

Zur Rolle der aberranten DNA-Hypermethylierung
des Tumorsuppressorgens
Inter- α -Trypsin-Inhibitor heavy chain 5 (ITIH5)
bei akuter myeloischer Leukämie

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Christoph Oing
aus
Essen

Berichter: Herr Professor
 Dr. med. Oliver Galm

 Herr Privatdozent
 Dr. med. Marc Dieter Piroth

Tag der mündlichen Prüfung: 13. September 2012

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.

*Meinen Eltern
Wilhelm & Ursula Oing*

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis.....	I
II Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Einleitung.....	1
1.1 Kanzerogenese.....	1
1.2 Epigenetik.....	2
1.2.1 Einführung in die Epigenetik.....	2
1.2.2 DNA-Methylierung.....	3
1.2.3 Histonmodifikationen.....	7
1.2.4 Interaktion epigenetischer Mechanismen.....	9
1.2.5 Klinische Bedeutung epigenetischer Veränderungen.....	13
1.2.6 Epigenetische Therapie.....	14
1.3 Akute myeloische Leukämie.....	19
1.3.1 Definition.....	19
1.3.2 Hämatopoese und Leukämogenese.....	19
1.3.3 Klassifikation.....	21
1.3.4 Epidemiologie, Ätiologie und Risikofaktoren.....	23
1.3.5 Klinik.....	24
1.3.6 Diagnostik.....	24
1.3.6.1 Immunphänotypisierung.....	25
1.3.6.2 Zytogenetik.....	26
1.3.6.3 Molekulargenetik.....	27
1.3.7 Therapie.....	30
1.3.7.1 Aktuelle Therapiestrategien bei AML.....	30
1.3.7.2 Neue zielgerichtete Therapieansätze.....	32
1.3.8 Minimale Resterkrankung.....	35
1.3.9 Prognose.....	36
1.4 Inter- α -Trypsin-Inhibitor Heavy Chain 5.....	37
1.4.1 Inter- α -Trypsin-Inhibitoren.....	37
1.4.2 Inter- α -Trypsin-Inhibitor heavy chains.....	38
1.4.3 Inter- α -Trypsin-Inhibitor heavy chain 5.....	40
2. Zielsetzung.....	42
3. Material und Methodik.....	43
3.1 Methodik.....	43

3.1.1	Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation.....	43
3.1.2	DNA-Isolation.....	44
3.1.3	<i>In vitro</i> methylierte DNA.....	45
3.1.4	Natriumbisulfit-Behandlung.....	45
3.1.5	Methylierungsspezifische PCR.....	47
3.1.6	Gelelektrophoretische Auswertung.....	49
3.1.7	Patienten- und Kontrollkollektive.....	49
3.1.8	Statistik.....	49
3.2	Material.....	50
3.2.1	Standardgeräte.....	50
3.2.2	Standardlösungen und –puffer.....	50
3.2.3	Zelllinien.....	50
3.2.4	Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation.....	51
3.2.5	DNA-Isolation.....	51
3.2.6	<i>In vitro</i> methylierte DNA.....	52
3.2.7	Natriumbisulfit-Behandlung.....	52
3.2.8	Methylierungsspezifische PCR.....	52
3.2.9	Gelelektrophorese.....	52
4.	Ergebnisse.....	53
4.1	Hypermethylierung des <i>ITIH5</i> -Promotors in Zelllinien.....	53
4.2	Demethylierung des <i>ITIH5</i> -Promotors nach DAC-Behandlung.....	54
4.3	Hypermethylierung des <i>ITIH5</i> -Promotors nicht-maligner Zellen.....	55
4.4	Das Patientenkollektiv.....	55
4.5	<i>ITIH5</i> -Methylierungsstatus primärer AML-Patientenproben.....	57
5.	Diskussion.....	60
5.1	Bedeutung der <i>ITIH5</i> -Promotorhypermethylierung bei AML.....	60
5.2	Bewertung der Methodik.....	65
6.	Zusammenfassung.....	67
7.	Ausblick.....	68
III	Literaturverzeichnis.....	V
IV	Auflistung der eigenen Publikationen.....	XIII
V	Danksagung.....	XIV
VI	Erklärung zur Aufbewahrung der Daten.....	XV

II Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AMBP	<i>α_1-microglobuline/bikunin precursor</i>
AML	Akute myeloische Leukämie
APL	Akute Promyelozyten-Leukämie
Ara-C	Cytosin-Arabinosid
ATRA	All-trans Retinsäure
AZA	5-Azacytidin
BAALC	<i>Brain and leukemia, cytoplasmic</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BRCA1	<i>Breast cancer 1</i>
CBF	<i>Core binding factor</i>
CEBP α	<i>CCAAT / enhancer binding protein α</i>
CIMP	<i>CpG island methylator phenotype</i>
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CpG	<i>Cytosine preceding Guanosin</i>
CSF	<i>Colony stimulating factor</i>
DAC	5-Aza-2'-Deoxycytidin
DAPK	<i>Death-associated protein kinase</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNMT	DNA-Methyltransferase
ECM	Extrazelluläre Matrix
ERG	<i>ETS-related gene</i>
EV11	<i>Ecotropic virus integration-1</i>
FAB	<i>French-American-British</i>
FLT3	<i>Fms-related tyrosine kinase 3</i>
HA	<i>Hyaluronan acid</i>
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HDACI	Histon-Deacetylase-Inhibitor
HDM	Histon-Demethylase
hMLH1	<i>Human mutL homolog 1</i>
HMT	Histon-Methyl-Transferase

ITD	<i>Internal tandem duplication</i>
ITI	Inter- α -Trypsin-Inhibitor
ITIH	Inter- α -Trypsin-Inhibitor- <i>Heavy chain</i>
IVD	<i>In vitro</i> methylierte DNA
KM	Knochenmark
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
LOI	<i>Loss of imprinting</i>
m ⁵ C	5-Methylcytosin
MBD	<i>Methyl-cytosine binding domain</i>
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MGMT	<i>O(6)-methylguanine DNA methyltransferase</i>
MLL	<i>Mixed leukemia lymphoma</i>
MM	Multiple Myelom
MPN	Myeloproliferative Neoplasie
MRD	<i>Minimal residual disease</i>
MSP	Methylierungsspezifische Polymerase-Ketten-Reaktion
MTI	(DNA-)Methyltransferase-Inhibitor
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NPM1	<i>Nukleophosmin 1</i>
pB	Peripheres Blut
PGP	Protein-Glykosaminoglykan-Protein-Komplex
PTD	<i>Partial tandem duplication</i>
RAEB	Refraktäre Anämie mit Blastenexzess
RAR β 2	<i>Retinoic acid receptor β2</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SAHA	<i>Suberoylanilide hydroxamic acid</i>
SHAP	<i>Serum-derived HA-associated protein</i>
SZT	Stammzelltransplantation
TNFAIP6	<i>Tumor necrosis factor α-induced protein 6</i>
UTI	<i>Urinary trypsin inhibitor</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WT1	<i>Wilms-Tumor 1</i>

1. Einleitung

1.1 Kanzerogenese

Die Kanzerogenese ist ein mehrstufiger Prozess mit Einbezug vieler verschiedener Alterationen biologischer Funktionen und zellulärer Signalwege, die eine gesunde Zelle erfährt bevor sie maligne entartet (Hanahan & Weinberg, 2011). Hierbei führt nicht ein einzelner Gendefekt, sondern vielmehr die Interaktion verschiedener genetischer und epigenetischer Veränderungen zur progressiven Transformation einer normalen Zelle zu deren malignem Abkömmling. Das Genom von Tumorzellen zeigt regelmäßig Veränderungen multipler Gene durch Mutationen, Deletionen und Translokationen, die wiederum mit einer Aktivierung von Onkogenen oder einem Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen einhergehen. Durch diese Alterationen zellulärer Signalkaskaden erhalten Tumorzellen einen Wachstums- und Überlebensvorteil (Hanahan & Weinberg, 2000; Feinberg & Tycko, 2004). Beispiele hierfür sind Keimbahnmutationen des *Retinoblastoma (RB)*-Gens bei Retinoblastomen (Friend *et al.*, 1986), aktivierende Punktmutationen in *RAS*-Onkogenen bei einer Vielzahl solider und hämatologischer Neoplasien (Bos, 1989), inaktivierende Deletionen im Tumorsuppressorgen *p16^{INK4a}* bei soliden Tumoren (Liggett & Sidransky, 1998) oder das Fusionsgen *bcr-abl* durch die Translokation t(9;22) bei chronischer myeloischer Leukämie (CML) (Kurzrock *et al.*, 1988).

Epigenetische Aberrationen stellen in der Tumorgenese komplementäre Ereignisse zu den multiplen genetischen Veränderungen dar und finden sich in malignen Zellen mindestens genauso häufig wie genetische Veränderungen (Baylin & Herman, 2000; Jones & Baylin, 2002). Epigenetische Veränderungen können durch Inaktivierung des Wild-Typ-Allels von Tumorsuppressorgenen, bei zusätzlich auftretender intragener Mutation oder chromosomalem Verlust (*loss of heterozygosity*, LOH) des zweiten Allels, den zweiten Treffer nach Knudson's *two-hit hypothesis* zur Malignomentstehung darstellen (Robertson & Jones, 2000). Somit sind genetische und epigenetische Aberrationen gleichbedeutend in der Genese maligner Erkrankungen. Ferner zeigen viele Gene infolge epigenetischer Aberrationen, auch ohne das Auftreten nachweisbarer Mutationen, eine veränderte Expressionsrate bei Neoplasien (Jones & Baylin, 2007). Für die o.g., bei hereditären Tumoren auf DNA-Ebene alterierten Gene, konnte auch eine epigenetische Inaktivierung bei entsprechenden sporadisch auftretenden Tumoren nachgewiesen werden (Baylin *et al.*, 2001).

1.2 Epigenetik

1.2.1 Einführung in die Epigenetik

Der Begriff Epigenetik beschreibt meiotisch und mitotisch stabile Veränderungen der Genexpression, die nicht auf einer Veränderung der primären Nukleotidsequenz der DNA beruhen (Bird, 2002; Herman & Baylin, 2003). Es existieren vier verschiedene Kategorien epigenetischer Mechanismen: DNA-Methylierung, kovalente Histonmodifikationen, *Nukleosome remodelling* und nicht-kodierende RNAs (inklusive *microRNAs*, miRNAs) (Sharma *et al.*, 2010). Diese epigenetischen Prozesse beeinflussen die Chromatinstruktur und induzieren und erhalten distinkte Genexpressionsmuster, insb. durch DNA-Methylierung und Histonmodifikationen (Esteller, 2008). *Nukleosome remodelling* und nicht-kodierende RNAs, v.a. miRNAs, werden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter beschrieben.

Seit ihrer Entdeckung vor mehr als 25 Jahren (Feinberg & Vogelstein, 1983) standen epigenetische Prozesse in der Kanzerogenese lange im Schatten der Genetik. Jedoch werden epigenetische Prozesse, wie Hypo- und Hypermethylierung, genomische Prägung und Modifikationen der Chromatinstruktur sowie deren Bedeutung im Rahmen von normaler Entwicklung und Kanzerogenese zunehmend erkannt (Feinberg & Tycko, 2004). Zu den grundlegenden epigenetischen Faktoren in der Ätiologie maligner Neoplasien gehören globale DNA-Hypomethylierung mit Induktion einer genomischen Instabilität, lokale DNA-Hypermethylierung mit konsekutiver Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und charakteristische Histonmodifikationsmuster (Esteller, 2008).

Epigenetische Veränderungen sind potenziell reversibel und sind daher mögliche Ansatzpunkte neuer molekular zielgerichteter Therapiestrategien bei einer Vielzahl neoplastischer Erkrankungen mit dem Ziel der Reaktivierung epigenetisch inaktivierter Tumorsuppressorgene (Feinberg & Tycko, 2004). Mittlerweile sind die DNA-demethylierend wirksamen Nukleosidanaloga 5-Azacytidin (AZA, *Vidaza*[®]) und sein Derivat 5-Aza-2'-deoxycytidin (DAC, *Decitabine*[®]) von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) für die Behandlung von myelodysplastischen Syndromen (MDS) der Hochrisikogruppe nach *International prognostic scoring system* (IPSS) zugelassen (Kaminskas *et al.*, 2005; Kantarjian *et al.*, 2006).

1.2.2 DNA-Methylierung

Vier Basen, Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T), bilden die primäre Nukleotidsequenz. Durch kovalente Modifikation der postreplikativen DNA entsteht jedoch eine ‚fünfte Base‘. Spezifische Enzyme, DNA-Methyl-Transferasen (DNMTs), katalysieren den Transfer von Methylgruppen des Methylgruppen-Donors S-Adenosyl-Methionin (SAM) auf die Ringstruktur des Cytosins, sodass 5-Methylcytosin (m^5C) entsteht (s. Abb. 1.2.1). Der Mensch besitzt drei verschiedene DNMTs: DNMT1, DNMT3a und DNMT3b. DNMT3a und DNMT3b sind zuständig für die *de novo* Methylierung der DNA zur Erstellung bestimmter embryonaler, gewebsspezifischer Genexpressionsmuster während der Entwicklung. DNMT1 dient dem Erhalt der durch DNMT3a/b induzierten Methylierungsmuster während der Zellteilung, indem es das Methylierungsmuster nach der DNA-Replikation vom parentalen DNA-Strang auf den Tochterstrang kopiert. DNMT1 allein ist jedoch nicht in der Lage, unmethylierte Cytosin-Basen *de novo* zu methylieren (Baylin & Herman, 2000).

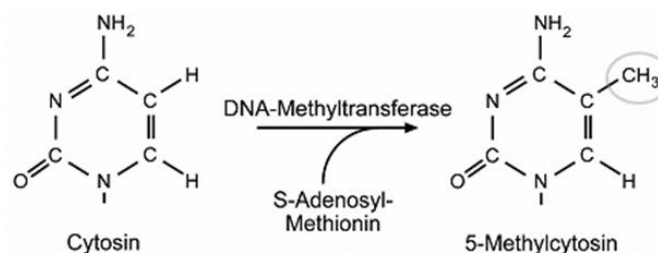


Abbildung (Abb.) 1.2.1: Enzymatische Konversion von Cytosin zu 5-Methylcytosin (m^5C). Proteine der Familie der *DNA-Methyltransferasen* (DNMTs) katalysieren die Methylierung des Cytosin an Position 5 der Ringstruktur, wobei *S-Adenosyl-Methionin* (SAM) als Donor der Methylgruppe ($-CH_3$) fungiert. Abbildung modifiziert nach (Herman & Baylin, 2003).

Methylierung tritt bei Säugern vorwiegend an Cytosinbasen auf, welche in 5'-Richtung einer Guanosinbase direkt folgen, sog. *Cytosine-preceding-Guanosin* (CpG)-Dinukleotide. Die Base m^5C ist hochgradig mutagen, weil durch spontane Deaminierung des m^5C Thymin entstehen und daraus C-zu-T-Punktmutationen resultieren können. Durch diesen Mechanismus wurden CpG-Dinukleotide im Laufe der Evolution im Genom rarefiziert (Herman & Baylin, 2003; Egger *et al.*, 2004).

Bei Säugern sind ca. 1% aller DNA-Basen m^5C und insgesamt 60-90% aller CpG-Dinukleotide des Genoms methyliert. Die höchste Dichte von CpG-Dinukleotiden im Genom findet sich in sog. CpG-Inseln. Dies sind CpG-reiche DNA-Abschnitte mit einer Länge von 0,5-2 kb und einem relativen GC-Anteil von mehr als 55%, die häufig

Promotorregionen und andere regulatorische DNA-Abschnitte enthalten. CpG-Inseln finden sich in ungefähr 60% aller Promotorregionen, davon sind in der Regel 85-90% unmethyliert. Sofern entsprechende Transkriptionsfaktoren präsent sind und die Chromatinstruktur euchromatisch ist, sind solche Gene transkriptional aktiv. Die verbleibenden 40% der Gene ohne CpG-Inseln zeigen mosaikartige Cytosinmethylierungen in Abhängigkeit vom Zellzyklus (Bird & Wolffe, 1999; Ehrlich, 2002; Esteller, 2002; Egger *et al.*, 2004). CpG-Inseln, welche in normalen und malignen Zellen unmethyliert bleiben, besitzen bestimmte Basensequenzmotive, die identisch sind mit Bindungssequenzen für ubiquitäre Transkriptionsfaktoren. Eine stabile Bindung dieser Transkriptionsfaktoren führt in gesunden Zellen zu einer Resistenz gegen aberrante *de novo* DNA-Methylierung. CpG-Inseln mit einer Prädisposition für aberrante Methylierung besitzen dagegen oft Bindungssequenzen für gewebsspezifische Transkriptionsfaktoren und sind assoziiert mit funktionell bedeutenden Genregionen für Zellentwicklung, -differenzierung und -kommunikation (Gebhard *et al.*, 2010).

DNA-Methylierung ist eine physiologische epigenetische Modifikation, welche die Genexpression in Säuger-Zellen kontrolliert und damit sowohl in der normalen embryonalen Entwicklung, als auch bei maligner Transformation eine wichtige Rolle spielt (Herman & Baylin, 2003). Ein individuelles Methylierungsmuster wird während der Entwicklung angelegt und in der Regel lebenslang erhalten (Yoo & Jones, 2006).

DNA-Methylierung bewirkt eine stabile Formation Nuklease-resistenten Chromatins und folglich die transkriptionale Inaktivierung einer Vielzahl von Genen durch Hemmung der Bindung von Transkriptionsfaktoren oder Rekrutierung bestimmter m^5C -bindender Proteine und deren assoziierter Chromatin-modulierender Faktoren (Keshet *et al.*, 1986; Robertson & Jones, 2000). Der größte Teil des menschlichen Genoms ist stark methyliert und liegt daher in geschlossener, also inaktiver Chromatinstruktur als sog. Heterochromatin vor (Jones & Baylin, 2002). Promotorhypermethylierung ist ein progredienter Prozess, in welchem das Ausmaß des Transkriptionsverlustes eines Gens positiv mit der Methylierungsdichte der Promotorregion korreliert (Baylin *et al.*, 2001). DNA-Hypermethylierung ist der grundlegende Mechanismus der Inaktivierung des X-Chromosoms, der genomischen Prägung, gewebsspezifischer Genexpressionsmuster und ein Abwehrmechanismus gegen endoparasitäre DNA-Sequenzen (Robertson & Wolffe, 2000; Robertson & Jones, 2000; Esteller, 2002). Zudem verleiht die physiologische

Methylierung repetitiver DNA-Sequenzen und Introns chromosomale Stabilität (Lopez-Serra & Esteller, 2008).

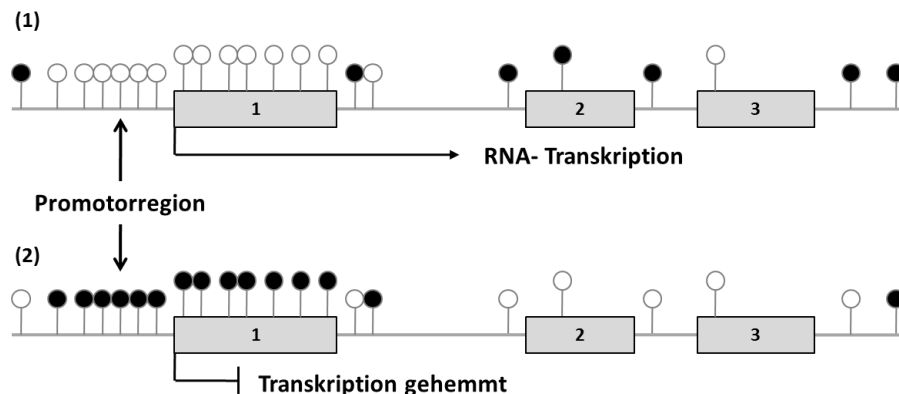


Abb. 1.2.2 DNA-Methylierungsstatus eines Tumorsuppressorgens in (1) einer normalen (unmethylierte CpG-Insel) und (2) einer Tumorzelle (hypermethylierte CpG-Insel). Das Vorhandensein einer dichten Hypermethylierung in der Promotorregion der Tumorzelle verändert die lokale Chromatinstruktur und hemmt die Transkription. Weiße Kreise = unmethylierte CpGs, schwarze Kreise = methylierte CpGs. Abbildung modifiziert nach (Esteller, 2002).

Bei nahezu jeder Tumorentität sind aberrante DNA-Methylierungsmuster zu finden (Esteller, 2002). Diese zeigen sich sowohl als regionspezifische Hypermethylierung, als auch als globale Hypomethylierung (Robertson & Jones, 2000). Aberrante *de novo* DNA-Methylierung von CpG-Inseln in Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen führt zu deren Inaktivierung (s. hierzu Abb. 1.2.2) und ist daher ein wichtiger Faktor in der humanen Kanzerogenese (Herman & Baylin, 2003). Methylierungsbedingte Geninaktivierung betrifft eine Vielzahl von Genen und damit verschiedene zelluläre Signalwege von Zellzyklus, DNA-Reparatur, Karzinogen-Metabolismus, Zelladhäsion und Zellinteraktion, Angiogenese, etc. (Herman & Baylin, 2003).

Tabelle (Tab.) 1.2.1 Epigenetisch alterierte zelluläre Signalwege

Signalweg	Gene
Zell-Zyklus-Kontrolle	<i>RB, p16, p15, p14, p73</i>
DNA-Reparatur	<i>hMLH1, MGMT, BRCA1, GSTP</i>
Apoptose	<i>DAPK, Caspase 8, TMS-1</i>
Zelladhäsion und -invasion	<i>E-cadherin, VHL, APC, TIMP-2, TIMP-3</i>
Wachstumsfaktorenregulation	<i>ER, RARβ2, SOCS-1, HIC-1</i>

Tabelle modifiziert nach (Esteller, 2002; Herman & Baylin, 2003).

Auch im Rahmen der Genese hämatologischer Neoplasien spielt der Methylierungsstatus verschiedener Gene ätiologisch eine tragende Rolle (s. hierzu Tab. 1.2.2) (Galm *et al.*, 2006). Zudem zeigen z.B. leukämische Zellen bei akuter myeloischer Leukämie (AML) und auch chronischer myeloischer Leukämie (CML) in Akzeleration eine typ- und stadienspezifisch deutlich vermehrte Expression der drei DNMTs. Dies mag zu einem vermehrten Auftreten aberranter Methylierungsmuster

während der Leukämogenese beitragen (Mizuno *et al.*, 2001). So ist die aberrante DNA-Methylierung mit konsekutiver Tumorsuppressorgen-Inaktivierung einer der Hauptmechanismen der Entwicklung einer AML aus einem MDS (Jiang *et al.*, 2009).

Tab. 1.2.2 Hypermethylierte Gene bei hämatologischen Neoplasien

Hämatologische Neoplasie	Gene
Non-Hodgkin Lymphome (NHL)	<i>DAPK, p57, p16, MGMT, GSTP, RARβ2, CRBP1</i>
Multiples Myelom (MM)	<i>p16, SOCS-1, E-cadherin, p73, DAPK</i>
Chronisch myeloische Leukämie (CML)	<i>p15, abl</i>
Akute lymphatische Leukämie (ALL)	<i>E-cadherin, p16, p15, DAPK, MGMT</i>
Akute myeloische Leukämie (AML)	<i>p15, E-cadherin, SOCS-1, p73, DAPK, HIC-1, RARβ2, CRBP1</i>

Tabelle modifiziert nach (Galm *et al.*, 2006).

Die Methylierungsmuster von Tumoren sind charakteristisch für eine Tumorentität, sodass Tumore, so auch die AML, nach ihrem Methylierungsprofil klassifiziert werden können (Costello *et al.*, 2000; Esteller *et al.*, 2001, Figueroa *et al.*, 2010b). Ein distinktes Methylierungsprofil kann Tumorzellen einen selektiven Wachstums- und Überlebensvorteil in der jeweiligen gewebsspezifischen Umgebung verleihen (Lopez-Serra & Esteller, 2008). Zwar ist eine Vielzahl von Genen, welche in Tumoren methyliert sind, auch in Zellen des normalen Gewebes methyliert, jedoch gibt es z.B. bei kolorektalen Tumoren eine Reihe tumorspezifisch methylierter Gene. Demzufolge könnte ein sog. *CpG island methylator phenotype* (CIMP), ein distinktes, tumorspezifisches Methylierungsmuster, einen grundlegenden Beitrag zur Pathogenese verschiedener Tumoren leisten (Toyota *et al.*, 1999). Auch bei verschiedenen AML-Subtypen zeigen sich Unterschiede im Methylierungsmuster und es lassen sich darüber hinaus distinkte Subtypen aufgrund eines spezifischen Methylierungsmusters abgrenzen (Figueroa *et al.*, 2010b). So zeigen blastäre Zellen bei MDS oder sekundärer AML (s-AML) im Vergleich zur normalen Myelopoese oder zur *De novo* AML quantitativ vermehrte Hypermethylierung mit regelmäßiger Involvierung einer Vielzahl von Genen der WNT- und *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalwege (Figueroa *et al.*, 2009).

Neben der vermehrten Hypermethylierung von Promotor-CpG-Inseln in Tumorsuppressorgenen zeigt sich bei einer Vielzahl von Tumoren auch ein globaler genomischer Verlust von m⁵C, vor allem in repetitiven DNA-Sequenzen, Retrotransposonen, CpG-armen Promotoren und Intron-Sequenzen (Feinberg & Vogelstein, 1983; Sharma *et al.*, 2010). Diese Hypomethylierung stellt einen eigenständigen Mechanismus der malignen Transformation dar und führt zu Prägungsverlusten sowie zu einer Reaktivierung endoparasitärer DNA-Sequenzen

(Robertson & Wolffe, 2000; Ehrlich, 2002). Die Demethylierung repetitiver Sequenzen bedingt eine vermehrte chromosomale Instabilität mit gehäuftem Auftreten von Translokationen und Rekombinationen von Satellitensequenzen, Deletionen und LOH (Jones & Baylin, 2002; Bestor, 2005). Eine DNA-Demethylierung kann sowohl aktiv durch die DNMTs3a/b, welche fähig sind m^5C zu T und C zu U umzuwandeln, als auch passiv durch Bindung von Transkriptionsfaktoren an Promotor- und Nicht-Promotor-Sequenzen vermittelt sein (Ooi & Bestor, 2008).

1.2.3 Histonmodifikationen

In eukaryotischen Zellen liegt die Erbsubstanz organisiert im Zellkern als Chromatin in sog. Nukleosomen vor. Dies sind die grundlegenden strukturellen Untereinheiten des Chromatins, bestehend aus dem DNA-Doppelstrang und Histonproteinen (Jones & Baylin, 2002). Ein Nukleosom besteht aus einem Histon-Oktamer aus je vier Histon-Dimeren H2A, H2B, H3 und H4, um das sich ein 147 bp langer DNA-Abschnitt windet (Ballestar & Esteller, 2002; Kouzarides, 2007). Histone sind kleine basische Proteine aus einer zentral im Nukleosom lokalisierten globulären und einer geladenen N-terminalen Domäne, welche aus dem Nukleosom-Komplex herausragt (Jenuwein & Allis, 2001). Die Chromatinstruktur hat bedeutenden Einfluss auf die Regulation der Genexpression. Strukturell wird unterschieden zwischen dicht gepacktem, inaktivem Heterochromatin und aufgelockertem, genreichem Euchromatin. Die dichte, heterochromatische Chromatinstruktur verhindert den Zugang von Transkriptionsaktivatoren und des Transkriptionskomplexes zur DNA. Dagegen ist eine lockere, euchromatische Formation charakteristisch für transkriptional aktive DNA-Abschnitte, in denen Gene an- oder abgeschaltet und DNA repliziert oder repariert werden kann (Felsenfeld, 1996; Kouzarides, 2007).

Veränderungen der Chromatinstruktur haben entscheidenden Einfluss auf grundlegende zelluläre Prozesse wie Zellzyklus, DNA-Replikation und –Reparatur, chromosomale Rekombination und Stabilität (Jenuwein & Allis, 2001). Posttranslationale Histonmodifikationen sind diesbezüglich ein wichtiger epigenetischer Einflussfaktor auf die Chromatinstruktur und damit die transkriptionale Aktivierung oder Inaktivierung abhängig von der Art der Modifikation und der modifizierten Struktur (Sharma *et al.*, 2010). Die drei wichtigsten Modifikationen sind Acetylierung von Lysin-Resten, Methylierung von Lysin- und Arginin-Resten, sowie Phosphorylierung von Serin-Resten der N-terminalen Domänen der oktameren Proteine

(Egger *et al.*, 2004; Kouzarides, 2007). Diese Modifikationen sind dynamisch und werden durch verschiedene Proteine enzymatisch katalysiert. Dazu gehören Histon-Acetyl-Transferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDACs), Histon-Methyl-Transferasen (HMTs) und Histon-Demethylasen (HDMs), sowie verschiedene Kinasen und Phosphorylasen (Kouzarides, 2007).

Histonmodifikationen verändern den Kontakt zwischen DNA und Histonen sowie den Kontakt von Histonen benachbarter Nukleosomen untereinander, ändern so die Chromatinstruktur und rekrutieren verschiedene Nicht-Histon-Proteine mit weiteren Chromatin-modifizierenden und –remodellierenden Eigenschaften. Die Regulation der Genexpression in euchromatischen Regionen bedarf einer Rekrutierung der o.g. Chromatin-modifizierenden Proteine durch DNA-gebundene Transkriptionsfaktoren. Auf einen Stimulus hin binden solche Transkriptionsfaktoren ihre spezifischen DNA-Sequenzen und initiieren eine Histonmodifikations-Kaskade mit entsprechender Expression oder Inaktivierung jeweiliger Gene (Kouzarides, 2007).

Das sequentielle oder kombinatorische Zusammenspiel distinkter posttranslationaler Modifikationen eines oder mehrerer Histonfortsätze initiiert verschiedene lokale und globale Chromatin-Modifikationsmuster mit spezifischen *Downstream*-Funktionen und beschreibt damit den sog. *Histon-Code* (Fischle *et al.*, 2003). Die Formation von Eu- oder Heterochromatin beruht auf spezifischen Kombinationen unterschiedlicher Histonmodifikationen und deren Interaktion mit weiteren Chromatin-assoziierten Proteinen. So reflektiert sich der *Histon-Code* in transkriptionaler Aktivität oder Hemmung (Jenuwein & Allis, 2001). Generell haben Histon-Acetylierung und -Methylierung direkten Einfluss auf viele nukleäre Prozesse wie Gentranskription, DNA-Reparatur und -Replikation und chromosomale Organisation (Esteller, 2008). Eine Acetylierung von Lysinresten der Histonproteine neutralisiert die positive Ladung der Aminosäure und verringert so deren Affinität zur negativ geladenen DNA. In der Folge kommt es zur Entfaltung von Nukleosomen und somit zu einer Dekondensation des Chromatins mit einer verbesserten Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren und andere regulatorische Proteine (Lee *et al.*, 1993).

