

**DNA-Methylierungsdynamik bei fünf Patienten
mit akuter myeloischer Leukämie
unter 5-Aza-2'-Deoxycytidin-Therapie**

Christina Maria Franzen

DNA-Methylierungsdynamik bei fünf Patienten mit akuter myeloischer Leukämie
unter 5-Aza-2'-Deoxycytidin-Therapie

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

vorgelegt von
Christina Maria Franzen
aus
Münster

Berichter: Herr Privatdozent
 Dr.med. Oliver Galm

 Herr Privatdozent
 Dr.med. Konrad Streetz

Tag der mündlichen Prüfung: 2. März 2011

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 Grundlagen der Kanzerogenese	1
1.2 Die akute myeloische Leukämie	2
1.2.1 Einleitung und Epidemiologie	2
1.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren	2
1.2.3 Molekulare Pathogenese der AML	2
1.2.4 Klassifikationen der AML	4
1.2.5 Prognosefaktoren	5
1.2.6 Therapie	6
1.2.7 Probleme in der Therapie älterer AML-Patienten	7
1.3 Grundlagen der Epigenetik	9
1.3.1 DNA-Methylierung	9
1.3.2 Histon-Modifikationen und Verbindung zur DNA-Methylierung	10
1.3.3 Epigenetische Veränderungen in Tumorzellen	12
1.3.4 Epigenetisch beeinflusste zelluläre Signalwege	14
1.3.5 Methodische Grundlagen der Methylierungsanalyse	15
1.3.6 Klinische Bedeutung epigenetischer Veränderungen	16
1.3.6.1 DNA-Hypermethylierung als Biomarker	16
1.3.6.2 Epigenetische Veränderungen als Zielstrukturen therapeutischer Ansätze	16
1.3.7 Epigenetische Therapieansätze bei der AML	18
1.3.8 Kombinierte Therapie mit epigenetischen Therapeutika und ATRA	20
2 ZIELSETZUNG	21
3 MATERIAL UND METHODEN	22
3.1 Patientenproben	22
3.2 Untersuchte Gene	25
3.3 Eingesetzte Standardgeräte und Übersicht der Analyseschritte	27
3.4 Ficoll-Zentrifugation	28
3.5 DNA-Isolierung	28
3.6 Bisulfitbehandlung der DNA	29
3.7 Herstellung von <i>in vitro</i> methylierter DNA	30

3.8	Methylierungs-spezifische PCR	32
3.8.1	Primer	33
3.8.2	Material	34
3.8.3	Methode der Methylierungs-spezifischen PCR	34
3.9	Auswertung: Elektrophorese und Bilderzeugung	35
3.10	Interpretation der MSP-Ergebnisse	36
3.11	Auswertung der klinischen Parameter	37
4	ERGEBNISSE	38
4.1	Patientenkollektiv	38
4.2	Behandlungsverläufe der Patienten	39
4.3	Methylierungsprofile der fünf AML-Patienten	44
5	DISKUSSION	48
5.1	Bedeutung begleitender Untersuchungen zu Studien zur AML-Therapie	48
5.2	Vergleich des Patientenkollektives mit anderen AML-Studien	49
5.3	Vergleich der Therapieerfolge von älteren Patienten in Studien zur AML-Therapie	50
5.4	Assoziation zwischen Zytogenetik, klinischen Parametern und methylierten Genen	52
5.5	DNA-Hypermethylierung als Surrogatmarker für positive Effekte der DAC-Therapie	53
5.6	Weitere potentielle Surrogatmarker	56
5.7	Schlussfolgerung	57
6	ZUSAMMENFASSUNG	59
7	LITERATURVERZEICHNIS	60
	DANKSAGUNG	65
	ERKLÄRUNG ZUR DATENAUFBEWAHRUNG	66

Abkürzungsverzeichnis

ALE	antileukämischer Effekt
AML	akute myeloische Leukämie
Ara-C	Cytosin-Arabinosid
ATRA	all-trans-Retinsäure
AZA	5-Azacytidin
C/EBP α	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
CBF	<i>core binding factor</i>
CIMP	<i>CpG island methylator phenotype</i>
CpG	Cytosin-Guanin Dinukleotid
CR	Komplette Remission
DAC	5-Aza-2'-Deoxycytidin
DAPK1	<i>death-associated protein kinase 1</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	2'-Deoxynukleotid-5'-Triphosphat
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EDN3	<i>endothelin 3</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAB	<i>French-American-British</i>
FLT3	<i>fms-like tyrosinkinase 3</i>
FTI	Farnesyltransferase-Inhibitor
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-Stimulierender-Faktor
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HPCE	<i>high-performance capillary electrophoresis</i>
HU	Hydroxyurea
ID4	<i>inhibitor of DNA binding 4</i>
ITD	Interne-Tandem-Duplikation
IVD	<i>in vitro</i> methylierte DANN
JAK	Januskinase
LDH	Laktatdehydrogenase
LINE	<i>long interspersed nucleotide element</i>
MAPK	Mitogen-aktivierende-Protein-Kinase
MBP	Methylcytosin-bindendes Protein

MDS	myelodysplastisches Syndrom
MeCP2	<i>methyl CpG binding protein</i>
MGMT	<i>O₆-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
hMLH1	<i>mutl homologue 1 gene</i>
MLL	<i>mixed lineage leukemia</i>
MSP	methylierungs-spezifische Polymerase-Kettenreaktion
Ms-SNuPE	<i>methylation-sensitive single-nucleotide primer extension</i>
NC	<i>no change</i> , keine Veränderung
NR	<i>no response</i> , ohne Ansprechen
PAS	<i>periodic acid schiff reaction</i>
PB	peripheres Blut
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	<i>progressive disease</i> , fortschreitende Erkrankung
PML	Promyelozytenleukämie
POX	Myeloperoxidase
PR	Partielle Remission
PTD	Partielle-Tandem-Duplikation
RAR β 2	<i>retinoic acid receptor β2</i>
Rb	Retinoblastom-Gen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SFRP	<i>secreted frizzled related protein</i>
SHP-1	<i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAE	Trisacetat EDTA
TIMP	<i>tissue inhibitor of matrix metalloproteinase</i>
TSA	Trichostatin A
UV	Ultraviolett
VPA	Valproat
WHO	<i>World Health Organization</i>
WRN	<i>werner syndrome gene</i>

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Kanzerogenese

Für die Etablierung von Therapien für onkologische Patienten ist das Verständnis der Tumorentstehung von fundamentaler Bedeutung. Erkenntnisse über die molekularen Veränderungen in malignen Zellen haben dabei wesentlich zum heutigen Wissensstand beigetragen. Neoplasien sind Folge eines dynamischen Prozesses, der durch die Akkumulierung von Störungen in der Genfunktion verursacht wird. In mehreren Schritten transformieren normale Zellen aufgrund verschiedener Gen-Aberrationen der DNA zu malignen Zellen. Mechanismen wie Punktmutationen, Deletionen, Amplifikationen und Translokationen verändern die DNA-Sequenz. Sie aktivieren Protoonkogene zu unkontrollierten Onkogenen oder bewirken den Funktionsverlust von Tumorsuppressorgen. Darüber hinaus können neue Fusionsgene entstehen. Irreversible Mutationen führen zur Abweichung der Zellphysiologie, indem die molekulare Regulation von Proliferation, Differenzierung und Zelltod beeinflusst wird. Der entstehende Überlebensvorteil begünstigt die maligne Transformation der Zelle [1]. Neben diesen genetischen Aberrationen der DNA sind auch epigenetische Veränderungen bekannt, die an der Tumorentstehung beteiligt sind. Der Begriff *Epigenetik* bezieht sich auf Modifikationen der DNA, die - im Gegensatz zu genetischen Aberrationen - ohne Veränderung der eigentlichen Nukleotidsequenz Einfluss auf die Genexpression nehmen [2]. In einer großen Zahl verschiedener Tumorarten konnten bereits epigenetische Veränderungen nachgewiesen werden [3]. Auch bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) sind diese Mechanismen an der Pathophysiologie beteiligt und sollen Gegenstand dieser Studie sein.

1.2 Die akute myeloische Leukämie

1.2.1 Einleitung und Epidemiologie

Die AML ist eine Erkrankung hämatopoetischer Stammzellen, die durch Fehlregulationen der Differenzierung und Proliferation zur klonalen Vermehrung einer unreifen myeloischen Vorläuferzelle führt. Die autonome Proliferation verursacht die Expansion eines malignen Zellklons im Knochenmark mit daraus folgender Insuffizienz der drei hämatopoetischen Zellreihen. Sie kann sich sowohl in der Infiltration extramedullärer Organe als auch in der Ausschwemmung von Blasten manifestieren [4]. Mit einer weltweiten Inzidenz von 3,7 /100.000 Einwohner ist die AML eine seltene, jedoch hochmaligne Erkrankung. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 65 Jahren. Auffallend ist die steigende Inzidenz bei Patienten über 65 Jahre mit 17 /100.000 Einwohner. Während sich das Überleben für jüngere Patienten im Rahmen der therapeutischen Möglichkeiten in den letzten Jahren verbessert hat, sind die Therapieerfolge für ältere Patienten weiterhin eingeschränkt [5].

1.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die genaue Ätiologie der AML ist in den meisten Fällen ungeklärt. Es gibt jedoch verschiedene Noxen, die hämatopoetische Vorstufen schädigen und als Risikofaktoren gelten. Zudem sind eine Reihe von kongenitalen Krankheiten mit einem erhöhten AML-Aufkommen assoziiert. In Tabelle 1.1 sind bekannte ätiologischen Faktoren aufgeführt.

Tabelle 1.1: Faktoren mit einer erhöhten AML-Inzidenz (modifiziert nach [5])

Gruppen	Faktoren	
Chemikalien	Benzol Pestizide und Herbizide	Ethylenoxide
Chemotherapie	Alkylierende Substanzen Anthracycline	Topoisomerase-II-Inhibitoren Taxane
Ionisierende Strahlen	therapeutisch	nicht-therapeutisch
Kongenitale Erkrankungen	Down-Syndrom Fanconi-Anämie Li-Fraumeni-Syndrom Ataxia Teleangiectasia	Klinefelter-Syndrom Neurofibromatose Patau-Syndrom

1.2.3 Molekulare Pathogenese der AML

Die Hämatopoese wird als komplexer Prozess durch eine Vielzahl von Transkriptions- und Wachstumsfaktoren reguliert. Erst dadurch wird die Differenzierung in spezifische Zellreihen ermöglicht. Studien zur Genetik der AML haben gezeigt, dass die AML auf

einen Zellklon einer frühen hämatopoetischen Stammzelle zurückzuführen ist [6]. Verschiedene molekulargenetische Prozesse münden in einem mehrstufigen Verlauf in die abnormale Regulation von Proliferation, Zelldifferenzierung und -ausreifung der hämatopoetischen Stammzelle. Der durch eine erste Veränderung entstandene Überlebensvorteil der leukämischen Stammzelle begünstigt die Expansion dieser und resultiert in der Verdrängung der normalen Hämatopoese. AML-Zellen sind dabei grundsätzlich nicht mehr zur vollständigen Differenzierung fähig und bleiben auf einer unreifen Entwicklungsstufe stehen [6]. Nach genetischer und molekularer Pathogenese wird die AML in drei Gruppen eingeteilt, die in Tabelle 1.2 aufgeführt sind.

Tabelle 1.2: AML-Gruppen nach molekularer und genetischer Pathogenese

molekular-pathogenetische Gruppe	Beispiel
AML mit balancierten Chromosomenanomalien	Translokationen: t(8;21), t(15;17) Inversionen: inv(16)
AML mit unbalancierten Chromosomenanomalien	-5, -7 Deletion komplexe Aberrationen
AML ohne Nachweis von Karyotypanomalien	FLT3-Mutationen MLL-Tandemduplikationen, C/EBP α -Mutationen

In etwa 55 % der AML-Fälle werden zum Diagnosezeitpunkt chromosomale Aberrationen nachgewiesen [6]. Diese befinden sich an Genorten, die relevante Gene für die Hämatopoese einschließen. AML-assoziierte, balancierte chromosomale Translokationen und Inversionen sind hauptsächlich bei jüngeren Patienten (< 60 Jahre) zu finden. Sie verursachen Fusionsproteine, die pathologische Signalkaskaden in der Zelle induzieren können. Zwei den *core binding factor* (CBF) betreffende Veränderungen sind beispielsweise die Translokation t(8;21) mit dem atypischen Fusionsprotein AML1/ETO und die Inversion inv(16), die zur Verbindung der CBF Untereinheit CBF β mit MYH11 (Gen für die Myosin-Schwerketten) führt [4].

Die akute Promyelozytenleukämie (PML, nach FAB Klassifikation: AML M3) entsteht durch die Translokation des *retinoic acid receptor α* -Gens (RAR α) und der Fusion mit dem PML-Gen (t(15; 17)). Das gebildete Fusionsprotein PML/RAR α bildet einen Komplex. Dieser Komplex inhibiert die differenzierungs-fördernden Effekte von RAR α /RXR α -Dimeren, die normalerweise durch die Bindung von Retinolsäurederivaten an RAR α vermittelt werden [7].

Im Unterschied zu balancierte Translokationen liegen chromosomale Verluste (Deletionen und Monosomien) oder komplexe Aberrationen vorwiegend bei älteren Patienten vor [8]. Entstehungsmechanismen ohne chromosomale Veränderungen schließen Mutationen ein, die die Signaltransduktionswege der Zelle betreffen.

Beschrieben ist zum Beispiel die Involvierung von RAS Genen (Guanin Nukleotid-Bindungsproteine) [6]. Mutationen des Gens der Rezeptor-Tyrosinkinase *fms-like tyrosinkinase 3* (FLT3) lösen eine Aktivierung der RAS-, MAPK- und STAT5-Signaltransduktionswege aus. Insbesondere Interne-Tandem-Duplikationen (ITD) des FLT3-Gens sind dabei mit einer schlechteren Prognose assoziiert [9].

Zusätzlich zu den durch genetische Aberrationen verursachten Proliferations- und Differenzierungsdefekten ist die Involvierung epigenetischer Pathomechanismen bei der Entstehung der AML nachgewiesen. Am besten untersucht ist bisher die Hypermethylierung der Promotorregion des Zellzyklusinhibitors p15 (INK4b) [10]. Regelmäßig treten aberrante Hypermethylierungen auch bei den Wachstumsfaktorregulatoren SOCS-1 und RARβ2, bei p73 und E-Cadherin auf [11].

1.2.4 Klassifikationen der AML

Die Akute myeloische Leukämie ist 1985 nach dem French-American-British (FAB) System klassifiziert worden, das - unter Berücksichtigung des Differenzierungsgrades der Blasten im Knochenmark - auf morphologischen und immunhistochemischen Kriterien beruht. Molekulargenetische Informationen waren hierbei noch nicht einbezogen worden. Heute ist bekannt, dass einige Subgruppen mit bestimmten zytogenetischen bzw. molekulargenetischen Aberrationen assoziiert sind.

Tabelle 1.3: FAB-Klassifikation der AML und assoziierte genetische Aberrationen. Abkürzungen: POX = Myeloperoxidase, PAS = *periodic acid schiff reaction* (modifiziert nach [4])

FAB (Subtyp-Anteil in %)	FAB-Kriterien, Morphologie im Knochenmark	Zyto- chemie positiv für:	Assoziiert mit 1.zytogenetisch 2.molekular- genetisch
M0 undifferenzierte akute Leukämie (3 %)	≥ 30 Blasten, ohne Granula	POX < 3 %	1. Inv(3q26) t(3;3) (1 %)
M1 minimal differenzierte akute Leukämie (15 -20 %)	≥ 90 % Blasten der nicht-erythrozytären Knochenmarkzellen; vereinzelte Granula	POX ≥ 3 %	
M2 akute Leukämie mit Ausreifung (25-30 %)	30 -90 % Blasten der nicht-erythrozytären Zellen > 10 % der Blasten tragen Granula, Auerstäbchen < 20 % Promyelozyten	POX ≥ 3 %	1. t(8;21) (40 %) 2. AML1-ETO
M3 akute Promyelozytenleukämie (5-10 %)	> 30 % Promyelozyten der kernhaltigen Zellen stark granulierte Promyelozyten, Auerstäbchen	POX +++	1 t(15;17) (98 %) 2. PML-RARα
M4 myelomonozytäre Leukämie (20 %)	≥ 30 % Myeloische Blasten der kernhaltigen Knochenmarkzellen; Monozytäre Zellen > 20 %	POX ≥ 3 % Esterase > 20 %	1. 11q23 (20 %) 2. MLL-Aberration
M4Eo myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie (5 %)	≥ 30 % Myeloische Blasten der kernhaltigen Zellen > 20 % Monozytäre Zellen Zusätzlich unreife Eosinophile mit dunklen Granula	POX ≥ 3 % Esterase > 20 %	1. inv(16), t(16;16) 80 % 2. CBFβ-MYH11
M5a akute Monoblastenleukämie M5b akute Monozytenleukämie (2-9 %)	≥ 90 % Blasten der nicht-erythrozytären Zellen, > 80 % Monoblasten der monozytären Zellen	Esterase +++ POX +/-	1. 11q23 (20 %), MLL-Aberration
M6 Erythroleukämie (5 %)	≥ 50 % Erythroblasten	POX +	
M7 Megakaryoblastenleukämie (3-12 %)	> 30 % Megakaryoblasten	Esterase +/- PAS +/-	1. t(1;22) (5 %)

Im Jahr 1999 wurde die Klassifikation hämatopoetischer und lymphatischer Neoplasien der *World Health Organization* (WHO) eingeführt, die nun auch zytogenetische und molekulargenetische Charakteristika in der Einteilung berücksichtigt. Weiterhin spielen Hinweise auf die Möglichkeit einer therapieassoziierten AML eine Rolle.

Die Molekulargenetik hat dabei das Verständnis der Pathogenese der AML deutlich verbessert. Sie hat prognostische Relevanz, wie bei den aufgeführten chromosomalen Aberrationen, die in Abhängigkeit von der Risikogruppe mit einem unterschiedlichen Ansprechen auf Chemotherapien und verschiedenen Remissionsraten einhergehen. Darüber hinaus haben die Erkenntnisse der molekularen Pathogenese zur Entdeckung neuer Angriffspunkte in der Therapie hämatopoetischer Erkrankungen beigetragen. Aus diesen Gründen ist die chromosomale Analyse und die Untersuchung auf bestimmte molekulare Veränderungen heute ein wichtiger Bestandteil der Routinediagnostik. Im Gegensatz zur FAB-Klassifikation, bei der ab einem Blastenanteil von über 30 % im Knochenmark der Übergang vom myelodysplastischen Syndrom (MDS) zur AML liegt, ist die Grenze bei der WHO-Klassifikation auf ≥ 20 % Blastenanteil herabgesetzt worden [12].

Tabelle 1.4: WHO-Klassifikation der AML [12]

AML-Subtypen	
AML mit zytogenetischen Aberrationen	- AML mit t(8;21) (q22;q22), AML 1/ETO - Akute Promyelozyten Leukämie (AML mit t(15;17) (q22;q11-12), PML/RARα) - AML mit abnormen Knochenmarkeosinophilen (inv(16)(p13q22) oder t(16;16) (p13q11), CBFβ/MYH11) - AML mit 11q23 (MLL-Aberrationen)
AML mit Multiliniendysplasie	- AML mit vorherigem MDS - AML ohne vorherigem MDS
therapieassoziierte AML und MDS	- Alkylanzien-assoziiert - Epidophyllotoxin-assoziiert - Andere Typen
AML ohne weitere Spezifizierung	- minimal differenzierte akute Leukämie - akute Leukämie ohne Ausreifung - akute Leukämie mit Ausreifung - akute myelomonozytäre Leukämie - akute monozytäre Leukämie - akute erythroide Leukämie - akute megakaryozytäre Leukämie - akute basophile Leukämie - akute Panmyelose mit Myelofibrose

1.2.5 Prognosefaktoren

Unbehandelt versterben die meisten Patienten innerhalb weniger Wochen an Infektionen oder Blutungen, die durch eine Verdrängung der normalen Hämatopoese verursacht sind. Der wichtigste Faktor für die Langzeitprognose unter Therapie ist zurzeit die Zytogenetik. Drei prognostische Gruppen (günstige, mittlere und ungünstige

Prognose) sind in Abhängigkeit von zytogenetischen Merkmalen definiert worden und sind in Tabelle 1.5 dargestellt. Patienten mit normalem Karyotyp (50 %) stellen allerdings keine einheitliche Risikogruppe dar. Einige molekulare Veränderungen, die bei normalem Karyotyp auftreten können, sind mit unterschiedlichen klinischen Verläufen und Lebenserwartungen assoziiert. Innerhalb der intermediären Gruppe mit normalem Karyotyp weisen Patienten mit C/EBP α Mutationen und NPM1-Mutationen eine bessere Prognose auf, FLT3 ITD, MLL PTD (Partielle- Tandem-Duplikation) und die Überexpression des *brain and acute leukemia, cytoplasmic gene* (BAALC) verschlechtern die Prognose [13, 14].

