

Medizinische Klinik der Universität Ulm
Abteilung Innere Medizin III
(Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie, Infektionskrankheiten)
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Hartmut Döhner

***CEBPA*-Mutationen bei jüngeren Erwachsenen mit akuter
myeloischer Leukämie und normalem Karyotyp**

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

vorgelegt von
Ina Susanne Stolze
aus Karlsruhe
2005

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Konstanze Döhner

2. Berichterstatter: PD Dr. Wolfgang Kratzer

Tag der Promotion: 20.07.2006

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	8
1.1 Karyotyp als prognostischer Faktor bei der akuten myeloischen Leukämie	8
1.2 CCAAT/enhancer binding protein alpha (CEBPA)	9
1.3 CEBPA und AML	11
1.4 Kooperation mit anderen Mutationen	14
1.5 Zielsetzung	16
2. Patienten, Material und Methoden	17
2.1 Reagenzienverzeichnis	17
2.2 Patienten	19
2.3 Therapie der Patienten	19
2.4 Gesunde Probanden	20
2.5 Materialgewinnung	20
2.6 Methodenübersicht	21
2.7 DNA-Extraktion	22
2.8 Primerbestimmung und –verdünnung	22
2.9 Polymerase Chain Reaction (PCR) aus genomischer DNA	23
2.10 Gelelektrophorese	26
2.11 Aufreinigung der PCR-Produkte	27
2.12 Cycle Sequencing Reaction	29
2.13 DNA-Aufreinigung	30

2.14 Sequenzierung	31
2.15 Klonierung	33
2.16 Statistische Analysen	36
3. Ergebnisse	37
3.1 Polymorphismen	37
3.2 Inzidenz von <i>CEBPA</i> -Mutationen	37
3.3 Mutationstypen	38
3.4 Lokalisation der Mutationen auf den Allelen	42
3.5 Auswirkungen der Mutationen auf das CEBPA-Protein	42
3.6 Assoziation mit anderen Mutationen	43
3.7 FAB-Subtypen der Patienten mit <i>CEBPA</i> -Mutationen	45
4. Diskussion	46
5. Zusammenfassung	55
6. Literaturverzeichnis	57
7. Danksagung	66
8. Lebenslauf	67

Abkürzungsverzeichnis

A	im Gen: Adenin; im Protein: Alanin
acc. no.	accession number (Eingangsnummer)
AML	akute myeloische Leukämie
AML1	acute myeloid leukemia 1 gene (Synonyme: RUNX1, CBFA2T1)
AMLSG ULM	AML Study Group Ulm
ALFA	Acute Leukemia French Association
APL	akute Promyelozytenleukämie
BAALC	brain and acute leukemia, cytoplasmic
bp	Basenpaare
bzip	basic region-leucine zipper-Domäne
C	Cytosin
CBFA2T1	core binding factor alpha subunit 2 (Synonym: ETO, RUNX1)
CBFB	core binding factor beta
CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein alpha
CSR	Cycle Sequencing Reaction
CKIT	eine Rezeptortyrosinkinase
CR	complete remission (komplette Remission)
C-terminal/Terminus	carboxyl-terminal/Carboxyl-Terminus
D	Aspartat
D835	Mutation der Aminosäure 835 von FLT3
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dNTP/ddNTP	Desoxynukleosidtriphosphate/Didesoxynukleosidtriphosphate
del	Deletion
DFS	disease-free survival (krankheitsfreies Überleben)
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat

DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Glutamat
E. coli	Escherichia coli (Bakterien)
EFS	event-free survival (ereignisfreies Überleben)
ETO	ETO-Gen, ein Transkriptionsfaktor (Synonym CBFA2T1, RUNX1)
Fa.	Firma
FAB-Klassifikation	French American British Cooperative Group-Klassifikation
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3
fs	frameshift
G	im Gen: Guanin; im Protein: Glycin
G-CSF	Granulozyten-colony stimulating factor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-colony stimulating factor
H	Histidin
HAM	Chemotherapiezyklus (Hochdosis-Cytosin-Arabinosid, Mitoxantron)
HD	Heidelberg
HPLC	high pressure liquid chromatography (Wasser)
ICE	Chemotherapiezyklus (Idarubicin, Cytosin-Arabinosid, Etoposid)
ins	Insertion
inv	Inversion
ITD	interne Tandemduplikation
K	Lysin
kD	Kilodalton
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma 2 Vital Oncogene
L	Leucin
LB	Luria-Bertani (Medium)
M0-M7	morphologische AML-Subtypen M0 bis M7 (FAB-Klassifikation)
MLL	mixed-lineage-leukemia-Gen
MRC	medical research council (Klassifikation)

MTG8	myeloid translocation gene on 8q22
MYH11	myosin heavy chain 11
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene
N-terminal/Terminus	amino-terminal/Amino-Terminus
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
OS	overall survival (Gesamtüberleben)
P	Prolin
PB	peripheres Blut
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PML	inducer of acute promyelocytic leukemia (Transkriptionsfaktor)
PTD	partielle Tandemduplikation
PU1	hämatopoetischer Transkriptionsfaktor
Q	Glutamin
R	Arginin
RARA	retinoic acid receptor alpha
RAS	Familie von Onkogenen
RNA	Ribonukleinsäure
RTKI	Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor
RUNX1	RUNT-related transcription factor 1 (Synonyme: ETO, CBFA2)
SCL	stem cell leukemia transcription factor
SCT	Stammzelltransplantation
S-HAM	Chemotherapiezyklus (Hochdosis-Cytosin-Arabinosid, Mitoxantron)
ssDNA	single-stranded-DNA (einzelsträngige DNA)
t	Translokation
T	im Gen: Thymin; im Protein: Threonin
t-AML	therapie-assoziierte AML nach primärem Malignom
TAD	transactivation domain (Transaktivierungsdomäne)
UTR	untranslated region
UV	ultraviolette Strahlung
V	Valin
X	Kettenabbruch in der Proteinsynthese durch Stoppcodon

1. Einleitung

1.1 Karyotyp als prognostischer Faktor bei der akuten myeloischen Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine biologisch und klinisch sehr heterogene Erkrankung. Um dieser Tatsache gerecht zu werden, wurde mit der French-American-British (FAB)-Klassifikation zunächst eine Unterteilung je nach Zelltyp und Differenzierungsgrad in morphologische AML-Subtypen (M0 bis M7) vorgenommen (Bennett et al. 1985).

Bei bestimmten AML-Subtypen kommen bestimmte genetische Veränderungen gehäuft vor. Durch zahlreiche Studien etablierte sich die Erkenntnis, dass der Karyotyp die wichtigste unabhängige prognostische Information bei Patienten mit AML liefert (Bloomfield et al. 1998, Byrd et al. 2002, Grimwade et al. 1998, Schlenk et al. 2003, Slovak et al. 2000).

Daher werden heute einige der über 160 bekannten strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen dazu genutzt, die Patienten in Risikogruppen einzuteilen und das klinische Management mittels risikoadaptierter Therapieprotokolle danach auszurichten. Es existieren 3 Risikokategorien: Das beste Outcome haben Patienten mit den Translokationen $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q11\sim21)$ sowie der Inversion $inv(16)(p13;q22)$. Eine sehr ungünstige Prognose haben Patienten mit einem komplexen Karyotyp, -5 , $del(5q)$, -7 oder Veränderungen von $3q$. Die übrigen sind Patienten mit intermediärem Risiko, darunter auch solche mit normalem Karyotyp (Grimwade et al. 1998).

Bei ca. 45% der AML-Patienten können bei der konventionellen Chromosomenanalyse (chromosomale Bänderungsanalyse bzw. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) keine Aberrationen gefunden werden (Mrozek et al. 2001). Obwohl die Gruppe der Patienten mit normalem Karyotyp in allen bislang publizierten genetischen Stratifikationssystemen der intermediären Risikogruppe zugeordnet wird, umfasst sie Fälle mit günstigem,

intermediärem und ungünstigem klinischen Verlauf (Byrd et al. 2002, Grimwade 2001, Grimwade et al. 1998, Slovak et al. 2000).

Mit Hilfe molekulargenetischer Untersuchungen wird versucht, auch für diese große und heterogene Gruppe von Patienten mit normaler Zytogenetik eine Differenzierung in prognostisch unterschiedliche Subgruppen durch molekulare Marker zu finden. Diese Erkenntnisse könnten in die Therapiestrategie mit einfließen und so zur Prognoseverbesserung beitragen (Baldus et al. 2003, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al. 2003, Döhner et al. 2002, Fröhling et al. 2002a, Kottaridis et al. 2001, Thiede et al. 2002, Whitman et al. 2001).

Der zuerst beschriebene molekulare Marker dieser Art ist die partielle Tandemduplikation des mixed-lineage-leukemia-Gens (*MLL-PTD*), die bei ca. 6-11% der AML-Patienten mit normalem Karyotyp auftritt und mit einer statistisch signifikanten Verkürzung der kompletten Remissions(CR)-Dauer einhergeht (Caligiuri et al. 1998, Döhner et al. 2002, Schnittger et al. 2000).

1.2 CCAAT/enhancer binding protein alpha (CEBPA)

Zu diesen neuen molekularen Markern zählen auch Mutationen des *CEBPA* (CCAAT/enhancer binding protein alpha)-Gens.

Das Gen, welches für den Transkriptionsfaktor CEBPA kodiert, liegt auf dem langen Arm von Chromosom 19 (19q13.1) (Hendricks-Taylor et al. 1992). Es besteht aus einem einzigen Exon, welches sehr CG-reich ist (über 70%), 2783 Basenpaare umfasst und ein aus 356 Aminosäuren zusammengesetztes Protein kodiert (Antonson et al. 1995).

CEBPA gehört zur Familie der „leucine zipper“-Transkriptionsfaktoren. Die am C-terminalen Ende des Proteins gelegene leucine zipper-Domäne ist über einen Abschnitt aus 7 Aminosäuren, die sogenannte „fork“, an die „basic region“ gekoppelt. Die Funktion dieses als basic region-leucine zipper-Domäne zusammengefassten Bereichs besteht in der Dimerisierung als Homodimer mit einem weiteren CEBPA-Molekül oder als Heterodimer mit anderen Transkriptionsfaktoren und in der Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Bindung. Am N-terminalen Ende befinden sich 2 Transaktivierungsregionen, die zur Genaktivierung nötig sind (D'Alo et al. 2003, Friedman et al. 1990, Landschulz et al. 1988, Tenen et al.

1997, Vinson et al. 1989). Der basic region-leucine zipper-Bereich ist bei allen Mitgliedern der CEBP-Familie sehr homogen, die Transaktivierungsregionen sind heterogen (Lekstrom-Himes et al. 1998).

Innerhalb des hämatopoetischen Systems wird *CEBPA* in normalen myeloischen Zellen sowie bei myeloischen Leukämien des Menschen exprimiert, nicht jedoch in erythrozytären oder lymphozytären Zelllinien (Scott et al. 1992).

CEBPA ist an der Regulation der Myelopoese beteiligt, indem es die Expression von Genen steuert, die Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle und andere Transkriptionsfaktoren kodieren, die wiederum für die Differenzierung einer hämatopoetischen Stammzelle in einen reifen Granulozyten wichtig sind (Ward et al. 2000).

Die Hochregulation von CEBPA „dirigiert“ bipotente myeloische Vorläuferzellen (monozytär und granulozytär) auf die Zellreihe der Granulozyten, während die der Monozyten geblockt wird (Radomska et al. 1998). Während die Konzentration von CEBPA in den proliferierenden Vorläuferzellen der Granulozyten sehr hoch ist, fällt sie mit zunehmender phänotypischer Reifung der Granulozyten ab (Scott et al. 1992).

Transfektionsstudien haben gezeigt, dass CEBPA die Promotoren zahlreicher granulozytenspezifischer Gene reguliert, wie z.B. für den G-CSF-Rezeptor (Smith, L. T. et al. 1996), den GM-CSF-Rezeptor (Hohaus et al. 1995), die Neutrophilen-Elastase (Oelgeschlager et al. 1996), die Myeloperoxidase (Ford et al. 1996) und Lactoferrin (Khanna-Gupta et al. 2000). Die Aktivität von CEBPA wird durch RAS verstärkt, indem das Serin an der 248. Stelle der Aminosäuresequenz der Transaktivierungsdomäne phosphoryliert wird (Behre et al. 2002).

Andere Transfektionsstudien an Hepatomen, hepatozellulären Karzinomen und Osteosarkomen haben Hinweise darauf geliefert, dass CEBPA eine hemmende Wirkung auf die Zellproliferation hat und somit als Tumorsuppressor agieren könnte (Hendricks-Taylor et al. 1995, Watkins et al. 1996).

Bei *CEBPA*-knock out-Mäusen, d.h. homozygoten *-/-* Tieren, fehlen reife neutrophile Granulozyten im peripheren Blut. Sowohl die Zellen der erythrozytären als auch der megakaryozytären Linie sowie Monozyten und Lymphozyten werden in normaler Morphologie und Konzentration gebildet. Hinzu kommt, dass bei diesen knock out-Mäusen die Mehrheit der Leukozyten im peripheren Blut Myeloblasten sind. Daher kam man zu der Annahme, dass die Population der reifen Granulozyten im peripheren Blut durch myeloische Vorläuferzellen ersetzt wurde. Auch in der Leber von *CEBPA* *-/-* Mäuseföten und *CEBPA* *-/-* neugeborenen Mäusen waren keine reifen Granulozyten nachweisbar. Im Gegensatz dazu waren bei neugeborenen heterozygoten Mäusen (*+/-* für *CEBPA*) und solchen mit Wildtyp-*CEBPA* (*+/+*) nahezu 90% der Leukozyten im peripheren Blut reife neutrophile Granulozyten. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Defekt in der Reifung der Granulozyten im hämatopoetischen System liegt (Tenen et al. 1997, Zhang, D. E. et al. 1997).

Die Rolle von CEBPA in der Regulation der Myelopoese und die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren soll anhand des folgenden Modells verdeutlicht werden: Aus einem Hämangioblasten wird unter dem Einfluss der Transkriptionsfaktoren SCL und AML1 eine pluripotente hämatopoetische Stammzelle. Aus dieser entwickelt sich unter dem Einfluss von PU1 eine gemeinsame myeloische Vorläuferzelle. Durch den „zellreihenspezifischen“ Transkriptionsfaktor CEBPA entsteht eine bipotente Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzelle. Unter dem Einfluss von PU1 reift die Zelle zu einem Monozyten bzw. Makrophagen, während die hochregulierte Expression von *CEBPA* zur Reifung eines Granulozyten führt. CEBPA hemmt den „default pathway“ der Monozytenreifung und führt zum alternativen Weg der Granulozytenreifung durch Hemmung von PU1. Dieses Modell hat zur Grundlage, dass die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen in verschiedene Zellreihen auf der Expression spezifischer Kombinationen von Transkriptionsfaktoren beruht (Tenen 2003).

1.3 CEBPA und AML

Wie bereits oben erwähnt, sind die Mehrzahl der Leukozyten im peripheren Blut von *CEBPA*-knock out-Mäusen Myeloblasten. Aufgrund dieser Beobachtung kam man zu dem

Schluss, dass der Funktionsverlust von CEBPA durch den Block in der Differenzierung von myeloischen Vorläuferzellen möglicherweise eine Rolle in der Entstehung von AML spielt (Zhang, D. E. et al. 1997).

Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse von Mutationsanalysen des *CEBPA*-Gens bei AML-Patienten gestützt. Pabst et al. analysierten 137 erwachsene AML-Patienten und identifizierten heterozygote *CEBPA*-Mutationen bei 10 (7,3%) von ihnen. Die Mutationen betrafen in der Mehrzahl Patienten mit dem FAB (French American British Cooperative Group)-Subtyp M2 ohne t(8;21). Bei einem Patienten dieser Studie, von dem Zellmaterial bei Diagnosestellung, Remission und Rückfall entnommen wurde, zeigte sich, dass die Mutation nur bei Diagnosestellung und Rückfall nachweisbar war, nicht jedoch während der Remission. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass es sich um eine somatische Mutation handelt. Gesunde Probanden zeigten keine Mutationen, die die Aminosäuresequenz des Proteins veränderten. Es wurden verschiedene Mutationstypen gefunden: Die erste Gruppe von Mutationen waren solche, die den N-terminalen Bereich des Proteins betreffen und dominant-negative Eigenschaften aufweisen. Sie führen zur vermehrten Bildung eines 30kD schweren Proteins, einer physiologischen Isoform, die auch normalerweise in geringen Mengen in granulopoetischen Zellen vorkommt, während das normale 42kD-Protein nicht mehr gebildet werden kann. Das 30kD-Protein wird durch Benutzung eines Startcodons in Position der 120. Aminosäure synthetisiert. Genauso wie das 42kD-CEBPA ist es im Zellkern lokalisiert. Das 30kD-Protein hat eine bis zu 84%ig reduzierte Fähigkeit, den Promoter des G-CSF-Rezeptors zu aktivieren und inhibiert das 42kD-CEBPA-Protein in Zellen, in denen es 1:1 mit dem Wildtyp exprimiert wird. Bei einem Verhältnis von 2:1 Mutante zu Wildtyp ist die Promoter-Aktivität genauso gering wie bei alleiniger Expression des mutierten Proteins. Es scheint also das Verhältnis von 30kD- zu 42kD-Protein entscheidend zu sein. In einem Experiment mit U937-Zellen konnte durch die induzierte Expression von *CEBPA*-Wildtyp eine Differenzierung zum Granulozyten beobachtet werden, während die Expression eines N-terminal mutierten Gens nicht zu dieser Differenzierung führte. Bestätigt wurde diese Beobachtung durch den fehlenden Anstieg der G-CSF-Rezeptor-Expression.

