden, werden in diesem Arbeitsschritt aus dem CSR-Produkt entfernt.

Zunächst wurden 240 µl Sequencing Binding Buffer zusammen mit 15 µl CSR-Produkt auf eine Zymo-Spin IB-96 Platte gegeben und mit 4000 x g für 2 min zentrifugiert. Danach wurden in jede Säule 300µl Sequencing Wash Buffer gegeben und erneut bei 4000 x g für 5 min zentrifugiert. Abschließend wurde die Zymo-Spin IB-96 Platte auf eine 96-Well PCR Platte gesetzt, es wurde 15 µl erwärmtes Nuklease-freies Wasser (67°C) auf die Säulen gegeben, bei 3000 x g für 2 min zentrifugiert und das gebundene CSR-Produkt damit eluiert.

#### **2.4.10 DNA Sequenzierung**

Die Proben wurden mit 5µl HiDi-Formamid gemischt und in eine 96-Well Platte gegeben. Leere Zellen wurden mit HiDi-Formamid befüllt. Zur Denaturierung der DNA wurde das aufgereinigte CSR-Produkt zwei Minuten lang bei 95°C auf einen Heizblock gestellt. Dies war für die elektrophoretische Trennung der einzelnen DNA-Fragmente notwendig. Die Platte wurde kurz abzentrifugiert, mit Deckeln verschlossen, und in den Sequenzierer gestellt. Es wurde ein neues Sequence Sample Sheet angelegt. Die Sequenzierung selbst erfolgte computergestützt. Es wurde ein 3500 xl Dx Genetic Analyzer verwendet, bei dem die Detektion der einzelnen Fragmente über die Erkennung des an die ddNTPs gekoppelten, fluoreszierenden Moleküls mit einem Laser-Scanning System erfolgt.

Die bei der CSR in verschiedener Größe amplifizierte DNA-Fragmente werden durch Kapillarelektrophorese nach ihrer Länge aufgetrennt. Nach abgeschlossenem Durchlauf konnten die Sequenzdaten abgerufen und mittels AB Sequence Scanner Software v1.0 analysiert werden.

#### **2.4.11 Auswertung der Sequenzen**

Zur Auswertung der Sequenzdatensätze wurde die Software CLC Genomics Main Workbench 6.7 und NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) verwendet.

Als Referenzgenom wurde für das Gen *RAD21* die Eingangsnummer NC\_000008 vom National Center for Biotechnological Information (NCBI)

verwendet. Mithilfe der Software NCBI BLAST können Sequenzabweichungen wie Punktmutationen, Insertionen und Deletionen detektiert werden. Es können mehrere Sequenzen gleichzeitig dargestellt werden. Somit ist es möglich durch den Vergleich von sense- und antisense-Sequenzen das Ergebnis zu validieren und Diagnose- mit Remissionsproben abzugleichen. Es kann weiterhin überprüft werden ob die gefundenen Veränderungen bereits als Small Nucleotide Variations (SNPs) innerhalb der menschlichen Population bei NCBI bekannt sind.

### **2.4.12 Statistische Analysen**

Für die statistische Untersuchung der Patienteninformationen wurden Mann-Whitney Tests für stetige Variablen bzw. exakte Tests nach Fisher für diskrete Variablen angewendet. Zur Evaluation der prognostischen Bedeutung der gefundenen Mutationen wurden die Patientendaten Remissionsstatus, rezidivfreies- (RFS) und ereignisfreies Überleben (EFS) sowie Gesamtüberleben (OS) mittels Kaplan-Meier Methode analysiert. Ausschlaggebend für das RFS war der Zeitraum bis zum Eintritt eines Rezidivs oder des Todes des Patienten während der CR. Für den Zeitraum des OS war der Todeszeitpunkt entscheidend.

Die statistischen Analysen wurden mithilfe des Programms GraphPad Prism v6.02 durchgeführt. Für das statistische Signifikanzniveau wurde dabei jeweils ein zweiseitiges Signifikanzniveau von  $\alpha = 5\%$  bzw.  $p \leq 0,05$  vorausgesetzt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Optimierung der Exonamplifikation aus genomischer DNA

Der Assay zur Untersuchung von Patientenproben auf das Vorhandensein von *RAD21*-Genmutationen wurde etabliert und bezüglich Reaktionsbedingungen, Reagenzien und Arbeitsablauf optimiert. Vor Beginn der Sequenzierungen wurden zunächst Primertests durchgeführt und mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Abb.2).

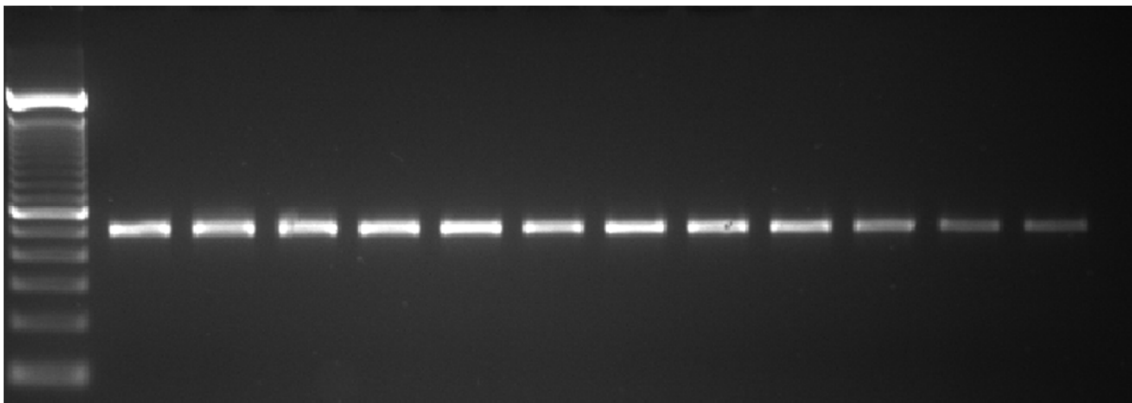


Abb. 2: Primertest zur Optimierung der Reaktionsbedingungen (Gradienten-PCR)

## 3.2 Inzidenz der *RAD21*-Genmutationen

Alle kodierenden Exone des *RAD21*-Gens wurden sequenziert und von den insgesamt 170 untersuchten CN-AML Patientenproben wiesen 9 (5,3% des Patientenkollektivs) eine Mutation in *RAD21* auf.

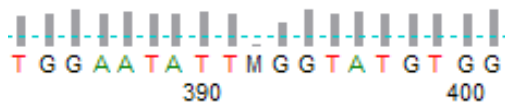
Bei 7 dieser Patienten (4,1%) wurden nicht-synonyme Mutationen gefunden, während 2 der gefundenen Mutationen (1,2%) keine Auswirkung auf die Aminosäureabfolge hatten. Es lagen keine biallelischen Mutationen vor. Es konnte lediglich in einer Probe mehr als eine Mutation gefunden werden.

Für 5 der 7 Patienten mit nicht-synonymen *RAD21*-Mutationen stand Untersuchungsmaterial zum Zeitpunkt der kompletten Remission zur Verfügung. Somit konnte untersucht werden, ob die entsprechende Mutation auch in nicht-Tumorzellen vorkommt, und somit möglicherweise eine Keimbahnmutation vorliegt. Mit Ausnahme eines Patienten (Pat.-ID 465) konnten lediglich in Leukämiezellen die entsprechenden *RAD21*-Mutationen nachgewiesen werden. Bei Patient 465 konnte sowohl in der Diagnose- als auch in der Remissionsprobe die gleiche *RAD21*-Genmutation gefunden werden.

Des Weiteren zeigt Patient 465 eine positive Familienanamnese. Es handelt sich in diesen Fall um eine Patientin deren Mutter an Leukämie verstarb. Dieser Fall könnte einen Hinweis für die Beteiligung einer *RAD21*-Mutation an der Pathogenese und damit für seine Rolle als Driver-Event darstellen.

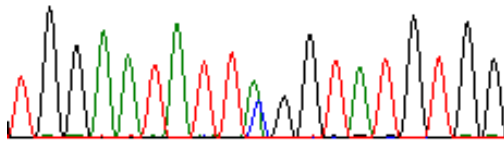
In den nachfolgenden Abbildungen (3 – 11) sind die gefundenen *RAD21* Veränderungen einzeln dargestellt. Tabelle 5 zeigt eine Zusammenfassung aller gefundenen *RAD21* Mutationen.

Diagnose:



Remission:

CR nicht vorhanden



Aminosäureaustausch:

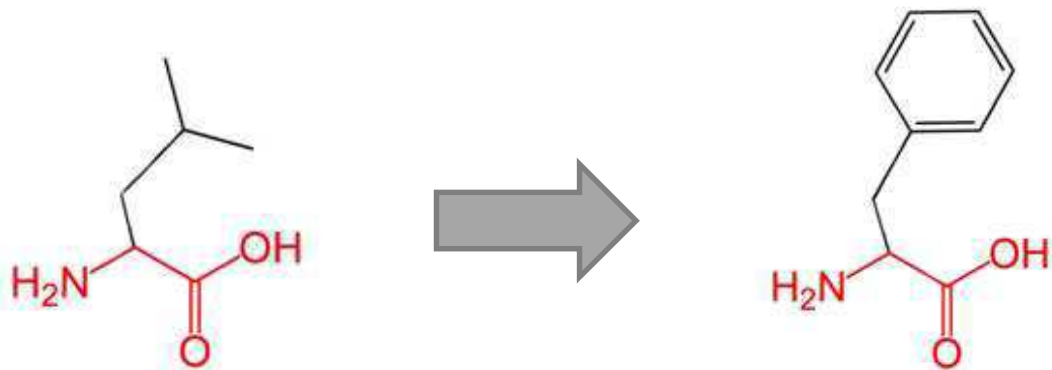


Abb. 3 : Gensequenz des Patienten 744

Da keine Probe aus CR vorlag kann keine Aussage bezüglich des Vorliegens einer Keimbahnmutation getroffen werden.

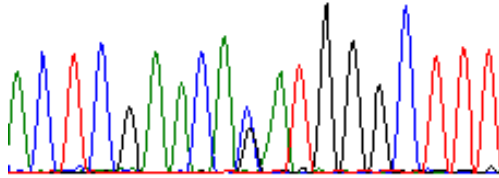
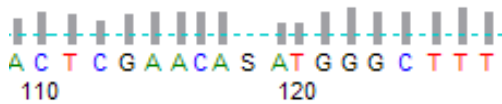
Es handelt sich um eine monoallelische Mutation, welche zu einem Austausch von Leuzin durch Phenylalanin in Position 229 der Aminosäureabfolge führt.

Die mutierte und die Wildtyp-Aminosäure unterscheiden sich in ihrer Größe. Durch den Größenunterschied kann die Proteinstruktur beeinträchtigt sein [149].

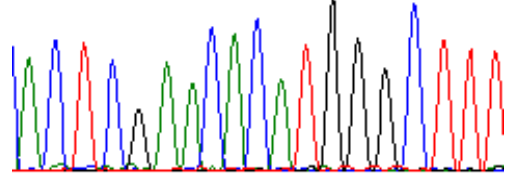
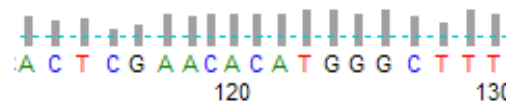
Chr. 8: 117869507 missense: c.A687C: p.L229F: Exon 6

Austausch des Nukleotids A durch das Nukleotid C in der Position 687 der Wildtyp-*RAD21*-Gensequenz.

Diagnose:



Remission:



Aminosäureaustausch:

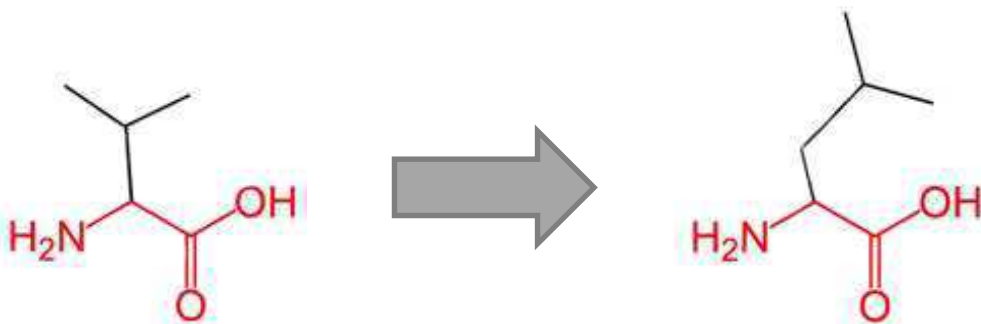


Abb.4: Gensequenz des Patienten 596

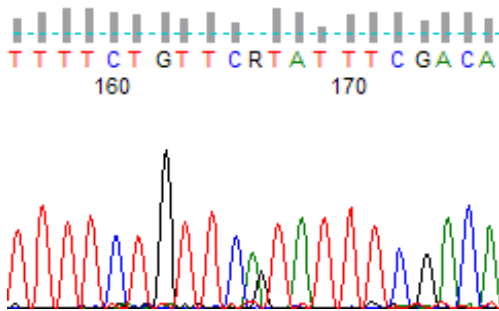
Die Diagnoseprobe zeigt neben der mutierten Sequenz auch die Wildtypsequenz, während die Remissionsprobe lediglich die Wildtypsequenz aufweist. Es handelt sich daher um eine monoallelische somatische Mutation. Es kommt zu einem Austausch von Valin durch Leuzin an Position 32 der Aminosäureabfolge.

Die mutierte und die Wildtyp-Aminosäure unterscheiden sich in der Größe ihrer Reste was wahrscheinlich zu einer Beeinträchtigung der Proteinstruktur führt. Der Aminosäurerest ist Bestandteil der Proteindomäne „RAD21/Rec-like protein, N-terminal“ welche an der Bindung anderer Moleküle beteiligt ist. Die genannte Mutation könnte dementsprechend die Proteinbindung beeinträchtigen [149].

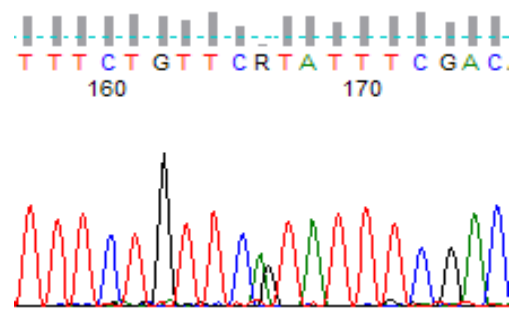
Chr. 8: 117878875, missense: c.G94C; p.V32L; Exon 2

Austausch des Nukleotids G durch das Nukleotid C in der Position 94 der Wildtyp-*RAD21*-Gensequenz.

Diagnose:



Remission:



Aminosäureaustausch:

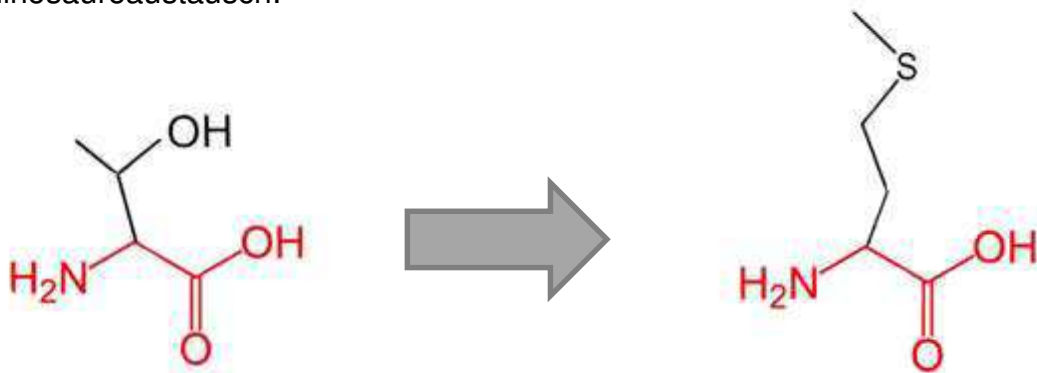
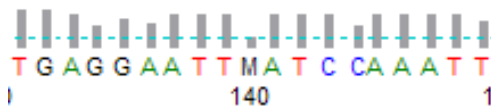


Abb. 5: Gensequenz des Patienten 465  
Gezeigt ist die DNA-Mutation, die in Diagnose- und Remissions-Gewebeproben des Patienten 465 nachgewiesen werden konnte. Es handelt sich um eine Keimbahnmutation.  
Die Mutation führt zu einem Austausch der Aminosäure Threonin durch Methionin an Position 588 des Proteins. Die mutierte und die Wildtyp-Aminosäure unterscheiden sich in Größe und in ihrer Hydrophobizität. Die genannte Mutation kann folglich zu einer Beeinträchtigung der Proteinstruktur, zur Fehlfaltungen und zu einem Verlust von Wasserstoffbrückenbindungen führen [149].  
Chr 8: 117859872, missense: c. C1763T: p.T588M; Exon 14  
Austausch des Nukleotids C durch das Nukleotid T in Position 1763 der Wildtyp-*RAD21*-Gensequenz.



Diagnose

Remission



CR nicht vorhanden

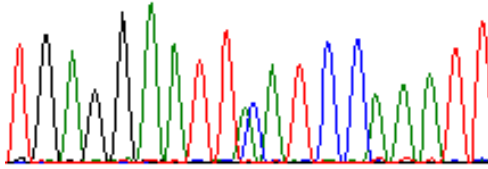


Abb. 6: Gensequenz des Patienten 465

Es lag keine Probe aus kompletter Remission vor, daher konnte keine Aussage bezüglich des Vorliegens einer Keimbahnmutation getroffen werden. Es kommt zu einem Austausch von Glutamat durch ein Stoppcodon an Position 415 der Aminosäureabfolge. Chr. 8: 117864866, nonsense; c.G1243T; p.E415X; Exon 10 Austausch des Nukleotids C durch das Nukleotid T in Position 1763 der Wildtyp-*RAD21*-Gensequenz.

Diagnose

Remission

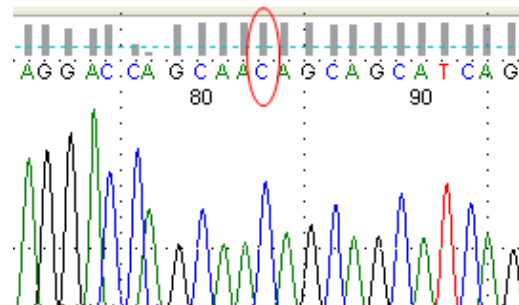
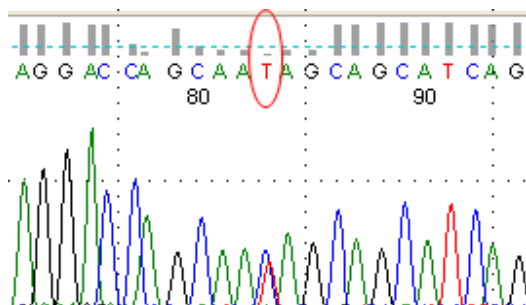


Abb. 7 Gensequenz des Patienten 725

Es handelt sich um eine monoallelische somatische Mutation. Es kommt zu einem Austausch von Glutamin durch ein Stoppcodon an Position 432 der Aminosäureabfolge. Chr. 8: 117864815, nonsense: c.C1294T; p.Q432X; Exon 10 Austausch des Nukleotids C durch das Nukleotid T in der Position 1294 der Wildtyp-*RAD21*-Gensequenz.