Tabelle 1.5: Zytogenetische Risikogruppen Einteilung nach *Medical Research Council* (modifiziert nach [15])

Risikogruppe	Chromosomale Veränderung
Günstig	t(8;21), inv16, t(16;16), t(15;17)
Intermediär	Normaler Karyotyp, +8, +21, +22, del (9q), strukturelle Veränderung von 11q23
Ungünstig	-5, -7, del (5q), Abnormal strukturelle Veränderung von 3q, Komplexe Aberrationen

Der zweite prognostisch relevante Faktor ist das Alter des Patienten. Die Lebenserwartung von älteren AML-Patienten (> 60 Jahren) ist insgesamt schlechter. Dies ist bedingt durch das häufigere Vorliegen einer ungünstigen Zytogenetik, die bestehenden Komorbiditäten und den herabgesetzten Allgemeinzustand [4]. Bei Patienten, die eine komplette Remission (CR) erreichen, nahm das Alter in verschiedenen Untersuchungen keinen Einfluss mehr auf die Prognose. Weiterhin besteht eine schlechtere Prognose bei chemotherapeutisch vorbehandelter AML und bei einer AML, der ein MDS vorangeht, sowie bei initialen Leukozyten von über 20.000 / μ l oder einer erhöhten Laktatdehydrogenase (LDH) bei Diagnosestellung [16]. Ziel der Einteilung ist die Entwicklung von risikoadaptierten Therapiestrategien [15].

1.2.6 Therapie

Zur Standard-Induktionstherapie werden - neben supportiver Therapie - die zytostatischen Substanzen Cytosin-Arabinosid (Ara-C) für sieben Tage und Anthrazykline (Daunorubicin oder Idarubicin) über drei Tage („3+7“-Schema) eingesetzt. Unter dieser Therapie erreichen 70 % bis 80 % der AML-Patienten unter 60 Jahren und bis zu 50 % der über 60-jährigen Patienten eine komplette Remission [4].

Elemente der Postremissions- bzw. Konsolidierungstherapie zur Verhinderung eines Rezidivs sind bei jungen Patienten, neben der Chemotherapie mit Ara-C, die intensivierte Konsolidierung mit autologer und allogener Stammzelltransplantation [4].

Neuere Therapiestrategien setzen an molekularen Strukturen an und sollen eine gezielte Therapie mit weniger Nebenwirkungen ermöglichen. Die PML/RAR α positive akute Promyelozytenleukämie, verursacht durch die Translokation t(15; 17), kann spezifisch mit dem Vitamin-A-Derivat all-trans-Retinsäure (ATRA) therapiert werden. Darunter zeigt sich eine Ausreifung der Promyelozyten mit Erreichen einer kompletten Remission [17]. Neue Chancen bieten auch monoklonale Antikörper gegen Antigene, die von Tumorzellen exprimiert werden. Gemtuzumab-Ozogamicin, ein Konjugat aus CD33-Antikörpern mit dem Toxin Calicheamicin, wurde 2001 von der *Food and Drug Administration* (FDA) für Patienten über 60 Jahren mit AML im ersten Rezidiv zugelassen und konnte bei 16 % der Patienten eine komplette Remission erzielen [18]. Ein weiteres therapeutisches Ziel bietet die Inhibition des mutierten Ras-Gens durch Farnesyltransferase-Inhibitoren (FTI) [18]. Die Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3 induziert bei Mutationen eine pathologisch gesteigerte Signaltransduktion in hämatopoetischen Zellen. Für FLT3-Inhibitoren konnte *in vitro* eine zytotoxische Wirkung in Leukämiezellen nachgewiesen werden. Verschiedene Präparate sind Bestandteil aktueller klinischer Studien [17]. Neue Optionen in der Therapie der AML stellen Substanzen dar, die in epigenetische Prozesse der Zelle eingreifen. Diese werden ausführlich in Kapitel 1.3.7 vorgestellt.

1.2.7 Probleme in der Therapie älterer AML-Patienten

Die Therapie der AML bei älteren Patienten (über 60 Jahre) ist bis heute nicht zufrieden stellend. Unter Standardinduktionstherapie („3+7“-Regime) wird bei dieser Patientengruppe eine deutlich niedrigere komplette Remissionsrate als bei jüngeren Patienten erreicht. Die mittlere Überlebenszeit beträgt nur drei bis zwölf Monate und das Gesamtüberleben liegt nach vier Jahren bei nur 10 % bis 20 % [4, 19]. Ursächlich für die schlechtere Prognose dieser Patientengruppe ist die durch Komorbiditäten bedingte niedrigere Toleranz gegenüber der intensiven Chemotherapie. Aufgrund der therapieassoziierten Mortalität kann diese den Patienten oft nicht mehr angeboten werden. Ein weiterer Grund ist der steigende Anteil an sekundären, aus MDS entstehenden, und therapieassoziierten Leukämien, die häufig resistent gegen

Chemotherapeutika sind [20]. Als weiteren Faktor zeigt die AML bei älteren Patienten einige biologische Charakteristika, die mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind. Zum Beispiel liegen in dieser Patientengruppe besonders häufig ungünstige zytogenetische Veränderungen wie Deletionen in Chromosom 5 oder 7 vor [21].

Bei der Therapieplanung von Patienten über 60 Jahren ist grundsätzlich zu überlegen, ob eine Standard-Induktionstherapie, eine Therapie innerhalb von klinischen Studien zu neuen Substanzen oder eine palliative Therapie für den Patienten am sinnvollsten ist. Bisherige Kriterien zur Entscheidung sind das Patientenalter, der Allgemeinzustand, die Organfunktionen und zytogenetische Faktoren [20]. Die Entwicklung eines geeigneten Konzeptes ist fundamental für das Therapiemanagement eines älteren AML-Patienten. Zurzeit gibt es jedoch noch keine einheitlichen Standards zur Therapie von Patienten über 60 Jahren.

Bei Patienten zwischen 60 und 69 Jahren in gutem Allgemeinzustand (*Eastern Cooperative Oncology Group [ECOG] performance status* < 2), ohne eingeschränkter Organfunktion und mit günstigem zytogenetischen Risikoprofil ist die zytostatische intensive Chemotherapie weiterhin die Therapie der Wahl. Auch bei älteren Patienten mit gleich guten klinischen Voraussetzungen kann die Induktions-Chemotherapie erwogen werden [19]. Beide Patientengruppen machen allerdings nur einen kleinen Teil (17 %) der 60 bis 80 jährigen Patienten aus [19]. Den meisten dieser Patienten ist eine intensive Chemotherapie nicht zumutbar. Sie sind daher für die Teilnahme an experimentellen Therapien im Rahmen von klinischen Studien geeignet [22]. Patienten mit sehr schlechtem Allgemeinzustand oder sehr beeinträchtigender Multimorbidität sollten palliativ mit supportiven Maßnahmen behandelt werden [19].

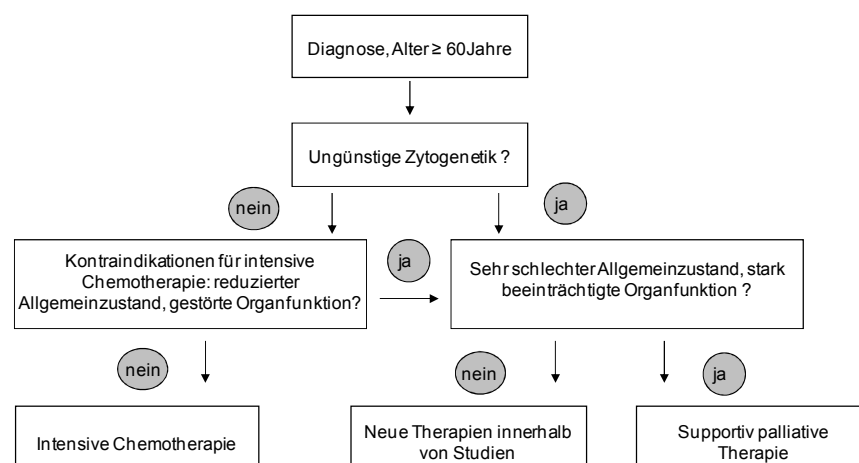


Abbildung 1.1: Übersicht zum Vorgehen bei der Therapieentscheidung bei älteren AML-Patienten (modifiziert nach [23])

1.3 Grundlagen der Epigenetik

Epigenetische Modifikationen der DNA nehmen ohne Veränderung der eigentlichen Nukleotidsequenz Einfluss auf die Genexpression. Bekannte Mechanismen sind die DNA-Methylierung, die kovalente Histon-Modifikationen und die RNA-assoziierte Geninaktivierung [10]. Ihre Schlüsselfunktionen in der Zellphysiologie wurden in zahlreichen Studien untersucht und sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Sie kontrollieren das Zellwachstum, die Differenzierung und den Prozess der Zellalterung. Epigenetische Aberrationen spielen aber auch in der Tumorentstehung und -ausbreitung eine wesentliche Rolle. Im Unterschied zu genetischen Veränderungen handelt es sich dabei um graduierte, reversible Prozesse. Diese sind pharmakologisch beeinflussbar und somit auch für therapeutische Ansätze von Interesse [24]. Der am intensivsten erforschte epigenetischer Mechanismus und Schwerpunkt dieser Studie ist die DNA-Methylierung.

1.3.1 DNA-Methylierung

Unter DNA-Methylierung versteht man die kovalente Bindung einer Methylgruppe an die Basen der DNA. Die Methylgruppen sind an Cytosine gebunden, die einem Guanin in der Basenabfolge vorausgehen, so genannte *cytosine preceding guanosine dinukleotides* (CpG-Dinukleotide) [2]. Die DNA-Methylierung in der Promotorregion eines Gens verhindert dabei über die Rekrutierung von Methylcytosin-bindenden Proteinen (MBPs) und Histon-Modifikationen die Anlagerung von zur Transkription notwendiger Faktoren. Sie ist eine postreplikative, enzymvermittelte Modifikation der DNA, bei der mit Hilfe von DNA-Methyltransferasen (DNMTs) eine Methylgruppe (CH_3) an das C-Atom in Position 5 des Pyrimidinrings von Cytosin kovalent gebunden wird. S-Adenosylmethionin dient dabei als Methylgruppen-Donator [25].

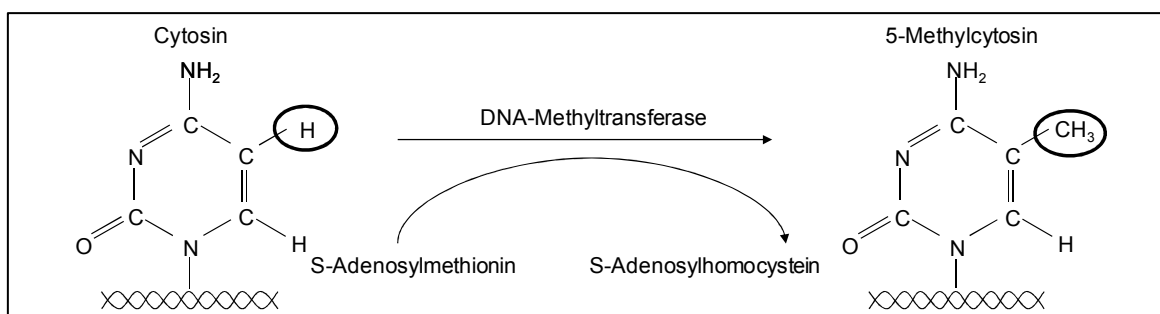


Abbildung 1.2: Methylierung der DNA-Base Cytosin (modifiziert nach [25])

Es wurden drei DNMTs in Säugetierzellen identifiziert. DNMT1 ist hauptsächlich für die postreplikative Wiederherstellung der Methylierung in beiden DNA-Strängen der Doppelhelix verantwortlich. DNMT3a und DNMT3b hingegen regulieren gemeinsam die *de novo* Methylierung [26]. Zur Untersuchung der Rolle der DNMTs in der Tumorentstehung wurden diese in kolorektalen Tumorzelllinien experimentell inaktiviert. Bei alleiniger Ausschaltung des DNMT3b-Gens konnte nur eine Reduktion der globalen DNA-Methylierung von 3 % erreicht werden. Bei zusätzlicher Inaktivierung von DNMT1 waren es 95 %. Die abnormale Hypermethylierung in der Tumorentstehung setzt demnach die Kooperation von DNMT1 und DNMT3b voraus [27].

Die Verteilung der CpG-Dinukleotide variiert in verschiedenen DNA-Abschnitten. Regionen, in denen die Dinukleotide vermehrt auftreten, werden CpG-Inseln genannt und befinden sich proximal der Promoterregion (5' Ende). 70 % bis 80 % der vorkommenden CpG-Dinukleotide sind methyliert [2]. Die methylierten CpG-Dinukleotide tragen zur Konformation zum inaktiven Heterochromatin bei und liegen hauptsächlich in diesen DNA-Abschnitten vor. CpG-Inseln im Euchromatin, den transkriptionell aktiven Arealen, weisen hingegen kaum Methylierungen auf und ermöglichen damit die Genexpression [28].

Physiologische Bedeutung hat die DNA-Methylierung zum Beispiel bei der X-Chromosom-Inaktivierung und der elternspezifischen Inaktivierung von Genen (dem „*genomic imprinting*“) [29]. Darüber hinaus verhindert die DNA-Methylierung die Transkription pathologischer Elemente, wie viraler DNA-Sequenzen oder Transposons, und stabilisiert die perizentromere Region aus kondensiertem Heterochromatin [25].

1.3.2 Histon-Modifikationen und Verbindung zur DNA-Methylierung

Ein wichtiger Faktor in der Transkription eines Gens ist die Zugänglichkeit des Gens für Transkriptionsfaktoren innerhalb der chromosomalen Struktur. Die DNA ist um Histone gewickelt, die aus Oktameren bestehen, und bildet mit diesen ein Nukleosom. Nukleosomen werden zu kompaktem Chromatin organisiert [30]. Die Bindung zwischen Histonen und DNA wird durch kovalente, posttranslationale Modifikationen der N-terminalen Domänen von Histonresten, wie Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung reguliert. Sie sind damit für den dreidimensionalen Chromatinaufbau verantwortlich und nehmen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität der DNA. Jenuwein prägte für diese Histon-Modifikationen den Begriff des „*Histone Code*“ [31].

Im Euchromatin, der transkriptionell aktiven DNA, liegen Histone meist im acetylierten Zustand vor und bewirken eine Auflockerung der Chromatinstruktur. Histon-Acetyltransferasen (HAT) und Histon-Deacetylasen (HDAC) sorgen dabei für ein Gleichgewicht. Als weitere Histon-Modifikation ist die Methylierung der Aminosäure Lysin von Bedeutung [31, 32].

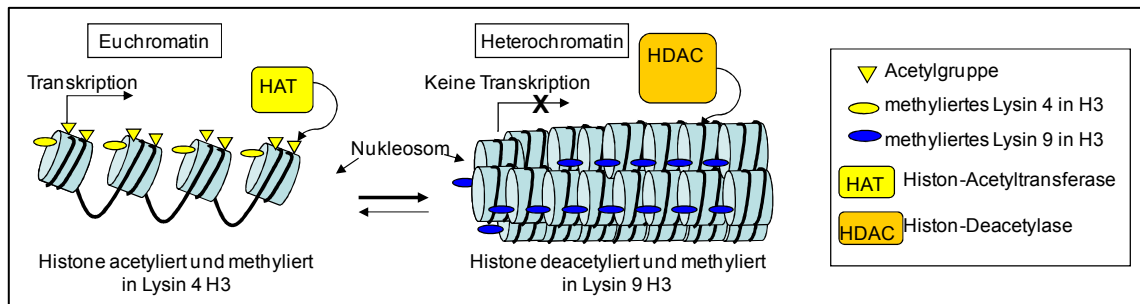


Abbildung 1.3: Modell zu Histon-Modifikationen (modifiziert nach [31])

Im Euchromatin und Heterochromatin finden durch Acetylierung und Methylierung Histon-Modifikationen statt. Euchromatin: Acetylierungen und Methylierungen von Lysin 4 in Histon 3 bewirken die Chromatinauflockerung. Transkriptionsfaktoren können zur Genaktivierung anbinden. Heterochromatin: Deacetylierung und Methylierung von Lysin 9 in Histon 3 führen zur kompakten Anordnung des Chromatins und blockieren die Transkription.

Die beiden epigenetischen Prozesse DNA-Methylierung und N-terminale Histon-Modifikationen („*Histone Code*“) sind funktionell durch MBPs wie zum Beispiel MeCP2 verbunden und nehmen in gegenseitiger Abhängigkeit Einfluss auf die Genexpression [33]. MBPs lagern sich an Methylcytosin in CpG-Inseln in der Promotorregion an und bilden mit Korepressoren, einschließlich HDACs, einen Komplex, der diese Enzyme aktiviert. Die Deacetylierung der Histone hat zur Folge, dass die nukleosomale Konfiguration kompakter wird und eine Anbindung von Transkriptionsfaktoren nicht mehr erfolgen kann [34].

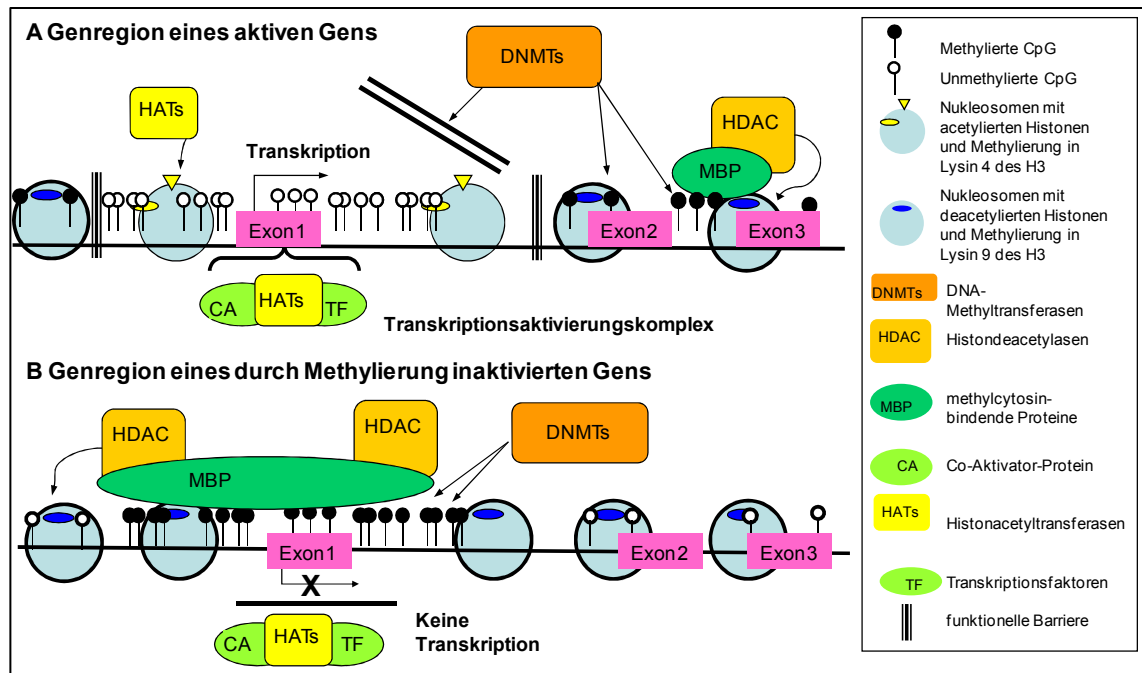


Abbildung 1.4: Genexpression in Abhängigkeit von Methylierung und Histon-Modifikationen Promotorregion (modifiziert nach [2])

A: Genregion eines aktiven Gens: in der Promotorregion sind die meisten CpG-Dinukleotide unmethyliert. Die Nucleosomen befinden sich im acetylierten Zustand und sind in Lysin 4 des Histons 3 methyliert. Der Transkriptionsaktivierungskomplex kann an die DNA binden und die Transkription induzieren. DNMTs können in diesem Bereich nicht anlagern. In angrenzenden, nicht zu transkribierenden Regionen werden Cytosine methyliert. Es binden MBPs an die Methylcytosine und ermöglichen durch Komplexbildung die Aktivierung von HDACs. Es erfolgt die Kondensierung der DNA.

B: Genregion eines epigenetisch inhibierten Gens: DNMTs werden vermehrt methyliert. Infolge der MBP- und HDAC-Aktivierung kann der Transkriptionsaktivierungskomplex nicht an den Promotor anlagern. Die Transkription des Gens ist inhibiert. Bereiche, die die Genregion flankieren, sind in geringerem Maße methyliert.

Die physiologisch vorkommende Methylierung und Inaktivierung von bestimmten Genen erfolgt kontrolliert. Tumorsuppressorgene können jedoch pathologisch inaktiviert werden, wenn Cytosin-Methylierungen aus der Umgebung der Genregion auf CpG-Inseln des Gen-Promotors übergreifen. Die Inhibition kann in einem mehrschrittigen Prozess zur Tumorentstehung beitragen.

1.3.3 Epigenetische Veränderungen in Tumorzellen

In Knudsons „two-hit“-Hypothese, nach der beide Allele für den Funktionsverlust eines Tumorsuppressorgens inaktiv sein müssen, sind Genmutationen und der Verlust von chromosomalem Material (*loss of heterozygosity*) ursächlich für die Tumorentstehung. Durch das zunehmende Wissen über die wichtige Rolle epigenetischer Mechanismen in der Kontrolle von Genexpression konnte Knudsons Theorie um den Faktor der epigenetisch bedingten Informationsverluste erweitert werden [35, 36].

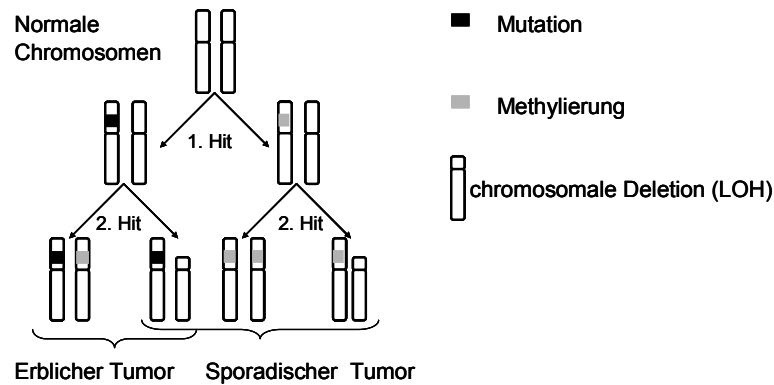


Abbildung 1.5: Knudsons „two-hit“-Theorie (modifiziert nach [25])

Zwei Aberrationen, genetisch oder epigenetisch, sind zur Repression eines Tumorsuppressorgens notwendig. Die erste Störung kann in sporadischen Tumoren sowohl durch eine Mutation als auch durch Promotor-Methylierung hervorgerufen sein. Im Gegensatz dazu findet man bei erblichen Tumoren als erste Alteration ausschließlich Mutationen. Der zweite Gendefekt kann in beiden Tumorarten Folge einer chromosomalen Deletion oder Hypermethylierung sein.