Die zweite Gruppe von Mutationen betraf den C-terminalen Teil des Proteins. Hier fanden sich heterogene Ergebnisse bezüglich der Funktionen des resultierenden CEBPA: Bei einer

bestimmten Punktmutation wurde die Fähigkeit des Proteins, den G-CSF-Rezeptor-Promoter zu aktivieren, nicht beeinträchtigt. Bei 2 verschiedenen Insertionen wurde diese Funktion auf 2% bzw. 60% reduziert. Bei einer Deletion wurde die Promoteraktivität um das dreifache gesteigert. (Pabst et al. 2001b).

Hinweise auf eine pathogenetische Bedeutung von *CEBPA*-Mutationen liefern auch häufige balancierte Aberrationen bei AML-Patienten. Bei der Translokation t(8;21)(q22;q22), die eng mit dem FAB-Subtyp M2 assoziiert ist, kommt es zur Bildung des Fusionsgens *RUNX1-CBF2T1* (auch *AML1-ETO* genannt), welches das AML1-ETO-Fusionsprotein kodiert. AML1 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Hämatopoese beeinflusst (Yergeau et al. 1997). Das Fusionsgen supprimiert die Expression des *CEBPA*-Gens, es kommt bei diesen Patienten zu einer wesentlich geringeren Konzentration an *CEBPA*-mRNA (Ribonukleinsäure) und nicht nachweisbarem CEBPA-Protein (Pabst et al. 2001a). Aufgrund dieser Daten und der Tatsache, dass *CEBPA*-knock out-Mäuse einen Differenzierungsblock ähnlich des M2-Subtyps der AML aufweisen (Zhang, D. E. et al. 1997), liegt die Vermutung nahe, dass die Mutation des *CEBPA*-Gens und die Translokation t(8;21) durch denselben Mechanismus die Pathogenese der AML beeinflussen, nämlich durch den Verlust der CEBPA-Funktion.

Auch bei Patienten mit der Translokation t(15;17)(q22;q11~21), die mit der akuten Promyelozyten-Leukämie (APL; FAB-Subtyp M3) assoziiert ist, wird die Funktion von CEBPA beeinträchtigt. Durch das bei dieser Translokation entstehende PML-RARA-Fusionsprotein wird die Lokalisation von CEBPA im Zellkern verändert und dessen Bindung an die DNA verringert (Lodie et al. 1999).

Eine Publikation über eine familiär gehäuft auftretende Form der AML lässt ebenfalls eine Beteiligung von *CEBPA*-Mutationen an der Pathogenese der Erkrankung vermuten: In der untersuchten Familie zeigten 3 Mitglieder, die von AML betroffen waren, zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine identische *CEBPA*-Mutation, die nach der kompletten Remission nicht mehr nachweisbar war. Gesunde Familienmitglieder zeigten diese Mutation nicht (Smith, M. L. et al. 2004).

In einer retrospektiven Studie von Preudhomme et al. wurde die prognostische Bedeutung von *CEBPA*-Mutationen untersucht (Preudhomme et al. 2002). Es wurden 135 Patienten mit de novo-AML vor der Behandlung nach einem Protokoll der Acute Leukemia French Association (ALFA) auf das Vorliegen von Mutationen untersucht. Es handelte sich um eine heterogene Gruppe von AML-Patienten, d.h. mit unterschiedlichem Karyotyp. Von den 135 untersuchten AML-Patienten hatten 15 (11%) mindestens eine *CEBPA*-Mutation. Zwölf dieser Patienten hatten mindestens eine N-terminale *CEBPA*-Mutation. Die Mutationen traten nur bei Patienten mit intermediärem zytogenetischen Risiko (Grimwade et al. 1998) auf und waren mit dem FAB-Subtyp M1 assoziiert. Der Nachweis einer *CEBPA*-Mutation war mit einer signifikant besseren Prognose assoziiert, vorausgesetzt, es lag nicht gleichzeitig eine interne Tandemduplikation des Gens der FMS-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*-ITD) vor (Preudhomme et al. 2002).

1.4 Kooperation mit anderen Mutationen

Es gibt Hinweise darauf, dass Mutationen von hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren (Klasse II-Mutationen), wie *CEBPA*, mit Mutationen von Tyrosinkinase (Klasse I-Mutationen) kooperieren.

Studien an Mäusen haben gezeigt, dass die Fusionsgene der Transkriptionsfaktoren *AML1-ETO* und *CBFB-MYH11*, die bei der Translokation t(8;21) bzw. der Inversion inv(16) zustande kommen, die normale myeloische Differenzierung blockieren.

Bei heterozygoten *AML1-ETO* $-/+$ Mäuseembryonen kommt es zur Blockade der normalen *AML1*-Funktion, zu dysplastischen hämatopoetischen Stammzellen verschiedener Zelllinien und zu einer erhöhten Proliferationsrate dieser Zellen. Die Feten versterben noch in utero (Okuda et al. 1998, Yergeau et al. 1997). Eine Untersuchung von transgenen Mäusen, die *AML1-ETO* exprimieren, zeigte, dass erst die zusätzliche Gabe eines Mutagens bei 55% dieser Mäuse zur AML führt. Das spricht dafür, dass die Translokation t(8;21) für die Entwicklung des Phänotyps der AML nicht ausreicht, sondern weitere genetische Veränderungen erforderlich sind (Yuan et al. 2001).

Auch beim Fusionsprotein *CBFB-MYH11*, welches bei der inv(16) entsteht, zeigte sich am murinen Modell, dass es zu einer Blockade der normalen myeloischen und lymphozytären Differenzierung kommt (Castilla et al. 1999, Kundu et al. 2002), diese Inversion alleine

jedoch nicht ausreicht, um eine AML zu entwickeln. Für dieses Fusionsgen heterozygote chimere Mäuse zeigten keine AML, jedoch trugen die embryonalen Stammzellen mit dem *CBFB-MYH11*-Gen nicht zur endgültigen Myelo- und Lymphopoese bei. Erst nach zusätzlicher einmaliger Injektion eines DNA-alkylierenden Mutagens entstand bei 84% eine AML innerhalb von 2-6 Monaten (Castilla et al. 1999). Bei der Injektion eines murinen, schwach malignominduzierenden Retrovirus kam es bei 63% der für *CBFB-MYH11* heterogenen Mäuse ebenfalls zur Entwicklung einer AML. Mäuse mit nur einer der Veränderungen (Fusionsgen oder Injektion des Retrovirus) zeigten keine AML. Dieses Fusionsprotein scheint also zur AML zu prädisponieren, jedoch müssen weitere genetische Veränderungen in der Pathogenese der AML hinzukommen (Castilla et al. 2004).

Mutationen in Tyrosinkinasen bewirken im Experiment ein myeloproliferatives Syndrom. In einer Untersuchung von Kelly et al. wurden hämatopoetische Vorläuferzellen mit *FLT3-ITD* in das Knochenmark von Mäusen transplantiert. Diese Tiere entwickelten nach einer Latenz von 40-60 Tagen ein myeloproliferatives Syndrom mit extramedullärer Hämatopoese und Leukozytose. Die Kontrollgruppe entwickelte keine hämatologische Erkrankung. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Mutationen in Tyrosinkinasen alleine zwar ein myeloproliferatives Syndrom bewirken, aber keine AML (Kelly et al. 2002b).

Im Experiment kann das Zusammenwirken dieser beiden Mutationstypen (Transkriptionsfaktoren und Tyrosinkinasen) eine AML hervorrufen. Transgene Mäuse, die das *PML-RARA*-Fusionsprotein bilden, entwickeln ein myeloproliferatives Syndrom, 15% davon nach langer Latenz eine APL. Die Transduktion von *FLT3-ITD* in das Knochenmark dieser transgenen Mäuse führt zur Ausbildung einer APL mit einer kurzen Latenz und kompletter Penetranz. Dies lässt eine Kooperation von *PML-RARA* und *FLT3-ITD* in der Entstehung der APL vermuten (Kelly et al. 2002a).

Bei einigen AML-Patienten werden Mutationen aus beiden komplementären Gruppen gefunden, z.B. *CBFB-MYH11* und *CKIT* (Gari et al. 1999), *CBFB-MYH11* und *NRAS*, *KRAS*, *CKIT* oder *FLT3* (Valk et al. 2004) sowie *PML-RARA* und *FLT3-ITD* (Fröhling et al. 2002a, Kottaridis et al. 2001, Thiede et al. 2002).

1.5 Zielsetzung

In dieser Arbeit wurden Patienten der multizentrischen Therapiestudie AML HD93 (Heidelberg) auf Mutationen des *CEBPA*-Gens untersucht.

Primäres Ziel dieser Arbeit war es, die Inzidenz von *CEBPA*-Mutationen bei AML-Patienten im Alter von 16 bis 60 Jahren zu untersuchen. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Gruppe der Patienten mit normalem Karyotyp.

Weiterhin sollte eine genaue molekulare Charakterisierung der Mutationen und Analyse der Auswirkungen auf das CEBPA-Protein erfolgen.

Bei den Patienten mit positivem *CEBPA*-Mutationsstatus sollte eine Assoziation mit anderen Mutationen überprüft werden, die bei der Diagnosestellung im Rahmen der Studie AML HD93 der AML Study Group Ulm (AMLSG ULM) erfasst wurden.

Diese Arbeit ist Grundlage für die Beurteilung der klinischen Relevanz von *CEBPA*-Mutationen. Durch Korrelation mit klinischen Daten wie dem Ansprechen auf die Therapie, Häufigkeit und Dauer der kompletten Remission, Rezidivrate und Überlebenszeit können Rückschlüsse auf die prognostische Bedeutung von *CEBPA*-Mutationen in der klinisch sehr heterogenen Gruppe der AML-Patienten mit normalem Karyotyp gezogen werden.

2. Patienten, Material und Methoden

2.1 Reagenzienverzeichnis

2.1.1 Material

Material	Hersteller
ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
ABI PRISM buffer (10x) with EDTA	Applied Biosystems, Darmstadt
Agarose (Type I, low EEO)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
Blue Juice Gel loading buffer	Invitrogen, Groningen, Niederlande
DNAzol-Lösung	Gibco BRL, Eggenstein
dNTP (dATP, dTTP, dGPT, dCPT)	Roche Diagnostics, Mannheim
Dye Ex Spin Kit	Qiagen, Hilden
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (70% / 100%)	RdH, Seelze
Ethidiumbromidlösung	Eurobio, Courtaboeuf, Frankreich
Hot Star Taq DNA Polymerase Kit	Qiagen, Hilden
HPLC-Wasser (Li-Chrosolv Wasser für die Chromatographie)	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Boehringer, Mannheim
MicroAmp Reaction Tube with Cap	Applied Biosystems, Darmstadt
NaCl (Sodium Chloride)	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
Parafilm	SPI Supplies, West Chester, USA
POP-6 (Performance Optimized Polymer 6) Primer	Applied Biosystems MWG Biotech Ebersberg
PP-Tube 12ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen

Reaktionsgefäß Falcon 15ml	Falcon-Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Pipettenspitzen	
mit Filter (steril)	Gilson, Middleton, USA
Combitips für Multipipette	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
QIAprep 8 Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR-Purification-Kit	Qiagen, Hilden
Ready-load 100bp DNA-ladder	Invitrogen, Groningen, Niederlande
RNAse A	Roche Diagnostics, Mannheim
TAE-Puffer (1x)	USB, Cleveland, USA
TOPO-TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Tryptone (Bacto Tryptone)	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
Yeast (Bacto Yeast Extract)	DIFCO Laboratories, Detroit , USA

2.1.2 Geräte

Gerät

Brutschrank: 5042E

Elektrophorese-Kammer

Heizblöcke:

 Thermomixer 5436

 QBT2

Mikrowelle

PCR-Geräte:

 Gene Amp PCR System 2400

 Gene Amp System 9700

 Gene Amp System 2700

Pipetten (20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)

Rührgerät

Schüttelinkubator: G24

Hersteller

Heraeus Instruments, Osterode

MBT Brand, Gießen

Eppendorf, Hamburg

Grant Instruments Ltd., Cambridge,
Großbritannien

Moulinex, München

Applied Biosystems, Darmstadt

Applied Biosystems, Darmstadt

Applied Biosystems, Darmstadt

Abimed, Langenfeld

Heidolph, Schwabach

Brunswick Scientific, Edison, USA

Sequenziergerät: ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
UV-Kamera: Transilluminator 8000-Systems	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
UV-Photometer: Ultrospec III	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Vakuumpumpe: QIAvac 6S	Qiagen, Hilden
Waage: Precisa 220M	Oerlikon AG, Zürich, Schweiz
Zentrifuge: Heraeus Biofuge Pico	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold

2.2 Patienten

Es wurden 122 jüngere erwachsene (16 bis 60 Jahre alte) Patienten mit AML aus der multizentrischen prospektiven Phase III-Therapiestudie AML HD93 auf das Vorliegen von *CEBPA*-Mutationen analysiert. Hierzu wurde DNA aus Proben extrahiert, die bei der Diagnosestellung aus Knochenmark (KM) oder peripherem Blut (PB) gewonnen wurden. Die morphologische Diagnose wurde anhand der Kriterien der FAB-Klassifikation gestellt (Bennett et al. 1985). Es handelte sich um Patienten mit de-novo-AML oder mit sekundärer AML nach geheiltem primärem Malignom (t-AML).

Der Karyotyp der Patienten wurde mittels zytogenetischer und molekularzytogenetischer Methoden zentral im Referenzlabor der AMLSG ULM bestimmt. Es kamen G-Bänderung und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) mit einem Sondensatz für die Detektion der häufigsten chromosomalen Aberrationen zum Einsatz (Fröhling et al. 2002b). 84 Patienten wiesen einen normalen Karyotyp auf, 11 hatten eine inv(16), 8 eine t(8;21), 10 eine t(15;17) und 9 eine t(11q23). Die Patienten mit normalem Karyotyp wurden der intermediate-risk-Gruppe zugeordnet.

Alle Patienten wurden über die Studie aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis zur Therapie und Archivierung der KM- bzw. PB-Proben gemäß der Helsinki-Deklaration.

2.3 Therapie der Patienten

Alle Patienten erhielten im Rahmen des AML HD93-Protokolls der AMLSG ULM eine intensive Doppelinduktionstherapie aus 2 Zyklen ICE (Idarubicin, Cytosin-Arabinosid, Etoposid). Nach Rekonstitution erhielten Patienten in kompletter Remission (CR, d.h. <5%

Blasten im Knochenmark) eine Konsolidierungstherapie mit HAM (Hochdosis-Cytosin-Arabinosid) und G-CSF (Granulozyten-colony stimulating factor). In der Regenerationsphase bestand die Möglichkeit, Blutstammzellen bzw. Knochenmark für eine spätere autologe Stammzelltransplantation (SCT) bzw. Knochenmarkstransplantation (KMT) zu gewinnen. Dann folgte die risikoadaptierte Konsolidierungstherapie gemäß zytogenetischem Befund. Hierbei erhielten Patienten mit low-risk (t(8;21), t(15; 17), t(16; 16), inv(16)) und alle Patienten im Alter von 55-60 Jahren einen zweiten HAM-Zyklus. Patienten mit intermediate risk (normaler Karyotyp) erhielten einen Zyklus S-HAM (Hochdosis-Cytosin-Arabinosid, Mitoxantron) oder eine allogene Knochenmarkstransplantation (KMT) bei Verfügbarkeit von HLA-identischem Knochenmark von Geschwistern. Die Patienten mit high risk-AML wurden einer autologen SCT oder KMT oder einer allogenen KMT unterzogen (Schlenk et al. 2003).

2.4 Gesunde Probanden

Um zu bestätigen, dass es sich bei den *CEBPA*-Mutationen um AML-assoziierte Veränderungen handelt, wurde DNA aus dem peripheren Blut von 9 gesunden Personen mit denselben Methoden wie die Proben der AML-Patienten analysiert.

2.5 Materialgewinnung

Knochenmark wurde durch Punktion des Beckenkamms, peripheres Blut durch Venenpunktion gewonnen. Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Proben heparinisiert (Natrium-Heparin, Verhältnis 1:10). Das Ausgangsmaterial für die Untersuchungen waren mononukleäre Zellen, die mittels Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen und dann bei -80°C archiviert wurden.