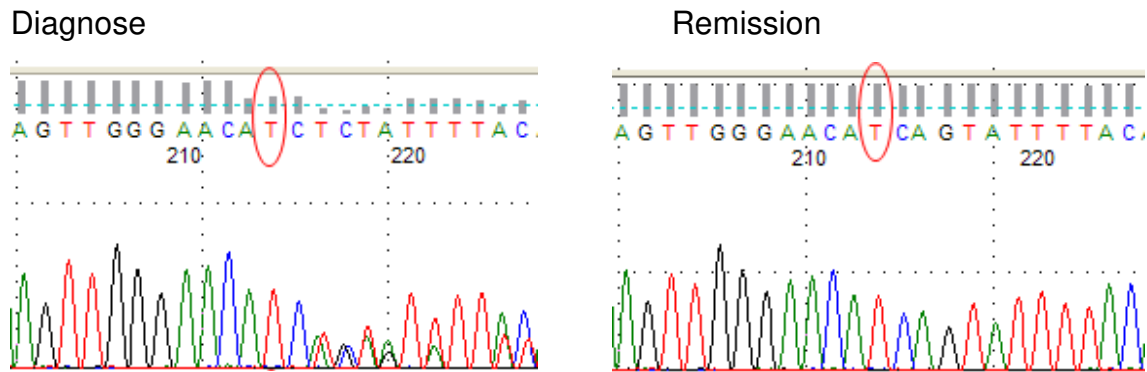


Abb. 8: Gensequenz des Patienten 858

Die Diagnoseprobe zeigt neben der Wildtyp-Sequenz eine um zwei Basen verschobene Sequenz mit einer Veränderung des Leserasters (Frameshift), während die Remissionsprobe lediglich die Wildtypsequenz aufweist. Es handelt sich daher um eine monoallelische somatische Frameshift-Mutation. Es kommt zum Austausch der Aminosäure Methionin durch ein Stoppcodon an Position 171 der Aminosäureabfolge und damit zur Bildung eines verkürzten Proteins.

Chr. 8: 117870615, frameshift: c. A457:\*/+GA; p. M171X; Exon5  
Es handelt sich um eine Insertion der Nukleotide G und A an Position 457 der Wildtyp-*RAD21*-Gensequenz.

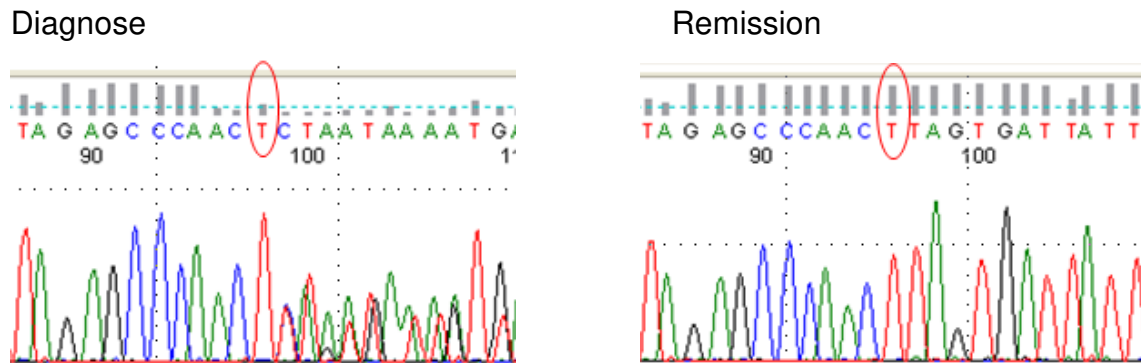


Abb. 9: Gensequenz des Patienten 107

Die Diagnoseprobe zeigt neben der Wildtyp-Sequenz eine um 2 Basen und um 4 Basen verschobene Sequenz mit zwei Insertionen, während die Remissionsprobe lediglich die Wildtypsequenz aufweist. Es handelt sich daher vermutlich um zwei monoallelische somatische Mutationen. Es kommt zu einer Insertion der Aminosäuren Asparagin, Glutamin und Asparagin an Position 342 der Aminosäureabfolge.

Chr. 8: 117866622, Insertion: c.T1023:\*/+TTAG; p.S342/+NQN;

Exon 9

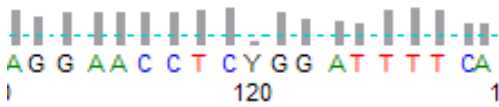
Es handelt sich um eine Insertion der Nukleotide T, T, A und G an Position 1023 der Wildtyp-*RAD21*-Gensequenz

Chr. 8: 117866620, Insertion: c. G1025:\*/+TT; p.S342/+NQN;

Exon 9

Es handelt sich um eine Insertion der Nukleotide T und T an Position 1025 der Wildtyp-*RAD21*-Gensequenz

Diagnose:



Remission:

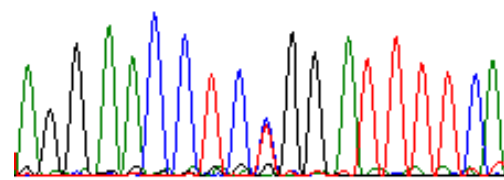
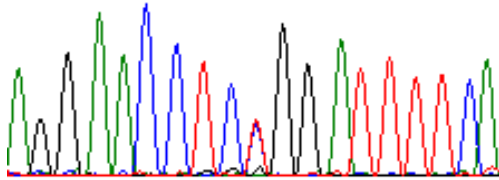
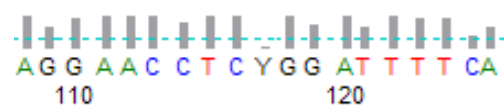


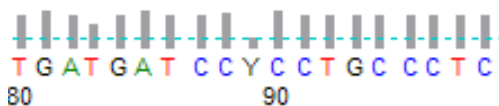
Abb. 10: Gensequenz des Patienten 1007

Sowohl Diagnose- als auch Remissionsprobe zeigen neben der mutierten Sequenz auch die Wildtypsequenz, es handelt sich daher um eine monoallelische Keimbahnmutation. Die Aminosäureabfolge ist durch die Mutation nicht verändert.

Chr. 8: 117864840, synonym: c.A1269G; p.P423P; Exon 10

Austausch des Nukleotids A durch das Nukleotid G in der Position 1269 der Wildtyp-*RAD21*-Gensequenz.

Diagnose:



Remission:

CR nicht vorhanden

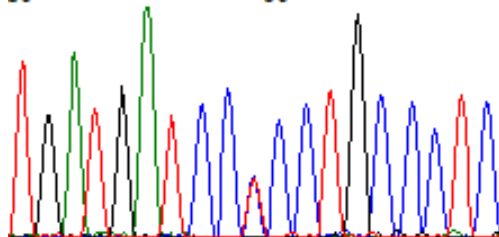


Abb. 11: Gensequenz des Patienten 785

Da keine Probe aus vollständiger Remission vorlag konnte keine Aussage bezüglich dem Vorliegen einer Keimbahnmutation getroffen werden. Die Aminosäureabfolge ist durch die Mutation nicht verändert.

Chr. 8: 117868964, synonym: c.C735T; p. P245P; Exon 7

Austausch des Nukleotids C durch das Nukleotid T in der Position 735 der Wildtyp-*RAD21*-Gensequenz.

### 3.3 Molekulare Charakterisierung der *RAD21*-Genmutationen

Die Beurteilung der gefundenen Mutationen bezüglich ihres Effekts auf die Proteinfunktion von RAD21 erfolgte mithilfe der computergestützten Analysewerkzeuge „Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT)“, „Polymorphism Phenotyping (PolyPhen)“ und „Consensus Deleteriousness Score (Condel)“.

SIFT ist eine Sequenzhomologie-basierte Analysemethode zur prädiktiven Beurteilung von Aminosäureveränderungen. [95] Der Vergleich einer veränderten Sequenz mit bekannten homologen Sequenzen stellt laut Gabaldon et al. einen guten Ausgangspunkt für die Prognose von Funktionsveränderungen dar. [40]

PolyPhen ermöglicht eine Einschätzung von Sequenzveränderungen basierend auf einer Kombination aus strukturellen und funktionellen Eigenschaften wie z.B. der Beteiligung von aktiven Zentren. [108]

Condel ist eine Methode zur Einschätzung von nichtsynonymen SNVs, welche auf einem sogenannten CONsensus DELeteriousness Score beruht. Dieser Algorithmus kombiniert und integriert Ergebnisse aus mehreren Analysewerkzeugen für die Funktionsprognose. [43]

Tab.5: Charakteristika der *RAD21*-Mutationen: Auswirkungen auf Proteinebene und prognostizierter Effekt auf die Proteinfunktion

**Erläuterungen:**

**fs** – Frameshift; **cDNA** – coding Deoxyribonucleic Acid; **SIFT** - Sorting Intolerant From Tolerant; **Polyphen** - Polymorphism Penotyping; **Condel** - CONsensus DELeteriousness Score.

Pat.- ID	DNA- Mutation (cDNA)	Mutations -typ	Protein- ebene	Effekt		
				SIFT	Polyphen	Condel
744	A687C	missense	L229F	deleterious (0.23)	probably damaging (0.975)	deleterious (0.952)
465	C1763T	missense	T588M	deleterious (0.01)	probably damaging (0.916)	deleterious (0.954)
596	G94C	missense	V32L	deleterious (0.00)	probably damaging (0.816)	deleterious (0.916)
715	G1243T	nonsense	E415X	nonsense	nonsense	nonsense
725	C1294T	nonsense	Q432X	nonsense	nonsense	nonsense
858	A457:*/+GA	Insertion- fs	S153fs M171X	nonsense	nonsense	nonsense
107	T1023:*/+TTAG G1025:*/+TT	Insertion	S342/ +NQN	N/A	N/A	N/A
1007	A1269G	synonym- ous	P423P	N/A	N/A	N/A
785	C735T	synonym- ous	P245P	N/A	N/A	N/A

### 3.4 Lokalisation der gefundenen Mutationen

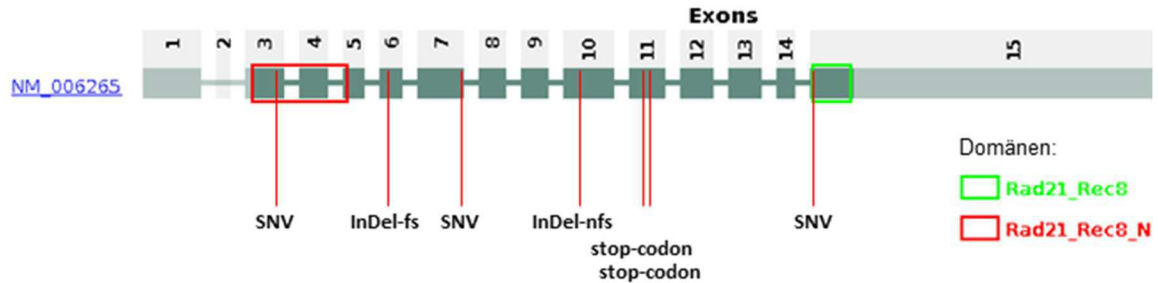


Abb.12: Verteilung der gefundenen nicht-synonymen Mutationen innerhalb der kodierenden Regionen des *RAD21*-Gens. (nach [117])  
Die gefundenen Mutationen ließen sich keinem Cluster zuordnen, sondern unterliegen einer gleichmäßigen Verteilung.

**Erläuterungen:** SNV single nucleotide variation; InDel Insertion-Deletion; fs frameshift; nfs non-frameshift

### 3.5 Assoziation mit anderen Mutationen

Im Rahmen der Studien AMLSG-HD98-A, AMLSG 07-04 und AMLSG 06-04 wurden für die in dieser Arbeit untersuchten Patienten mit normalem Karyotyp ebenso weitere molekulare Marker wie *MLL*-PTD, *FLT*-ITD, *FLT*-TKD, *NPM1*, *CEBPA* und *NRAS* untersucht. In der nachfolgenden Tabelle ist der *RAD21*-Mutationsstatus diesen molekularen Markern gegenübergestellt.

Eine signifikante Korrelation ( $p=0,018$ ) konnte nur zwischen dem gleichzeitigen Vorhandensein einer *RAD21*-Mutation und einer Mutation im *NRAS*-Gen gefunden werden.

Tab. 6: Zusammenhang zwischen *RAD21*-Mutationen und anderen molekularen Markern

**Erläuterungen:**

Angaben in Klammern: Prozentualer Anteil der Patienten mit *MLL*, *FLT-ITD*, *FLT-TKD*, *NPM1*, *CEBPA* und *NRAS* Mutation an der Gesamtzahl, bzw. den Patienten mit dem entsprechendem *RAD21*-Mutationsstatus; **MLL** = Histone-lysine N-methyltransferase HRX; **FLT3-ITD** = FMS-like tyrosine kinase 3 interne Tandem-Duplikation; **FLT3-TKD** = FMS-like tyrosine kinase 3 Tyrosinkinase-Domäne; **NPM1** = Nucleophosmin, member 1; **CEBPA** = CCAAT/enhancer-binding protein alpha; **NRAS** = Neuroblastoma *RAS* viral oncogene homolog; **MUT** = mutiert; **WT** = Wildtyp.

Mutation	Alle Patienten N=170 (%)	<i>RAD21</i>		p-Wert (exakter Test nach Fisher)
		WT N = 163 (%)	MUT N = 7 (%)	
<i>MLL</i> -PTD				0,4252
-WT:	147 (86)	141 (87)	6 (86)	
-MUT:	15 (9)	15 (9)	0	
-keine Daten:	8 (5)	7 (4)	1 (14)	
<i>FLT</i> -ITD				1,000
-WT:	129 (76)	40 (25)	6 (86)	
-MUT:	41 (24)	123 (75)	1 (14)	
-keine Daten:	0	0	0	
<i>FLT</i> -TKD				1,000
-WT:	146 (86)	140 (86)	6 (86)	
-MUT:	20 (12)	20 (12)	0	
-keine Daten:	4 (2)	3 (2)	1 (14)	
<i>NPM1</i>				0,3598
-WT:	127 (75)	123 (75)	4 (57)	
-MUT:	40 (23)	37 (23)	3 (43)	
-keine Daten:	3 (2)	3 (2)	0	
<i>CEBPA</i>				0,5673
-WT:	136 (80)	131 (80)	5 (72)	
-MUT:	20 (12)	19 (12)	1 (14)	
-keine Daten:	14 (8)	13 (8)	1 (14)	
<i>NRAS</i>				0,018
-WT:	131 (77)	128 (78)	3 (43)	
-MUT:	28 (17)	24 (15)	4 (57)	
-keine Daten:	11 (6)	11 (7)	0	



### 3.6 Korrelation mit klinischen Parametern

Von allen Patienten der Studien AMLSG-HD98-A, AMLSG-07-04 und AMLSG-06-04 mit normalem Karyotyp, für die in dieser Arbeit eine *RAD21*-Mutationsstatusbestimmung durchgeführt wurde, wurden weitere klinische Parameter erfasst: Alter, Geschlecht, AML-Typ, Hämoglobinwert, Thrombozytenzahl, Leukozytenzahl, Blastenanteil im peripheren Blut und im Knochenmark, und LDH-Wert im Plasma. Weitere untersuchte klinische Parameter waren das Vorliegen eines extramedullären Befalls durch leukämische Zellen und das Vorhandensein einer Hepato- oder Splenomegalie. Sämtliche aufgeführten Parameter wurden, durch Vergleich der Patienten mit *RAD21*-Mutation und mit Wildtyp-*RAD21*, mit dem erhobenen *RAD21*-Mutationsstatus korreliert und auf signifikante Unterschiede überprüft. Diese sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tab. 7: Korrelation klinischer Parameter mit dem Mutationsstatus von *RAD21*

**Erläuterungen:**

Angaben in Klammern: Anteil der Patienten (%); **KM** = Knochenmark; **MUT** = mutiert; **PB**: peripheres Blut; **WT**: Wildtyp; **LDH** = Laktatdehydrogenase; **s-AML** = sekundäre akute myeloische Leukämie; **t-AML** = Therapieassoziierte akute myeloische Leukämie; **FAB** = French-American-British Klassifikation; **AML** = Akute myeloische Leukämie.

	Alle Patienten n=170 (%)	<i>RAD21</i> - MUT n=7 (%)	<i>RAD21</i> - WT n=163 (%)	p-Wert	
				Mann- Whitney	Fisher
Studie, Anzahl Patienten					
AMLSG-HD98-A	130 (76)	4 (57)	126 (77)		
AMLSG 07-04	37 (22)	2 (29)	35 (22)		
AMLSG 06-04	3 (2)	1 (14)	2 (1)		
Alter, Jahre				0,32	
Median	43,2	49,8	43,2		
Spannweite	16,3-69,7	24,1-67,5	16,3-69,7		
Geschlecht, Anzahl Patienten				0,44	
weiblich	86 (51)	5 (71)	81 (50)		
männlich	84 (49)	2 (29)	82 (50)		
AML-Typ, Anzahl Patienten					
<i>de novo</i>	160 (95)	5 (72)	155 (95)		0,33
s-AML	4 (2)	1 (14)	3 (2)		0,66
t-AML	4 (2)	1 (14)	3 (2)		0,66
fehlt	2 (1)	0	2 (1)		
Hämoglobinwert, g/L				0,61	
Median	9,2	8,7	9,2		
Spannweite	3,0-14,5	3,9-11,3	3,0-14,5		
fehlt	2	0	2		

Fortsetzung Tab. 7 auf Seite 52

Fortsetzung Tab.7 von Seite 51

	Alle Patienten n=170 (%)	RAD21- MUT n=7 (%)	RAD21- WT n=163 (%)	p-Wert	
				Mann- Whitney	Fisher
Thrombozytenzahl, $\times 10^9/L$				0,94	
Median	43	39	44		
Spannweite	2,3-529	13-232	2,3-529		
fehlt	2	0	2		
Leukozytenzahl, $\times 10^9/L$				0,43	
Median	22,5	18,9	22,5		
Spannweite	0,5-238,2	6,9-58,7	0,5-238,2		
fehlt	2	0	2		
Blasten im PB				0,79	
Median	66	71	65		
Spannweite	0-96	25-80	0-96		
fehlt	7	0	7		
Blasten im KM				0,46	
Median	85	87,5	85		
Spannweite	0-100	55-99	0-100		
fehlt	15 (9)	1 (14)	14 (9)		
Extramedulläre Infiltration, Anzahl				0,50	
nein	147 (86)	6 (86)	141 (86)		
ja	15 (9)	1 (14)	14 (9)		
fehlt	8 (5)	0	8 (5)		

Fortsetzung Tab. 7 auf Seite 53

Fortsetzung Tab.7 von Seite 52

	Alle Patienten n=170 (%)	<i>RAD21</i> - MUT n=7 (%)	<i>RAD21</i> - WT n=163 (%)	p-Wert	
				Mann- Whitney	Fisher
LDH, U/L (Spannweite)				0,94	
Median	546,5	513	566		
Spannweite	131-4566	356-897	131-4566		
fehlt	4	0	4		
Splenomegalie, Anzahl				0,71	
nein	63 (37)	4 (57)	59 (36)		
ja	70 (41)	3 (43)	67 (41)		
fehlt	37 (22)	0	37 (23)		
Hepatomegalie, Anzahl (%)				1.0	
nein	82 (48)	4 (57)	78 (48)		
ja	35 (21)	1 (14)	34 (21)		
fehlt	53 (31)	2 (29)	51 (31)		

Die Untersuchung der aufgeführten klinischen Parameter zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Trägern einer *RAD21*-Mutation und den Patienten mit Wildtyp-*RAD21*.

### 3.7 Beeinflussung des Chemotherapie-Ansprechens

Für eine Einschätzung der prognostischen Relevanz von *RAD21*-Mutationen wurde das Therapieansprechen bei Patienten mit und ohne Mutation untersucht. Grundlage für den Vergleich war der Remissionsstatus, welcher nach dem zweiten Induktionszyklus erhoben wurde. Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse der Analyse.

Durch die Analyse konnte keine signifikante Korrelation zwischen dem *RAD21*-Mutationsstatus und dem Therapieansprechen festgestellt werden. Patienten mit und ohne *RAD21*-Mutation zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich einer CR, einer refraktären Erkrankung oder einem frühen Tod.

Tab. 8: Zusammenhang zwischen dem Ansprechen auf Chemotherapie und dem Mutationsstatus von *RAD21*

Erläuterungen: MUT = mutiert; WT = Wild-typ.