Erste Erkenntnisse über epigenetische Veränderungen von malignen Tumorzellen präsentieren Feinberg und Vogelstein in den frühen 80er Jahren. Zuerst wurde die Verringerung von DNA-Methylierungen in Tumorzellen identifiziert, die sowohl genomweit als auch in spezifischen Protoonkogenen auftreten kann. Die Hypomethylierung von CpG-Dinukleotiden der Promotorregion führt zur Aktivierung von Protoonkogenen, wie z.B. Ras-Onkogene in Lungen- und Kolonkarzinomen [24].

Eine genomweite Hypomethylierung wird in Tumorzellen häufig in repetitiven Sequenzen innerhalb von Introns oder bei in die DNA eingefügten, viralen Genen beobachtet. In normalen Zellen sind diese Bereiche dicht methyliert, wodurch die Transkription unterdrückt wird. Zu solchen repetitiven Sequenzen gehören *Alu-repeats* und *long interspersed nucleotide elements* (LINE-Sequenzen). Eine Hypomethylierung von LINE-Sequenzen wurde in verschiedenen Tumoren wie beispielsweise beim Kolonkarzinom gefunden [37]. Neben der Hypomethylierung als Faktor der Tumorentstehung wurde auch eine Zunahme der Methylierung in Gen-spezifischen Regionen verschiedener Tumorzellen festgestellt. 1986 wurde in Lungentumoren die Hypermethylierung des Calcitonin-Promotors und die Verminderung der Genexpression nachgewiesen [38]. Der vermutete Zusammenhang zwischen Hypermethylierung von CpG-Inseln und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen konnte erstmals 1989 beim Retinoblastom-Gen (Rb-Gen) aufgezeigt werden [39]. 1995 folgte dann die Entdeckung, dass die Hypermethylierung und die resultierende Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p16 häufig in neoplastischen Zellen vorkommt [40].

Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, setzt die Hypermethylierung von CpG-Dinukleotiden in der Promotorregion eine Kaskade von Proteinreaktionen in Gang, welche die Geninaktivierung von Tumorsuppressorgenen zur Folge hat.

1.3.4 Epigenetisch beeinflusste zelluläre Signalwege

In den letzten zwanzig Jahren konnte eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, die durch epigenetische Alterationen Einfluss auf die Entstehung verschiedener Neoplasien nehmen. Es handelt sich häufig um Gene, deren Produkte in der Kontrolle zellulärer Mechanismen mitwirken und die die Tumorentstehung bedingen können. Methylierungsanalysen von Kandidatengenen konnten aufzeigen, dass einige Gene in Abhängigkeit vom Herkunftsgewebe des Tumors häufiger methyliert sind [3]. Verschiedene Gene sind in unterschiedlichen Tumorentitäten hypermethyliert, so zum Beispiel das Zellzykluskontrollgen p16. Darüber hinaus können mehrere Signalwege der Zelle simultan durch Methylierungen beeinträchtigt werden [3]. In Tabelle 1.6 sind einige wichtige von epigenetischen Veränderungen betroffene Gene und ihre Signalwege zusammengefasst.

Tabelle 1.6: Signalwege der Zelle, die von epigenetischen Veränderungen betroffen sein können (modifiziert nach [25])

Signalweg	Gene
Zellzykluskontrolle	Rb, p14, p15, p16, p53 p73
DNA-Reparatur	hMLH1, MGMT, BRCA1
Wachstumsfaktorregulation	RAR β 2, SOCS-1
Apoptoseregulation	Caspase 8, DAP Kinase 1
Zelladhäsion, Zellinvasion	TIMP-2, TIMP-3, E-Cadherin

Für die aufgeführten Gene konnte die aberrante Methylierung von CpG-Inseln als Ursache von Geninaktivierung und Verlust der vor Tumorentstehung schützenden Faktoren nachgewiesen werden [25]. Epigenetische Aberrationen initiieren nicht nur eine Repression von Tumorsuppressorgenen, sondern nehmen auch Einfluss auf genetische Veränderungen im Verlauf der mehrschrittigen Tumorprogression. Die Inaktivierung von DNA-Reparatur-Genen kann zum Beispiel zu weiteren Mutationen prädisponieren [2]. Der Einfluss epigenetischer Veränderungen auf nachfolgende genetische Mutationen lässt vermuten, dass sie in der frühen Phase der Tumorentstehung eine entscheidende Rolle spielen [41].

1.3.5 Methodische Grundlagen der Methylierungsanalyse

Es existieren verschiedene Methoden zur Analyse des DNA-Methylierungsstatus, die von der Untersuchung der Methylierung des gesamten Genoms bis zu der eines spezifischen Gens reichen. Eine Auswahl ist in Tabelle 1.7 zusammengestellt.

Tabelle 1.7: Methoden der Methylierungsanalyse (modifiziert nach [42])

Fragestellung	Methode	Vorbehandlung der DNA	Erst-beschreiber
Globale Methylierungsanalyse	<i>reversed-phase high-performance liquid chromatography</i> (HPLC)	enzymatische Hydrolyse	Kuo 1980
	<i>high-performance capillary electrophoresis</i> (HPCE)	enzymatische Hydrolyse	Fraga 2002
Qualitative Analyse einzelner CpGs	MSREs + <i>Southernblot</i>	Restriktions- endonukleasen	Southern 1975
	MSREs + PCR	Restriktions- endonukleasen	Singer-Sam 1990
	MSP	Bisulfitbehandlung	Herman 1996
Quantitative Analyse einzelner CpGs	Ms-SNuPE (<i>methylation-sensitive single-nucleotide primer extension</i>)	Bisulfitbehandlung	Gonzalzo, Jones 1997
	<i>bisulfite genomic sequencing</i>	Bisulfitbehandlung	Frommer 1992

Herman *et al.* entwickelten mit der - in dieser Studie verwendeten - methylierungs-spezifischen PCR (MSP) eine rein qualitative, jedoch sehr sensitive, spezifische und robuste Methode zur Detektion von Hypermethylierungen individueller CpG-Dinukleotide innerhalb von CpG-Inseln. Mit diesem Verfahren können schnell und einfach Gen-spezifische Analysen durchgeführt werden, die insbesondere in der Analyse von Methylierungen in Tumorzellen und Patientenproben bevorzugt eingesetzt werden können [11, 43]. Grundlage ist die Verwendung von zwei Primerpaaren, die nach Bisulfitbehandlung der DNA jeweils entweder spezifisch an DNA-Stränge mit Cytosin (methylierte DNA) oder spezifisch an DNA-Stränge mit Uracil (unmethylierte DNA) binden und diese amplifizieren. Die MSP ist damit ein etabliertes Verfahren zur qualitativen Analyse von Methylierungen in vielen verschiedenen Tumorsuppressorgenen in unterschiedlichen Neoplasien [3].

1.3.6 Klinische Bedeutung epigenetischer Veränderungen

1.3.6.1 DNA-Hypermethylierung als Biomarker

Veränderungen der Gensequenz, der Genexpression und der Proteinstruktur dienen heute als molekulare Marker für verschiedene Tumoreigenschaften. Auch die Analyse von hypermethylierten CpG-Inseln in der Promotorregion von Genen könnte in Zukunft als Biomarker klinische Verwendung finden. Zur frühen Tumordetektion können sie potentiell zum Nachweis von Tumorzellen eingesetzt werden [44]. In der Klassifikation von malignen Erkrankungen können epigenetische Veränderungen von Nutzen sein. Erfolg versprechend ist auch der Nachweis hypermethylierter CpG-Inseln als prognostisches Kriterium. Zum Beispiel deuten die Ergebnisse von Esteller auf eine Assoziation der Methylierung von p16 und K-ras zum Diagnosezeitpunkt mit einem schlechteren Überleben bei Patienten mit Kolon-Karzinomen hin [10]. In einer weiteren Studie wurde festgestellt, dass die Methylierung des Promotors von MGMT bei primären Gliomen mit einem besseren Ansprechen auf die alkylierende Therapie mit Temozolomide assoziiert war [45]. Außerdem könnten Veränderungen in Methylierungsmustern zur Kontrolle des Verlaufs der Erkrankung, sowie zur Einschätzung von Therapieerfolgen mit Erfassung einer minimalen Resterkrankung verwendet werden [10, 46].

1.3.6.2 Epigenetische Veränderungen als Zielstrukturen therapeutischer Ansätze

Im Gegensatz zu genetischen Aberrationen sind epigenetische Veränderungen durch pharmakologische Substanzen reversibel. Abbildung 1.6 zeigt die Inhibition von DNMTs und HDACs als potentielle therapeutische Angriffspunkte. Epigenetische Therapeutika wirken bei soliden und hämatopoetischen Neoplasien relativ selektiv auf Tumorzellen, weil diese Aberrationen vermehrt in neoplastischen Zellen vorkommen [47].

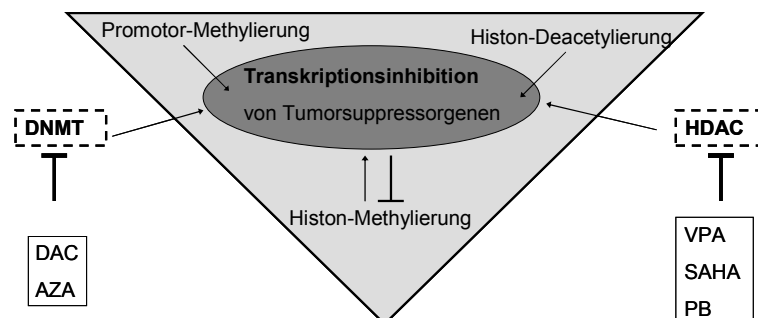


Abbildung 1.6: Epigenetische Regulation der Transkriptionsaktivität und epigenetische Ziele therapeutischer Substanzen zur Modifikation von DNA-Methylierung und Histon-Acetylierung (modifiziert nach [47])

Vor etwa 45 Jahren wurden das Cytosinanalogen 5-Aza-2'-Deoxycytidin (DAC) und das Ribonukleosidanalogen 5-Azacytidin (AZA) - noch vor der Entdeckung ihrer demethylierenden Eigenschaften - als zytotoxische Substanzen für die Therapie von Leukämien entwickelt. Ihr Einsatz in Kombination mit anderen Chemotherapeutika in der Induktions- und Konsolidierungstherapie akuter Leukämien wird jedoch durch ihre hohe Toxizität limitiert [47].

1980 beschrieben Jones und Taylor erstmals die Fähigkeit von AZA bei *in vitro* behandelten Zellen die Methylierung von neu synthetisierter DNA zu inhibieren [48]. Später wurde nachgewiesen, dass demethylierende Substanzen die Reexpression von Tumorsuppressorgenen in Tumorzellen induzieren können [2]. AZA wird nach Phosphorylierung als Nukleosidanalogen hauptsächlich in RNA und zu einem kleinen Teil in DNA eingebaut. DAC wird hingegen aufgrund der enthaltenen Deoxyribose-Gruppe ausschließlich in DNA eingefügt [49]. Anschließend binden beide Substanzen kovalent an DNMTs und blockieren diese irreversibel. Bemerkenswert ist, dass DAC schon in niedriger Dosis seine demethylierende Aktivität entfaltet [50].

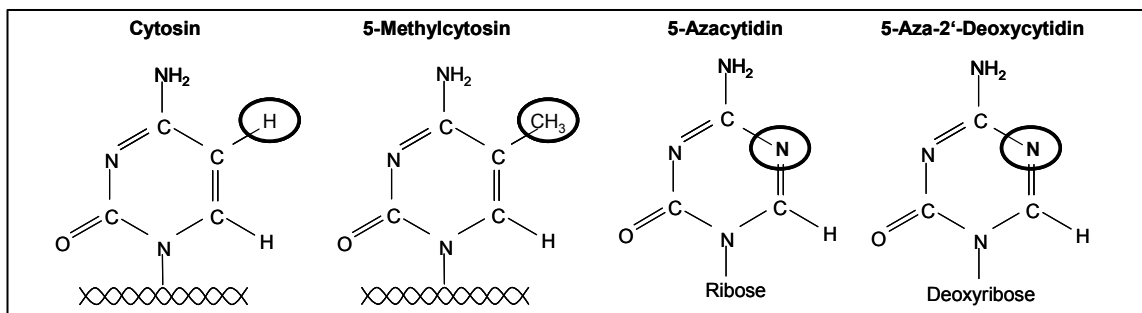


Abbildung 1.7: Molekularer Aufbau der Base Cytosin und ihrer modifizierten Base Methylcytosin sowie der DNMT-Inhibitoren AZA und DAC

Beim therapeutischen Einsatz in niedrigen Dosierungen sind die Effekte von DAC hauptsächlich auf dessen differenzierungs-induzierende Eigenschaften zurückzuführen, während die zytotoxische Aktivität hier eine geringere Rolle spielt [51]. In mehreren Studien konnten die demethylierenden Eigenschaften bei einzelnen Genen in der Niedrig-Dosis-Therapie bei Patienten mit MDS und AML nachgewiesen werden [52]. Näheres zur epigenetischen Therapie bei hämatopoetischen Neoplasien wird im folgenden Kapitel beschrieben.

Die Geninaktivierung wird durch ein Zusammenspiel DNMTs und HDACs vermittelt. Die abnorme Aktivierung von HDACs und der resultierende Verlust von Acetylierung der Lysinreste von Histonen bieten einen weiteren Angriffspunkt für epigenetische Therapiemöglichkeiten. Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Cytosin-Methylierung

in der Aufrechterhaltung der transkriptionellen Repression dominant über die Aktivität von HDAC ist. So kann der HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) zwar die Expression unmethylierter Gene steigern, in einer Monosubstanz-Therapie gelingt jedoch keine Reaktivierung. Voraussetzung für die Wirkung von HDAC-Inhibitoren ist die Kombination mit der vorherigen Gabe von DNMT-Inhibitoren. Der synergistische Effekt beider Substanzen führte in dieser Untersuchung zur Reexpression der Gene hMHL1, TIMP-3, p15 und p16 [53]. In Tabelle 1.8 ist eine Zusammenstellung von bereits untersuchten HDAC-Inhibitoren aufgeführt. Durch eine sequentielle Applikation von DNMT-Inhibitoren gefolgt von HDAC-Inhibitoren kann die stärkste Reexpression von hypermethylierten Genen in Tumorzellkulturen erzielt werden [54].

Tabelle 1.8: Auswahl an HDAC-Inhibitoren (modifiziert nach [49])

Substanzgruppe	HDAC-Inhibitoren in klinischen Studien
Kurzkettige Fettsäuren	Valproat (VPA), Natriumphenylbutyrat
Hydroxamsäure	Trichostatin A Suberoylanilinhydroxamsäure (SAHA)
Benzamid	MS-275
Zyklische Tetrapeptide	Depsipeptide

In wieweit sich die Beeinflussung unbeteiligter Gene, durch die Therapie mit epigenetisch wirksamen Substanzen, als ein Problem in der Therapie herausstellen könnte ist noch nicht bekannt. Die unbeabsichtigte Aktivierung von Onkogenen kann nicht völlig ausgeschlossen werden [55].

Die Untersuchung der DNA-Methylierung in spezifischen Promotorregionen und die globale Methylierungsveränderung sind daher wichtiger Bestandteil klinischer Studien zum Einsatz von demethylierenden Substanzen.

1.3.7 Epigenetische Therapieansätze bei der AML

Die Forschungsergebnisse über die epigenetische Beeinflussung der Entstehung hämatopoetischer Neoplasien durch Hypermethylierung von Zellregulationsgenen wie p15, gab Anlass, die Effekte der DNA-Methyltransferase-Inhibitoren AZA und DAC bei Leukämie-Patienten näher zu untersuchen [56]. Erste Nachweise zu differenzierungs-fördernden Effekten von DAC bei AML- und MDS-Patienten wurden 1984 von Pinto *et al.* erbracht [49]. In folgenden klinischen Studien konnte die Wirkung der Niedrig-Dosis-Therapie von AZA und DAC bestätigt werden. Die meisten bisher veröffentlichten Studien untersuchen dabei MDS-Patienten. AZA und DAC weisen in

niedrigen Dosierungen ein günstiges Nebenwirkungsprofil auf. Im Vergleich zur intensiven Chemotherapie ist die therapieassoziierte Myelosuppression bei AZA und DAC weniger stark ausgeprägt und von kürzerer Dauer [57]. In klinischen Studien von Wijermans und Lübbert zur Wirkung von DAC bei MDS-Patienten wurde bei etwa der Hälfte Patienten ein Therapieeffekt verzeichnet. Insbesondere Patienten der zytogenetisch ungünstigen Gruppe profitierten von der Therapie [58]. In der ersten Phase III Studie der *cancer and leukemia group B* (CALGB), in der die Behandlung von MDS-Patienten mit subkutan appliziertem AZA mit alleiniger supportiver Therapie verglichen wurde, konnte erstmals ein Überlebensvorteil für die mit AZA behandelten Patienten festgestellt werden. Die Gesamtüberlebenszeit bzw. die Zeit bis zur Transformation in eine AML verlängerte sich deutlich. Durch die weniger aggressive Therapie konnte insbesondere die Lebensqualität positiv beeinflusst werden [59]. Studien zu DAC bei MDS wurden von Wijermans 2000 mit 15 mg/m² 3-mal pro Tag für 3 Tage i.v. und 2007 von Kantarjian in niedrigerer Gesamtdosis in verschiedenen Protokollschemata veröffentlicht. Zusammenfassend zeigen die klinischen Daten, dass niedrige Dosierungen mit einer Applikationsdauer von fünf bis maximal zehn Tagen die besten Ergebnisse erzielen [50, 58, 60]. Die optimalen Dosierungen und Verabreichungsschemata von DAC bei AML sind Gegenstand aktueller Studien.

Tabelle 1.9: Klinische Studien zu AZA und DAC bei MDS und AML (modifiziert nach [47])
Abkürzungen: d = Tage, n = Anzahl der Patienten, CR = komplette Remission, PR = partielle Remission, HI = Verbesserung der hämatologischen Situation, Mo = Monate, Wo = Wochen

Substanz	Erkrankung	Studienphase Dosis Protokoll	Gesamt- dosis/ Zyklus	n	An- sprechr- rate (CR,PR,HI)	Ansprechdauer/ Überlebenszeit	Autoren
AZA	MDS	Phase II 75 mg/m ² /d für 7 d i.v.	525 (mg/m ²)	43	49 % (12,25,12) %	mittleres Überleben 13,3 Mo mittlere Remissionszeit für CR und PR: 14,7 Mo	Silverman 1993 [61]
AZA	MDS	Phase III 75 mg/m ² /d für 7 d s.c.	525 (mg/m ²)	98	60 % (7,16,37) %	mittlere Zeit bis Transformation in AML oder Tod: 19 Mo mittlere Ansprechdauer CR und PR: 15 Mo	Silverman 2002 [59]
DAC	MDS	Phase II 15 mg/m ² 3x /d für 3 d i.v.	135 (mg/m ²)	66	49 % (20,4,24) %	mittlere Ansprechdauer CR: 36 Wo, PR: 39 Wo; mittleres Überleben ab Diagnose: 22 Mo, ab Therapiebeginn: 15 Mo	Wijerman 2000 [58]
DAC	MDS	Phase III 15 mg/m ² 3x /d für 3 d i.v.	135 (mg/m ²)	170	17 % (9,8,13) %	mittlere Zeit bis Transformation in AML/ Tod: 12,1 Mo	Kantarjian 2006 [62]
DAC	MDS/ chronisch myelomon ozytäre Leukämie	Phase II 1. 20 mg/m ² /d: 5 d i.v. 2. 20 mg/m ² /d: 5 d s.c. 3. 10 mg/m ² /d: 10 d i.v.	100 (mg/m ²)	95	Insgesamt: 59 % (34,1,24) % 1. CR 39 % 2. CR 21 % 3. CR 24 %	mittleres Gesamtüberleben 19 Mo	Kantarjian 2007 [60]
DAC	AML	Phase I 90-120 mg/m ² 3x /d für 3 d i.v.	810- 1080 (mg/m ²)	12	33 % (25,8) %	k.a.	Petti 1993 [63]

In Erweiterung zur Monotherapie mit DNMT-Inhibitoren wurde die kombinierte Therapie mit sequentieller Gabe von DNMT-Inhibitoren gefolgt von HDAC-Inhibitoren entwickelt. In den Jahren 2006 und 2007 wurden drei Studien zur kombinierten Therapie bei AML- und MDS-Patienten veröffentlicht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1.10 zusammengefasst.