Viele der histonmodifizierenden Enzyme zeigen geringe Substratspezifität und haben durchaus Nicht-Histon-Substrate. Ferner werden bestimmte Histonmodifikationen durch mehrere Enzyme gleichermaßen katalysiert (Kouzarides, 2007). HATs und HDACs sind jeweils Teil großer Co-Aktivator- (SAGA, etc.) bzw. Co-Repressor-Komplexe

(Sin3a, Mi-2/NURD, etc.) und wirken gegensätzlich auf die zelluläre Genexpression durch Modifikation der N-terminalen Histondomänen (Ballestar & Esteller, 2002). HDAC-vermittelte Deacetylierung der Histone H3 und H4 führt zur Formation einer transkriptionshemmenden Chromatinstruktur, HAT-vermittelte H3-Acetylierung ist wiederum typisch für Bereiche aktiver Genexpression (Nguyen *et al.*, 2001). Der Effekt HMT-vermittelter Methylierungen ist abhängig von der modifizierten Aminosäure, sowie deren Position in der Aminosäuresequenz des Histonfortsatzes (Lachner & Jenuwein, 2002; Kouzarides, 2007). Inaktive Gene sind insb. im Bereich von Lysin 9 des H3 methyliert (H3K9me3), aktive dagegen im Bereich von Lysin 4 des H3 (Herman & Baylin, 2003). Es gibt AML-spezifische H3K9me3-Verteilungsmuster, die unabhängig vom zytogenetischen Befund (s. Kap. 1.3.6.2) prognostischen Wert besitzen (Müller-Tidow *et al.*, 2010). Eine Übersicht charakteristischer eu- bzw. heterochromatischer Histonmodifikationen zeigt Tab. 1.2.3.

Tab. 1.2.3 Kovalente Histon- und DNA-Modifikationen der verschiedenen Chromatinformationen

Euchromatin (aktiv)	Heterochromatin (inaktiv)
H3-K4-Methylierung	H3-K27-Methylierung
	H3-K9-Methylierung
	H4-K20-Methylierung
H3/H4-Acetylierung	H3/H4-Deacetylierung
Cytosin-Hypomethylierung	Cytosin-Hypermethylierung

Tabelle modifiziert nach (Lachner & Jenuwein, 2002; Kouzarides, 2007).

Alle humanen Tumoren zeigen einen Verlust an monoacetyliertem H4K16 und trimethyliertem H4K20 im Bereich repetitiver DNA-Sequenzen, welche wiederum in Tumorzellen regelmäßig hypomethyliert sind. Beide Mechanismen führen zu vermehrter chromosomaler Instabilität mit den in Kap. 1.2.2 genannten Folgen. Beide Alterationen sind, ebenso wie die CpG-Hypermethylierung, universale epigenetische Marker einer malignen Transformation (Fraga *et al.*, 2005).

1.2.4 Interaktion epigenetischer Mechanismen

Die Interaktion von CpG-Hypermethylierung und Histon-Deacetylierung führt zur Formation einer transkriptionshemmenden Chromatinstruktur (s. hierzu auch Abb. 1.2.3). Dies resultiert in einer Inaktivierung multipler Gene, so auch insb. von Tumorsuppressorgenen, und ist damit generell ein bedeutender Eingriff in das zelluläre Genexpressionsmuster (Jones *et al.*, 1998; Bird & Wolffe, 1999). Diese Interaktion beruht auf verschiedenen nukleären Faktoren. Eine Schlüsselrolle spielt hier eine Familie von Proteinen mit einer Methylcytosin-Bindungsdomäne (MBDs), welche

einzelne methylierte CpG-Dinukleotide erkennen, spezifisch binden und anschließend histonmodifizierende (insb. HDACs) und Chromatin-remodellierende Proteinkomplexe rekrutieren (Hendrich & Bird, 1998).

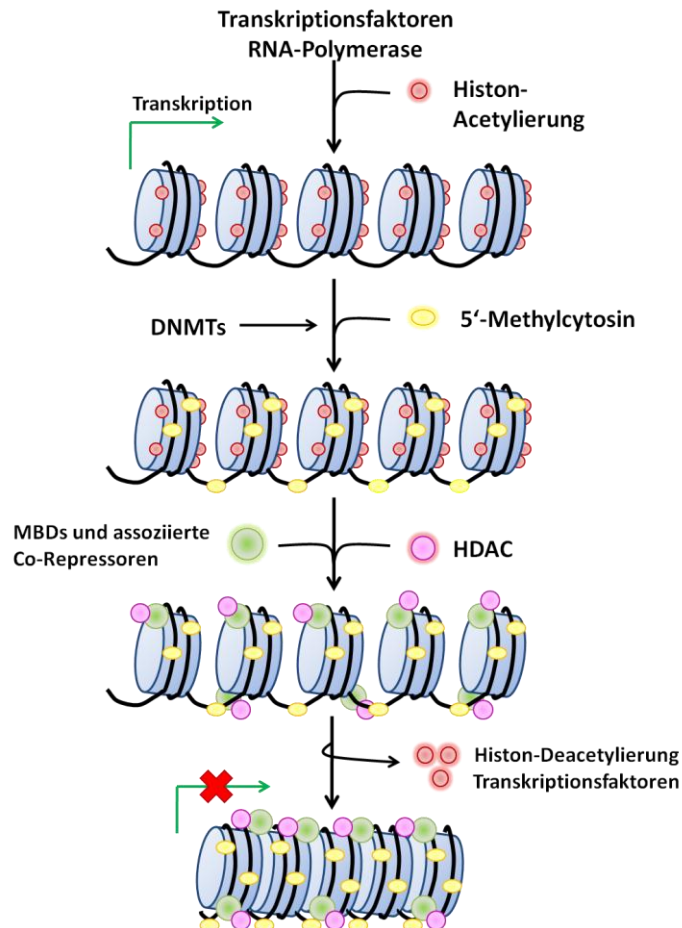


Abb. 1.2.3 Kooperation kovalenter Chromatin-Modifikationen in Bezug auf Chromatinstruktur und transkriptionale Aktivität an einem schematischen Tumorsuppressorgen. Transkriptional aktive Regionen zeigen generell eine vermehrte HAT-vermittelte Acetylierung der H3- und H4-Proteine und eine lockere Chromatinstruktur. Im Rahmen der epigenetischen Inaktivierung erfolgt zunächst eine DNA-Hypermethylierung, gefolgt von einer MBD-assozierten HDAC-Rekrutierung mit konsekutiver Histon-Hypoacetylierung und Formation einer transkriptional repressiven Chromatinstruktur. DNMT = DNA-Methyl-Transferase; MBD = 5'-Methylcytosin-bindende Proteine; HDAC = Histon-Deacetylase. Blaue Scheiben = Histonoktamere; schwarze Linie = DNA-Doppelstrang. Abbildung modifiziert nach (Robertson & Wolffe, 2000).

Die folgende Abbildung (s. Abb. 1.2.4) gibt einen Überblick über die Interaktion epigenetischer Regulationsmechanismen unter Einbezug von MBDs, DNMTs und HDACs in einer schematischen Genpromotorregion. Es sind die Prozesse in einer gesunden und einer maligne entarteten Zelle vergleichend dargestellt.

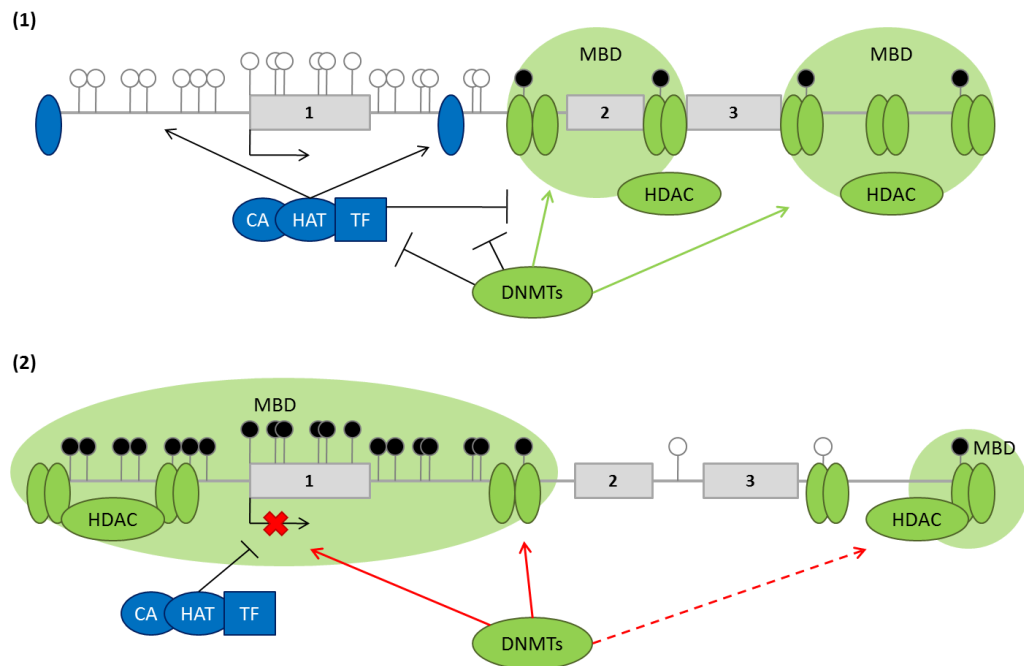


Abb. 1.2.4 Epigenetische Regulation der Transkription normaler (1) und maligner Zellen (2).

(1) Typische Konfiguration eines aktiv transkribierten (Pfeil an Exon 1) 3-Exon-Gens (graue Kästen 1-3) mit unmethylierter CpG-Insel der Promotorregion, reich an unmethylierten CpG-Dinukleotiden (weiße Kreise). *Downstream* im Gen-Zentrum und weiter in 3'-Richtung zeigt sich ein CpG-Verlust und nur noch wenige, hier methylierte CpG-Dinukleotide (schwarze Kreise). Die Nucleosomen in der Promotorregion sind locker gepackt und enthalten acetylierte Histone (blaue Ovale an der DNA). Das Chromatin *downstream* der CpG-Insel besteht aus kompakt gelagerten Nucleosomen mit deacetylierten Histonen (grüne Ovale an der DNA). Im Bereich der CpG-Insel liegt ein typischer Transkriptionskomplex bestehend aus Histon-Acetyltransferase (HAT), Co-Aktivator (CA) und basalen Transkriptionsfaktoren (TF), welcher nicht mit DNA-Methyltransferasen (DNMTs) interagiert. Methylierte *Downstream*-Regionen sind zugänglich für DNMTs und interagieren mit Methyl-Cytosin bindenden Proteinen (MBDs) und Histon-Deacetylasen (HDACs).

(2) Das Gen der Tumorzelle ist aberrant methyliert und transkriptional inaktiviert. Die Promotor-CpG-Insel ist dicht methyliert (schwarze Kreise), zugänglich für DNMTs und die Nucleosomen sind dichter gepackt (grüne Ovale an der DNA) und enthalten deacetylierte Histone. Die CpG-Dinukleotide der CpG-Insel interagieren mit MBD-HDAC-Komplexen, der Transkriptionskomplex wird dagegen an einer Interaktion gehindert. Die *Downstream*-Region zeigt die typische Hypomethylierung einer Tumorzelle mit nur schwacher DNMT-Interaktion, aufgelockerter Chromatinstruktur und verminderter Zahl an MBD-HDAC-Komplexen. Abbildung modifiziert nach (Baylin & Herman, 2000).

Derzeit sind fünf Mitglieder der MBD-Familie bekannt: MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 und MBD4 (Hendrich & Bird, 1998). Drei der fünf MBDs rekrutieren HDAC-enthaltende Co-Repressor-Komplexe (z.B. Sin3a/HDAC oder Mi-2/NuRD) an methylierten CpG-Inseln, welche daraufhin eine transkriptional repressive Chromatinstruktur herstellen und dadurch die Expression betroffener Gene effektiv hemmen (s. Kap. 1.2.3) (Jones *et al.*, 1998; Lopez-Serra & Esteller, 2008). Die DNA im Bereich inaktiver Promotoren ist daher typischerweise hochgradig methyliert, jeweilige lokale Histone deacetyliert und H3-K9-methyliert (Nguyen *et al.*, 2001; Lachner & Jenuwein, 2002). *Downstream* von Promotorregionen gebundene MBDs haben bei aktiviertem *Upstream*-Promotor aber keinen Einfluss auf die transkriptionale Elongation und damit auf die Expression betroffener Gene (Nguyen *et al.*, 2001).

DNA-Methylierung ist auch direkt mit Histonmodifikationen assoziiert, da DNMT1 in der Lage ist HDACs zu rekrutieren und so während der DNA-Replikation sowohl das DNA-Methylierungsmuster, als auch eine transkriptionshemmende Chromatininformation zu erhalten (Baylin *et al.*, 2001; Ballestar & Esteller, 2002). Andererseits werden über H3K9me in heterochromatischen DNA-Regionen DNMTs rekrutiert und die repressive Chromatinstruktur stabilisiert (Lachner & Jenuwein, 2002).

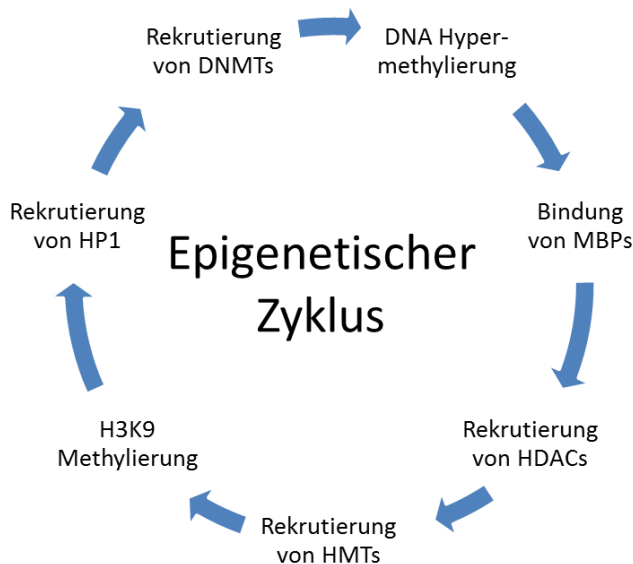


Abb. 1.2.5 Zusammenspiel epigenetischer Modifikation zur Regulation des transkriptionshemmenden Heterochromatins (modifiziert nach Issa J.P., The cancer epigenome, Präsentation bei der AACR-Jahrestagung 2011).

So wirken DNA-Methylierung und Histon-Deacetylierung synergistisch auf die Inaktivierung von Genen durch Formation von Heterochromatin (s. Abb. 1.2.5 und Abb. 1.2.6), wobei die CpG-Hypermethylierung dominiert (Ballestar & Esteller, 2002).

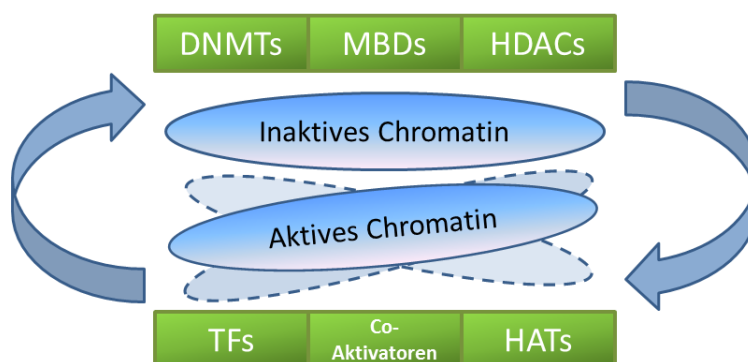


Abb. 1.2.6 Zusammenhang zwischen Chromatinstruktur und transkriptionalen Regulatoren. Die transkriptionale Aktivität des Chromatins wird durch die Interaktion verschiedener aktivierender und hemmender Faktoren dynamisch reguliert. Störungen dieser Regulatoren beeinflussen die Balance zwischen aktivem und inaktivem Chromatin und verändern so das Transkriptionsmuster. DNMTs = DNA-Methyl-Transferasen. MBDs = Methyl-Cytosin bindende Proteine. HDACs = Histon-Deacetylasen. TFs = Transkriptionsfaktoren. HATs = Histon-Acetyl-Transferasen. Abbildung modifiziert nach (Jaenisch & Bird, 2003).

1.2.5 Klinische Bedeutung epigenetischer Veränderungen

Struktur und Funktion des menschlichen Genoms werden durch epigenetische Prozesse reguliert. Im Gegensatz zur DNA-Sequenz unterliegt das Epigenom dem Einfluss von Umweltfaktoren und verändert sich sowohl mit fortschreitendem Alter, als auch im Prozess einer malignen Entartung (Jones & Martienssen, 2005).

Epigenetische Aberrationen sind häufig in der Frühphase einer malignen Transformation, oft schon vor genetischen Aberrationen, zu finden und sind teilweise ursächlich für nachfolgende Veränderungen auf genetischer Ebene (Baylin *et al.*, 2001; Feinberg & Tycko, 2004). Beispielsweise verändert eine bei verschiedenen Tumoren auftretende epigenetische Inaktivierung der DNA-Reparatur-Gene *Human mutL homolog 1 (hMLH1)*, *O(6)-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT)* oder *Breast cancer 1 (BRCA1)* das gesamte zelluläre DNA-Gefüge. Infolge der epigenetischen Inaktivierung kommt es konsekutiv zu einem vermehrten Auftreten spezifischer Punktmutationen bis hin zu komplexen genomischen Alterationen und damit zum Progress der malignen Transformation (Herman & Baylin, 2003; Esteller, 2008). Umgekehrt sind epigenetische Aberrationen, z.B. in der Ätiologie akuter Leukämien, genetisch getriggert. Abnorme, onkogene Transkriptionsfaktoren, z.B. PML-RAR α , können DNMTs an Promotorregionen ihrer Zielgene rekrutieren und so deren Inaktivierung mittels DNA-Hypermethylierung induzieren (Herman & Baylin, 2003).

Der klinisch bedeutendste Unterschied zwischen genetischen und epigenetischen Alterationen besteht darin, dass DNA-Hypermethylierung und Histon-Acetylierung, im Gegensatz zu Alterationen der DNA-Sequenz, potenziell reversibel sind. Die Reversibilität bietet neue Möglichkeiten für das klinische Management neoplastischer Erkrankungen und einen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Therapiestrategien (s. Kap. 1.2.6). Außerdem könnten epigenetische Veränderungen als Marker für Diagnostik, Risiko- und Prognosebewertung oder für die Wahrscheinlichkeit eines Therapieansprechens Bedeutung erlangen (Esteller, 2002; Herman & Baylin, 2003; Esteller, 2008).

Ein positiver Methylierungsstatus von *hMLH1* hat negativen, von *MGMT* dagegen positiven Einfluss auf das Ansprechen auf eine chemotherapeutische Behandlung und damit prädiktiven Wert für den Therapieerfolg (Plumb *et al.*, 2000; Esteller *et al.*, 2000a). Es ist außerdem bekannt, dass eine Hypermethylierung beispielsweise des *p16^{INK4a}*-Gens bei kolorektalen Karzinomen oder des

Inter- α -Trypsin-Inhibitor heavy chain 5 (ITIH5)-Gens bei Mammakarzinomen signifikant mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Esteller *et al.*, 2000b; Veeck *et al.*, 2008a).

1.2.6 Epigenetische Therapie

Epigenetisch inaktivierte Gene sind zwar transkriptional inaktiv, jedoch im Gegensatz zu genetisch mutierten Genen in ihrer Struktur intakt. Daher ermöglicht der Einsatz pharmakologischer Substanzen, welche die DNA-Methylierung und Histon-Deacetylierung hemmen, eine Reexpression von Genen (Esteller, 2002; Gilbert *et al.*, 2004). So kann, abhängig von den betroffenen Genen, die Wiederherstellung der normalen Expression entweder die Tumorentstehung verhindern, eine Erkrankung zum Stillstand bringen, das Auftreten von Metastasen hinauszögern oder eine hypermethylierungsassoziierte Therapieresistenz aufheben (s. hierzu Abb. 1.2.7) (Gilbert *et al.*, 2004). Epigenetische Therapieansätze haben den Vorteil, bereits bei niedrigen Dosierungen und dementsprechend mit günstigem Toxizitätsprofil effektiv wirksam zu sein (Yoo & Jones, 2006).

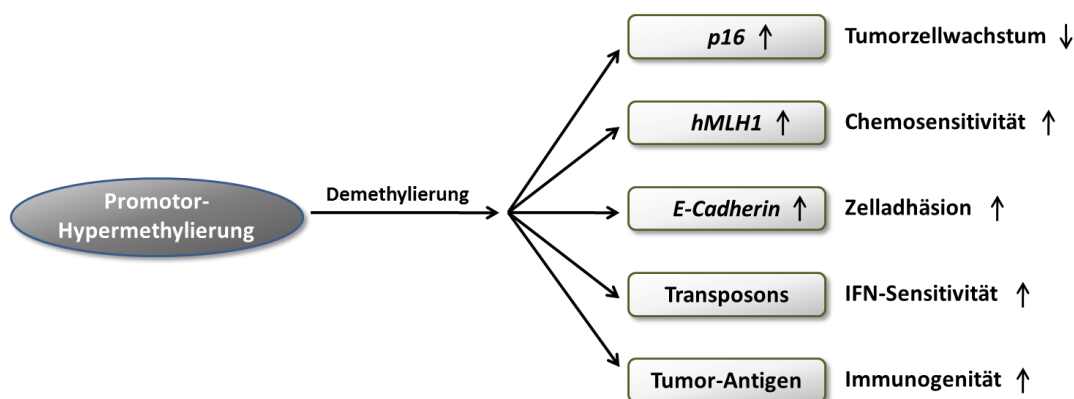


Abb. 1.2.7 Reaktivierung epigenetisch inaktiverter Gene durch DNMT-Inhibitoren (MTIs). Der Einsatz von MTIs, wie AZA und DAC, initiiert eine genomweite Demethylierung der DNA, die eine Reaktivierung zuvor hypermethylierter Gene ermöglicht. Reexpression von Zell-Zyklus-Regulatoren, z.B. *p16*, wirkt hemmend auf das Tumorzellwachstum. Die Aktivierung von DNA-Reparaturgenen, wie z.B. *hMLH1*, lassen Tumorzellen sensitiver gegenüber konventionellen Chemotherapeutika werden. Infolge einer Reaktivierung des *E-Cadherin*-Gens wird die Zell-Zell-Adhäsion gestärkt. Eine mögliche Aktivierung von Transposonen könnte sich durch verbesserte Antwort auf Interferone (IFN) begünstigend auf den Therapieerfolg auswirken. Schließlich kann eine Expression von Tumor-Antigenen die Immunogenität der malignen Zellen erhöhen. Abbildung modifiziert nach (Yoo & Jones, 2006).

Die Inaktivierung von DNMTs ist eine der effektivsten Optionen aberrante DNA-Methylierung zu inhibieren und physiologische Methylierungsmuster wiederherzustellen. Es gibt zwei Klassen von DNMT-Inhibitoren (MTIs): Nukleosidanaloga und Nicht-Nukleosidanaloga. Cytosin-Analoga wie AZA und DAC (s. Abb. 1.2.8), werden in teilungsaktive Zellen inkorporiert und durch Kinasen von

Nukleosiden zu Nukleotiden metabolisiert (Yoo & Jones, 2006). Diese werden dann während der Replikation in die DNA eingebaut und binden kovalent DNMTs in einem Komplex an die DNA. So führen diese Agenzien zu einem progressiven Verlust an DNMTs und folglich zu einer Verminderung der DNA-Methylierung mit jedem neuen Zellzyklus, was letztendlich in einer globalen Hypomethylierung der DNA resultiert (Egger *et al.*, 2004; Issa, 2007).

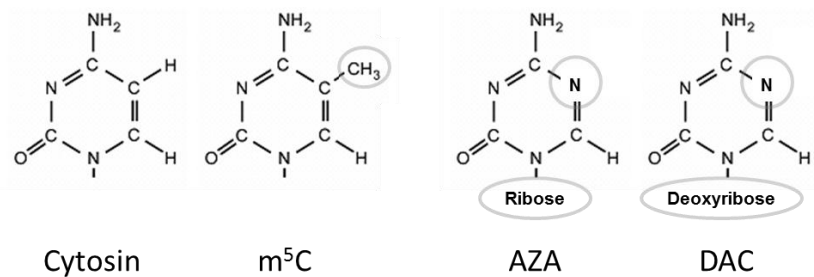


Abb. 1.2.8 Strukturformeln von Cytosin, 5-Methylcytosin (m^5C), 5-Azacytidin und 5-Aza-2'-deoxycytidin. Abbildung modifiziert nach (Santini *et al.*, 2001).

Ursprünglich wurde die chemotherapeutische Wirksamkeit von AZA bereits vor mehr als 40 Jahren beschrieben, die demethylierende Wirkung der Nukleosidanaloga wurde jedoch erst 1980 erkannt (Jones & Taylor, 1980). Im Vergleich zu hohen Dosen zeigen AZA und DAC in niedrigeren, nicht-zytostatischen Dosen klinisch effektivere hypomethylierende, antitumoröse Wirkung bei gleichzeitig verminderter Toxizität (Issa, 2007). Die Hemmung von DNMTs induziert zuerst eine Promotor-Demethylierung gefolgt von einer Gen-Reexpression und zuletzt auch eine komplette Rehabilitation des *Histon-Codes* (Fahrner *et al.*, 2002). AZA und DAC sind nicht spezifisch für bestimmte Gene oder DNMTs. Diese mangelnde Spezifität ist mitunter verantwortlich für die toxischen Nebenwirkungen. Die bedeutendsten Nebenwirkungen, auch bei geringeren Dosen, sind schwere Übelkeit und Erbrechen sowie Zytopenien. Die Summe der multiplen Effekte auf die Zellphysiologie scheint jedoch insgesamt einen therapeutisch günstigen Einfluss zu haben (Gilbert *et al.*, 2004; Issa, 2007). AZA und DAC waren die ersten epigenetischen Pharmaka, welche von der FDA für die Behandlung des MDS zugelassen wurden (Kaminskas *et al.*, 2005; Kantarjian *et al.*, 2006). Beide Pharmaka induzieren Remissionen oder klinische Verbesserungen bei über 50% der behandelten MDS-Patienten, vermindern das Risiko einer Transformation in eine AML und verbessern signifikant die Lebensqualität (Silverman *et al.*, 2002; Kantarjian *et al.*, 2006). Zebularin ist ein, im Gegensatz zu AZA und DAC, oral applizierbares Nukleosidanalogon, welches im Rahmen

experimenteller Studien demethylierende Wirkung zeigt (Zhou *et al.*, 2002). Klinisch spielt *Zebularin* jedoch aktuell wegen erforderlicher hoher Dosierung, potenzieller Mutagenität und eingeschränkter Bioverfügbarkeit keine Rolle (Yoo & Jones, 2006).

Nicht-Nukleosidanaloga sind molekulare MTIs, welche nicht in die DNA inkorporiert werden, sondern DNMTs durch Bindung an die katalytische Domäne inhibieren (Yoo & Jones, 2006). *MG98* ist ein Antisense-Oligonukleotid und spezifischer Inhibitor der *DNMT1*-mRNA. Die höhere Spezifität bedingt ein günstigeres Nebenwirkungsprofil (Stewart *et al.*, 2003). *Procain* und *Hydralazin* sind oral applizierbare Pharmaka mit nur schwacher DNMT-hemmender Wirkung, die als MTI klinisch derzeit keine Rolle spielen. Dafür jedoch ist *Procain* (Novocain®) als Lokalanästhetikum und Antiarrhythmikum, *Hydralazin* als Antihypertensivum zugelassen (Mack, 2006; Issa, 2007).

Unter den Histonmodifikationen ist die verminderte Histon-Acetylierung gegenüber Alterationen der Histon-Methylierung der dominierende Faktor im Prozess der malignen Transformation. Daher sind die derzeit bekannten elf verschiedenen HDACs die primären Zielstrukturen epigenetischer Therapieansätze gegen Histonmodifikationen (Yoo & Jones, 2006; Jost *et al.*, 2006). Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACIs) stellen eine biochemisch und biologisch heterogene Gruppe von Agenzien dar. Es gibt vier Wirkstoffklassen: kurzkettige Fettsäuren (z.B. *Phenylbutyrat*, *Valproat*), Hydroxamsäure-Derivate (z.B. *Trichostatin A*, SAHA), zyklische Tetrapeptide (z.B. *Depsipeptid*) und Benzamide (z.B. *MS-275*, *CI-994*) (Yoo & Jones, 2006). Alle induzieren einheitlich eine Hyperacetylierung von Histonen und darüber eine aufgelockerte Chromatinstruktur mit der Möglichkeit aktiver Genexpression (Gilbert *et al.*, 2004). Experimentell hat der Einsatz von HDACIs pleiotrope Effekte, z.B. die Induktion von Zell-Zyklus-Arrest, zellulärer Differenzierung oder Apoptose sowie die Inhibition von Angiogenese und Metastasierung (Villar-Garea & Esteller, 2004).

Ferner führt eine Behandlung von Zelllinien mit HDACIs *in vitro* zu einer erhöhten Sensibilität dieser Zellen gegenüber der zytotoxischen Wirkung verschiedener Zytostatika, möglicherweise da diese Substanzen besseren Zugang zur DNA finden (Kim *et al.*, 2003). *Valproat* (VPA) ist bisher nur als Antikonvulsivum in klinischem Gebrauch, zeigt aber, z.B. in klinischen Studien, gute Erfolge in Kombination mit ATRA bei AML des älteren Patienten oder *in vitro* kombiniert mit AZA bei

verschiedenen Leukämie-Zelllinien (Mack, 2006; Yoo & Jones, 2006). Das synthetische Hydroxamsäure-Derivat *Suberoylanilide hydroxamic acid* (SAHA, Vorinostat[®]) induziert vor allem eine vorübergehende H3-Acetylierung und wurde als erster HDACI von der FDA für die Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms zugelassen. Außerdem induziert SAHA *in vitro* Zell-Zyklus-Arrest und Apoptose in leukämischen Zellen (Issa, 2007; Jain *et al.*, 2009). *Depsipeptide* (FK228, Romidepsin[®]), ein zyklisches Tetrapeptid, zeigt vor allem bei kutanen T-Zell-Lymphommanifestationen gute antitumoröse Wirksamkeit im Rahmen klinischer Studien (Jain *et al.*, 2009). MS-275 (Entinostat[®]) ist ein synthetischer Aktivator des *Retinoic acid receptor β2* (RARβ2) mit erwiesener Wirksamkeit bei Nierenzell- und Prostatakarzinomen, sowie wachstumshemmender Wirkung auf Leukämiezelllinien und leukämische Blasten *in vitro* (Wang *et al.*, 2005; Jain *et al.*, 2009). Das Zimtsäure-Derivat LBH 589 (Panobinostat[®]) ist eines der potentesten HDACIs, zeigt als Monotherapie in klinischen Studien jedoch, wie alle anderen HDACIs, nur unzureichende Wirksamkeit (Jain *et al.*, 2009).

Deacetylierende Agenzien haben als Monotherapie aufgrund der dominierenden Rolle der DNA-Methylierung nur begrenzt Einfluss auf die Wiederherstellung der Expression epigenetisch inaktiverter Gene (Bird & Wolffe, 1999; Cameron *et al.*, 1999). Eine partielle Demethylierung der DNA ist Voraussetzung für die Reexpression eines Gens und für die Umkehr anderer Chromatin- und Histonmodifikationen (Cameron *et al.*, 1999). Allerdings beschreibt eine aktuelle Studie die Induktion einer Reexpression der Tumorsuppressorgene *p15^{INK4b}* und *E-cadherin* bei AML *in vitro* durch direkte Inhibition der HMT SUV39H1 auch ohne vorhergehende Promotor-Demethylierung (Lakshmikuttyamma *et al.*, 2010).