Remissionsstatus	Alle Patienten N=170	RAD21		p-Wert (exakter Test nach Fisher)
		WT N=163	MUT N=7	
Remission, No. (%)				0,7017
Komplette Remission	132 (78)	126 (77)	6 (86)	
Refraktäre Remission	23 (13)	22 (14)	1 (14)	
Früher Tod	15 (9)	15 (9)	0	
Keine Daten	0	0	0	

### 3.8 Korrelation mit dem klinischen Verlauf

Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer *RAD21*-Mutation und einem veränderten klinischen Verlauf (Outcome) wurde mittels Überlebenszeitkurven nach Kaplan-Meier-Methode untersucht. Die kleinere Gruppe der Patienten mit *RAD21*-Mutation (n=7) wurde mit der deutlich größeren Gruppe der Patienten ohne *RAD21*-Mutation (n=163) verglichen.

#### Korrelation mit dem Gesamtüberleben

Es ergab sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem *RAD21*-Mutationsstatus und dem Gesamtüberleben der Patienten (p=0,6188).

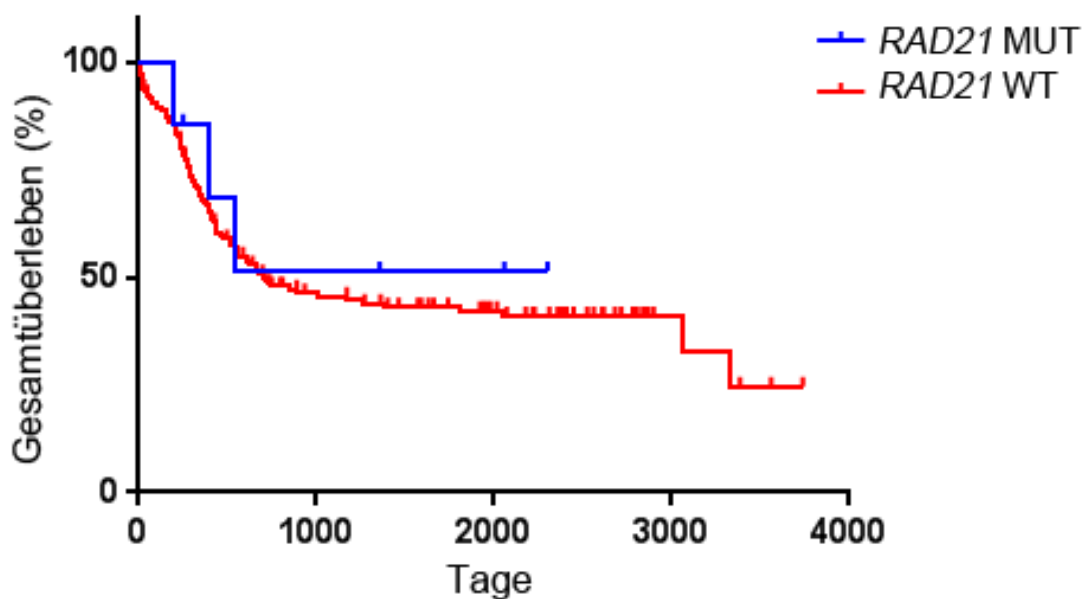


Abb.13: Gesamtüberleben der Patienten aus den Studien AMLSG-HD98-A, AMLSG-07-04 und AMLSG-06-04 der Deutsch-Österreichischen AML Studiengruppe (AMLSG) mit und ohne *RAD21*-Mutation (Kaplan-Meier-Diagramm; n=169; p=0,6188)

Erläuterungen: *RAD21* MUT= Patienten mit nachgewiesener *RAD21*-Mutation ; *RAD21* WT= Patienten mit Wildtyp-*RAD21*

Die Auswertung der Kurven aus Abb.13 führte für die *RAD21*-mutierten und nicht mutierten Patienten zu folgendem Ergebnis (siehe Tabelle 9):

Tab. 9: Korrelation mit dem Gesamtüberleben

Erläuterungen: MUT = mutiert; WT = Wild-typ.

RAD21	Events	Median (Tage)	p-Wert
WT (n=162)	91	711.0	0,6188
MUT (n=7)	3	Nicht definiert	

### Korrelation mit dem rezidivfreien Überleben

Entsprechend dem Vorgehen für die Analyse des Gesamtüberlebens wurde ebenfalls die Korrelation des rezidivfreien Überlebens mit dem *RAD21*-Mutationsstatus untersucht.

Auch bei der Analyse der Unterschiede im rezidivfreien Überleben zwischen den Patienten mit *RAD21*-Mutation und den Patienten mit Wildtyp-*RAD21* konnte keine signifikante Korrelation festgestellt werden ( $p=0,8340$ ). Für 23 Patienten waren keine Daten bezüglich des rezidivfreien Überlebens vorhanden.

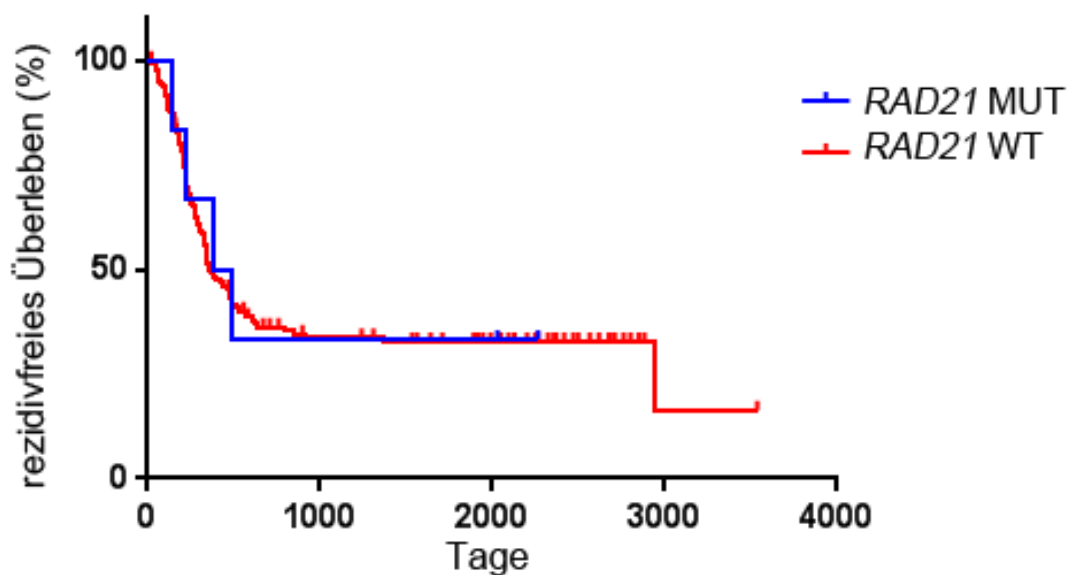


Abb. 14: Rezidivfreies Überleben der Patienten aus den Studien AMLSG-HD98-A, AMLSG-07-04 und AMLSG-06-04 der Deutsch-Österreichischen AML Studiengruppe (AMLSG) mit und ohne *RAD21*-Mutation (Kaplan-Meier-Diagramm; n=146; p=0,8340)

Erläuterungen: *RAD21* MUT= Patienten mit nachgewiesener *RAD21*-Mutation ; *RAD21* WT= Patienten mit Wildtyp-*RAD21*

Die Auswertung der Kurven aus Abb.14 führte für die *RAD21*-mutierten und nicht mutierten Patienten zu folgendem Ergebnis (siehe Tabelle 10):

Tab. 10: Korrelation mit dem rezidivfreien Überleben

Erläuterung: MUT = mutiert; WT = Wild-typ.

RAD21	Events	Median (Tage)	p-Wert
WT (n=140)	92	359,0	0,8340
MUT (n=6)	4	434,5	

### Korrelation mit dem ereignisfreien Überleben

Abschließend wurde ebenfalls eine mögliche Korrelation vom *RAD21*-Mutationsstatus und ereignisfreiem Überleben mittels Kaplan-Meier-Methode untersucht.

Auch bei der Analyse des ereignisfreien Überlebens konnte, entsprechend den Ergebnissen bezüglich Gesamt- und rezidivfreien Überlebens, kein signifikanter Einfluss des Mutationsstatus von *RAD21* aufgezeigt werden (p=0,5473). Die Kaplan-Meier Kurve in Abbildung 15 zeigt keinen Trend zu einer besseren oder schlechteren ereignisfreien Überlebensrate bei Patienten mit *RAD21*-Mutation. Der Medianwert des ereignisfreien Überlebens liegt für Patienten mit *RAD21*-Mutation mit 415 Tagen um ca. ein Drittel über dem Wert von Patienten mit Wildtyp-*RAD21* (315 Tage)



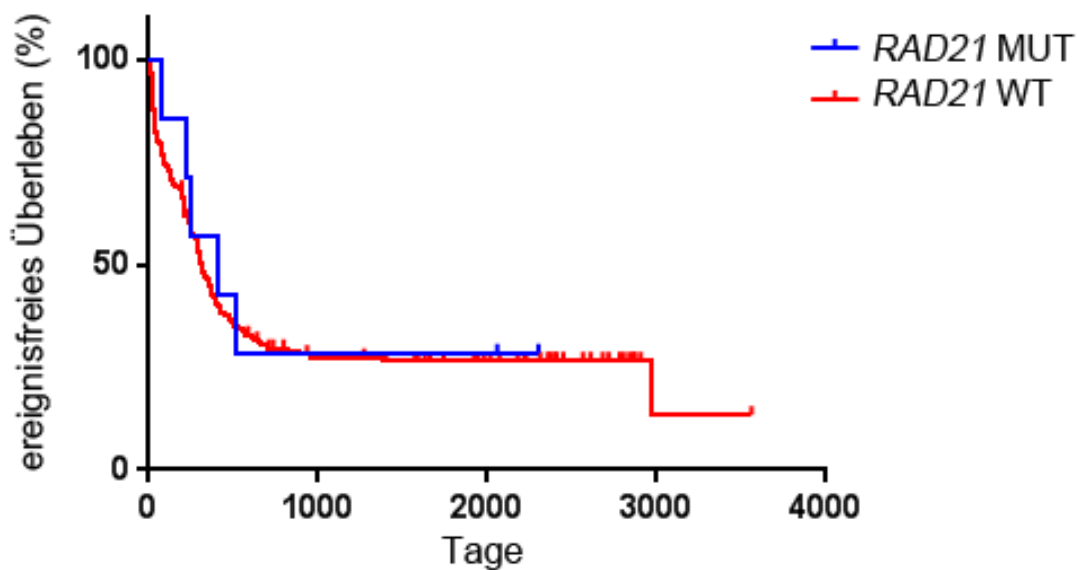


Abb. 15: Ereignisfreies Überleben der Patienten aus den Studien AMLSG-HD98-A, AMLSG-07-04 und AMLSG-06-04 der Deutsch-Österreichischen AML Studiengruppe (AMLSG) mit und ohne *RAD21*-Mutation (Kaplan-Meier-Diagramm; n=169; p=0,5473)

**Erläuterungen:** *RAD21 MUT*= Patienten mit nachgewiesener *RAD21*-Mutation ; *RAD21 WT*= Patienten mit Wildtyp-*RAD21*

Die Auswertung der Kurven aus Abb. 15 führte für die *RAD21*-Mutierten und nicht mutierten Patienten zu folgendem Ergebnis (siehe Tabelle 11):

Tab. 11: Korrelation mit dem ereignisfreien Überleben

**Erläuterung:** MUT = mutiert; WT = Wild-typ.

RAD21	Events	Median (Tage)	p-Wert
WT (n=162)	117	415	0,5473
MUT (n=7)	5	315	

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden mittels Sequenzierung nach Sanger insgesamt 170 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie einem Screening auf Genmutationen in dem Cohesin-Komplexgen *RAD21* unterzogen. Insgesamt wurden 7 (4,1%) nicht-synonyme Genveränderungen, darunter 5 SNVs und 2 Insertionen/Deletionen entdeckt. Die gefundenen Mutationen waren in verschiedenen kodierenden Regionen des *RAD21* Gens verteilt und es wurde kein Mutationshotspot festgestellt. Alle nichtsynonymen Mutationen zeigten nach molekularer Charakterisierung eine große Wahrscheinlichkeit für eine Beeinträchtigung der Proteinfunktion. Ein gemeinsames Vorliegen einer Mutation von *RAD21* zusammen mit anderen häufig bei AML vorliegenden Mutationen wurde für die Gene *MLL-PTD*, *FLT3-ITD*, *FLT-TKD*, *NPM1*, *CEBPA* und *NRAS* untersucht. Lediglich für *NRAS*-Mutationen wurde hier ein statistisch signifikanter Zusammenhang ( $p=0,018$ ) festgestellt. Beim Vergleich klinischer und biologischer Parameter mit dem Mutationsstatus der untersuchten Patienten ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge. Auch bei der Untersuchung der Parameter Gesamtüberleben, rezidivfreies Überleben und ereignisfreies Überleben mittels Überlebenszeitanalysen nach Kaplan-Meier zeigte sich kein Zusammenhang mit dem *RAD21*-Mutationsstatus.

Nachfolgend sollen die bereits dargestellten Ergebnisse kritisch basierend auf dem aktuellen Stand wissenschaftlicher Literatur erörtert werden. Hierbei stehen insbesondere die verwendete Technologie und die klinische sowie biologische Relevanz der gefundenen Veränderungen zur Diskussion.

### Diskussion der Methodik

Die in dieser Arbeit für die Validierung der NGS-Ergebnisse verwendete Methode der Sanger Sequenzierung wird als sogenannte „First-Generation“ Sequenzierungsmethode bezeichnet und führte zu vielen Erkenntnissen wie z.B. der Entschlüsselung des menschlichen Genoms im Rahmen des Human Genome Project [52]. Die Entwicklung neuer Technologien,

welche zusammenfassend als „Next Generation Sequencing“ (NGS) bezeichnet werden, haben in den letzten Jahren das Wissen im Hinblick auf genomische Veränderungen in Tumorerkrankungen revolutioniert [83].

Die zwei Haupttypen experimenteller Ansätze für die genomische DNA-Sequenzierung stellen zum einen „Whole Genome Sequencing“ und zum anderen „Targeted Sequencing“ dar. Beim „Whole Genome Sequencing“ wird das gesamte Genom umfassend analysiert. So bietet sich die Möglichkeit genomische Veränderungen, sowohl in kodierenden, als auch in nicht-kodierenden Bereichen zu identifizieren. Der größte Nachteil dieser Technik sind die immer noch sehr hohen Kosten für eine Analyse des gesamten nicht-kodierenden Erbguts.

Eine alternative Herangehensweise stellt „Targeted Sequencing“ dar. Hierbei lässt sich eine höhere Coverage der zu untersuchenden DNA-Abschnitte bei niedrigerem Zeitaufwand und niedrigeren Kosten im Vergleich zum „Whole Genome Sequencing“ erzielen. Bei dieser Technik wird nicht das gesamte Genom sequenziert, sondern nur bestimmte Bereiche z.B. mittels hybridisierungsbasierten Verfahren zur Sequenzierung isoliert. Die Hauptnachteile dieser Technik bestehen folglich darin, dass bereits vor der Untersuchung die DNA-Abschnitte von Interesse bekannt sein müssen, und dass eventuelle Veränderungen außerhalb dieser Bereiche der Untersuchung entgehen.

Verglichen mit der herkömmlichen Sequenzierung nach Sanger bietet NGS mehrere zu erwähnende Nachteile bezüglich der technischen Umsetzung. Hierzu gehört beispielsweise eine größere Abhängigkeit von Bioinformatik und hoher Rechenleistung um die Alignment-Protokolle zu generieren. Eine weitere Herausforderung stellt die große Menge an Speicherplatz dar, welche für die Analyse der riesigen Datenmengen eines jeden Sequenzierungsdurchlaufs benötigt wird. Anhaltender Fortschritt auf dem Gebiet der Computational Science lässt diese Nachteile des NGS jedoch als bewältigbare Herausforderungen in der Zukunft der Sequenzierungstechnologie erscheinen.

Erhebliche Vorteile von NGS gegenüber klassischer Sequenzierung nach Sanger zeigen sich insbesondere im Hinblick auf eine verbesserte Genauigkeit durch

hohe Coverage des sequenzierten Erbguts, die in der Zusammenschau niedrigeren Kosten und die Möglichkeit Subklone zu erkennen. Im Folgenden soll auf die genannten Punkte näher eingegangen werden.

### **Genauigkeit von NGS gegenüber Sequenzierung nach Sanger**

Das im Rahmen von NGS verwendete Sequenzierungsprinzip des „Sequencing by Synthesis“ zeigt im Vergleich zur Didesoxymethode von Sanger eine geringere Genauigkeit bei der Generierung einzelner Reads. Die erhöhte Fehlerquote basiert auf Artefakten, welche während der Probenvorbereitung und Sequenzierung auftreten. Hinzu kommen Polymerasefehler wie z.B. der Einbau falscher Basen oder die Umlagerung von Basen, welche zu falsch positiven Ergebnissen bezüglich dem Vorliegen von genetischen Veränderungen führen können. Eine weitere fundamentale Limitierung der neuen Technologie stellt die Begrenzung einzelner Reads auf eine Länge von 100 bis 150 Basenpaaren dar. Klassische Sequenzierung nach Sanger ermöglicht hier Readlängen von ca. 500 Basenpaaren. Trotz dieser Nachteile von „Sequencing by Synthesis“ bezüglich der Generierung einzelner Reads ermöglicht die enorme Anzahl der mittels NGS erzeugten Sequenzen eines DNA-Abschnitts und die digitale Verarbeitung dieser Daten eine höhere Genauigkeit als dies mit einer Sequenzierung nach Sanger möglich ist. Die Möglichkeit durch die Überschneidung einer großen Anzahl einzelner Reads DNA-Abschnitte genauer darstellen zu können als mittels Sequenzierung nach Sanger wird mit dem Begriff der Konsens Genauigkeit oder „Consensus Accuracy“ umschrieben.

### **Kosten von NGS gegenüber Sequenzierung nach Sanger**

Einer der Hauptvorteile von NGS gegenüber Sanger stellt die erhebliche Kosteneinsparung bei der Generierung großer Datenmengen dar. Dieser Unterschied beruht zu großem Teil auf der Tatsache, dass für eine Sequenzierung nach Sanger zunächst eine Amplifikation des zu untersuchenden Genmaterials meist mittels PCR erfolgen muss. Dies führt zu relativ hohen Kosten für die benötigten Reagenzien und den großen Personalaufwand. Da bei der Analyse mittels NGS eine solche vorherige Amplifikation nicht notwendig ist, konnten die Kosten für die Analyse von gesamten Genomen in Verlauf der letzten 10 Jahre drastisch gesenkt werden [82]. Zusammenfassend ist zu sagen, dass

nach einer initialen Investition in eine NGS Sequenzierungsplattform die weitere Sequenzierung von Genomen auf der Suche nach pathogeneserelevanten Veränderungen deutlich kosteneffizienter mittels NGS zu leisten ist, als auf Basis der klassischen Sequenzierung nach Sanger.

### **Unterschiede bei der Analyse von Subklonen**

Ein weiterer Aspekt, welcher die Sequenzierung nach Sanger für die detaillierte genetische Typisierung von AML-Patienten in Frage stellt, ist die Existenz und Bedeutung von Subklonen. Moderne Sequenzierungstechnologien zeigten, dass viele AML-Fälle aus mehreren verwandten Subklonen zusammengesetzt sind. Diese entstehen durch den Erwerb verschiedener somatischer Mutationen während der Teilung aus einer einzigen Vorläuferzelle [26, 158]. Diese Klone sind mittels konventioneller Sequenzierungsmethoden nicht immer nachweisbar, können jedoch maßgeblich für die Diagnostik eines Rezidivs sein [26]. Die vollständige molekulare Beurteilung einer AML erfordert also die Identifizierung aller Mutationen mit prognostischer und therapeutischer Relevanz, sowohl im Haupt-, als auch in den eventuell vorliegenden Subklonen [20].