Tabelle 1.10: Auswahl von klinischen Studien zur kombinierten Therapie von DNMT-Inhibitoren und HDAC-Inhibitoren bei MDS und AML (modifiziert nach [47]) Abkürzungen: d= Tage, n= Anzahl der Patienten, CR= komplette Remission, PR= partielle Remission, HI= Verbesserung der hämatologischen Situation, Mo= Monate, Wo= Wochen

Sub-stanz	Krank-heit	Dosis Protokoll	Gesamtdosis pro Zyklus (mg/m ²)	n	Ansprech-rate CR, PR, HI	Ansprech-dauer/ Überlebens-zeit	Autoren
AZA + Natrium-phenyl-byturat	AML /MDS	Phase I AZA: 5, 10, 14 d 25-75 mg/m ² /d s.c. gefolgt von NPB 375 mg/kg /d	AZA: 125-1050 mg/m ² NPB: 2625 mg/kg	36	11/29 CR: 4/29 PR: 1/29 HI: 6/29	mittlere Ansprechdauer bei CR: 8 - > 19	Gore 2006 [54]
DAC + VPA	AML/ MDS	Phase I/II DAC: 15 mg/m ² /d für 10 d i.v. VPA: 20, 35, 50 mg/kg/Tag für 10 d p.o.	DAC: 150 mg/m ² VPA: 200-500 mg/kg	54	CR: 22 %	mittlere Überlebenszeit CR: 15,3 Mo (4,6 bis 20,2), NR: 4,9 Mo (0,6 bis 17,8)	Garcia-Manero 2006 [64]
AZA + VPA + ATRA	AML/ MDS	Phase I/II, AZA: 75 mg/m ² /d für 7 d s.c. VPA: 50, 62,5, 75 mg/kg /d für 7 d p.o., Phase II ATRA: 45 mg/m ² /d für 5 d	AZA: 525 mg/m ² VPA: 350-525 mg/kg ATRA: 225 mg/m ²	53	42 % (CR: 22 %), (bei > 60 Jahre ohne Vorbe-handlung: CR 33 %)	mittlere Ansprechdauer 26 Wo (mittlere Überlebenszeit noch nicht ausgewertet)	Soriano 2007

1.3.8 Kombinierte Therapie mit epigenetischen Therapeutika und ATRA

Bei AML-Subtypen ohne t(15;17) hat die ATRA-Monotherapie in der bei PML verwendeten Dosis keine Wirkung. Höhere Dosierungen, die möglicherweise einen besseren therapeutischen Effekt aufweisen könnten, sind aufgrund der Nebenwirkungen nicht einsetzbar. Modellversuche haben jedoch gezeigt, dass demethylierende Substanzen die Sensitivität von AML-Zellen ohne t(15;17) gegenüber ATRA verstärken. ATRA kann in Kombination mit AZA die Demethylierung und von RAR β 2 induzieren [65]. In gesunden hämatopoetischen Stammzellen induzieren Retinoide die Differenzierung der Zellen. Diese durch den Retinolsäure-Rezeptor vermittelte Signalkaskade kann in AML-Zellen gestört sein. Bei der PML liegt durch ein *rearrangement* des Retinolsäure-Rezeptors ein Funktionsverlust vor, der durch ATRA wiederhergestellt werden kann. Möglicherweise ist in den AML-Zellen ohne t(15;17) ein komplizierterer Defekt für die Störung des Signalweges verantwortlich, so dass die alleinige Gabe von ATRA für eine Reaktivierung nicht ausreicht. Die Rekrutierung von DNMTs und HDACs durch das PML/RAR α -Fusionsprotein weist auf die Verbindung zwischen genetischen und epigenetischen Aberrationen bei der AML hin [65].

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Erfassung von Methylierungsmustern von älteren AML-Patienten und die Ermittlung des Spektrums an *in vivo* Effekten im Verlauf einer epigenetischen Therapie in Form von Methylierungsveränderungen.

Als Erkrankung des älteren Menschen kann mit steigender Lebenserwartung in der westlichen Welt von einer zunehmenden Inzidenz der AML ausgegangen werden. Die Problematik der Therapie älterer AML-Patienten liegt darin ihnen oft keine aggressive Induktionstherapie oder Stammzelltransplantation zumuten zu können. Dies macht die Entwicklung neuer Therapiestrategien notwendig. Auf der Suche nach Alternativen zur rein supportiven Therapie haben die Erkenntnisse über die Entstehungsmechanismen der AML, bei denen neben genetischen Aberrationen auch epigenetische Veränderungen eine Rolle spielen, zur Entwicklung neuer Therapiestrategien mit epigenetischen Angriffspunkten geführt.

Zur Identifizierung von älteren AML-Patienten, die von einer epigenetischen Therapie profitieren können, ist die Bestimmung von Kriterien notwendig, die auf ein mögliches Ansprechen hinweisen. Aus diesem Grund ist die Durchführung studienbegleitender Untersuchungen über die Effekte von epigenetisch wirksamen Medikamenten bedeutsam. Zu diesen gehören unter anderem die Methylierungsanalysen verschiedener Zielgene.

In Zelllinien sind die demethylierenden Effekte von AZA und DAC bereits vielfach nachgewiesen. Zu der *in vivo* Aktivität dieser Substanzen gibt es hingegen nur wenige Arbeiten, die sich meist mit einzelnen Genen befassen.

In dieser Arbeit soll der Methylierungsstatus von einem breiten Spektrum an 19 bekannten Tumorsuppressorgenen in Proben von fünf älteren AML-Patienten untersucht werden, die an der von Lübbert *et al.* initiierten Phase II Studie FR00331 zur niedrig-dosierten DAC-Therapie bei AML teilgenommen haben. Dabei soll erfasst werden, welche Methylierungsmuster und Methylierungsdynamik im Verlauf der Therapie mit demethylierenden Substanzen auftreten können. Die Ergebnisse werden dem Ansprechen auf die Therapie, dem Überleben der Patienten und klinischen Parametern gegenübergestellt. Es soll ermittelt werden, ob es Hinweise im Methylierungsprofil gibt, die auf ein besseres Ansprechen auf die Therapie bzw. eine bessere Prognose hindeuten und deren Untersuchung an einer größeren Patientenpopulation sinnvoll erscheint.

3 Material und Methoden

3.1 Patientenproben

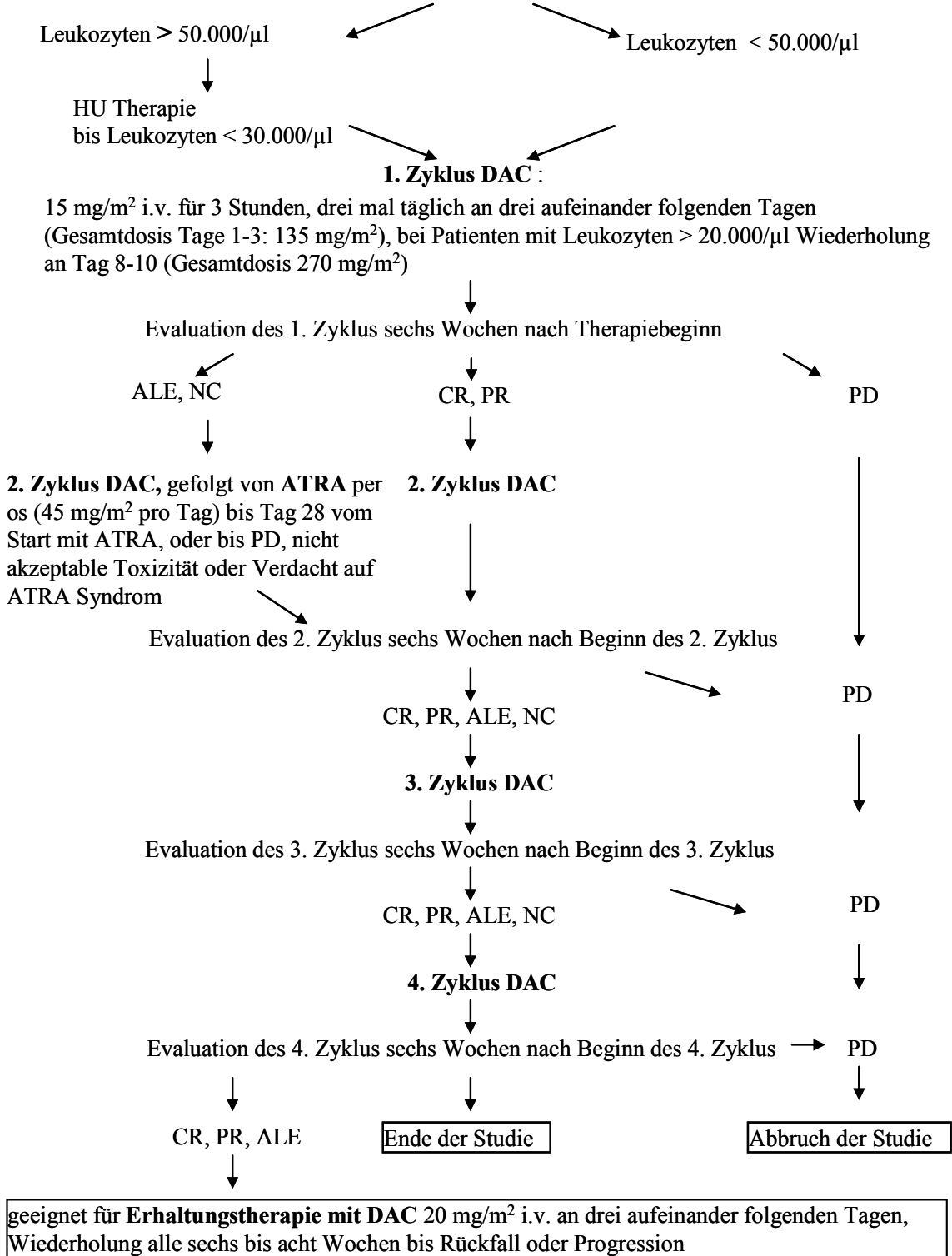
Es wurden Knochenmark- bzw. Blutproben von fünf AML-Patienten auf ihr Methylierungsprofil in 19 Genen bei Diagnosestellung und nach zwei Zyklen mit DAC untersucht. Alle fünf Patienten wurden im Zeitraum von 2005 bis 2007 in der Medizinischen Klinik IV des Universitätsklinikums Aachen behandelt und nahmen an folgender von Lübbert *et al.* initiierten Studie teil: „*Phase II study of low-dose intravenous DAC in patients aged > 60 years with acute myeloid leukaemia who are not eligible for standard induction chemotherapy (FR00331)*“. Sie entsprachen den unten stehenden Kriterien zum Studieneinschluss und haben sowohl in die Teilnahme an der Studie als auch in die Verwendung ihrer Knochenmark- bzw. Blutproben und Einbeziehung ihrer klinischen Daten zu wissenschaftlichen Zwecken eingewilligt. Diese Studie ist von der Ethik-Kommission der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen genehmigt worden. Die Diagnosestellung der Patienten erfolgte nach der FAB-Klassifikation [66].

In der Studie FR00331 soll die Wirksamkeit und Toxizität von niedrig dosiertem DAC bei älteren Patienten mit AML, die für eine aggressive Induktions-Chemotherapie nicht in Frage kommen, untersucht werden. Die Patienten müssen nachstehende Kriterien erfüllen:

- Patienten mit AML (> 30 % Blastenanteil im Knochenmark, FAB-Klassifikation), für die zum Diagnosezeitpunkt die Standard-Induktions-Chemotherapie oder Knochenmarktransplantation als Therapieoption ausgeschlossen wurden
- Alter der Patienten > 60 Jahre
- Lebenserwartung mit erfolgreicher Therapie > drei Monate
- Allgemeinzustand nach ECOG-Kriterien 0 bis 2
- altersentsprechend normale Herz-, Lungen-, und Leberfunktion (Kreatinin < 1,5 mg/dl [außer Leukämie-assoziiert], gesamt Bilirubin < 2,0 mg/dl)
- Patienten mit Leukozyten > 50.000 / μ l mit effektiver initialer Zytoreduktionstherapie
- vom Patienten unterschriebene Einwilligungserklärung

**Die Decitabine-Therapie erfolgt nach folgendem Studienprotokoll
(Erklärungen der Abkürzungen befinden sich auf nachfolgender Seite)**

Diagnose der AML, Induktions-Therapie nicht durchführbar, Einschlusskriterien erfüllt



Patienten, die zum Zeitpunkt der Erhaltungstherapie nicht in kompletter Remission sind, eignen sich für eine anschließende DAC-Therapie in Kombination mit VPA: Erhaltungstherapie DAC 20 mg/m² i.v. an drei Tagen alle acht Wochen und VPA (oral) täglich. Bei schwerer Toxizität werden die kommenden Zyklen auf 50 % der vorherigen Dosis reduziert. Bei einer Zytopenie, die länger als zehn Wochen anhält, wird die Therapie abgebrochen.

Tabelle 3.1: In der DAC-Studie verwendete Abkürzungen

Abkürzungen	Bedeutung
DAC	5-Aza-2'-Deoxycytidin
HU	Hydroxyurea
ATRA	all-trans-Retinsäure
CR (<i>complete remission</i>)	vollständige Remission
PR (<i>partial remission</i>)	Partielle Remission
ALE (<i>antileukemic effect</i>)	Antileukämischer Effekt
NC (<i>no change</i>)	Keine Veränderung
PD (<i>progressive disease</i>)	Fortschreiten der Erkrankung

Die Beurteilung des Ansprechens auf die Therapie wird jeweils sechs Wochen nach Erhalt des DAC-Zyklus an Hand von Knochenmarkaspiraten (Blasten im Knochenmark) und von Blutwerten durchgeführt. Dazu dienen folgende Kriterien:

Tabelle 3.2: Studienkriterien zur Beurteilung des Therapieerfolges

Ansprechen auf die Therapie	Blasten	Leukozyten peripher	Thrombozyten peripher	Sonstige Merkmale
Vollständige Remission (CR)	< 5 %	> 1.500 /µl	> 100.000 /µl	Kein Hinweis auf extramedulläre Leukämie
Partielle Remission (PR)	5-25 %	> 1.500 /µl	> 100.000 /µl	Kein Hinweis auf extramedulläre Leukämie
	< 5 %	< 1.500 /µl	< 100.000 /µl	Kein Hinweis auf extramedulläre Leukämie
Antileukämischer Effekt (ALE)	> 25 % Blasten Reduktion im Knochenmark im Vergleich zum initialen Blastenanteil, aber nicht ausreichend um PR Kriterien zu erfüllen			
Stabile Erkrankung (SD)	Kein CR, PR oder ALE und keine Progression			
Fortschreitende Erkrankung (PD)	25 %ige Zunahme der Blasten im peripheren Blut und Knochenmark im Vergleich zum Anteil vor Therapie			
	oder	Leukozyten Anstieg über 50.000 µl oder Verdopplung innerhalb 24 Stunden, ohne Anzeichen von Differenzierung oder infektiöbedingter Leukozytose		
	oder	Offensichtliche klinische Zeichen und Symptome von Leukostase, Koagulopathie oder extramedullärer Leukämie, die eine sofortige Zytoreduktion mit Hydroxyurea benötigen		
	oder	Leukozytose, die nicht mit Hydroxyharnstoff (nach Studienprotokoll gegeben) kontrolliert werden kann		
Früher Tod (<i>early death</i>, ED)	Jeder Todesfall innerhalb von sechs Wochen nach Beginn der DAC-Therapie			

3.2 Untersuchte Gene

Die Erstellung des Methylierungsprofils in dieser Arbeit erfolgte auf der Grundlage eines Kandidatengenansatzes. Basis dafür sind Gene, die erfahrungsgemäß tumorassoziiert sind und für deren Genprodukte eine Rolle in der Pathogenese der AML bestätigt oder wahrscheinlich ist. Die 19 Gene wurden aufgrund ihrer Funktion in der Zelladhäsion, -invasion und -zykluskontrolle, der Apoptoseregulation, der DNA-Bindung und DNA-Reparatur, sowie der Regulation von Transkriptions- und Wachstumsfaktoren ausgewählt. Bei diesen 19 Genen wurde in vorhergehenden Studien gezeigt, dass ihre Expression durch Hypermethylierung von CpG-Inseln in verschiedenen Tumoren inhibiert sein kann (siehe Tabelle 3.3). Bei der Auswahl wurden sowohl Gene berücksichtigt, die schon ausführlich im Zusammenhang mit der epigenetischen Tumorentstehung beschrieben werden, als auch Gene, die erst in einzelnen Studien untersucht werden. Esteller *et al.* haben 2001 Methylierungsprofile in verschiedenen Tumorgeweben untersucht und bestätigt, dass die Hypermethylierung von CpG-Inseln in allen Tumorentitäten gefunden werden kann. Dabei zeigen sich tumorspezifische Methylierungsmuster. Typische Gene, die bei Leukämien hypermethyliert sind, sind zum Beispiel p15, p73, MGMT, RAR β 2 und DAPK1. Im Gegensatz dazu ist p16 häufiger bei malignen Lymphomen methyliert. Nur teilweise liegen für die hier analysierten Gene Untersuchungen zur Hypermethylierung bei der AML vor.

Tabelle 3.3: Informationen zu den untersuchten Genen

Gen	Chromosom	Funktion des zugehörigen Proteins	Referenzen zu Methylierungen in Neoplasien
C/EBPα (CCAAT/enhancer binding protein)	19q13.1	DNA-Bindungs-Protein: erkennt die CCAAT Region und Enhancer-Strukturen	AML [67]
DAPK1 (death-associated protein kinase 1)	9q34.1	Apoptoseregulation: Kalzium/Calmodulin-abhängige Serin/Threonin- Kinase als Regulator der Apoptose	Leukämien [3]
E-Cadherin	16q22.1	Zelladhäsion: Reguliert Zell-Zelladhäsion Ca^{2+} -abhängig	AML [68]
ID4 (inhibitor of DNA binding 4)	6p22-p21	Transkriptionsfaktorregulator: Helix-Loop-Helix-Protein: inhibiert durch Bildung von Heterodimeren die DNA-Bindung anderer Helix-Loop-Helix Proteine	AML [69]
MGMT (O_6 -methylguanine-DNA methyltransferase)	10q26	DNA-Reparatur: Schutz vor dem Einfluss von O_6 -Methylguaninen, Reparatur von alkylierten Guaninen in der DNA	Leukämien [3]
p15 (cyclin - dependent kinase inhibitor 2B)	9p21	Zellzykluskontrolle: Inhibiert die Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK4/6)	AML [68]
p16 (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)	9p21	Zellzykluskontrolle: Inhibiert die Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK4/6)	Lymphom [3], AML [11], Neoplasien[40],
p73	1p36.3	Zellzykluskontrolle: Induziert die Transkription des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors p21, induziert Apoptose	AML [11]
RARβ2 (retinoic acid receptor beta 2)	3p24	Wachstumsfaktorregulation: Rezeptor für Retinolsäure, Regulation der Genexpression	Non-Hodgkin-Lymphom [70]
SFRP-1 (secreted frizzled related protein 1)	8p12-p11.1	Wachstumsfaktorregulation: Modulator des Wnt-Signalweges durch Interaktion mit Wnts, diese haben Einfluss auf Zellwachstum und Differenzierung	AML [71]
SFRP-2 (secreted frizzled related protein 2)	4q31.3	Wachstumsfaktorregulation: Modulator des Wnt-Signalweges durch Interaktion mit Wnts, diese haben Einfluss auf Zellwachstum und Differenzierung	AML [71]
SFRP-4 (secreted frizzled related protein 4)	7p14.1	Wachstumsfaktorregulation: Modulator des Wnt-Signalweges durch Interaktion mit Wnts, diese haben Einfluss auf Zellwachstum und Differenzierung	AML [71]
SFRP-5 (secreted frizzled related protein 5)	10q24.1	Wachstumsfaktorregulation: Modulator des Wnt-Signalweges durch Interaktion mit Wnts, diese haben Einfluss auf Zellwachstum und Differenzierung	AML [71]
SHP-1 (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6)	12p13	Wachstumsfaktorregulation: Protein-Tyrosin-Phosphatase, Aktivität ist verbunden mit Rezeptoren für Wachstumsfaktoren	AML [72]
SOCS-1 (suppressor of cytokine signaling 1)	16p13.1 3	Wachstumsfaktorregulation: Negative Regulation von Cytokin-Signalwegen, die den JAK/STAT Signalweg betreffen, inhibiert JAK2 Kinase-Aktivität	AML [11]
SOCS-3 (suppressor of cytokine signaling 3)	17q25.3	Wachstumsfaktorregulation: Negative Regulation von Cytokin-Signalwegen, die den JAK/STAT Signalweg betreffen, inhibiert JAK2 Kinase-Aktivität	nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom [73]
TIMP-2 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 2)	17q25	Zelladhäsion/Zellinvasion: Bildet Komplex mit Metalloproteinasen (Zinkabhängige Endopeptidasen) und inaktiviert sie irreversibel	Non-Hodgkin-Lymphom [74]
TIMP-3 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 3)	22q12.1 q13.2/2 2q12.3	Zelladhäsion/Zellinvasion: Bildet Komplex mit Metalloproteinasen (Zinkabhängige Endopeptidasen) und inaktiviert sie irreversibel	Nierenkarzinom [3]
WRN (werner syndrome gene)	8p12-p11.2	Wachstumsfaktorregulation: Bindet an Rezeptoren der Frizzled Familie, Beeinflussung von β -Catenin-abhängiger Transkriptionsregulation	AML [75]