Der kombinierte Einsatz DNA-demethylierender und Histon-deacetylierender Agenzien hat *in vitro* und *in vivo* im Tiermodell einen synergistischen Effekt auf die Reaktivierung einer Vielzahl epigenetisch inaktiver Tumorsuppressorgene, die Hemmung des Tumorzellwachstums und auf eine Resensibilisierung von Tumorzellen gegenüber zytotoxischer Chemotherapie, insb. bei primärer Resistenz von Tumorstammzellen (Cameron *et al.*, 1999; Steele *et al.*, 2009, Sharma *et al.*, 2010). Auch eine Kombination von HDACIs mit *Bortezomib* (Velcade[®]), einem Proteasominhibitor, hat synergistische Wirkung auf eine Apoptoseinduktion, z.B. in leukämischen Blasten der AML oder ALL (Dai *et al.*, 2011). Beruhend auf dem diesen Synergismen sind therapeutische Kombinationen, sowohl von epigenetischen Therapien

miteinander, als auch zusammen mit konventionellen Chemotherapeutika, derzeit Gegenstand klinischer Studien. Jedoch ist bisher noch keine Kombination von MTIs und HDACIs für den klinischen Einsatz zugelassen.

Auch die Kombination epigenetischer Therapeutika mit konventionellen Chemotherapeutika könnte von Vorteil sein, da demethylierende Agenzien nur einen vorübergehenden Einfluss auf die behandelten Zellen haben. Abnorme Methylierungsmuster regenerieren sich nämlich nach Absetzen der MTIs (Yoo & Jones, 2006).

Abb. 1.2.9 gibt einen Überblick über aktuell in experimenteller und klinischer Erprobung befindliche epigenetisch wirksame Substanzen.

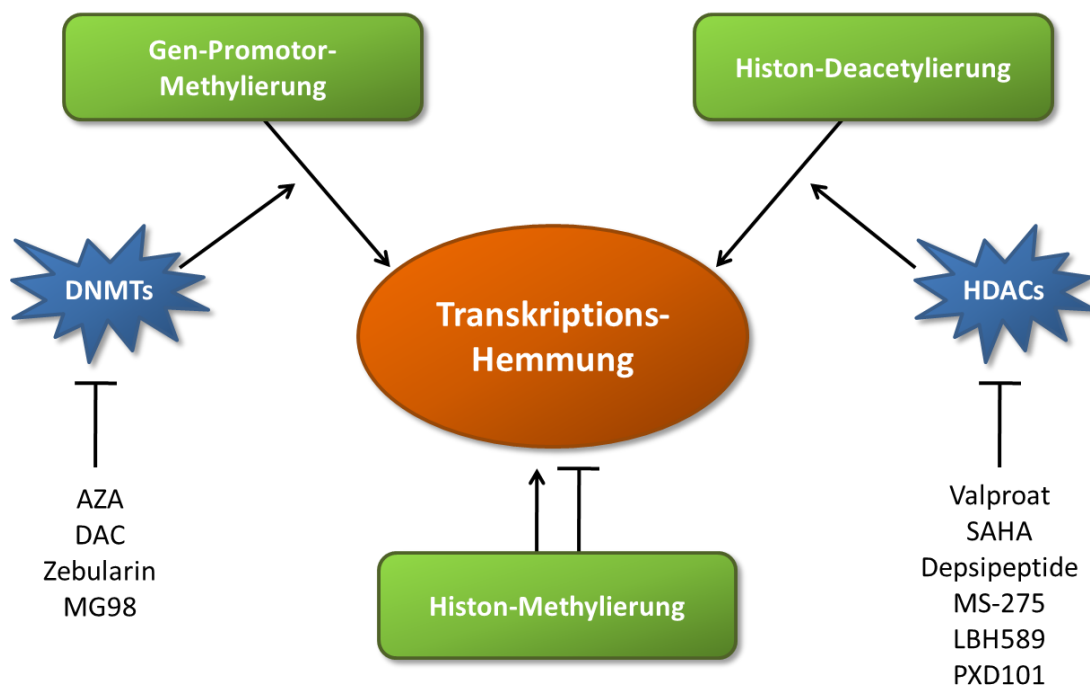


Abb. 1.2.9 Epigenetische Regulationsmechanismen der Transkription und der Einfluss verschiedener Substanzen auf die verantwortlichen Proteine. Die epigenetische Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen ist ein fundamentaler und zugleich reversibler Mechanismus der Tumorgenese. DNMTs katalysieren die Hypermethylierung von Promotorregionen und werden gehemmt durch verschiedene AZA-Analoga (AZA, DAC, Zebularin) oder das Antisense-Nukleosid MG98. Verschiedene HDAC-Hemmstoffe, wie Valproat, SAHA, Depsipeptide, MS-275, LBH 589 oder PXD101 inhibieren die Histon-Deacetylierung und führen darüber zu einer aufgelockerten Chromatinstruktur durch vermehrte Histon-Acetylierung. Abbildung modifiziert nach (Jost & Galm, 2007; Jain *et al.*, 2009).

Der größte Nachteil der verfügbaren epigenetisch wirksamen Substanzen ist deren mangelnde Substrat- bzw. Gen-Spezifität. Problematisch ist eine durch verstärkte DNA-Hypomethylierung hervorgerufene unspezifische Reaktivierung repetitiver Sequenzen. Diese birgt ein mutagenes Risiko durch Aktivierung von Onkogenen und Transposonen im Genom gesunder Zellen (Egger *et al.*, 2004; Yoo & Jones, 2006).

1.3 Akute myeloische Leukämie

1.3.1 Definition

Die AML ist eine sehr heterogene Erkrankung durch eine maligne klonale Vermehrung unreifer myeloischer Vorläuferzellen, sog. Blasten, in Knochenmark (KM), peripherem Blut (pB) oder anderen Geweben und Organen. Sie ist gekennzeichnet durch eine Dysregulation von Differenzierung und Proliferation der unreifen Vorläuferzellen der Hämatopoese und einer Verdrängung der normalen Hämatopoese durch ungehemmte Expansion des malignen Zellklons (Löwenberg *et al.*, 1999; Estey & Döhner, 2006).

1.3.2 Hämatopoese und Leukämogenese

Sowohl für die normale Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks zu Vorläufern und reifen Zellen des Blutes, als auch für die Entstehung einer Differenzierungsblockade bei AML sind spezifische hämatopoetische Transkriptionsfaktoren von entscheidender Bedeutung (s. Abb. 1.3.1) (Tenen, 2003).

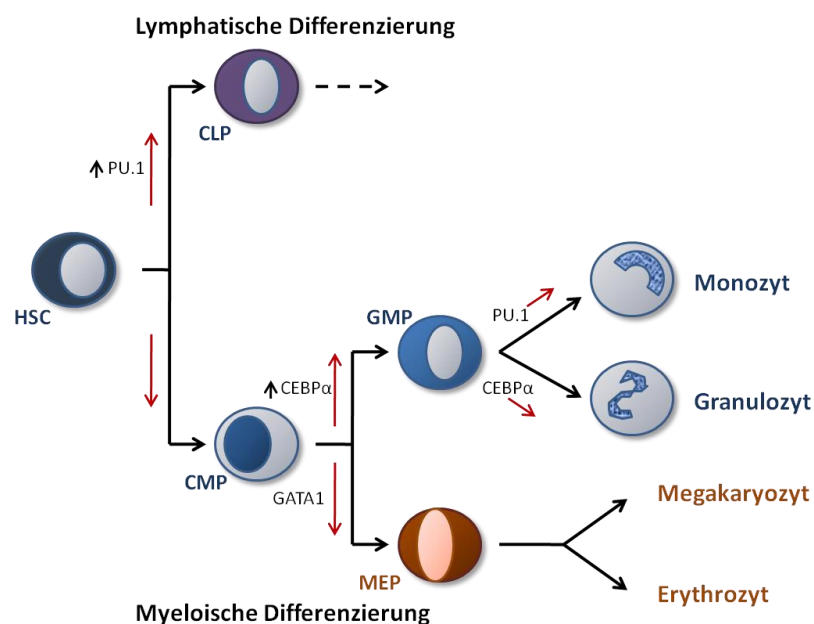


Abb. 1.3.1 Die Rolle von Transkriptionsfaktoren in der Hämatopoese. Pluripotente hämatopoetische Stammzellen (*hematopoietic stem cells*; HSCs) des Knochenmarks erneuern sich entweder selbst oder differenzieren sich zu unreifen Vorläufern der erythroiden, myeloischen, lymphatischen oder megakaryozytären Reihe (*common myeloid progenitor*, CMP oder *common lymphoid progenitor*, CLP). Während der Differenzierung exprimieren die multipotenten Vorläuferzellen durch die Wirkung hämatopoetischer Transkriptionsfaktoren Rezeptoren für spezifische Wachstumsfaktoren, die *colony stimulating factors* (CSFs). Dies ermöglicht die gerichtete Proliferation und Differenzierung als Antwort auf einen extrazellulären Stimulus. GATA1 bewirkt die Differenzierung der CMPs zu erythroiden Vorstufen (*macrophage/erythroid progenitor*; MEP). PU.1 und CEBP α induzieren die Differenzierung der myeloischen Zellreihe. Der Verlust von CEBP α führt selektiv zu einem Expressionsverlust des G-CSF-Rezeptors und dadurch zur Blockade der Differenzierung allein der neutrophilen Granulozyten. Abbildung modifiziert nach (Tenen, 2003).

Außerdem ist die mangelhafte Hämatopoese bei AML Folge einer Dysregulation der Interaktion von leukämischen Blasten und umgebendem *Microenvironment* im KM, insb. aus Stromazellen und deren Produkten, v.a. Zytokinen und Strukturen der extrazellulären Matrix (*extracellular matrix*, ECM) (Mayani, 1996). Dieses *Microenvironment* unterstützt und reguliert die Proliferation und Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSCs) (Bhatia *et al.*, 1993).

HSCs sind charakterisiert durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie zur multilineären Differenzierung und Ausreifung. Leukämische Stammzellen (*leukemic stem cells*, LSCs) hingegen erscheinen als kleine Population transformierter HSCs mit unkontrollierter Proliferation und Ausreifung durch eine Akkumulation genetischer und epigenetischer Aberrationen. LSCs sind gekennzeichnet durch einen distinkten Immunphänotyp (CD34⁺CD38⁻) (Huntly & Gilliland, 2005; Bonnet, 2005). In der Leukämogenese führen somit zytogenetische Aberrationen und molekulargenetische Veränderungen zur Blockierung der Ausreifung der blastären Zellen durch eine Dysregulation von Proliferation, Ausdifferenzierung und Apoptose des malignen Zellklons (Löwenberg, 2008). Die leukämischen Blasten sind nicht dazu fähig, funktionstüchtige Erythrozyten, Leukozyten, Monozyten oder Thrombozyten zu bilden. Außerdem behindert der maligne blastäre Zellklon noch vorhandene normale Blasten in ihrer Ausreifung. Dies führt regelmäßig zu einer (Pan-)Zytopenie. Jedoch besteht keine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Zytopenie und der Blastenzahl im KM (Estey & Döhner, 2006). Ferner ist die Proliferationsrate der leukämischen Stammzellen nicht zwangsläufig höher als die von Zellen der gesunden Hämatopoese, wenngleich im malignen Klon oft eine Dysregulation der Zell-Zyklus-Kontrolle auftritt (Tenen, 2003).

Die auftretenden genetischen oder epigenetischen Veränderungen begründen die Aktivierung von Onkogenen oder den Verlust der Aktivität von Tumorsuppressorgenen (Hanahan & Weinberg, 2000). Diese Veränderungen betreffen die Funktion von Signalmolekülen, Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktoren, bestimmen darüber hinaus den leukämischen Phänotyp und nehmen Einfluss auf die Therapieantwort. Außerdem spiegeln die oftmals koexistierenden multiplen genomischen Veränderungen in einer einzigen leukämischen Zelle den Transformationsprozess hin zum leukämischen Blasten in der Entstehung der AML wider (Löwenberg, 2008). Diese Entstehung leukämischer Blasten aus einer normalen Blastenpopulation gründet auf zwei verschiedenen Klassen genetischer Veränderungen. Die Klasse I-Veränderungen induzieren eine dauerhafte Aktivierung von Rezeptoren an der Zelloberfläche,

z.B. Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (FLT3, RAS, cKIT, JAK2), mit konsekutiv dauerhafter Aktivierung zellulärer Signalwege und einem daraus resultierenden Wachstums- und Überlebensvorteil der betroffenen hämatopoetischen Vorläuferzelle. Klasse II umfasst Veränderungen, die durch alterierte Transkriptionsfaktoren oder Teile des Transkriptions-Coaktivator-Komplexes einen Reifungsblock induzieren, so z.B. die Expression von Fusionsgenen (z.B. AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1) bei t(8;21) oder CBF β -MYH11 bei inv(16)) oder Mutationen des *CEBPa*-, *MLL*- oder *NPM1*-Gens (Estey & Döhner, 2006; Schlenk *et al.*, 2008). *In vivo* treten Veränderungen beider Klassen regelmäßig kombiniert auf, so z.B. *cKIT*-Mutationen zusammen mit einer t(8;21) oder inv(16) (Estey & Döhner, 2006). DNA-Methylierung ist ein weiterer Faktor im mehrstufigen Transformationsprozess der Leukämogenese. So konnten bisher zahlreiche Gene mit Einfluss auf Zell-Zyklus, DNA-Reparatur, Apoptoseinduktion, Tumorinvasion oder Wachstumsfaktor-Antwort identifiziert werden, die bei AML epigenetisch inaktiviert sind (Galm *et al.*, 2006).

1.3.3 Klassifikation

Ursprünglich diente die 1976 eingeführte *French-American-British*-Klassifikation (FAB) zur Unterteilung der AML anhand von Zytomorphologie und Zytochemie in zehn verschiedene Subtypen, M0-M7 (inklusive M3v und M4Eo). Nach den FAB-Kriterien muss der Blastenanteil an allen kernhaltigen Zellen mindestens 30% betragen, um die Diagnose AML stellen zu können (Bennett *et al.*, 1976). Einige FAB-Subtypen zeigen distinkte zytogenetische Aberrationen (s. auch Tab. 1.3.1).

Tab. 1.3.1 FAB-Klassifikation der AML

FAB	Name	Häufigkeit (%)	Zytogenetik	Molekulargenetik
M0	AML mit minimaler Differenzierung	3%	-	EVI1
M1	AML ohne Ausreifung	15-20%	t(8;21)	AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1)
M2	AML mit Ausreifung	25-30%	t(8;21)	AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1)
M3	Akute Promyelozyten-Leukämie (APL)	5-10%	t(15;17)	PML-RAR α
M3v	APL-Variante	(vgl. M3)	t(15;17)	PML-RAR α
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	20%	-	-
M4eo	Akute myelomonozytäre Leukämie mit abnormen Eosinophilen	5-10%	inv(16), t(16;16)	CBF-MYH11
M5	Akute monozytäre Leukämie	2-9%	11q23	MLL-Aberration
M6	Erythroleukämie	3-5%	-	-
M7	Akute megakaryozytäre Leukämie	3-12%	-	-

Tabelle modifiziert nach (Löwenberg *et al.*, 1999).

Die WHO-Klassifikation der AML von 1999 (s. Tab. 1.3.2) kombiniert die Merkmale der FAB-Klassifikation mit immunphänotypischen, genetischen und klinischen Parametern zur Unterteilung biologisch homogener AML-Subgruppen mit klinischer und prognostischer Relevanz (Swerdlow *et al.*, 2008). Eine wichtige Neuerung zur FAB-Klassifikation ist die Empfehlung, eine AML bereits ab einem Blastenanteil von $\geq 20\%$ in KM oder pB zu diagnostizieren (Cheson *et al.*, 2003; Vardiman *et al.*, 2009).

Tab. 1.3.2 WHO-Klassifikation akuter myeloischer Leukämien

AML-Klasse	Subtypen
AML mit rekurrenten zytogenetischen Aberrationen	AML mit t(8;21)(q22;q22); (RUNX1-RUNX1T1)
	AML mit abnormen Knochenmarkseosinophilen und inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13;q22); (CBF β -MYH11)
	APL mit t(15;17)(q22;q12); (PML-RAR α)
	AML mit t(9;11)(p22;q23); (MLLT3-MLL)
	AML mit t(6;9)(p23;q34); (DEK-NUP214)
	AML mit inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); (RPN1-EVI1)
	AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13;q13); (RBM15-MKL1)
	(vorläufig) AML mit mutiertem NPM1 (vorläufig) AML mit mutiertem CEBP α
AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen	AML mit vorangegangenem MDS
	AML ohne vorangegangenes MDS
Therapieassoziierte myeloische Neoplasie	t-AML/t-MDS
	t-AML/t-MDS/Myeloproliferative Neoplasie (MPN)
AML ohne weitere Spezifizierung	Minimal differenzierte AML
	AML ohne Ausreifung (M0)
	AML mit Ausreifung (M1)
	Akute myelomonozytäre Leukämie (M4)
	Akute monoblastische/monozytäre Leukämie (M5)
	Akute erythroide Leukämie (M6)
	Akute megakaryoblastische Leukämie (M7)
	Akute basophile Leukämie Akute Panmyelose mit Markfibrose
Myeloisches Sarkom, Chlorom	
Blastisch plasmozytoide Neoplasie der dendritischen Zellen	
AML unklarer Linienzugehörigkeit	Akute undifferenzierte AML
	Gemischt-phänotypische akute Leukämie
Myeloische Proliferation bei Down-Syndrom	Transient abnorme Myelopoese AML assoziiert mit Down-Syndrom (insb. mit GATA1-Mutationen)

Tabelle modifiziert nach (Swerdlow *et al.*, 2008; Vardiman *et al.*, 2009).

Die ersten drei Kategorien tragen der prognostischen Bedeutung einiger Faktoren für den Verlauf des leukämischen Prozesses, den Therapieerfolg und damit für die Überlebensdauer Rechnung. AML mit den rekurrenten zytogenetischen Aberrationen t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22) und die akute Promyelozyten-Leukämie (APL) mit t(15;17)(q22;q12) treten überwiegend bei Patienten jüngeren Alters auf und sind als prognostisch günstig zu bewerten. Bei Vorliegen dieser distinkten zytogenetischen Aberrationen sowie distinkter Fälle einer Erythroleukämie ist die Diagnose AML unabhängig vom Blastenanteil in KM oder pB, also auch bei

einem Blastenanteil $\leq 20\%$, zu stellen (Vardiman *et al.*, 2009; Döhner *et al.*, 2009). Auch die zytogenetischen Befunde einer $t(6;9)(p23;q34)$, $inv3(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2)$ und $t(1;22)(p13;q13)$ sind mit charakteristischen morphologischen und klinischen Erscheinungen assoziiert, wenngleich sie eher selten sind (Vardiman *et al.*, 2009).

Dagegen treten AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen gehäuft bei älteren Patienten auf und zeigen regelmäßig ein prognostisch ungünstiges zytogenetisches Profil sowie eine ungünstige Therapieantwort. Eine AML dieser Kategorie liegt vor, wenn sie aus einem vorbestehenden MDS oder einer myeloproliferativen Neoplasie (MPN) entsteht, spezifische Myelodysplasie-assoziierte zytogenetische Veränderungen vorliegen oder mindestens 50% der Zellen aus zwei oder mehr myeloischen Zellreihen Dysplasiezeichen zeigen. Fälle therapieassoziiierter myeloischer Neoplasien haben alle, abgesehen vom Blastenanteil, eine ähnliche pathophysiologische und genetische Grundlage. Patienten mit myeloischen Neoplasien dieser Kategorie zeigen klinisch einen signifikant schlechteren Verlauf im Vergleich zur *de novo* AML mit den gleichen genetischen Aberrationen. Eine Unterscheidung nach auslösendem Agens (Alkylanzien vs. Topoisomerase-II-Inhibitoren) wird nicht mehr empfohlen. Die Kategorie der AML ohne weitere Spezifizierung umfasst Fälle, die kein Kriterium der anderen WHO-Subgruppen erfüllen und gründet vornehmlich auf den morphologischen Kriterien der FAB-Klassifikation (Vardiman *et al.*, 2009).

1.3.4 Epidemiologie, Ätiologie und Risikofaktoren

Weltweit liegt die Inzidenz der AML bei ungefähr 3,7 Fällen pro 100.000 Einwohner im Jahr. Die weltweit höchsten Inzidenzraten finden sich in den USA, Australien und Westeuropa. Sie ist seit Jahren stabil und zeigt zwei Höhepunkte, im frühen Kindes- und im höheren Erwachsenenalter. Mit einem Anteil von 70% der Fälle ist die AML die mit Abstand häufigste maligne hämatologische Erkrankung im Erwachsenenalter, die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist hingegen vorwiegend eine Erkrankung des Kindesalters. Die Inzidenz der AML ist altersspezifisch und steigt mit zunehmendem Alter deutlich an von jährlich 2,4:100.000 Einwohner im Alter von unter 60 Jahren auf jährlich 12,6:100.000 Einwohner im Alter von 65 Jahren und darüber (Löwenberg *et al.*, 1999). Das mittlere Erkrankungsalter der AML liegt bei 70 Jahren, das Geschlechterverhältnis zwischen Männern und Frauen beträgt 1,5:1. Unter den Leukämien zeigen Patienten mit AML die geringsten Überlebensraten. Obwohl sich die

Raten bei jungen Erwachsenen deutlich verbesserten, gilt die Prognose für ältere Erwachsene weiterhin als sehr schlecht. Die Mortalität steigt mit zunehmendem Alter von 2,7 auf maximal 18 Todesfälle pro 100.000 Einwohner im Jahr (Deschler & Lübbert, 2006). Prognostische Faktoren lassen sich unterscheiden in Patientencharakteristika und den allgemeinen Gesundheitszustand sowie charakteristische molekulare Veränderungen des leukämischen Zellklons (Döhner *et al.*, 2009).

Ätiologisch lassen sich insgesamt drei Gruppen unterscheiden: Die primäre oder *de novo* AML, die aus einem vorbestehenden MDS hervorgegangene s-AML und die therapieassoziierten Fälle (t-AML) nach zytotoxischer Chemotherapie, insb. mit Alkylanzien oder Topoisomerase-II-Inhibitoren. Als mögliche auslösende Umweltfaktoren gelten ionisierende Strahlung und Benzenexposition (Löwenberg *et al.*, 1999; Estey & Döhner, 2006). Es lassen sich jedoch nur 1-2% aller AML-Fälle auf solche genotoxischen Einflüsse zurückführen. Auch das Vorliegen kongenitaler Störungen der Hämatopoese birgt ein erhöhtes AML-Risiko, so z.B. die Fanconi-Anämie oder die Trisomie 21 (Swerdlow *et al.*, 2008).

1.3.5 Klinik

Die klinischen Zeichen und Symptome der AML sind generell variabel und unspezifisch, stehen jedoch regelmäßig in direktem Zusammenhang mit einer leukämischen Infiltration des KM und der daraus resultierenden Zytopenie durch zunehmende hämatopoetische Insuffizienz. Diese ist gleichzeitig die häufigste Todesursache bei AML-Patienten (Estey & Döhner, 2006). Als Folge des Mangels an Erythrozyten, Thrombozyten und/oder neutrophilen Granulozyten leiden Patienten mit AML sehr häufig unter Müdigkeit und Blässe, Blutungsneigung, Infektionen und Fieber. Weitere Symptome beruhen auf einer im Erwachsenenalter eher selten auftretenden leukämischen Infiltration anderer Gewebe, wie z.B. Leber, Milz, Lymphknoten, Gingiva, Haut oder ZNS. Eine Leukozytose von mehr als 100.000/ μ l kann eine Leukostase mit der Gefahr von retinalen und zerebralen Einblutungen, Hypoxie und selten arteriellen Okklusionen induzieren (Löwenberg *et al.*, 1999).

1.3.6 Diagnostik

Teil der Basisdiagnostik sind Differentialblutbild sowie die Bestimmung von Retikulozytenzahl, Laktatdehydrogenase (LDH) und C-reaktivem Protein (CRP). Der

Nachweis einer pathologischen Vermehrung blastärer Zellen im KM ist die Hauptvoraussetzung, um die Diagnose AML zu verifizieren. Wichtig ist vor allem auch die Abgrenzung zu ALL und MDS wegen der prognostischen Bedeutung und der resultierenden Unterschiede in der jeweiligen Therapiestrategie. Die Diagnostik bei Verdacht auf AML basiert auf der Untersuchung von pB, KM-Aspirat und -Stanzbiopsien zur sicheren Zuordnung blastärer Zellen zur entsprechenden hämatopoetischen Reihe. Die AML zeigt aufgrund ihrer Heterogenität ein großes Spektrum morphologischer, immunphänotypischer, zyto- und molekulargenetischer Veränderungen. Wegweisend für die Subtypisierung sind daher die lichtmikroskopische Beurteilung der Zytomorphologie in der Färbung nach Pappenheim, die durchflusszytometrische Immunphänotypisierung, der zytochemische Nachweis der Aktivität der Myeloperoxidase (POX) und der nicht-spezifischen Esterase (NSE) sowie zyto- und molekulargenetische Untersuchungen zum Nachweis bestimmter genetischer Aberrationen des malignen Zellklons. Zudem sollte bei Patienten, für die eine allogene Stammzell- (SZT) oder Knochenmarktransplantation (KMT) in Frage kommt, eine frühzeitige Blutgruppenbestimmung, Virusserologie und HLA-Typisierung erfolgen (Jaffe *et al.*, 2001).

1.3.6.1 Immunphänotypisierung

Die Immunphänotypisierung ist für die Bestimmung der hämatopoetischen Linienzugehörigkeit, die Unterscheidung zwischen minimal differenzierter AML und akuter lymphatischer Leukämie (ALL), die Erkennung einer akuten megakaryozytären Leukämie und weiterhin zur Differenzierung zwischen B- und T-Zell-ALL von zentraler Bedeutung (Cheson *et al.*, 2003). Außerdem finden sich in der WHO-Klassifikation der AML verschiedene Subtypen, welche durch einen spezifischen Immunphänotyp charakterisiert sind. Für weitere Details wird an dieser Stelle auf die ausführliche Beschreibung der verschiedenen AML-Subtypen in der derzeit gültigen WHO-Klassifikation verwiesen (Swerdlow *et al.*, 2008). Die durchflusszytometrische Immunphänotypisierung von Patientenproben erlaubt ein zügiges Screening auf hämatologische Neoplasien und spielt hierbei eine Schlüsselrolle für Diagnostik und Klassifikation. Ausreifungsgestörte myeloische oder monozytäre Zellen zeigen stets aberrante Antigenexpressionsmuster oder abnorme Expressionsraten auch physiologisch exprimierter Antigene (Craig & Foon, 2008). Tab. 1.3.3 zeigt typische Marker für die Klassifikation akuter Leukosen.

Tab. 1.3.3 Panel monoklonaler Antikörper zur Klassifikation akuter Leukämien

Zellreihe	Zielantigene
Hämatopoetische Vorläuferzellen	CD34, HLA-DR, TdT, CD45
B-Zellreihe	CD19, CD20, CD22, CD79a
T-Zellreihe	CD2, CD3, CD5, CD7
Myeloische Zellreihe	CD13, CD33, CD15, MPO, CD117
Megakaryoblastische Reihe	CD41, CD61

Tabelle modifiziert nach (Jaffe *et al.*, 2001).

Zudem gibt es seltene Fälle akuter undifferenzierter Leukämien und solche, die Marker von mehr als einer Zellreihe exprimieren oder Blastenpopulationen unterschiedlicher Zellreihen besitzen. BCR-ABL1-positive Leukämien sollten diesbzgl. als ALL charakterisiert oder differentialdiagnostisch von einer CML in Blastenkrise abgegrenzt und zusätzlich mit Tyrosinkinase-Inhibitoren therapiert werden (Döhner *et al.*, 2009).

1.3.6.2 Zytogenetik

Die zytogenetische Diagnostik ist bei Patienten mit AML obligat, denn der zytogenetische Befund ist einer der wichtigsten Prädiktoren für Therapieansprechen und Gesamtüberleben bei AML (Grimwade *et al.*, 1998; Döhner *et al.*, 2009). Der Nachweis genetischer Aberrationen in der blastären Zellpopulation mittels konventioneller Zytogenetik oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) bildet die Grundlage der WHO-Klassifikation und ist von großer prädiktiver Bedeutung hinsichtlich der Prognose und des Ansprechens auf Therapie im Vergleich zwischen Patienten mit und ohne zytogenetische Aberrationen. Die prognostische Bedeutung bezieht sich auf das Ansprechen auf die Induktionstherapie, das Rezidivrisiko und das Gesamtüberleben. 48% aller Fälle von AML zeigen keine zytogenetischen Auffälligkeiten, 52% haben dagegen mindestens eine karyotypische Aberration. Es werden drei zytogenetisch definierte Risikogruppen unterschieden, die ebenso auf Fälle von *de novo* AML wie auf Fälle von s-AML anwendbar und für alle Altersklassen gültig sind (Grimwade *et al.*, 1998; Grimwade *et al.*, 2001). Tabelle 1.3.4 zeigt die Assoziation verschiedener zytogenetischer Aberrationen mit dem jeweiligen Risikoprofil.

Tab. 1.3.4 Risikogruppen nach zytogenetischem Befund

Risikogruppe	Karyotyp	Anteil	4-JÜR
Günstig	t(8;21), t(15;17), inv(16)/t(16;16)	7%	≥70%
intermediär	11q23-Alterationen, +8, +21, +22, del(9q), del(7q), t(9;11) nicht anders klassifiziert (inkl. normaler Karyotyp)	73%	40-50%
ungünstig	komplexer Karyotyp*, del(5q), -5, -7, 3q-Alterationen, inv(3)/t(3;3), t(6;9), t(v;11)	20%	≤20%

* ≥ 3 zytogenetische Aberrationen. 4-JÜR = 4-Jahres-Überlebensrate.

Tabelle modifiziert nach (Grimwade *et al.*, 1998; Grimwade *et al.*, 2001; Löwenberg *et al.*, 2003; Döhner *et al.*, 2009).

Bei Patienten mit prognostisch günstigem Karyotyp hat das zusätzliche Auftreten anderer Alterationen keinen negativen Einfluss auf die günstige Prognose (Grimwade *et al.*, 1998; Byrd *et al.*, 2002). Ausnahme sind *KIT*-Mutationen bei den sog. *Core binding factor* (CBF)-AML mit t(8;21) oder inv(16), die deutlich negativen Einfluss auf die sonst vergleichsweise gute Prognose haben (Vardiman *et al.*, 2009).

Mit zunehmendem Alter steigt die Inzidenz des normalen und des ungünstigen Karyotyps -5/-7, die balancierter Translokationen aber nicht (Estey & Döhner, 2006). Zusätzlich treten ab einem Alter von 60 Jahren und älter prognostisch ungünstige Aberrationen oftmals kombiniert als Teil eines komplexen Karyotyps auf (Grimwade *et al.*, 2001). Ein komplexer Karyotyp ist definiert durch das Vorliegen von ≥ 3 zytogenetischen Aberrationen ohne den Nachweis eines günstigen Karyotyps (Döhner *et al.*, 2009). Diese Risikostratifizierung erlaubt eine risikoadaptierte Behandlung. Durch Vermeidung einer Über- oder Untertherapie wird so die therapieassoziierte Toxizität auf das notwendige Maß beschränkt (Döhner *et al.*, 2005).

1.3.6.3 Molekulargenetik

Neben den beschriebenen zytogenetischen Aberrationen erlauben bestimmte molekulargenetische Alterationen eine genetische Risikostratifizierung auch bei AML mit unauffälligem Karyotyp (*Cytogenetically normal* AML, CN-AML) und sind damit von großem prognostischem Wert (Vardiman *et al.*, 2009). 40-50% aller Patienten mit AML haben eine CN-AML und gehören damit der intermediären Risikogruppe an, jedoch zeigen mindestens 80% dieser Patienten molekulargenetische Veränderungen (s. hierzu Tab. 1.3.5) (Byrd *et al.*, 2002; Döhner *et al.*, 2005).