Diese Gründe lassen für die weitere Untersuchung der in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse, eine gezielte Resequenzierung mit hoher Coverage mittels NGS-Technologie der weiteren Untersuchung mittels Sequenzierung nach Sanger überlegen erscheinen. Trotz anhaltender Bemühungen die Sensitivität von Sequenzierungen nach Sanger, besonders bei heterogenen Tumorproben zu optimieren [24], könnte es aufgrund der relativ geringen Sensitivität von 20-30% sein, dass in dieser Arbeit rein theoretisch subklonale *RAD21*-Mutationen übersehen bzw. nicht erfasst wurden.

### Vergleich mit Ergebnissen anderer Autoren

Die durch uns gefundene Inzidenz entspricht den Ergebnissen des Cancer Genome Research Network (TCGA). Durch Ley et al. 2013 wurden bei 50 Patienten für Tumor- und normale Hautzellen eine genomweite Sequenzierung und für weitere 150 Probenpaare eine Exomanreicherung und –sequenzierung durchgeführt. Um zusätzlich mehr über die Beziehungen zwischen bestimmten Mutationen und epigenetischen Phänotypen zu erfahren, wurden zusätzlich RNA und miRNA Sequenzierungen und Untersuchungen zur DNA-Methylierung durchgeführt. Mit einem Durchschnitt von 13 gefundenen Mutationen, von denen 5 in Genen auftraten, welche häufig bei AML verändert sind, zeigen AML-Genome weniger Veränderungen als andere adulte Krebsarten. Es wurden 23 Gene gefunden, welche signifikante Veränderungen zeigten, und weitere 237 Gene, welche in zwei oder mehr Proben eine Mutation aufwiesen. Durch Einteilung der Genmutationen in funktionell verwandte Kategorien wurden neue potentiell wichtige biologische Zusammenhänge aufgedeckt. In mindestens einer von neun Genkategorien, welche mit großer Sicherheit als relevant für die Pathogenese angesehen werden, zeigten fast alle Proben mindestens eine nichtsynonyme Mutation. Die Anteile der neun Genkategorien setzen sich wie folgt zusammen: Transkriptionsfaktorfusionen (in 18% der Fälle), Veränderungen des Nucleophosmin-Gens (*NPM1*) (in 27% der Fälle), Chromatin-modifizierende Gene (in 30% der Fälle), myeloische Transkriptionsfaktor-Gene (in 22% der Fälle), Cohesin-Komplex-Gene (in 13% der Fälle) und Spliceosom-Komplex-Gene (in 14% der Fälle). Die Inzidenz von Mutationen in *RAD21* als Teilmenge der Cohesin-Komplex-Mutationen zeigt bei Ley eine Inzidenz von 2,5 % der Fälle [1]. Diesem Ergebnis entspricht die in unserer Studie beobachtete Inzidenz von 4,1%, welche aufgrund der ausschließlichen Analyse von CN-AML Fällen fast doppelt so hoch ist.

Eine noch gezielter auf Cohesin-Komplex Mutationen ausgerichtete Arbeit wurde von Thol et al. 2014 durchgeführt. In dieser Studie wurden 389 AML-Patienten aller Karyotypen mittels NGS auf das Vorhandensein und die klinische sowie die prognostische Relevanz von Mutationen in *STAG1*, *STAG2*, *SMC1A*, *SMC3* und *RAD21* untersucht. Insgesamt konnte auch hier eine relativ geringe Anzahl von insgesamt 23 Patienten (5,9% des Patientenkollektivs) mit einer Mutation in

einem der Cohesin-Komplexgene gefunden werden. Während *STAG1* (1.8%), *STAG2* (1.3%), und *SMC3* (1.3%) die größte Inzidenz aufwiesen, zeigte *RAD21* eine geringere Häufigkeit von 4 positiven Proben (1,0% des Patientenkollektivs) [144].

Die Ergebnisse von Ley et al. 2013 und Thol et al. 2014 entsprechen der Inzidenz in unserer Arbeit. Gemäß dem Fall, dass bei ausreichend hoher Coverage in den Arbeiten von Thol und Ley nur eine vernachlässigbar kleine Anzahl an Mutationen übersehen wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Zahl der uns entgangenen Mutationen bei der Analyse mittels Sequenzierung nach Sanger ebenfalls ausreichend klein ist.

### **Diskussion der klinischen Relevanz**

Die Patienten mit *RAD21*-Mutation in der, dieser Arbeit zugrunde liegenden, Kohorte zeigten weder bezüglich der biologischen Parameter Alter und Geschlecht, noch bezüglich der klinischen Parameter Thrombo- und Leukozytenzahl, Blastenanteil in peripherem Blut und Knochenmark, Hämoglobinwert, LDH-Aktivität im Plasma, Extramedullärer Infiltration und Vorliegen einer Hepato- und/oder Splenomegalie signifikante Unterschiede zu Patienten ohne *RAD21*-Mutation.

Auch im Chemotherapieansprechen bezüglich der Parameter früher Tod, refraktäre Erkrankung und vollständige Remission zeigten sich zwischen Patienten mit und ohne *RAD21*-Mutation keine signifikanten Unterschiede. Diese von uns gefundenen Ergebnisse betreffend klinischer Auswirkungen entsprechender Mutationen decken sich mit den Ergebnissen aus aktuellen Studien zur Inzidenz und prognostischen Beurteilung von Mutationen in Cohesin-Komplex Genen. Thol et al. beschreiben in ihrer Arbeit bei der Analyse aller vier Cohesin-Untereinheiten *STAG1*, *STAG2*, *SMC3* und *RAD21* mittels NGS ebenfalls keine Korrelation mit den oben genannten klinischen und biologischen Parametern [144].

Des Weiteren wurden mögliche Auswirkungen einer Mutation in *RAD21* auf die Dauer von Rezidiv- und ereignisfreiem Überleben sowie auf die Dauer des Gesamtüberlebens untersucht. Eine signifikante Auswirkung auf diese Werte beim Vorliegen einer *RAD21*-Mutation war nicht nachweisbar. Auch diese

Resultate entsprechen der durch Thol et al. 2014 durchgeführten Untersuchung, in der sich kein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Mutation in Cohesin-Komplexgenen und einer Veränderung eines oder mehrerer der genannten Patientendaten zeigte [144].

Bei der Diskussion der fehlenden Korrelation mit klinischen Parametern ist vor allem die zu geringe Fallzahl der in dieser Arbeit gefundenen Patienten mit *RAD21*-Mutation zu berücksichtigen. Ein signifikanter Zusammenhang mit den genannten klinischen Parametern könnte so übersehen worden sein und erst bei einer größeren Kohorte zu Tage treten. Diese Annahme lässt den Schluss zu, dass weitere Screenings mit größeren Fallzahlen ( $n > 1000$ ) und eine kombinierte Analyse aller Cohesin-Komplex-Gene notwendig sind, da diese einen ähnlichen Phänotyp zur Folge haben könnten. Hinweise zur starken Wechselwirkung und gegenseitigen Beeinflussung dieser Gene lieferten Laugsch et al. 2013, die in ihrer Arbeit bei Knock-down von *SMC1* oder *SMC3* in HeLa-Zellen proteinspezifische Phänotypen, aber auch eine Degradation von *RAD21* bei Reduktion eines der SMC Proteine zeigen konnten [67].

Darüber hinaus können zur Erklärung der geringen Assoziation von *RAD21*-Mutationen mit klinischen Parametern Daten bezüglich des Karyotyps herangezogen werden. Laut Ley et al. 2013 zeigen die meisten Patienten mit Mutationen in Cohesin-Genen eine CN-AML mit mittlerem bis niedrigem zytogenetischen Risiko [1]. Auch bei den meisten durch Thol et al. 2014 gefundenen Cohesin Mutationen handelte es sich um CN-AML Tumorzellen [144].

### **Bedeutung von *RAD21*-Mutationen in der Pathogenese der AML**

Bei dem von uns untersuchten Zusammenhang zwischen *RAD21*-Mutationen und Mutationen in anderen molekularen Markern zeigten sich folgende Zusammenhänge.

Bei der Subgruppenanalyse wurde durch Thol et al. eine Assoziation zwischen dem Vorliegen von Mutationen in Cohesin-Komplex Genen und *NPM1* Mutationen gezeigt. Dieses Ergebnis unterstreicht die Vermutung, dass Cohesin-Genmutationen ihre Wirkung durch Beeinflussung der Transkriptionskontrolle entfalten. Mit *NPM1* interagiert CTCF, ein sequenzspezifischer



Transkriptionsfaktor, welcher ebenfalls Tumor-Suppressor-Loci reguliert [169]. Aber auch unabhängig von CTCF wurde für Cohesin-Gene eine Wirkung auf Transkriptionsvorgänge nachgewiesen [122]. In unserer Arbeit zeigte sich für das gleichzeitige Vorliegen von Mutationen in *RAD21* und *NPM1* kein klarer statistischer Zusammenhang, wobei jedoch 3 Patienten in unserer Kohorte beide Mutationen gleichzeitig aufwiesen. Als Ursache für die nicht signifikante Korrelation kommt die in dieser Arbeit relativ kleine Kohorte und die alleinige Analyse von *RAD21* ohne die restlichen Cohesin-Faktor-Gene in Frage. Eine Analyse aller Gene in ausreichend großer Fallzahl könnte eine möglicherweise bestehende Korrelation mit größerer Sicherheit nachweisen. Als Fazit ist festzustellen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit zumindest nicht gegen einen möglichen Zusammenhang zwischen *RAD21*- und *NPM1*-Mutationen sprechen. Eine deutliche Korrelation zeigte sich hingegen in unserer Arbeit zwischen Mutationen in *RAD21* und *NRAS*. Insgesamt 4 von 7 *RAD21*-mutierten Patienten zeigten zusätzlich eine Mutation in dem Proto-Onkogen. Ein Zusammenhang von Cohesinopathien und Veränderungen in Genen für Signaltransduktionswege wie *NRAS* wurde bisher noch nicht entdeckt und könnte als neuer Aspekt bei der AML-Entstehung eine Rolle spielen. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen fand sich in der Arbeit von Thol et al. 2014 keine signifikante Verbindung zwischen dem gleichzeitigen Vorkommen der genannten Mutationen [144]. Zur Erklärung dieser divergierenden Ergebnisse ist zu bedenken, dass auch in der Arbeit von Thol et al. nur eine sehr niedrige Inzidenz an *RAD21*-mutierten Fällen gefunden werden konnte und so möglicherweise ein Zusammenhang übersehen wurde. Insbesondere könnte eine Korrelation spezifisch zwischen *RAD21*- und *NRAS*-Mutationen bestehen. Ein solcher Zusammenhang könnte durch eine gemeinsame Analyse aller Cohesin-Komplex Gene im Allgemeinen, wie sie von Thol et al. durchgeführt wurde, weniger deutlich ausfallen. Kritisch zu bemerken ist die Tatsache, dass auch die in unserer Arbeit gefundene Korrelation zufällig sein könnte. Um einen potentiellen Zusammenhang zwischen *RAD21*- und *NRAS*-Mutationen mit ausreichender Sicherheit aufdecken zu können, wären auch hier weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen sinnvoll.

*RAS* Onkogene kodieren für eine Familie von membranassoziierten Proteinen, welche die Signaltransduktion durch Bindung an eine Reihe verschiedener Membran-Rezeptoren regulieren. Sie spielen eine wichtige Rolle in den

regulatorischen Prozessen der Proliferation, Differenzierung und Apoptose [137]. Mutationen in *RAS*-Onkogenen wurden in verschiedenen soliden Tumoren und bei hämatologischen Tumoren beschrieben und können zu einer konstitutiven Aktivierung des RAS-Proteins führen [65]. *NRAS*-Mutationen scheinen zu den wichtigsten RAS-Mutationen bei der AML zu gehören und zeigen Inzidenzen von bis zu 30% [5, 137]. Eine dauerhafte Aktivierung der RAS-Signalwege führt zu Proliferationssteigerung und verringerten Apoptoseraten. Eine Aktivierung des Ras-Signalwegs kann aber auch durch Mutationen anderer Gene vermittelt werden [55]. Der Nachweis einer Korrelation oder eventuell sogar eines funktionellen Zusammenhangs zwischen *RAD21*- und *NRAS*-Mutationen könnte einen Beitrag zu einem besseren Verständnis der Pathogenese einer AML leisten.

Aktuelle Studien zeigten für Mutationen des *NPM1*-Gens eine Inzidenz von etwa 35% bei *de novo* AML Patienten und insbesondere ein gehäuftes Auftreten bei Patienten mit CN-AML [34]. *NPM1* ist überwiegend im Nukleolus lokalisiert und es wird vermutet, dass ihm Funktionen als Chaperon-Protein und beim Transport von ribosomalen Proteinen durch die Kernmembran zukommen [14]. Mutationen von *NPM1* resultieren in einer zytoplasmatischen Verlagerung und in einem hiermit verbundenen Funktionsverlust des Proteins. Die hohe Frequenz von *NPM1*-Mutationen bei CN-AML und die Beobachtung, dass zytoplasmatisches *NPM1* seine normalen Funktionen als Bindungspartner und Transporter-Protein nicht mehr wahrnehmen kann, führen zu der Vorstellung, dass *NPM1* Mutationen ein frühes Ereignis in der Leukämogenese darstellen [150]. Eine Interaktion zwischen dem nukleär lokalisierten *RAD21* als Teil des Cohesin-Komplex und dem nukleolär lokalisierten *NPM1* erscheint möglich. Das Aufdecken einer solchen Interaktion könnte einen Beitrag zum Verständnis der AML und ihrer Pathogenese leisten.

Zusammenfassend weisen die gefundenen Ergebnisse bezüglich der Wechselbeziehungen zu anderen häufig bei AML veränderten Genen darauf hin, dass sowohl für die Patienten mit *NPM1*-Mutation als auch für Patienten mit *NRAS*-Mutationen weitere Subgruppenanalysen mit deutlich größeren Kohorten notwendig sein werden, um eventuelle Unterschiede in der Biologie dieser Untergruppen erkennen zu können.

## **Auswirkungen von RAD21 auf Zellhaushaltsfunktionen**

Im Folgenden soll die Rolle von *RAD21*-Mutationen und einem konsekutivem Ausfall der Proteinfunktion bezüglich einer Beeinträchtigung seiner Haushaltsfunktionen diskutiert werden. Diese Funktionen umfassen die Zusammenlagerung der Schwesterchromatiden bei der Zellteilung, die Telomerprotektion und die Reparatur von DNA-Schäden.

### **Zusammenlagerung der Schwesterchromatiden bei der Zellteilung**

Die Trennung und der Transport der Schwesterchromatiden zu den entgegengesetzten Zellpolen erfolgt während der Mitose durch eine Bindung an die Kinetochore über Mikrotubuli [111]. Cohesin und sein Bestandteil RAD21 wirken einer vorzeitigen Trennung während der Pro- und Metaphase entgegen, ermöglichen den Aufbau der nötigen Spannung um die Schwesterchromatiden in der Äquatorialebene zu lokalisieren und wirken einer chromosomalen Destabilisierung entgegen [86, 146]. Die, trotz der bekannten Rolle von Cohesin bei der Zellteilung, erhöhte Inzidenz von *RAD21*-Mutationen bei Patienten mit CN-AML lässt vermuten, dass die Zusammenlagerung der Schwesterchromatiden nicht die entscheidende Funktion von RAD21 ist, welche in Verbindung zur Leukämogenese steht.

### **Reparatur von DNA-Schäden**

Sowohl für die Organismen Hefe und Huhn als auch am Menschen konnte für Cohesin eine Beteiligung an DNA-Reparaturvorgängen nachgewiesen werden [4, 9, 118, 130, 135]. Eine Funktion, welche Cohesin bei dieser DNA-Doppelstrangbruchreparatur erfüllt, besteht in der Zusammenlagerung homologer DNA Abschnitte und damit dem Ermöglichen einer homologen Rekombination [164].

### **Telomerprotektion**

Der Kontrollmechanismus der Telomerverkürzung kann durch verschiedene Mechanismen außer Kraft gesetzt werden und so zur Entstehung von maligne entarteten Zellen führen. Eine Möglichkeit hierfür stellt die Reaktivierung des Enzyms Telomerase dar. Im Gegensatz dazu kann die Telomerverkürzung auch

durch sogenanntes alternative lengthening of telomeres (ALT) beeinträchtigt sein [49]. Zellen, welche einen entsprechenden Defekt aufweisen zeichnen sich unter anderem durch das Vorliegen von ALT-associated promyelocytic leukemia bodies (APBs) aus. Humanes RAD21 wurde als wichtiger Bestandteil dieser Proteinkomplexe identifiziert. Dieser Umstand verdeutlicht seine Rolle bei der Telomerprotektion [168]. Um auf diesen Aspekt genauer einzugehen, wäre im Rahmen einer weiterführenden Untersuchung eine Analyse der Telomerlänge in Abhängigkeit vom Vorliegen einer Cohesin-Faktor-Mutation im Allgemeinen oder einer *RAD21*-Mutation im Besonderen sinnvoll.

Die in dieser Arbeit gefundenen *RAD21*-Mutationen, welche allesamt als Proteinfunktion einschränkend vorhergesagt sind, und die wichtige Rolle von RAD21 in Zellhaushaltsfunktionen, lassen vermuten, dass entsprechende Veränderungen biologisch für die Leukämieentstehung relevant sind. Es bleibt zu zeigen, in welchem Ausmaß ein Zusammenhang besteht, und ob hier eventuell Möglichkeiten für die Entwicklung einer gezielten therapeutischen Intervention bestehen.

Zur Diskussion der Frage, warum trotz der Rolle von RAD21 im Zellhaushalt eine erhöhte Inzidenz bei CN-AML zu verzeichnen ist, können Ergebnisse von Laugsch et al. 2013 herangezogen werden. Für entsprechende Zellhaushaltsfunktionen von *RAD21* wurde gezeigt, dass diese durch einen teilweisen Verlust des Proteins nicht kritisch beeinträchtigt werden. In der entsprechenden Studie wurde ein Knock-Down der Cohesin-Bestandteile SMC1 und SMC3 mittels RNA-Interferenz durchgeführt. Ein bemerkenswertes Ergebnis der Arbeit bestand in der Erkenntnis, dass weniger als 30% der Gesamtmenge an Cohesin ausreichend waren, um einen ordnungsgemäßen Ablauf des Zellzyklus und eine angemessene Antwort auf DNA-Schäden zu gewährleisten. Im Vergleich zu den nicht veränderten Zellen in den Experimenten wurde gezeigt, dass bereits 10 bis 15 Prozent der Cohesin-Konzentration ausreichen, um diese wichtigen Haushaltsfunktionen aufrecht zu erhalten. Es wird angenommen, dass dieser essentielle Cohesin-Pool, welcher eine hohe Affinität zu Chromatin aufweist ein Mindestmaß an Kohäsion der Schwesterchromatiden gewährleistet, und damit noch eine Trennung der Chromosomen und die ordnungsgemäße Zellproliferation ermöglicht [67]. Auch in früheren Studien wurden bereits

konsistente Ergebnisse bezüglich eines stark mit Chromatin assoziierten Anteils von etwa einem Drittel der Cohesin-Gesamtmenge festgestellt [41].

Das Vorkommen von *RAD21*-Mutationen bei CN-AML ist mit diesen Ergebnissen vereinbar, da bei monoallelischen Mutationen noch genügend *RAD21* für die Aufrechterhaltung seiner Haushaltsfunktionen vorhanden ist. Hieraus ergibt sich die Frage, wie trotz erhaltener Zellhaushaltsfunktionen eine Haploinsuffizienz von *RAD21* zu einem Leukämiephänotyp beitragen kann. Diese Frage kann den Gegenstand weiterer Untersuchungen darstellen. In Frage kommen hier z.B. ein shRNA-basierter Knock-down in *NPM1*-mutierten hämatopoetischen Stammzellen oder ein CRISPR/Cas9 vermittelter knock-out eines Allels.