2.6 Methodenübersicht

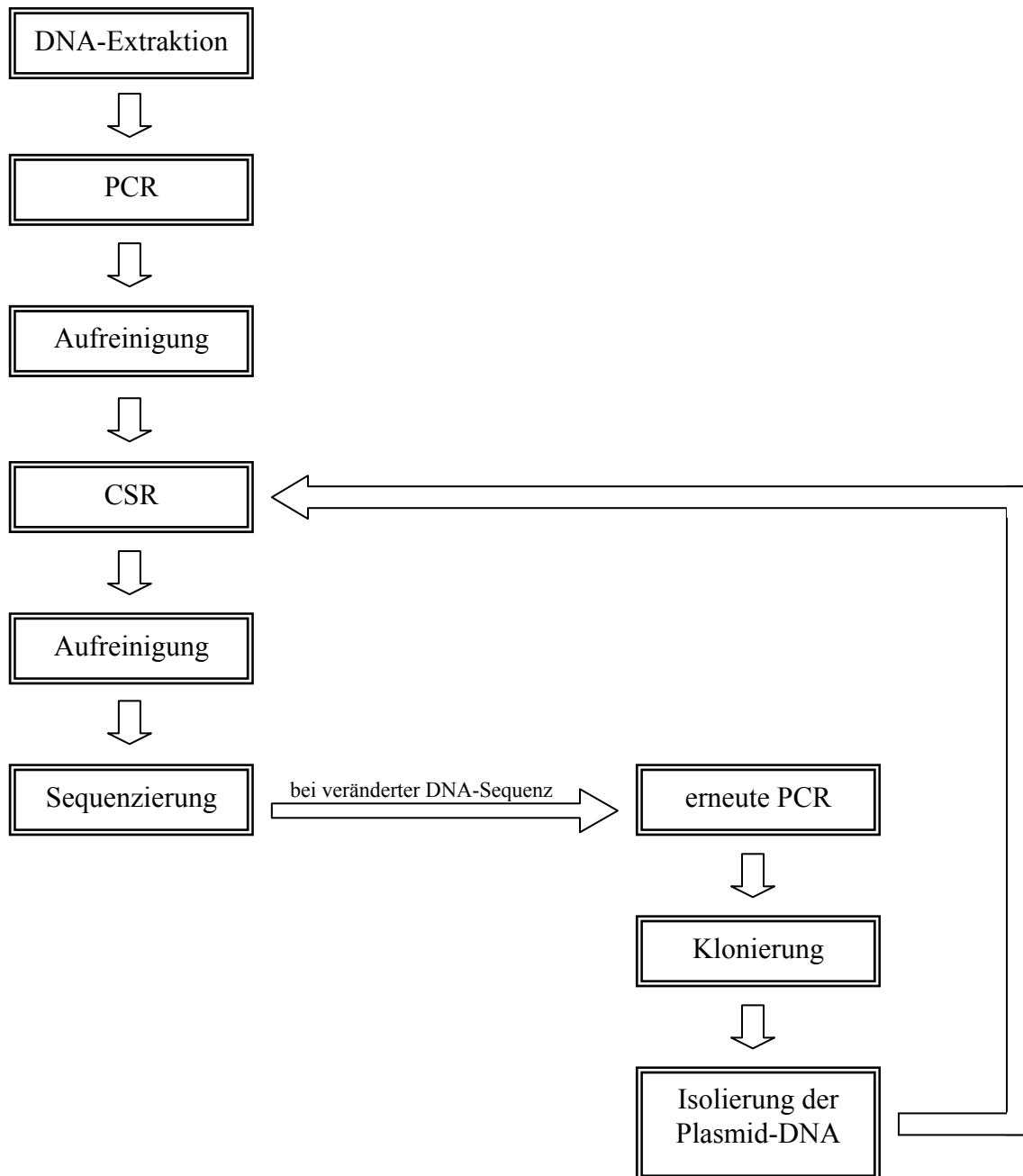


Abbildung 1: Methodenübersicht

DNA: Desoxyribonukleinsäure
PCR: Polymerase Chain Reaction
CSR: Cycle Sequencing Reaction

2.7 DNA-Extraktion

Die DNA wurde aus den mononukleären Knochenmarkzellen bzw. peripheren mononukleären Blutzellen mittels DNAzol-Lösung (Fa. Gibco BRL, Eggenstein) extrahiert.

Dabei wurde zunächst 2ml DNAzol-Lösung mit diesen Zellen gemischt, um eine Zellwandlyse zu erreichen, dann zweimal nacheinander je 1ml 100% Ethanol (Fa. RdH, Seelze) dazugegeben und der Behälter geschwenkt.

Dieses Gemisch wurde in 2 Eppendorf-Behälter überführt und bei 13.000 Umdrehungen pro Minute 15 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert (Heraeus Biofuge Pico, Fa. Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold).

Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt. Dann wurde 95% Ethanol auf das Pellet gegeben und 10 Minuten bei 13.000 Umdrehungen pro Minute und 4°C zentrifugiert. Dann wurde der Überstand wieder abgekippt. Dieser letzte Schritt wurde noch einmal wiederholt und dann der Eppendorf-Behälter für 5 Minuten kopfüber zum Trocknen aufgestellt.

Danach wurde das Pellet mit 100µl Wasser für Infusionslösungen resuspendiert und über Nacht bei 37°C geschüttelt (Thermomixer 5437, Fa. Eppendorf, Hamburg).

Am nächsten Tag wurde 5µl RNase A (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) pro Eppendorf-Gefäß zugegeben. Nach kurzem Zentrifugieren bei 13.000 Umdrehungen pro Minute wurden die Behälter für eine halbe Stunde bei 37°C auf dem Heizblock (QBT2, Fa. Grant Instruments Ltd., Cambridge, Großbritannien) belassen, um so einen Verdau von RNA-Fragmenten zu erreichen. Dann wurde nochmals kurz zentrifugiert, die Lösung mit einer Pipette durchmischt und erneut kurz zentrifugiert.

Nach photometrischer Konzentrationsmessung (UV-Photometer Ultrospec III, Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurde die DNA-Lösung bei -20°C aufbewahrt.

2.8 Primerbestimmung und -verdünnung

Die benötigten Primer, d.h. synthetische Oligonukleotide, wurden mit Hilfe der Software Primer Express (Fa. Applied Biosystems, Darmstadt) festgelegt und über die Firma MWG Biotech (Ebersberg) bezogen.

Aus der Stocklösung des benötigten Primers wurden durch Verdünnung Gebrauchslösungen hergestellt.

Für die Polymerase Chain Reaction (PCR) aus genomischer DNA wurde durch Zugabe von 10µl Stocklösung zu 90µl Aqua ad iniectabilia (Fa. Braun, Melsungen) eine Gebrauchslösung der Konzentration 10pmol/µl hergestellt.

Für die Cycle Sequencing Reaction wurden zu 97µl Aqua ad iniectabilia 3µl Stocklösung hinzugegeben, um eine Konzentration von 3pmol/µl zu erreichen.

Die fertigen Gebrauchslösungen wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.9 Polymerase Chain Reaction (PCR) aus genomischer DNA

2.9.1 Prinzip

Für die gezielte Amplifikation des *CEBPA*-Gens wurde die PCR verwendet. Das Gen besteht aus einem einzigen Exon ohne Introns. Als Ausgangsmaterial für die PCR diente daher die extrahierte genomische DNA aus archivierten mononukleären Zellen des Knochenmarks oder des peripheren Blutes.

Da die kodierende Region des *CEBPA*-Gens für eine Sequenzierung an einem Stück zu lang ist (2783 Basenpaare), wurde es in 4 überlappende Abschnitte aufgeteilt.

2.9.2 Lösungen

Für die PCR wurde der Hot Star Taq DNA Polymerase Kit (Fa. Qiagen, Hilden) verwendet.

Er enthält folgende Lösungen:

- PCR buffer, 10x konzentriert: enthält TrisCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 15mM MgCl₂; pH-Wert: 8,7 bei 20°C
- Q-Solution, 5x
- Hot Star Taq DNA Polymerase (5 units/µl)

Die Q-Solution ist eine Lösung, die das Schmelzverhalten der DNA verändert und das Ergebnis bei GC-reichen Templates verbessern soll.

Das Enzym Hot Star Taq DNA Polymerase wird erst bei Erhitzung auf 95°C für 15 Minuten aktiviert, bei Raumtemperatur zeigt es keine Aktivität. So wird die Entstehung unerwünschter PCR Produkte und Primer-Dimere verhindert.

Zusätzlich wurden

- dNTP-Stocklösung (hierfür wurden zu 60µl Aqua destillata je 10µl dATP, dTTP, dGTP und dCTP in der Konzentration 100mM zugegeben, um eine Konzentration von 10mM je dNTP zu erreichen; Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
- Gebrauchslösungen der Primer (Konzentration 10pmol/µl; Fa. MWG Biotech, Ebersberg) und
- Aqua destillata

eingesetzt.

Alle Lösungen wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.9.3 Primer

Pro Patient wurden jeweils 4 überlappende Primerpaare eingesetzt:

- CF 7 und CR 7
- CF 14 und CR 13
- CF 9 und CR 9
- CF 10 und CR 10

„F“ steht hierbei für Forward- und „R“ für Reverse-Leserichtung.

Somit wurde die gesamte kodierende Sequenz von *CEBPA* sowie 92 Nukleotide der 5' untranslatierten Region und 58 Nukleotide der 3' untranslatierten Region erfasst.

Die Primerpaare haben folgende Positionen im *CEBPA*-Gen (GenBank acc.no. (Eingangsnummer) U34070;

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&cmd=search&term=u34070>):

- CF 7: 500-519; 5'-GGCGAGCAGGGTCTCCGGGT-3'
- CR 7: 824-844; 5'-TGTGCTGGAACAGGTCGGCCA-3'
- CF 14: 744-761; 5'-GCTGGGCGGCATCTGCGA-3'
- CR 13: 1026-1045; 5'-CCCCGACGCGCTCGTACAGG-3'
- CF 9: 998-1017; 5'-CCGGCTACCTGGACGGCAGG-3'
- CR 9: 1414-1441; 5'-CGTTGCTGTTCTTGTCCACCGACTTCTT-3'
- CF 10: 1312-1328; 5'-CTCGGTGCCCGCCGGCCT-3'
- CR 10: 1706-1726; 5'-AACCACTCCCTGGGTCCCCGC-3'

Lokalisation der Primer im *CEBPA*-Gen

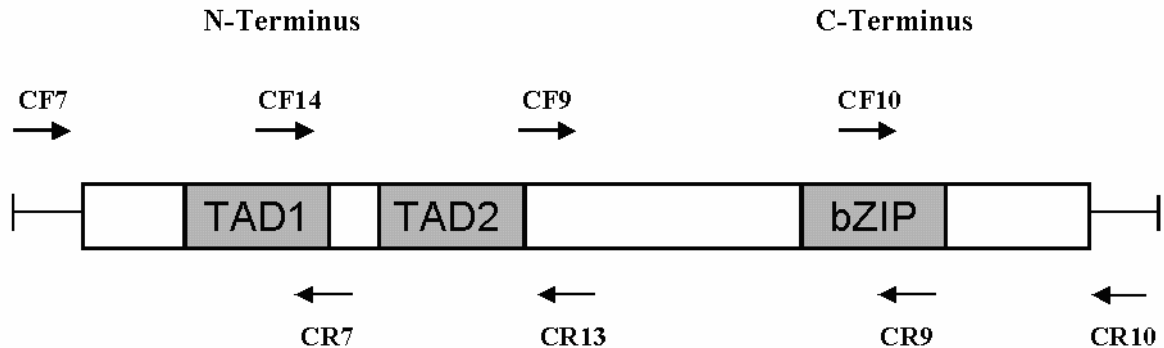


Abbildung 2: Lokalisation der Primer im *CEBPA*-Gen

CEBPA: CCAAT/enhancer binding protein alpha

N-Terminus: Amino-Terminus

C-Terminus: Carboxyl-Terminus

CF7, CF14, CF9, CF10: Primer in Forward-Leserichtung

CR7, CR13, CR9, CR10: Primer in Reverse-Leserichtung

TAD1/TAD 2: transactivation domain 1 / 2 (Transaktivierungsdomäne)

bZIP: basic region-leucine zipper-Domäne

Die Pfeile entsprechen der Lage der für die PCR (Polymerase chain reaction) verwendeten Primer.

2.9.4 Reaktionsansätze

Ein einzelner Ansatz bestand aus 30,5µl Aqua destillata, 5µl 10xPCR-Puffer, 10µl Q-Solution, 1µl dNTP (10pmol jedes dNTPs), 1µl Forward-Primer-Lösung (10pmol Primer), 1µl Reverse-Primer-Lösung (10pmol Primer), 0,5µl Hot Star Taq DNA Polymerase (2,5U) und 500ng DNA. Die DNA-Menge wurde bei erfolgloser PCR verdoppelt.

2.9.5 PCR-Bedingungen

Das PCR-Gerät (Gene Amp PCR System 2400 oder Gene Amp System 9700 oder 2700 der Fa. Applied Biosystems, Darmstadt) wurde folgendermaßen programmiert: 15 Minuten lang 95°C (Denaturierung), dann 35 Zyklen mit je einer Minute 94°C (Denaturierung) und drei Minuten 68°C (Annealing), schließlich 3 Minuten lang 68°C (Synthese) und unendlich 4°C. Das Reaktionsvolumen betrug 50 bis 52 µl, je nach eingesetzter Menge des

Templates. Bei Proben, die mehrfach in ihrer Sequenz nicht auswertbar waren, wurde die Zahl der Zyklen auf 40 erhöht.

Die PCR-Produkte wurden im Kühlschrank bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.10 Gelelektrophorese

Nach jeder PCR wurden 5µl des entstandenen Produkts zur Elektrophorese verwendet, um festzustellen, ob der gewünschte Genabschnitt auch amplifiziert wurde.

2.10.1 Gel

2.10.1.1 Material

- TAE-Puffer, 1x: enthält 0,04M Tris-Acetate (Fa. USB, Cleveland, USA), 0,001M EDTA (Fa. Merck, Darmstadt) und 100% Essigsäure (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Agarose: Sigma Agarose Type I, low EEO (Fa. Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Ethidiumbromidlösung (Fa. Eurobio, Courtaboeuf, Frankreich)

Oben genannte Substanzen wurden bei Raumtemperatur gelagert.

- 10x Blue Juice Gel loading buffer (Fa. Invitrogen, Groningen, Niederlande)
- Ready-load 100bp DNA-ladder (Fa. Invitrogen, Groningen, Niederlande), Konzentration 0,1µg/µl

Diese beiden Lösungen wurden im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

- Waage: Precisa 220M (Oerlikon AG, Zürich, Schweiz)
- Erlenmeyerkolben 250ml (Fa. Schott Duran, Mainz)
- Mikrowelle (Fa. Moulinex, München)
- Rührgerät (Fa. Heidolph, Schwabach)
- Elektrophorese-Kammer (Fa. MBT Brand, Gießen)

2.10.1.2 Herstellung des Gels

Je nach Anzahl der PCR-Produkte wurden unterschiedlich große Gele hergestellt:

Kleines Gel mit 12 Taschen: 50ml 1xTAE-Puffer wurden mit 1g Agarose in einem Erlenmeyerkolben vermischt und 2 Minuten lang in der Mikrowelle erhitzt. Es wurden 2 Tropfen der Ethidiumbromidlösung hinzugegeben und anschließend mit dem Rührgerät für

5 Minuten verrührt. Nach Einsetzen der Kämme in den Schlitten der Elektrophoresekammer wurde das noch flüssige Gel eingefüllt und 20 Minuten lang getrocknet.

Großes Gel mit 28 Taschen: Zu 150ml 1x TAE-Puffer in einem Erlenmeyerkolben wurden 3g Agarose hinzugegeben und diese Mischung 3 Minuten lang in der Mikrowelle erhitzt. Nach Zugabe von 3 Tropfen Ethidiumbromidlösung wurde 10 Minuten lang mit dem Rührgerät verrührt. Danach wurde genauso verfahren wie beim kleinen Gel.

2.10.2 Vorbereiten und Auftragen der Proben

Jeweils 5µl des entsprechenden PCR-Produkts wurde mit 2µl Blue Juice vermischt.

Das getrocknete Gel wurde in die mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gestellt und die Kämme entfernt. Jeweils am Anfang und am Ende einer Reihe wurde 4µl des 100bp-ladder in die Taschen eingefüllt, dazwischen die Proben mit der zu untersuchenden DNA. Der 100bp DNA-ladder ist eine Kontrolllösung mit 15 blunt-ended Fragmenten von 100bp bis 1500bp Länge (Vielfache von 100) und einem zusätzlichen Fragment von 2072 bp Länge. Diese Lösung dient als Anhalt dafür, wie lang die zu untersuchenden DNA-Fragmente sind. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 120V, 500mA und 150Watt. Bei einem kleinen Gel betrug die Zeit für die Elektrophorese 20 Minuten, beim großen Gel 50 Minuten.

2.10.3 Fotografieren des Gels

Die mit Ethidiumbromid angefärbten Banden wurden mittels UV-Licht sichtbar gemacht, die photographische Dokumentation der Resultate der Gelelektrophorese erfolgte mit Hilfe des Transilluminator 8000-Systems (Fa. Stratagene, Amsterdam, Niederlande).