Tab. 1.3.5 Molekulargenetische Aberrationen bei AML mit normalem Karyotyp

Gen	Genlokus	Risikoprofil	Häufigkeit	Autor
<i>NPM1</i>	5q35	Günstig	50-60%	Thiede <i>et al.</i> , 2006
<i>CEBPA</i>	19q13.1	Günstig	15%	Preudhomme <i>et al.</i> , 2002
<i>FLT3</i> -TKD	13q12	Unbekannt	11%	Kiyoi <i>et al.</i> , 1999
<i>FLT3</i> -ITD	13q12	Ungünstig	30-40%	Kiyoi <i>et al.</i> , 1999
<i>WT1</i>	11p13	Ungünstig	10%	Paschka <i>et al.</i> , 2008
<i>MLL</i> -PTD	11q23	Ungünstig	7%	Döhner <i>et al.</i> , 2002
<i>IDH1</i>	2q33.3	Ungünstig*	8%	Paschka <i>et al.</i> , 2010
<i>IDH2</i>	15q26.1	Unbekannt	9%	Paschka <i>et al.</i> , 2010
<i>TET2</i>	4q24	Ungünstig*	23%	Metzeler <i>et al.</i> , 2011
<i>N-RAS</i>	1p13.2	Ungünstig	13%	Kiyoi <i>et al.</i> , 1999
<i>MLL5</i> -Überexpression	7q22	Günstig	n.a.	Damm <i>et al.</i> , 2011
<i>EVI1</i> -Überexpression	3q24-q28	Ungünstig	4%	Lugthart <i>et al.</i> , 2008
<i>BAALC</i> -Überexpression	8q22.3	Ungünstig	66%	Baldus <i>et al.</i> , 2003
<i>ERG</i> -Überexpression	21q22.3	Ungünstig	n.a.	Marcucci <i>et al.</i> , 2007

* Ungünstiges Risiko bei gleichzeitigem Vorliegen einer *NPM1*-Mutation (*IDH1*) bzw. *NPM1*- oder *CEBPA*-Mutation (*TET2*) ohne gleichzeitige *FLT3*-ITD. n.a. = nicht angegeben.

Die große molekulare Heterogenität dieser Gruppe erfordert eine Identifikation und Bewertung molekularer Veränderungen hinsichtlich ihrer prognostischen Bedeutung und eine entsprechende Anpassung der Therapiestrategie (Löwenberg, 2008; Lugthart *et al.*, 2008). Oft treten spezifische Mutationen im *Nucleophosmin*- (*NPM1*), *fms related tyrosine kinase 3*- (*FLT3*), *CCAAT/enhancer binding protein α* - (*CEBP α*), *mixed leukemia lymphoma*- (*MLL*) oder *Wilms' Tumor 1*- (*WT1*)-Gen solitär oder in Kombination bei CN-AML auf, wo sie als unabhängige Risikofaktoren unterschiedliche prognostische Relevanz besitzen (Schlenk *et al.*, 2008; Paschka *et al.*, 2008). Ebenso stellen die Expressionsraten des *Brain and leukemia, cytoplasmic*- (*BAALC*), des *ecotropic virus integration-1*-Gens (*EVII*) und des *ETS-related gene* (*ERG*) unabhängige Risikofaktoren bei CN-AML dar (Marcucci *et al.*, 2007; Paschka *et al.*, 2008; Schlenk *et al.*, 2008). Abbildung 1.3.2 gibt einen Überblick über die Häufigkeiten distinkter molekulargenetischer Veränderungen bei CN-AML.

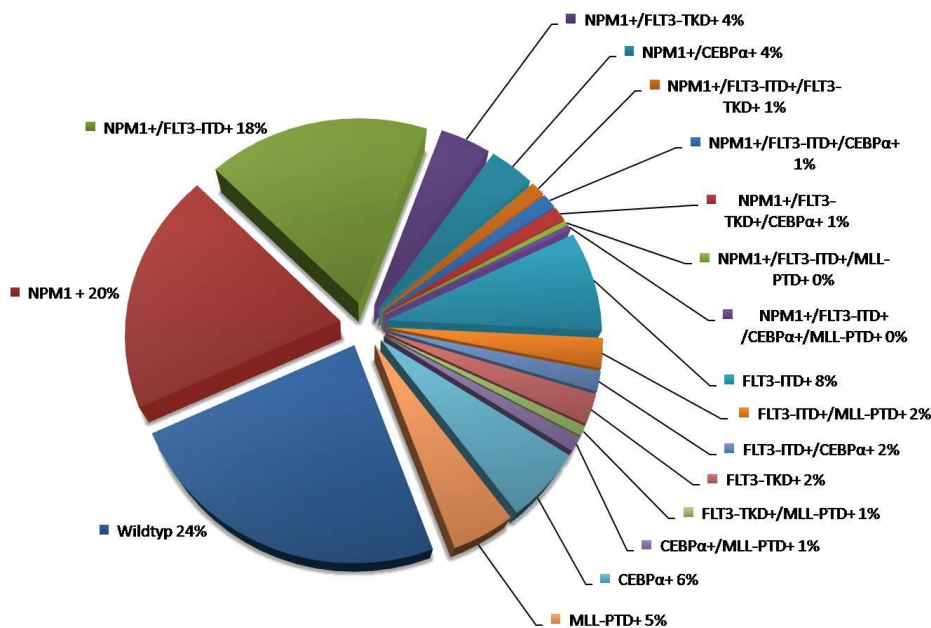


Abb. 1.3.2 Häufigkeit molekularer Alterationen im *NPM1*- und *CEBP α* -Gen, *FLT3*-ITD, *FLT3*-TKD und *MLL*-PTD bei CN-AML. Abbildung modifiziert nach (Döhner *et al.*, 2005; Mrózek *et al.*, 2007).

Ein positiver Mutationsstatus für *NPM1* (*NPM1^{mut}*) ohne gleichzeitige *FLT3*-internal tandem duplication (*FLT3*-ITD) und für *CEBP α* (*CEBP α ^{mut}*) ist als prognostisch günstig zu bewerten. Remissionsdauer, Gesamtüberleben und Therapieansprechen sind vergleichbar mit den prognostisch günstigen CBF-Leukämien mit t(8;21) oder inv(16). Eine *FLT3*-ITD hat ebenso wie das Vorliegen einer *MLL*-partial tandem duplication (*MLL*-PTD) und einer *WT1*-Mutation dagegen prognostisch negative Auswirkungen mit

verkürztem rezidivfreien und Gesamtüberleben (Schlenk *et al.*, 2008; Paschka *et al.*, 2008). Die Bedeutung von Punktmutation im *FLT3*-Gen (*FLT3*-TKD) wird kontrovers beschrieben und bleibt weiterhin zu klären. Interessant ist außerdem, dass *NPM1*^{mut} häufig mit einer *FLT3*-ITD assoziiert ist (Döhner *et al.*, 2005). Auffällig ist jedoch, dass in diesem Falle immer nur eine bestimmte *NPM1*-Mutation vorliegt. Daher ist die *NPM1*-Mutation möglicherweise ein früher Schritt der Leukämogenese, der einer *FLT3*-ITD vorausgeht (Thiede *et al.*, 2006).

Es zeigt sich, dass die funktionelle Bedeutung mehrerer molekularer Aberrationen auf einer genetisch bedingten Alteration epigenetischer Mechanismen beruht. Mutationen im *Isocitrat dehydrogenase 1-* (*IDH1*) und *-2-*Gen (*IDH2*) bedingen z.B. eine neuartige Enzymfunktion mit Katalyse der Konversion von α -Ketoglutarat (α KG) zu *2-Hydroxyglutarat* (2HG). Eine zelluläre 2HG-Synthese korreliert wiederum positiv mit dem m⁵C-Gehalt des Genoms und induziert eine globale DNA-Hypermethylierung (Figuerao *et al.*, 2010b). *IDH1/2*-Mutationen treten häufig bei AML mit intermediärem Risikoprofil, aber auch bei verschiedenen Gliomen, jedoch niemals gemeinsam auf. Eine *IDH1*-Mutation ist ein Prädiktor eines ungünstigen Verlaufs bei CN-AML mit nachweisbarer *NPM1*^{mut} ohne *FLT3*-ITD, hat interessanterweise jedoch günstigen Einfluss auf das Rezidivrisiko bei *FLT3*-ITD-positiver CN-AML, aber auch auf den Verlauf von Gliomen (WHO °II-IV) (Sanson *et al.*, 2009; Green *et al.*, 2010; Paschka *et al.*, 2010). Eine Mutation des *Tet oncogene family member 2*-Gens (*TET2*), welches für die DNA-Demethylase TET2 kodiert, induziert ein charakteristisches Genexpressionsmuster bei CN-AML mit *NPM1*^{mut} ohne *FLT3*-ITD oder mit *CEBP α* ^{mut} und hat prognostisch ungünstige Auswirkungen bei diesen eigentlich günstigen molekularen Markerkonstellationen (Metzeler *et al.*, 2011). TET2 ist ein α KG-abhängiges Enzym, welches die Konversion von m⁵C zu *5-Hydroxy-methylcytosin* (hm⁵C) katalysiert und darüber eine Demethylierung der DNA induziert. *TET2*-Mutationen treten zudem i.d.R. nicht kombiniert mit *IDH1/2*-Mutationen auf, haben jedoch ähnliche epigenetische Effekte mit Alterationen im m⁵C-Profil des Genoms hämatopoetischer Zellen, da die *IDH1/2*-Mutanten die physiologische Funktion von TET2 inhibieren. *IDH1*-, *IDH2*- und *TET2*-Mutationen induzieren so jeweils eine Störung der Hämatopoese sowie eine vermehrte Expression zellulärer Stammzellmarker und haben daher möglicherweise einen leukämogenen Effekt (Figuerao *et al.*, 2010b).

Außerdem haben eine Überexpression des *BAALC*-, des *EVII*- und des *ERG*-Gens prognostisch negative Auswirkungen (Baldus *et al.*, 2003; Lugthart *et al.*, 2008).

Niedrige Expressionsraten von *BAALC* und *ERG* gehen einher mit einer Expression funktionell günstiger Gen- und miRNA-Profile und einer Suppression der DNA-Methylierungsmaschinerie (Schwind *et al.*, 2010). *EVI1* interagiert mit DNMT3a und DNMT3b und induziert bei Überexpression ein distinktes, prognostisch ungünstiges DNA-Methylierungsmuster durch spezifische *EVI1*-Bindungssequenzen in den hypermethylierten Genregionen (Lugthart *et al.*, 2011). Eine Überexpression der HMT *Human mixed lineage leukemia 5* (*MLL5*) bedingt bei CN-AML und bei CBF-Leukämien einen Überlebensvorteil. *MLL5* bindet an den Retinolsäure-Rezeptor α (*RAR α*) und induziert so die Transkription einer Vielzahl der *RAR α* -Zielgene durch den epigenetischen Mechanismus einer Methylierung der Lysinreste des Histons H3 (Damm *et al.*, 2011). Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass auch somatische Mutationen im *DNMT3A*-Gen, welches für die o.g. DNA-Methyltransferase DNMT3a kodiert, mit einer Gesamthäufigkeit von 18% bei AML, vornehmlich bei jüngeren Patienten mit CN-AML (27% der Fälle) und in Kombination mit *NPM1*- und *CEBP α* -Genmutationen oder einer *FLT3*-ITD, auftreten. Eine *DNMT3A*-Mutation hat negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben, jedoch interessanterweise keinen Einfluss auf den m^5C -Gehalt der DNA, das genomische Methylierungsmuster, die Genexpressionsrate oder die genomische Stabilität (Ley *et al.*, 2010; Thol *et al.*, 2011).

Es bleibt jedoch zu klären, wie sich das gleichzeitige Auftreten multipler Mutationen und/oder Genexpressionsmuster mit gegensätzlicher prognostischer Bedeutung auf die Gesamtprognose auswirkt (Mrózek *et al.*, 2007).

1.3.7 Therapie

1.3.7.1 Aktuelle Therapiestrategien bei AML

Wichtigstes Therapieziel bei AML ist das Erreichen einer Komplettremission (CR) als Hauptvoraussetzung für eine Heilung der Erkrankung. Als CR gilt eine Reduktion des Blastenanteils auf <5% im KM, das Fehlen von Auer-Stäbchen, sowie eine Regeneration der normalen Hämatopoese mit mindestens 1×10^9 neutrophilen Granulozyten/l und 100×10^9 Thrombozyten/l im peripheren Blutbild (Cheson *et al.*, 2003). Grundlagen der Therapie sind die Polychemotherapie und die allogene Stammzelltransplantation (SZT).

Die chemotherapeutische Behandlung der AML gliedert sich in zwei Phasen: Die Induktions- und die Konsolidierungsphase. Standardmäßig erfolgt die Induktion zweimalig nach dem „3+7“-Schema mit einer Kombination eines Anthrazyklins

(*Idarubicin* oder *Daunorubicin*) für drei Tage mit *Cytosin-Arabinosid* (Ara-C) als kontinuierliche Infusion über sieben Tage. Hierunter erreichen 50-75% aller Patienten eine CR (Tallman *et al.*, 2005). Wird eine CR erreicht, folgt die Konsolidierungs- oder Postremissionstherapie zur Eradikation verbliebener leukämischer Blasten, der *Minimal residual disease* (MRD). Grund für das häufig nur kurzzeitige Bestehen einer CR kann eine nur unzureichende Wirkung der Standardtherapie gegen die oftmals chemoresistenten LSCs sein (Bonnet, 2005). Zur Konsolidierung bestehen die Optionen einer intensivierten Chemotherapie oder einer autologen oder allogenen SZT nach hochdosierter zytotoxischer Konditionierung (Löwenberg *et al.*, 2003). Die allogene SZT besitzt das größte antileukämische Potential mit den geringsten Rezidivraten durch den *Graft-versus-Leukemia*-Effekt, ist jedoch gleichzeitig mit einer hohen therapieassoziierten Morbidität und Mortalität (10-25%) und einer deutlich verminderten Lebensqualität assoziiert (Tallman *et al.*, 2005). Jüngere Patienten mit günstigem Risikoprofil profitieren von einer alleinigen Chemotherapie. Für Patienten der Hochrisikogruppe ist derzeit die allogene SZT von einem HLA-kompatiblen Familienspender nach myeloablativer Konditionierung die einzig kurative Therapieoption (Estey & Döhner, 2006).

In der heterogenen intermediären Risikogruppe sind molekulare Marker für die Therapieentscheidung von wachsender Bedeutung. So zeigen Patienten mit Mutationen im *CEBP α* -Gen oder im *NPM1*-Gen ohne gleichzeitige *FLT3*-ITD ähnlich günstige Verläufe wie CBF-Leukämien, weshalb in diesen Fällen eine allogene SZT nicht die Therapie der ersten Wahl ist (Schlenk *et al.*, 2008). Hingegen profitieren Patienten mit CN-AML mit prognostisch ungünstiger *FLT3*-ITD möglicherweise von einer allogenen SZT in der ersten Remission (Bornhäuser *et al.*, 2007).

Die Therapie erfolgt stets risikoadaptiert im Rahmen klinischer Studien. Bedeutenden Einfluss auf die Therapieantwort haben mehrere Faktoren: Alter, Allgemeinzustand (AZ), sowie Ätiologie (*de novo* vs. s-AML/t-AML), Zyto- und Molekulargenetik der AML sowie die Expression des *Multi drug resistance (MDR1)*-Gens mit vermehrter Chemoresistenz (Schaich *et al.*, 2005; Estey & Döhner, 2006; Löwenberg, 2008).

75% aller AML-Patienten sind älter als 60 Jahre und stellen eine therapeutische Herausforderung dar, da sich sowohl die Biologie der AML, als auch der Gesundheitszustand mit zunehmendem Alter ändert. Ältere AML-Patienten zeigen häufig multiple zyto- und molekulargenetische Aberrationen kombiniert mit

Begleiterkrankungen, reduziertem AZ und eingeschränkten Organfunktionen (Appelbaum *et al.*, 2006). Dies bedingt eine verminderte Toleranz gegenüber zytotoxischer Chemotherapie, denn durch ein vermehrtes Auftreten verschiedener ungünstiger Krankheitsfaktoren leiden ältere Menschen viel häufiger unter therapieassoziierter Morbidität und Mortalität und bedürfen daher spezifischerer, weniger toxischer Therapieregime (Löwenberg *et al.*, 1999; Appelbaum *et al.*, 2006). Obwohl eine AML ein onkologischer Notfall ist, ist es bei älteren Patienten vertretbar erst bei Kenntnis von Zyto- und Molekulargenetik eine entsprechend spezifischere, weniger toxische, risikoadaptierte Therapie einzuleiten. Bei jüngeren Patienten unter 60 Jahren hingegen sollte umgehend nach aktuellem Standard behandelt werden, um nicht die Chance auf das Erreichen einer CR zu mindern. Retrospektiv erhobene Daten weisen auf ein schlechteres Therapieergebnis bei Verzögerung des Therapiestarts um mehr als fünf Tage nach Diagnosestellung hin (Sekeres *et al.*, 2009).

1.3.7.2 Neue zielgerichtete Therapieansätze

Die Entdeckung molekularer Anomalien ermöglicht, unabhängig vom zytogenetischen Befund, die Entwicklung neuer Arzneimittel, welche zielgerichtet und selektiv in die pathophysiologischen Prozesse eingreifen (Karp, 2008). Dies wiederum wird zukünftig eine individuelle, krankheitsspezifische Therapie ermöglichen, wodurch die unter der ungerichteten Standardtherapie auftretenden toxischen Nebenwirkungen reduziert werden können. Die bislang größten Erfolge in der Entwicklung zielgerichteter Therapien sind der Einsatz von ATRA bei APL, des Tyrosinkinase-Inhibitors *Imatinib* (Glivec[®]) bei CML und des Thalidomid-Analogons *Lenalidomid* bei *low-risk* MDS mit 5q⁻-Syndrom (Lübbert *et al.*, 2008).

Die APL mit t(15;17) und Expression des Fusionsgens PML-RAR α ermöglicht den Einsatz des molekular zielgerichteten Vitamin A-Derivats *all-trans Retinsäure* (ATRA), zusätzlich zur konventionellen Chemotherapie, welches eine vollständige Ausdifferenzierung der leukämischen Promyelozyten induziert (Tallman *et al.*, 2005). ATRA und *Arsentrioxid* sind neue, gegen PML-RAR α gerichtete Wirkstoffe. Seither ist die APL der AML-Subtyp mit den besten Heilungsaussichten. 80-85% der Patienten können dauerhaft geheilt werden (Tallman, 2008). Neue Studienergebnisse zeigen eine sehr vielversprechende Wirksamkeit bei günstigem Nebenwirkungsprofil von *Arsentrioxid* nicht nur im Rezidiv, sondern auch monotherapeutisch in der

Erstlinientherapie einer APL (Ghavamzadeh *et al.*, 2011). Tabelle 1.3.6 gibt einen Überblick über aktuelle zielgerichtete Therapieansätze und deren Zielstrukturen.

Tab. 1.3.6 Substanzklassen, Wirkstoffe und Zielstrukturen der *molecular targeted* Therapien

Wirkung/Substanzklasse	Wirkstoffname	Zielstruktur
Ausdifferenzierung	ATRA	PML-RAR α
Ausdifferenzierung & Apoptose	Arsentrioxid	PML-RAR α , H ₂ O ₂ , Glutathion
Antiangiogenese	Bevacizumab, Semaxinib	VEGF
monoklonale Antikörper	Gemtuzumab-Ozogamicin, Lintuzumab	CD33-Antigen
Farnesyltransferase-Inhibition	Tipifarnib	KIT, Farnesyl-Protein-Transferase
FLT3-Tyrosinkinase-Inhibition	Midostaurin, Lestaurtinib	FLT3-ITD
MDR-Modulatoren	Zosuquidar	p-Glykoprotein
Immunmodulation	Lenalidomid	del(5q)-Zellklon
Apoptose-Induktion	Oblimersen Natrium	Bcl-2-mRNA
Apoptose-Induktion	Parthenolid LC-1	NF- κ B
Histondeacetylierung	Valproat, SAHA, Trichostatin	HDACs
DNA-Demethylierung	AZA, DAC	DNMTs

Tabelle modifiziert nach (Tallman *et al.*, 2005; Tallman, 2008; Larson *et al.*, 2002; Lübbert *et al.*, 2008).

Die Hemmung des *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) unterbindet dessen wachstums- und proliferationsfördernde Wirkung auf leukämische Zellen und die Induktion vermehrter Mikrovaskularisation des Knochenmarks. *Bevacizumab* ist ein Antikörper, der direkt gegen VEGF gerichtet ist, *Semaxinib* (SU5416) wirkt dagegen als Hemmstoff der Tyrosin-Kinase-Aktivität von VEGF-Rezeptoren (Fiedler *et al.*, 2003).

Therapieansätze mit unkonjugierten oder konjugierten monoklonalen Antikörpern richten sich gegen verschiedene Oberflächenantigene, wie z.B. CD33, das teilweise von leukämischen Zellen aber auch von normalen hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert wird. *Gemtuzumab Ozogamicin* (CMA-676, Mylotarg[®]) ist ein humanisiertes Anti-CD33-Immunglobulin, an welches das hochpotente Chemotherapeutikum *Calicheamicin* gekoppelt ist. *Calicheamicin* führt so in CD33-positiven Zellen zu DNA-Doppelstrangbrüchen und damit zur Apoptose, was nebenbei oft auch zu hochgradiger Neutropenie und Thrombozytopenie führt (Larson *et al.*, 2002). Mylotarg[®] war bis Juni 2010 von der FDA beim AML-Rezidiv des älteren Patienten zugelassen. Die Zulassung wurde aber wegen fehlender Wirksamkeit zurückgezogen.

Farnesyltransferase-Inhibitoren, wie z.B. *Tipifarnib*, sind selektive Hemmstoffe der Farnesylierung intrazellulärer Signalproteine, wie z.B. RAS, MAPK oder Lamin A, und hemmen darüber das Tumorwachstum bei einer Vielzahl von Malignomen (Lancet & Karp, 2003). *Tipifarnib* wurde in klinischen Studien bereits erfolgreich in Kombination mit konventioneller Chemotherapie bei AML der Hochrisiko-Gruppe mit

abnormen Veränderungen an Chromosom 5 und 7, vorzugsweise Patienten mit s-AML oder t-AML, eingesetzt (Gore, 2008; Karp, 2008).

Die medikamentöse Blockade pathologisch aktivierter Signalwege ist Ziel des Einsatzes selektiver FLT3- und KIT-Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren wie *Midostaurin* (PKC412) (gleichzeitig ein VEGF-Rezeptor-Inhibitor) und *Lestaurtinib* (CEP701). Die Substanzen werden als Teil einer Kombinationstherapie mit anderen Chemotherapeutika eingesetzt und sind sowohl bei AML mit *FLT3*-ITD, als auch mit *FLT3*/wt moderat antiproliferativ wirksam (Gore, 2008).

Zosuquidar (LY335979) ist ein hochpotenter Hemmstoff des MDR-induzierenden p-Glykoproteins, welcher chemotherapieresistente Zellen resensibilisiert und kombiniert mit üblichen Chemotherapeutika appliziert werden kann (Sandler *et al.*, 2004).

Lenalidomid (CC5013, Revlimid®), ein *Thalidomid*-Analogon der 2. Generation mit immunmodulierender, proapoptotischer und antiangiogenetischer Wirkung, zeigt sehr gute Wirkung bei *low-risk* MDS mit del(5q). Es induziert zytogenetische Remissionen und die Wiederherstellung einer normalen Erythropoese mit vermindertem Transfusionsbedarf bei gleichzeitig günstigem Nebenwirkungsprofil (List *et al.*, 2006). *Lenalidomid* ist von der FDA zur Behandlung des Multiplen Myeloms und bei *low risk* MDS zugelassen. Die Bedeutung in der Therapie von *high-risk* MDS und AML mit del(5q) ist noch unklar, jedoch zeigen sich erste klinische Erfolge in der Therapie bei AML mit prognostisch ungünstiger Trisomie 13 (Fehniger *et al.*, 2009).

B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) ist ein physiologischer Apoptose-Inhibitor, dessen Überexpression bei AML zu vermehrter Chemoresistenz führt. Der Einsatz des Oligonukleotids *Oblimersen Natrium* (G3139) in Kombination mit üblichen Chemotherapeutika führt zu einer verminderten Expression von Bcl-2 und erhöht so die Chemosensitivität der leukämischen Zellen (Marcucci *et al.*, 2003).

Häufig zeigt sich bei AML mit ungünstigem zytogenetischen Risikoprofil eine Überexpression des Apoptose-Inhibitors NF-κB. Das pflanzliche Parthenolid *LC-1* bewirkt bei AML eine direkte Inhibition der fünf bekannten humanen NF-κB-assoziierten Proteine und der durch NF-κB regulierten Zytokine. Die zytotoxische Wirkung von *LC-1* auf leukämische Blasten beruht auf der Aktivierung von *p53* und der konsekutiven Apoptoseinduktion (Jenkins *et al.*, 2008).

Es gibt also neben den bereits erwähnten epigenetischen Therapien eine Vielzahl molekular zielgerichteter Therapieoptionen bei vielen malignen Erkrankungen, so auch

bei AML. Tabelle 1.3.7 zeigt die aktuell in klinischer Erprobung befindlichen zielgerichteten Therapieansätze bei AML in Bezug auf verschiedene Subtypen.

Tab. 1.3.7 Molekular zielgerichtete Therapieansätze in klinischer Erprobung bei verschiedenen AML-Subtypen

Molekularer Marker	Therapie	Beispielsubstanzen
<i>FLT3</i> -Mutationen	FLT3-Inhibitoren +/- mTOR-Inhibitoren	Lestaurtinib, Midostaurin, MLN518 +/- Rapamycin
CBF-Leukämien	Epigenetische Therapien	Decitabine, SAHA
CBF mit <i>ckIT</i> -Mutationen	Tyrosinkinase-Inhibitoren	Imatinib, Dasatinib
<i>RAS</i> -Mutationen	Konventionelle Chemotherapie	Hochdosis Ara-C
<i>Bcl-2</i> -Überexpression	<i>Bcl-2</i> -Antisense-Nukleotide	Oblimersen Natrium
<i>MLL</i> -PTD / Wildtyp-Heterozygotie	Epigenetische Therapien	Decitabine, SAHA
PML-RAR α	Retinoide	ATRA

mTOR = *Mammalian target of rapamycin*. Tabelle modifiziert nach (Kolitz, 2006).

1.3.8 Minimale Resterkrankung

Die meisten Patienten, welche eine morphologische CR mit nicht mehr nachweisbaren zytogenetischen Veränderungen erreichen, sind nicht geheilt. Residuelle Blasten führen unweigerlich binnen weniger Wochen zum Rezidiv (Estey & Döhner, 2006). Die Kinetik des Rezidivs ist in Abhängigkeit von zugrundeliegenden molekularen Veränderungen sehr variabel (Ommen *et al.*, 2010). Die Detektion und die anschließende Einleitung gezielter Therapiemaßnahmen sind daher für den langfristigen Therapieerfolg von essentieller Bedeutung. Der Nachweis der MRD gelingt entweder über den Nachweis von Zellen eines aberranten Phänotyps mittels multidimensionaler Durchflusszytometrie (FACS) oder durch Detektion spezifischer zyto- und molekulargenetischer Marker, wie von mutierten oder aberrant überexprimierten Genen (z.B. *NPM1^{mut}*, überexprimiertes *WT1*) oder Fusionsgenprodukten (PML-RAR α , RUNX1-RUNX1T1, CBF β -MYH11) mittels RQ-PCR (Cheson *et al.*, 2003, Gorello *et al.*, 2006; Ommen *et al.*, 2010). *NPM1^{mut}* ist eine pathogenetisch früh auftretende Aberration und erlaubt daher ein sensitives MRD-Monitoring mit frühzeitigem Nachweis eines Therapieversagens oder Rezidivs (Schnittger *et al.*, 2009). So ist ein positiver Nachweis des *NPM1^{mut}*-Transkriptes nach Doppelinduktion oder nach Abschluss der Konsolidierung ein signifikanter Risikofaktor für ein Rezidiv und ein AML-assoziiertes Versterben (Krönke *et al.*, 2011). Ferner zeigt z.B. der Nachweis einer bei AML häufig zu findenden *WT1*-Überexpression zum Ende der Konsolidierung ein hohes Rezidivrisiko an. Insofern erlaubt ein frühes MRD-Screening eine weitere Risikostratifizierung und die frühzeitige Detektion eines AML-Rezidivs (Cilloni *et al.*, 2009; Krönke *et al.*, 2011).

Bei AML finden sich jedoch in einer Vielzahl der Fälle keine per RQ-PCR detektierbaren molekularen Marker. Ein weiterer vielversprechender Marker zur Quantifizierung einer MRD ist daher der Nachweis aberranter DNA-Promotorhypermethylierung verschiedener Gene, welche bei AML häufig epigenetisch dysreguliert sind. Auch in CR können aberrante Methylierungsmuster bestehen, wenngleich diese i.d.R. deutlich geringer ausgeprägt sind als zum Zeitpunkt der Erstdiagnose oder bei Manifestation eines Rezidivs. So zeigt sich bei AML-Patienten in CR eine Assoziation zwischen einer nachweisbaren Hypermethylierung der Gene *Estrogen receptor α* (*ER α*) und *p15^{INK4B}* und einem erhöhten Rezidivrisiko bzw. einer deutlich verkürzten rezidivfreien Überlebensdauer (Agrawal *et al.*, 2007).

1.3.9 Prognose

Die Prognose der AML ist sehr variabel. Insgesamt liegt die 5-Jahres-Überlebensrate ab Diagnose bei nur 15-25%, das mittlere Überleben bei Auftreten eines Rezidivs beträgt nur 3-12 Monate (Keating *et al.*, 1989). 10-50% aller Patienten mit AML erreichen keine CR unter Therapie. Die wichtigsten Prognosefaktoren für das Erreichen einer CR, das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben sind der zytogenetische Untersuchungsbefund, *FLT3*-, *NPM1*- und *MLL*-Mutationsstatus, Patientenalter und AZ, die ätiologische Unterscheidung zwischen *de novo* und s-AML, Leukozytenzahl im peripheren Blutbild bei Diagnosestellung und die Zahl der Induktionszyklen bis zur ersten CR (Byrd *et al.*, 2002; Cheson *et al.*, 2003). Patienten, die länger als 3 Jahre in Komplettemission überleben, haben ein Rezidivrisiko von unter 10%, sie gelten als potenziell geheilt (Estey & Döhner, 2006).

Das zunehmende Verständnis molekularer Pathomechanismen und die Detektion neuer molekularer Marker erlaubt eine weitergehende Klassifizierung der AML in neue distinkte Subgruppen, was eine genauere Risikobewertung, vor allem innerhalb der sehr heterogenen intermediären Risikogruppe, erlaubt und gleichzeitig Ansatzpunkte für neue risikoadaptierte und zielgerichtete Behandlungsansätze bietet (Baldus *et al.*, 2003).

1.4 Inter- α -Trypsin-Inhibitor Heavy Chain 5

1.4.1 Inter- α -Trypsin-Inhibitoren

Inter- α -Trypsin-Inhibitoren (ITIs) sind eine Familie von Serin-Protease-Inhibitoren vom Kunitz-Typ in der ECM verschiedener Organe und des Blutes (Veeck *et al.*, 2008a). Die extrazelluläre Interaktion von ITIs und Hyaluronsäure (*hyaluronan acid*, HA), einem Hauptbestandteil der ECM, dient der Stabilisation der ECM (Chen *et al.*, 1994). Strukturell sind ITIs Protein-Glykosaminoglykan-Protein-Komplexe (PGP), welche aus einer ITI-Leichtkette, dem sog. Bikunin, und zwei variablen, jeweils homologen ITI-Schwerketten (ITI-*heavy chains*, ITIHs) (ITIH1-5) bestehen. Diese sind wiederum über Chondroitinsulfat, ein Glykosaminoglykan, kovalent verbunden (Enghild *et al.*, 1991). Damit stellen ITIs sowohl strukturell, als auch funktionell einzigartige Proteoglykane dar, deren Aktivität auf die Hemmung von Plasmaproteasen gerichtet ist. ITIs kommen konstitutiv in relativ hohen Konzentrationen im Plasma, aber auch in anderen Kompartimenten und Bindegeweben des menschlichen Körpers vor (Zhuo *et al.*, 2004).