Weiterhin ist zu bedenken, dass Zellhaushaltsfunktionen nicht die einzige Möglichkeit für eine Beteiligung von *RAD21*-Mutationen an der Leukämogenese darstellen. Weitere potentiell relevante Funktionen reichen von einer Rolle bei der Chromatinorganisation über eine Beteiligung an epigenetischen Regulationsmechanismen bis hin zu globalen Änderungen der Genexpression und sollen im Folgenden weiter diskutiert werden.

### **Rolle von *RAD21* bei der Chromatinorganisation**

Eine mögliche neue Rolle von *RAD21*-Mutationen bei der Leukämieentstehung könnte mit seiner Funktion im Rahmen der dreidimensionalen Modifikation von Chromatin zusammenhängen. Durch eine Veränderung der Chromatinstruktur im Zellkern mittels DNA-looping können Genexpressionsmuster beeinflusst werden [60, 96]. Ein weiterer Transkriptionsfaktor, welcher bei AML erkrankten Patienten nachgewiesen werden kann und die Genregulation über DNA-looping beeinflusst, ist *CTCF* [129, 152]. Auch für die Akute lymphatische Leukämie wurden unlängst *CTCF*-Mutationen nachgewiesen [89]. Eine Untersuchung von *CTCF*-dezimierten Burkitt-Lymphom Zelllinien mittels high-throughput RNA-Sequenzierung zeigte für die Rolle von *CTCF* bei Splice-Vorgängen sowohl einen globalen Effekt, als auch eine direkte Beeinflussung von spezifischen Zielmolekülen, wie z.B. CD45 [129]. Interessanterweise zeigten mehrere Arbeiten, dass *CTCF*- und *RAD21* auch untereinander interagieren und ihre Funktionalität gegenseitig beeinflussen. Dorsett et al. 2011 schreiben z.B. Cohesin eine Vermittlerfunktion bei long-range Interaktionen zwischen

Enhancer/Promotorregionen und CTCF-Bindestellen zu [30], während Essafi et al. 2011 eine funktionelle Wechselwirkung zwischen RAD21, CTCF und dem Zink Finger und Transkriptionsfaktorprotein WT1 aufzeigen [32]. Eine Rolle von RAD21 als Teil eines Chromatin Remodelling Komplex konnte durch Hakimi et al. 2002 gezeigt werden. Dieser Komplex umfasst neben RAD21 auch ISWI Chromatinremodelling-Protein und Mi-2/NuRD (Nucleosome Remodeling Deacetylase) [48]. Insbesondere bei der Chromatinfaltung spielen RAD21 und CTCF eine wichtige Rolle. Eine Depletion von RAD21 und CTCF in humanen Zellen sollte ihre genaue Rolle bei Chromatinfaltung und DNA-looping klären. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten nach Depletion eine Erhöhung der Chromatindichte. Die erhöhte Chromatindichte wird durch ein Ungleichgewicht zwischen „longrange“- und „shortrange“-DNA-looping erklärt. Diese Ergebnisse verdeutlichen den starken Einfluss von RAD21 auf das empfindliche Gleichgewicht bei der Chromatinfaltung [44, 140]. Eine genetische Fehlregulation bestimmter Gengruppen konnte auch in anderen Studien durch Beeinträchtigung von CTCF und Cohesin bestätigt werden [134, 170]. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass *RAD21*-Mutationen allein, oder in Kombination mit Mutationen anderer Chromatin-assoziiierter Proteine, Einfluss auf die Genexpression ausüben und damit möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung einer AML spielen.

### **Epigenetische Regulationsmechanismen in Zusammenhang mit RAD21**

Die genaue Biologie von Initiailläsionen in hämatopoetischen Vorläuferzellen, welche zum Ausbruch einer AML führen, ist noch nicht hinreichend geklärt. Neue Arbeiten liefern Hinweise darauf, dass insbesondere Mutationen in Genen, welche epigenetische Regulationsmechanismen beeinflussen, zur Ausbildung sogenannter prä-leukämischer hämatopoetischer Stammzellen (HSCs) führen können und damit zu einer Prädisposition für die Entwicklung einer AML beitragen [128]. Die zwei Hauptmechanismen mit denen epigenetisch, also ohne den genetischen Code zu verändern, Gentranskription und -expression beeinflusst werden sind zum einen posttranslationale Histonmodifizierung und zum anderen die Methylierung und Hydroxymethylierung von DNA [8, 97].

Mittels Hochdurchsatzsequenzierungsverfahren wurden verschiedene Gene identifiziert, welche an der epigenetischen Regulation beteiligt sind und damit prognostische Relevanz bei der AML-Diagnostik erlangten. Während die Gene *DNMT3A*, *TET2* und *IDH1/IDH2* an der DNA-Methylierung beteiligt sind, konnte für die Modifizierung von Histonen eine Beteiligung der Gene *EZH2* und *ASXL1* festgestellt werden [21]. Mutationen von *DNMT3A* gehören mit einem Auftreten von 15-25% zu den häufigsten somatischen Veränderungen bei einer AML [100, 127, 153]. Eine etwas geringere Inzidenz zeigen *TET2*-Mutationen, welche bei 7-23% der AML und bei 10-20% der MDS Fälle nachweisbar sind [2, 100, 127, 157]. *IDH1/IDH2*-Mutationen, welche auch in anderen Krebsarten wie dem Kolonkarzinom und in Hirntumoren vorkommen, treten in etwa 15-30% aller *de novo* und sekundären AML-Fälle, sowie in ca. 5% der MDS-Fälle auf [36, 107]. Für die genannten Mutationen wurde ein begünstigender Effekt auf die Zellteilung und ein negativer Effekt auf die Differenzierung von HSCs gezeigt.

Eine Anhäufung in HSCs kann zu einer klonalen Expansion und zur Bildung einer präleukämischen HSC-Population führen. Die Fähigkeit zur vollständigen Differenzierung bleibt in diesen Vorläuferzellen zwar erhalten, jedoch besteht eine erhöhte Wahrscheinlichkeit zur vollständigen Transformation durch den Erwerb zusätzlicher Driver-Mutationen [18]. Eine Untersuchung von Rezidiv-Patienten gepaart mit den zugehörigen primären AML-Proben zeigte eine große Stabilität und Prävalenz von *DNMT3A*-Mutationen. Auch diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Mutationen von epigenetischen Regulatoren wie *DNMT3A* Vorläufer für weitere Driver-Mutationen, wie z.B. *NPM1*, innerhalb der Pathogenese einer AML darstellen [66]. Präleukämische HSCs wurden auch in Remissionsproben gefunden, was ihre Resistenz gegenüber einer Chemotherapie verdeutlicht. Aus frühen Mutationen in epigenetischen Regulatoren wie *DNMT3A* kann so eine Ansammlung klonal entstandener Vorläuferzellen hervorgehen, welche eine erhöhte Prädisposition zur Entstehung sowohl einer primären Erkrankung, als auch eines Rezidivs darstellt. Die Entdeckung und Behandlung solcher präleukämischen Klone noch vor Erwerb weiterer Mutationen ist Gegenstand aktueller Forschung. [128]

Poleshko et al. 2010 untersuchten mittels RNA-basiertem Knock-Down in HeLa-Zellen 200 potentielle Gene, welche als epigenetische Regulatoren in Frage kamen. In dieser Untersuchung konnten 15 Gene als Teil eines epigenetischen

Regulationsnetzwerkes in humanen Zellen gefunden werden, die neben *DNMT3A* auch *RAD21* beinhalten [105]. Eine Beeinträchtigung der epigenetischen Regulation durch das Vorliegen einer *RAD21*-Genmutation, ähnlich wie dies bei *DNMT3A*-Mutationen stattfindet, scheint damit als Pathomechanismus bei der Entstehung einer AML in Frage zu kommen.

### **Rolle von RAD21 bei der Gentranskription**

Die Regulation der Gentranskription durch Transkriptionsfaktoren ist ein weiterer Mechanismus, welcher durch *RAD21* beeinflusst wird und potenziell die Entwicklung einer AML prägt. Um ein Gleichgewicht zwischen Pluripotenz und der Fähigkeit zur schnellen Differenzierung beizubehalten, benötigen embryonale Stammzellen (ESC) die Expression spezieller Transkriptionsfaktoren, begleitet von einer bestimmten Organisation der Chromosomen. Die Rollen von *RAD21* bei Genregulation und Chromatinorganisation sind aus diesen Gründen nicht klar zu trennen, sondern ergänzen sich gegenseitig. Nitzsche et al. 2011 zeigen die funktionelle Rolle von *RAD21* bei der Stammzellentwicklung durch seine enge Verbindung zum Pluripotenz Transkriptions-Netzwerk [96]. Mittels ChIP-Seq Analysen wurde für *RAD21* ein ESC spezifisches Bindungsmuster entdeckt. Dieses zeichnet sich durch Unabhängigkeit gegenüber dem Zinkfingerprotein CTCF und durch Kolokalisation von Cohesin und pluripotenten Transkriptionsfaktoren wie *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, *ESRRB* und *KLF4* aus. Im Verlauf der Differenzierung von ESCs verschwinden die pluripotenzassoziierten Bindungsstellen und werden durch CTCF unabhängige und differenzierungsassoziierte *RAD21*-Bindungsstellen ersetzt. Weiterhin führte ein Knock-Down von *RAD21* zu ähnlichen Veränderungen des Expressionsmusters wie bei einer Depletion des wichtigen Transkriptionsfaktors *NANOG*, und es wurde eine Wechselwirkung zwischen *NANOG* und den Cohesin assoziierten Proteinen STAG1 und WAPL entdeckt. Basierend auf diesen Ergebnissen kann davon ausgegangen werden, dass *RAD21* durch direkte transkriptionsfaktorvermittelte DNA-Bindung einen Beitrag zur Organisation der Chromosomen bei der Genexpression von ESCs leistet [96]. Durch eine Mutation in *RAD21* könnte das Gleichgewicht hämatopoetischer



Stammzellen gestört und sowohl Proliferation, als auch Differenzierung dieser Zellen beeinträchtigt sein.

Die Fähigkeit von Cohesin die räumliche Struktur von Chromosomen zu beeinflussen wird nicht nur für die Zusammenlagerung der Schwesterchromatiden genutzt, sondern auch um die Konformation von bestimmten Genloci dynamisch zu verändern. Cohesin vermittelte Bildung von Chromatinschleifen bildet, laut Hadjur et al. 2009 [46], die topologische und mechanistische Grundlage zelltypspezifischer chromosomaler Langstreckeninteraktionen des Zytokin-Genlocus IFNG. Es wird angenommen, dass Cohesin durch seine Fähigkeit die Konformation von Chromatin zu verändern, die Wahrscheinlichkeit für eine Interaktion verschiedener Genregulationsmechanismen beeinflusst [46].

Auch durch Kagey et al. 2010 [60] wurde die Rolle von Cohesin für zellspezifische Genexpressionsprogramme untersucht. Die Genaktivierung setzt wahrscheinlich eine DNA-Schleifenbildung zwischen Enhancer-gebundenen Transkriptionsfaktoren und dem Kern-Promotor des Transkriptionsapparates voraus [56, 85, 148]. Es wurde ein funktioneller Zusammenhang für den Transkriptionsmultiproteinkomplex Mediator und Cohesin in ESCs nachgewiesen. Mediator bildet einen ringförmigen Komplex mit Cohesin, über den zwei DNA Segmente miteinander verbunden werden. Weiterhin wurde eine DNA-Schleifenbildung zwischen Enhancer und Promotorregion durch Mediator und Cohesin aufgezeigt, was ihre wichtige Rolle bei der Gentranskription bestätigt [60].

*RUNX1* ist ein essentieller Transkriptionsfaktor für die Hämatopoese in Vertebraten, welcher sowohl durch Cohesin als auch durch CTCF beeinflusst wird. Dies geschieht über sogenannte cis-regulatorische Elemente (CREs), also Regionen nicht kodierender DNA, welche die Transkription nahe gelegener Gene steuern. Folglich beeinflusst Cohesin die Rekrutierung der RNA-Polymerase II (RNAPII) bei der Transkription von *RUNX1*. Eine Depletion von Cohesin bei einer humanen Leukämie-Zelllinie zeigte eine deutliche Zunahme der Expression von *RUNX1*. Diese Entdeckung unterstreicht einen möglichen Zusammenhang von Cohesin-Mutationen mit der Entstehung von hämatopoetischen Neoplasien [79]. Eine Nullmutation von *RAD21* im Zebrafisch führte hingegen zu einer Herabregulation von *RUNX1* [53].

Weitere *RAD21* assoziierte Gennetzwerke wurden von Rhodes et al. 2010 am Zebrafisch aufgedeckt. Diese beinhalten *MYC*, *P53* und *MDM2* [110]. *MYC* Proteine stellen Schlüsselregulatoren der Proteinbiosynthese, des Wachstums und der Proliferation verschiedener Organismen dar, und eine Überexpression von *MYC* wirkt an der Entstehung vieler Krebsarten mit [103, 151]. Während *MYC* in einem *RAD21* negativen Mutanten drastisch herunterreguliert wird, liegt bei *P53* und *MDM2* eine Hochregulierung der Expression vor. Ein entsprechendes Verhalten zeigt sich bei *P53* und *MDM2* auch bei einem Verlust von CTCF. Sowohl Cohesin als auch CTCF zeigten eine Bindung an Transkriptionsstartpunkte von *MYC*, *P53* und *MDM2*. Dies lässt vermuten, dass beide Proteine einen direkten Einfluss auf die Transkription dieser Gene haben. Eine Cohesin-abhängige Regulation der Expression von c-MYC könnte auf einen Koordinationsmechanismus der Zellteilung hindeuten, in dem Cohesin auch durch die *MYC* vermittelte Wachstumssteuerung eine Schlüsselrolle einnimmt [110].

### **Bedeutung von Cohesin-Mutationen in Bezug auf den klonalen Aufbau einer AML**

Um ein tieferes Verständnis für die Rolle von *RAD21* bei der Entstehung einer AML zu gewinnen sind neben der Beurteilung seiner vielfältigen Funktionen bei zellulären Prozessen wie Mitose, Regulation der Apoptose, Organisation der Chromosomen, Replikation, Transkriptionskontrolle, RNA-Prozessierung und DNA-Reparatur noch weitere Faktoren von Bedeutung. Es muss für Veränderungen von *RAD21* zwischen sogenannten Driver-Mutationen, welche für die Erkrankung verantwortlich sind, und zusätzlich erworbenen Passenger-Mutationen unterschieden werden. Anhaltspunkte für diese Beurteilung liefert der klonale Aufbau eines AML-Genoms.

Der klonale Aufbau einer AML kann durch den Vergleich verschiedener Allelfrequenzen aller somatischen Mutationen bestimmt werden, welche mittels NGS gefunden werden [158]. Die große Mehrzahl der in diesen Genomen gefundenen Mutationen sind sogenannte Passenger-Mutationen, welche zufällig während des Alterungsprozesses entstehen, und während der Transformation

der Tumorzellen weitergegeben werden [158]. Obwohl Passenger-Mutationen nicht entscheidend zur Pathogenese beitragen, können mithilfe dieser zusätzlichen genetischen Informationen klonale Subpopulationen innerhalb eines Tumorgenoms differenziert werden. Ein krankheitsverursachender Klon im Knochenmark eines Patienten enthält hunderte Mutationen, darunter verschiedene Driver-Mutationen. Aus diesem Hauptklon entstehen sogenannte Tochter-Subklone. Wiederkehrend mutierte Gene werden sowohl in Ursprungs- als auch in Subklonen gefunden [155]. Die klinische und biologische Bedeutung der Verteilung von Mutationen innerhalb der Subklone ist noch nicht restlos geklärt. Da allerdings eine gezielte Therapie bestimmter spezifischer Mutationen möglich ist, erscheint es denkbar, dass diese Therapien Unterschiede in ihrer Effektivität aufweisen je nachdem ob die entsprechenden Mutationen im Haupt- und/oder Subklon vorliegen [156]. Die Targeted-Resequencing Daten aus unserer Arbeit zeigen für die gefundenen *RAD21*-Mutationen hohe Readzahlen zwischen 30% und 49% was gegen das Vorhandensein von Subklonen und für die Einstufung einer *RAD21*-Mutation als Driver-Event spricht [29]. Dies bedeutet, dass die entsprechende Mutation mit hoher Wahrscheinlichkeit für die Entstehung der AML mitverantwortlich war. Der in dieser Arbeit gefundene Fall einer Keimbahnmutation mit positiver Familienanamnese unterstützt diese These zusätzlich.

Überdies wurden *RAD21* Mutationen ebenfalls beim MDS beobachtet. Der Begriff MDS vereint eine Gruppe von Knochenmarkserkrankungen bei denen die Blutbildung durch genetisch veränderte Stammzellen unausgereifte und nicht vollständig funktionstüchtige Blutzellen hervorbringt. Patienten mit MDS tragen, je nach Ätiologie, ein erhöhtes Risiko zu einem späteren Zeitpunkt auch eine AML zu entwickeln [142]. Während Ley et al. 2013 neben Veränderungen in Kandidatengenen z.B. für Spliceosom Gene, Transkriptionsfaktoren und RAS Signalwege auch eine Beteiligung von Cohesin-Komplex Genen bei der AML zeigen [1], konnte durch Walter et al. 2013 ebenfalls eine erhöhte Inzidenz von Mutationen in Cohesin Genen beim MDS beobachtet werden [156]. Das Vorliegen von Cohesinmutationen in MDS unterstützt die Vermutung, dass auch *RAD21* Mutationen als Early Event einzustufen sind.

### **Cohesinmutationen in anderen Tumorerkrankungen**

Zur allgemeinen Rolle von *RAD21* bei der Krebsentstehung gilt, Veränderungen der Cohesin-Gene sind insgesamt selten (1%), können jedoch in mehreren unabhängigen Studien gefunden werden [15, 113, 154]. Deletionen in Genen wie *RAD21* und *STAG2* erschienen zunächst als isolierte Einzelfälle. Die Tatsache dass diese Gene allerdings Untereinheiten desselben Proteinkomplexes bilden, leitet zu der Annahme, dass Cohesin als neuer Akteur für die Entstehung von Leukämien in Frage kommt. Eine gestörte Funktion von Cohesin beeinträchtigt die erfolgreiche Trennung der Schwesterchromatiden bei der Zellteilung und wird mit chromosomaler Instabilität bei Darmkrebs in Verbindung gebracht [7, 104]. Außerdem kommt Cohesin auch eine Rolle bei der DNA-Reparatur und bei der Regulation der Genexpression zu. Horsfield et al. 2007 zeigten dies am Zebrafisch. Eine Inaktivierung von *RAD21* führte zu einer verminderten Expression des Transkriptionsfaktors *RUNX1* und zu einer verschlechterten Zelldifferenzierung. [53] Ein weiterer Transkriptionsfaktor der durch Cohesin beeinflusst wird ist *CTCF*, welches mit Nucleophosmin interagiert und Tumorsuppressorgene reguliert [109]. Schäden in *RAD21* oder *STAG2* könnten an der Entstehung von Leukämie durch verstärkte Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie *NPM1* oder *RUNX1* beteiligt sein. Eine solche unnatürliche Transkriptionshemmung könnte ein allgemeiner Mechanismus bei der Leukämieentstehung sein. Die Untersuchung von Mutationen in Cohesin-Komplex-Genen wie *RAD21* leistet einen Beitrag zur Katalogisierung von krankheitserzeugenden Genveränderungen bei der Leukämie und führt zu einem besseren Verständnis ihrer Rolle bei der Hämatopoese [113].