2.11 Aufreinigung der PCR-Produkte

Es wurden nur die Produkte aufgereinigt, die in der Gelelektrophorese die erwartete Bande gezeigt hatten.

2.11.1 Material

Es wurde der QIAquick PCR-Purification-Kit (Fa. Qiagen, Hilden) verwendet. Es eignet sich zur Aufreinigung von Einzel- oder Doppelstrang-PCR-Produkten der Größe 100bp bis 10kb und enthält folgende Materialien:

- QIAquick Spin Columns (Säulen für die Zentrifugation mit 800µl Volumen)
- Collection tubes (Auffangtubes für die Zentrifugation mit 2ml Volumen)
- Puffer: - buffer PB
 - buffer PE (Konzentrat), zu 55ml dieses Puffers wurde vor Gebrauch 220ml 100% Ethanol (Fa. RdH, Seelze) gegeben.

Das Set wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Außerdem

- Ethanol 100% (Fa. RdH, Seelze)
- HPLC-Wasser (high pressure liquid chromatography: Li-Chrosolv Wasser für die Chromatographie, 1l=1,00k, M=18,02g/mol (Fa. Merck, Darmstadt)

2.11.2 Prinzip und Vorgehen

Durch die Aufreinigung mittels einer Silikagel-Membran in der Säule nach dem Prinzip der Gelchromatographie wurden Primerreste, ungebundene Nukleotide, Enzyme und Salze entfernt. Die an die Membran gebundene DNA wurde dann mit HPLC-Wasser eluiert.

Die Säulen wurden in die Collection tubes gestellt und das mit 200µl PB-Puffer gemischte PCR-Produkt (50-52µl) auf die jeweilige Säule gegeben. Anschließend wurde diese Mischung 60 Sekunden lang bei 13.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen. Dann wurden 750µl PE-Puffer auf die Säule gegeben und der Zentrifugationsschritt unter Verwerfung des Eluats zweimal wiederholt. Die Säulen wurden danach in ein Eppendorf-Tube (Größe: 1,5ml) mit abgeschnittenem Deckel gestellt. 30µl HPLC-Wasser wurden ins Zentrum der Säule auf die Silikagel-Membran pipettiert und eine Minute inkubiert. Danach wurde 60 Sekunden bei 13.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert.

Das erhaltene Eluat wurde in ein neues Eppendorf-Tube (1,5ml) überführt und bei -20°C gelagert.

2.12 Cycle Sequencing Reaction

Mit Hilfe der Cycle Sequencing Reaction (CSR) wurden einzelne DNA-Stränge des *CEBPA*-Gens für die anschließende Sequenzierung amplifiziert.

2.12.1 Material

2.12.1.1 Lösungen

Der ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Fa. Applied Biosystems, Darmstadt) enthält folgende Bestandteile in der fertigen Gebrauchslösung:

- A-Dye Terminator labeled with dichloro[R6G] (ddATP, grün markiert)
- C-Dye Terminator labeled with dichloro[ROX] (ddCTP, rot markiert)
- G-Dye Terminator labeled with dichloro[R110] (ddGTP, blau markiert)
- T-Dye Terminator labeled with dichloro[TAMRA] (ddTTP, schwarz markiert)
- Desoxyribonukleosidtriphosphate: dATP, dCTP, dITP, dUTP
- Ampli Taq DNA Polymerase, FS
- MgCl₂
- Tris-HCl Puffer, pH 9,0

Die Lösungen wurden bei -20°C gelagert.

- Gebrauchslösungen der benötigten Primer mit einer Konzentration von 3pmol/μl (siehe 2.5, Fa. MWG Biotech, Ebersberg)
- HPLC-Wasser: Li-Chrosolv Wasser für die Chromatographie, 1l=1,00k, M=18,02g/mol (Fa. Merck, Darmstadt)
- gereinigtes PCR-Produkt (siehe 2.8)

2.12.1.2 Primer

Pro Reaktionsansatz wurde jeweils nur ein Primer zugegeben: CF 7, CR 7, CF 14, CR 13, CF 9, CR9, CF 10 oder CR 10.

2.12.2 Reaktionsansätze

Ein Reaktionsansatz bestand aus 14μl HPLC-Wasser, 4μl ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix, 1μl Primerlösung (10pmol Primer) und 1-4μl Template (entspricht dem gereinigten PCR-Produkt aus 2.8).

2.12.3 PCR-Bedingungen

Das Gerät (Gene Amp PCR System 2400 oder 9700 oder 2700 der Fa. Applied Biosystems, Darmstadt) wurde auf folgendes Programm eingestellt:

Initiale Denaturierung 45 Sekunden lang bei 96°C, dann 25 Zyklen mit je 15 Sekunden lang Denaturierung bei 96°C, 10 Sekunden lang Annealing bei 54°C und 4 Minuten lang Elongation bei 60°C, danach unendlich 4°C.

Bei Patienten, die nach mehrfachen Versuchen keine auswertbare Sequenz zeigten, wurde die Zahl der Zyklen auf 30 erhöht. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die PCR-Produkte bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.13 DNA-Aufreinigung

Es wurden 2 Methoden angewendet: Zuerst die konventionelle Alkoholfällung mit Ethanol, später wurde auf den Dye Ex Spin Kit umgestellt.

2.13.1 Konventionelle DNA-Fällung

Zum CSR-Produkt wurden 5µl HPLC-Wasser (Fa. Merck, Darmstadt), 2µl Natriumacetat mit pH 4,8 und 55µl 100% Ethanol (Fa. RdH, Seelze) pipettiert, vermischt und in ein 0,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 30 Minuten lang bei 13.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden 250µl 70% Ethanol (Fa. RdH, Seelze) auf das Pellet gegeben und 5 Minuten bei 13.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und die Probe auf dem Heizblock (Thermomixer 5436, Fa. Eppendorf) bei 37°C und offenem Deckel getrocknet. Dann wurde die DNA in 20µl HPLC-Wasser resuspendiert und 10 Minuten auf den Thermomixer bei 45°C gestellt.

Die DNA-Lösung wurde bei -20°C gelagert.

2.13.2 Aufreinigung mit Dye Ex Spin Kit

Dieser Kit (Fa. Qiagen, Hilden) wird bei Raumtemperatur gelagert und enthält folgendes Material:

- Säulen: Dye Ex Spin Columns
- Auffanggefäße: Collection Tubes (2ml)

Das Set dient dazu, überflüssige Dye-Terminators (ddNTPs) aus der CSR zu entfernen und beruht auf dem Prinzip der Gelchromatographie, bei der die Trennung von Stoffen auf deren Molekulargewicht basiert. Während die kleineren Dye-Terminators in die Poren diffundieren und so im Gel zurückgehalten werden, fließen die größeren DNA-Fragmente durch das Gel hindurch.

Zunächst wurden die Deckel der Säulen mit Flüssigkeit um eine Vierteldrehung aufgedreht und der untere Verschluss entfernt. Die Säulen wurden dann in die Auffanggefäße gestellt und anschließend bei 2800 Umdrehungen pro Minute 3 Minuten lang zentrifugiert.

Die Auffanggefäße wurden verworfen und die Säulen, die nur noch Gel enthielten, in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß mit abgeschnittenem Deckel überführt. Der Deckel der Säulen wurde ganz abgedreht, das gesamte CSR-Produkt in die Mitte des Gels pipettiert, der Deckel wieder aufgeschraubt und das Ganze bei 2800 Umdrehungen pro Minute 3 Minuten lang zentrifugiert.

Der Durchfluss wurde in ein 0,5ml-Reaktionsgefäß überführt und bis zur Sequenzierung bei -20°C gelagert.

2.14 Sequenzierung

2.14.1 Prinzip

Bei der CSR bindet der Primer an das 3'-Ende der ssDNA, die Polymerase synthetisiert den komplementären DNA-Strang. Im Unterschied zur herkömmlichen PCR werden dem Ansatz neben den verschiedenen dNTP auch 4 verschiedene, unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosidtriphosphate (2'3'-ddNTP) hinzugefügt. Das hat den Effekt, dass zufällig ddNTP statt dNTP eingebaut werden, was zum Abbruch der Polymerasereaktion, also der Komplementärstrang-Synthese führt, weil an diesem Molekül kein freies 3'-OH für das Weiterlaufen der Reaktion zur Verfügung steht. Durch das richtige Verhältnis von ddNTP zu dNTP entstehen so unterschiedlich lange DNA-Stücke, die mit einem zufällig ausgewählten, fluoreszenzmarkierten A, T, C oder G enden.

Nach der Denaturierung werden die Oligonukleotide als Einzelstränge in einer polymergefüllten Kapillare elektrophoretisch getrennt. Die DNA-Fragmente wandern im elektrischen Feld an einem Laserstrahl vorbei, der die Fluoreszenzen anregt. Die Signale werden durch einen Detektor (Charge Coupled Device-Kamera) aufgenommen und von

einem Computer analysiert. Das Ergebnis ist eine Folge von Fluoreszenz-Peaks, die den einzelnen Nukleotiden zugeordnet werden können (Sanger et al. 1977).

2.14.2 Material

Es wurde der ABI PRISM 310 Genetic Analyzer der Fa. Applied Biosystems, Darmstadt verwendet.

- ABI PRISM buffer (10x) with EDTA (Fa. Applied Biosystems, Darmstadt)
- POP-6 (Performance Optimized Polymer 6) (Fa. Applied Biosystems)
- HPLC-Wasser: LiChrosolv Wasser für die Chromatographie, $\eta=1,00k$, $M=18,02g/mol$ (Fa. Merck, Darmstadt)
- Kapillare: 310 Genetic Analyzer 47cm x 10 μ m Capillaries (Fa. Applied Biosystems)
- Heizblock: Grant QBT 2 (Fa. Grant Instruments Ltd., Cambridge, Großbritannien)
- Computer: Power Macintosh 7200/90
- Software: ABI PRISM 310 Collection Sequencing Analysis 3.4 (Fa. Applied Biosystems)

2.14.3 Vorgehen

Die Proben wurden aufgetaut und 2 Minuten lang bei 95°C auf den Heizblock gestellt, um die DNA zu denaturieren. Die Deckel der Reaktionsgefäße wurden abgeschnitten und stattdessen spezielle Deckel für den Sequenzierer aufgesetzt.

Das Gerät wurde in allen Einstellungen auf die „Home-Position“ gebracht.

Dann wurde der Puffer mit HPLC-Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt und in die entsprechenden Gefäße gefüllt. Ebenso wurden die Gefäße für HPLC-Wasser aufgefüllt. Das Polymer wurde in die Spritze des Geräts aufgezogen und der Block mit demselben gefüllt.

Es wurde ein neues Sequence Sample Sheet und eine Sequence Injection List angelegt. Die Läufe wurden bei einer Temperatur von 50°C und mit einer Injektionszeit von 20 Sekunden durchgeführt.

Zur Auswertung wurde das Programm Sequencing Analysis 3.4 verwendet.

Die so erhaltenen Sequenzen wurden mit denen der gesunden Probanden verglichen.

2.15 Klonierung

2.15.1 Prinzip

Um festzustellen, ob in den Fällen mit einer veränderten DNA-Sequenz die Veränderungen auf beiden Allelen vorliegen bzw. ob in den Fällen mit mehreren Mutationen diese auf verschiedenen Allelen lokalisiert sind, wurden die DNA-Einzelstränge bei den von *CEBPA*-Mutationen betroffenen Patienten in *E. coli* (*Escherichia coli*)-Bakterien kloniert.

Als Plasmid-Vektor diente der pCR4-TOPO-Vektor (Fa. Invitrogen, Groningen, Niederlande), ein Plasmid, welches eine Kanamycin-Resistenz bewirkt und außerdem das *ccdB*-Gen, das mit dem *LacZ*-alpha-Fragment fusioniert ist, trägt. Dieses Gen bewirkt das Absterben der *E. coli*-Bakterien. Durch den Einbau eines PCR-Produkts in das Plasmid wird die Expression des Gens verhindert. Deshalb wachsen nur Bakterienkolonien mit dem rekombinanten Vektor im Nährmedium.

2.15.2 Material

Die PCR zur Amplifikation einzelner Allele wurde wie unter 2.8 beschrieben mit folgenden Primern (Fa. MWG, Ebersberg) durchgeführt (GenBank acc.no. U34070; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&cmd=search&term=u34070>):

- ATG-Fix: 573-601; 5'-GGAGAACTCTAACTCCACCATGGAGTCGG-3'
- 4R: 1651-1670; 5'-CCTCACGCGCAGTTGCCCAT-3'

Mit diesen Primern wurde die gesamte kodierende Region des *CEBPA*-Gens amplifiziert.

Es wurde der TOPO-TA Cloning Kit for Sequencing (Fa. Invitrogen, Groningen, Niederlande) eingesetzt. Er enthält folgende Lösungen:

- Salt Solution: 1,2 M NaCl
0,06 M MgCl₂
- Steriles Wasser
- pCR4-TOPO-Vektor
- TOP-10-Zellen: *E. coli*-Zellen (Chemically Competent)
- SOC-Medium: 2% Tryptone
0,5% Yeast Extract
10mM NaCl

2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
20mM Glucose

Zur Anzucht der Bakterien wurden Agar-Platten mit Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) und Kanamycin mit folgenden Bestandteilen eingesetzt:

- Tryptone: Bacto Tryptone, Pancreatic Digest of Casein (Fa. Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA)
- Yeast: Bacto Yeast Extract, water soluble portion of autolysed yeast containing vit. B-komplex (Fa. DIFCO Laboratories, Detroit , USA)
- NaCl: Sodium Chloride (Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande)
- Kanamycin (Boehringer, Mannheim)

Zur Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde der QIAprep 8 Miniprep Kit (Fa. Qiagen, Hilden) mit folgenden Bestandteilen verwendet:

- QIAprep 8 strips
- buffer P1 (enthält RNase)
- buffer P2 (enthält NaOH)
- buffer N3
- buffer PB
- buffer PE
- buffer EB (enthält 10mM Tris, pH 8,5)
- RNase A
- collection microtubes (1,2 ml)
- caps for QIAprep strips
- caps for collection microtubes

Außerdem wurde eine QIAvac 6S Vakuumpumpe (Fa. Qiagen, Hilden) eingesetzt.

2.15.3 Vorgehen

Vorbereitung: Zunächst wurde das LB-Medium wie folgt hergestellt: 10g Tryptone, 5g Yeast, 10g NaCl wurden in ein Glasgefäß gegeben und mit Aqua destillata auf einen Liter aufgefüllt. Der pH-Wert dieser Lösung liegt bei 7,5.

Für die Agar-Platten wurden dann 100 ml LB-Medium mit 1,5g Bacto-Agar in einem Erlenmeyerkolben gemischt und in der Mikrowelle aufgekocht, bis die Flüssigkeit klar aussah. Nach kurzem Abkühlen wurden 100µl Kanamycin zugegeben und dann je 25 ml auf eine Platte gegeben. Die Platten wurden bei -4°C ausgehärtet.

Tag1: Es wurde die Ligationsreaktion in einem 0,5ml Eppendorf-Gefäß angesetzt:

- 2µl PCR-Produkt
- 1µl Salt Solution
- 2µl steriles Wasser
- 1µl pCR4-TOPO-Vektor

Dieses Gemisch wurde 20 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf Eis gelegt.

In der darauf folgenden Transformationsreaktion wurde auf TOP-10-Zellen (*E. coli*) 2µl der o.g. Ligationsreaktion gegeben und gemischt. Die Zellen wurden 15 Minuten auf Eis gestellt, dann 30 Sekunden lang im 42°C warmen Wasserbad (Typ 1083, Fa. GFL, Burgwedel) schockerwärmt und schließlich wieder auf Eis gestellt. Dann wurde 250µl SOC-Medium zugegeben und bei 200 Umdrehungen pro Minute und 37°C eine Stunde lang unter Schütteln inkubiert (G24, Fa. Brunswick Scientific, Edison, USA).

100µl der Zelllösung wurden auf eine LB-Platte ausplattiert und bei 37°C über Nacht im Brutschrank (5042E, Heraeus Instruments, Osterode) belassen. Zur größeren Ausbeute wurden für jeden Ansatz 2 Platten ausplattiert.

Tag 2: Nach 20 Stunden Brutzeit wurde mit einer Impföse je eine Kolonie von der Platte in einen Snap Cap-Behälter (PP-Tube, Fa. Greiner Bio-one, Frickenhausen) übertragen. Dieser enthielt 5ml LB-Medium und 7,5µl Kanamycin. Pro Patient wurden je 10 Einzelkolonien ins Flüssigmedium gegeben und bei 37°C im Schüttler bei 220 Umdrehungen pro Minute bebrütet.

Tag 3: Dieser letzte Schritt diente der Isolierung der Plasmid-DNA. Dafür wurde der QIAprep 8 Miniprep Kit (Fa. Qiagen, Hilden) verwendet.