Bikunin wird kodiert durch das α_1 -*microglobuline/bikunin precursor*-Gen (*AMBIP*), welches ebenfalls für α_1 -*Mikroglobulin* kodiert. Beide Proteine sind jedoch weder strukturell noch funktionell verwandt (Salier *et al.*, 1996). Bikunin ist ein Protein mit inhibitorischer Wirkung auf Plasmaproteasen, wie Plasmin, Trypsin, Chymotrypsin, Leukozytenelastase, u. a. und schützt so die ECM vor proteolytischer Degradation (Salier *et al.*, 1996). Die Hemmwirkung des Bikunin macht jedoch trotz der hohen Konzentration im Blutplasma insgesamt nur 5% der gesamten Protease-inhibitorischen Aktivität des Plasmas aus (Zhuo *et al.*, 2004). Folglich fungiert Bikunin möglicherweise als *Shuttle*-Protein, welches Proteasen bindet und ihren physiologischen Inhibitoren zuführt (Pratt & Pizzo, 1986). Hingegen ist der anti-proteolytische Effekt gegen oberflächenständiges Plasmin von Tumorzellen stärker und daher Bikunin damit möglicherweise antimetastatisch und antiinvasiv wirksam (Kobayashi *et al.*, 1994). So hat Bikunin z.B. *in vitro* hemmende Eigenschaften auf Tumorzellinvasion und Metastasierung bei Ovarialkarzinomen (Kobayashi *et al.*, 1998).

Mehrere Studien zeigen die Bedeutung von ITIs für eine Vielzahl pathologischer Prozesse und Erkrankungen, so z.B. für die Entstehung der Urolithiasis, weiblicher Infertilität, Atherosklerose und anderer vaskulärer Erkrankungen, sowie entzündlicher Prozesse (Veeck *et al.*, 2008a).

Zudem haben verschiedene Studien den Hinweis auf eine protektive Wirkung der ITIs gegenüber der Entstehung verschiedener Tumoren erbracht. Insb. durch die Funktion des Bikunins als Plasmaprotease-Inhibitor und die ECM-stabilisierenden ITIHs üben ITIs hemmenden Einfluss auf Tumorprogress und Metastasierung aus (Kobayashi *et al.*, 1995; Bourguignon *et al.*, 1999). Es konnte z.B. im Mausmodell gezeigt werden, dass eine Überexpression von *ITIH1* und *ITIH3* zu einer deutlichen Verminderung der Metastasierung bei Bronchialkarzinomen führt und dass eine *ITIH*-Überexpression eine verbesserte Zelladhäsion bedingt (Paris *et al.*, 2002).

1.4.2 Inter- α -Trypsin-Inhibitor heavy chains

ITIHs wurden als HA-assoziierte, ca. 85 kDa große Proteine in der ECM muriner Fibroblastenkulturen identifiziert und initial *Serum-derived HA-associated proteins* (SHAPs) genannt (Yoneda *et al.*, 1990). Bislang sind fünf verschiedene ITIHs bekannt, deren Gene auf zwei verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. Die Gene *ITIH1*, *ITIH3* und *ITIH4* liegen auf Chromosom 3p2.11-12, die Gene *ITIH2* und *ITIH5* auf Chromosom 10p14-15 (Diarra-Mehrpour *et al.*, 1989; Bost *et al.*, 1998; Himmelfarb *et al.*, 2004). *ITIH1*, *ITIH2* und *ITIH3* werden vornehmlich hepatisch als Vorläufer-Polypeptide synthetisiert, die dann ausgedehnt posttranslational modifiziert werden. Sie enthalten eine spezifische Bruchstelle, welche für die kovalente Bindung an die ITI-Leichtkette Bikunin mittels eines Glykosaminoglykans von Bedeutung ist (Enghild *et al.*, 1991).

ITIHs binden unter Freiwerden von Bikunin kovalent an HA in der ECM und im Blutstrom und bilden so sog. *cabal-like structures* (Bost *et al.*, 1998). Dieses entstehende ITIH-HA-Aggregat ist hauptverantwortlich für die Stabilisation der ECM in HA-reichen Geweben (Rugg *et al.*, 2005). Freigesetztes Bikunin wird zum Teil glykosyliert und als *Urinary trypsin inhibitor* (UTI) renal eliminiert (Bost *et al.*, 1998). Eine schematische Darstellung der physiologischen Funktion von ITI zeigt Abbildung 1.4.1. Diese Organisation der ECM ist zudem essentiell für den Ablauf einer geweblichen Entzündungsreaktion, da einwandernde mononukleäre Zellen über CD44, einen oberflächenständigen HA-Rezeptor, mit der ECM interagieren (Zhuo *et al.*, 2004).

Essentiell für den Transfer von ITIHs auf HA ist das Protein *Tumor necrosis factor α -induced protein 6* (TNFAIP6) (Jessen & Ødum, 2003). TNFAIP6 ist Cofaktor und Katalysator zugleich und bildet für die ablaufende Veresterung einen stabilen Komplex mit ITIH und HA durch kovalente Bindung an beide Reaktionspartner

(Rugg *et al.*, 2005). Ferner induzieren Abbauprodukte der HA bei Degradation der ECM eine gesteigerte Angiogenese. Da HA-Verknüpfung und die damit verbundene ECM-Stabilität in engem Zusammenhang mit ITIHs stehen, scheint eine ITIH-Dysregulation auch die Neovaskularisation während der Genese von Tumoren zu begünstigen (West & Kumar, 1991).

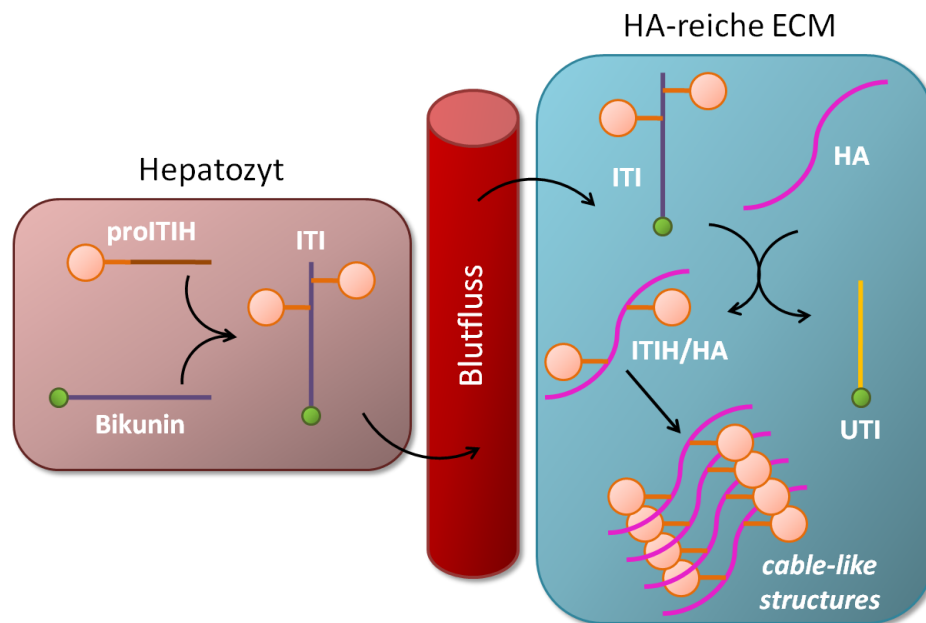


Abb. 1.4.1 Struktur und Funktion der ITIs. ITI-Komponenten und ihre Vorstufen werden vornehmlich hepatisch synthetisiert und im Trans-Golgi-Apparat der Hepatozyten über ein Glykosaminoglykan (lila-farbene Linie) zu ITIs verknüpft. ITIs werden dann in die Blutbahn abgegeben und erreichen Hyaluronsäure (HA)-reiche extrazelluläre Kompartimente. Dort werden die ITI-Schwerketten (ITIHS) unter Freiwerden von Bikunin oder in glykosylierter Form als *Urinary trypsin inhibitor* (UTI) mit HA durch Veresterung zu sog. ITIH-HA-Komplexen kovalent verbunden. Diese Komplexe aggregieren zu sog. *cable-like structures*, welche die extrazelluläre Matrix (ECM) stabilisieren und die Adhäsion Entzündungs-assoziiierter Zellen ermöglichen. Abbildung modifiziert nach (Zhuo *et al.*, 2004).

Das Zusammentreffen von ITIs und HA unter physiologischen Zuständen, wie der Ovulation, oder verschiedenen pathologischen Zuständen, wie z.B. Entzündungen oder Malignomen, mit vermehrter Exsudation von Plasmapbestandteilen und damit auch ITIs ist assoziiert mit einer vermehrten Bildung von ITIH-HA-Komplexen in Blutstrom und ECM und einer gleichzeitig erhöhten Konzentration von UTI im Urin (Zhuo *et al.*, 2004). Entzündungen induzieren gleichzeitig oft einen dramatischen Anstieg der HA-Konzentration im Serum, die mit der Konzentration von ITIH-HA-Komplexen im Serum korreliert. So ist die Konzentration von HA und ITIH-HA-Komplexen im Serum ein nützlicher klinischer Parameter zur Kontrolle von Verlauf und Therapieerfolg insb. bei Patienten mit rheumatoider Arthritis oder Leberzirrhose (Zhuo *et al.*, 2004; Veeck *et al.*, 2008a). Ferner haben Untersuchungen an humanen KM-Biopsaten gezeigt, dass es bei AML zu einer deutlichen Anreicherung

von HA in der ECM kommt (Sundström *et al.*, 2005). Die pathophysiologische Bedeutung dieser Veränderung ist jedoch bislang nicht bekannt.

Vier der *ITIH*-Gene zeigen aberrante Expressionsmuster bei verschiedenen humanen Tumorentitäten, so *ITIH2*, *ITIH3* und *ITIH5* beim Mammakarzinom oder *ITIH2*, *ITIH3* und *ITIH4* bei Kolon-, Magen- und Bronchialkarzinomen. In entsprechenden Fällen zeigt sich fast ausschließlich ein Verlust an *ITIH*-mRNA (Hamm *et al.*, 2008).

1.4.3 Inter- α -Trypsin-Inhibitor heavy chain 5

Das Protein ITIH5 ist das jüngste Mitglied der ITIH-Familie und wird nicht hepatisch, sondern vornehmlich in Geweben der weiblichen Fortpflanzungsorgane, wie Placenta, Brustdrüse und Ovar, exprimiert (Himmelfarb *et al.*, 2004). ITIH5 ist ein Polypeptid aus 942 Aminosäuren und enthält, ebenso wie alle bekannten ITIHs, zwei charakteristische Proteindomänen: Die *vault protein inter- α -trypsin domain* (VIT) und die *von Willebrand type-A domain* (vWA), welche Bindungskapazität für Integrine, Kollagene, Proteoglykane und Heparin besitzt (Colombatti & Bonaldo, 1991). Außerdem besitzt ITIH5 ein Signalpeptid am N-Terminus und eine C-terminale spezifische Bruchstelle (DPHFVV). Das *ITIH5*-Gen ist auf Chromosom 10p15 lokalisiert, umfasst 82,7 kb und enthält 14 Exone (Himmelfarb *et al.*, 2004). *ITIH5* ist das einzige Gen der *ITIH*-Genfamilie, welches eine hohe CpG-Dichte in seiner Promotorregion aufweist, sodass insb. *ITIH5* eine epigenetische Dysregulation erfahren kann und damit ein putatives Klasse-II-Tumorsuppressorgen darstellt (Veeck *et al.*, 2008b). Abbildung 1.4.2 zeigt eine schematische Darstellung der humanen ITIH5-Promotorregion.

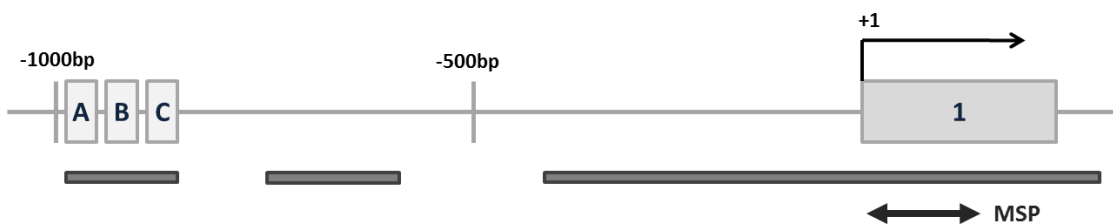


Abb. 1.4.2 Schematische Darstellung der humanen ITIH5-Promotorregion. Die Abbildung zeigt ein ca. 1,2 kb großes Fragment der DNA-Sequenz auf Chromosom 10p15. A-C = Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (A: *CCAAT/enhancer-binding-protein- β* =CEBP β ; B: MYC-MAX-binding site; C: GC-Box-Elemente.). Graue Balken = CpG-Inseln in relativem Abstand zum Transkriptionsstart. Transkriptionsstart bei +1 am Beginn von Exon 1 (grauer Kasten). Der rote Doppelpfeil repräsentiert die mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP, s. auch Kap. 3.1.5) amplifizierte Region der (Promotor-)DNA-Sequenz. Abbildung modifiziert nach (Veeck *et al.*, 2008a).

Eine verminderte Zell-Adhäsion und erhöhte proteolytische Aktivität von ECM-Komponenten sind wichtige Charakteristika einer invasiven

Tumorzellausbreitung und Metastasierung (Veeck *et al.*, 2008a). Der Zusammenhang von epigenetischer Inaktivierung und Tumorzell-Invasion konnte bereits für die Adhäsionsgene *E-cadherin* und *Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP3)* gezeigt werden (Graff *et al.*, 1995; Bachman *et al.*, 1999). Da ITIHs die ECM-adhäsive Komponente der ITIs darstellen, kann ebenso ein Verlust der *ITIH*-Expression zum invasiven Tumor-Phänotyp beitragen. So könnte auch ein Verlust der *ITIH5*-Expression an einer Tumorentwicklung beteiligt sein (Veeck *et al.*, 2008a).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der *ITIH5*-Expression durch Promotorhypermethylierung bei Patienten mit invasivem Mammakarzinom ungünstigen Einfluss auf die Prognose und den klinischen Verlauf hat (Veeck *et al.*, 2008a). Ferner zeigte sich ein gehäuftes Auftreten einer Dysregulation der *ITIH5*-Expression bei schlecht differenzierten Schilddrüsenkarzinomen. Dessen prognostische Bedeutung ist jedoch zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht abschließend geklärt (Pita *et al.*, 2009).

2. Zielsetzung

Die AML ist eine sehr heterogene Erkrankung, der eine Vielzahl genetischer Defekte und epigenetischer Aberrationen pathophysiologisch zugrunde liegt. Der Einfluss genetischer Veränderungen auf Pathogenese, Therapie und Prognose ist seit vielen Jahren anerkannt. Zudem wurde die methylierungsassoziierte Inaktivierung einer Vielzahl von Tumorsuppressorgenen im Rahmen der Leukämogenese beschrieben (Galm *et al.*, 2006). Epigenetische Marker stellen daher interessante Faktoren für das grundlegende Verständnis der Pathophysiologie der AML dar und bieten einen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer zielgerichteter therapeutischer Optionen.

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Kandidatengen *ITIH5* kodiert für ein extrazelluläres Matrix-Protein und das jüngste Mitglied der *ITIH*-Genfamilie. Das Protein *ITIH5* spielt eine zentrale Rolle in der Stabilisierung der ECM, sowie in der Zell-ECM-Interaktion. Eine Dysregulation der Zell-ECM-Interaktion zeigt sich regelmäßig bei soliden Tumoren und ist möglicherweise auch in der Genese hämatologischer Neoplasien bedeutsam. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass sich eine methylierungsassoziierte Inaktivierung des *ITIH5*-Gens negativ auf klinischen Verlauf und Prognose bei invasiven Mammakarzinomen auswirkt (Veeck *et al.*, 2008a). *ITIH5* ist damit ein putatives Tumorsuppressorgen, dessen Rolle im Rahmen der Myelopoese zum aktuellen Zeitpunkt zwar noch ungeklärt, dessen Bedeutung als Biomarker jedoch auch bei hämatologischen Neoplasien von großem Interesse ist.

Die vorliegende Arbeit untersucht den Methylierungsstatus im Bereich des *ITIH5*-Promotors bei AML. Dies soll klären, ob und inwiefern eine aberrante DNA-Hypermethylierung von *ITIH5* klinische Bedeutung bei AML besitzt. Dazu erfolgt eine Korrelation zwischen *ITIH5*-Methylierungsstatus und klinischem Verlauf, laborchemischen Parametern, Erkrankungsstadium und Tumorbiologie. Zusätzlich soll hiermit geklärt werden, ob eine Hypermethylierung von *ITIH5* bei AML, ähnlich wie beim Mammakarzinom, einen epigenetischen Biomarker und Prognosefaktor darstellt. *In vitro* wird abschließend untersucht, inwieweit der Einsatz einer DNA-demethylierenden Therapie, in diesem Falle DAC, eine Demethylierung der Promotorregion und damit potenziell eine Reexpression des Kandidatengens ermöglicht. Ziel hierbei ist die Evaluation, ob eine medikamentös induzierte *ITIH5*-Reexpression zu den bereits bekannten günstigen Effekten einer epigenetischen Therapie bei AML beitragen könnte.

3. Material und Methodik

3.1 Methodik

Die Abbildung 3.1.1 zeigt eine Übersicht der im Rahmen der vorliegenden experimentellen Arbeit verwendeten Methoden.

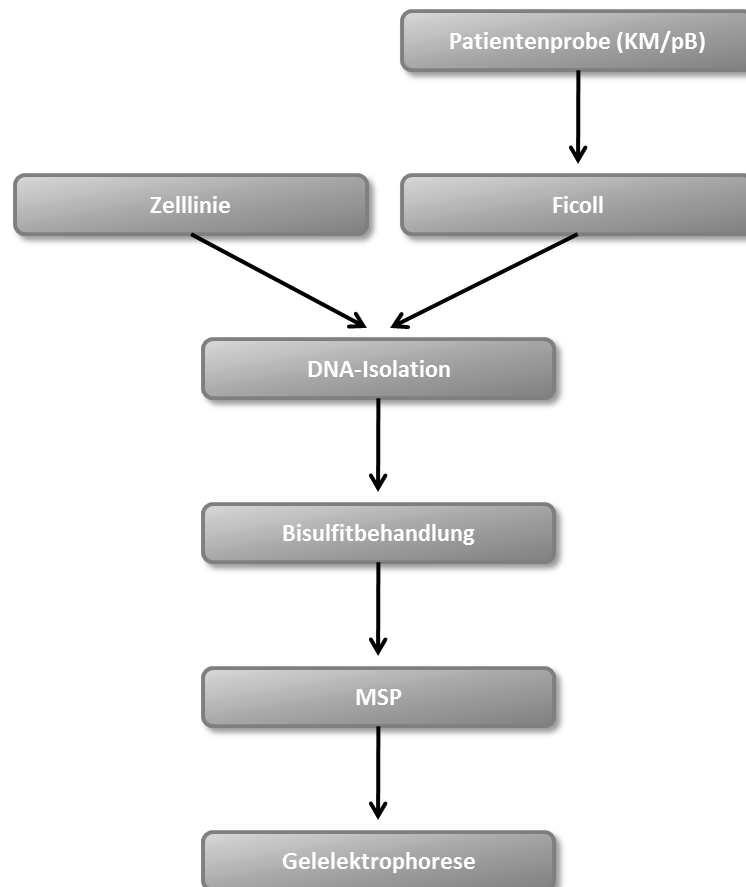


Abb. 3.1.1 Übersicht der verwendeten Methoden. Abbildung modifiziert nach (Galm & Herman, 2005).

3.1.1 Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Die Isolation mononukleärer Zellen erfolgt mittels der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation. Ficoll ist ein linearer Gradient aus Polysacchariden unterschiedlicher Dichte. Verschiedene gelöste Makromoleküle und Zellen werden anhand ihrer unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeit durch Zentrifugation separiert. Erythrozyten, Granulozyten und Zelldetritus sinken ab, die mononukleären Zellen (Lymphozyten, Plasmazellen, Monozyten, u.a.) passieren Ficoll nicht und bilden die sog. Interphase. Als Ausgangsmaterial eignet sich peripheres EDTA-Vollblut, Heparin-Vollblut oder Citrat-KM. Eine schematische Darstellung des Ergebnisses der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation zeigt Abbildung 3.1.2.

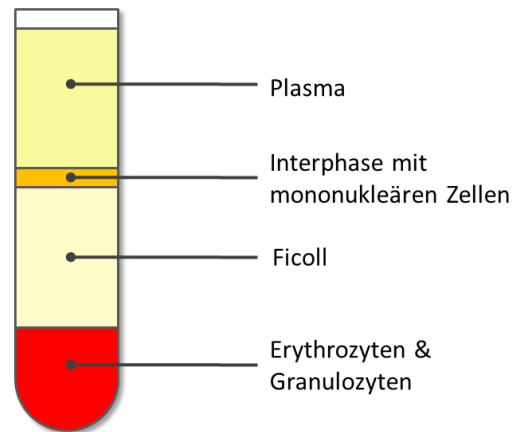


Abb. 3.1.2 Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation. Darstellung der Auftrennung der Bestandteile von pB- und KM-Proben nach 20 minütiger Zentrifugation.

Zunächst werden 3 ml Ficoll in ein 13 ml-Probenröhrchen gegeben, vorsichtig mit 5-10 ml Patientenblut überschichtet und anschließend für zwanzig Minuten (min) bei 2.400 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Die entstehende Interphase mit den mononukleären Zellen wird anschließend in eine 2 ml-Spritze aufgenommen, auf ein neues Probenröhrchen überführt, in 9 ml *Phosphate buffered saline* (PBS) resuspendiert und für 10 min bei 1.200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Proben durch Schütteln homogenisiert und erneut einem Waschschrift mit PBS unterzogen. Die aufgereinigten Zellen werden in 1 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl am Mikrospektrometer gemessen. Die Suspension wird mit PBS auf eine Zellzahl von ungefähr $5-10 \times 10^6$ Zellen/ml verdünnt. Abschließend wird die Zellsuspension in 1 ml-Aliquots aufgeteilt. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 1.200 rpm wird der Überstand verworfen und die Pellets bis zur weiteren Verwendung bei -80°C kryokonserviert.

3.1.2 DNA-Isolation

Das Prinzip der DNA-Isolation beruht auf der enzymatischen Lyse von Zellen, deren DNA unter Zugabe von Ethanol ausgefällt wird. Nach mehreren Waschschriften erhält man dann isolierte DNA, die wieder eluiert wird.

Die Präparation der genomischen DNA aus den aufgereinigten Zellpellets erfolgt mit Hilfe des *QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit* (Qiagen). Die Details der durchgeführten Arbeitsschritte sind dem Protokoll des Kits zu entnehmen. Die Zellen werden denaturiert und die DNA auf *Miniprep columns* mit Ethanol ausgefällt und durch mehrere Waschschriften aufgereinigt. Abschließend wird die DNA in *Aqua ad injectabilia* eluiert. Die Reinheit und Quantität der DNA wird spektrophotometrisch bei

einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt. Die isolierten DNA-Proben werden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C kryokonserviert.

3.1.3 *In vitro* methylierte DNA

In vitro methylierte DNA (IVD) zeichnet sich dadurch aus, dass nahezu jedes CpG-Dinukleotid methyliert ist. Darum dient IVD als universelle Positivkontrolle der Methylierungsreaktion (M-Reaktion) in der hier verwendeten *Methylation-specific polymerase chain reaction* (MSP). Zur Herstellung von IVD wird DNA eines gesunden Spenders *in vitro* durch das Enzym Cytosin-C5-Methyltransferase (M. SssI) methyliert. *S-Adenosyl-Methionin* (SAM) fungiert hierbei als Methylgruppendonator. Alternativ kann DNA von Tumorzelllinien, bei welchen das jeweilige Kandidatengen hypermethyliert ist, als Positivkontrolle genutzt werden (Galm & Herman, 2005).

Es werden 50 µg DNA mit 2,5 µl SAM (32 mM), 25 µl NEB-2-Puffer und 6 µl M. SssI (4.000 U/ml) versetzt, die Lösung mit *Aqua ad injectabilia* auf ein Gesamtvolumen von 250 µl aufgefüllt und anschließend vorsichtig homogenisiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C im Wasserbad werden am Folgetag 5 µl SAM (32 mM) und 3 µl M. SssI (4.000 U/ml) hinzugefügt und die Lösung anschließend erneut für 4 Stunden im 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Im Anschluss erfolgt die Aufreinigung der IVD über *G50 Spin-Mini-Columns*. Die Säulen werden vorab für 3 min bei 3.400 rpm zentrifugiert, um eventuell vorhandene Flüssigkeit zu eliminieren. Anschließend werden jeweils 42 µl-Aliquots der IVD auf die Säulen übertragen und 3 min bei 3.400 rpm zentrifugiert. Abschließend wird das Zentrifugat aller Gefäße zur spektrophotometrischen Konzentrationsmessung zusammengeführt.

Die aufgereinigte IVD wird auf 1 µg/45 µl mit *Aqua ad injectabilia* verdünnt und bis zur weiteren Verwendung in 45 µl-Aliquots bei -20°C kryokonserviert (Galm & Herman, 2005).

3.1.4 Natriumbisulfit-Behandlung

Für die Methylierungsanalyse von DNA, z.B. mittels MSP, müssen die zu untersuchenden DNA-Proben vorab mit Natriumbisulfit behandelt werden. Diese Behandlung der DNA führt durch kovalente Basenmodifikation zur Konversion aller Cytosin-Basen zu Uracil (U), mit Ausnahme bereits methylierter CpG-Dinukleotide (Galm & Herman, 2005). Eine Darstellung der bei der Bisulfitkonversion ablaufenden chemischen Reaktionen zeigt Abbildung 3.1.3.

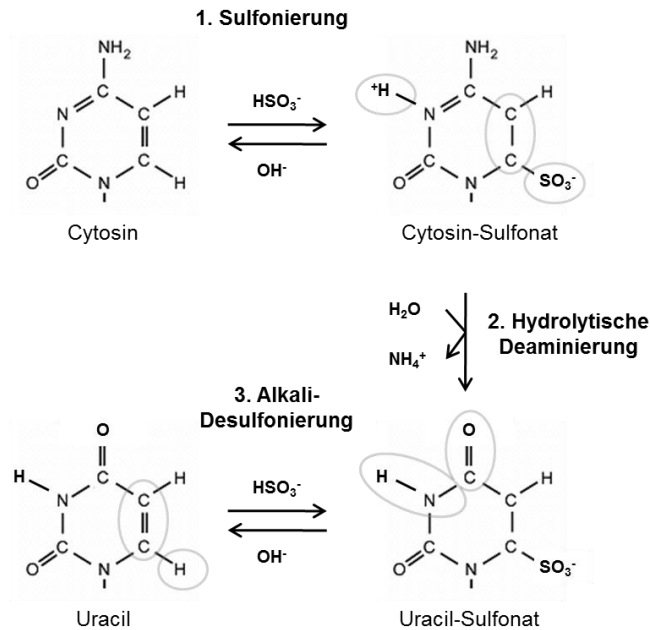


Abb. 3.1.3 Schema der Natriumbisulfitbehandlung. Durch die Bisulfitbehandlung wird mit Ausnahme von 5-Methylcytosin jedes Cytosin in drei chemischen Reaktionen zu Uracil konvertiert. Damit repräsentiert jeder erhaltene Cytosin-Rest der entstehenden Amplikon-Sequenz eine bereits zuvor methylierte Cytosin-Base. Uracil wird während der Amplifikation durch sein DNA-Äquivalent Thyminid ersetzt. Abbildung modifiziert nach (Clark *et al.*, 1994).

Die Bisulfitbehandlung erfolgt unter Verwendung des *EZ DNA MethylationTM Kit* (Zymo Research). Die genaue Durchführung der einzelnen Arbeitsschritte ist dem dem Kit beiliegenden Protokoll zu entnehmen. Abbildung 3.1.4 zeigt eine schematische Darstellung des Effektes der Bisulfitkonversion auf eine exemplarische DNA-Sequenz.

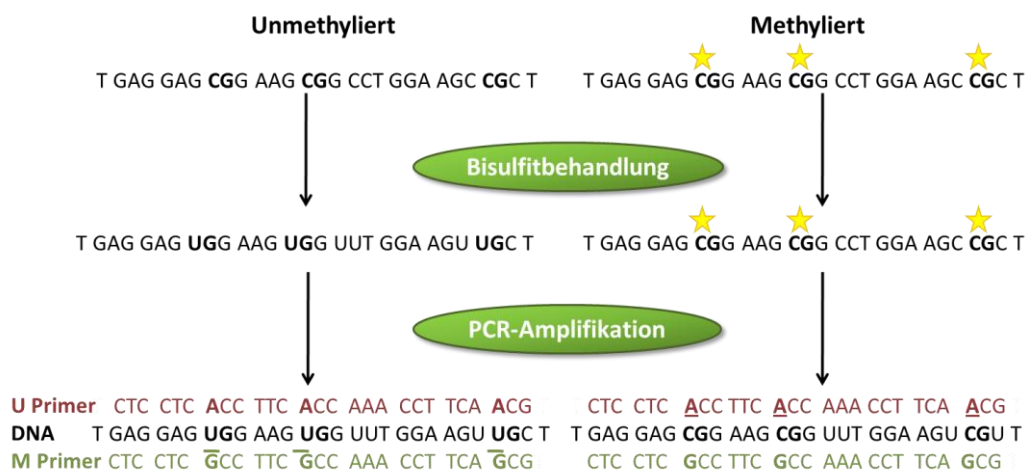


Abb. 3.1.4 Effekt der Natriumbisulfit-Behandlung auf eine exemplarische DNA-Sequenz (oben) und entsprechende MSP-Primer (unten). Dargestellt ist eine exemplarische DNA-Sequenz, die auf der linken Seite drei unmethylierte (fett gedruckt) und rechts drei methylierte (fett gedruckt mit gelben Sternen) CpG-Dinukleotide enthält. Unter Bisulfitbehandlung werden Cytosin-Reste unmethylierter CpG-Dinukleotide zu Uracil (U) konvertiert, methylierte Cytosin-Basen bleiben unverändert erhalten. Entsprechend der so entstehenden Unterschiede methylierter und unmethylierter DNA-Sequenzen können sequenzspezifische Primer designed werden. Die sequenzspezifischen *mismatches*, welche eine Primer-Anlagerung verhindern, sind jeweils mit Strichen markiert. Abbildung modifiziert nach (Galm & Herman, 2005).

Die bisulfitkonvertierte DNA wird in 21 µl *Aqua ad injectabilia* resuspendiert und in je zwei Aliquots aufgeteilt. Bis zur weiteren Verwendung in der MSP wird die nun sehr für Degradation anfällige DNA bei -20°C kryokonserviert.