Eine C-terminale Spaltung von *RAD21* durch die Kaspasen 3 und 7 führt zu einem Spaltprodukt mit proapoptotischen Eigenschaften [19, 101]. Hinweisend für eine Assoziation von *RAD21* mit der Krebsentstehung ist, dass die Expression von *RAD21* in Leber- und Brustkrebszellen durch Hypoxie verringert wird [136], dass eine Überexpression von *RAD21* in Pankreaskrebszellen vorliegt [106], und dass die Expression von *RAD21* durch *BCRA1*, einem Tumorsuppressorgen in Brustkrebszellen, gesteigert wird [3]. Yamamoto et al. [165] fanden bei Untersuchungen von oralen Plattenepithelkarzinomzellen (PE-Ca.) eine enge Verbindung zwischen einer Herabregulation von *RAD21* und einer deutlich erhöhten Apoptoseresistenz von Tumorzellen. Außerdem wurde eine Rolle von

*RAD21* bei der Invasion und Metastasierung von Zellen des oralen PE-Ca. festgestellt [165].

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass dem Cohesin-Komplex Gen *RAD21* eine potentielle Rolle bei der Entstehung einer AML zukommt. *RAD21* kann damit als neuer Kandidat für genauere funktionelle Analysen in der Zellkultur oder im Mausmodell und die Untersuchung seiner genauen biologischen Wirkung auf die AML-Entstehung angesehen werden.

## 5 Zusammenfassung

Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) handelt es sich um eine heterogene klonale Erkrankung hämatopoetischer Stammzellen. Trotz anhaltender Bemühungen Diagnostik, Behandlung und Prognose der AML zu verbessern stellt die große Heterogenität und Komplexität der Erkrankung bis heute für Klinik und Forschung eine große Herausforderung dar. Um eine genauere prognostische Einschätzung der AML zu ermöglichen, wurden zyto- und histomorphologische Gesichtspunkte unter anderem durch molekulargenetische Erkenntnisse erweitert, welche in die aktuelle WHO-Klassifikation integriert wurden. Bezüglich der Risikostratifizierung einer AML haben jedoch bislang nur wenige molekulare Marker wie z.B. Nucleophosmin 1 (*NPM1*), CCAAT/enhancer binding protein alpha (*CEBPA*) und Fms-Related Tyrosine Kinase 3 (*FLT3-ITD*) den Weg in die klinische Praxis gefunden. Um jedoch alle Erkrankungsfälle zuverlässig molekulargenetisch erfassen zu können, insbesondere die große Gruppe der AML-Patienten mit zytogenetisch normalem Karyotyp (CN-AML), welche einen stark heterogenen klinischen Verlauf zeigt, bedarf es der Etablierung weiterer molekularer Biomarker. Die Identifikation entsprechender Genmutationen mithilfe neuer Sequenzierungsverfahren ermöglicht die Verbesserung risikoadaptierter Therapiestrategien für AML-Patienten und liefert mögliche Angriffspunkte für die Entwicklung neuartiger Behandlungsoptionen.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, eine mögliche Bedeutung von *RAD21*-Genmutationen als Biomarker bei der AML mit zytogenetisch normalem Karyotyp zu evaluieren. Hinweise auf eine Rolle des Cohesinkomplex-Gens *RAD21* bei AML lieferten Ergebnisse vorheriger Studien. Zu diesem Zweck wurde ein unabhängiges Patientenkollektiv bestehend aus insgesamt 170 CN-AML Fällen aus den Studien AMLSG-HD98-A, AMLSG-07-04 und AMLSG-06-04 bezüglich des Vorliegens einer entsprechenden Mutation mittels Sequenzierung nach Sanger untersucht. Ein möglicher Zusammenhang der gefundenen Mutationen mit biologischen und klinischen Parametern, dem klinischen Verlauf, sowie eine Verbindung zu anderen vorliegenden Mutationen in bekannten Markern wurden durch Analyse der erhobenen Patientendaten untersucht. Die genauen Auswirkungen der Mutationen auf Proteinebene wurden mithilfe der

computergestützten Analysewerkzeuge Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT), Polymorphism Phenotyping (PolyPhen) und Consensus Deleteriousness Score (Condel) getestet. Es wurden insgesamt 9 Mutationen innerhalb des Patientenkollektivs entdeckt, von denen 7 Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz zeigten. Die relativ kleine Inzidenz von 4,1% ist konsistent mit Ergebnissen entsprechender Untersuchungen zu *RAD21* in anderen publizierten Studien. Fälle mit *RAD21*-Mutationen zeigten eine gehäufte Assoziation mit *RAS*-Mutationen. Es wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen *RAD21*-Mutationen und den Parametern Alter, Geschlecht, AML-Typ, Hämoglobinwert, Thrombozytenzahl, Leukozytenzahl, Blastenanteil im peripheren Blut und im Knochenmark, Laktatdehydrogenase-Wert im Plasma, dem Vorliegen eines extramedullären Befalls durch leukämische Zellen und dem Vorhandensein einer Hepato- oder Splenomegalie gefunden. Weiterhin zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge bezüglich kompletter Remission, einer refraktären Erkrankung oder einem frühen Tod. Eine schwache Korrelation zu den genannten Werten kann jedoch aufgrund der relativ kleinen Fallzahl an mutierten Fällen nicht ausgeschlossen werden.

Laut aktueller Studienlage nimmt *RAD21* als Protein des Cohesin-Komplex Einfluss auf vielfältige Prozesse wie DNA-Reparatur, Telomerverkürzung, Chromatinorganisation, Splicevorgänge, epigenetische Regulation und Gentranskription durch Transkriptionsfaktoren. Diese wichtigen Aufgaben lassen *RAD21*-Mutationen als vielversprechenden Kandidaten für zukünftige weiterführende funktionelle Untersuchungen mit größeren Patientenkohorten erscheinen. Insbesondere in Kombination mit Mutationen in den restlichen Cohesinkomplex-Genen *SMC1*, *SMC3* und *STAG1/2* könnten funktionell synergistische Zusammenhänge bestehen, welche für die Entstehung und Prognose von myeloischen Erkrankungen wie der AML eine Rolle spielen. Entsprechend können zukünftige Einblicke in die mit *RAD21*-Mutationen verbundenen Veränderungen biologischer Funktionen zur Verbesserung sowohl bei der Risikostratifizierung von AML-Patienten, als auch bei deren Therapie beitragen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. *Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia.*  
N Engl J Med 368: 2059-74 (2013)
2. Abdel-Wahab O, Manshoury T, Patel J, Harris K, Yao J, Hedvat C, Heguy A, Bueso-Ramos C, Kantarjian H, Levine R L, and Verstovsek S: *Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias.*  
Cancer Res 70: 447-52 (2010)
3. Atalay A, Crook T, Ozturk M, and Yulug I G: *Identification of genes induced by BRCA1 in breast cancer cells.*  
Biochem Biophys Res Commun 299: 839-46 (2002)
4. Atienza J M, Roth R B, Rosette C, Smylie K J, Kammerer S, Rehbock J, Ekblom J, and Denissenko M F: *Suppression of RAD21 gene expression decreases cell growth and enhances cytotoxicity of etoposide and bleomycin in human breast cancer cells.*  
Mol Cancer Ther 4: 361-8 (2005)
5. Bacher U, Haferlach T, Schoch C, Kern W, and Schnittger S: *Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients.*  
Blood 107: 3847-53 (2006)
6. Bacher U, Schnittger S, and Haferlach T: *Molecular genetics in acute myeloid leukemia.*  
Curr Opin Oncol 22: 646-55 (2010)
7. Barber T D, McManus K, Yuen K W, Reis M, Parmigiani G, Shen D, Barrett I, Nouhi Y, Spencer F, Markowitz S, Velculescu V E, Kinzler K W, Vogelstein B, Lengauer C, and Hieter P: *Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers.*  
Proc Natl Acad Sci U S A 105: 3443-8 (2008)
8. Bartova E, Krejci J, Harnicarova A, Galiova G, and Kozubek S: *Histone modifications and nuclear architecture: a review.*  
J Histochem Cytochem 56: 711-21 (2008)
9. Bauerschmidt C, Arrichiello C, Burdak-Rothkamm S, Woodcock M, Hill M A, Stevens D L, and Rothkamm K: *Cohesin promotes the repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks in replicated chromatin.*  
Nucleic Acids Res 38: 477-87 (2010)
10. Bennett J M, Catovsky D, Daniel M T, Flandrin G, Galton D A, Gralnick H R, and Sultan C: *Proposed revised criteria for the classification of acute*



- myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group.*  
Ann Intern Med 103: 620-5 (1985)
11. Betz B L and Hess J L: *Acute myeloid leukemia diagnosis in the 21st century.*  
Arch Pathol Lab Med 134: 1427-33 (2010)
  12. Bienz M, Ludwig M, Leibundgut E O, Mueller B U, Ratschiller D, Solenthaler M, Fey M F, and Pabst T: *Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype.*  
Clin Cancer Res 11: 1416-24 (2005)
  13. Boissel N, Leroy H, Brethon B, Philippe N, de Botton S, Auvrignon A, Raffoux E, Leblanc T, Thomas X, Hermine O, Quesnel B, Baruchel A, Leverger G, Dombret H, and Preudhomme C: *Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML).*  
Leukemia 20: 965-70 (2006)
  14. Borer R A, Lehner C F, Eppenberger H M, and Nigg E A: *Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm.*  
Cell 56: 379-90 (1989)
  15. Bullinger L, Kronke J, Schon C, Radtke I, Urlbauer K, Botzenhardt U, Gaidzik V, Cario A, Senger C, Schlenk R F, Downing J R, Holzmann K, Dohner K, and Dohner H: *Identification of acquired copy number alterations and uniparental disomies in cytogenetically normal acute myeloid leukemia using high-resolution single-nucleotide polymorphism analysis.*  
Leukemia 24: 438-49 (2010)
  16. Byrd J C, Mrozek K, Dodge R K, Carroll A J, Edwards C G, Arthur D C, Pettenati M J, Patil S R, Rao K W, Watson M S, Koduru P R, Moore J O, Stone R M, Mayer R J, Feldman E J, Davey F R, Schiffer C A, Larson R A, and Bloomfield C D: *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: 4325-36 (2002)
  17. Byrd J C, Ruppert A S, Mrozek K, Carroll A J, Edwards C G, Arthur D C, Pettenati M J, Stamberg J, Koduru P R, Moore J O, Mayer R J, Davey F R, Larson R A, and Bloomfield C D: *Repetitive cycles of high-dose cytarabine benefit patients with acute myeloid leukemia and inv(16)(p13q22) or t(16;16)(p13;q22): results from CALGB 8461.*  
J Clin Oncol 22: 1087-94 (2004)
  18. Chan S M and Majeti R: *Role of DNMT3A, TET2, and IDH1/2 mutations in pre-leukemic stem cells in acute myeloid leukemia.*  
Int J Hematol 98: 648-57 (2013)

19. Chen F, Kamradt M, Mulcahy M, Byun Y, Xu H, McKay M J, and Cryns V L: *Caspase proteolysis of the cohesin component RAD21 promotes apoptosis.*  
J Biol Chem 277: 16775-81 (2002)
20. Conte N, Varela I, Grove C, Manes N, Yusa K, Moreno T, Segonds-Pichon A, Bench A, Gudgin E, Herman B, Bolli N, Ellis P, Haddad D, Costeas P, Rad R, Scott M, Huntly B, Bradley A, and Vassiliou G S: *Detailed molecular characterisation of acute myeloid leukaemia with a normal karyotype using targeted DNA capture.*  
Leukemia 27: 1820-5 (2013)
21. Conway O'Brien E, Prideaux S, and Chevassut T: *The epigenetic landscape of acute myeloid leukemia.*  
Adv Hematol 14: 103-175 (2014)
22. Dang L, Jin S, and Su S M: *IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia.*  
Trends Mol Med 16: 387-97 (2010)
23. Dang L, White D W, Gross S, Bennett B D, Bittinger M A, Driggers E M, Fantin V R, Jang H G, Jin S, Keenan M C, Marks K M, Prins R M, Ward P S, Yen K E, Liao L M, Rabinowitz J D, Cantley L C, Thompson C B, Vander Heiden M G, and Su S M: *Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate.*  
Nature 462: 739-44 (2009)
24. Davidson C J, Zeringer E, Champion K J, Gauthier M P, Wang F, Boonyaratanakornkit J, Jones J R, and Schreiber E: *Improving the limit of detection for Sanger sequencing: A comparison of methodologies for KRAS variant detection.*  
Biotechniques 12: 1940-9818 (2012)
25. Deng Z, Wang Z, Stong N, Plasschaert R, Moczan A, Chen H S, Hu S, Wikramasinghe P, Davuluri R V, Bartolomei M S, Riethman H, and Lieberman P M: *A role for CTCF and cohesin in subtelomere chromatin organization, TERRA transcription, and telomere end protection.*  
EMBO J 31: 4165-78 (2012)
26. Ding L, Ley T J, Larson D E, Miller C A, Koboldt D C, Welch J S, Ritchey J K, Young M A, Lamprecht T, McLellan M D, McMichael J F, Wallis J W, Lu C, Shen D, Harris C C, Dooling D J, Fulton R S, Fulton L L, Chen K, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, Magrini V J, Cook L, McGrath S D, Vickery T L, Wendl M C, Heath S, Watson M A, Link D C, Tomasson M H, Shannon W D, Payton J E, Kulkarni S, Westervelt P, Walter M J, Graubert T A, Mardis E R, Wilson R K, and DiPersio J F: *Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing.*  
Nature 481: 506-10 (2012)

27. Dohner H, Estey E H, Amadori S, Appelbaum F R, Buchner T, Burnett A K, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson R A, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele G J, Sanz M A, Sierra J, Tallman M S, Lowenberg B, and Bloomfield C D: *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet.* Blood 115: 453-74 (2010)
28. Dohner K, Schlenk R F, Habdank M, Scholl C, Rucker F G, Corbacioglu A, Bullinger L, Frohling S, and Dohner H: *Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations.* Blood 106: 3740-6 (2005)
29. Dolnik A, Engelmann J C, Scharfenberger-Schmeer M, Mauch J, Kelkenberg-Schade S, Haldemann B, Fries T, Kronke J, Kuhn M W, Paschka P, Kayser S, Wolf S, Gaidzik V I, Schlenk R F, Rucker F G, Dohner H, Lottaz C, Dohner K, and Bullinger L: *Commonly altered genomic regions in acute myeloid leukemia are enriched for somatic mutations involved in chromatin remodeling and splicing.* Blood 120: 83-92 (2012)
30. Dorsett D: *Cohesin: genomic insights into controlling gene transcription and development.* Curr Opin Genet Dev 21: 199-206 (2011)
31. Dumbar T S, Gentry G A, and Olson M O: *Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids.* Biochemistry 28: 9495-501 (1989)
32. Essafi A, Webb A, Berry R L, Slight J, Burn S F, Spraggon L, Velecela V, Martinez-Estrada O M, Wiltshire J H, Roberts S G, Brownstein D, Davies J A, Hastie N D, and Hohenstein P: *A wt1-controlled chromatin switching mechanism underpins tissue-specific wnt4 activation and repression.* Dev Cell 21: 559-74 (2011)
33. Estey E and Dohner H: *Acute myeloid leukaemia.* Lancet 368: 1894-907 (2006)
34. 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, Pettrossi V, Saglio G, Mandelli F, Lo-Coco F, Pelicci P G, and Martelli M F: *Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype.* N Engl J Med 352: 254-66 (2005)
35. Ferrara F and Pinto A: *Acute myeloid leukemia in the elderly: current therapeutic results and perspectives for clinical research.* Rev Recent Clin Trials 2: 33-41 (2007)

36. Figueroa M E, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward P S, Patel J, Shih A, Li Y, Bhagwat N, Vasanthakumar A, Fernandez H F, Tallman M S, Sun Z, Wolniak K, Peeters J K, Liu W, Choe S E, Fantin V R, Paietta E, Lowenberg B, Licht J D, Godley L A, Delwel R, Valk P J, Thompson C B, Levine R L, and Melnick A: *Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation.*  
Cancer Cell 18: 553-67 (2010)
37. Frohling S, Schlenk R F, Kayser S, Morhardt M, Benner A, Dohner K, and Dohner H: *Cytogenetics and age are major determinants of outcome in intensively treated acute myeloid leukemia patients older than 60 years: results from AMLSG trial AML HD98-B.*  
Blood 108: 3280-8 (2006)
38. Frohling S, Schlenk R F, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Dohner H, and Dohner K: *CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations.*  
J Clin Oncol 22: 624-33 (2004)
39. Frohling S, Scholl C, Gilliland D G, and Levine R L: *Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications.*  
J Clin Oncol 23: 6285-95 (2005)
40. Gabaldon T and Huynen M A: *Prediction of protein function and pathways in the genome era.*  
Cell Mol Life Sci 61: 930-44 (2004)
41. Gerlich D, Koch B, Dupeux F, Peters J M, and Ellenberg J: *Live-cell imaging reveals a stable cohesin-chromatin interaction after but not before DNA replication.*  
Curr Biol 16: 1571-8 (2006)
42. Gilliland D G: *Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy.*  
Semin Hematol 39: 6-11 (2002)
43. Gonzalez-Perez A and Lopez-Bigas N: *Improving the assessment of the outcome of nonsynonymous SNVs with a consensus deleteriousness score, Condel.*  
Am J Hum Genet 88: 440-9 (2011)
44. Gosalia N, Neems D, Kerschner J L, Kosak S T, and Harris A: *Architectural proteins CTCF and cohesin have distinct roles in modulating the higher order structure and expression of the CFTR locus.*  
Nucleic Acids Res 42: 9612-22 (2014)
45. Guacci V, Koshland D, and Strunnikov A: *A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in S. cerevisiae.*

- Cell 91: 47-57 (1997)
46. Hadjur S, Williams L M, Ryan N K, Cobb B S, Sexton T, Fraser P, Fisher A G, and Merckenschlager M: *Cohesins form chromosomal cis-interactions at the developmentally regulated IFNG locus.*  
Nature 460: 410-3 (2009)
  47. Haering C H, Farcas A M, Arumugam P, Metson J, and Nasmyth K: *The cohesin ring concatenates sister DNA molecules.*  
Nature 454: 297-301 (2008)
  48. Hakimi M A, Bochar D A, Schmiesing J A, Dong Y, Barak O G, Speicher D W, Yokomori K, and Shiekhattar R: *A chromatin remodelling complex that loads cohesin onto human chromosomes.*  
Nature 418: 994-8 (2002)
  49. Hanahan D and Weinberg R A: *Hallmarks of cancer: the next generation.*  
Cell 144: 646-74 (2011)
  50. Hellenbrecht A. M D, Gökbuget N.: Aktualisierung der ALL-Inzidenzen (M. Hartog/TP2)  
[http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/epidemiologie/leukaemiehaeufigkeit/index\\_ger.html](http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/epidemiologie/leukaemiehaeufigkeit/index_ger.html) (2007)
  51. Hirano T: *At the heart of the chromosome: SMC proteins in action.*  
Nat Rev Mol Cell Biol 7: 311-22 (2006)
  52. Hood L and Rowen L: *The human genome project: big science transforms biology and medicine.*  
Genome Med 5: 79 (2013)
  53. Horsfield J A, Anagnostou S H, Hu J K, Cho K H, Geisler R, Lieschke G, Crosier K E, and Crosier P S: *Cohesin-dependent regulation of Runx genes.*  
Development 134: 2639-49 (2007)
  54. Hu S, Niu H, Inaba H, Orwick S, Rose C, Panetta J C, Yang S, Pounds S, Fan Y, Calabrese C, Rehg J E, Campana D, Rubnitz J E, and Baker S D: *Activity of the multikinase inhibitor sorafenib in combination with cytarabine in acute myeloid leukemia.*  
J Natl Cancer Inst 103: 893-905 (2011)
  55. Illmer T, Thiede C, Fredersdorf A, Stadler S, Neubauer A, Ehninger G, and Schaich M: *Activation of the RAS pathway is predictive for a chemosensitive phenotype of acute myelogenous leukemia blasts.*  
Clin Cancer Res 11: 3217-24 (2005)
  56. Jiang H and Peterlin B M: *Differential chromatin looping regulates CD4 expression in immature thymocytes.*  
Mol Cell Biol 28: 907-12 (2008)