Nach 20 Stunden im Schüttler wurden die SnapCap-Behälter in der Minifuge T (Fa. Heraeus Instruments, Osterode) bei 3000 Umdrehungen pro Minute 10 Minuten lang zentrifugiert.

Die Pellets wurden in je 250µl P1-Lösung resuspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Dann wurden 250µl P2-Lösung dazugegeben, die Tubes verschlossen und alles vermischt. Schließlich wurden 500µl N3-Puffer dazugegeben und erneut gemischt.

Es folgte eine Zentrifugation bei 13000 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten.

Der Überstand wurde sofort in die mitgelieferten Gefäße für die QIAvac6s-Vakuumpumpe pipettiert und das Gerät auf 300mbar Vakuum eingestellt. Es wurden nacheinander je 1ml PB-Puffer und zweimal je 1ml PE-Puffer zugegeben und nach den Puffer-Zugaben jeweils das Vakuum solange angeschaltet, bis keine Flüssigkeit mehr aus den Gefäßen tropfte. Nach 5 Minuten Trocknungszeit wurde schließlich der Auffangbehälter entfernt, durch Tubes ersetzt und mit je 100µl EB-Puffer eluiert. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die Vakuumpumpe nochmals für 10 Minuten eingeschaltet.

Die so aufgereinigte Plasmid-DNA wurde bei -20°C konserviert. Zur Analyse der Gensequenz der einzelnen Klone wurde die CSR mit den jeweiligen Primern in Forward- und Reverse-Richtung, die den veränderten Genabschnitt erfassen, und die weiteren Schritte bis zur Sequenzierung angeschlossen.

2.16 Statistische Analysen

Schwerpunkt der Dissertationsarbeit war der Nachweis einer krankheitsspezifischen Genmutation an einer definierten Patientenpopulation. Es handelte sich um eine rein experimentelle Arbeit. Diese experimentellen Arbeiten waren jedoch Grundlage für die Durchführung der in der Arbeit erwähnten klinischen Korrelationen, die im Rahmen eines größeren Forschungsprojektes analysiert wurden. Durch diese Korrelationen ergaben sich neue, klinisch signifikante Aspekte, die daher im Diskussionsteil der Arbeit integriert und diskutiert wurden. Die statistischen Analysen zur Korrelation der experimentellen Daten zu den klinischen Daten wurden von einem Biostatistiker und dem Leiter der Studienzentrale durchgeführt. Da der Schwerpunkt der Dissertationsarbeit nicht in der Durchführung dieser Korrelationen und der damit verbundenen statistischen Analysen, sondern im Nachweis der krankheitsspezifischen Genmutation lag, erfolgte keine Beschreibung der statistischen Analysen.

3. Ergebnisse

3.1 Polymorphismen

Die häufigsten in der vorliegenden Arbeit gefundenen *CEBPA*-Mutationen waren Polymorphismen, also Sequenzvarianten, die nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des Proteins führen. Insgesamt wiesen 33 der 122 untersuchten Patienten (27%) solche Veränderungen auf.

Der häufigste Polymorphismus betraf das Nukleotid 1281 (Bezugssequenz GenBank acc.no. U34070). Er trat bei 31 (25%) der 122 Patienten auf, 23 davon hatten einen normalen Karyotyp, 2 eine inv(16) und jeweils 3 eine t(8;21) bzw. t(11q23). Dabei war auf dem Strang in Forward-Leserichtung Guanin durch Thymin, auf dem Reverse-Strang entsprechend Cytosin durch Adenin ersetzt. In der Subgruppe mit normalem Karyotyp entsprach der Prozentsatz mit diesem Polymorphismus 27%.

Eine weitere Sequenzvariante betraf das Nukleotid 1164 (Bezugssequenz GenBank acc.no. U34070). Hier wurde Cytosin durch Thymin ersetzt. Diese Variante wurde bei einem Patienten mit normalem Karyotyp gefunden, hatte also eine Inzidenz von 1%.

Ebenfalls mit einer Inzidenz von 1% trat die Sequenzvariante des Nukleotids 630 (Bezugssequenz GenBank acc.no. U34070) auf. Anstelle von Cytosin war hier die Base Thymin zu finden. Es handelte sich um einen Patienten mit normalem Karyotyp.

Ein Polymorphismus wurde auch bei einem der 9 gesunden Probanden gefunden. Dabei handelte es sich um die Veränderung des Nukleotids 1281, wie oben beschrieben.

3.2 Inzidenz von *CEBPA*-Mutationen

Bei 11 (9%) der 122 untersuchten Patienten wurden Mutationen im *CEBPA*-Gen gefunden, welche die Aminosäuresequenz von CEBPA verändern. 6 (5%) Patienten wiesen mehr als eine Mutation auf.

Diese Mutationen traten alle bei Patienten mit normalem Karyotyp auf. Bezogen auf die Gruppe der Patienten mit normalem Karyotyp (84 Patienten) waren 13,1% der Patienten von einer Mutation betroffen, 7% von mehr als einer Mutation.

Bei den Patienten mit inv(16), t(8;21), t(15;17) oder t(11q23) wurden keine die Proteinsequenz verändernden Mutationen gefunden.

3.3 Mutationstypen

Es wurden verschiedene *CEBPA*-Mutationstypen gefunden: Nonsense-Mutationen mit Verschiebung des open reading frame (ORF, offener Leserahmen) und Missense-Mutationen (in-frame-Mutationen), die eine Veränderung der Aminosäuresequenz bewirken, nicht jedoch des ORF. Die Mutationen betrafen unterschiedliche Domänen des CEBPA-Proteins. Sie werden in der folgenden Tabelle dargestellt.

Mutationen im *CEBPA*-Gen mit Veränderung der Aminosäuresequenz des CEBPA-Proteins

Pat.-Nr.	FAB-Subtyp	DNA (Bezugssequenz GenBank U34070)	Aminosäure-Sequenz	Protein
3	M2	655_659del 1519_1520insCGA	P22fsX104 T310dup	N-terminale Nonsense-Mutation (N-terminaler Stopp) C-terminale in frame-Mutation (Duplikation im bzip)
8	M2	748_752delinsC	G53fsX158	N-terminale Nonsense-Mutation (N-terminaler Stopp)
10	M2	798_801del 1516_1517insTCA	D69fsX158 E309delinsVK	N-terminale Nonsense-Mutation (N-terminaler Stopp) C-terminale in frame-Mutation (Insertion im bzip)

15	M4	902_904del	G104del	N-terminale in frame-Mutation (Deletion zwischen TAD1 u. TAD2)
16	M1	905_924dup 1526_1528dup	P112fsX166 K313dup	N-terminale Nonsense-Mutation (N-terminaler Stopp) C-terminale in frame-Mutation (Duplikation im bzip)
25	M2	1525_1557dup	D320fsX325	C-terminale Nonsense-Mutation (Stopp im bzip)
27	M1	1146_1184del 1175_1180dup	P184_P198delinsP P194_H195dup	N-terminale in frame-Mutation (Deletion in TAD2) N-terminale in frame-Mutation (Duplikation in TAD2)
35	M5	1149_1277del 1153_1155del 1160_1165dup 1175_1180dup	P187fsX316 P188del H192_P193dup P194_H195dup	C-terminale Nonsense-Mutation (Stopp im bzip) N-terminale in frame-Mutation (Deletion in TAD2) N-terminale in frame-Mutation (Duplikation in TAD2) N-terminale in frame-Mutation (Duplikation in TAD2)

35 Forts.	M5	1310_1315dup	A240_L241insLA	In frame-Mutation (Insertion zwischen TAD2 und bzip)
49	M4	1153_1155del	P188del	N-terminale in frame- Mutation (Deletion in TAD2)
50	M1	1291G>T	E334X	C-terminale Nonsense- Mutation (Stopp im bzip)
60	M2	878_902del 1525_1526insGGC	G96fsX151 Q311_Q312insR	N-terminale Nonsense- Mutation (N-terminaler Stopp) C-terminale in frame- Mutation (Insertion im bzip)

Tabelle 1: CEBPA-Mutationen

CEBPA: CCAAT/enhancer binding protein alpha

Pat.-Nr.: Patientennummer

FAB: French American British Cooperative Group-Klassifikation (morphologische Subtypen der akuten myeloischen Leukämie M0-M7)

DNA: Desoxyribonukleinsäure

Basen: C: Cytosin; G: Guanin; A: Adenin; T: Thymin

Aminosäuren: P: Prolin; T: Threonin; G: Glycin; D: Aspartat; E: Glutamat; V: Valin;

K: Lysin; H: Histidin; A: Alanin; L: Leucin; Q: Glutamin; R: Arginin

del: Deletion; ins: Insertion; dup: Duplikation

Forts.: Fortsetzung

fs: frameshift

X: Stopp (Abbruch der Aminosäuresynthese)

N-terminal: amino-terminal; C-terminal: carboxyl-terminal

bzip: basic region-leucine zipper-Domäne

TAD1/TAD 2: transactivation domain 1 / 2 (Transaktivierungsdomäne)

Nummerierung der Sequenzen: Bezugssequenz Gen Bank Eingangsnummer U34070.

Aminosäuresequenz gemäß ORF-Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)

Lokalisation der funktionellen Domänen des CEBPA-Proteins gemäß Friedman et al.

(1990) und Vinson et al. (1989). Auswirkungen der CEBPA-Mutationen auf das CEBPA-Protein sind theoretisch abgeleitet.

Die folgenden Ausschnitte aus *CEBPA*-Gensequenzen zeigen als Beispiel für eine Mutation eine Duplikation von 3 Nukleotiden im Vergleich zum Wildtyp:

Beispiel einer Gensequenz mit *CEBPA*-Mutation

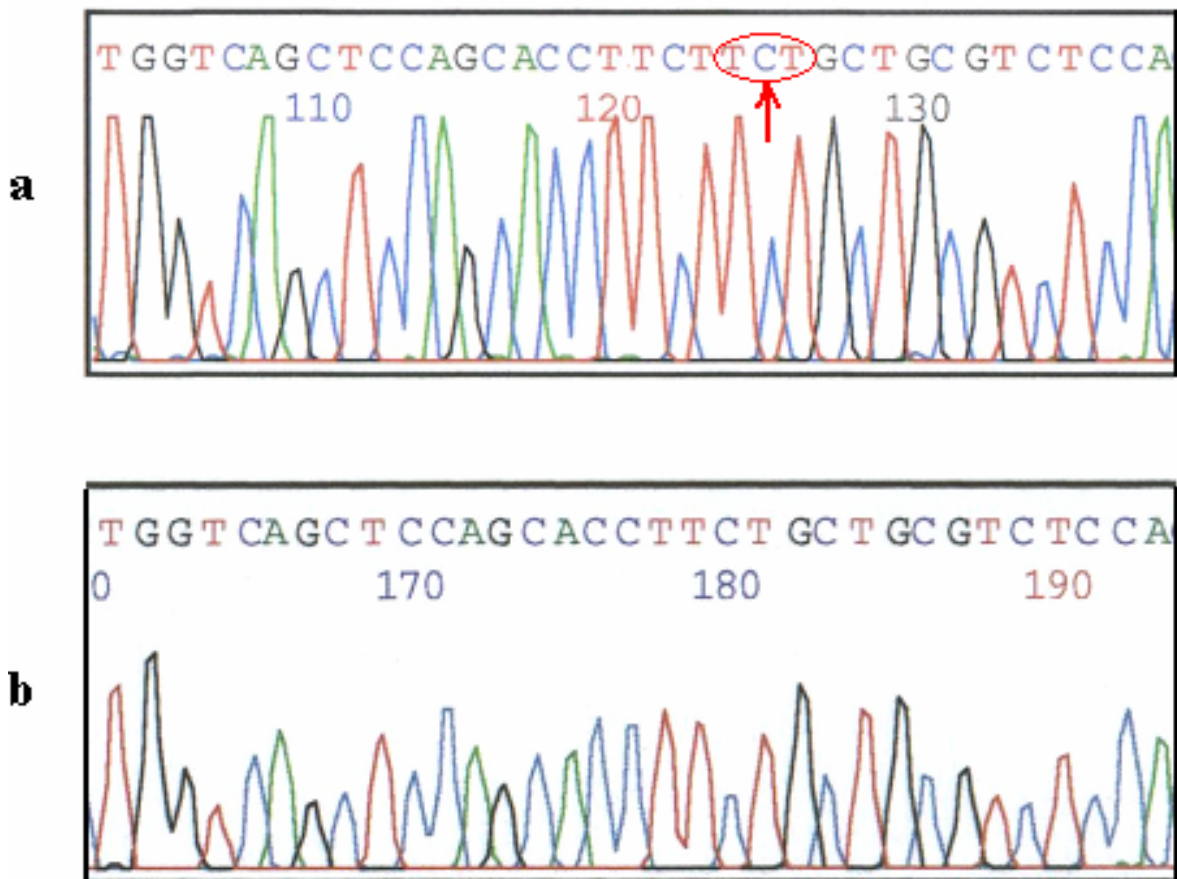


Abbildung 3: Beispiel einer Gensequenz mit *CEBPA*-Mutation

a: Ausschnitt einer Gensequenz mit *CEBPA*-Mutation (markiert): Duplikation der Nukleotide TCT (Nr. 1526-1528 im *CEBPA*-Gen, GenBank Eingangsnummer U34070), entspricht dem Patienten Nr. 16 in der Tabelle. Diese Mutation führt zur Duplikation der Aminosäure Lysin Nr. 313 im *CEBPA*-Protein.

Abkürzungen: *CEBPA*: CCAAT/enhancer binding protein alpha; T: Thymin; G: Guanin; C: Cytosin; A: Adenin

b: Wildtyp des gleichen Genabschnitts zum Vergleich.

3.4 Lokalisation der Mutationen auf den Allelen

Bei der Klonierung und anschließenden Sequenzierung von DNA-Einzelsträngen des *CEBPA*-Gens mittels *E.coli*-Bakterienkulturen wurde festgestellt, dass sich bei den Patienten mit nur einer Mutation sowohl Klone mit Mutation als auch Wildtyp-Klone fanden. Es handelt sich in diesen Fällen somit sehr wahrscheinlich um heterozygote Mutationen.

Bei den Klonierungsexperimenten mit DNA-Proben der Patienten 3, 10, 16 und 60, also den Patienten mit N-terminaler Nonsense-Mutation und gleichzeitiger C-terminaler in-frame-Mutation, fanden sich Klone mit alleiniger N- und alleiniger C-terminaler Mutation. Dies legt nahe, dass die Mutationen auf unterschiedlichen Allelen lokalisiert sind, d.h. dass es sich hierbei um biallelische Mutationen handelt.

3.5 Auswirkungen der Mutationen auf das CEBPA-Protein

Die Auswirkungen der *CEBPA*-Mutationen auf das CEBPA-Protein wurden theoretisch abgeleitet (Aminosäuresequenz gemäß ORF-Finder;

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>, Lokalisation der funktionellen Domänen des CEBPA-Proteins gemäß Friedman et al. (1990) und Vinson et al. (1989)).

Wie bereits in der obigen Tabelle gezeigt, fanden sich unterschiedliche Arten von Mutationen: Nonsense-Mutationen und Missense-Mutationen (in-frame-Mutationen).

Bei 8 (7%) der 122 Patienten (10% der Patienten mit normalem Karyotyp) fanden sich Nonsense-Mutationen durch frameshift und daraus resultierendem Stoppcodon mit Abbruch der Aminosäuresynthese.

Eine Sonderform der Nonsense-Mutationen ist die der N-terminalen Nonsense-Mutation mit frameshift und dadurch resultierendem Stoppcodon im Bereich der N-terminalen CEBPA-Domäne. Diese wurde bei 5 (4%) der untersuchten Patienten gefunden (Nr. 3, 8, 10, 16 und 60). Bezogen auf die Gruppe der Patienten mit normalem Karyotyp fand sich diese Form der N-terminalen Nonsense-Mutation bei 6% der Patienten. Es handelt sich um eine loss-of-function-Mutation (Funktionsverlust-Mutation), die zur Synthese einer verkürzten CEBPA-Isoform mit 30kD Molekulargewicht statt der Wildtyp-Form mit 42kD führt. Diese Isoform inhibiert auf dominant-negative Weise die Funktion des Wildtyp-

CEBPA-Proteins, d.h. die Bindung und Aktivierung von Zielgenen, die für die Granulozytendifferenzierung entscheidend sind (Gombart et al. 2002, Pabst et al. 2001b).

Bei 4 (80%) dieser Patienten (Nr. 3, 10, 16 und 60) lag gleichzeitig auch eine in frame-Mutation der für die DNA-Bindung notwendigen C-terminalen Domäne vor. Diese lagen jedoch nach der Analyse mittels Klonierung und anschließender Sequenzierung auf verschiedenen Allelen des *CEBPA*-Gens. Ein Patient (Nr. 8) wies die N-terminale loss-of-function-Mutation ohne weitere *CEBPA*-Mutationen auf.

Bei 3 (2%) der Patienten (Nr. 25, 35 und 50) lag eine C-terminale Nonsense-Mutation mit einem Stopp der Aminosäuresynthese in der basic region-leucine zipper-Domäne vor. Bezogen auf die Patientengruppe mit normalem Karyotyp entspricht dies 4%.