3.1.5 Methylierungsspezifische PCR

Die Bisulfit-Behandlung führt zu einer partiellen Degradation der DNA und resultiert in DNA-Einzelsträngen, die nicht länger komplementär sind (Galm & Herman, 2005). So kann in anschließenden Untersuchungen zwischen vormals methylierten und unmethylierten Cytosin-Resten differenziert werden. Natriumbisulfit-behandelte DNA kann amplifiziert und sequenziert werden und gibt so Aufschluss über den Methylierungsstatus der untersuchten DNA-Region (Frommer *et al.*, 1992). Während der Amplifikation mittels MSP wird Uracil durch Thymin, m⁵C hingegen durch Cytosin ersetzt. So kann anhand der Sequenz des PCR-Produktes auf den Methylierungsstatus geschlossen werden (Clark *et al.*, 1994; Galm & Herman, 2005).

Die MSP ist eine schnelle, kosteneffektive und hochsensitive Methode für die Analyse des Methylierungsstatus praktisch jeder CpG-reichen DNA-Region. Im Gegensatz zu den konventionellen Methoden *Southern Blot* oder Sequenzierung, welche größere Mengen qualitativ hochwertiger DNA benötigen, kann eine MSP auch aus kleinen DNA-Mengen und minderwertigeren DNA-Proben, z.B. aus paraffineingebettetem Gewebe erfolgen. Diese Methode beruht auf den Unterschieden zwischen methylierten und unmethylierten Allelen der DNA-Sequenz, welche im Rahmen der Behandlung der DNA mit Natriumbisulfit entstehen und bedarf keiner zeitaufwendigen Amplikon-Sequenzierung (Herman *et al.*, 1996; Esteller, 2002).

Im Gegensatz zur konventionellen PCR-Methode, beruht die MSP auf dem Einsatz zweier unterschiedlicher Primer-Paare. MSP-Primer werden so designed, dass sie zwischen unmethylierter (U) und methylierter (M) DNA-Sequenz unterscheiden und sich nur an bisulfitbehandelte DNA anlagern, um die Amplifikation artifiziell anwesender DNA zu vermeiden (Herman *et al.*, 1996; Galm & Herman, 2005). Durch eine durchschnittliche Primer-Länge von 21-24 bp ist eine ausreichende Spezifität für die Promotorregion des entsprechenden Zielgens gewährleistet. Gleichzeitig sollte jeder Primer mindestens zwei bis drei CpG-Dinukleotide abdecken, um eine ausreichende Sensitivität zu gewährleisten. Die Amplikon-Länge sollte zudem nicht mehr als 200 bp betragen (Galm & Herman, 2005). Die Basenfolgen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten MSP-Primer sind Tabelle 3.1.1 zu entnehmen.

Die als Lyophilisat gelieferten Primer wurden in 500 µl *Aqua ad injectabilia* resuspendiert und für die MSP auf eine Endkonzentration von 20 µM verdünnt.

Tab. 3.1.1 Sequenz der verwendeten MSP-Primer und entstehende Amplikon-Länge

Primer	Primer-Sequenz (5'→3')	Amplikonlänge (bp)
<i>ITIH5</i> U sense	G TTG GAG TTT TGG GTG TTG TAA AGT	141
<i>ITIH5</i> U antisense	CCC AAC TCT ACA CCT CTT CTT ACA	
<i>ITIH5</i> M sense	TTG GAG TTT TGG GCG TTG TAA AGC	139
<i>ITIH5</i> M antisense	CCA ACT CTA CGC CTC TTC CTA CG	

Da jeweils U- und M-Primer verwendet werden, müssen immer zwei *Mastermixes* hergestellt werden, die sich nur im enthaltenen Primer-Paar unterscheiden (s. hierzu Tab. 3.1.2). Pro Probe werden also zwei PCRs angesetzt, sodass in der einen PCR nur die unmethylierte, in der anderen nur die methylierte Sequenz amplifiziert wird.

Tab. 3.1.2 Reagenzien des MSP-Mastermixes

Reagenz	Volumen pro Probe (µl)	Volumen pro 10 Proben (µl)
10x PCR-Puffer	2,5	25
dNTP-Mix	1,25	12,5
Sense-Primer (U oder M)	0,5	5
Antisense-Primer (U oder M)	0,5	5
<i>Aqua ad injectabilia</i>	14,25	142,5
RedTaq DNA-Polymerase	1,35	13,5
<i>Aqua ad injectabilia</i>	9,45	94,5

Der Standard-PCR-Puffer besteht aus 16,6 mM Ammoniumsulfat, 67 mM Tris (pH 8,8), 6,7 mM MgCl₂ und 10 mM β-Mercaptoethanol.

Alle MSP-Reaktionen (U- und M-Reaktionen) laufen in einem Reaktionsvolumen von 25 µl ab. Für jede MSP-Reaktion wird jeweils 1 µl (~50ng) Bisulfit-konvertierte DNA zu 19 µl des zugehörigen *Mastermix* (U oder M) in die PCR-*Tubes* gegeben und zum Schutz vor Verdunstung mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet. Die PCR-*Tubes* werden im Thermocycler bei 95°C für 5 min erhitzt. Anschließend wird die Temperatur bei 80°C gehalten und es werden 5µl verdünnte RedTaq[®] DNA-Polymerase zugefügt. Nun erfolgt die PCR nach dem folgenden Standard-Temperatur-Schema: 35 Zyklen bei 95°C für 30 Sekunden (sec), bei 63°C für 30 sec und bei 72°C für 30 sec gefolgt von einem Zyklus bei 72°C für 5 min. Die Temperatur von 63°C ist primerspezifisch und variiert daher in Abhängigkeit von untersuchtem Gen und Primerpaar.

Essentiell zur Beurteilung der MSP-Ergebnisse ist die Verwendung geeigneter Kontrollen. Für jede MSP sind drei Kontrollen erforderlich. Jeweils eine für die unmethylierte (U-Kontrolle) und methylierte (M-Kontrolle) Sequenz, sowie eine Negativkontrolle (z.B. *Aqua ad injectabilia*). Als U-Kontrolle dient DNA gesunder Spender, als M-Kontrolle methylierte DNA von Tumorzelllinien oder IVD. Gesunde

Zellen als U-Kontrolle sollten einzig ein Signal in der U-Reaktion zeigen, ein Signal in der M-Reaktion bedeutet mangelnde Spezifität der M-Reaktion. In der M-Kontrolle darf ein Signal in der U-Reaktion als Ausdruck einer unvollständigen Methylierung der IVD oder einer Methylierungsheterogenität der Tumorzelllinien erscheinen, solange das Signal der M-Reaktion stark positiv ausfällt.

3.1.6 Gelelektrophoretische Auswertung

Die MSP-Auswertung erfolgt elektrophoretisch auf Ethidiumbromid-gefärbten 2,5% Agarose-Gelen. Dazu werden 10 µl des PCR-Produkts für eine Laufzeit von 25 min bei 100 V aufgetragen und das Ergebnis unter einem UV-Transilluminator visualisiert und photographisch dokumentiert.

3.1.7 Patienten- und Kontrollkollektive

Ausgangsmaterial der vorliegenden Untersuchung sind KM- oder pB-Proben von insgesamt 104 Patienten bei Erstdiagnose einer AML, die sich in der Zeit von 1995 bis 2008 in der Klinik für Onkologie, Hämatologie und Stammzelltransplantation des Universitätsklinikums Aachen vorstellten. Ferner werden 21 nicht maligne, davon 13 aus KM und 8 aus pB, von gesunden Spendern gewonnene Proben auf *ITIH5*-Methylierung untersucht. Das schriftliche Einverständnis der Patienten für die Konservierung von Zellmaterial zur Verwendung für wissenschaftliche Zwecke wurde individuell eingeholt. Die Asservierung von Patientenproben zur Analyse von genetischen und epigenetischen Veränderungen wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen genehmigt (EK 2220).

3.1.8 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe der SAS Statistik-Software (v9.1.3, SAS Institute; Cary, NC, USA). Korrelationen einzelner Variablen werden anhand des zweiseitigen exakten Fisher-Testes bzw. des zweiseitigen t-Tests untersucht. Als statistisch signifikant gelten p-Werte von $p < 0,05$. Die Überlebenskurve wird nach der Kaplan-Meier-Methode erstellt und mittels Log-Rank-Test verglichen. Als Überlebenszeit gilt der Zeitraum vom Tag der Diagnosestellung bis zum Tag des Versterbens oder des letzten Krankenhausaufenthaltes. Die statistischen Tests wurden von Dr. med. Stefan Wilop, Klinik für Onkologie, Hämatologie und Stammzelltransplantation, Universitätsklinikum Aachen, konzipiert und kontrolliert.

3.2 Material

3.2.1 Standardgeräte

Tab. 3.2.1 Übersicht der verwendeten Geräte

Geräte	Hersteller
Autoklav	Autoklave HMC, BPW Vertriebs-GmbH für Labortechnik; Süßen
Bench	HSP 12, Heraeus instruments; Hanau
Brutschrank	Cytoperm 2, Heraeus instruments; Hanau
Elektrophorese-Kammer	MU-0030, i-Mupid Mini Gel Migration Trough, Eurogentec GmbH; Köln
Heatblock	Dri-Block DB-2A, Techne; Wertheim
Kamera	Camedia C3040Zoom, Olympus; Hamburg
Gefrierschrank	Cooler, Bosch; Stuttgart
Mikrospektrometer	ABX Micros 60-OT, ABX Hématologie; Montpellier, Frankreich
Mikrowelle	Micro-Chef 900W, Moulinex; Leipzig
Mikrozentrifuge	SD, 110 VAC, Sigma-Aldrich; München
Spektralfotometer	GeneQuant II, Pharmacia Biotech; Cambridge, England
Thermocycler	Omn-E Thermal Cycler, Thermo Hybaid; Ulm
Transilluminator	UV-Transilluminator, biostep GmbH; Jahnsdorf
Vortexer	Assistent Reamix 2789, Karl Hecht GmbH Co KG; Sondheim
Waage	AC 100, Mettler Waagen GmbH; Giessen
Wasserbad	Köttermann Labortechnik; Uetze
Zentrifuge 1	Universal 32, Hettich Zentrifugen; Tuttlingen
Zentrifuge 2	Biofuge pico, Heraeus Instruments; Hanau

3.2.2 Standardlösungen und –puffer

Tab. 3.2.2 Übersicht der verwendeten Standardlösungen und –puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Ethanol	„Ethanol absolute“ Baker Analyzed Reagents, Deventer, Netherlands
Phosphate buffered saline (PBS)	Apothek des Universitätsklinikums Aachen 1,3 g Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H ₂ O 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat 8,0 g Natriumchlorid Demineralisiertes Wasser ad 1 l
TAE-Puffer	„DNA Typing Grade 50x TAE Buffer“ Invitrogen, Karlsruhe 2 M Tris-Acetat 50 mM EDTA Verwendet wurde der Puffer mit einer Verdünnung von 1:100

3.2.3 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien stammen aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) und der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. Stefan Barth des Fraunhofer Instituts für Molekularbiologie und Ökologie (IME) in Aachen. Als Nährmedium diente *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640) oder *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (MDM) mit *Fetal Bovine Serum* (FBS). Vor dem Einfrieren wurde dem Medium zur Prophylaxe einer Zellyse 10%-iges Dimethylsulfoxid (DMSO) zugefügt.

Zur Analyse der Reversibilität der Promotorhypermethylierung durch den Einsatz demethylierender Agenzien wurden die Zelllinien *in vitro* mit DAC behandelt. Die Zellen wurden bei einer Endkonzentration von 1 μM DAC für 96 Stunden inkubiert. Dazu wurde das Medium alle 24 Stunden gewechselt und DAC neu hinzugefügt, um eine stabile DAC-Konzentration im Medium zu gewährleisten und Abbauprodukte des DAC zu entfernen.

Tab. 3.2.3 Übersicht der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	DSMZ-Nr./IME	Zelltyp	Medium
HL-60	ACC 3	AML	90% RPMI1640 + 10% FBS
KG1a	ACC 421	AML	80% IMDM (oder RPMI1640) + 20% FBS
GDM-1	ACC 87	AML aus MPN	80% RPMI1640 + 20% FBS
OPM-2	ACC 50	Multiples Myelom	90% RPMI1640 + 10% FBS
RPMI-8226	ACC 402	Multiples Myelom	90% RPMI1640 + 10% FBS
U-266	ACC 9	Multiples Myelom	90% RPMI1640 + 10% FBS
LP-1	ACC 41	Multiples Myelom	80% IMDM + 20% FBS
Raji	ACC 319	Burkitt-Lymphom	90-95% RPMI1640 + 5-10% FBS
SET-2	ACC 608	Essentielle Thrombozytämie	80% RPMI1640 + 20% FBS
L-428	IME	Hodgkin-Lymphom	90% RPMI1640 + 10% FBS
L-540	IME	Hodgkin-Lymphom	80% RPMI1640 + 20% FBS
L-1236	IME	Hodgkin-Lymphom	90% RPMI1640 + 10% FBS

Tab. 3.2.4 Zur Zellkultur verwendete Medien

Material	Hersteller
RPMI 1640	„RPMI 1640 Medium + 25 mM HEPES + L-Glutamine“ Invitrogen GIBCO, Karlsruhe, Ref. 52400-025
IMDM	„IMDM“ Invitrogen GIBCO, Karlsruhe, Ref. 21980-032
FBS	„Fetal Bovine Serum“ Biochrom AG, Berlin, Cat.-No. S0115

3.2.4 Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Tab. 3.2.5 Zur Dichtegradientenzentrifugation verwendete Materialien

Material	Hersteller
PBS	Apotheke des Universitätsklinikums Aachen
Ficoll	„Lymphoprep TM “ Nycomed PharmaAS, Oslo, Norway
Spritze mit Aufsatz	Abbotath-T 14G, G-713-A01 4535-14, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Kryoröhrchen	Cryo. S, 2ml, 121279, Greiner bio-one, Frickenhausen

3.2.5 DNA-Isolation

Tab. 3.2.6 Zur DNA-Isolation verwendetes Material-Kit

Material	Hersteller
QIAamp [®] DNA Blood Mini Kit (50)	Qiagen, Hilden, Cat.-No. 51104

3.2.6 *In vitro* methylierte DNA

Tab. 3.2.7 Zur IVD-Herstellung verwendete Materialien

Material	Hersteller
G50 Spin-Mini-Columns	BIOMAX Inc., Odenton, USA, Cat.-No. 97-160M
NEB2-Buffer	M0226S, New England BioLabs, Frankfurt a.M.
M. Sssl (4000 U/ml)	M0226S, New England BioLabs, Frankfurt a.M.
S-Adenosyl-Methionin (SAM) (32 mM)	M0226S, New England BioLabs, Frankfurt a.M.

3.2.7 Natrium-Bisulfitbehandlung

Tab. 3.2.8 Zur DNA-Bisulfitbehandlung verwendetes Materialkit

Material	Hersteller
EZ DNA Methylation™ Kit (50)	Zymo Research, Orange, USA, Cat.No. D5001

3.2.8 Methylierungsspezifische PCR

Tab. 3.2.9 Zur MSP verwendete Materialien

Material	Hersteller
Magnesiumchlorid	„MgCl ₂ •6H ₂ O, 99.0%“ Sigma, No. M-0250
Trispuffer	„TRIZMA® Base, 99.9% (Tris[hydroxymethyl]aminomethanol)“ Sigma, No. T-1503
Ammoniumsulfat	„(NH ₄) ₂ SO ₄ “ Sigma, No. A-4418
β-Mercaptoethanol	„2-Mercaptoethanol“ Sigma, No. M-3148
dNTPs	„Deoxynucleotide-Set“ Sigma, No. DNTP-100 A
Red Taq DNA-Polymerase	„RedTaq™ DNA POLYMERASE“ Sigma, No. D-5684
IVD	Siehe Anleitung
PCR-Tubes	„Omnistrip“ Abgene, Cat.-No. AB-0404

3.2.9 Gelelektrophorese

Tab. 3.2.10 Zur gelelektrophoretischen Auswertung verwendete Materialien

Material	Hersteller
Ethidiumbromid	„Ethidium Bromide“ Invitrogen, Karlsruhe, Cat. No: 15585-011
TAE-Puffer	„TAE GeneClean Grade“ Bio101 Inc., Vista, CA, USA, Cat.-No. 2300-404
Agarose	„Agarose - Electrophoresis grade“ Invitrogen, Karlsruhe, Cat.-No. 15510-027
DNA-Marker	„Trackit 1kb Plus DNA Ladder“ Invitrogen, Karlsruhe, Cat.-No. 10068-013

4. Ergebnisse

4.1 Hypermethylierung des *ITIH5*-Promotors in Zelllinien

Zuerst erfolgte eine qualitative Untersuchung des Methylierungsstatus des *ITIH5*-Promotors bei hämatologischen Zelllinien (s. hierzu Tab. 4.1.1 und Abb. 4.1.1). Der qualitative Nachweis von CpG-Dinukleotiden im Bereich des *ITIH5*-Promotors erfolgte mittels MSP. Verwendet wurden die AML-Zelllinien KG1a und HL-60, die Zelllinie GDM-1, eine s-AML nach Transformation einer MPN, die Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-428, L-540 und L-1236, die Burkitt-Lymphom-Zelllinie Raji, die Essentielle Thrombozytämie (ET)-Zelllinie SET-2, sowie die Multiple Myelom (MM)-Zelllinien LP-1, OPM-2, RPMI-8226, U-266. Die experimentellen Ergebnisse werden in Abbildung 4.1.1 und Tabelle 4.1.1 dargestellt.

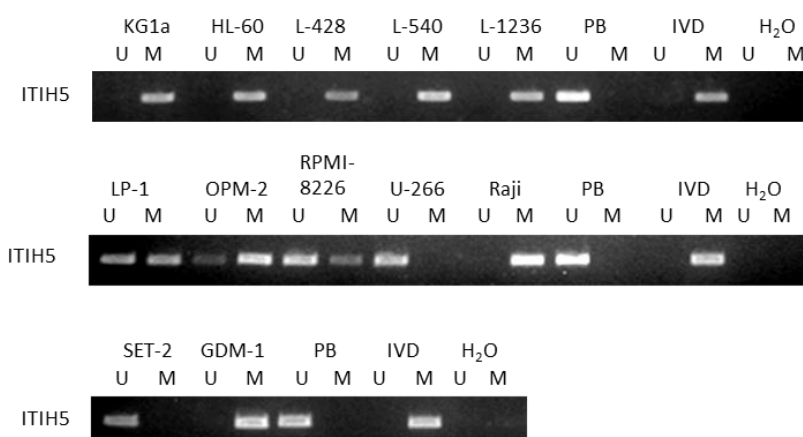


Abb. 4.1.1 MSP-Ergebnisse hämatologischer Zelllinien. Dargestellt sind die Ergebnisse der MSP für die verschiedenen hämatologischen Zelllinien (s. Kap. 3.2.3). PB: Periphere Blutproben gesunder Spender. IVD: *In vitro* methylierte DNA. H₂O: Wasserkontrolle. U: PCR-Produkt der unmethylierten Promotorsequenz. M: PCR-Produkt der methylierten Promotorsequenz.

Tab. 4.1.1 Übersicht über den Methylierungsstatus der *ITIH5*-Promotorregion in hämatologischen Zelllinien

Hämatologische Erkrankung	Zelllinie	ITIH5-Status
Akute myeloische Leukämie	KG1a	M
	HL-60	M
AML aus myeloproliferativer Neoplasie	GDM-1	M
	L-428	M
Hodgkin Lymphom	L-540	M
	L-1236	M
Burkitt-Lymphom	Raji	M
Essentielle Thrombozytämie	SET-2	U
Multiples Myelom	LP-1	U/M
	OPM-2	U/M
	RPMI-8226	U/M
	U-266	U

Es zeigte sich, dass alle drei AML-Zelllinien (HL-60, KG1a und GDM-1) einheitlich im Bereich des *ITIH5*-Promotors vollständig aberrant methyliert sind. Auch die Hodgkin-Lymphom-Zelllinien (L-428, L-540 und L-1236) und die Burkitt-Lymphom-Zelllinie Raji zeigten einheitlich eine vollständige Promotorhypermethylierung. Hingegen zeigten die MM-Zelllinien ein uneinheitliches Bild mit nur partiellen Methylierungen (LP-1, OPM-2, RPMI-8226) bzw. einer Zelllinie mit unmethylierter *ITIH5*-Promotorregion (U-266). Auch die ET-Zelllinie SET-2 aus der Gruppe der MPN besitzt einen unmethylierten *ITIH5*-Promotor.

4.2 Demethylierung des *ITIH5*-Promotors nach DAC-Behandlung

Ausgehend von dem Nachweis einer Promotorhypermethylierung des *ITIH5*-Gens in verschiedenen Zelllinien erfolgte anschließend die Untersuchung einer potenziellen Reversibilität der aberranten Methylierung unter Einsatz der demethylierenden Substanz DAC. Untersucht wurden die AML-Zelllinien HL-60 und KG1a, deren *ITIH5*-Promotor hypermethyliert ist (s. Kap. 4.1). Nach 96 stündiger Behandlung *in vitro* mit 1 μ M DAC wurden die Zelllinien erneut mittels MSP auf ihren Methylierungsstatus hin untersucht. Für die Zelllinien zeigte sich nach DAC-Behandlung in der MSP ein Signal der unmethylierten Sequenz (s. Abb. 4.2.1) und damit der Beweis für die Reversibilität der Hypermethylierung der *ITIH5*-Promotorregion. Es konnte also eine partielle Demethylierung erreicht werden, die potenziell eine Reexpression des *ITIH5*-Gens in den behandelten Zellen ermöglicht. Die ebenfalls im Bereich des *ITIH5*-Promotors hypermethylierte AML-Zelllinie GDM-1 wurde im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nicht mit DAC behandelt.

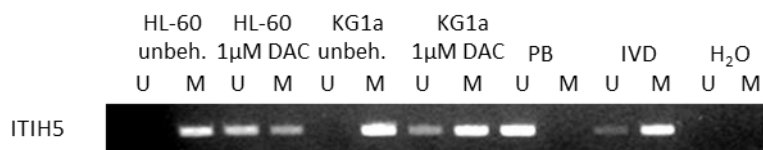


Abb. 4.2.1 MSP-Ergebnisse nach DAC-Behandlung hämatologischer Zelllinien. Dargestellt sind die Ergebnisse der MSP für zwei verschiedene AML-Zelllinien (s. Kap. 3.2.3). PB: Periphere Blutproben gesunder Spender. IVD: *In vitro* methylierte DNA. H₂O: Wasserkontrolle. U: PCR-Produkt der unmethylierten Promotorsequenz. M: PCR-Produkt der methylierten Promotorsequenz.

Um den Effekt der pharmakologisch induzierten Demethylierung mittels DAC-Behandlung auf die *ITIH5*-Expression in leukämischen Zelllinien zu objektivieren, könnte z.B. eine Analyse der Genexpressionsrate von *ITIH5* sowohl an Zelllinien, als auch anschließend in Patientenproben mittels *Real time quantitativer PCR* (RTq-PCR) erfolgen.

4.3 Hypermethylierung des *ITIH5*-Promotors nicht-maligner Zellen

Bei der Untersuchung des Methylierungsstatus des *ITIH5*-Promotors von 21 nicht malignen pB-Proben gesunder Probanden oder nicht-malignen KM-Proben von Patienten zeigte sich ein nahezu einheitliches Bild. Im untersuchten Kollektiv nicht maligner Proben zeigte sich lediglich bei einer pB-Probe eines gesunden Probanden eine partielle Methylierung des *ITIH5*-Promotors.

4.4 Das Patientenkollektiv

Ausgangsmaterial zur Untersuchung des *ITIH5*-Methylierungsstatus und die Erstellung eines Methylierungsprofils bei AML waren Proben aus KM oder pB von insgesamt 104 Patienten, gewonnen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einer AML. Diagnosestellung und Klassifikation erfolgten nach der FAB-Klassifikation. Aufgrund der distinkten Pathophysiologie, Behandlung und Überlebensrate wurden Proben mit Nachweis einer t(15;17) und damit des FAB-Subtyps M3 oder M3v (insgesamt 4 Proben) von der vorliegenden Untersuchung ausgeschlossen. Das Alter des untersuchten Patientenkollektivs betrug im Median 60 Jahre. Das Geschlechterverhältnis bei 50 untersuchten Proben männlicher und 54 Proben weiblicher Patienten betrug im Vergleich von Männern zu Frauen 1:1,1. Damit weichen die Daten der von uns untersuchten Population nur in geringem Maße von den in der aktuellen Literatur beschriebenen Werten (mittleres Erkrankungsalter 70 Jahre, Geschlechterverhältnis Männer zu Frauen 1,5:1) ab (Deschler & Lübbert, 2006). Auch die Verteilung der FAB-Subtypen innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs entspricht nahezu den allgemein beschriebenen Durchschnittswerten (vgl. hierzu Kap. 1.3.4). Abweichend stellt sich hier jedoch das verminderte Vorkommen des eigentlich häufigsten FAB-Subtyps M2 im untersuchten Kollektiv (13,5% vs. 25-30%) dar. Hingegen liegt der Subtyp M1 um ca. 10% und der Subtyp M4 um ca. 5% häufiger vor als im allgemein anerkannten Durchschnitt. Die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen vom Karyotyp bestimmten Risikogruppen entsprach annähernd dem Durchschnittsvorkommen (vgl. hierzu Tab. 1.3.4). Bei 13,5% der Proben waren keine Informationen über den Karyotyp verfügbar. Die wichtigsten Daten und klinischen Parameter des Patientenkollektivs sind in Tabelle 4.4.1, Abb. 4.4.1 und Abb. 4.4.2 zusammengestellt.

Tab. 4.4.1 Klinische und laborchemische Parameter des Patientenkollektivs

Anzahl Patienten, n	104
Alter (Jahre)	60,4 (21,0-89,1)
Altersgruppe, n	
Jung (≤ 59 Jahre)	54
Alt (≥ 60 Jahre)	50
Geschlecht, n	
männlich	50
weiblich	54
Probenmaterial, n	
Knochenmark	72
Peripherblut	32
Ätiologie, n	
<i>De novo</i> AML	80
AML aus MDS (s-AML)	24
FAB-Subtyp, n	
M0	5
M1	34
M2	14
M4	27
M4Eo	11
M5	11
M5a	1
M7	1
Risikogruppe, n	
günstig	16
intermediär	60
ungünstig	14
nicht definiert	14
Laborparameter	
WBC ($10^9/l$)	21,4 (0,9-354)
Hb (g/l)	91 (41-142)
Thrombozyten ($10^9/l$)	60,5 (3-680)
LDH (U/l)	496 (139-3761)

Für das Alter und die laborchemischen Messwerte ist jeweils der Zentralwert (Median) angegeben. Die Zahlen in Klammern zeigen jeweils den minimalen und den maximalen Wert an.

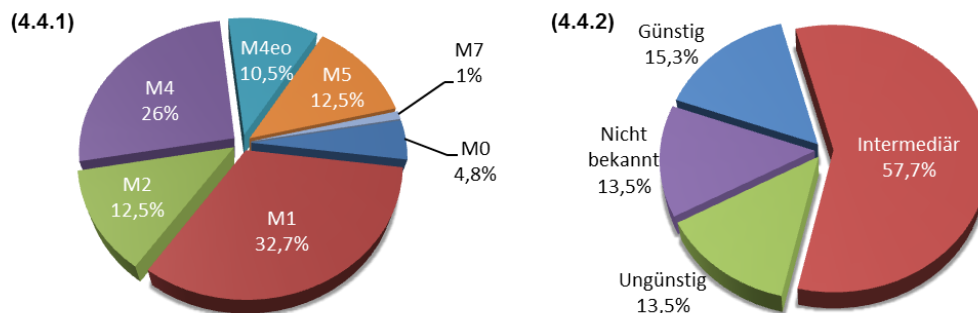


Abb. 4.4.1 & 4.4.2 Häufigkeit der verschiedenen FAB-Subtypen und der verschiedenen zytogenetischen Risikogruppen im untersuchten Patientenkollektiv (n=104).

4.5 *ITIH5*-Methylierungsstatus primärer AML-Patientenproben

Während alle drei untersuchten AML-Zelllinien (HL-60, KG1a und GDM-1) eine Hypermethylierung des *ITIH5*-Promotors aufwiesen, zeigten nur 15 der insgesamt 104 untersuchten primären Proben von Patienten mit AML eine zumindest partielle Hypermethylierung im Bereich der *ITIH5*-Promotorregion. Dies entspricht einem Anteil von 14,4%. Einen exemplarischen Auszug der erzielten MSP-Ergebnisse zeigt die Abbildung 4.5.1.

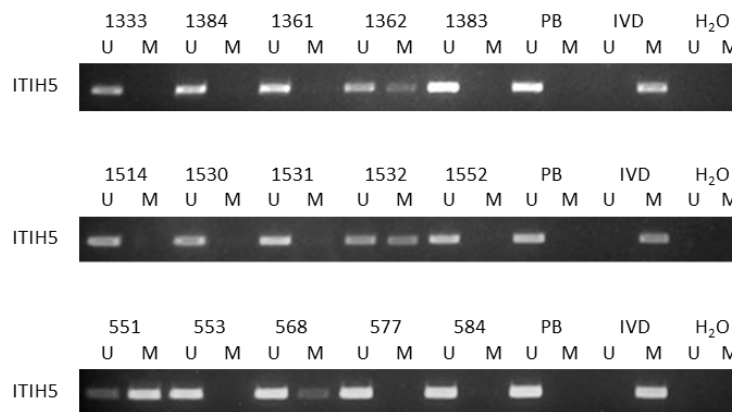


Abb. 4.5.1 MSP-Ergebnisse primärer Patientenproben. Dargestellt sind die Ergebnisse der MSP für ausgewählte Patientenproben. PB: Periphere Blutproben gesunder Spender. IVD: *In vitro* methylierte DNA. H₂O: Wasserkontrolle. U: PCR-Produkt der unmethylierten Promotorsequenz. M: PCR-Produkt der methylierten Promotorsequenz.

Ein positiver Methylierungsstatus korrelierte weder mit der Herkunft des gewonnenen Probenmaterials aus pB- oder KM-Proben ($p=0,33$), noch mit einer bestimmten Altersgruppe ($p=0,22$) oder einem bestimmten Geschlecht ($p=0,22$). Partielle Methylierungen traten im untersuchten Kollektiv lediglich bei den FAB-Subtypen M1, M4 und M4Eo auf (s. Abb. 4.5.2). Dieser Zusammenhang war jedoch ebenfalls nicht statistisch signifikant ($p=0,13$).

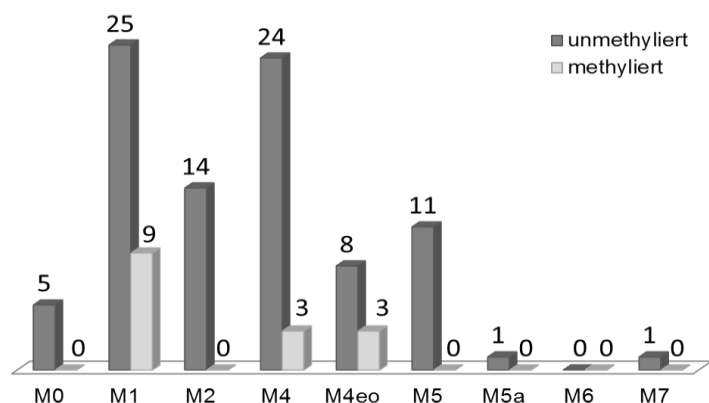


Abb. 4.5.2 Häufigkeit methylierter und unmethylierter Patientenproben in Korrelation zum FAB-Subtyp. Absolute Patientenzahlen mit entweder unmethylierter oder methylierter Promotorregion.