57. Ju X: *New roles of hRAD21 in alternative lengthening of telomeres in cancer genesis.*  
Cancer Biol Ther 9: 984-5 (2010)
58. Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Mollgard L, Stockelberg D, Tidefelt U, Wahlin A, and Hoglund M: *Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry.*  
Blood 113: 4179-87 (2009)
59. Juliusson G, Lazarevic V, Horstedt A S, Hagberg O, and Hoglund M: *Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed.*  
Blood 119: 3890-9 (2012)
60. Kagey M H, Newman J J, Bilodeau S, Zhan Y, Orlando D A, van Berkum N L, Ebmeier C C, Goossens J, Rahl P B, Levine S S, Taatjes D J, Dekker J, and Young R A: *Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture.*  
Nature 467: 430-5 (2010)
61. Kane E V, Roman E, Cartwright R, Parker J, and Morgan G: *Tobacco and the risk of acute leukaemia in adults.*  
Br J Cancer 81: 1228-33 (1999)
62. Kelly L M, Kutok J L, Williams I R, Boulton C L, Amaral S M, Curley D P, Ley T J, and Gilliland D G: *PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model.*  
Proc Natl Acad Sci U S A 99: 8283-8 (2002)
63. Kern W B G, v.Schilling Ch, Haferlach T, Adorf D, Jehn U, Waterhouse C, Brack N, and Schnittger S P, W, Hiddemann W: *Akute myeloische Leukämie (AML) beim Erwachsenen. In: Hiddemann W, Haferlach T, Manual Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome.*  
Zuckschwerdt Verlag Tumorzentrum München 2: 17-48 (2003)
64. Kern W, Kohlmann A, Schnittger S, Schoch C, and Haferlach T: *Role of gene expression profiling for diagnosing acute leukemias.*  
Rev Clin Exp Hematol 9: 1-9 (2005)
65. Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Jinnai I, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Oh H, Motoji T, Omoto E, Saito H, Ohno R, and Ueda R: *Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia.*  
Blood 93: 3074-80 (1999)
66. Kronke J, Bullinger L, Teleanu V, Tschurtz F, Gaidzik V I, Kuhn M W, Rucker F G, Holzmann K, Paschka P, Kapp-Schworer S, Spath D, Kindler T, Schittenhelm M, Krauter J, Ganser A, Gohring G, Schlegelberger B,

- Schlenk R F, Dohner H, and Dohner K: *Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia.*  
Blood 122: 100-8 (2013)
67. Laugsch M, Seebach J, Schnittler H, and Jessberger R: *Imbalance of SMC1 and SMC3 cohesins causes specific and distinct effects.*  
PLoS One 8: 65-149 (2013)
68. Leroy H, Roumier C, Huyghe P, Biggio V, Fenaux P, and Preudhomme C: *CEBPA point mutations in hematological malignancies.*  
Leukemia 19: 329-34 (2005)
69. Lessard J and Sauvageau G: *Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells.*  
Nature 423: 255-60 (2003)
70. Ley T J, Ding L, Walter M J, McLellan M D, Lamprecht T, Larson D E, Kandoth C, Payton J E, Baty J, Welch J, Harris C C, Lichti C F, Townsend R R, Fulton R S, Dooling D J, Koboldt D C, Schmidt H, Zhang Q, Osborne J R, Lin L, O'Laughlin M, McMichael J F, Delehaunty K D, McGrath S D, Fulton L A, Magrini V J, Vickery T L, Hundal J, Cook L L, Conyers J J, Swift G W, Reed J P, Alldredge P A, Wylie T, Walker J, Kalicki J, Watson M A, Heath S, Shannon W D, Varghese N, Nagarajan R, Westervelt P, Tomasson M H, Link D C, Graubert T A, DiPersio J F, Mardis E R, and Wilson R K: *DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia.*  
N Engl J Med 363: 2424-33 (2010)
71. Ley T J, Mardis E R, Ding L, Fulton B, McLellan M D, Chen K, Dooling D, Dunford-Shore B H, McGrath S, Hickenbotham M, Cook L, Abbott R, Larson D E, Koboldt D C, Pohl C, Smith S, Hawkins A, Abbott S, Locke D, Hillier L W, Miner T, Fulton L, Magrini V, Wylie T, Glasscock J, Conyers J, Sander N, Shi X, Osborne J R, Minx P, Gordon D, Chinwalla A, Zhao Y, Ries R E, Payton J E, Westervelt P, Tomasson M H, Watson M, Baty J, Ivanovich J, Heath S, Shannon W D, Nagarajan R, Walter M J, Link D C, Graubert T A, DiPersio J F, and Wilson R K: *DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome.*  
Nature 456: 66-72 (2008)
72. Link D C, Schuettpelz L G, Shen D, Wang J, Walter M J, Kulkarni S, Payton J E, Ivanovich J, Goodfellow P J, Le Beau M, Koboldt D C, Dooling D J, Fulton R S, Bender R H, Fulton L L, Delehaunty K D, Fronick C C, Appelbaum E L, Schmidt H, Abbott R, O'Laughlin M, Chen K, McLellan M D, Varghese N, Nagarajan R, Heath S, Graubert T A, Ding L, Ley T J, Zambetti G P, Wilson R K, and Mardis E R: *Identification of a novel TP53 cancer susceptibility mutation through whole-genome sequencing of a patient with therapy-related AML.*  
JAMA 305: 1568-76 (2011)
73. Liu P, Tarle S A, Hajra A, Claxton D F, Marlton P, Freedman M, Siciliano M J, and Collins F S: *Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia.*

- Science 261: 1041-4 (1993)
74. Lowenberg B: *Strategies in the treatment of acute myeloid leukemia*. Haematologica 89: 1029-32 (2004)
75. Lowenberg B, Downing J R, and Burnett A: *Acute myeloid leukemia*. N Engl J Med 341: 1051-62 (1999)
76. Lugthart S, Groschel S, Beverloo H B, Kayser S, Valk P J, van Zelder-Bhola S L, Jan Ossenkuppe G, Vellenga E, van den Berg-de Ruyter E, Schanz U, Verhoef G, Vandenberghe P, Ferrant A, Kohne C H, Pfreundschuh M, Horst H A, Koller E, von Lilienfeld-Toal M, Bentz M, Ganser A, Schlegelberger B, Jotterand M, Krauter J, Pabst T, Theobald M, Schlenk R F, Delwel R, Dohner K, Lowenberg B, and Dohner H: *Clinical, molecular, and prognostic significance of WHO type inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2) and various other 3q abnormalities in acute myeloid leukemia*. J Clin Oncol 28: 3890-8 (2010)
77. Marcucci G, Mrozek K, and Bloomfield C D: *Molecular heterogeneity and prognostic biomarkers in adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics*. Curr Opin Hematol 12: 68-75 (2005)
78. Mardis E R, Ding L, Dooling D J, Larson D E, McLellan M D, Chen K, Koboldt D C, Fulton R S, Delehaunty K D, McGrath S D, Fulton L A, Locke D P, Magrini V J, Abbott R M, Vickery T L, Reed J S, Robinson J S, Wylie T, Smith S M, Carmichael L, Eldred J M, Harris C C, Walker J, Peck J B, Du F, Dukes A F, Sanderson G E, Brummett A M, Clark E, McMichael J F, Meyer R J, Schindler J K, Pohl C S, Wallis J W, Shi X, Lin L, Schmidt H, Tang Y, Haipek C, Wiechert M E, Ivy J V, Kalicki J, Elliott G, Ries R E, Payton J E, Westervelt P, Tomasson M H, Watson M A, Baty J, Heath S, Shannon W D, Nagarajan R, Link D C, Walter M J, Graubert T A, DiPersio J F, Wilson R K, and Ley T J: *Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome*. N Engl J Med 361: 1058-66 (2009)
79. Marsman J, O'Neill A C, Kao B R, Rhodes J M, Meier M, Antony J, Monnich M, and Horsfield J A: *Cohesin and CTCF differentially regulate spatiotemporal runx1 expression during zebrafish development*. Biochim Biophys Acta 1839: 50-61 (2014)
80. Martelli A M, Nyakern M, Tabellini G, Bortul R, Tazzari P L, Evangelisti C, and Cocco L: *Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutic implications for human acute myeloid leukemia*. Leukemia 20: 911-28 (2006)
81. Mayer R J, Davis R B, Schiffer C A, Berg D T, Powell B L, Schulman P, Omura G A, Moore J O, McIntyre O R, and Frei E, 3rd: *Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia*. Cancer and Leukemia Group B.



- N Engl J Med 331: 896-903 (1994)
82. Metzker M L: *Sequencing technologies - the next generation.*  
Nat Rev Genet 11: 31-46 (2010)
83. Meyerson M, Gabriel S, and Getz G: *Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing.*  
Nat Rev Genet 11: 685-96 (2010)
84. Michaelis C, Ciosk R, and Nasmyth K: *Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids.*  
Cell 91: 35-45 (1997)
85. Miele A and Dekker J: *Long-range chromosomal interactions and gene regulation.*  
Mol Biosyst 4: 1046-57 (2008)
86. Moore D P and Orr-Weaver T L: *Chromosome segregation during meiosis: building an unambivalent bivalent.*  
Curr Top Dev Biol 37: 263-99 (1998)
87. Mrozek K, Dohner H, and Bloomfield C D: *Influence of new molecular prognostic markers in patients with karyotypically normal acute myeloid leukemia: recent advances.*  
Curr Opin Hematol 14: 106-14 (2007)
88. Mrozek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman S P, and Bloomfield C D: *Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification?*  
Blood 109: 431-48 (2007)
89. Mullighan C G, Zhang J, Kasper L H, Lerach S, Payne-Turner D, Phillips L A, Heatley S L, Holmfeldt L, Collins-Underwood J R, Ma J, Buetow K H, Pui C H, Baker S D, Brindle P K, and Downing J R: *CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia.*  
Nature 471: 235-9 (2011)
90. Muntoni A and Reddel R R: *The first molecular details of ALT in human tumor cells.*  
Hum Mol Genet 14 Spec No. 2: 191-6 (2005)
91. Nabetani A, Yokoyama O, and Ishikawa F: *Localization of hRad9, hHus1, hRad1, and hRad17 and caffeine-sensitive DNA replication at the alternative lengthening of telomeres-associated promyelocytic leukemia body.*  
J Biol Chem 279: 25849-57 (2004)
92. Nakanishi M, Tanaka K, Shintani T, Takahashi T, and Kamada N: *Chromosomal instability in acute myelocytic leukemia and myelodysplastic syndrome patients among atomic bomb survivors.*

- J Radiat Res 40: 159-67 (1999)
93. Nasmyth K and Haering C H: *Cohesin: its roles and mechanisms*. Annu Rev Genet 43: 525-58 (2009)
94. Nasmyth K, Peters J M, and Uhlmann F: *Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids*. Science 288: 1379-85 (2000)
95. Ng P C and Henikoff S: *Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function*. Annu Rev Genomics Hum Genet 7: 61-80 (2006)
96. Nitzsche A, Paszkowski-Rogacz M, Matarese F, Janssen-Megens E M, Hubner N C, Schulz H, de Vries I, Ding L, Huebner N, Mann M, Stunnenberg H G, and Buchholz F: *RAD21 cooperates with pluripotency transcription factors in the maintenance of embryonic stem cell identity*. PLoS One 6: 194-70 (2011)
97. Oki Y and Issa J P: *Epigenetic mechanisms in AML - a target for therapy*. Cancer Treat Res 145: 19-40 (2010)
98. Onn I, Heidinger-Pauli J M, Guacci V, Unal E, and Koshland D E: *Sister chromatid cohesion: a simple concept with a complex reality*. Annu Rev Cell Dev Biol 24: 105-29 (2008)
99. Paschka P, Schlenk R F, Gaidzik V I, Habdank M, Kronke J, Bullinger L, Spath D, Kayser S, Zucknick M, Gotze K, Horst H A, Germing U, Dohner H, and Dohner 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: 3636-43 (2010)
100. Patel J P, Gonen M, Figueroa M E, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, Van Vlierberghe P, Dolgalev I, Thomas S, Aminova O, Huberman K, Cheng J, Viale A, Socci N D, Heguy A, Cherry A, Vance G, Higgins R R, Ketterling R P, Gallagher R E, Litzow M, van den Brink M R, Lazarus H M, Rowe J M, Luger S, Ferrando A, Paietta E, Tallman M S, Melnick A, Abdel-Wahab O, and Levine R L: *Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia*. N Engl J Med 366: 1079-89 (2012)
101. Pati D, Zhang N, and Plon S E: *Linking sister chromatid cohesion and apoptosis: role of Rad21*. Mol Cell Biol 22: 8267-77 (2002)
102. Pecorino L: *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets and Therapeutics* Oxford University Press Oxford 3: 53 (2008)

103. Pelengaris S, Khan M, and Evan G: *c-MYC: more than just a matter of life and death.*  
Nat Rev Cancer 2: 764-76 (2002)
104. Peters J M, Tedeschi A, and Schmitz J: *The cohesin complex and its roles in chromosome biology.*  
Genes Dev 22: 3089-114 (2008)
105. Poleshko A, Einarson M B, Shalginskikh N, Zhang R, Adams P D, Skalka A M, and Katz R A: *Identification of a functional network of human epigenetic silencing factors.*  
J Biol Chem 285: 422-33 (2010)
106. Porkka K P, Tammela T L, Vessella R L, and Visakorpi T: *RAD21 and KIAA0196 at 8q24 are amplified and overexpressed in prostate cancer.*  
Genes Chromosomes Cancer 39: 1-10 (2004)
107. Rakheja D, Konoplev S, Medeiros L J, and Chen W: *IDH mutations in acute myeloid leukemia.*  
Hum Pathol 43: 1541-51 (2012)
108. Ramensky V, Bork P, and Sunyaev S: *Human non-synonymous SNPs: server and survey.*  
Nucleic Acids Res 30: 3894-900 (2002)
109. Recillas-Targa F, De La Rosa-Velazquez I A, Soto-Reyes E, and Benitez-Bribiesca L: *Epigenetic boundaries of tumour suppressor gene promoters: the CTCF connection and its role in carcinogenesis.*  
J Cell Mol Med 10: 554-68 (2006)
110. Rhodes J M, Bentley F K, Print C G, Dorsett D, Misulovin Z, Dickinson E J, Crosier K E, Crosier P S, and Horsfield J A: *Positive regulation of c-Myc by cohesin is direct, and evolutionarily conserved.*  
Dev Biol 344: 637-49 (2010)
111. Rieder C L and Salmon E D: *The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis.*  
Trends Cell Biol 8: 310-8 (1998)
112. Riva L, Luzi L, and Pelicci P G: *Genomics of acute myeloid leukemia: the next generation.*  
Front Oncol 2: 40 (2012)
113. Rocquain J, Gelsi-Boyer V, Adelaide J, Murati A, Carbuccia N, Vey N, Birnbaum D, Mozziconacci M J, and Chaffanet M: *Alteration of cohesin genes in myeloid diseases.*  
Am J Hematol 85: 717-9 (2010)
114. Rowe J M, Neuberg D, Friedenbergs W, Bennett J M, Paietta E, Makary A Z, Liesveld J L, Abboud C N, Dewald G, Hayes F A, Tallman M S, and Wiernik P H: *A phase 3 study of three induction regimens and of priming*

- with GM-CSF in older adults with acute myeloid leukemia: a trial by the Eastern Cooperative Oncology Group.*  
Blood 103: 479-85 (2004)
115. Rucker F G, Bullinger L, Schwaenen C, Lipka D B, Wessendorf S, Frohling S, Bentz M, Miller S, Scholl C, Schlenk R F, Radlwimmer B, Kestler H A, Pollack J R, Lichter P, Dohner K, and Dohner H: *Disclosure of candidate genes in acute myeloid leukemia with complex karyotypes using microarray-based molecular characterization.*  
J Clin Oncol 24: 3887-94 (2006)
116. Rucker F G, Schlenk R F, Bullinger L, Kayser S, Teleanu V, Kett H, Habdank M, Kugler C M, Holzmann K, Gaidzik V I, Paschka P, Held G, von Lilienfeld-Toal M, Lubbert M, Frohling S, Zenz T, Krauter J, Schlegelberger B, Ganser A, Lichter P, Dohner K, and Dohner H: *TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome.*  
Blood 119: 2114-21 (2012)
117. Ryan M C, Zeeberg B R, Caplen N J, Cleland J A, Kahn A B, Liu H, and Weinstein J N: *SpliceCenter: a suite of web-based bioinformatic applications for evaluating the impact of alternative splicing on RT-PCR, RNAi, microarray, and peptide-based studies.*  
BMC Bioinformatics 9: 313 (2008)
118. Schar P, Fasi M, and Jessberger R: *SMC1 coordinates DNA double-strand break repair pathways.*  
Nucleic Acids Res 32: 3921-9 (2004)
119. Schlenk R F, Benner A, Hartmann F, del Valle F, Weber C, Pralle H, Fischer J T, Gunzer U, Pezzutto A, Weber W, Grimminger W, Preiss J, Hensel M, Frohling S, Dohner K, Haas R, and Dohner H: *Risk-adapted postremission therapy in acute myeloid leukemia: results of the German multicenter AML HD93 treatment trial.*  
Leukemia 17: 1521-8 (2003)
120. Schlenk R F and Dohner H: *Genomic applications in the clinic: use in treatment paradigm of acute myeloid leukemia.*  
Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2013: 324-30 (2013)
121. Schlenk R F, Dohner K, and Dohner H: *[Acute myeloid leukemia. Genetic diagnostics and molecular therapy].*  
Internist (Berl) 54: 171-8 (2013)
122. Schmidt D, Schwalie P C, Ross-Innes C S, Hurtado A, Brown G D, Carroll J S, Flicek P, and Odom D T: *A CTCF-independent role for cohesin in tissue-specific transcription.*  
Genome Res 20: 578-88 (2010)

123. Schnittger S, Haferlach C, Ulke M, Alpermann T, Kern W, and Haferlach T: *IDH1 mutations are detected in 6.6% of 1414 AML patients and are associated with intermediate risk karyotype and unfavorable prognosis in adults younger than 60 years and unmutated NPM1 status.* Blood 116: 5486-96 (2010)
124. Seyfried T N and Shelton L M: *Cancer as a metabolic disease.* Nutr Metab (Lond) 7: 7 (2010)
125. Shen Y, Zhu Y M, Fan X, Shi J Y, Wang Q R, Yan X J, Gu Z H, Wang Y Y, Chen B, Jiang C L, Yan H, Chen F F, Chen H M, Chen Z, Jin J, and Chen S J: *Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia.* Blood 118: 5593-603 (2011)
126. Shi H X, Jiang B, Qiu J Y, Lu X J, Fu J F, Wang D B, and Lu D P: *[Studies of treatment strategy and prognosis on acute myeloid leukemia with chromosome 8 and 21 translocation].* Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi 26: 481-4 (2005)
127. Shih A H, Abdel-Wahab O, Patel J P, and Levine R L: *The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies.* Nat Rev Cancer 12: 599-612 (2012)
128. Shlush L I, Zandi S, Mitchell A, Chen W C, Brandwein J M, Gupta V, Kennedy J A, Schimmer A D, Schuh A C, Yee K W, McLeod J L, Doedens M, Medeiros J J, Marke R, Kim H J, Lee K, McPherson J D, Hudson T J, Brown A M, Yousif F, Trinh Q M, Stein L D, Minden M D, Wang J C, and Dick J E: *Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia.* Nature 506: 328-33 (2014)
129. Shukla S, Kavak E, Gregory M, Imashimizu M, Shutinoski B, Kashlev M, Oberdoerffer P, Sandberg R, and Oberdoerffer S: *CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing.* Nature 479: 74-9 (2011)
130. Sjogren C and Nasmyth K: *Sister chromatid cohesion is required for postreplicative double-strand break repair in Saccharomyces cerevisiae.* Curr Biol 11: 991-5 (2001)
131. Skibbens R V, Maradeo M, and Eastman L: *Fork it over: the cohesion establishment factor Ctf7p and DNA replication.* J Cell Sci 120: 2471-7 (2007)
132. Slovak M L, Kopecky K J, Cassileth P A, Harrington D H, Theil K S, Mohamed A, Paietta E, Willman C L, Head D R, Rowe J M, Forman S J, and Appelbaum F R: *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: 4075-83 (2000)