3.3 Eingesetzte Standardgeräte und Übersicht der Analyseschritte

Gerät	Produktbezeichnung und Hersteller
Autoklav	Autoclave HMC, BPW Vertriebs-GmbH für Labortechnik, Süßen
Gelelektrophoresekammer	i-MUPID electrophoresis system MV-0030 Eurogentec, Köln
Heizblock	Techne DRI-BLOCK DB.2A, thermo-DUX, Wertheim
Kamera	Camedia C3040Zoom, Olympeus, Hamburg
Kühlschränke	Bosch, München
Messküvette	Microvolume cell 70µl, Pharmacia Biotech, Freiburg
Mikrospektrometer	ABX Micros 60-OT, ABX Hematologie, Montpellier (Frankreich)
Mikrowelle	Mikrochef 900W, Moulinex, Offenbach
Mikrozentrifuge	SD, 110 VAC, Sigma-Aldrich, München
pH-Meter	MP 230, Mettler Toledo, Schwerzenbach (Schweiz)
Pipetten	Eppendorf Reference, Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Pipet-Plus LTS Pipet, Rainin, Giessen
Spektralphotometer	Gene Quant II, Pharmacia Biotech, Freiburg
1. Thermocycler	Omn-E Thermal Cycler, Thermo Hybaid, Ashford (UK)
2. Thermocycler	PxE Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation, Dreieich
Tiefkühler	Haereus, Haereus instruments, Hanau
Transilluminator	UV-Transilluminator, biostep GmbH, Jahnsdorf
Vortexer	Assistent Reamix 2789, K. Hecht GmbH & Co.KG, Sondheim
Waage	AC 100, Mettler Waagen GmbH, Giessen
Wasserbad	Küttermann Labortechnik, Uetze-Hänigsen
Werkbank	Heraeus instruments, Hanau
Zellzähler	MICROS 60, AXON LAB AG, Reichenbach/ Stuttgart
Zentrifuge 1	Labofuge 400e, Haereus instruments, Hanau
Zentrifuge 2	Biofuge (pico), Haereus instruments, Hanau

Standard-verbrauchsmaterial	Hersteller
Pasteurpipetten	Einweg-Pasteurpipetten, steril, Carl Roth, Karlsruhe
Erlenmeyer-Kolben	Schott Duran, Mainz
Messkolben	Schott Duran, Mainz
Pipettenspitzen	epT.I.P.S, Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Gel-Saver Tip II, Kisker, Steinfurt
Pipettenspitzen	MultiGuard Barrier Tips, Sorenson BioScience, Salt Lake City (USA)
Waagschalen	Rotilambo Einmal-Wagschalen, Opak-blau, Carl Roth, Karlsruhe

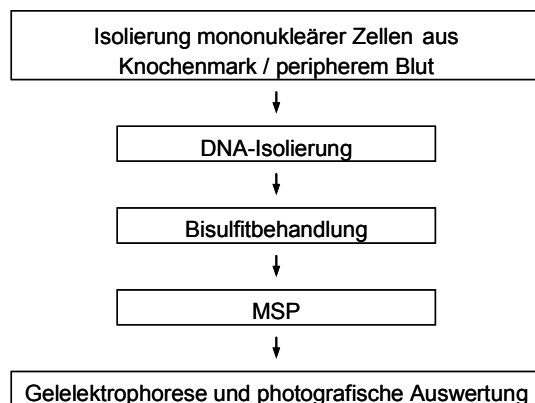


Abbildung 3.1: Übersicht der einzelnen Schritte in der MSP-Analyse

3.4 Ficoll-Zentrifugation

Material	Hersteller
Lymphoprep	Prod.No.1114544 (1 x 250ml), Axis-Shield PoC AS, Oslo (Norwegen)
PBS-Puffer, bestehend aus: Na ₂ HPO ₄ (1,3 g) KH ₂ PO ₄ (0,2 g) NaCl (8,0 g) Aqua bidest. ad 1,0 l	Apotheke Uniklinikum Aachen
Kryoröhrchen (2 ml)	Kryoröhrchen, Greiner bio-one, Frickenhausen
Spritze mit Aufsatz	Abbocath-T 14G, G713-A01 4535-14, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden

Zur Isolierung mononukleärer Zellen aus Citrat-Knochenmark oder EDTA-Blut der zu untersuchenden AML-Patienten wird das aus Natrium-Diatrizoat und Polysachariden bestehende Ficoll-Lymphoprep-Reagenz verwendet. Die Isolierung erfolgt nach dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation. Auf eine Ficoll-Lymphoprep-Schicht wird Knochenmark (KM) bzw. peripheres Blut (PB) aufgebracht. Die vollständige Trennung erfolgt durch Zentrifugierung. Anschließend werden die mononukleären Zellen aus der Interphase (siehe Abbildung 3.2) entnommen und nach Zugabe des PBS-Puffers mittels einer Zentrifuge aufgereinigt. Die Zellzahl wird am Mikrospektrometer bestimmt. Die Probe kann dann mit etwa 5×10^6 Zellen pro ml eingefroren werden oder direkt zur DNA-Isolierung weiterverwendet werden.

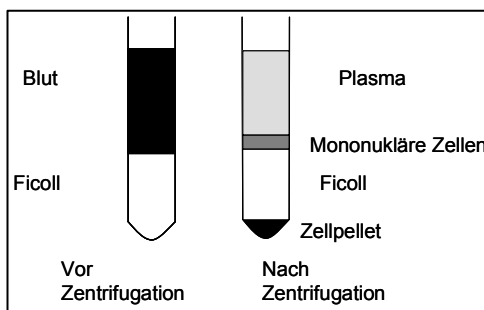


Abbildung 3.2: Isolierung mononukleärer Zellen mit Hilfe des Ficoll-Reagenz
Nach Zentrifugation trennen sich die Blutbestandteile nach ihrem Dichtegradienten auf. Die mononukleären Zellen können zur weiteren Verarbeitung entnommen werden.

3.5 DNA-Isolierung

Material	Hersteller
QIAmp DNA-Blood Mini	Cat.No.51104 ,Qiagen, Hilden
AL-Buffer (Lysis Buffer)	Mat.No 1014594
Qiagen Protease:	Protease Pulver mit 1,2 ml Protease solvent bei -20 °C gelagert Mat.No 1016330
AW1-Buffer:	Washbuffer 19 ml Konzentrat plus 25 ml Ethanol absolut Mat.No 1010584
AW2-Buffer:	Washbuffer 13 ml Konzentrat plus 30 ml Ethanol absolut Mat.No 1014790
Ethanol absolut	Baker Analyzed Reagents; Deventer, Niederlande
PBS-Puffer	Mat.No 1014592 Baker Analyzed Reagents; Deventer, Niederlande Apotheke Uniklinikum Aachen

Zur DNA-Isolierung wird nach dem Protokoll des QIAmp DNA-Blood Mini Kits verfahren. Die genaue Versuchsanweisung kann diesem entnommen werden.

Für die DNA-Isolierung wird das aufgetaute Zellmaterial nach Hinzufügen von *AL-Buffer* gevortext. Dann werden der PBS-Puffer und sowie die Qiagen Protease zur Auflösung der Zellstruktur ohne Beeinträchtigung der DNA hinzu pipettiert. Anschließend folgen mehrere Schritte zur Reinigung der DNA mit Ethanol. Nachfolgend werden der *AW1-Buffer* und der *AW2-Buffer* hinzugefügt mit jeweiligen Zentrifugen-Zwischenschritten. Anschließend erfolgt die wiederholte Zugabe von Aqua und Zentrifugation. Die isolierte DNA kann bei -20 °C aufbewahrt werden. Zur Analyse der Konzentration und Reinheit der DNA werden 20 µl DNA mit 50 µl Aqua verdünnt und die Extinktion am Spektralphotometer gemessen.

3.6 Bisulfitbehandlung der DNA

Die Behandlung der DNA mit Natriumbisulfit ist Grundlage für die MSP. In diesem Verfahren werden alle Cytosine der DNA, die nicht in 5'-Position zu Guanin stehen und alle Cytosine in CpG-Dinukleotiden, die nicht methyliert sind, zu Uracil konvertiert, während die methylierten Cytosine unverändert bleiben [43, 76, 77].

Material	Hersteller
<i>EZ DNA Methylation Kit</i>	Zymo Research, Orange (USA)
<i>CT Conversion Reagent</i>	Cat. No.: D5001-1
<i>M-Dilution Buffer</i>	Cat. No.: D5001-2
<i>M-Binding Buffer</i>	Cat.No.: D5001-3
<i>M-Wash Buffer</i>	Cat.No.: D5001-4
(aufgelöst in 24 ml 100 % Ethanol)	
<i>M-Desulphonation Buffer</i>	Cat.No.: D5001-5
<i>M-Elution Buffer</i>	Cat.No.: D5001-6
Zymo-Spin Column	Cat.No.: C1004-50
Collection Tubes	Cat.No.: C1001-50
Ethanol (100 %)	Ethanol absolute, Baker Analyzed Reagents, Deventer, Niederlande

Für die Bisulfitbehandlung wird das *Zymo Research DNA Methylation Kit* verwendet. Die ausführliche Versuchsbeschreibung liegt dem Kit bei.

Zunächst wird die isolierte DNA mit Aqua auf eine Endkonzentration von 1 µg/ 45 µl verdünnt. Anschließend wird der *M-Dilution Buffer* hinzugefügt und die Suspension bei 37 °C inkubiert. Hierbei erfolgt als erster Reaktionsschritt der DNA-Methylierung die Denaturierung der DNA. Für den zweiten Hauptreaktionsschritt, der Konversion, wird das mit Aqua und *M-Dilution Buffer* aufgelöste *CT Conversion Reagent* beigelegt. Das im *CT Conversion Reagent* enthaltene Hydroquinon schützt vor Oxidierung des Natriumbisulfits. In der folgenden Inkubationszeit von 12-16 Stunden bei 50 °C werden

alle unmethylierten Cytosine durch das im *Conversion Reagent* befindliche Natriumbisulfit zu Uracil deaminiert [43, 78].

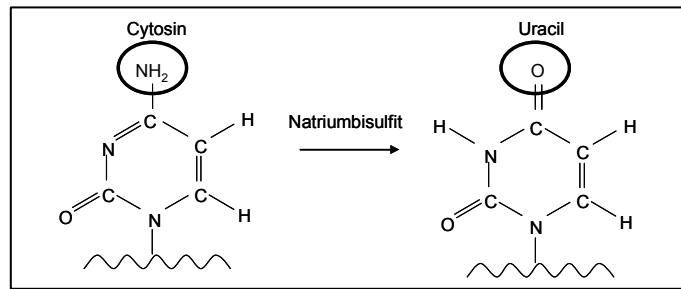


Abbildung 3.3: Bisulfitreaktion: durch Natriumbisulfit konvertiert Cytosin zu Uracil

Im dritten Teil der Bisulfitbehandlung wird die behandelte DNA in mehreren Schritten und mit Austausch der Reaktionsgefäße aufgereinigt. Zunächst wird die Konversionsreaktion durch eine Inkubation der Proben auf Eis gestoppt. Anschließend wird der *M-Binding Buffer* und nach Zentrifugation der *M-Wash Buffer* hinzugefügt. Es wird der *M-Desulphonation Buffer* zugegeben und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Im Anschluss an eine Zentrifugation wird zweimal *M-Wash Buffer* hinzu pipettiert und zentrifugiert. Schließlich werden 10 µl *Elution Buffer* hinzugefügt, um die Bindung der DNA an die Membran des Columns aufzulösen. Die Proben werden zentrifugiert und nach Zugabe von 12 µl Aqua in Proben von je 10,5 µl aufgeteilt. Bisulfit-behandelte DNA hydrolysiert leicht und muss daher sofort auf Eis gestellt werden, anschließend bei -20 °C gelagert und nur für die MSP aufgetaut werden.

3.7 Herstellung von *in vitro* methylierter DNA

In vitro methylierte DNA (IVD) wird in der MSP als Positivkontrolle der M-Reaktion verwendet und ist an allen CpG-Dinukleotiden methyliert. Zur Herstellung von IVD werden DNA-Proben aus nicht-malignem Knochenmark mit Hilfe der Methyltransferase SssI und S-Adenosylmethionin (SAM), als Methylgruppen-Donator, in vollständig methylierte DNA umgewandelt. Anschließend wird die IVD ebenfalls mit Natriumbisulfit behandelt.

Material	Hersteller
DNA	aus mononukleären Zellen von nicht-malignem Knochenmark
S-Adenosylmethionin 32mM	Cat.No.: B9003 S, New England Biolabs, Frankfurt
SssI Methyltransferase (4000 U/ml)	Cat.No.: M0226 S, New England Biolabs, Frankfurt
<i>NEB-2-Buffer</i>	Cat.No.: B7002 S, New England Biolabs, Frankfurt
BIOMAX SPIN-50 MINI-Column	Cat.No.: 97-160M, BIOMAX Inc., Denton, MD (USA)

Zur Herstellung der IVD werden bis zu 50 µg DNA verwendet. Je nach DNA-Konzentration der Probe muss demnach ein entsprechendes Volumen an DNA-Suspension verwendet werden. Zu der DNA werden 25 µl *NEB-2-Buffer*, 2,5 µl SAM und 6 µl SssI hinzu pipettiert und soweit mit Aqua aufgefüllt, dass ein Gesamtvolumen von 250 µl entsteht. Die Mischung wird homogenisiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert [11].

Am folgenden Tag werden nochmals 5 µl SAM und 3 µl SssI hinzugefügt, homogenisiert und für vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Zur Aufreinigung der IVD werden Spin Columns verwendet, die zunächst ohne Inhalt für 3 Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert werden. Danach wird der obere Teil des Columns auf ein neues Unterteil gestellt. Anschließend wird die IVD in Aliquots zu je 42 µl aufgeteilt, in den Spin Columns für 3 Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert und der Unterstand in ein Eppendorfcap überführt. Zum Abschluss wird auch hier die DNA-Konzentration spektralphotometrisch bestimmt, die DNA auf 1 µg/45 µl verdünnt und in 45 µl Aliquots bei - 20 °C gelagert oder direkt die Bisulfitbehandlung durchgeführt.

3.8 Methylierungs-spezifische PCR

Zur Methylierungsanalyse von CpG-Inseln bei AML-Patienten wurde die MSP eingesetzt. Es werden zwei getrennte PCR-Reaktionen mit je einem spezifischen Primer-Paar für die Bindung an methylierte bzw. unmethylierte DNA-Sequenzen durchgeführt. Abbildung 3.4 gibt eine Übersicht über die Veränderung einer DNA-Sequenz nach der Bisulfitbehandlung in Abhängigkeit von ihrem Methylierungsstatus. Dargestellt sind außerdem die Anlagerung des spezifischen Primers und das MSP-Produkt. Dabei binden U-Primer an unmethylierte DNA-Sequenzen und M-Primer an methylierte DNA-Sequenzen. Bei der Amplifikation der DNA während der MSP wird Uracil durch Thymin und 5-Methylcytosin durch Cytosin ersetzt. Da die Primer nur an Bisulfit-behandelte DNA binden, wird eine ungewollte Amplifikation von unzureichend konvertierter DNA verhindert [77].

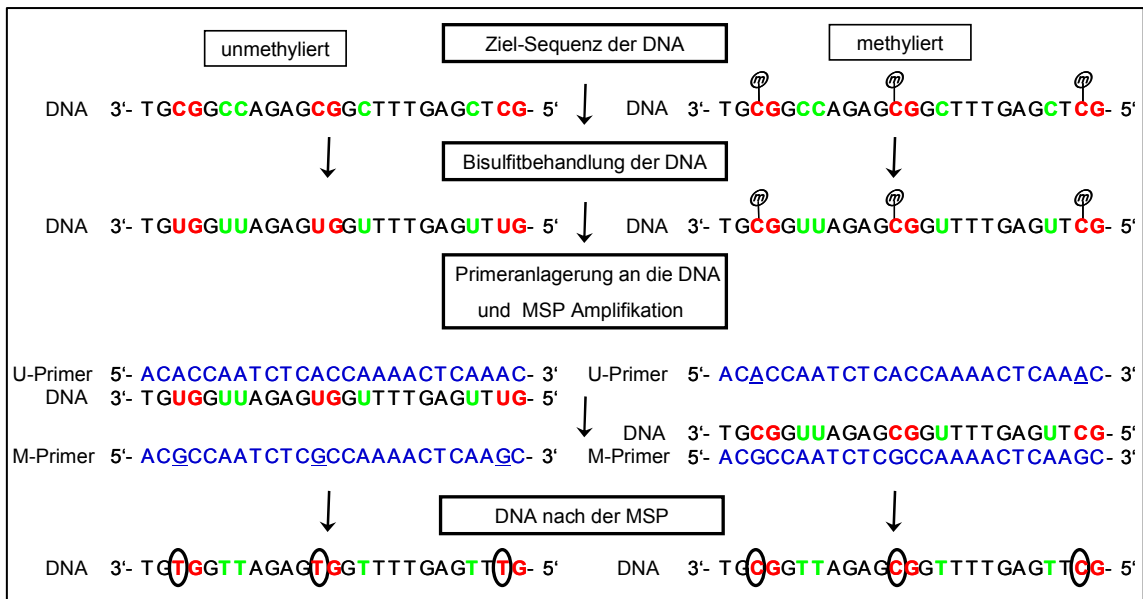


Abbildung 3.4: Unmethylierte und methylierte (Ⓜ) DNA-Sequenz vor und nach Bisulfitbehandlung am Beispiel von p15 [43]

Alle Cytosine außerhalb eines CpG-Dinukleotids (grün) werden zu Uracil deaminiert, ebenso alle unmethylierten Cytosine innerhalb eines CpG-Dinukleotids (rot). Im Gegensatz dazu werden methylierte Cytosine (rot mit Ⓜ) nicht verändert. Zur Amplifikation werden spezifische U und M Primer (blau) benutzt, die entweder nur zur unmethylierten oder methylierten DNA-Sequenz komplementär sind. Unpassende Nukleotide der Primer sind unterstrichen. Die Primer können nur an Bisulfit-behandelte DNA binden, da alle Cytosine außerhalb einer CpG-Insel ebenfalls zu Uracil deaminiert werden. Bei der Amplifikation der DNA in der MSP wird Uracil durch Thymin und 5-Methylcytosin durch Cytosin ersetzt.

3.8.1 Primer

Tabelle 3.4: Übersicht der verwendeten MSP-Primer (MWG Biotech) und der optimalen Anlagerungstemperatur (°C)

Gen	Sense Primer ((5'-3'))	Antisense Primer (5'-3')	°C
C/EBPα	U: TTG TTG GGT ATA AAA GTT GGG TTG GT	U: AAA ATT CTC CCA ACA TAA CAA ACC TCA	58
	M:GTC GGG TAT AAA AGT TGG GTC GGC	M:ATT CTC CCG ACA TAA CGA ACC TCG	
DAPK1	U: GGA GGA TAG TTG GAT TGAGTT AATGTT	U: CAA ATC CCT CCC AAA CAC CAA	60
	M:GGA TAG TCG GATCGAGTT AAC GTC	M:CCC TCC CAA ACG CCG A	
E-Cadherin	U: TGG TTG TAG TTA TGT ATT TAT TTT TAG TGG TGT	U: ACA CCA AAT ACA ATC AAA TCA AAC CAA A	60
	M:TGT AGT TAC GTA TTT ATT TTT AGT GGC GTC	M:CGA ATA CGA TCG AAT CGA ACC G	
ID4	U: GGT AGT TGG ATT TTT TGT TTT TTA GTA TT	U: AAC TAT ATT TAT AAA ACC ATA CAC CCC	60
	M:TAG TCG GAT TTT TCG TTT TTT AGT ATC	M:CTA TAT TTA TAA AAC CGT ACG CCC CG	
MGMT	U: TTTGTG TTT TGA TGT TTG TAG GTT TTT GT	U: AAC TCC ACA CTC TTC CAA AAA CAA AAC A	60
	M:TTT CGA CGT TCG TAG GTT TTC GC	M:GCA CTC TTC CGA AAA CGA AAC G	
p15	U: TGT GAT GTG TTG TAT TTT GTG GTT	U: CCA TAC AAT AAC CAA ACA ACC AA	60
	M:GCG TTC GTA TTT TGC GGT T	M:CGT ACA ATA ACC GAA CGA CCG A	
p16	U: TTA TTA GAG GGT GGG GTG GAT TGT	U: CAA CCC CAA ACC ACA ACC ATA A	60
	M:TTA TTA GAG GGT GGG GCG GAT CGC	M:GAC CCC GAA CCG CGA CCG TAA	
p73	U: AGG GGA TGT AGT GAA ATT GGG GTT T	U: ATC ACA ACC CCA AAC ATC AAC ATC CA	60
	M:GGA CGT AGC GAA ATC GGG GTT C	M:ACC CCG AAC ATC GAC GTC CG	
RARβ2	U: TTG GGA TGT TGA GAA TGT GAG TGA TTT	U: CTT ACT CAA CCA ATC CAA CCA AAA CAA	60
	M:TGT CGA GAA CGC GAG CGA TTC	M:CGA CCA ATC CAA CCG AAA CGA	
SFRP-1	U: GTT TTG TAG TTT TTG GAG TTA GTG TTG TGT	U: CTC AAC CTA CAA TCA AAA ACA ACA CAA ACA	62
	M:TGT AGT TTT CGG AGT TAG TGT CGC GC	M:CCT ACG ATC GAA AAC GAC GCG AAC G	
SFRP-2	U:TTT TGG GTT GGA GTT TTT TGG AGT TGT GT	U: AAC CCA CTC TCT TCA CTA AAT ACA ACT CA	62
	M:GGG TCG GAG TTT TTC GGA GTT GCG C	M:CCG CTC TCT TCG CTA AAT ACG ACT CG	
SFRP-4	U: GGG GGT GAT GTT ATT GTT TTT GTA TTG AT	U: CAC CTC CCC TAA CAT AAA CTC AAA ACA	62
	M:GGG TGA TGT TAT CGT TTT TGT ATC GAC	M:CCT CCC CTA ACG TAA ACT CGA AAC G	
SFRP-5	U: GTA AGA TTT GGT GTT GGG TGG GAT GTT T	U: AAA ACT CCA ACC CAA ACC TCA CCA TAC A	63
	M:AAG ATT TGG CGT TGG GCG GGA CGT TC	M:ACT CCA ACC CGA ACC TCG CCG TAC G	
SHP1	U: GTG AAT GTT ATT ATA GTA TAG TGT TTG	U: TTC ACA CAT ACA AAC CCA AAC AAT	59
	M:GAA CGT TAT TAT AGT ATA GCG TTC	M:TCA CGC ATA CGA ACC CAA ACG	
SOCS-1	U: TTA TGA GTA TTT GTG TGT ATT TTT AGG TTG GTT	U: CAC TAA CAA CAC AAC TCC TAC AAC AAC CA	60
	M:TTC GCG TGT ATT TTT AGG TCG GTC	M:CGA CAC AAC TCC TAC AAC GAC CG	
SOCS-3	U: GTT GGA GGG TTT TGG GTA TTT AAT GT	U: TAA ATA ACC ATA ACA CAC AAA ACC AAC A	58
	M:TGG AGG GTT TCG GGT ATT TAA CGC	M:ATA ACC ATA ACG CAC GAA ACC AAC G	
TIMP-2	U: GTA ATA AAA TTG TGG TTT GGT TTA AGT TT	U: TTC TCT CCT CTT TAT CTC AAA AAC ACA	58
	M:AAT AAA ATT GCG GTT CGG TTT AAG TTC	M:CTC TCC TCT TTA TCT CGA AAA CGC G	
TIMP-3	U: TTT TGT TTT GTT ATT TTT TGT TTT TGG TTT T	U: CCC CCA AAA ACC CCA CCT CA	59
	M:CGT TTC GTT ATT TTT TGT TTT CGG TTT C	M:CCG AAA ACC CCG CCT CG	
WRN	U: GTA GTT GGG TAG GGG TAT TGT TTG T	U: AAACAA AAT CCA CCA CCC ACC CC	60
	M:CGG GTA GGG GTA TCG TTC GC	M:AAC GAA ATC CAC CGC CCG CC	

Die Primer werden auf eine Endkonzentration von 20 μM verdünnt. Für das Design der Primer zur Amplifikation der mit Bisulfit behandelten DNA sollten zwei Faktoren bedacht werden:

1. Nach der Bisulfitbehandlung sind die DNA-Stränge nicht mehr komplementär zueinander. Daraus folgt, dass zur Amplifikation zwei unterschiedliche Primer notwendig sind. DNA-Stränge können somit aber auch unabhängig voneinander amplifiziert werden.
2. Die Primer sollten komplementär zu DNA-Abschnitten sein, die mehrere Cytosine beinhalten, welche nicht Teil eines CpG-Dinukleotids sind und so nach der Bisulfitbehandlung in Uracil umgewandelt werden. Damit kann eine Amplifikation von nicht konvertierter DNA ausgeschlossen werden [44].