Ferner zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen positivem *ITIH5*-Methylierungsstatus und einer distinkten zytogenetischen Risikogruppe (günstig, intermediär oder ungünstig) ($p=0,32$) (s. hierzu Tab. 4.5.1). Methylierungen traten in allen Risikogruppen auf. Insgesamt zeigten 3 der 16 Proben (18,8%) mit günstigem zytogenetischem Risikoprofil eine *ITIH5*-Promotorhypermethylierung. Alle 3 Methylierungen traten bei Fällen des FAB-Subtyps M4eo mit *inv(16)* auf, was möglicherweise auf eine Assoziation dieses Karyotyps mit einer *ITIH5*-Hypermethylierung bei AML mit zytogenetisch günstigem Risikoprofil deutet. In der Gruppe mit intermediärem Risiko fand sich bei unmethyliertem sowie bei methyliertem *ITIH5*-Promotor in den meisten Fällen ein normaler Karyotyp. Die Methylierungsrate in der zytogenetisch ungünstigen Risikogruppe war auffallend niedrig (7,1%).

Tab. 4.5.1 Korrelation zwischen *ITIH5*-Methylierungsstatus und karyotypischem Risikoprofil

	<i>ITIH5</i> -Methylierung (%)
Patientenzahl gesamt (n=104)	14,4% (15/104)
Günstiges Risikoprofil (n=16)	18,8% (3/16)
- <i>inv(16)</i> (n=11)	27,3% (3/11)
- <i>t(8;21)</i> (n=5)	0%
Intermediäres Risikoprofil (n=60)	11,7% (7/60)
Ungünstiges Risikoprofil (n=14)	7,1% (1/14)
Karyotyp nicht bekannt (n=16)	28,6% (4/14)

Das günstige Risikoprofil beinhaltet die Karyotypen *inv(16)*, *t(16;16)* und *t(8;21)*. Das ungünstige Risikoprofil beschreibt die karyotypischen Veränderungen mit Multiliniendysplasie, *-5/del(5q)*, *-7/del(7q)* und *3q*-Veränderungen. Das intermediäre Risikoprofil beinhaltet alle anderen Formen zytogenetischer Aberrationen und die CN-AML, s. hierzu auch Tab. 1.3.4.

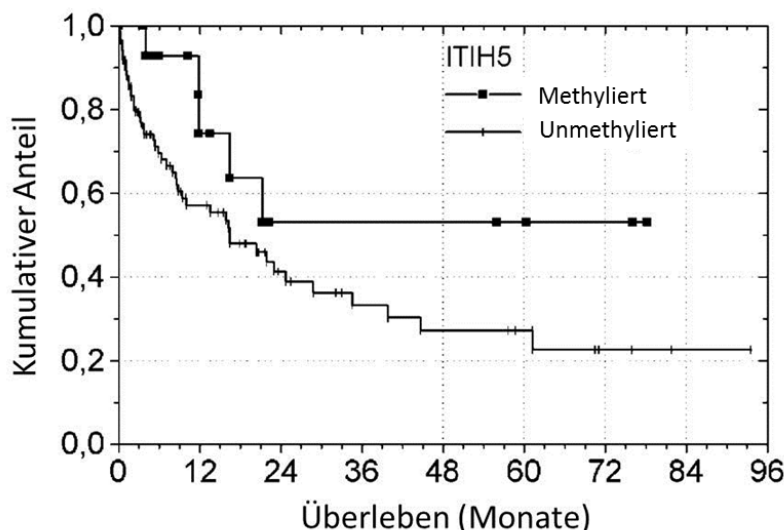


Abb. 4.5.3 Darstellung der Überlebenszeit der Patienten mit oder ohne Promotorhypermethylierung des *ITIH5*-Gens zum Zeitpunkt der Diagnose (n=104). Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang ($p=0,08$). Das Gesamtüberleben wird in der Gruppe der Patienten mit methyliertem *ITIH5*-Promotor nicht erreicht. Grund hierfür ist, dass entweder alle verbliebenen Patienten noch am Leben sind oder keine weiteren klinischen Untersuchungsdaten erfasst wurden.

Interessanterweise zeigte sich in der Gesamtüberlebenskurve (s. Abb. 4.5.3) ein Trend in Richtung eines Überlebensvorteils bei positivem *ITIH5*-Methylierungsstatus, wengleich dieser statistisch nicht signifikant war ($p=0,08$).

In der vergleichenden Analyse zwischen *ITIH5*-Methylierungsstatus und klinisch-laborchemischen Parametern konnte weder für den initialen Hämoglobin-Wert (Hb) ($p=0,48$), noch für die initialen Leukozyten- ($p=0,24$), die Thrombozytenzahlen ($p=0,70$) oder für den laborchemischen Parameter LDH ($p=0,34$) eine signifikante Korrelation nachgewiesen werden (s. hierzu Tab. 4.5.2).

Tab. 4.5.2 Korrelation zwischen Methylierungsstatus und laborchemischen Parametern

	Leukozyten ($10^9/l$)	Hb (g/l)	Thrombozyten ($10^9/l$)	LDH (U/l)
U	49,9	92,4	82	614
M	73,3	96,1	72	780

Jeweilige Mittelwerte der beiden Subpopulationen des Patientenkollektivs. U: Unmethylierter *ITIH5*-Promotor. M: Methylierter *ITIH5*-Promotor. Hb: Hämoglobin-Wert. LDH: Laktatdehydrogenase.

Tab. 4.5.3 Liste der untersuchten Patientenproben nach FAB-Subtyp

Probe	FAB	<i>ITIH5</i>	Probe	FAB	<i>ITIH5</i>	Probe	FAB	<i>ITIH5</i>
514	M0	U	1557	M1	U	1479	M4	U/M
561	M0	U	1615	M1	U	1481	M4	U
1083	M0	U	1665	M1	U	1497	M4	U
1448	M0	U	1671	M1	U	1498	M4	U
1655	M0	U	527	M2	U	1530	M4	U
516	M1	U	538	M2	U	1659	M4	U
532	M1	U	540	M2	U	1667	M4	U/M
536	M1	U	543	M2	U	1670	M4	U
544	M1	U	556	M2	U	1672	M4	U/M
546	M1	U	576	M2	U	1673	M4	U
558	M1	U/M	1156	M2	U	519	M4eo	U
568	M1	U/M	1158	M2	U	526	M4eo	U/M
572	M1	U	1166	M2	U	541	M4eo	U
583	M1	U/M	1383	M2	U	551	M4eo	U/M
587	M1	U	1429	M2	U	573	M4eo	U
1085	M1	U	1496	M2	U	589	M4eo	U
1155	M1	U	1514	M2	U	595	M4eo	U
1157	M1	U	1531	M2	U	1082	M4eo	U
1180	M1	U	512	M4	U	1328	M4eo	U
1182	M1	U	548	M4	U	1333	M4eo	U
1183	M1	U	549	M4	U	1656	M4eo	U/M
1269	M1	U/M	553	M4	U	505	M5	U
1300	M1	U/M	569	M4	U	528	M5	U
1302	M1	U	571	M4	U	534	M5	U
1361	M1	U	596	M4	U	535	M5	U
1362	M1	U/M	1044	M4	U	581	M5	U
1384	M1	U	1154	M4	U	584	M5	U
1386	M1	U	1298	M4	U	1181	M5	U
1486	M1	U/M	1299	M4	U	1305	M5	U
1488	M1	U	1321	M4	U	1616	M5	U
1489	M1	U/M	1341	M4	U	1627	M5	U
1495	M1	U	1449	M4	U	1635	M5	U
1532	M1	U/M	1452	M4	U	1480	M5a	U
1552	M1	U	1456	M4	U	577	M7	U
1554	M1	U	1464	M4	U			

Ein pink hinterlegtes Feld kennzeichnet eine vorliegende *ITIH5*-Promotorhypermethylierung der jeweiligen Patientenprobe. U: Signal der unmethylierten Sequenz. U/M: Signal der unmethylierten und methylierten Sequenz entsprechend einer Methylierung der *ITIH5*-Promotorregion in blastären Zellen und fehlender Methylierung bei anderen, nicht-malignen Zellen der jeweiligen Blutprobe.

5. Diskussion

5.1 Bedeutung der *ITIH5*-Promotorhypermethylierung bei AML

Epigenetische Prozesse kontrollieren Struktur und Funktion des menschlichen Genoms und sind sowohl bei physiologischen, als auch bei pathologischen Zuständen eines Organismus bedeutsam, dementsprechend auch bei malignen Erkrankungen. Die Rolle epigenetischer Aberrationen in der Pathogenese maligner Erkrankungen wird zunehmend erkannt. So konnte der Zusammenhang zwischen aberranter Methylierung von Promotorregionen und funktioneller Inaktivierung für verschiedenste Gene mit Involvierung in essentielle Signalwege, Zellzyklus und DNA-Reparaturmechanismen bei soliden Tumoren und hämatologischen Neoplasien identifiziert werden (Herman & Baylin, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Kandidatengen-Ansatz verfolgt. Dieser gründet auf der Annahme, dass ein untersuchtes Gen, in diesem Falle *ITIH5*, möglicherweise eine Schlüsselrolle in der Leukämogenese und damit in der Pathophysiologie der AML spielen könnte. *ITIH5* ist ein Protein der ECM mit ECM-stabilisierenden Eigenschaften und somit ein potenzielles Tumorsuppressorgen, dessen Rolle sowohl bei soliden Tumoren, als auch im Rahmen hämatologischer Neoplasien von großem Interesse ist. Eine Störung der Interaktion zwischen Geweben und ihrer umgebenden ECM führt zu Störungen physiologischer Prozesse, wie z.B. der ovariellen Follikelreifung, aber auch zur Progression maligner Erkrankungen mit Auftreten von Metastasierung und erhöhter Invasivität durch Adhäsionsverluste (Zhuo *et al.*, 2001). Insb. durch die Funktion des Bikunins als Plasmaprotease-Inhibitor und die ECM-stabilisierenden *ITIHs* üben *ITIs* hemmenden Einfluss auf Tumorprogress und Metastasierung aus (Kobayashi *et al.*, 1995; Bourguignon *et al.*, 1999, Paris *et al.*, 2002).

Gleichwohl ist die Rolle einer *ITIH5*-Expression oder dessen Dysregulation im Rahmen von Myelopoese oder Leukämogenese zum aktuellen Zeitpunkt nur unzureichend untersucht worden. Eine Expressionsanalyse von *ITIH5* in Knochenmark, Lymphknoten und verschiedensten anderen Geweben zeigte keine messbare *ITIH5*-Expression in Knochenmark oder Lymphknoten (Himmelfarb *et al.*, 2004). Dies ist jedoch für eine gezielte Untersuchung der Rolle einer *ITIH5*-Expression in der Myelopoese unzureichend, da hierbei die miteinander vermischte DNA der verschiedenen zellulären Bestandteile dieser Kompartimente untersucht wurde. Interessanterweise findet sich im

Knochenmark von AML-Patienten ein vermehrter HA-Gehalt der ECM, dessen funktionelle Bedeutung jedoch bislang nur unzureichend geklärt ist (Sundström *et al.*, 2005).

Die Untersuchung maligner hämatologischer Zelllinien auf aberrante Methylierung des *ITIH5*-Promotors zeigte bei allen drei untersuchten AML-Zelllinien (HL-60, KG1a und GDM-1) sowie bei allen untersuchten Hodgkin-Lymphom-Zelllinien (L-428, L-540, L-1236) und der untersuchten Burkitt-Lymphom-Zelllinie Raji eine vollständige Hypermethylierung der Zellen. Wir konnten damit zeigen, dass eine Promotorhypermethylierung des Tumorsuppressorgens *ITIH5* eine neue, bisher unbekannte epigenetische Aberration ist. Diese Resultate stützen die Annahme, dass *ITIH5*, bzw. dessen epigenetische Dysregulation, möglicherweise eine Rolle in der Genese der AML und bei malignen Lymphomen der B-Zellreihe spielt. Möglicher Mechanismus ist eine gestörte Interaktion zwischen umgebender ECM im KM und dem malignen leukämischen Klon.

Eine Vielzahl von Studien zeigte bereits, dass der Einsatz demethylierender Agenzien, insb. AZA oder DAC, *in vitro* zu einer Reexpression zuvor durch Hypermethylierung inaktivierter Tumorsuppressorgene führt (Herman & Baylin, 2003; Gilbert *et al.*, 2004). Der erfolgreiche Einsatz im Rahmen klinischer Studien führte mittlerweile zur Zulassung von AZA und DAC zur Behandlung des *high grade* MDS durch die FDA (Kaminskas *et al.*, 2005; Kantarjian *et al.*, 2006). Tumorstammzellen besitzen gehäuft Resistenzen gegenüber konventionellen Chemotherapeutika. Daher könnte ein klinischer Einsatz demethylierender Substanzen in Kombination mit konventioneller Chemotherapie oder anderen epigenetisch wirksamen Substanzen durch Reinduktion eines physiologischen Genexpressionsmusters möglicherweise das Therapieansprechen verbessern, eine epigenetisch bedingte Chemotherapieresistenz aufheben, die Remissionsdauer verlängern oder günstigen Einfluss im Rahmen einer remissionserhaltenden Therapie nach einem ersten Rezidiv oder nach allogener SZT haben. So konnte z.B. bei testikulären Keimzelltumoren die Überwindung einer initialen Resistenz gegenüber standardmäßig *Cisplatin*-haltiger Chemotherapie durch den Einsatz von AZA erreicht werden (Beyrouthy *et al.*, 2009). Nachteil bisheriger epigenetischer Therapieansätze ist die mangelnde Spezifität der eingesetzten Pharmaka. AZA und DAC induzieren eine globale DNA-Hypomethylierung mit dem Risiko einer ungerichteten Aktivierung von Onkogenen oder Transposonen in gesunden Zellen und wirken damit wiederum potenziell mutagen (Egger *et al.*, 2004; Yoo & Jones, 2006). So

wurde beispielsweise im Mausmodell bei der Testung epigenetischer Therapien ein vermehrtes Auftreten maligner Lymphome beobachtet (Jones & Baylin, 2007).

Die vorliegenden Ergebnisse der Methylierungsanalyse der AML-Zelllinien KG1a und HL-60 vor und nach demethylierender DAC-Behandlung zeigen eine DAC-induzierte partielle Demethylierung des zuvor vollständig methylierten *ITIH5*-Promotors. Dies belegt die Reversibilität der *ITIH5*-Hypermethylierung. Die physiologische Bedeutung einer Demethylierung von *ITIH5* sollte durch eine Analyse der Expressionsrate vor und nach DAC-Behandlung, z.B. mittels RTq-PCR, objektiviert werden. Möglicherweise trägt eine medikamentös induzierte Demethylierung des *ITIH5*-Promotors zum günstigen Effekt einer Therapie mit demethylierenden Agenzien bei AML bei.

Bei der anschließenden Untersuchung von 104 AML-Patientenproben ließ sich in 14,4% (15/104) der Fälle eine aberrante Methylierung im Bereich des *ITIH5*-Promotors nachweisen. In der statistischen Auswertung zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen einem positivem Methylierungsstatus und FAB-Subtyp, zytogenetischer Risikogruppe oder den laborchemischen Parametern Hb, initiale Leukozyten- und Thrombozytenzahl oder der LDH. In der günstigen Risikogruppe trat eine *ITIH5*-Methylierung zwar einzig bei Fällen mit dem zytogenetischen Merkmal einer Inversion von Chromosom 16 (inv(16)) auf, eine Bestätigung dieser Assoziation durch prospektive Untersuchung größerer Patientenkollektive bleibt jedoch abzuwarten. Ebenso wenig zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem *ITIH5*-Methylierungsstatus und dem Gesamtüberleben. Hier zeichnet sich jedoch überraschend ein Trend in Richtung eines Überlebensvorteils bei hypermethyliertem *ITIH5*-Promotor ($p=0,08$) ab (s. hierzu auch Abb. 4.5.3). Ursächlich hierfür könnte sein, dass im untersuchten Kollektiv eine aberrante *ITIH5*-Hypermethylierung allein bei günstigem oder intermediärem, nicht jedoch bei Patienten mit ungünstigem Risiko auftrat. Da unser untersuchtes Patientenkollektiv mit insgesamt 104 Patientenproben recht klein und sehr heterogen in Bezug auf Alter, Risikoprofil und applizierte Therapieregime war, kann anhand der vorliegenden Daten jedoch kein definitiver Schluss im Hinblick auf die prognostische Bedeutung einer *ITIH5*-Hypermethylierung gezogen werden. So sollte auch hierfür eine Charakterisierung des *ITIH5*-Methylierungsstatus als Biomarker bei AML im Rahmen von Untersuchungen größerer, risikoadaptierter Patientenkollektive abgewartet werden.

Das Fehlen einer signifikanten Korrelation zwischen *ITIH5*-Methylierungsstatus und distinkten klinischen oder laborchemischen Charakteristika einer AML bedeutet demnach nicht, dass eine Dysregulation von *ITIH5* keine Bedeutung für die Myelopoese oder Leukämogenese hat. Vielmehr scheint eine epigenetische *ITIH5*-Dysregulation bei einem kleinen Anteil der AML-Fälle einen Teilaspekt der leukämischen Entartung darzustellen. Der statistische Trend für einen Zusammenhang zwischen *ITIH5*-Hypermethylierung und erhöhter Leukozytenzahl ($p=0,24$) könnte möglicherweise in einer gestörten Interaktion zwischen der ECM und der leukämischen Blastenpopulation mit gestörter Zell-Matrix-Adhäsion und konsekutiv erhöhten peripheren Leukozyten- und insb. Blastenzahlen begründet sein.

Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass distinkte epigenetische Alterationen einer Vielzahl von Genen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese maligner Erkrankungen spielen (Herman & Baylin, 2003; Galm *et al.*, 2006). Außerdem unterscheiden sich einzelne Tumorentitäten auch durch ihr Muster epigenetischer Aberrationen, sodass mit Hilfe der Methylierungsanalyse erkrankungsspezifische Methylierungsmuster, z.B. bei kolorektalen Karzinomen oder hämatologischen Neoplasien, identifiziert werden konnten (Toyota *et al.*, 1999; Galm *et al.*, 2006; Jones & Baylin, 2007). Dies führte in einer genomweiten Methylierungsanalyse eines großen Patientenkollektivs mit AML zur Identifikation Subtyp-spezifischer Methylierungsmuster und zur Detektion neuer methylierungsassoziierter Subtypen (Figueroa *et al.*, 2010a).

Für *ITIH5* konnte bislang in vorangegangenen Studien eine Bedeutung als prognostisch relevanter Biomarker beim invasiv-duktalem Mammakarzinom nachgewiesen werden. Eine epigenetische Inaktivierung von *ITIH5* korreliert mit einer signifikant schlechteren Prognose (Veeck *et al.*, 2008a). Ferner liegen Hinweise auf das Bestehen einer *ITIH5*-Dysregulation bei schlecht-differenzierten Schilddrüsenkarzinomen vor (Pita *et al.*, 2009).

Zur Klärung der Funktion des *ITIH5*-Genproduktes im Rahmen der Physiologie der Myelopoese, sowie für die Pathophysiologie der Leukämogenese bedarf es in Zukunft weiterer experimenteller Studien. Um die physiologische Bedeutung von *ITIH5* für die Interaktion zwischen ECM und myeloischen Zellen bzw. deren CD34-positiven Vorläufern in der Myelopoese und ferner zwischen ECM und leukämischem Zellklon in der Leukämogenese zu erhalten, wäre eine Expressionsanalyse an isolierten

myeloischen Zellen, deren CD34-positiven Vorläufern und leukämischen Zellen notwendig. In einem weiteren Schritt sollte eine Klärung der physiologischen Relevanz der Methylierung des *ITIH5*-Promotors durch eine Expressionsanalyse des *ITIH5*-Gens sowohl an gesunden, unmethylierten Zellstadien der myeloischen Differenzierung, als auch anschließend an isolierten leukämischen Zellpopulationen erfolgen. Interessant wäre, ob *ITIH5* im Rahmen der Myelopoese exprimiert wird und inwiefern die aberrante Promotorhypermethylierung die *ITIH5*-Expression beeinflusst und damit zum Prozess der malignen Entartung beiträgt.

5.2 Bewertung der Methodik

Die MSP ist eine schnelle, kosteneffektive und hochempfindliche Methode für die Analyse des Methylierungsstatus praktisch jeder CpG-reichen Region des Genoms. Die MSP detektiert methylierte Allele mit einer Nachweisgrenze von 0,1% und kann ausgehend von nur kleinen DNA-Probenmengen aus frischem, kryokonserviertem Gewebe, KM, pB und anderen Körperflüssigkeiten, sowie aus paraffineingebettetem Gewebe erfolgen (Herman *et al.*, 1996; Galm *et al.*, 2006). Die MSP kann allerdings nur unter Berücksichtigung entsprechender Kontrollreaktionen valide Ergebnisse liefern. Erforderlich ist das Vorliegen einer Kontrolle der Reaktionen sowohl für die unmethylierte (U-Kontrolle), als auch die methylierte (M-Kontrolle) Sequenz. Als U-Kontrolle dienen in der Regel DNA-Proben von gesunden Spendern, da man annimmt, dass die DNA gesunder Spender keine Hypermethylierung in Promotorregionen aufweist. Störfaktor hierbei kann das Vorliegen partieller, physiologisch scheinbar vollkommen irrelevanter Promotorhypermethylierungen in verwendeten U-Kontrollen sein, da per MSP auch minimale Methylierungsraten von ca. 3% erfasst werden können. Dies bedingt eine fragliche Einschränkung der Spezifität der MSP. Zur Ausräumung dieser Problematik befinden sich mittlerweile neue, sensitivere Verfahren, wie z.B. die Pyrosequenzierung in praktischem Gebrauch.

Ein Vorteil der Untersuchung von pB- oder KM-Proben besteht in der leichten Gewinnung einer großen, vitalen Zellpopulation, was eine bessere Qualität der DNA als z.B. bei paraffineingebetteten Gewebeproben bietet. Das Problem der Untersuchung solcher Proben von Patienten mit hämatologischen Neoplasien besteht jedoch darin, dass eine Mischung der DNA sowohl des malignen Zellklons, als auch gesunder zellulärer Blutbestandteile vorliegt. Dies begründet, dass bei der Detektion einer Methylierung des jeweiligen untersuchten Gens im malignen Zellklon immer auch ein Signal der unmethylierten Sequenz aus der DNA der gesunden Blutbestandteile nachzuweisen ist. Aus genau diesem Grund wäre eine quantitative Methylierungsanalyse aus pB oder KM ohne vorherige Isolation des leukämischen Zellklons nur bedingt als repräsentativ zu bewerten (Galm & Herman, 2005).

Die MSP beruht auf den Unterschieden zwischen methylierten und unmethylierten Allelen der DNA-Sequenz, welche im Rahmen der Behandlung der DNA mit Natriumbisulfit entstehen und mit Hilfe sequenzspezifischer Primer nachgewiesen werden. Die Wahl einer funktionell geeigneten Region im Promotor eines Gens ist für das Primer-Design und für einen validen qualitativen Nachweis aberranter

Promotorhypermethylierung der entscheidende Faktor. Die Primer dürfen sich nur an mit Natriumbisulfit behandelte DNA anlagern, um eine Amplifikation eventuell artifiziell anwesender DNA zu vermeiden. Ferner muss anhand der spezifischen Primer-Paare zwischen methylierter und unmethylierter DNA-Sequenz unterschieden werden können (Herman *et al.*, 1996; Galm & Herman, 2005). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer binden spezifisch im Bereich der *ITIH5*-Promotorregion und gewährleisten die Amplifikation und damit den verlässlichen qualitativen Nachweis aberranter Hypermethylierung des *ITIH5*-Gens. Da jedoch durch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primerpaare je nur zwei CpG-Dinukleotide detektiert werden, könnte bei Auftreten heterogener Methylierungsmuster in der Promotorregion in einer Vielzahl von Proben fälschlicherweise eine zu hohe oder aber zu niedrige Methylierungsrate detektiert werden.

Es bleibt zu klären, inwiefern die in dieser Arbeit demonstrierte Hypermethylierung der untersuchten Region mit einer transkriptionalen Inaktivierung einhergeht. Im Vergleich zu den in der Arbeit von Veeck *et al.* zur Untersuchung des *ITIH5*-Methylierungsstatus bei Mammakarzinomen verwendeten Primer, binden die in dieser Arbeit verwendeten Primer näher am Transkriptionsstart im Bereich des ersten Exons. Dies lässt eine höhere Sensitivität der Erfassung einer Hypermethylierung der Promotorregion erwarten, welche möglicherweise größeren Einfluss auf eine transkriptionale Inaktivierung ausübt.

Voraussetzung für die MSP ist die vorherige Bisulfitkonversion der genomischen DNA. Ein Problem dieser Bisulfitbehandlung von DNA-Proben ist die mögliche artifizielle unvollständige Konversion von unmethylierten Cytosinbasen zu Uracil. Grund hierfür ist eine mangelnde Denaturierung der DNA, da Bisulfit nur mit Cytosinbasen reagiert, welche nicht an der Basenpaarung beteiligt sind, oder eine lokalisierte Renaturierung des DNA-Doppelstranges im Verlauf der Natriumbisulfit-Behandlung. Ferner erfolgt während der 16-stündigen Inkubationszeit eine spontane Konversion von maximal 2-5% aller m⁵C-Reste zu Thymin. Auch die Verwendung größerer DNA-Mengen als 1 µg DNA pro Natriumbisulfit-Reaktion birgt die Gefahr der unvollständigen Konversion. Artefakte dieser Art können zu einer Verfälschung der Signale für die methylierte DNA-Sequenz führen.

6. Zusammenfassung

Die Bedeutung epigenetischer Prozesse für die Pathogenese maligner Entartung wird zunehmend erkannt und liefert wichtige Informationen über die komplexe Pathophysiologie von Malignomen. Die Promotorhypermethylierung induziert in Interaktion mit Histonmodifikationen eine transkriptionale Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Dieser molekulare Mechanismus ist funktionell gleichbedeutend mit inaktivierenden genetischen Aberrationen (Herman & Baylin, 2003). Die Korrelation von klinischen Parametern und aberranten Methylierungsmustern deutet auf einen potenziellen Nutzen epigenetischer Faktoren als Biomarker für Risikostratifizierung, Prognose und Wahl der adäquaten Therapie hin. Daher erlauben Untersuchungen epigenetischer Veränderungen ein besseres Verständnis der Pathophysiologie solider Tumoren und hämatologischer Neoplasien, wie z.B. der AML.

Bei der AML sind bereits eine Vielzahl von Tumorsuppressorgenen identifiziert worden, die epigenetischen Aberrationen unterliegen (Galm *et al.*, 2006). Die Heterogenität der AML impliziert, dass auch die Akkumulation von Veränderungen im Epigenom zum Prozess der Leukämogenese beiträgt. Epigenetische Untersuchungen bei AML erlauben daher eine sensitivere Risikostratifizierung und die Identifikation neuer Therapieansätze, welche das Epigenom der malignen Blasten gezielt beeinflussen.

Die Bedeutung des in dieser Arbeit untersuchten Kandidatengens *ITIH5* für die Myelopoese sowie die Leukämogenese ist aktuell noch nicht hinreichend geklärt. Das Auftreten einer Hypermethylierung des *ITIH5*-Promotors in AML-Zelllinien, primären AML-Patientenproben sowie in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien definiert jedoch eine neue epigenetische Aberration bei diesen verschiedenen hämatologischen Neoplasien. Eine aberrante *ITIH5*-Hypermethylierung konnte in 14,4% (15/104) der primären AML-Proben von Patienten aller Risikogruppen nachgewiesen werden. Eine Dysregulation des *ITIH5*-Gens trägt somit potenziell zum Prozess der Leukämogenese bei. Der zugrundeliegende Mechanismus könnte eine verminderte Interaktion zwischen malignem Zellklon und umgebender ECM mit konsekutiv verminderter Zelladhäsion, erhöhten peripheren Blastenzahlen und erhöhtem Zellumsatz sein. Es besteht keine signifikante Korrelation einer *ITIH5*-Hypermethylierung mit klinisch-prognostischen Parametern. Die aberrante *ITIH5*-Hypermethylierung ist demnach kein unabhängiger prognostischer Faktor bei AML, wie es kürzlich für Mammakarzinome beschrieben wurde (Veeck *et al.*, 2008a).

7. Ausblick

Die AML stellt eine heterogene Gruppe von Ausreifungsstörungen der myeloischen Zellreihe dar. Die Identifikation distinkter zytogenetischer Aberrationen ermöglicht eine prognostisch bedeutsame Risikoeinteilung innerhalb dieser heterogenen Gruppe. Die Entdeckung neuer molekularer Marker erlaubt eine weitergehende Risikostratifizierung, v.a. bei der CN-AML, die ca. 40-50% aller AML-Fälle darstellt. Da eine AML jedoch nicht einheitlich auf dem Boden einer einzelnen Aberration entsteht, ist der Verlauf sehr variabel und es fehlt aktuell, mit Ausnahme der APL, an individuell optimierten Therapieregimen. Aber aufgrund der Heterogenität wird eine molekular zielgerichtete Behandlung einzelner Läsionen allein wahrscheinlich nicht ausreichen (Karp, 2008).

Zur Optimierung einer risikoadaptierten, individualisierten Therapie der verschiedenen AML-Subtypen bedarf es daher der weiteren Identifikation molekularer Markerprofile und entsprechend optimierter Therapieoptionen. Hierfür ist die klinische Testung neuer molekular zielgerichteter Agenzien als *Single agents*, in Kombination miteinander oder kombiniert mit etablierten Therapien ein aussichtsreicher Ansatz (Karp, 2008). Beispielsweise befindet sich aktuell eine aktive Immunisierung mit T-Zell-Aktivierung gegen leukämische Blasten, beruhend auf molekulargenetischen Alterationen wie z.B. einer WT1-Überexpression, in pharmakologischer Entwicklung (Gore, 2008).

In der letzten Dekade sind epigenetische Aberrationen, insb. DNA-Methylierung und Histonmodifikationen, in den Fokus der onkologisch-hämatologischen Forschung gerückt. Diese Veränderungen sind Teil eines komplexen epigenetischen Netzwerkes, welches Struktur und Funktion des humanen Genoms kontrolliert und die Transkription insb. von Tumorsuppressorgenen reguliert. Der Einfluss von Veränderungen des Epigenoms auf physiologische und pathologische Zustände stellt damit eine wichtige Komponente im Spektrum der bisher bekannten pathophysiologischen Mechanismen maligner Entartung dar. Die Identifikation erkrankungsspezifischer Unterschiede im Epigenom, z.B. der DNA-Methylierung, verschiedener Subtypen maligner Erkrankungen deutet auf einen Nutzen epigenetischer Aberrationen als Biomarker für Risikostratifizierung und Optimierung der jeweiligen Therapiestrategien hin. Die Herausforderung wird also sein, neue epigenetische Biomarker in der klinischen Praxis zu etablieren (Baylin & Jones, 2011).

Ein Fortschritt bzgl. der essentiellen Bedeutung des Epigenoms für Gesundheit und Krankheit ist die Initiation des *Human Epigenome Project*, dessen Zweck die

Identifikation aller chemischen Veränderungen und Interaktionen der Chromatin-komponenten ist, um so Entwicklungs- und Alterungsprozesse sowie Ursprünge einer abnormen Genregulation bei Tumoren nachzuvollziehen (Jones & Martienssen, 2005).

Epigenetische Aberrationen sind potenziell reversibel und bieten damit einen interessanten Therapieansatz. Die in dieser Arbeit beobachtete Reversibilität der *ITIH5*-Promotorhypermethylierung durch Inkubation ursprünglich hypermethylierter AML-Zelllinien mit dem demethylierenden Agens DAC bestätigt die bereits in klinischen Studien beobachtete Wirkung dieses epigenetischen Therapieansatzes bei der AML. Die nebenwirkungsarme Therapie mit MTIs ist durch die FDA bereits zur Behandlung des *high risk* MDS (nach IPSS) zugelassen, der Einsatz von HDACs ist bereits bei kutanen T-Zelllymphomen eine anerkannte Therapieoption.