Die in frame-Mutationen lagen in Form von Insertionen, Deletionen, Duplikationen und Substitutionen vor und traten sowohl C- als auch N-terminal sowie im Bereich zwischen den beiden terminalen Domänen auf. Diese Missense-Mutationen bewirken eine veränderte Aminosäuresequenz, jedoch kein Stoppcodon. Insgesamt wurden 12 in frame-Mutationen bei 8 Patienten (entsprechend 7% des gesamten Patientenkollektivs und 10% der Patientengruppe mit normalem Karyotyp) gefunden. Davon waren 4 C-terminal gelegen (Patienten-Nr. 3, 10, 16, 60), 7 N-terminal (Patienten-Nr. 15, 27, 35, 49) und eine im Bereich zwischen der N-terminalen Transaktivierungsdomäne und der C-terminalen Bindungsdomäne (Patient Nr. 35).

Lediglich 2 der Mutationen traten doppelt auf: Die Deletion der Nukleotide 1153 bis 1155 (GenBank acc.no. U34070) mit daraus entstehender Deletion von Prolin Nr. 188 bei den Patienten Nr. 35 und 49 und die Duplikation der Nukleotide 1175 bis 1180 GenBank acc.no. U34070) mit Duplikation der Aminosäuren Prolin und Histidin Nr. 1194 und 1195 (Patienten 27 und 35).

3.6 Assoziation mit anderen Mutationen

Für die Patienten der AML HD93-Studie mit normalem Karyotyp lagen bereits Untersuchungen zum Mutationsstatus des *FLT3*-Gens (Fröhling et al. 2002a) sowie des *MLL*-Gens (Döhner et al. 2002) vor, die von der AMLSG ULM durchgeführt wurden.

Daher war es möglich, die Assoziation der *CEBPA*-Mutationen mit anderen Mutationen zu prüfen.

Auf die gesamte Gruppe der Patienten mit normalem Karyotyp gesehen, waren 45 der 84 Patienten von *FLT3*-ITD, 17 von Punktmutationen von Codon 835 (D835) innerhalb der zweiten Tyrosinkinasedomäne von *FLT3* und 6 von partiellen Tandemduplikationen des *MLL*-Gens betroffen.

Bei 5 der 11 Patienten mit *CEBPA*-Mutationen lagen gleichzeitig Mutationen des *FLT3*-Gens vor. Dabei handelte es sich in allen Fällen um interne Tandemduplikationen. Es fiel auf, dass nur eine der *FLT3*-ITD bei einem Patienten mit einer N-terminalen *CEBPA*-Nonsense-Mutation gefunden wurde. Diese trat bei dem Patienten mit der Nummer 8 auf, der keine weitere *CEBPA*-Mutation aufwies. Es wurden keine Punktmutationen von *FLT3*-D835 innerhalb der zweiten Tyrosinkinsedomäne bei gleichzeitiger *CEBPA*-Mutation gefunden.

Keiner der Patienten mit *CEBPA*-Mutation wies eine partielle Tandemduplikation des *MLL*-Gens auf.

Die Tabelle auf der folgenden Seite fasst diese Ergebnisse zusammen.

Mutationen im *FLT3*- und *MLL*-Gen in Bezug auf den *CEBPA*-Mutationsstatus von Patienten mit normalem Karyotyp

	<i>FLT3</i> -ITD	<i>FLT3</i> D835	<i>MLL</i> -PTD
N-terminale <i>CEBPA</i> -Nonsense-Mutation (n=5)	1	0	0
andere <i>CEBPA</i> -Mutation (n=6)	4	0	0
Keine <i>CEBPA</i> -Mutation (n=73)	40	17	6

Tabelle 2: Koinzidenz von *CEBPA*-Mutationen und *FLT3*- bzw. *MLL*-Mutationen

CEBPA: CCAAT/enhancer binding protein alpha-Gen

FLT3: FMS-like tyrosine kinase 3-Gen

MLL: mixed lineage leukemia-Gen

ITD: interne Tandemduplikation

D835: Mutation der Aminosäure 835 von *FLT3*

PTD: partielle Tandemduplikation

N-terminal: amino-terminal

n: Patientenzahl

3.7 FAB-Subtypen der Patienten mit *CEBPA*-Mutation

Bei der Analyse des FAB-Subtyps der Patienten mit normalem Karyotyp und *CEBPA*-Mutation fiel eine Häufung der phänotypisch ähnlichen Subtypen M1 und M2 auf. Diese Subtypen wiesen 8 der 11 Patienten mit Mutation (72,7%) auf, davon 3 den Subtyp M1 (Myeloblastenleukämie ohne Ausreifung) und 5 den Subtyp M2 (Myeloblastenleukämie mit Reifezeichen).

Die Patienten mit einer N-terminalen Nonsense-Mutation von *CEBPA* und Synthese des verkürzten 30kD-Proteins hatten zu 100% den Phänotyp M1 oder M2. Darunter waren 4 Patienten mit Subtyp M2 und einer mit Subtyp M1.

Unter den Patienten mit anderen Mutationstypen waren auch 2 mit M4-Phänotyp (myelomonozytäre Leukämie) und einer mit M5-Phänotyp (Monozytenleukämie).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten mit AML im Alter von 16 bis 60 Jahren auf Mutationen des *CEBPA*-Gens untersucht. Dabei konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Gruppe der Patienten mit normalem Karyotyp. In diese Subgruppe fallen bei der Untersuchung mittels konventioneller zytogenetischer Techniken ca. 45% aller jüngeren erwachsenen AML-Patienten (Mrozek et al. 2001).

Bisher wird bei der Diagnosestellung der AML eine Risikostratifizierung nur mit Hilfe häufiger chromosomaler Aberrationen vorgenommen und die Therapie danach angepasst. Die Gruppe von AML-Patienten mit normalem Karyotyp wird in allen bislang publizierten genetischen Stratifikationssystemen der intermediären Risikokategorie zugeordnet. Sie umfasst jedoch Fälle mit günstigem, intermediärem und ungünstigem klinischen Verlauf (Byrd et al. 2002, Grimwade et al. 1998, Slovak et al. 2000). Neuere Untersuchungen belegen, dass die Gruppe der Patienten ohne zytogenetische Veränderungen auf molekularer Ebene sehr heterogen ist. Daher wird versucht, mit Hilfe molekulargenetischer Analysen auch für diese große Gruppe von Patienten ohne informative chromosomale Marker eine Differenzierung in prognostisch unterschiedliche Subgruppen durch molekulare Marker zu finden. Diese Erkenntnisse könnten in die Therapiestrategie mit einfließen und so zur Prognoseverbesserung beitragen (Baldus et al. 2003, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al. 2003, Döhner et al. 2002, Fröhling et al. 2004, Fröhling et al. 2002a, Kottaridis et al. 2001, Thiede et al. 2002, Whitman et al. 2001).

In den letzten Jahren konnte so beispielsweise die prognostische Wertigkeit von *MLL*- und *FLT3*-Mutationen sowie der Expression von *BAALC* nachgewiesen werden.

Partielle Tandemduplikationen des *MLL*-Gens treten bei ca. 6-11% der AML-Patienten mit normalem Karyotyp auf und sind mit einer signifikant kürzeren Remissionsdauer verbunden (Caligiuri et al. 1998, Döhner et al. 2002, Schnittger et al. 2000).

Mutationen der Tyrosinkinase *FLT3* in Form von ITD oder Punktmutationen stellen ebenfalls einen unabhängigen negativen prognostischen Faktor für die Remissionsdauer und darüber hinaus auch für die Gesamtüberlebensrate (overall survival, OS) dar (Abu-Duhier et al. 2000, Fröhling et al. 2002a, Kiyoi et al. 1999, Kottaridis et al. 2001, Rombouts et al. 2000, Schnittger et al. 2002, Thiede et al. 2002).

Die starke Expression von *BAALC* (brain and acute leukemia, cytoplasmic) konnte als unabhängiger Risikofaktor für das OS, das ereignisfreie Überleben (event-free survival, EFS) und das krankheitsfreie Überleben (disease free survival, DFS) identifiziert werden (Baldus et al. 2003).

Zu diesen molekularen Markern zählen auch Mutationen des *CEBPA*-Gens. Das auf Chromosom 19 (Genlocus 19q13.1) lokalisierte, intronfreie Gen (Hendricks-Taylor et al. 1992) kodiert für CEBPA, welches zur Gruppe der leucine-zipper-Transkriptionsfaktoren gehört. Die für die DNA-Bindung und Dimerisierung entscheidende basic region-leucine zipper-Domäne (bzp) liegt C-terminal im Protein, die beiden Transaktivierungsregionen N-terminal (Antonson et al. 1995, Friedman et al. 1990, Landschulz et al. 1988, Tenen et al. 1997, Vinson et al. 1989).

CEBPA ist an der Regulation der Myelopoese beteiligt, indem es die Expression von Genen steuert, die Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle und andere Transkriptionsfaktoren kodieren, die wiederum für die Differenzierung einer myeloischen Vorläuferzelle in einen reifen Granulozyten entscheidend sind (Ward et al. 2000). Durch Studien an murinen *CEBPA*-knock out-Modellen konnte gezeigt werden, dass Funktionsverlust von CEBPA zu einem Defekt in der Reifung der Granulozyten innerhalb des hämatopoetischen Systems führt und die Mehrzahl der Leukozyten im peripheren Blut dieser Tiere Myeloblasten sind (Tenen et al. 1997, Zhang, D. E. et al. 1997).

Die Untersuchung von Patienten mit prognostisch günstigen Rearrangements spricht ebenfalls für eine entscheidende Rolle des CEBPA-Funktionsverlustes in der Leukämogenese: Bei der Translokation t(8;21) wird das Fusionsgen *RUNX1-CBF2T1* (auch *AML1-ETO* genannt) gebildet. Das Transkriptionsprodukt AML1-ETO supprimiert die Expression des *CEBPA*-Gens (Pabst et al. 2001a). Auch bei der inv(16) konnte gezeigt werden, dass die Expression von *CEBPA* im Knochenmark bei der Diagnosestellung der AML im Vergleich zum Knochenmark gesunder Probanden signifikant vermindert ist und diese Expression während der kompletten Remission wieder ansteigt (Cilloni et al. 2003). Bei der Translokation t(15;17) wird das Fusionsprotein PML-RARA gebildet. Es beeinträchtigt die CEBPA-Funktion, indem dessen Bindung an die DNA hemmt (Lodie et

al. 1999). Es sind also 3 AML-Subgruppen mit prognostisch günstigem Outcome durch einen Funktionsverlust von CEBPA gekennzeichnet.

Einige neuere Studien beleuchten die Inzidenz und die prognostische Bedeutung von *CEBPA*-Mutationen bei AML-Patienten.

Pabst et al. fanden bei 10 (7,3%) von 137 AML-Patienten *CEBPA*-Mutationen. Dabei wurden neben C-terminal lokalisierten Mutationen auch N-terminal gelegene loss-of-function-Mutationen mit daraus resultierender Synthese einer physiologisch in kleinen Mengen vorkommenden Isoform des Proteins identifiziert, deren Molekulargewicht statt 42kD nur 30kD beträgt. In vitro wurde für dieses verkürzte Protein eine stark verringerte Fähigkeit zur Transaktivierung des G-CSF-Promoters nachgewiesen. Es inhibierte darüber hinaus die Funktion des Wildtyp-CEBPA, wenn es im Verhältnis 1:1 mit demselben exprimiert wurde. Es führte im Gegensatz zum 42kD-Protein nicht zu einer Differenzierung von U937-Zellen zu Granulozyten (Pabst et al. 2001b).

In einer retrospektiven Studie von Preudhomme et al. wurde die prognostische Bedeutung von *CEBPA*-Mutationen bei 135 AML-Patienten mit unterschiedlichem Karyotyp untersucht. Die Mutationen wurden bei 11% der Patienten nachgewiesen und betrafen nur Patienten mit intermediärem zytogenetischen Risiko. Der Nachweis einer *CEBPA*-Mutation war mit einer signifikant besseren Prognose bezüglich 5-Jahres-Überlebensrate, EFS und DFS assoziiert, vorausgesetzt, es lag nicht gleichzeitig eine *FLT3*-ITD vor. Diese Arbeitsgruppe schlägt eine modifizierte Risikostratifizierung vor, die als Kriterien für eine gute Prognose neben t(8;21), t(15;17) und inv(16) auch *CEBPA*-Mutationen ohne *FLT3*-ITD und ohne ungünstige zytogenetische Veränderungen definiert. Patienten mit *CEBPA*-Mutationen und *FLT3*-ITD ohne ungünstige zytogenetische Veränderungen gehören nach diesem Vorschlag der intermediären Risikogruppe an (Preudhomme et al. 2002).

In einer Arbeit von van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al. werden in-frame Mutationen der C-terminal lokalisierten basic region-leucine zipper-Domäne von CEBPA beschrieben, welche in einer verminderten DNA-Bindungsfähigkeit resultieren. Diese Mutationsform wurde bei 12 (4,3%) von 277 intermediate-risk-AML-Patienten gefunden und war mit loss-of-function-Mutationen des N-Terminus von CEBPA assoziiert. Diese beiden Mutationen lagen in allen Fällen auf verschiedenen Allelen. Diese Arbeitsgruppe

fand signifikant höhere Überlebensraten für Patienten mit diesen biallelischen *CEBPA*-Mutationen im Vergleich zur Gruppe ohne *CEBPA*-Mutation (van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al. 2003).

Die Resultate der o.g. Studien konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Hier betrug die Inzidenz von *CEBPA*-Mutationen der gesamten untersuchten AML-Studiengruppe 9% (11/122). Im Unterschied zu den 3 erstgenannten Studien konzentrierte sich die vorliegende Arbeit auf die Patienten mit normalem Karyotyp. Es wurde daher eine Patientenpopulation untersucht, die homogen bezüglich des Alters bei Diagnosestellung (16-60 Jahre), der Zytogenetik und der erhaltenen intensiven Therapie (Doppelinduktion, Konsolidierung mit Hochdosis-Cytarabin) ist. Innerhalb der Gruppe von Patienten mit normalem Karyotyp wiesen 13% (11/84) mindestens eine und 7% (6/84) mehr als eine *CEBPA*-Mutation auf. Bei Patienten mit den Aberrationen $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q11\sim21)$, $inv(16)(p13q22)$ oder $t(11q23)$ wurden keine *CEBPA*-Mutationen gefunden.

In der vorliegenden Untersuchung konnten unterschiedliche *CEBPA*-Mutationstypen nachgewiesen werden. Zum einen waren unter den Mutationen sowohl in-frame Mutationen, d.h. Missense-Mutationen in Form von Insertionen, Duplikationen, Substitutionen oder Deletionen, als auch frameshift-Mutationen (Nonsense-Mutationen) mit resultierendem Stoppcodon. Zum anderen wurden beide Formen sowohl im Bereich der N-terminalen Domäne als auch im Bereich der C-terminalen Domäne von *CEBPA* gefunden.

Nonsense-Mutationen der N-terminalen *CEBPA*-Domäne als sogenannte loss-of-function-Mutationen mit Synthese der oben beschriebenen verkürzten *CEBPA*-Isoform mit 30kD Molekulargewicht lagen bei 6% der Patienten mit normalem Karyotyp vor. Bei 4 der 5 Patienten mit dieser Mutationsform lagen gleichzeitig in-frame-Mutationen des C-Terminus von *CEBPA* vor, was bereits in mehreren Arbeiten beschrieben wurde (Gombart et al. 2002, Pabst et al. 2001b, Preudhomme et al. 2002, van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al. 2003). Bei einem der Patienten trat diese loss-of-function-Mutation auch isoliert, d.h. ohne gleichzeitige in-frame-Mutation der bzip-Region, auf.

In Analogie zur Studie von van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al. (2003) lagen diese nach der Analyse mittels Klonierung und anschließender Sequenzierung auf verschiedenen Allelen des *CEBPA*-Gens. Da die N-terminalen loss-of-function-Mutationen in präklinischen Studien dominant-negative Eigenschaften aufweisen, ist bei diesen Patienten mit einem Funktionsverlust von CEBPA zu rechnen, der wahrscheinlich zur Leukämogenese beiträgt (Gombart et al. 2002, Pabst et al. 2001b). Die funktionellen Untersuchungen von D'Alo et al. und Keeshan et al. zeigen, dass für die DNA-Bindung und Transaktivierung von Genen und letztlich für die Granulozytendifferenzierung aus myeloischen Vorläuferzellen verschiedene CEBPA-Domänen notwendig sind, nämlich eine intakte N-terminale Transaktivierungsdomäne und eine intakte DNA-Bindungsregion (D'Alo et al. 2003, Keeshan et al. 2003).