Eine optimale Sensitivität und Spezifität der Primer kann mit drei CpG-Dinukleotiden und einer Länge von mindestens 21-24 Basenpaaren erzielt werden [11].

3.8.2 Material

Material		Hersteller
Mastermixkomponenten		
Deoxynucleotide Set- dNTPs bestehend aus:	1000 μl ATP 1000 μl CTP 1000 μl GTP 1000 μl TTP	Cat.No.: DNTP- 100 A, Sigma-Aldrich, Steinheim
10 X Puffer bestehend aus:	MgCl ₂ Trispuffer (NH ₄) ₂ SO ₄ β -Mercaptoethanol 98 % ,HCL 25 %	Cat.No.: M-0250, Sigma-Aldrich, Steinheim Cat.No.: T-1503, Sigma-Aldrich, Steinheim Cat.No.: A-4418, Sigma-Aldrich Cat.No.: M-3148, Sigma-Aldrich, Steinheim Cat.No.: 1.00316.1011, Merck, Darmstadt
MSP-Primer		MWG-Biotech AG, Ebersberg
Kontrollen		
U-Kontrolle		(siehe Kapitel 3.6)
IVD-Kontrolle		(<i>in vitro</i> methylierte DNA), (siehe Kapitel 3.7)
Aqua-Kontrolle		Aqua ad iniectionem, Ch-B: 23061, Delta Select, Dreieich
Red Taq DNA-Polymerase		Cat.No.: D-5684, Sigma-Aldrich, Steinheim
Mineralöl		Sigma Mineral Oil, Cat.No. M5904, Sigma-Aldrich, Steinheim
Omnistrip PCR-Tubes		Cat.No.: AB-0404, Abgene, Epsom (UK)

3.8.3 Methode der Methylierungs-spezifischen PCR

Zunächst werden zwei verschiedenen Stammlösungen (Mastermix), ein U-Mastermix für unmethylierte DNA-Sequenzen und ein M-Mastermix für methylierte DNA-Sequenzen hergestellt. Dabei enthält der U-Mastermix den *sense* und *antisense* U-Primer für das jeweilige Gen und der M-Mastermix den entsprechenden *sense* und *antisense* M-Primer. Pro DNA-Probe werden für jede Stammlösung 14,25 μl Aqua, 2,50 μl 10 x Puffer, 1,25 μl dNTPs in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Anschließend gibt man für jede Probe

je 0,5 µl *sense* und *antisense* U-Primer bzw. M-Primer in die jeweilige Stammlösung. Die Stammlösung mit einem Endvolumen von 19 µl pro Reaktion wird anschließend homogenisiert. Drei zusätzliche Kontrollreaktionen werden in jedem Ansatz verwendet: eine U-Kontrolle (DNA von gesunden Spendern) als Positivkontrolle der U-Reaktion, eine IVD-Kontrolle als Positivkontrolle der M-Reaktion und eine Negativkontrolle (Aqua) [43].

Tabelle 3.5: MSP Mastermix-Komponenten

Reagenzien	Volumen pro Probe (µl)
Aqua	14,25
10 x Puffer	2,50
dNTP Mischung	1,25
<i>sense</i> Primer (U oder M)	0,50
<i>antisense</i> Primer (U oder M)	0,50
Gesamtvolumen	19,00

Zu den 19 µl des U-Mastermix und M-Mastermix werden je 1 µl der aufgetauten und homogenisierten DNA/Kontrolle in die PCR-Tubes pipettiert. Jedes Tube wird mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet.

Die MSP im Thermocycler beginnt mit einem *hot start* auf 95 °C für fünf Minuten und wird dann bei 80 °C angehalten. Während des Stopps werden 5 µl des hitzestabilen Enzyms Red Taq DNA-Polymerase hinzugefügt. Dieses Enzym stammt aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* und wurde zuvor im Mischungsverhältnis 0,625 µl Red Taq DNA-Polymerase und 4,375 µl Aqua verdünnt. Es schließen sich 35 Zyklen mit drei Temperaturschritten (*Denaturierung*, *Annealing*, *Elongation*) zu jeweils 30 Sekunden an. Während der ersten 30 Sekunden im Zyklus bei 95 °C wird die noch doppelsträngige DNA in zwei Einzelstränge denaturiert. Es folgen 30 Sekunden bei der spezifischen Bindungstemperatur (58-63 °C) des Primer-Paares für das jeweiligen Gen zur Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge (*Annealing*). Die optimale Temperatur von 72 °C für die Aktivität der Red Taq DNA-Polymerase wird ebenfalls 30 Sekunden eingehalten. In diesem Zyklusschritt katalysiert die Polymerase die Verlängerung (*Elongation*) des DNA-Einzelstranges in 5'-3'-Richtung mit Startpunkt am Primer, der am komplementären Strang angelagert ist. Abschließend erfolgt ein Zyklus von fünf Minuten bei 72 °C zur Sicherstellung der vollständigen Elongation.

3.9 Auswertung: Elektrophorese und Bilderzeugung

Material	Hersteller
TAE-Puffer GIBCO, DNA Typing grade 50 x TAE-Puffer (als 1:100 Verdünnung auf 0,5 TAE-Puffer)	CatNo 24710-030, Invitrogen Corporation, Karlsruhe

M Tris-Acetat , 50 mM EDTA	
Agarose	Seakem Le Agarose Cat No. 50004, FMC Bio Products, Rockland (USA)
Ethidiumbromid (20 µl)	Ethidium Bromid Solution (10 mg/ml), CatNo 15585-011, Invitrogen Corporation, Karlsruhe
DNA-Marker 5 µl TrackIt 1Kb Plus DNA Ladder	CatNo 12308-011 Invitrogen Corporation, Karlsruhe

Zuerst werden 2,5 %ige Agarose-Gele aus 4 g Agarose-Pulver und 160 ml „0,5 x TAE-Puffer“ (für drei Gele) hergestellt. Beides wird in der Mikrowelle erhitzt bis sich das Pulver vollständig aufgelöst hat. Anschließend werden in die noch heiße Flüssigkeit 20 µl des Farbstoffes Ethidiumbromid gegeben, der sich in die DNA-Fragmente einlagert, so dass diese unter UV-Licht fluoreszieren. Die Flüssigkeit wird in Gelformen gegossen und ein Kamm zur Bildung von Pipettiertaschen ins Gel eingebracht. In der mit TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer können nun 10 µl der MSP-Produkte in die Geltaschen pipettiert werden. In die letzte Geltasche werden 2 µl DNA-Marker als Längenstandard pipettiert. Für 25 Minuten wird nun eine Spannung von 100 V an die Elektrophoresekammer angelegt, so dass die DNA-Banden Richtung Anode laufen. Anschließend können die DNA-Banden des Gels im Transilluminator unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden.

3.10 Interpretation der MSP-Ergebnisse

Ein typisches MSP-Gel ist in Bild 4.4 zu sehen. Hier handelt es sich um die Auswertung des Methylierungsstatus von p16 bei mehreren Zelllinien. Bei jeder Zelllinie liegen zwei MSP-Reaktionen vor, je eine spezifisch für methylierte (M) und unmethylierte (U) DNA. Vollständig unmethylierte Gene sind nur in der U-Reaktion positiv (Bande) und vollständig methylierte Gene nur in der M-Reaktion. Es können jedoch auch beide Reaktionen positiv sein, wenn zum Beispiel in der Probe sowohl Tumorzellen als auch gesunde Zellen vorhanden waren. Es ist auch eine partielle Methylierung von Gen-Abschnitten möglich.

In der Auswertung müssen die Kontrollen bestimmte Reaktionen zeigen. Bei der U-Kontrolle (PB = peripheres Blut) darf ausschließlich in der U-Reaktion eine Bande vorhanden sein. Die IVD-Kontrolle (M-Kontrolle) hingegen muss bei der M-Reaktion kräftig positiv sein. Die U-Reaktion kann eine Bande aufweisen (bei unvollständiger Methylierung während IVD-Herstellung). Die Wasserkontrolle (Negativ-Kontrolle) darf keine positive Reaktion zeigen.

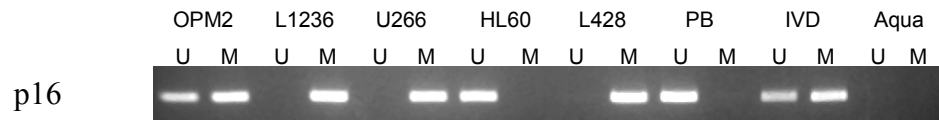


Abbildung 3.5: MSP-Auswertung der p16 Promotorregion in verschiedenen hämatopoetischen Tumorzelllinien und normalen Blutzellen (PB)

3.11 Auswertung der klinischen Parameter

Im Rahmen des stationären Aufenthaltes werden die Blutwerte der Patienten für Leukozyten, Hämoglobin, Thrombozyten und LDH erhoben. Zur Diagnose und in regelmäßigen Abständen wird außerdem der Blastenanteil im Knochenmark und im Differentialblutbild ermittelt. Der Verlauf der klinischen Parameter während der Erkrankung der Patienten im Bezug zu den Therapiemaßnahmen wird mit Hilfe von Zeitkurven ausgewertet und im Ergebnisteil graphisch dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv

Die Charakteristika der untersuchten Patienten sind in Tabelle 4.1 aufgeführt. Das Alter der fünf weiblichen Patienten lag zwischen 72 und 78 Jahre (Mittelwert = 75,2 Jahre). Bei vier Patienten wurde eine AML M1 und bei Patient B eine AML M4 diagnostiziert. Allen Fällen war ein MDS vorausgegangen. Der Karyotyp war bei zwei Patienten normal, zwei Patienten hatten komplexe Aberrationen (Patient E zusätzlich eine FLT3 Mutation) und bei Patient D war die Chromosomenanalyse aufgrund fehlender suffizienter Metaphasen nicht auswertbar. Die fünf Patienten haben mindestens zwei Zyklen DAC erhalten. Zusätzlich erfolgte die protokollgerechte Verabreichung von Hydroxyurea, ATRA und VPA. Bei vier der Patienten konnte ein ALE erreicht werden, während Patient A nur eine SD aufwies. Die Überlebenszeit der fünf Patienten betrug 16 bis > 58 Wochen.

Tabelle 4.1: Übersicht der Patientencharakteristika

Charakteristika	Patient A	Patient B	Patient C	Patient D	Patient E
Ansprechen	SD	ALE	ALE	ALE	ALE
Überlebenszeit nach Diagnosezeitpunkt	20 Wochen	23 Wochen	28 Wochen	> 58 Wochen	16 Wochen
Anzahl hypermethylierter Gene vor Therapie	0	2	2	6	2
Anzahl hypermethylierter Gene nach 2 Zyklen DAC	1	4	4	2	2
Alter	74	78	72	74	78
Geschlecht	weiblich	weiblich	weiblich	weiblich	weiblich
Diagnose	AML M1 aus MDS	AML M4 aus MDS	AML M1 aus MDS	AML M1 aus MDS	AML M1 aus MDS
zytogenetische Analyse	Normaler Karyotyp	Normaler Karyotyp	del(5q) (q13q33), Monosomie 7, 16, 17	Metaphasen nicht ausreichend	del(7) (q11.2q22) Del(20)(q11q13) FLT3 Mutation
zytogenetische Risikogruppe	intermediär	intermediär	ungünstig	-	ungünstig
Allgemeinzustand (ECOG) vor Therapie	2	2	2	2	2
Erhaltene Zyklen DAC	2	2	4	4 + 4	3
HU erhalten	nein	ja	nein	nein	ja
ATRA erhalten	ja	ja, Abbruch wegen PD	ja	ja	nein
VPA erhalten	nein	nein	nein	ja	nein
Dosisreduktion (Zyklus)	nein	nein	ja (3,4)	nein	ja (2)
Bestes Ansprechen nach Zyklus	1	1	1	2	1
Abbruch der DAC-Therapie nach	17 Wochen	10 Wochen	26 Wochen	> 58 Wochen	13 Wochen
Leukozyten	1.600 / μ l	64.400 / μ l	10.500 / μ l	1.400 / μ l	36.900 / μ l
Hämoglobin	78 g/l	102 g/l	81 g/l	85 g/l	86 g/l
Thrombozyten	74.000 / μ l	680.000 / μ l	60.000 / μ l	309.000 / μ l	19.000 / μ l
LDH	142 U/l	492 U/l	1322 U/l	191 U/l	726 U/l

4.2 Behandlungsverläufe der Patienten

Patient A

Bei Patient A wurden zwei Therapiezyklen DAC ohne akute Komplikationen verabreicht. Im Anschluss an Zyklus zwei erfolgte protokollgemäß die orale Einnahme von ATRA. Zunächst konnte eine Stabilisierung der Erkrankung mit persistierender Leukopenie erreicht werden. Unter der Therapie kam es mehrfach zu febrilen Episoden. Die Verabreichung von G-CSF führte zum Anstieg der Blastenzahl und wurde daher abgebrochen. Der Blastenanteil im Knochenmark betrug zum Diagnosezeitpunkt 80 % und konnte auch unter der Therapie nicht gesenkt werden. Im peripheren Blut lagen Blasten mit 600 / μ l bei 38 % der Gesamtleukozyten. Zeitweise konnte eine Stabilisierung der hämatologischen Situation (SD) erreicht werden. Es kam jedoch im weiteren Verlauf zu einer Progredienz der AML mit zunehmender Ausschwemmung blastärer Zellen ins periphere Blut. Die seit der Diagnose bestehende Thrombozytopenie verschlechterte sich kontinuierlich. Die DAC-Therapie wurde bei fortschreitender Erkrankung protokollgemäß abgebrochen und anschließend eine rein supportive Therapie weitergeführt. Im Rahmen eines septischen Geschehens bei progredienter AML verstarb Patient A.

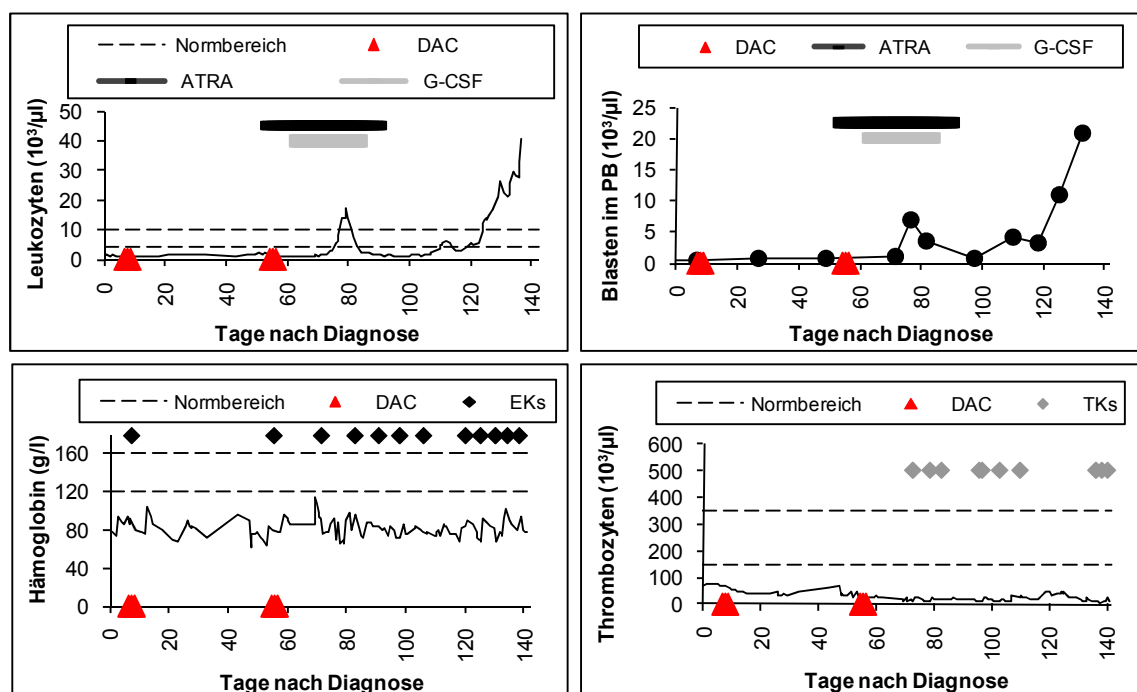


Abbildung 4.1: Klinischer Verlauf der Leukozytenwerte und Blasten im peripheren Blut, sowie Hämoglobin und Thrombozyten im peripheren Blut von Patienten A vom Diagnosezeitpunkt bis zum Ende des Studienzeitraums (Abbruch der Studie oder Tod des Patienten)

Abkürzungen: EK: Erythrozytenkonzentrate, TK: Thrombozytenkonzentrate.

Patient B

Zur Zytoreduktion wurde bei Patient B zunächst Hydroxyharnstoff verabreicht. Es folgten zwei Zyklen DAC und anschließend die Gabe von ATRA. Die Therapie wurde gut vertragen, es kam jedoch zu mehreren Infektionen. Nach dem ersten Zyklus der DAC-Therapie konnte ein ALE mit Reduktion des Blastenanteils im Knochenmark von 70 % auf 45 % und eine Verminderung der Blastenausschwemmung erreicht werden. Nach dem zweiten Zyklus kam es zur Progression der Erkrankung mit massiver Leukozytose und wieder zunehmender Ausschwemmung blastärer Zellen ins periphere Blut. Die Auswertung des Blastenanteils im Knochenmark konnte zu diesem Zeitpunkt nur anhand der Histologie erfolgen und stieg wieder auf 50 % an.

Daraufhin erfolgte der protokollgemäße Abbruch der DAC-Behandlung und es wurde eine palliative Therapie mit Hydroxyurea eingeleitet, die zur Zytoreduktion führte. Unter Verschlechterung des Allgemeinzustandes und vermehrt auftretenden infektiösen Komplikationen verstarb Patient B.

Insgesamt unterlagen die Werte der Thrombozyten bei Patient B im Verlauf starken Schwankungen. Die initiale Thrombozytenerhöhung fiel dabei zunächst unter der Hydroxyurea-Therapie auf Normwerte ab. Im späteren Verlauf stiegen die Werte aber zeitweise wieder an.