Zukünftige Aufgabe wird es sein die genauen Wirkungsmechanismen epigenetischer Therapien mit MTIs und HDACIs zu definieren sowie den Nutzen einer epigenetischen Therapie in Bezug auf geeignete Kombinationen untereinander oder mit anderen Therapiemodalitäten und zur Überwindung einer bestehenden Chemotherapieresistenz zu evaluieren (Baylin & Jones, 2011). Daher gibt es aktuell eine Vielzahl von Studien, die den Einsatz von MTIs allein oder kombiniert mit anderen epigenetisch wirksamen Substanzen (HDACIs) oder zusammen mit konventionellen Chemotherapien z.B. im Rahmen einer remissionserhaltenden Therapie oder zur Induktion bei Patienten, für welche eine hochdosierte Chemotherapie nicht in Frage kommt, austesten (Gore, 2008).

Die Fortschritte in der epigenetischen Forschung werden ein somit wachsendes Verständnis der Pathophysiologie maligner Erkrankungen erbringen. Es werden in Zukunft sowohl neue Biomarker identifiziert werden, die zur Individualisierung von Diagnostik und Prognosebewertung dienen, als auch vielversprechende Ansatzpunkte für Therapien entdeckt werden, welche eine gezielte Beeinflussung maligner Zellen durch die Regeneration eines physiologischen Epigenoms sowie eine verbesserte Wirksamkeit etablierter Therapien durch epigenetische Modifikationen erlauben. Epigenetische Therapien werden zukünftig vielleicht auch eine therapeutische Option bei AML oder soliden Tumoren bieten. Ferner kann die Untersuchung krankheitsspezifischer Methylierungsmuster z.B. als molekularer Marker einen bedeutenden Beitrag zur Detektion einer MRD in CR bei hämatologischen Neoplasien leisten und durch die Anzeige eines erhöhten Rezidivrisikos die langfristigen Therapieerfolge positiv beeinflussen (Agrawal *et al.*, 2007).

III Literaturverzeichnis

- Agrawal, S., Unterberg, M., Koschmieder, S. *et al.*, 2007. DNA methylation of tumor suppressor genes in clinical remission predicts the relapse risk in acute myeloid leukemia. *Cancer Research*, 67(3), 1370-77.
- Appelbaum, F.R., Gundacker, H., Head, D.R. *et al.*, 2006. Age and acute myeloid leukemia. *Blood*, 107(9), 3481-85.
- Bachman, K.E., Herman J.G., Corn P.G. *et al.*, 1999. Methylation-associated silencing of the *tissue inhibitor of metalloproteinase-3* gene suggests a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Research*, 59(4), 798-802.
- Baldus, C.D., Tanner, S.M., Ruppert, A.S. *et al.*, 2003. *BAALC* expression predicts clinical outcome of *de novo* acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood*, 102(5), 1613-18.
- Ballestar, E. & Esteller, M., 2002. The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing. *Carcinogenesis*, 23(7), 1103-09.
- Baylin, S.B. & Herman, J.G., 2000. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends in Genetics*, 16(4), 168-74.
- Baylin, S.B., Esteller, M., Rountree M.R. *et al.*, 2001. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Human Molecular Genetics*, 10(7), 687-92.
- Baylin, S.B. & Jones, P.A., 2011. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nature Reviews Cancer*, 11(10), 726-34.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T. *et al.*, 1976. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British Journal of Haematology*, 33(4), 451-58.
- Bestor, T.H., 2005. Transposons reanimated in mice. *Cell*, 122(3), 322-25.
- Beyrouthy, M.J., Garner, K.M., Hever, M.P. *et al.*, 2009. High DNA methyltransferase 3B expression mediates 5-Aza-Deoxycytidine hypersensitivity in testicular germ cell tumors. *Cancer Research*, 69(24), 9360-6.
- Bhatia, R., McGlave, P.B., Dewald, G.W. *et al.*, 1995. Abnormal function of the bone marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia: role of malignant stromal macrophages. *Blood*, 85(12), 3636-45.
- Bird, A.P. & Wolffe, A.P., 1999. Methylation-induced repression - belts, braces, and chromatin. *Cell*, 99(5), 451-54.
- Bird, A., 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, 16(1), 6-21.
- Bonnet, D., 2005. Normal and leukaemic stem cells. *British Journal of Haematology*, 130(4), 469-79.
- Bornhäuser, M., Illmer, T., Schaich, M. *et al.*, 2007. Improved outcome after stem-cell transplantation in FLT3/ITD-positive AML. *Blood*, 109(5), 2264-65.
- Bos, J.L., 1989. *ras* oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Research*, 49(17), 4682-89.
- Bost, F., Diarra-Mehrpour, M. & Martin, J.P., 1998. Inter-alpha-trypsin inhibitor proteoglycan family - a group of proteins binding and stabilizing the extracellular matrix. *European Journal of Biochemistry*, 252(3), 339-46.
- Bourguignon, J., Borghi, H., Sesboué, R. *et al.*, 1999. Immunohistochemical distribution of inter-alpha-trypsin inhibitor chains in normal and malignant human lung tissue. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 47(12), 1625-32.
- Byrd, J.C., Mrózek, K., Dodge, R.K. *et al.*, 2002. 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(13), 4325-36.
- Cameron, E.E., Bachman, K.E., Myöhänen, S. *et al.*, 1999. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nature Genetics*, 21(1), 103-07.

- Chen, L., Mao, S.J., McLean, L.R. *et al.*, 1994. Proteins of the inter-alpha-trypsin inhibitor family stabilize the cumulus extracellular matrix through their direct binding with hyaluronic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(45), 28282-87.
- Cheson, B.D., Bennett, J.M., Kopecky, K.J. *et al.*, 2003. Revised recommendations of the International Working Group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 21(24), 4642-49.
- Cilloni, D., Renneville, A., Hermitte, F. *et al.*, 2009. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized *WT1* assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *Journal of Clinical Oncology*, 27(31), 5195-201.
- Clark, S.J., Harrison, J., Paul, C.L. *et al.*, 1994. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Research*, 22(15), 2990-97.
- Colombatti, A. & Bonaldo, P., 1991. The superfamily of proteins with von Willebrand factor type A-like domains: one theme common to components of extracellular matrix, hemostasis, cellular adhesion, and defense mechanisms. *Blood*, 77(11), 2305-15.
- Costello, J.F., Frühwald, M.C., Smiraglia, D.J. *et al.*, 2000. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nature Genetics*, 24(2), 132-38.
- Craig, F.E. & Foon, K.A., 2008. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*, 111(8), 3941-67.
- Dai, Y., Chen, S., Wang, L. *et al.*, 2011. Bortezomib interacts synergistically with belinostat in human acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia cells in association with perturbations in NF- κ B and Bim. *British Journal of Haematology*, in press.
- Damm, F., Oberacker, T., Thol, F. *et al.*, 2011. Prognostic importance of histone methyltransferase *MLL5* expression in acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 29(6), 682-9.
- Deschler, B. & Lübbert, M., 2006. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*, 107(9), 2099-2107.
- Diarra-Mehrpour, M., Bourguignon, J., Sesboüé R. *et al.*, 1989. Human plasma inter-alpha-trypsin inhibitor is encoded by four genes on three chromosomes. *European Journal of Biochemistry*, 179(1), 147-54.
- Döhner, H., Estey, E.H., Amadori, S. *et al.*, 2009. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 115(3), 453-74.
- Döhner, K., Schlenk R.F., Habdank, M. *et al.*, 2005. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*, 106(12), 3740-46.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. *et al.*, 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429(6990), 457-63.
- Ehrlich, M., 2002. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*, 21(35), 5400-13.
- Enghild, J.J., Salvesen, G., Hefta, S.A. *et al.*, 1991. Chondroitin 4-sulfate covalently cross-links the chains of the human blood protein pre-alpha-inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(2), 747-51.
- Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E. *et al.*, 2000a. Inactivation of the DNA-repair gene *MGMT* and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *The New England Journal of Medicine*, 343(19), 1350-54.
- Esteller, M., Tortola, S., Toyota, M. *et al.*, 2000b. Hypermethylation-associated inactivation of *p14(ARF)* is independent of *p16(INK4a)* methylation and *p53* mutational status. *Cancer Research*, 60(1), 129-33.
- Esteller, M., Corn, P.G., Baylin, S.B. *et al.*, 2001. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Research*, 61(8), 3225-29.
- Esteller, M., 2002. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*, 21(35), 5427-40.
- Esteller, M., 2008. Epigenetics in cancer. *The New England Journal of Medicine*, 358(11), 1148-59.

- Estey, E. & Döhner, H., 2006. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*, 368(9550), 1894-907.
- Fahrner, J.A., Eguchi, S., Herman, J.G. *et al.*, 2002. Dependence of histone modifications and gene expression on DNA hypermethylation in cancer. *Cancer Research*, 62(24), 7213-18.
- Fehniger, T.A., Byrd, J.C., Marcucci, G. *et al.*, 2009. Single-agent lenalidomide induces complete remission of acute myeloid leukemia in patients with isolated trisomy 13. *Blood*, 113(5), 1002-05.
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B., 1983. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, 301(5895), 89-92.
- Feinberg, A.P. & Tycko, B., 2004. The history of cancer epigenetics. *Nature Reviews Cancer*, 4(2), 143-53.
- Feldman, E.J., Brandwein, J., Stone, R. *et al.*, 2005. Phase III randomized multicenter study of a humanized anti-CD33 monoclonal antibody, lintuzumab, in combination with chemotherapy, versus chemotherapy alone in patients with refractory or first-relapsed acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 23(18), 4110-16.
- Felsenfeld, G., 1996. Chromatin unfolds. *Cell*, 86(1), 13-19.
- Fiedler, W., Mesters, R., Tinnefeld, H. *et al.*, 2003. A phase 2 clinical study of SU5416 in patients with refractory acute myeloid leukemia. *Blood*, 102(8), 2763-67.
- Figueroa, M.E., Skrabanek, L., Li, Y. *et al.*, 2009. MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood*, 114(16), 3448-58.
- Figueroa, M.E., Lugthart, S., Li, Y. *et al.*, 2010a. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 17(1), 13-27.
- Figueroa, M.E., Abdel-Wahab, O., Chao, L. *et al.*, 2010b. Leukemic *IDH1* and *IDH2* mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*, 18(6), 553-67.
- Fischle, W., Wang, Y. & Allis, C.D., 2003. Histone and chromatin cross-talk. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(2), 172-83.
- Fraga, M.F., Ballestar, E., Villar-Garea, A. *et al.*, 2005. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature Genetics*, 37(4), 391-400.
- Friend, S.H., Bernards, R., Rogelj, S. *et al.*, 1986. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, 323(6089), 643-46.
- Galm, O. & Herman, J.G., 2005. Methylation-specific polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Medicine*, 113, 279-91.
- Galm, O., Herman, J.G. & Baylin, S.B., 2006. The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. *Blood Reviews*, 20(1), 1-13.
- Gebhard, C., Benner, C., Ehrlich, M. *et al.*, 2010. General transcription factor binding at CpG islands in normal cells correlates with resistance to *de novo* DNA methylation in cancer cells. *Cancer Research*, 70(4), 1398-407.
- Ghavamzadeh, A., Alimoghaddam, K., Rostami, S. *et al.*, 2011. Phase II Study of Single-Agent Arsenic Trioxide for the Front-Line Therapy of Acute Promyelocytic Leukemia. *Journal Of Clinical Oncology*, 29(20), 2753-7.
- Gilbert, J., Gore, S.D., Herman, J.G. *et al.*, 2004. The clinical application of targeting cancer through histone acetylation and hypomethylation. *Clinical Cancer Research*, 10(14), 4589-96.
- Gore, S.D., 2008. New agents for the treatment of AML: recent study findings. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*, 6(11), Suppl. 18, 6-8.
- Gorrello, P., Cazzaniga, G., Alberti, F. *et al.*, 2006. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying *nucleophosmin (NPM1)* gene mutations. *Leukemia*, 20(6), 1103-8.
- Graff, J.R., Herman, J.G., Lapidus, R.G. *et al.*, 1995. *E-cadherin* expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Research*, 55(22), 5195-99.
- Green, C.L., Evans, C.M., Hills, R.K. *et al.*, 2010. The prognostic significance if *IDH1* mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia is dependent on *FTL3/ITD* status. *Blood*, 116(15), 2779-82.

- Grimwade, D., Walker, H., Oliver, F. *et al.*, 1998. 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(7), 2322-33.
- Grimwade, D., Walker, H., Harrison, G. *et al.*, 2001. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia: analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*, 98(5), 1312-20.
- Hamm, A., Veeck, J., Bektas, N. *et al.*, 2008. Frequent expression loss of *Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain (ITIH)* genes in multiple human solid tumors: a systematic expression analysis. *BMC Cancer*, 8, 25.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-74.
- Hendrich, B. & Bird, A., 1998. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 18(11), 6538-47.
- Herman, J.G., Graff, J.R., Myöhänen, S. *et al.*, 1996. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18), 9821-26.
- Herman, J.G. & Baylin, S.B., 2003. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *The New England Journal of Medicine*, 349(21), 2042-54.
- Himmelfarb, M., Klopocki, E., Grube, S. *et al.*, 2004. *ITIH5*, a novel member of the inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family is downregulated in breast cancer. *Cancer Letters*, 204(1), 69-77.
- Huntly, B.J.P. & Gilliland, D.G., 2005. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nature Reviews Cancer*, 5(4), 311-21.
- Issa, J.P., 2007. DNA methylation as a therapeutic target in cancer. *Clinical Cancer Research*, 13(6), 1634-37.
- Jaenisch, R. & Bird, A., 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, 33 Suppl, 245-54.
- Jaffe, E.S., Stein, H., Vardiman, J.W. *et al.*, 2001: World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 3rd Edition. Lyon: IARC Press, 75-107.
- Jain, N., Rossi, A. & Garcia-Manero, G., 2009. Epigenetic therapy of leukemia: An update. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(1), 72-80.
- Jenkins, C., Hewamana, S., Gilkes, A. *et al.*, 2008. Nuclear factor-kappaB as a potential therapeutic target for the novel cytotoxic agent LC-1 in acute myeloid leukemia. *British Journal of Haematology*, 143(5), 661-71.
- Jenuwein, T. & Allis, C.D., 2001. Translating the histone code. *Science*, 293(5532), 1074-80.
- Jessen, T.E. & Ødum, L., 2003. Role of *tumour necrosis factor stimulated gene 6 (TSG-6)* in the coupling of inter-alpha-trypsin inhibitor to hyaluronan in human follicular fluid. *Reproduction*, 125(1), 27-31.
- Jiang, Y., Dunbar, A., Gondek, L.P. *et al.*, 2009. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood*, 113(6), 1315-25.
- Jones, P.A. & Taylor, S.M., 1980. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*, 20(1), 85-93.
- Jones, P.A. & Baylin, S.B., 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics*, 3(6), 415-28.
- Jones, P.A. & Martienssen, R., 2005. A blueprint for a human epigenome project: the AACR human epigenome workshop. *Cancer Research*, 65(24), 11241-46.
- Jones, P.A. & Baylin, S.B., 2007. The epigenomics of cancer. *Cell*, 128(4), 683-92.
- Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A. *et al.*, 1998. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics*, 19(2), 187-91.
- Jost, E., Galm, O. & Osieka, R., 2006. Targeting the epigenome in hematopoietic malignancies. *Letters in Drug Design & Discovery*, 4(3), 242-52.

- Kaminskas, E., Farrell, A.T., Wang, Y.C. *et al.*, 2005. FDA drug approval summary: azacitidine (5-azacytidine, Vidaza) for injectable suspension. *The Oncologist*, 10(3), 176-82.
- Kantarjian, H., Issa, J.P., Rosenfeld, C.S. *et al.*, 2006. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer*, 106(8), 1794-803.
- Karp, J., 2008. Future research directions for the treatment of AML. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*, 6(11), Suppl. 18, 8-10.
- Keating, M.J., Kantarjian, H., Smith, T.L. *et al.*, 1989. Response to salvage therapy and survival after relapse in acute myelogenous leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 7(8), 1071-1080.
- Keshet, I., Lieman-Hurwitz, J. & Cedar, H., 1986. DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell*, 44(4), 535-43.
- Kim, M.S., Blake, M., Baek, J.H. *et al.*, 2003. Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. *Cancer Research*, 63(21), 7291-300.
- Kiyoi, H., Naoe, T., Nakano, Y. *et al.*, 1999. Prognostic implication of *Flt3* and *N-ras* gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*, 93(9), 3074-80.
- Kobayashi, H., Shinohara, H., Takeuchi, K. *et al.*, 1994. Inhibition of the soluble and the tumor cell receptor-bound plasmin by urinary trypsin inhibitor and subsequent effects on tumor cell invasion and metastasis. *Cancer Research*, 54(3), 844-49.
- Kobayashi, H., Gotoh, J., Hirashima, Y. *et al.*, 1995. Inhibitory effect of a conjugate between human urokinase and urinary trypsin inhibitor on tumor cell invasion in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(14), 8361-66.
- Kobayashi, H., Sugino, D., She, M.Y. *et al.*, 1998. A bifunctional hybrid molecule of the amino-terminal fragment of urokinase and domain II of bikunin efficiently inhibits tumor cell invasion and metastasis. *European Journal of Biochemistry*, 253(3), 817-26.
- Kouzarides, T., 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693-705.
- Krönke, J., Schlenk, R.F., Jensen, K.O. *et al.*, 2011. Monitoring of minimal residual disease in *NPM1*-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. *Journal of Clinical Oncology*, 29(19), 2709-16.
- Kurzrock, R., Gutterman, J. & Talpaz, M., 1988. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *The New England Journal of Medicine*, 319(15), 990-98.
- Lachner, M. & Jenuwein, T., 2002. The many faces of histone lysine methylation. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(3), 286-98.
- Lakshmikuttyamma, A., Scott, S.A., Decoteau, J.F. *et al.*, 2010. Reexpression of epigenetically silenced AML tumor suppressor genes by SUV39H1 inhibition. *Oncogene*, 29(4), 576-88.
- Lancet, J.E. & Karp, J.E., 2003. Farnesyltransferase inhibitors in hematologic malignancies: new horizons in therapy. *Blood*, 102(12), 3880-89.
- Larson, R.A., Boogaerts, M., Estey, E. *et al.*, 2002. Antibody-targeted chemotherapy of older patients with acute myeloid leukemia in first relapse using Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin). *Leukemia*, 16(9), 1627-36.
- Lee, D.Y., Hayes, J.J., Pruss, D. *et al.*, 1993. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell*, 72(1), 73-84.
- Ley, T.J., Ding, L., Walter, M.J. *et al.*, 2010. DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 363(25), 2424-33.
- Liggett, W.H. Jr. & Sidransky, D., 1998. Role of the *p16* tumor suppressor gene in cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 16(3), 1197-206.
- List, A., Dewald, G., Bennet, J. *et al.*, 2006. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *The New England Journal of Medicine*, 355(14), 1456-65.
- Lopez-Serra, L. & Esteller, M., 2008. Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *British Journal of Cancer*, 98(12), 1881-85.
- Löwenberg, B., Downing, J.R. & Burnett, A., 1999. Acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 341(14), 1051-62.
- Löwenberg, B., Griffin, J.D., Tallman, M.S., 2003. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematology*, 82-101.

- Löwenberg, B., 2008. Diagnosis and prognosis in acute myeloid leukemia - the art of distinction. *The New England Journal of Medicine*, 358(18), 1960-62.
- Lugthart, S., van Drunen, E., van Norden, Y. *et al.*, 2008. High *EVII* levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: prevalence of *EVII* overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated. *Blood*, 111(8), 4329-37.
- Lugthart, S., Figueroa, M.E., Bindels, E. *et al.*, 2011. Aberrant DNA hypermethylation signature in acute myeloid leukemia directed by *EVII*. *Blood*, 117(1), 234-41.
- Lübbert, M., Müller-Tidow, C., Hofmann, W.K. *et al.*, 2008. Advances in the treatment of acute myeloid leukemia: from chromosomal aberrations to biologically targeted therapy. *Journal of Cellular Biochemistry*, 104(6), 2059-70.
- Mack, G.S., 2006. Epigenetic cancer therapy makes headway. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(20), 1443-44.
- Marcucci, G., Byrd, J.C., Dai, G. *et al.*, 2003. Phase 1 and pharmacodynamic studies of G3139, a *Bcl-2* antisense oligonucleotide, in combination with chemotherapy in refractory or relapsed acute leukemia. *Blood*, 101(2), 425-32.
- Marcucci, G., Maharry, K., Whitman, S.P. *et al.*, 2007. High expression levels of the *ETS*-related gene, *ERG*, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Journal of Clinical Oncology*, 25(22), 3337-43.
- Mayani, H., 1996. Composition and function of the hematopoietic microenvironment in human myeloid leukemia. *Leukemia*, 10(6), 1041-7.
- Metzeler, K.H., Maharry, Radmacher, M.D. *et al.*, 2011. *TET2* mutations improve the new european LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: A cancer and leukemia group B study. *Journal of Clinical Oncology*, 29(10), 1373-81.
- Mizuno, S., Chijiwa, T., Okamura, T. *et al.*, 2001. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 97(5), 1172-79.
- Mrózek, K., Marcucci, G., Paschka, P. *et al.*, 2007. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*, 109(2), 431-48.
- Müller-Tidow, C., Klein, H.U., Hascher, A. *et al.*, 2010. Profiling of H3 lysine 9 trimethylation levels predicts transcription factor activity and survival in acute myeloid leukemia. *Blood*, 116(18), 3564-71.
- Nguyen, C.T., Gonzales, F.A. & Jones, P.A., 2001. Altered chromatin structure associated with methylation-induced gene silencing in cancer cells: correlation of accessibility, methylation, MeCP2 binding and acetylation. *Nucleic Acids Research*, 29(22), 4598-606.
- Ommen, H.B., Schnittger, S., Jovanovic, J.V. *et al.*, 2010. Strikingly different molecular relapse kinetics in *NPM1c*, *PML-RARA*, *RUNX1-RUNX1T1* and *CBFB-MYH11* acute myeloid leukemias. *Blood*, 115(2), 198-205.
- Ooi, S.K.T. & Bestor T.H., 2008. The colorful history of active DNA demethylation. *Cell*, 133(7), 1145-8.
- Paris, S., Sesboüé, R., Delpech, B. *et al.*, 2002. Inhibition of tumor growth and metastatic spreading by overexpression of inter-alpha-trypsin inhibitor family chains. *International Journal of Cancer*, 97(5), 615-20.
- Paschka, P., Marcucci, G., Ruppert, A.S. *et al.*, 2008. *Wilms Tumor 1* gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Journal of Clinical Oncology*, 26(28), 4595-602.
- Paschka, P., Schlenk, R.F., Gaidzik, V.I. *et al.*, 2010. *IDH1* and *IDH2* mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with *NPM1* mutation without *FLT3* internal tandem duplication. *Journal of Clinical Oncology*, 28(22), 3636-43.
- Pita, J.M., Banito, A., Cavaco, B.M. *et al.*, 2009. Gene expression profiling associated with the progression to poorly differentiated thyroid carcinomas. *British Journal of Cancer*, 101(10), 1782-91.

- Plumb, J.A., Strathdee, G., Sludden, J. *et al.*, 2000. Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the *hMLH1* gene promoter. *Cancer Research*, 60(21), 6039-44.
- Pratt, C.W. & Pizzo, S.V., 1986. In vivo metabolism of inter-alpha-trypsin inhibitor and its proteinase complexes: evidence for proteinase transfer to alpha 2-macroglobulin and alpha 1-proteinase inhibitor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 248(2), 587-96.
- Robertson, K.D. & Jones, P.A., 2000. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*, 21(3), 461-67.
- Robertson, K.D. & Wolffe, A.P., 2000. DNA methylation in health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 1(1), 11-19.
- Rugg, M.S., Willis, A.C., Mukhopadhyay, D. *et al.*, 2005. Characterization of complexes formed between TSG-6 and inter-alpha-inhibitor that act as intermediates in the covalent transfer of heavy chains onto hyaluronan. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(27), 25674-86.
- Salier, J.P., Rouet, P., Raguenez, G. *et al.*, 1996. The inter-alpha-inhibitor family: from structure to regulation. *The Biochemical Journal*, 315 (Pt 1), 1-9.
- Sandler, A., Gordon, M., De Alwis, D.P. *et al.*, 2004. A Phase I trial of a potent P-glycoprotein inhibitor, zosuquidar trihydrochloride (LY335979), administered intravenously in combination with doxorubicin in patients with advanced malignancy. *Clinical Cancer Research*, 10(10), 3265-72.
- Sanson, M., Marie, Y., Paris, S. *et al.*, 2009. *Isocitrate dehydrogenase 1* codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *Journal of Clinical Oncology*, 27(25), 4150-4.
- Schaich, M., Soucek, S., Thiede, C. *et al.*, 2005. *MDR1* and *MRP1* gene expression are independent predictors for treatment outcome in adult acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, 128(3), 324-32.
- Schlenk, R.F., Döhner, K., Krauter, J. *et al.*, 2008. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 358(18), 1909-18.
- Schnittger, S., Kern, W., Tschulik, C. *et al.*, 2009. Minimal residual disease levels assessed by *NPM1* mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood*, 114(11), 2220-31.
- Schwind, S., Marcucci, G., Maharry, K. *et al.*, 2010. *BAALC* and *ERG* expression levels are associated with outcome and distinct gene and microRNA expression profiles in older patients with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood*, 116(25), 5660-9.
- Sekeres, M.A., Elson, P., Kalaycio, M.E. *et al.*, 2009. Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients. *Blood*, 113(1), 28-36.
- Sharma, S., Kelly, T.K. & Jones, P.A., 2010. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 27-36.
- Silverman, L.R., Demakos, E.P., Peterson, B.L. *et al.*, 2002. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *Journal of Clinical Oncology*, 20(10), 2429-40.
- Steele, N., Finn, P., Brown, R. *et al.*, 2009. Combined inhibition of DNA methylation and histone acetylation enhances gene re-expression and drug sensitivity *in vivo*. *British Journal of Cancer*, 100(5), 758-63.
- Stewart, D.J., Donehower, R.C., Eisenhauer, E.A. *et al.*, 2003. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the DNA methyltransferase 1 inhibitor MG98 administered twice weekly. *Annals of Oncology*, 14(5), 766-74.
- Sundström, G., Dahl, I.M., Hultdin, M. *et al.*, 2005. Bone marrow hyaluronan distribution in patients with acute myeloid leukemia. *Medical Oncology*, 22(1), 71-8.
- Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L. *et al.*, 2008. World Health Organization Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, 4th Edition. Lyon: IARC Press, 109-47.
- Tallman, M.S., Gilliland, D.G. & Rowe, J.M., 2005. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood*, 106(4), 1154-63.
- Tenen, D.G., 2003. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nature Reviews Cancer*, 3(2), 89-101.

- Thiede, C., Koch, S., Creutzig, E. *et al.*, 2006. Prevalence and prognostic impact of *NPM1* mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 107(10), 4011-20.
- Thol, F., Damm, F., Lüdeking, A. *et al.*, 2011. Incidence and prognostic influence of *DNMT3A* mutations in acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 29(21), 2889-96.
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M. *et al.*, 1999. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(15), 8681-86.
- Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A. *et al.*, 2009. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Rationale and important changes. *Blood*, 114(5), 937-51.
- Veeck, J., Chorovicer, M., Naami, A. *et al.*, 2008a. The extracellular matrix protein *ITIH5* is a novel prognostic marker in invasive node-negative breast cancer and its aberrant expression is caused by promoter hypermethylation. *Oncogene*, 27(6), 865-76.
- Veeck, J., Breuer, E., Rose, M. *et al.*, 2008b. Neuer Prognosemarker beim invasiven Mammakarzinom. *ITIH5*-Expression wird über aberrante Promotormethylierung inaktiviert. *Der Pathologe*, 29(2), 338-46.
- Villar-Garea, A. & Esteller, M., 2004. Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents. *International Journal of Cancer*, 112(2), 171-78.
- Wang, X.F., Qian, D.Z., Ren, M. *et al.*, 2005. Epigenetic modulation of retinoic acid receptor beta 2 by the histone deacetylase inhibitor MS-275 in human renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 11(9), 3535-42.
- West, D.C. & Kumar, S., 1991. Tumour-associated hyaluronan: a potential regulator of tumour angiogenesis. *International Journal of Radiation Biology*, 60(1-2), 55-60.
- Yoneda, M., Suzuki, S. & Kimata, K., 1990. Hyaluronic acid associated with the surfaces of cultured fibroblasts is linked to a serum-derived 85-kDa protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(9), 5247-5257.
- Yoo, C.B. & Jones, P.A., 2006. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(1), 37-50.
- Zhou, L., Cheng, X., Connolly, B.A. *et al.*, 2002. Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases. *Journal of Molecular Biology*, 321(4), 591-99.
- Zhuo, L., Hascall, V.C. & Kimata, K., 2004. Inter-alpha-trypsin inhibitor, a covalent protein-glycosaminoglycan-protein complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(37), 38079-82.

IV Auflistung der eigenen Publikationen

Oing, C., Jost, E., Dahl, E., Wilop, S., Brümmendorf, T.H., Galm, O., 2011. Aberrant DNA hypermethylation of the *ITIH5* tumor suppressor gene in acute myeloid leukemia. *Clinical Epigenetics*, 2(2), 419-23.

V Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Oliver Galm und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Edgar Jost für die hervorragende Betreuung und Zusammenarbeit, das Vertrauen und die stete fachliche und motivationale Unterstützung. Ihre ständige Bereitschaft als Ansprechpartner mit gutem Rat zur Seite zu stehen und das große wissenschaftliche Interesse waren ein stetiger Antrieb und unabdingbare Hilfe, diese Arbeit auch in schwierigen Phasen voranzutreiben und schließlich fertigzustellen.

Dr. med. Stefan Wilop möchte ich für seine hilfreiche Unterstützung während der statistischen Auswertung der gesammelten Daten danken. Ferner danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Edgar Jost für die freundliche und fundierte Unterstützung in fachlichen Fragestellungen jeglicher Art.

Ein besonders herzlicher Dank gilt den Mitarbeiterinnen des Labors der Klinik für Onkologie, Hämatologie und Stammzelltransplantation. Claudia Schubert danke ich für die kompetente Einarbeitung in die Bisulfitkonversion und die MSP sowie die Hilfe bei der DNA Extraktion aus dem dieser Arbeit zu Grunde liegenden Probenmaterial, Lucia Vankann und Melanie Hoffmann für die verlässliche Zusammenarbeit und die produktive und kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Danken möchte ich auch allen Patienten, durch deren Zustimmung zur Verwendung entnommener Blut- und Knochenmarkproben zu Forschungszwecken Projekte wie dieses erst möglich werden, sowie der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen und der Deutschen Krebshilfe, ohne deren Förderung Projekte wie dieses nicht realisierbar wären.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester, meinen Freunden und im Besonderen meiner Ehefrau Kristina, deren motivierender und aufmunternder Zuspruch, sowie Geduld und literarische Hilfestellung entscheidend zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

VI Erklärung zur Aufbewahrung der Daten

Erklärung §5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten in der Klinik für Onkologie, Hämatologie und Stammzelltransplantation des Universitätsklinikums Aachen, Pauwelsstraße 30, D-52074 Aachen, hinterlegt sind.