Letztere Region ist von Mutationen betroffen, die Genabschnitte des C-terminalen Anteils des Proteins, d.h. die basic region-leucine zipper-Domäne, kodieren. Dabei wurden in der vorliegenden Arbeit frameshift-Mutationen (bei 4% der Patienten mit normalem Karyotyp) und in-frame-Mutationen (5%) nachgewiesen. Die Aussage von Leroy et al., dass es sich bei C-terminalen Mutationen hauptsächlich um in-frame-Mutationen und bei N-terminalen Mutationen um frameshift-Mutationen konnte hier nicht bestätigt werden (Leroy et al. 2005). N-terminal lagen in gleicher Inzidenz wie C-terminal in-frame-Mutationen vor, nämlich bei 5% der Patienten. Mehrere in vitro-Analysen mit Leukämie-Zellreihen zeigen als funktionelle Auswirkung von Mutationen der bzip-Region eine beeinträchtigte Bindungsfähigkeit von CEBPA an die DNA (Asou et al. 2003, D'Alo et al. 2003, Gombart et al. 2002, Keeshan et al. 2003). Über die dominant-negativen Eigenschaften solcher C-terminaler *CEBPA*-Mutationen gibt es widersprüchliche Ergebnisse: Gombart et al. fanden für in-frame-Mutationen (Insertionen oder Deletionen) der bzip-Domäne keine dominant-negativen Eigenschaften, während andere Publikationen beschreiben, dass die einige im bzip-Bereich mutierte CEBPA-Formen die Bindung des Wildtyp-Proteins an den G-CSF-Promoter verhindern, also dominant-negativ sind (Asou et al. 2003, Nerlov 2004).

Bei der Korrelation von FAB-Subtyp und *CEBPA*-Mutationsstatus fiel eine Häufung der Subtypen M1 und M2 in der Patientengruppe mit Mutationen auf. Diese beiden ähnlichen

Phänotypen lagen bei 73% der Patienten mit normalem Karyotyp und *CEBPA*-Mutation vor. Die Patienten mit N-terminaler Nonsense-Mutation gehörten alle diesen beiden FAB-Subtypen an. Diese Daten ergänzen die Ergebnisse einiger Studien, die in einem AML-Patientenkollektiv mit intermediärem Risikoprofil eine signifikante Assoziation von *CEBPA*-Mutationen mit dem FAB-Subtyp M1 und M2 zeigen (Preudhomme et al. 2002, Snaddon et al. 2003, van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al. 2003). Diese Assoziation ist ein Hinweis darauf, dass diese Subtypen der AML eine ganz spezifische Biologie aufweisen.

Eine neue Theorie der AML-Entstehung besagt, dass es kooperierender Mutationen bedarf, damit sich die Erkrankung manifestiert. Dabei wird zwischen Klasse I- und Klasse II-Mutationen unterschieden. Klasse I-Mutationen führen zu einer Steigerung der Proliferationsrate von hämatopoetischen Vorläuferzellen, Klasse II-Mutationen blockieren die Differenzierung von myeloischen Vorläuferzellen (Gilliland et al. 2002, Valk et al. 2004).

Ein Beispiel für eine Mutation mit nachfolgender Proliferationssteigerung bei erhaltener Ausreifung der Zellen der Myelopoese im murinen Modell ist die aktivierende Mutation der *FLT3*-Rezeptortyrosinkinase (*FLT3*-ITD) (Gilliland et al. 2002, Kelly et al. 2002b). Der Funktionsverlust von *CEBPA* führt hingegen zu einem Differenzierungsblock myeloischer Progenitorzellen (Tenen 2003, Zhang, P. et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde bei 5 von 11 Patienten mit normalem Karyotyp und *CEBPA*-Mutation gleichzeitig eine *FLT3*-ITD festgestellt. Interessanterweise war diese seltener mit N-terminalen *CEBPA*-loss-of-function-Mutationen assoziiert als mit anderen *CEBPA*-Mutationsformen. Es wäre möglich, dass bei diesen Patienten die *FLT3*-ITD als Klasse I-Mutation das komplementäre molekulare Ereignis zur *CEBPA*-Mutation als Klasse II-Mutation darstellt. Um diese Kooperation zu belegen, wären funktionelle Untersuchungen in vivo nötig, beispielsweise in Form von Transplantationsmodellen bei Mäusen. Es konnten in dieser Arbeit weder *FLT3*-Punktmutationen noch *MLL*-Mutationen bei den Patienten mit positivem *CEBPA*-Mutationsstatus nachgewiesen werden, im Gegensatz zu Patienten mit negativem *CEBPA*-Mutationsstatus.

Die vorliegende Arbeit bildete die Grundlage einer großen Studie zur Evaluation der Bedeutung von *CEBPA*-Mutationen bei AML-Patienten mit normalem Karyotyp (Fröhling et al. 2004). Neben diesen Daten flossen auch die Mutationsanalysen von Patienten der multizentrischen Therapiestudie AML HD98-A der AMLSG ULM mit ein. Die Therapie erfolgte für alle Patienten mit Doppelinduktion und Konsolidierungstherapie. So konnten insgesamt 236 erwachsene Patienten untersucht und die Ergebnisse publiziert werden. Es zeigte sich, dass 15% mindestens eine *CEBPA*-Mutation aufwiesen. N-terminale loss-of-function-Mutationen wurden bei 9% gefunden. Diese Mutationsform lag am häufigsten bei den FAB-Subtypen M1 (67%) und M2 (24%) vor, während M4 der häufigste morphologische Subtyp bei anderen *CEBPA*-Mutationen war (53%).

Bezüglich der Kooperation von *CEBPA*-Mutationen mit *FLT3*-ITD ergab sich keine signifikante Koinzidenz dieser beiden Mutationen. Bei Patienten mit N-terminaler loss-of-function-Mutationen des *CEBPA*-Gens kamen nur bei 10% gleichzeitig *FLT3*-ITD vor. Daher erscheint eine Kooperation in dieser genetisch definierten AML-Subgruppe unwahrscheinlich.

Bei einer medianen Nachbeobachtungsdauer von 30 Monaten zeigte die Korrelation klinischer Daten mit dem Mutationsstatus keine statistisch signifikanten Unterschiede im Ansprechen auf die Doppelinduktionstherapie. Jedoch war die Remissionsdauer bei den Patienten mit *CEBPA*-Mutation signifikant länger als bei denjenigen ohne Mutation ($P=0.01$). Bei genauer Untersuchung der 3 Gruppen mit N-terminaler loss-of-function-Mutation, anderer *CEBPA*-Mutation und Wildtyp-*CEBPA* zeigte sich im Paarvergleich, dass dieser positive prognostische Effekt hauptsächlich den loss-of-function-Mutationen des N-Terminus zuzuschreiben ist, unabhängig davon, ob gleichzeitig C-terminale in-frame-Mutationen vorlagen oder nicht. Das Gesamtüberleben (OS) war für Fälle mit *CEBPA*-Mutation ebenfalls signifikant länger als für solche mit Wildtyp-*CEBPA* ($P=0.05$). Das gleichzeitige Vorliegen einer *FLT3*-ITD hatte keinen signifikanten Einfluß auf Remissionsdauer und OS. Damit konnten die Ergebnisse von Preudhomme et al. (2002), die eine signifikante Verschlechterung des OS bei gleichzeitigem Vorliegen von *FLT3*-ITD zeigen, nicht bestätigt werden. Diese Studie beschreibt also eine neue Subgruppe von AML-Patienten mit normalem Karyotyp, die durch N-terminale *CEBPA*-loss-of-function-

Mutationen charakterisiert und mit einem günstigen klinischen Outcome assoziiert ist (Fröhling et al. 2004).

Diese Ergebnisse, die in groß angelegten prospektiven Studien bestätigt werden müssen, bekräftigen die Wertigkeit von molekulargenetischen Analysen der heterogenen Gruppe von AML-Patienten mit normalem Karyotyp. Ein langfristiges Ziel wäre es, bei der Diagnosestellung der AML nicht nur die üblichen zytogenetischen Untersuchungen durchzuführen, sondern auch auf molekulargenetischer Ebene nach *CEBPA*-Mutationen und anderen molekularen Markern zu suchen. Dies könnte zu einer genaueren Risikostratifizierung führen und die klinisch heterogene Gruppe von Patienten mit normalem Karyotyp in prognostisch unterschiedliche Subgruppen aufteilen. Mehrere Arbeitsgruppen haben bereits die Zuordnung von Patienten mit normaler Zytogenetik und *CEBPA*-Mutationen zu der Gruppe mit günstigem Risiko vorgeschlagen (Fröhling et al. 2004, Preudhomme et al. 2002, Snaddon et al. 2003).

Darüber hinaus könnte man prüfen, ob *CEBPA*-Mutationen auch als Marker für den Nachweis von minimaler Resterkrankung geeignet sind. Erste Hinweise darauf liefern beispielsweise sequenzielle Analysen von *CEBPA*-Mutationen bei AML-Patienten von Lin et al. In dieser Arbeit waren die bei der Diagnosestellung nachgewiesenen *CEBPA*-Mutationen bei kompletter Remission nicht mehr nachweisbar, jedoch traten dieselben Mutationen bei einem Rückfall wieder auf (Lin et al. 2005).

In Zukunft könnten möglicherweise neue, zielgerichtete Therapiestrategien mit molekularem Angriffspunkt für AML-Patienten mit *CEBPA*-Mutation entwickelt werden. Dieser Ansatz wird z.B. bereits für *FLT3*-ITD verfolgt, indem Effekte von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren (RTKI) bei diesen Mutationen untersucht werden (Giles et al. 2003, O'Farrell et al. 2004, Spiekermann et al. 2003).

Im Falle von *CEBPA*-Mutationen wäre die Induktion der Zelldifferenzierung durch Modulation der *CEBPA*-Aktivität in reifungsgestörten Leukämiezellen als Therapieansatz denkbar (Truong et al. 2003).

Zukünftig könnte die Prognose von AML-Patienten möglicherweise verbessert werden, indem durch Untersuchung molekularer Marker - wie *CEBPA*-Mutationen - individuelle

Risikoprofile erstellt werden und neue, an dieses Profil adaptierte Therapieprotokolle zur Anwendung kommen.

5. Zusammenfassung

CEBPA (CCAAT/enhancer binding protein alpha) ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Regulation der Myelopoese beteiligt ist und für die Ausreifung myeloischer Vorläuferzellen zu Granulozyten von entscheidender Bedeutung ist.

Bei Patienten mit AML (akuter myeloischer Leukämie), welche durch einen Differenzierungsblock einer oder mehrerer myeloischer Zellreihen charakterisiert ist, sind in 7-11% der Patienten Mutationen des *CEBPA*-Gens nachgewiesen worden.

In der vorliegenden Arbeit wurden AML-Patienten im Alter von 16-60 Jahren auf Mutationen des *CEBPA*-Gens untersucht. Dabei konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Gruppe der Patienten mit normalem Karyotyp, der in ca. 45% der Patienten vorliegt und der intermediären Risikokategorie zugeordnet wird. Alle Patienten wurden einheitlich im Rahmen der Therapiestudie AML HD93 (Heidelberg 93) der AML Study Group Ulm (AMLSG Ulm) behandelt (Doppelinduktionstherapie und Konsolidierungstherapie mit Hochdosis-Cytarabin).

Innerhalb der Gruppe von Patienten mit normalem Karyotyp wiesen insgesamt 13% *CEBPA*-Mutationen auf. 7% hatten mehr als eine Mutation im *CEBPA*-Gen. Es konnten unterschiedliche *CEBPA*-Mutationstypen identifiziert werden. Den N (Amino)-Terminus - und damit die Transaktivierungsdomänen - von CEBPA betreffend fanden sich in 6% der Fälle so genannte loss-of-function-Mutationen mit Synthese einer verkürzten CEBPA-Isoform mit 30kD (Kilodalton) statt 42kD Molekulargewicht. Diese Isoform führt nicht zu einer Differenzierung von Granulozyten und besitzt dominant-negative Eigenschaften. Diese N-terminalen loss-of-function-Mutationen waren häufig mit in-frame-Mutationen der C (carboxyl)-terminalen DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Bindungsregion verbunden. Die Mutationen lagen auf unterschiedlichen Allelen.

Mutationen der C-terminal lokalisierten basic region-leucine zipper-Domäne wurden in Form von frameshift- (bei 4%) und in-frame-Mutationen (bei 5%) nachgewiesen. Diese Mutationen beeinträchtigen wahrscheinlich die Bindungsfähigkeit von CEBPA an die DNA.

Die Patienten mit *CEBPA*-Mutation wiesen in 73% der Fälle den FAB (French-American-British Cooperative Group)-Subtyp M1 oder M2 auf, bei Vorliegen einer N-terminalen loss-of-function-Mutation in 100%.

Bei der Überprüfung der Koinzidenz mit anderen Mutationen als mögliche Cofaktoren in der Pathogenese kamen Überlappungen von *CEBPA*-Mutationen mit *FLT3*-ITD (interne Tandemduplikation des FMS-like tyrosine kinase 3-Gens) vor. Gleichzeitige *FLT3*-Punktmutationen oder Mutationen des *MLL* (mixed lineage leukemia)-Gens wurden nicht gefunden.

Diese Arbeit bildete die wesentliche Grundlage für die Evaluation der prognostischen Bedeutung von *CEBPA*-Mutationen, da die Daten in eine retrospektive Studie mit insgesamt 236 Patienten der Therapiestudien AML HD93 und AML HD98-A (Heidelberg 98) einfließen. In dieser Studie war der positive *CEBPA*-Mutationsstatus bei einer medianen Nachbeobachtungsdauer von 30 Monaten mit einer signifikant längeren Remissionsdauer und Gesamtüberlebenszeit assoziiert.

Bei der detaillierten Untersuchung der mutierten Fälle zeigte sich, dass dieser positive prognostische Effekt hauptsächlich den loss-of-function-Mutationen des N-Terminus zuzuschreiben ist, unabhängig davon, ob gleichzeitig C-terminale in-frame-Mutationen vorlagen oder nicht. Das gleichzeitige Vorliegen einer *FLT3*-ITD hatte keinen signifikanten Einfluß auf Remissionsdauer und Gesamtüberlebenszeit. Diese Studie beschreibt also eine neue Subgruppe von AML-Patienten mit normalem Karyotyp, die durch N-terminale *CEBPA*-loss-of-function-Mutationen charakterisiert und mit einem günstigen klinischen Verlauf assoziiert ist.

So können innerhalb der klinisch sehr heterogenen Gruppe von Patienten mit normalem Karyotyp durch die Analyse des *CEBPA*-Mutationsstatus Patienten mit günstiger Prognose identifiziert werden.

Durch Untersuchung molekularer Marker - wie *CEBPA*-Mutationen - könnten zukünftig individuelle Risikoprofile erstellt werden und neue, molekular zielgerichtete und risikoadaptierte Therapieprotokolle zur Anwendung kommen, welche zur Prognoseverbesserung bei AML beitragen könnten.

6. Literaturverzeichnis

1. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Gari MA, Peake IR, Rees DC, Vandenberghe EA, Winship PR, Reilly JT. FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. *Br J Haematol* 111: 190-195 (2000).
2. Antonson P, Xanthopoulos KG. Molecular cloning, sequence and expression patterns of the human gene encoding CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha). *Biochem Biophys Res Commun* 215: 106-113 (1995).
3. Asou H, Gombart AF, Takeuchi S, Tanaka H, Tanioka M, Matsui H, Kimura A, Inaba T, Koefler HP. Establishment of the acute myeloid leukemia cell line Kasumi-6 from a patient with a dominant-negative mutation in the DNA-binding region of the C/EBPalpha gene. *Genes Chromosomes Cancer* 36: 167-174 (2003).
4. Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS, Whitman SP, Archer KJ, Marcucci G, Caligiuri MA, Carroll AJ, Vardiman JW, Powell BL, Allen SL, Moore JO, Larson RA, Kolitz JE, de la Chapelle A, Bloomfield CD. BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood* 102: 1613-1618 (2003).
5. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, van Putten WL, Valk PJ, van der Poel-van de Luytgaarde S, Hack R, Slater R, Smit EM, Beverloo HB, Verhoef G, Verdonck LF, Ossenkoppele GJ, Sonneveld P, de Greef GE, Lowenberg B, Delwel R. High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients. *Blood* 101: 837-845 (2003).
6. Behre G, Singh SM, Liu H, Bortolin LT, Christopeit M, Radomska HS, Rangatia J, Hiddemann W, Friedman AD, Tenen DG. Ras signaling enhances the activity of C/EBP alpha to induce granulocytic differentiation by phosphorylation of serine 248. *J Biol Chem* 277: 26293-26299 (2002).
7. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103: 620-625 (1985).