133. Smith M A, McCaffrey R P, and Karp J E: *The secondary leukemias: challenges and research directions.*  
J Natl Cancer Inst 88: 407-18 (1996)
134. Sofueva S, Yaffe E, Chan W C, Georgopoulou D, Vietri Rudan M, Mira-Bontenbal H, Pollard S M, Schroth G P, Tanay A, and Hadjur S: *Cohesin-mediated interactions organize chromosomal domain architecture.*  
EMBO J 32: 3119-29 (2013)
135. Sonoda E, Matsusaka T, Morrison C, Vagnarelli P, Hoshi O, Ushiki T, Nojima K, Fukagawa T, Waizenegger I C, Peters J M, Earnshaw W C, and Takeda S: *Scc1/Rad21/Mcd1 is required for sister chromatid cohesion and kinetochore function in vertebrate cells.*  
Dev Cell 1: 759-70 (2001)
136. Sook Kim M, Hyen Baek J, Bae M K, and Kim K W: *Human rad21 gene, hHR21(SP), is downregulated by hypoxia in human tumor cells.*  
Biochem Biophys Res Commun 281: 1106-12 (2001)
137. Stirewalt D L, Kopecky K J, Meshinchi S, Appelbaum F R, Slovak M L, Willman C L, and Radich J P: *FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia.*  
Blood 97: 3589-95 (2001)
138. Stirewalt D L and Radich J P: *The role of FLT3 in haematopoietic malignancies.*  
Nat Rev Cancer 3: 650-65 (2003)
139. Suela J, Alvarez S, and Cigudosa J C: *DNA profiling by arrayCGH in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes.*  
Cytogenet Genome Res 118: 304-9 (2007)
140. Tark-Dame M, Jerabek H, Manders E M, Heermann D W, and van Driel R: *Depletion of the Chromatin Looping Proteins CTCF and Cohesin Causes Chromatin Compaction: Insight into Chromatin Folding by Polymer Modelling.*  
PLoS Comput Biol 10: 10038-77 (2014)
141. Tatebayashi K, Kato J, and Ikeda H: *Isolation of a Schizosaccharomyces pombe rad21ts mutant that is aberrant in chromosome segregation, microtubule function, DNA repair and sensitive to hydroxyurea: possible involvement of Rad21 in ubiquitin-mediated proteolysis.*  
Genetics 148: 49-57 (1998)
142. Tefferi A and Vardiman J W: *Myelodysplastic syndromes.*  
N Engl J Med 361: 1872-85 (2009)
143. Tenen D G: *Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way.*  
Nat Rev Cancer 3: 89-101 (2003)

144. Thol F, Bollin R, Gehlhaar M, Walter C, Dugas M, Suchanek K J, Kirchner A, Huang L, Chaturvedi A, Wichmann M, Wiehlmann L, Shahswar R, Damm F, Gohring G, Schlegelberger B, Schlenk R, Dohner K, Dohner H, Krauter J, Ganser A, and Heuser M: *Mutations in the cohesin complex in acute myeloid leukemia: clinical and prognostic implications.* Blood 123: 914-20 (2014)
145. Toth A, Ciosk R, Uhlmann F, Galova M, Schleiffer A, and Nasmyth K: *Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p(Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication.* Genes Dev 13: 320-33 (1999)
146. Uhlmann F and Nasmyth K: *Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication.* Curr Biol 8: 1095-101 (1998)
147. Uhlmann F, Wernic D, Poupart M A, Koonin E V, and Nasmyth K: *Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast.* Cell 103: 375-86 (2000)
148. Vakoc C R, Letting D L, Gheldof N, Sawado T, Bender M A, Groudine M, Weiss M J, Dekker J, and Blobel G A: *Proximity among distant regulatory elements at the beta-globin locus requires GATA-1 and FOG-1.* Mol Cell 17: 453-62 (2005)
149. Venselaar H, Te Beek T A, Kuipers R K, Hekkelman M L, and Vriend G: *Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces.* BMC Bioinformatics 11: 548 (2010)
150. Verhaak R G, Goudswaard C S, van Putten W, Bijl M A, Sanders M A, Hugens W, Uitterlinden A G, Erpelinck C A, Delwel R, Lowenberg B, and Valk P J: *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: 3747-54 (2005)
151. Vita M and Henriksson M: *The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer.* Semin Cancer Biol 16: 318-30 (2006)
152. Wada Y, Ohta Y, Xu M, Tsutsumi S, Minami T, Inoue K, Komura D, Kitakami J, Oshida N, Papantonis A, Izumi A, Kobayashi M, Meguro H, Kanki Y, Mimura I, Yamamoto K, Mataka C, Hamakubo T, Shirahige K, Aburatani H, Kimura H, Kodama T, Cook P R, and Ihara S: *A wave of nascent transcription on activated human genes.* Proc Natl Acad Sci U S A 106: 18357-61 (2009)

153. Walter M J, Ding L, Shen D, Shao J, Grillot M, McLellan M, Fulton R, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, O'Laughlin M, Kandoth C, Baty J, Westervelt P, DiPersio J F, Mardis E R, Wilson R K, Ley T J, and Graubert T A: *Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes.*  
Leukemia 25: 1153-8 (2011)
154. Walter M J, Payton J E, Ries R E, Shannon W D, Deshmukh H, Zhao Y, Baty J, Heath S, Westervelt P, Watson M A, Tomasson M H, Nagarajan R, O'Gara B P, Bloomfield C D, Mrozek K, Selzer R R, Richmond T A, Kitzman J, Geoghegan J, Eis P S, Maupin R, Fulton R S, McLellan M, Wilson R K, Mardis E R, Link D C, Graubert T A, DiPersio J F, and Ley T J: *Acquired copy number alterations in adult acute myeloid leukemia genomes.*  
Proc Natl Acad Sci U S A 106: 12950-5 (2009)
155. Walter M J, Shen D, Ding L, Shao J, Koboldt D C, Chen K, Larson D E, McLellan M D, Dooling D, Abbott R, Fulton R, Magrini V, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, O'Laughlin M, Fan X, Grillot M, Witowski S, Heath S, Frater J L, Eades W, Tomasson M, Westervelt P, DiPersio J F, Link D C, Mardis E R, Ley T J, Wilson R K, and Graubert T A: *Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia.*  
N Engl J Med 366: 1090-8 (2012)
156. Walter M J, Shen D, Shao J, Ding L, White B S, Kandoth C, Miller C A, Niu B, McLellan M D, Dees N D, Fulton R, Elliot K, Heath S, Grillot M, Westervelt P, Link D C, DiPersio J F, Mardis E, Ley T J, Wilson R K, and Graubert T A: *Clonal diversity of recurrently mutated genes in myelodysplastic syndromes.*  
Leukemia 27: 1275-82 (2013)
157. Weissmann S, Alpermann T, Grossmann V, Kowarsch A, Nadarajah N, Eder C, Dicker F, Fasan A, Haferlach C, Haferlach T, Kern W, Schnittger S, and Kohlmann A: *Landscape of TET2 mutations in acute myeloid leukemia.*  
Leukemia 26: 934-42 (2012)
158. Welch J S, Ley T J, Link D C, Miller C A, Larson D E, Koboldt D C, Wartman L D, Lamprecht T L, Liu F, Xia J, Kandoth C, Fulton R S, McLellan M D, Dooling D J, Wallis J W, Chen K, Harris C C, Schmidt H K, Kalicki-Veizer J M, Lu C, Zhang Q, Lin L, O'Laughlin M D, McMichael J F, Delehaunty K D, Fulton L A, Magrini V J, McGrath S D, Demeter R T, Vickery T L, Hundal J, Cook L L, Swift G W, Reed J P, Alldredge P A, Wylie T N, Walker J R, Watson M A, Heath S E, Shannon W D, Varghese N, Nagarajan R, Payton J E, Baty J D, Kulkarni S, Klco J M, Tomasson M H, Westervelt P, Walter M J, Graubert T A, DiPersio J F, Ding L, Mardis E R, and Wilson R K: *The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia.*  
Cell 150: 264-78 (2012)



159. Welch J S and Link D C: *Genomics of AML: clinical applications of next-generation sequencing*.  
Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2011: 30-5 (2011)
160. Whitman S P, Archer K J, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson B D, Carroll A J, Mrozek K, Vardiman J W, George S L, Kolitz J E, Larson R A, Bloomfield C D, and Caligiuri M A: *Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study*.  
Cancer Res 61: 7233-9 (2001)
161. Wilson C S, Davidson G S, Martin S B, Andries E, Potter J, Harvey R, Ar K, Xu Y, Kopecky K J, Ankerst D P, Gundacker H, Slovak M L, Mosquera-Caro M, Chen I M, Stirewalt D L, Murphy M, Schultz F A, Kang H, Wang X, Radich J P, Appelbaum F R, Atlas S R, Godwin J, and Willman C L: *Gene expression profiling of adult acute myeloid leukemia identifies novel biologic clusters for risk classification and outcome prediction*.  
Blood 108: 685-96 (2006)
162. Wouters B J, Lowenberg B, Erpelinck-Verschueren C A, van Putten W L, Valk P J, and 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: 3088-91 (2009)
163. Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He W W, Okumura K, and Li E: *Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family*.  
Gene 236: 87-95 (1999)
164. Xu H, Balakrishnan K, Malaterre J, Beasley M, Yan Y, Essers J, Appeldoorn E, Tomaszewski J M, Vazquez M, Verschoor S, Lavin M F, Bertoncetto I, Ramsay R G, and McKay M J: *Rad21-cohesin haploinsufficiency impedes DNA repair and enhances gastrointestinal radiosensitivity in mice*.  
PLoS One 5: e12112 (2010)
165. Yamamoto G, Irie T, Aida T, Nagoshi Y, Tsuchiya R, and Tachikawa T: *Correlation of invasion and metastasis of cancer cells, and expression of the RAD21 gene in oral squamous cell carcinoma*.  
Virchows Arch 448: 435-41 (2006)
166. Zhang N, Kuznetsov S G, Sharan S K, Li K, Rao P H, and Pati D: *A handcuff model for the cohesin complex*.  
J Cell Biol 183: 1019-31 (2008)
167. Zhang P, Iwasaki-Arai J, Iwasaki H, Fenyus M L, Dayaram T, Owens B M, Shigematsu H, Levantini E, Huettner C S, Lekstrom-Himes J A, Akashi K, and Tenen D G: *Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating*

- capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha.*  
Immunity 21: 853-63 (2004)
168. Zhao B, Wang Z J, Yi B Q, Ma H C, and Xu H M: *hRad21 overexpresses and localizes to the ALT-associated promyelocytic leukemia body in ALT cells.*  
Cancer Biol Ther 9: 978-83 (2010)
169. Zlatanova J and Caiafa P: *CTCF and its protein partners: divide and rule?*  
J Cell Sci 122: 1275-84 (2009)
170. Zuin J, Dixon J R, van der Reijden M I, Ye Z, Kolovos P, Brouwer R W, van de Corput M P, van de Werken H J, Knoch T A, van I W F, Grosveld F G, Ren B, and Wendt K S: *Cohesin and CTCF differentially affect chromatin architecture and gene expression in human cells.*  
Proc Natl Acad Sci U S A 111: 996-1001 (2014)

## 7 Anhang

### **RAD21 Referenz-Sequenz (GenBank:NM\_006265.2)**

LOCUS NM\_006265 3773 bp mRNA linear PRI 22-AUG-2013

DEFINITION Homo sapiens RAD21 homolog (S. pombe) (RAD21), mRNA.

ACCESSION NM\_006265

VERSION NM\_006265.2 GI:208879448

KEYWORDS RefSeq.

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens  
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;  
Euteleostomi;  
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates;  
Haplorrhini;  
Catarrhini; Hominidae; Homo.

ORIGIN

```

1   aggcgcacag gtaccat ttt gaccgtaa acctctgccga tttgaaccga ggatttgggc
61  ggcaggaaga gccgcggcgt aacggcagcc atcttg tttgagt gaa tcgaaagga
121 ggcgcggcgt gtggcggcgg cgggagctgc tcggaagcta cacctcgcaa gggctcccc
181 ctttccccac cccctcccc gacccttttc ccctccccgg gccaccagc ccgccaact
241 cccagcggag agcaaggttt tcttctg tcatagccag ccagaacaat gttctacgca
301 cattttgttc tcagtaaaag agggcctctg gccaaaattt ggctagcggc ccattgggat
361 aagaagctaa ccaaagccca tgtgttcgag tgtaatttag agagcagcgt ggagagtatc
421 atctaccaa aggtgaaaat ggcattacgg acatcaggac atctcttact gggagtagtt
481 cgaatctatc acaggaaaag caaatacctt cttgcagact gtaatgaagc attcattaag
541 ataaagatgg cttttcggcc aggtgtggtt gacctgcctg aggaaaatcg ggaagcagct
601 tataatgcca ttactttacc tgaagaattt catgactttg atcagccact gcctgactta
661 gatgacatcg atgtggccca gcagttcagc ttgaatcaga gtagagt gga agagataacc
721 atgagagaag aagttgggaa catcagatatt ttacaagaaa atgattttgg tgattttgga
781 atggatgatc gtgagataat gagagaaggc agtgcttttg aggatgacga catgttagta
841 agcactacta cttctaacct cctattagag tctgaacaga gcaccagcaa tctgaatgag
901 aaaattaacc atttagaata tgaagatcaa tataaggatg ataattttgg agaaggaaat
961 gatggtggaa tattagatga caaacttatt agtaataatg atggcgggat ctttgatgat
1021 cccctgccc tctctgaggc aggggtgatg ttgccagagc agcctgcaca tgacgatatg
1081 gatgaggatg ataatgtatc aatgggtggg cctgatagtc ctgattcagt ggatcccgtt
1141 gaaccaatgc caaccatgac tgatcaaca acactgttc caaatgagga agaagcattt
1201 gcattggagc ctattgatat aactgttaa gaacaaaag ccaagaggaa gaggaagcta
1261 attggtgaca gtgtcaaaga gttggatagc aagacaatta gagcccaact tagtgattat
1321 tcagatattg ttactacttt ggatctggca ccgcccacca agaaattgat gatgtggaaa
1381 gagacaggag gagtagaaaa actgttttct ttacctgctc agcctttgtg gaataacaga
1441 ctactgaagc tctttacacg ctgtcttaca ccgcttgta cagaagacct tagaaaaagg
1501 aggaaaggag gagaggcaga taatttggat gaattcctca aagaatttga aatccagag
1561 gttcctagag aggaccagca acagcagcat cagcagcgtg atgttatcga tgagcccatt
1621 attgaagagc caagccgcct ccaggagtca gtgatggagg ccagcagaac aaacatagat
1681 gagtcagcta tgccctccacc accacctcag ggagttaagc gaaaagctgg acaaatgtac
1741 ccagagcctg tgatgcctcc tcagcaggtg gagcagatgg aataccacc ttagagcctt
1801 cccccagaag aacctccaaa tatctgtcag ctaataccag agttagaact tctgccagaa
1861 aaagagaagg agaaagagaa gaaaaagaa gatgatgaag aggaagagga tgaagatgca
1921 tcagggggcg atcaagatca ggaagaaaga agatggaaca aaaggactca gcagatgctt

```

1981 catggtcttc agcgtgctct tgctaaaact ggagctgaat ctatcagttt gcttgagtta  
2041 tgtcgaata cgaacagaaa acaagctgcc gcaaagtctt acagcttctt ggttcttaaa  
2101 aagcagcaag ctattgagct gacacaggaa gaaccgtaca gtgacatcat cgcaacacct  
2161 ggaccaaggt tccatattat ataaggagct agaagcatta tagctagtgt ttgattcact  
2221 agtgcttaca aattgcccc atgtgtaggg gacacagaac cctttgagaa aacttagatt  
2281 tttgtctgta caaagtcttt gcctttttcc ttcttcattt tttccagta cattaattt  
2341 gtcaatttca tctttgaggg aaactgatta gatgggttgt gtttgtgttc tgatggagaa  
2401 aacagcacc caaggactca gaagatgatt ttaacagttc agaacagatg tgtgcaatat  
2461 tgggtgcatgt aataatgttg agtggcagtc aaaagtcatg atttttatct tagttcttca  
2521 ttactgcatt gaaaaggaaa acctgtctga gaaaatgcct gacagtttaa tttaaaacta  
2581 tgggtgtaagt ctttgacaag aaaaaaaaaac aaacaaacac ttctttccat cagtaacact  
2641 ggcaatcttc ctgttaacca ctctccttag ggatggatc tgaacaaca atggtcacc  
2701 tcttgagatt cgttttaagt gtaattccat aatgagcaga ggtgtacgcg aaattgtgtt  
2761 atgactgata gccttcagct acaaaaagat aggactgacc tggtttaaaag tgttctattt  
2821 tgtaaactcat tccatttgag tctttctgat gaacttggct aactgaaat ctgttatttt  
2881 agtgaggctc caaaatgagc aaagctaggg ctgattagag tagagtgact attaaaaaac  
2941 ataactttct aggagctata aatcaaagtt ttaaaaagat gtttggatat atttgagtat  
3001 tccgatcatg aaaacagaaa ttgccctgcc tactacaagg acagactgat gggaaattat  
3061 gcacctggtc aacttagctt ttaagcagac gatgctgtaa aaactaacgg cttctctgat  
3121 atttattgta agtttttagta ctgatctcct tttccagtgc tgcacactcc tggtttgaa  
3181 ctttaatagc gttgcaacga aatcctatat ccagtctcct gtaatttaat tgaagaaaaa  
3241 tacatccaaa taaagacttt attattaaca gaccagatag catcagaaat catgtgactg  
3301 ttatgattat cagaatgtct taacttttta gggcaaagt aacactgaaa gttctagctt  
3361 aagtgttgaa acttttgtgg gaaaaaaaaa tcacttttga aactcagact tcagtgtata  
3421 cccaataatt taaaattatg tgaaatgttt taaatttgtg aactcgtaat tactgtttta  
3481 atgattcagt ttcttcagag tggtaattgt ataaaattgc tattgcagct ttacattcaa  
3541 tatgatgtgc ctgtaaacca aggagttttc cccgtttgta aaaagacatt gtagataatt  
3601 gaatgtttga ttttagaaaag gtcattagtt tcttgttaca cttttgtta gtctggtttt  
3661 tgttgcttat cgggtttaat attgttcttg aaaaatagtt atgctatggt atgtataact  
3721 tttctaataa aagttgtgtt ataagctgta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa

## **8 Danksagung**

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. Hartmut Döhner, Ärztlicher Direktor der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums Ulm mit den Schwerpunkten Hämatologie, Onkologie, Palliativmedizin, Rheumatologie und Infektionskrankheiten, für die Möglichkeit der Promotion in seiner Abteilung bedanken.

Ich danke im Besonderen Herrn Prof. Dr. med. Lars Bullinger, für die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung und die guten Arbeitsbedingungen innerhalb seiner Arbeitsgruppe.

Frau Dr. hum. biol. Anna Dolnik danke ich für die umfangreiche und sehr engagierte Hilfe bei der thematischen Einarbeitung und bei der Durchführung der Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern im Labor für die angenehme Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und ihre vielen guten Ratschläge bedanken.

## 9 Bisherige Veröffentlichungen

Dolnik A, Engelmann J C, Scharfenberger-Schmeer M, Mauch J, Kelkenberg Schade S, Haldemann B, Fries T, Kronke J, Kuhn M W, Paschka P, Kayser S, Wolf S, Gaidzik V I, Schlenk R F, Rucker F G, Dohner H, Lottaz C, Dohner K, and Bullinger L: *Commonly altered genomic regions in acute myeloid leukemia are enriched for somatic mutations involved in chromatin remodeling and splicing.* Blood 120: 83-92 (2012)