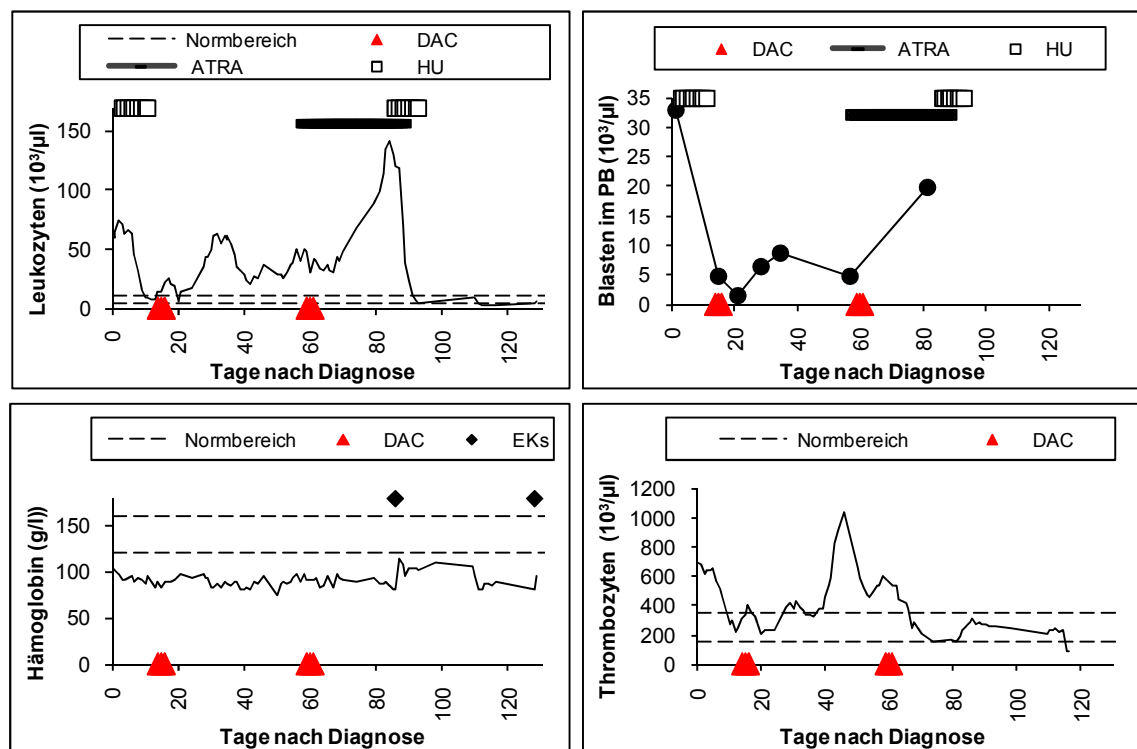


Abbildung 4.2: Klinischer Verlauf Patient B

Patient C

Patient C hat zwei Zyklen Chemotherapie mit DAC und die Behandlung mit ATRA nach dem zweiten Zyklus gut vertragen. Zwei weitere Zyklen mit DAC erfolgten angesichts einer anhaltenden Zytopenie protokollgemäß mit Reduktion der Dosis auf 50 %. Intermittierend kam es zu Infektionen und einer hypertensiven Entgleisung.

Unter der Therapie konnte zunächst ein ALE mit Reduktion des Blastenanteils im Knochenmark von 60 % auf unter 20 % nach dem ersten Zyklus und auf 10 % nach zwei Zyklen erreicht werden. Die Ausschwemmung von Blasten ins periphere Blut nahm deutlich ab. Wiederholte Erythrozyten- und Thrombozyten-Transfusionen waren jedoch notwendig. Im weiteren Verlauf kam es zu einem erneuten Anstieg des Blastenanteils im Knochenmark auf 25 % und zur Ausschwemmung blastärer Zellen. Die DAC Therapie wurde daraufhin abgebrochen. Der Allgemeinzustand von Patient C verschlechterte sich in den folgenden Wochen bei begleitender supportiver Therapie zunehmend. Schließlich verstarb Patient C aufgrund einer Sepsis mit Multiorganversagen.

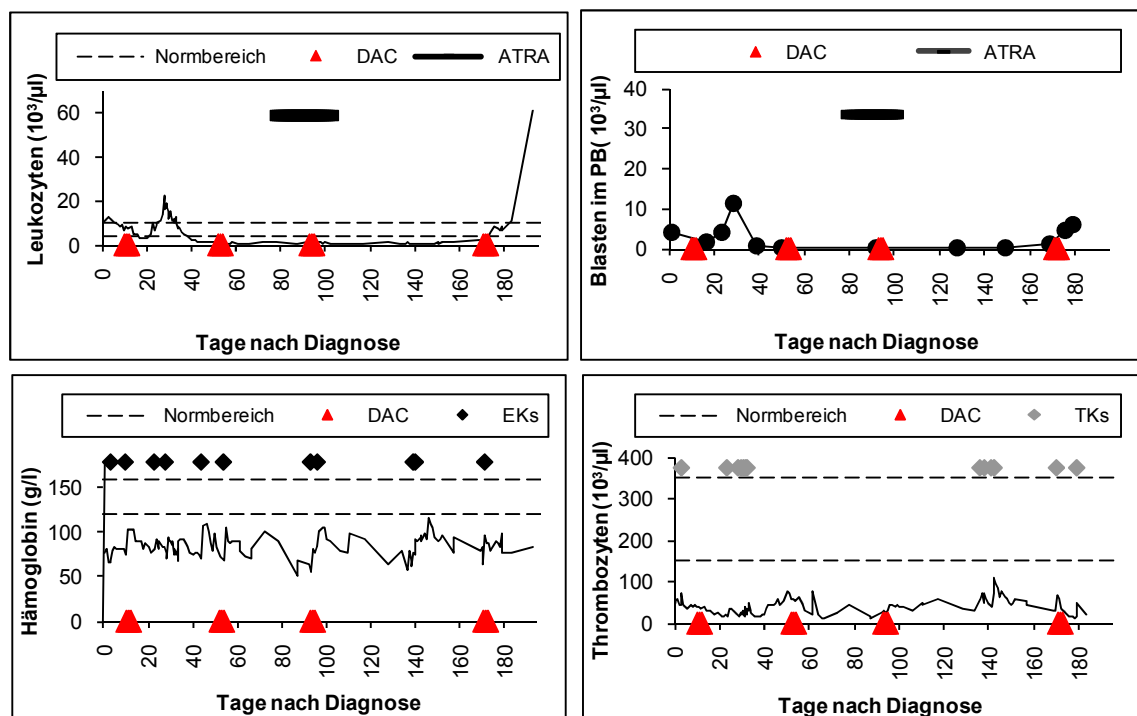


Abbildung 4.3: Klinischer Verlauf Patient C

Patient D

Bei Patient D wurden protokollgemäß insgesamt vier Zyklen DAC mit ATRA nach dem zweiten Zyklus und zusätzlich fünf Zyklen Erhaltungstherapie mit DAC und oraler VPA-Therapie ab dem vierten Erhaltungszyklus durchgeführt. Nach zwei Zyklen DAC konnte ein ALE mit Senkung des Blastenanteils im Knochenmark von 80 % auf 60 % und nach zwei weiteren Zyklen auf 45 % erreicht werden. Im peripheren Blut konnten bei starker Leukopenie von Leukozytenwerten unter 1000 / μ l nur vereinzelt Blasten nachgewiesen werden. Der dritte und vierte Zyklus wurde angesichts aufgetretener Infekte, im Abstand von jeweils 8 statt 6 Wochen fortgeführt. Die Thrombozytenwerte waren zum Zeitpunkt der Diagnose normal und unterlagen im weiteren Verlauf starken Schwankungen. Sie blieben dabei aber, mit Ausnahme von kurzen Abfällen im Anschluss an die DAC-Therapie, weitgehend im Normbereich. Zur Stabilisierung der hämatologischen Situation wurde intermittierend G-CSF appliziert. Außerdem wurden regelmäßig EKs transfundiert. In der Erhaltungstherapie mit DAC zeigte sich weiterhin eine klinisch stabile Situation von Patient D. Nach dem vierten Erhaltungszyklus mit DAC wurde die orale Therapie mit VPA eingeleitet, die insgesamt gut vertragen wurde. Relevante Nebenwirkungen traten nicht auf. Der Blastenanteil im Knochenmark blieb unverändert bei ca. 45 % und auch im peripheren Blut konnte nur eine minimale Ausschwemmung blastärer Zellen vermerkt werden. Nach dem fünften Erhaltungszyklus wurde die Therapie aufgrund persönlicher Gründe nicht weiter fortgeführt. Über den weiteren Verlauf konnten keine Informationen ermittelt werden.

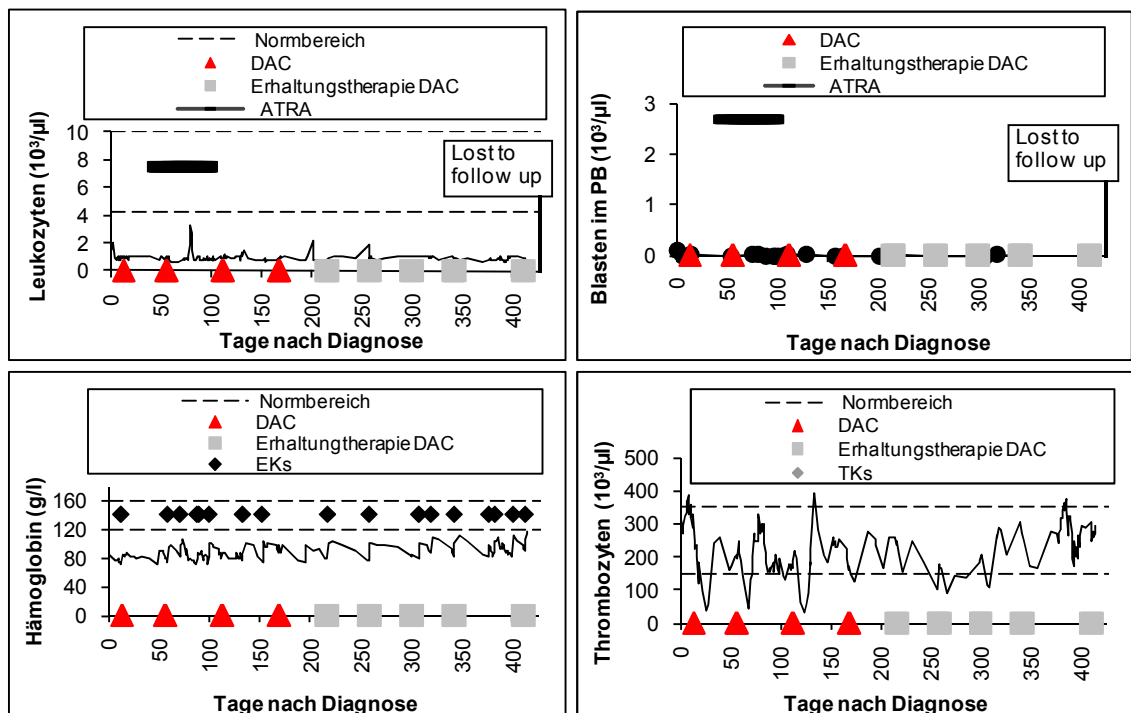


Abbildung 4.4: Klinischer Verlauf Patient D

Patient E

Patient E wurde in Absprache mit der Studienleitung trotz Vorbehandlung mit Ara-C in die DAC-Studie aufgenommen. Zunächst wurde der Patient mit Hydroxyurea zur Zytoreduktion behandelt. Anschließend wurden zwei Zyklen DAC durchgeführt. Der erste Zyklus enthielt eine zweite DAC-Gabe entsprechend dem Studienprotokoll bei Patienten mit Leukozyten $> 20.000/\mu\text{l}$. Im zweiten Zyklus erfolgte eine protokollgemäße Dosisreduktion auf 50 % (bei Zytopenie > 6 Wochen). Auf die Verabreichung von ATRA nach zwei Zyklen wurde aufgrund von Thrombozytopenie verzichtet. Während der Therapie kam es mehrfach zu fieberhaften Infekten.

Die zytologische Knochenmarksbeurteilung ergab zum Diagnosezeitpunkt einen Blastenanteil von 33 %. Die zweite Analyse musste anhand der Histologie erfolgen. Die genaue Bestimmung der Blastenmenge war durch eine hochgradige Fibrose eingeschränkt. Bei fehlenden Blastennestern war jedoch ein deutlicher Rückgang der Blasten zu verzeichnen. Im peripheren Blut zeigte sich ebenfalls eine Senkung der Blasten. Der Anstieg der Thrombozyten nach dem ersten Zyklus lässt auf ein zumindest temporäres Ansprechen auf die Therapie schließen. Zudem verbesserte sich der Allgemeinzustand von Patient E deutlich. Nach dem zweiten Zyklus kam es jedoch zum Progress der Erkrankung mit Verschlechterung des Allgemeinzustandes bei Leukopenie über zehn Wochen. Die DAC-Therapie musste daraufhin protokollgemäß abgebrochen werden. Patient E verstarb schließlich bei rein supportiv weitergeführter Therapie.

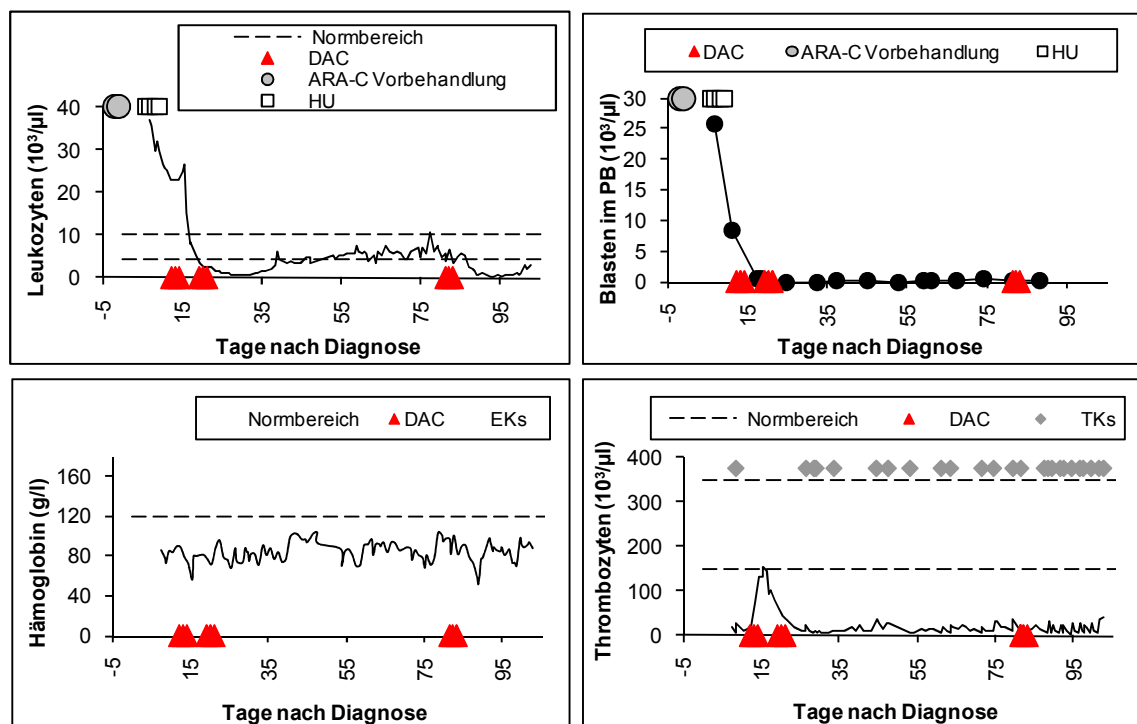


Abbildung 4.5: Klinischer Verlauf Patient E

4.3 Methylierungsprofile der fünf AML-Patienten

In Abbildung 4.6 ist eine Auswahl von repräsentativen MSP-Ergebnissen der 19 auf ihren Methylierungsstatus hin qualitativ untersuchten Gene zu zwei Zeitpunkten aufgeführt.

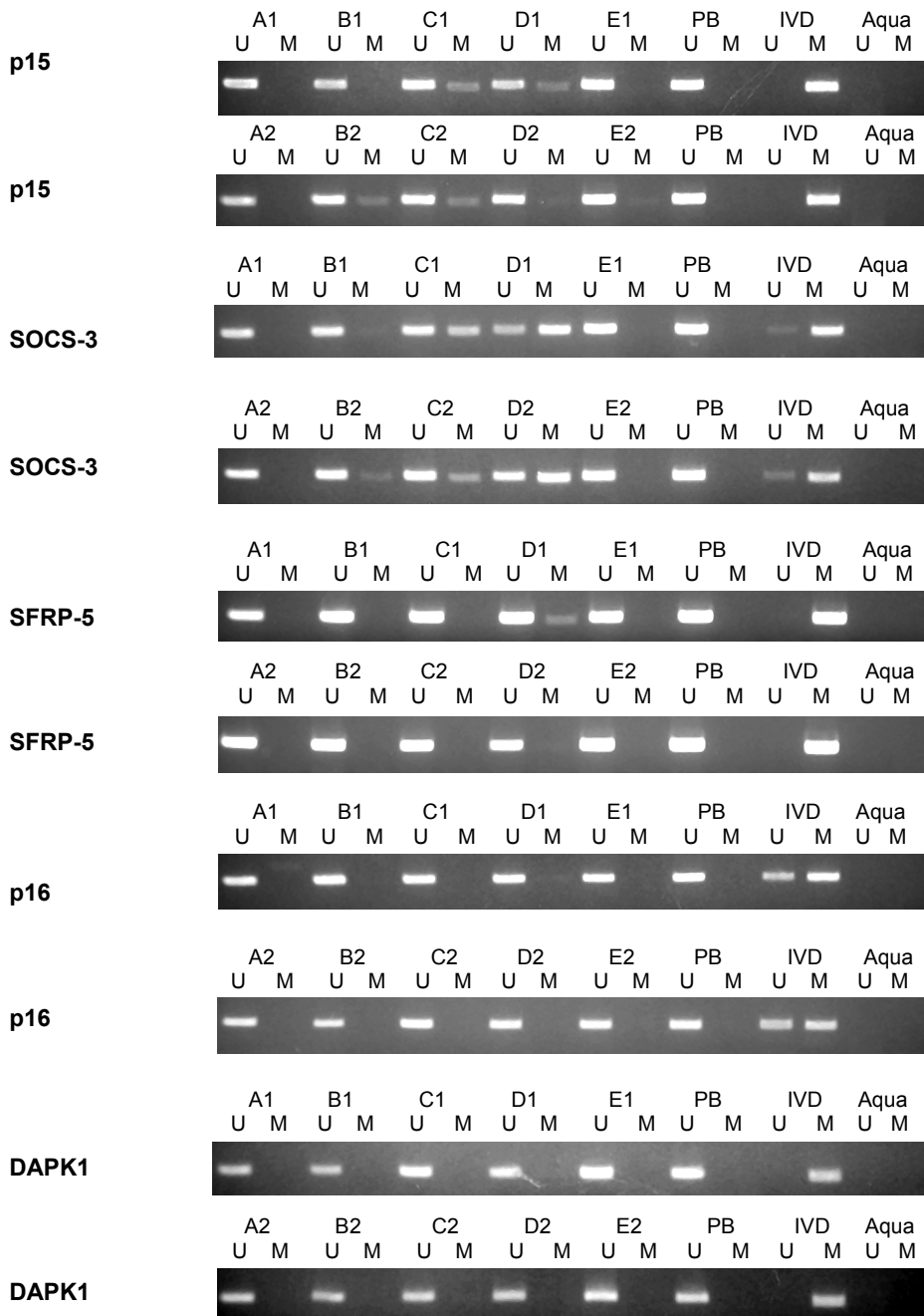


Abbildung 4.6: Repräsentative MSP-Ergebnisse von 5 Genen

In der ersten Zeile jedes Gens befinden sich die MSP-Ergebnisse der Patientenproben vom Zeitpunkt der Diagnosestellung (A1 – E1), in der zweiten Zeile zum Zeitpunkt nach zwei Therapiezyklen DAC (A2 – E2). Als Kontrollen dienen peripheres Blut von gesunden Probanden ohne Methylierungen der DNA in dieser Sequenz (PB), *in vitro* methylierte DNA (IVD) und Aqua. U: amplifiziertes Produkt mit Primern spezifisch für die unmethylierte Gen-Sequenz, M: amplifiziertes Produkt mit Primern spezifisch für die methylierte Gen-Sequenz.

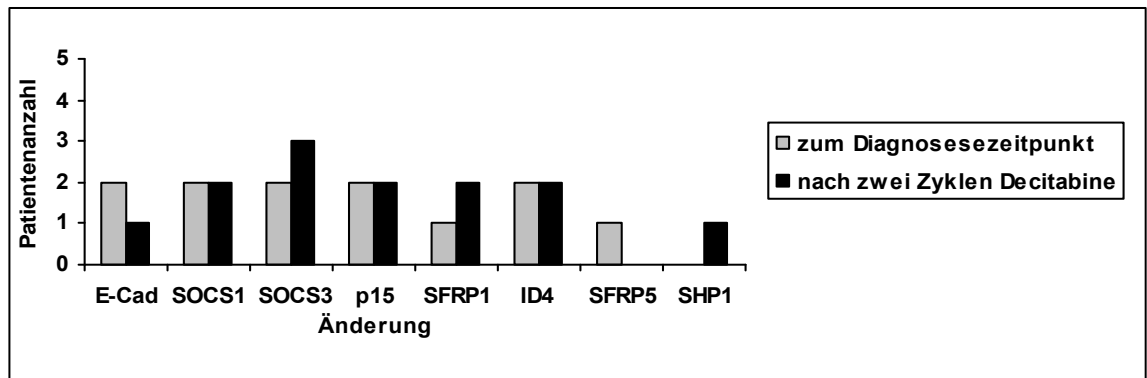


Abbildung 4.7: Methylierungshäufigkeit von 8 Genen der fünf AML-Patientenproben zum Diagnosezeitpunkt und nach zwei Zyklen DAC

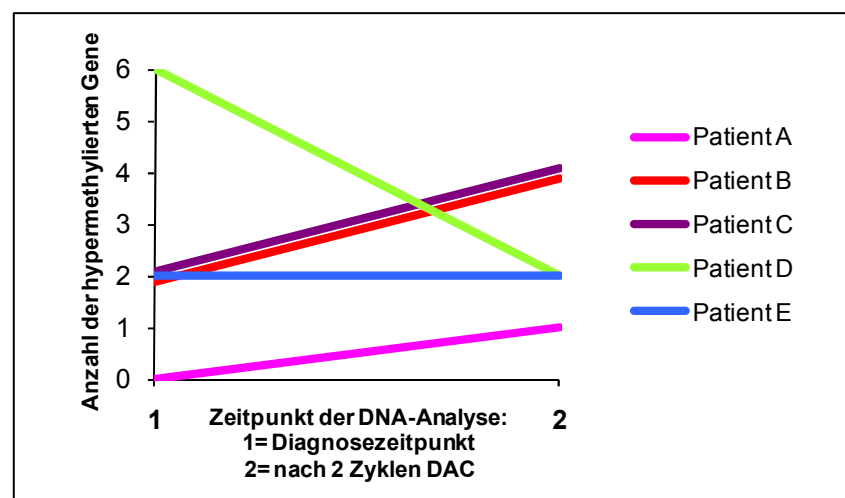


Abbildung 4.8: Veränderungen der Anzahl an hypermethylierten Genen der fünf AML-Patienten zum Diagnosezeitpunkt und nach zwei Zyklen DAC

In der Auswertung der klinischen Parameter und möglichen Assoziationen mit der Methylierungsanalyse sollen einige auffallende Beobachtungen aufgeführt werden. Dabei werden die Besonderheiten von Patient D im Vergleich zu den vier anderen Patienten hervorgehoben.