8. Bloomfield CD, Lawrence D, Byrd JC, Carroll A, Pettenati MJ, Tantravahi R, Patil SR, Davey FR, Berg DT, Schiffer CA, Arthur DC, Mayer RJ. Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res* 58: 4173-4179 (1998).
9. Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, Pettenati MJ, Patil SR, Rao KW, Watson MS, Koduru PR, Moore JO, Stone RM, Mayer RJ, Feldman EJ, Davey FR, Schiffer CA, Larson RA, Bloomfield CD. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 100: 4325-4336 (2002).
10. Caligiuri MA, Strout MP, Lawrence D, Arthur DC, Baer MR, Yu F, Knuutila S, Mrozek K, Oberkircher AR, Marcucci G, de la Chapelle A, Elonen E, Block AW, Rao PN, Herzig GP, Powell BL, Ruutu T, Schiffer CA, Bloomfield CD. Rearrangement of ALL1 (MLL) in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Cancer Res* 58: 55-59 (1998).
11. Castilla LH, Garrett L, Adya N, Orlic D, Dutra A, Anderson S, Owens J, Eckhaus M, Bodine D, Liu PP. The fusion gene Cbfb-MYH11 blocks myeloid differentiation and predisposes mice to acute myelomonocytic leukaemia. *Nat Genet* 23: 144-146 (1999).
12. Castilla LH, Perrat P, Martinez NJ, Landrette SF, Keys R, Oikemus S, Flanagan J, Heilman S, Garrett L, Dutra A, Anderson S, Pihan GA, Wolff L, Liu PP. Identification of genes that synergize with Cbfb-MYH11 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4924-4929 (2004).
13. Cilloni D, Carturan S, Gottardi E, Messa F, Messa E, Fava M, Diverio D, Guerrasio A, Lo-Coco F, Saglio G. Down-modulation of the C/EBPalpha transcription factor in core binding factor acute myeloid leukemias. *Blood* 102: 2705-2706 (2003).
14. D'Alo F, Johansen LM, Nelson EA, Radomska HS, Evans EK, Zhang P, Nerlov C, Tenen DG. The amino terminal and E2F interaction domains are critical for C/EBP alpha-mediated induction of granulopoietic development of hematopoietic cells. *Blood* 102: 3163-3171 (2003).
15. Döhner K, Tobis K, Ulrich R, Fröhling S, Benner A, Schlenk RF, Döhner H. Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16

to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. *J Clin Oncol* 20: 3254-3261 (2002).

16. Ford AM, Bennett CA, Healy LE, Towatari M, Greaves MF, Enver T. Regulation of the myeloperoxidase enhancer binding proteins Pu1, C-EBP alpha, -beta, and -delta during granulocyte-lineage specification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 10838-10843 (1996).

17. Friedman AD, McKnight SL. Identification of two polypeptide segments of CCAAT/enhancer-binding protein required for transcriptional activation of the serum albumin gene. *Genes Dev* 4: 1416-1426 (1990).

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

19. Fröhling S, Skelin S, Liebisch C, Scholl C, Schlenk RF, Döhner H, Döhner K. Comparison of cytogenetic and molecular cytogenetic detection of chromosome abnormalities in 240 consecutive adult patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 20: 2480-2485 (2002b).

20. Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol* 22: 624-633 (2004).

21. Gari M, Goodeve A, Wilson G, Winship P, Langabeer S, Linch D, Vandenberghe E, Peake I, Reilly J. C-kit proto-oncogene exon 8 in-frame deletion plus insertion mutations in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 105: 894-900 (1999).

22. Giles FJ, Stopeck AT, Silverman LR, Lancet JE, Cooper MA, Hannah AL, Cherrington JM, O'Farrell AM, Yuen HA, Louie SG, Hong W, Cortes JE, Verstovsek S, Albitar M, O'Brien SM, Kantarjian HM, Karp JE. SU5416, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, has biologic activity in patients with refractory acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *Blood* 102: 795-801 (2003).

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

24. Gombart AF, Hofmann WK, Kawano S, Takeuchi S, Krug U, Kwok SH, Larsen RJ, Asou H, Miller CW, Hoelzer D, Koeffler HP. Mutations in the gene encoding the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein alpha in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Blood* 99: 1332-1340 (2002).
25. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 92: 2322-2333 (1998).
26. Grimwade D. The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 14: 497-529 (2001).
27. Hendricks-Taylor LR, Bachinski LL, Siciliano MJ, Fertitta A, Trask B, de Jong PJ, Ledbetter DH, Darlington GJ. The CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP alpha) gene (CEBPA) maps to human chromosome 19q13.1 and the related nuclear factor NF-IL6 (C/EBP beta) gene (CEBPB) maps to human chromosome 20q13.1. *Genomics* 14: 12-17 (1992).
28. Hendricks-Taylor LR, Darlington GJ. Inhibition of cell proliferation by C/EBP alpha occurs in many cell types, does not require the presence of p53 or Rb, and is not affected by large T-antigen. *Nucleic Acids Res* 23: 4726-4733 (1995).
29. Hohaus S, Petrovick MS, Voso MT, Sun Z, Zhang DE, Tenen DG. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol Cell Biol* 15: 5830-5845 (1995).
30. Keeshan K, Santilli G, Corradini F, Perrotti D, Calabretta B. Transcription activation function of C/EBPalpha is required for induction of granulocytic differentiation. *Blood* 102: 1267-1275 (2003).
31. Kelly LM, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Amaral SM, Curley DP, Ley TJ, Gilliland DG. PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8283-8288 (2002a).
32. Kelly LM, Liu Q, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Gilliland DG. FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce

myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 99: 310-318 (2002b).

33. Khanna-Gupta A, Zibello T, Simkevich C, Rosmarin AG, Berliner N. Sp1 and C/EBP are necessary to activate the lactoferrin gene promoter during myeloid differentiation. *Blood* 95: 3734-3741 (2000).

34. 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, Ueda R. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 93: 3074-3080 (1999).

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

36. Kundu M, Chen A, Anderson S, Kirby M, Xu L, Castilla LH, Bodine D, Liu PP. Role of Cbfb in hematopoiesis and perturbations resulting from expression of the leukemogenic fusion gene Cbfb-MYH11. *Blood* 100: 2449-2456 (2002).

37. Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240: 1759-1764 (1988).

38. Lekstrom-Himes J, Xanthopoulos KG. Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem* 273: 28545-28548 (1998).

39. Leroy H, Roumier C, Huyghe P, Biggio V, Fenaux P, Preudhomme C. CEBPA point mutations in hematological malignancies. *Leukemia* 19: 329-334 (2005).

40. Lin LI, Chen CY, Lin DT, Tsay W, Tang JL, Yeh YC, Shen HL, Su FH, Yao M, Huang SY, Tien HF. Characterization of CEBPA mutations in acute myeloid leukemia: most patients with CEBPA mutations have biallelic mutations and show a distinct immunophenotype of the leukemic cells. *Clin Cancer Res* 11: 1372-1379 (2005).

41. Lodie TA, Radomska HS, Donato JD, Johansen LM, Adra C, Pabst T, Behre GB, Hiddemann W, Rego E, Pandolfi PP, Pelicci PG, Tenen DG. PML/RAR α induces ATRA-

sensitive delocalization of the critical granulocytic differentiation factor C/EBP α to a microspeckled nuclear pattern in t(15;17) APL. *Blood* 94: 692a (1999).

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

43. Nerlov C. C/EBP α mutations in acute myeloid leukaemias. *Nat Rev Cancer* 4: 394-400 (2004).

44. Oelgeschlager M, Nuchprayoon I, Luscher B, Friedman AD. C/EBP, c-Myb, and PU.1 cooperate to regulate the neutrophil elastase promoter. *Mol Cell Biol* 16: 4717-4725 (1996).

45. O'Farrell AM, Yuen HA, Smolich B, Hannah AL, Louie SG, Hong W, Stopeck AT, Silverman LR, Lancet JE, Karp JE, Albitar M, Cherrington JM, Giles FJ. Effects of SU5416, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, on FLT3 expression and phosphorylation in patients with refractory acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 28: 679-689 (2004).

46. Okuda T, Cai Z, Yang S, Lenny N, Lyu CJ, van Deursen JM, Harada H, Downing JR. Expression of a knocked-in AML1-ETO leukemia gene inhibits the establishment of normal definitive hematopoiesis and directly generates dysplastic hematopoietic progenitors. *Blood* 91: 3134-3143 (1998).

47. Pabst T, Mueller BU, Harakawa N, Schoch C, Haferlach T, Behre G, Hiddemann W, Zhang DE, Tenen DG. AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBP α in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat Med* 7: 444-451 (2001a).

48. Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S, Behre G, Hiddemann W, Tenen DG. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein- α (C/EBP α), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 27: 263-270 (2001b).

49. Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, Cayuela JM, Tigaud I, de Botton S, Thomas X, Raffoux E, Lamandin C, Castaigne S, Fenaux P, Dombret H. Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood* 100: 2717-2723 (2002).

50. Radomska HS, Huettner CS, Zhang P, Cheng T, Scadden DT, Tenen DG. CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Mol Cell Biol* 18: 4301-4314 (1998).
51. Rombouts WJ, Blokland I, Lowenberg B, Ploemacher RE. Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the *Flt3* gene. *Leukemia* 14: 675-683 (2000).
52. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467 (1977).
53. Schlenk RF, Benner A, Hartmann F, del Valle F, Weber C, Pralle H, Fischer JT, Gunzer U, Pezzutto A, Weber W, Grimminger W, Preiss J, Hensel M, Fröhling S, Döhner K, Haas R, Döhner H. Risk-adapted postremission therapy in acute myeloid leukemia: results of the German multicenter AML HD93 treatment trial. *Leukemia* 17: 1521-1528 (2003).
54. Schnittger S, Kinkelin U, Schoch C, Heinecke A, Haase D, Haferlach T, Buchner T, Wormann B, Hiddemann W, Griesinger F. Screening for *MLL* tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML. *Leukemia* 14: 796-804 (2000).
55. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, Löffler H, Sauerland CM, Serve H, Buchner T, Haferlach T, Hiddemann W. Analysis of *FLT3* length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 100: 59-66 (2002).
56. Scott LM, Civin CI, Rorth P, Friedman AD. A novel temporal expression pattern of three *C/EBP* family members in differentiating myelomonocytic cells. *Blood* 80: 1725-1735 (1992).
57. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, Paietta E, Willman CL, Head DR, Rowe JM, Forman SJ, Appelbaum FR. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 96: 4075-4083 (2000).

58. Smith LT, Hohaus S, Gonzalez DA, Dziennis SE, Tenen DG. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. *Blood* 88: 1234-1247 (1996).
59. Smith ML, Cavenagh JD, Lister TA, Fitzgibbon J. Mutation of CEBPA in familial acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 351: 2403-2407 (2004).
60. Snaddon J, Smith ML, Neat M, Cambal-Parrales M, Dixon-McIver A, Arch R, Amess JA, Rohatiner AZ, Lister TA, Fitzgibbon J. Mutations of CEBPA in acute myeloid leukemia FAB types M1 and M2. *Genes Chromosomes Cancer* 37: 72-78 (2003).
61. Spiekermann K, Dirschinger RJ, Schwab R, Bagrintseva K, Faber F, Buske C, Schnittger S, Kelly LM, Gilliland DG, Hiddemann W. The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits FLT3 and induces growth arrest and apoptosis in AML-derived cell lines expressing a constitutively activated FLT3. *Blood* 101: 1494-1504 (2003).
62. Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang DE. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* 90: 489-519 (1997).
63. Tenen, DG. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* 3: 89-101 (2003).
64. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schakel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhauser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, Illmer T. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 99: 4326-4335 (2002).
65. Truong BT, Lee YJ, Lodie TA, Park DJ, Perrotti D, Watanabe N, Koeffler HP, Nakajima H, Tenen DG, Kogan SC. CCAAT/Enhancer binding proteins repress the leukemic phenotype of acute myeloid leukemia. *Blood* 101: 1141-1148 (2003).
66. Valk PJ, Bowen DT, Frew ME, Goodeve AC, Lowenberg B, Reilly JT. Second hit mutations in the RTK/RAS signaling pathway in acute myeloid leukemia with inv(16). *Haematologica* 89: 106 (2004).
67. van Waalwijk van Doorn-Khosrovani SB, Erpelinck C, Meijer J, van Oosterhoud S, van Putten WL, Valk PJ, Berna Beverloo H, Tenen DG, Lowenberg B, Delwel R. Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML. *Hematol J* 4: 31-40 (2003).

68. Vinson CR, Sigler PB, McKnight SL. Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science* 246: 911-916 (1989).
69. Ward AC, Loeb DM, Soede-Bobok AA, Touw IP, Friedman AD. Regulation of granulopoiesis by transcription factors and cytokine signals. *Leukemia* 14: 973-990 (2000).
70. Watkins PJ, Condreay JP, Huber BE, Jacobs SJ, Adams DJ. Impaired proliferation and tumorigenicity induced by CCAAT/enhancer-binding protein. *Cancer Res* 56: 1063-1067 (1996).
71. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, Carroll AJ, Mrozek K, Vardiman JW, George SL, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD, Caligiuri MA. 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: 7233-7239 (2001).
72. Yergeau DA, Hetherington CJ, Wang Q, Zhang P, Sharpe AH, Binder M, Marin-Padilla M, Tenen DG, Speck NA, Zhang DE. Embryonic lethality and impairment of haematopoiesis in mice heterozygous for an AML1-ETO fusion gene. *Nat Genet* 15: 303-306 (1997).
73. Yuan Y, Zhou L, Miyamoto T, Iwasaki H, Harakawa N, Hetherington CJ, Burel SA, Lagasse E, Weissman IL, Akashi K, Zhang DE. AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10398-10403 (2001).
74. Zhang DE, Zhang P, Wang ND, Hetherington CJ, Darlington GJ, Tenen DG. Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 569-574 (1997).
75. Zhang P, Nelson E, Radomska HS, Iwasaki-Arai J, Akashi K, Friedman AD, Tenen DG. Induction of granulocytic differentiation by 2 pathways. *Blood* 99: 4406-4412 (2002).

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die bei dieser Arbeit direkt oder indirekt mitgewirkt haben.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Hartmut Döhner für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit danken, in seiner Abteilung arbeiten zu können.

Ich danke Frau Prof. Dr. Konstanze Döhner für die wissenschaftliche Betreuung meiner Dissertationsarbeit. Ihre kompetenten Anregungen und Ratschläge haben mir bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit große Hilfe geleistet.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Stefan Fröhling, der mich hervorragend betreut und mich sowohl während der Experimente als auch darüber hinaus tatkräftig unterstützt hat.

Weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern des Labors für zytogenetische und molekulare Diagnostik der Medizinischen Klinik III der Universität Ulm, ganz besonders Frau Sylvia Kreitmeier für ihre ausgezeichnete fachliche Hilfe im Labor.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Mutter für ihre Unterstützung und das Korrekturlesen meiner Arbeit und bei meinem Bruder für die Hilfe in Computerfragen herzlich bedanken.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stolze
Vorname: Ina Susanne
Geburtsdatum: 13.04.1978
Geburtsort: Karlsruhe
Familienstand: ledig

Schulbildung

1984-1988 Grundschohle in Bad Wimpfen
1988-1989 Hohenstaufengymnasium in Bad Wimpfen
1989-1993 Colégio Visconde de Porto Seguro in Valinhos, Brasilien
1993-1995 Hohenstaufengymnasium in Bad Wimpfen
1995-1997 Gymnasium Wiblingen in Ulm
Abschluss mit allgemeiner Hochschulreife

Studium

10/1997 – 09/2004 Medizinstudium an der Universität Ulm
08/1999 Ärztliche Vorprüfung
08/2000 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2003 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
05/2004 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeit

Seit 01/2005 Assistenzärztin in der Abteilung für Dermatologie und Allergologie im Klinikum Bayreuth

Publikationen

- Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K. Prognostic significance of CEBPA mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML study group Ulm. DGHO Onkologie, 25 (Sonderheft 4): XII + 304 abstract 768 (2002).

- Fröhling S, Schlenk R, Stolze I, Bihlmayr J, Kreitmeier S, Tobis K, Benner A, Döhner H, Döhner K, on behalf of the AML Study Group Ulm. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukaemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. DGHO Onkologie 26 (Sonderheft 5): VIII + 248, abstract 224 (2003).

- Fröhling S, Schlenk RF, Kreitmeyer S, Stolze I, Bihlmayr J, Tobis K, Benner A, Döhner H, Döhner K. CEBPA Mutations in Younger Adults with Acute Myeloid Leukemia and Normal Cytogenetics: Prognostic Relevance and Analysis of Cooperating Mutations. American Society of Hematology (ASH), December 2003 San Diego, California. Blood 102: 99 abstract 337 (2003).

- Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. J Clin Oncol 22: 624-633 (2004).

Kongreßbeiträge

- Jahrestagung der European Hematology Association 2002: Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K. Clinical significance of CEBPA mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. Posterpräsentation.

- Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie 2002: Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K. Prognostic significance of CEBPA mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. Posterpräsentation.

- Jahrestagung der American Society of Hematology 2002: Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K. Prognostic significance of

CEBPA mutations in younger adults (16 to 60 Years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm (AMLSG ULM). Posterpräsentation.

- Jahrestagung der European Hematology Association 2003: Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: identification of prognostically relevant genotypes and analysis of cooperating mutations. Vortrag.

- Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie 2003: Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Kreitmeier S, Benner A, Tobis K, Döhner H, Döhner K. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. Vortrag.

- Jahrestagung der American Society of Hematology 2003: Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Kreitmeier S, Benner A, Tobis K, Döhner H, Döhner K. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. Vortrag.