In Bezug auf das Therapieansprechen waren die besten erzielten Ergebnisse antileukämische Effekte. Keiner der Patienten erreichte eine komplette Remission. Die Therapieergebnisse blieben dabei bei Patient A mit SD für 17 Wochen stabil und bei den drei Patienten mit ALE und gleichbleibenden bzw. steigenden Methylierungen für 10 bis 26 Wochen stabil. Ein deutlich längerer Therapieeffekt wurde bei Patient D mit ALE und einem Rückgang von Hypermethylierungen mit über 58 Wochen erzielt. Bei Patienten mit gleich bleibender oder zunehmender Anzahl von hypermethylierten

Genen lag die Überlebenszeit zwischen 16 und 28 Wochen. Patient D zeigte hingegen eine wesentlich längere Überlebenszeit.

Auffällig ist, dass bei Patient D sowohl die Thrombozyten als auch die LDH zu Therapiebeginn normal waren. Im Gegensatz dazu waren bei den vier anderen Patienten die Thrombozytenwerte zu Therapiebeginn und während des überwiegenden Krankheitsverlaufes erniedrigt bzw. erhöht. Insbesondere Patient E mit der kürzesten Überlebenszeit wies starke Normabweichungen auf. Initial hohe Leukozytenwerte (bei über 20.000 / μ l allgemein als schlechtes Prognosezeichen gewertet) lagen bei Patient B und E vor und waren auch hier mit einer kurzen Überlebenszeit assoziiert.

Insgesamt ist festzuhalten, dass die aufgeführten klinischen Parameter, die sich im Referenzbereich befanden, für eine bessere Prognose sprechen und die Normalisierung der Werte auf ein besseres Ansprechen hinweist. Ob das Methylierungsprofil oder die Veränderungen der Methylierungen Einfluss auf klinische Parameter nehmen, konnte hier nicht erfasst werden.

Im Vergleich stiegen bei den Patienten mit zunehmender Anzahl von hypermethylierten Genen der Blastenanteil im Knochenmark und die Blastenzahl im peripheren Blut zeitlich versetzt an. Im Gegensatz dazu verringerten sich beide Parameter bei den Patienten mit abnehmender und gleich bleibender Anzahl von aberrant methylierten Genen. Die zytogenetische Analyse von vier Patienten zeigte keinen Zusammenhang mit der Hypermethylierung der untersuchten Gene. Aberrante Hypermethylierungen kamen in gleicher Anzahl bei Patienten mit normalem Karyotyp und Patienten mit komplexen Aberrationen vor. Es ließ sich ebenfalls kein Unterschied im Ansprechen auf die DAC-Therapie oder bei der Überlebenszeit der Patienten in zytogenetisch unterschiedlichen prognostischen Gruppen feststellen. Patient D wies keine suffizienten Metaphasen für eine Chromosomenanalyse auf, so dass hier eine weitere Beurteilung nicht möglich war.

5 Diskussion

5.1 Bedeutung begleitender Untersuchungen zu Studien zur AML-Therapie

Die Therapie älterer AML-Patienten stellt mit den Besonderheiten dieser Altersgruppe eine Herausforderung dar. Bisher sind kaum therapeutische Alternativen für Patienten etabliert, denen eine intensive Chemotherapie aus medizinischen Gründen nicht angeboten werden kann. Die Entwicklung von neuen Medikamenten und Therapiestrategien für diese Altersgruppe ist daher von großer Bedeutung.

Mit dem zunehmenden Verständnis über pathogenetische Mechanismen, die zur malignen Transformation und Tumorprogression führen, eröffnen sich neue therapeutische Perspektiven. So wurde in den letzten Jahren eine Reihe neuer Substanzen mit alternativen Wirkmechanismen entwickelt und zum Teil in die Therapie von hämatopoetischen Neoplasien integriert. Verschiedene Wirkstoffe zur zielgerichteten Therapie sind Gegenstand aktueller Studien (FTI, FLT3-Inhibitoren, Gemtuzumab-Ozogamicin) [18]. Es ist erwiesen, dass auch die epigenetische Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen in der molekularen Pathogenese der AML eine Rolle spielt. Diese durch hypermethylierte Promotorregionen und Histon-Deacetylierungen vermittelten Pathomechanismen sind vielversprechende therapeutische Zielstrukturen. In klinischen Studien konnte bereits der antileukämische Effekt der demethylierenden Substanzen DAC und AZA bei MDS und AML aufgezeigt werden [79].

Während die demethylierende Aktivität von AZA und DAC in Zellkulturen wiederholt belegt werden konnten, sind die pharmakologischen Effekte der Substanzen in klinischen Studien bisher nicht ausreichend erforscht [80]. Erste Untersuchungen von Patienten mit MDS und AML, die mit AZA oder DAC behandelt wurden, konnten die demethylierende Wirkung *in vivo* aufzeigen. Daskalakis *et al.* untersuchten die p15-Methylierung und Expression in Knochenmarkszellen von MDS-Patienten vor, während und nach Therapie mit niedrig dosiertem DAC. Ein Anteil von 65 % der Patientenproben war vor der Therapie hypermethyliert und von 12 hypermethylierten Proben zeigten 9 eine Abnahme der Methylierung [52].

Welche weiteren relevanten Zielgene in hämatopoetischen Neoplasien von Hypermethylierungen betroffen sein können und durch diese Therapie reaktiviert werden können, ist wichtiger Bestandteil studienbegleitender Untersuchungen.

Bisher wurden hauptsächlich die Gen-spezifischen Veränderungen der Methylierung nach Therapie mit demethylierenden Substanzen bei einzelnen Genen untersucht. In dieser Arbeit wurde nun ein Methylierungsprofil von 19 Tumorsuppressorgenen bei fünf älteren AML-Patienten im Verlauf der Therapie erstellt, die im Rahmen der Phase II AML-Studie FR00331 mit DAC behandelt wurden.

5.2 Vergleich des Patientenkollektives mit anderen AML-Studien

In der FR00331 DAC-Studie unter der Leitung von Lübbert *et al.*, an der die hier untersuchten Patienten teilnahmen, wurden im Gegensatz zu vergleichbaren Studien zur AML-Therapie keine MDS-Patienten eingeschlossen. Das Patientenkollektiv wurde weiterhin auf ein Alter von über 60 Jahren eingegrenzt, um die speziellen Erfordernisse dieser Patientengruppe zu untersuchen. Der Altersdurchschnitt der 227 Patienten lag bei 72 Jahren [81]. Die fünf in dieser Arbeit untersuchten Patienten gehören innerhalb der an der Studie teilnehmenden Gruppe zu den älteren Patienten. Im Vergleich zur Studie von Lübbert *et al.* sind die Patienten in den erwähnten AML-Studien mit kombinierten demethylierenden Therapien von Gore *et al.*, Garcia-Manero *et al.* und Soriano *et al.* etwas jünger (mittleres Alter 60 bis 69 Jahre, Altersspanne 5-85 Jahre) [54, 64, 83].

Die Unterteilung der AML-Patienten in eine Gruppe ab einem Alter von 60 Jahren mit einer schlechteren Prognose ist nicht unproblematisch. Mit zunehmendem Alter nimmt die Lebenserwartung der AML-Patienten ab. Die Verschlechterung beginnt aber nicht ab einem bestimmten Alter, sondern stellt vielmehr ein Kontinuum dar. Außerdem scheint sich das Alter nach Erreichen einer kompletten Remission nicht mehr auf die Prognose auszuwirken. Zusätzlich bedingt nicht das Alter allein die schlechteren Therapieergebnisse, sondern auch die damit verbundenen Komorbiditäten. Trotz dieser Problematik wird in der Regel eine Grenze bei 60 Jahren für die Prognoseeinteilung gestellt [16, 19].

Bisher wurde nicht aufgezeigt, dass geschlechtsspezifische Unterschiede im Ansprechen auf die DAC-Therapie bestehen [84]. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Proben von weiblichen Patienten untersucht. Eine Aussage bezüglich geschlechtsspezifischer Unterschiede im Methylierungsprofil oder Therapieansprechen kann daher nicht erfolgen.

5.3 Vergleich der Therapieerfolge von älteren Patienten in Studien zur AML-Therapie

Bei Patienten unter 60 Jahren können mit einer Induktionstherapie Remissionsraten von bis zu 70 - 80 % erreicht werden. Im Vergleich dazu sind die Erfolgsaussichten bei älteren Patienten wesentlich schlechter (bis zu 50 %) [16]. Deschler *et al.* haben die Ergebnisse aus 36 AML-Studien mit intensiver Chemotherapie bei Patienten über 60 Jahren zusammengetragen. Es wurde ein aus allen Studien zusammengefasster Mittelwert des Überlebens ermittelt. Er betrug für die intensive Chemotherapie nach unterschiedlichen Protokollen 30 Wochen, 12 Wochen für die Chemotherapie mit erniedrigter Dosis und 7,5 Wochen bei alleiniger supportiver Therapie ermittelt [16]. Für die Bewertung von AML-Studien zur intensiven Chemotherapie muss beachtet werden, dass es sich bei den Studienteilnehmern meist um Patienten in relativ gutem Allgemeinzustand handelt. Die Mehrzahl der älteren AML-Patienten weist einen wesentlich schlechteren Allgemeinzustand oder andere ungünstige Faktoren auf, die sie von der intensiven Chemotherapie ausschließen. Dazu gehören eine eingeschränkte Organfunktion, eine allgemein instabile klinische Situation und eine höhere Anzahl an vorliegenden Komorbiditäten [19].

Epigenetische Therapieansätze mit demethylierenden Substanzen können - wie die unter Kapitel 1.3.7 aufgeführten Studien zeigen - bei Patienten, die für eine intensive Chemotherapie nicht geeignet sind, bessere Überlebensergebnisse erzielen als bei älteren Patienten unter einer intensiven Chemotherapie. Der Anteil der Patienten, die eine komplette oder partielle Remission erreichen, lag zwischen 20 % und 50 %. Das Gesamtüberleben betrug bei diesen Patienten zwischen 4 und 20 Monaten (siehe Tabelle 1.10).

In der Studie von Gore *et al.* mit DAC und Natriumphénylbutyrat bei AML- und MDS-Patienten erreichten Patienten über 60 Jahre eine bessere komplette Remissionsrate von 20 %. Im Gegensatz dazu lag sie unter Einbeziehung jüngerer Patienten nur bei 14 % [54]. Ursache für diese Differenz kann in einer unterschiedlichen Krankheitsbiologie liegen. Bei jüngeren Patienten waren mehrere Hochrisikofaktoren zum Studieneinschluss notwendig und sie waren zum Teil schon mit einer Induktionstherapie vorbehandelt. Patienten über 60 Jahren wurden auch ohne weitere ungünstige Faktoren für die Studie zugelassen.

Die Auswertung der DAC-Studie FR00331 bei AML, an der die fünf Patienten dieser Untersuchung teilnahmen, wurde auf der Konferenz der *American Society of*

Hematology (ASH) 2007 in Atlanta (Georgia, USA) (Zwischenauswertung) und 2009 in New Orleans (Louisiana, USA) vorgestellt. Die mittlere Überlebenszeit betrug 5,5 Monate (0 - > 57.5 Monate). Etwa ein Viertel der Patienten erreichte eine komplette oder partielle Remission. Diese Patienten hatten eine mittlere Überlebenszeit von 24 Monaten. Bei 26 % der Patienten wurde ein antileukämischer Effekt festgestellt - mit einer mittleren Überlebenszeit von sechs Monaten. Im Gegensatz dazu lag der Mittelwert der Lebensdauer der Patienten ohne Therapieansprechen bei nur etwa 2 Monaten (Ergebnis der Zwischenauswertung) [81, 82].

Tabelle 5.1: Studie von Lübbert *et al.* zur DAC-Therapie in Kombination mit ATRA bei älteren AML-Patienten, (n= Anzahl der Patienten) [81, 82]

Sub-stanz	Krank-heit	Dosis Protokoll (d=Tage)	Gesamt-dosis pro Zyklus (mg/m ²)	n	Ansprech-rate (CR,PR, ALE)	Ansprechdauer/ Überlebenszeit (Monate)	Autoren
DAC+ ATRA	AML	DAC: 15 mg/m ² i.v. 3 x/Tag 3 Tage ATRA: ab 2. Zyklus 45 mg/m ² / pro Tag für 28 Tage	135 g/m ²	227	54 % CR: 13 % PR: 13 % ALE: 26 %	mittlere Überlebenszeit: 5,5 (0 - > 57,5)	Lübbert 2007, 2009 [81,82]

Im Vergleich zur Gesamtstudie liegen die Überlebenszeiten der fünf in dieser Studie untersuchten Patienten im durchschnittlichen Bereich. Patient A mit SD hatte eine etwas längere Überlebenszeit als der Mittelwert der nicht ansprechenden Patienten. Patient B und E liegen unterhalb der mittleren Überlebenszeit für Patienten mit ALE, während Patient C leicht darüber liegt.

Zusammenfassend zeigen die Studien zu demethylierenden Substanzen, dass ein Teil der Patienten von der Therapie profitiert. Für zukünftige Therapieentscheidungen bei der AML ist die Stratifizierung von Patienten, bei denen ein positiver Effekt mit DAC oder AZA erzielt werden kann, von essentieller Bedeutung. Zusätzlich zu zytogenetische Merkmalen und der Berücksichtigung des Alters sind weitere spezifische Entscheidungskriterien notwendig. Die demethylierende Wirkung von DAC und AZA wurde *in vivo* nachgewiesen, es fehlt bislang jedoch ein prädiktiver Biomarker für die biologischen Effekte von demethylierenden Substanzen.

5.4 Assoziation zwischen Zytogenetik, klinischen Parametern und methylierten Genen

Zytogenetische Aberrationen gelten weiterhin als wichtigster Prognosefaktor bei der AML [15]. Es gibt Hinweise für eine Verbindung zwischen Zytogenetik und der epigenetischen Veränderung von Genen. In einer Studie traten p15-Hypermethylierungen vermehrt bei den zytogenetischen Gruppen mit mittlerer bis ungünstiger Prognose auf. Außerdem scheinen prognostisch ungünstige zytogenetische Veränderungen tendenziell mit einer höheren Anzahl von methylierten Genen einherzugehen [11]. Insbesondere Patienten mit ungünstigen zytogenetischen Veränderungen haben in Studien zur MDS-Therapie mit DAC von der Behandlung profitiert [85]. In der klinischen Untersuchung von Lübbert an der die fünf Patienten teilnahmen, sprachen die Patienten mit normalem Karyotyp am besten auf die Therapie an (CR+PR bei normalem Karyotyp: 35 %, bei ungünstigem Karyotyp: 20 %). In dieser Arbeit kann der Zusammenhang zwischen den zytogenetischen Veränderungen und der Anzahl hypermethylierter Gene nur eingeschränkt ausgewertet werden. Bei Patient D, der einen Rückgang an hypermethylierten Genen und die längste Überlebenszeit aufwies, erbrachte die Chromosomenanalyse keine auswertbaren Metaphasen. Bei den vier übrigen Patienten ist keine Verknüpfung zwischen zytogenetischer Prognosegruppe und aberranten Methylierungen erkennbar.

Darüber hinaus haben wir klinische Parameter mit den Methylierungsmustern verglichen. Dabei fiel auf, dass nur Patient D mit der besten Überlebenszeit zu Therapiebeginn und im überwiegenden Teil des Therapieverlaufes normale Werte für Thrombozyten und LDH hatte. Die Hypermethylierungen nahmen ausschließlich bei diesem Patienten ab. Ob das Methylierungsprofil Einfluss auf klinische Parameter nimmt, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht spezifisch bewertet werden. In verschiedenen Studien wurde keine Assoziation der Leukozyten, LDH oder morphologischen Kriterien mit DNA-Hypermethylierungen bei AML-Patienten festgestellt [11, 86].

5.5 DNA-Hypermethylierung als Surrogatmarker für positive Effekte der DAC-Therapie

In dieser Arbeit wurden Methylierungsprofile von Tumorsuppressorgenen innerhalb des kleinen Kollektivs von fünf älteren AML-Patienten erstellt. Es wurde untersucht, welche Muster von Methylierungen auftreten und welche Veränderungen des Methylierungsprofils im Verlauf einer epigenetischen Therapie mit DAC möglich sind. Bei den untersuchten Patientenproben ergab sich ein heterogenes Bild an aberrant methylierten Genen. Die Verteilung der hypermethylierten Gene ist insgesamt vereinbar mit Ergebnissen früherer Untersuchungen bei AML-Proben (bzw. anderen hämatopoetischen Neoplasien). Zum Beispiel wiesen die Gene p15, E-Cadherin und SOCS-1, die in vergleichbaren Studien häufig hypermethyliert waren, auch in dieser Untersuchung Methylierungen auf. In einer Reihe von Genen, die in anderen Studien bei AML-Patienten nur selten oder nicht hypermethyliert sind (p16, TIMP-2, MGMT) wurden hier keine Methylierungen gefunden [10, 11].

Jeder der fünf hier untersuchten Patienten scheint ein individuelles Methylierungsmuster aufzuweisen. Einige Gene sind dabei häufiger betroffen, eine feste Kombination lag aber nicht vor. In Untersuchungen an einer größeren Patientenkohorte wäre es interessant zu überprüfen, ob es bestimmte regelmäßig auftauchende Methylierungsmuster gibt.

Es konnte im Rahmen dieser Studie kein spezifisches Gen identifiziert werden, dessen Promotor-Hypermethylierung als möglicher Biomarker für die Prognose und das Ansprechen auf die epigenetische Therapie dienen könnte. Vergleichbare Untersuchungen zur Methylierung einzelner Gene (meist p15) in der demethylierenden Therapie kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen. In der Studie von Daskalakis *et al.* zur p15-Methylierung bei DAC-Therapie wurde eine Verbindung zwischen dem Rückgang von p15-Hypermethylierungen und einem besseren Ansprechen festgestellt [52]. Dagegen zeigten eine Reihe von Studien abweichende Ergebnisse. Beispielsweise bestand keine Korrelation zwischen der Reexpression von p21 und p15 und dem Ansprechen von AML- bzw. MDS-Patienten auf die Therapie mit AZA, VPA und ATRA in der Analyse von Soriano *et al.* [84]. Ebenfalls war bei MDS-Patienten in der Studie von Oki *et al.* die p15-Hypermethylierung vor Therapie und p15-Hypomethylierung nach Therapie mit DAC nicht mit einem besseren Therapieansprechen assoziiert [87].

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass DAC-Therapieerfolge in hämatopoetischen Neoplasien durch die Demethylierung von hypermethylierten Genen induziert sind. Dabei spielt aber nicht allein das Tumorsuppressorgen p15 eine Rolle, sondern eine Vielzahl von Genen ist involviert. Als einzelnes Gen ist p15 damit kein geeigneter Surrogatmarker für ein Therapieansprechen. Bisher wurde auch kein anderes spezifisches Gen ermittelt, das als Surrogatmarker eingesetzt werden könnte.

Eine Assoziation zwischen der Anzahl an hypermethylierten Genen bei Diagnose und dem Ansprechen auf die Therapie konnte in dieser Studie nicht festgestellt werden.

Es lag kein Zusammenhang zwischen dem Rückgang von Methylierungen bei der zweiten Analyse und dem Ansprechen auf die Therapie vor. Die hier erhobenen Daten geben aber Hinweise darauf, dass eine Assoziation zwischen der Zunahme von Hypermethylierungen während der DAC-Therapie und einer kürzeren Überlebenszeit besteht. Der Krankheitsverlauf von Patient D gibt außerdem Anhaltspunkte für eine Verbindung zwischen einer größeren Anzahl von aberrant methylierten Genen bei Diagnosestellung, der Abnahme an hypermethylierten Genen im Verlauf der Therapie und einer längeren Überlebenszeit. Bei den Ergebnissen ist jedoch zu bedenken, dass Patient D auch allein durch die bessere hämatologische Ausgangssituation profitiert haben kann. Ob ein Zusammenhang mit dem Methylierungsmuster besteht, konnte nicht geklärt werden. Zu beachten ist, dass nur eine Auswahl von Genen untersucht wurde und nicht ausgeschlossen werden kann, dass nicht untersuchte Gene bei den Patienten methyliert sind und Einfluss auf die Krankheitsentwicklung nehmen.

In einer Studie von Shen *et al.* wurden zum größten Teil andere als die in der vorliegenden Studie aufgeführten Gene untersucht. Es wurden Methylierungslevel von zehn Genen bei MDS-Patienten, die mit DAC behandelt wurden, zu mehreren Zeitpunkten ermittelt. Höhere Methylierungslevel der einzelnen Gene zu Beginn der Untersuchung waren assoziiert mit einer schlechteren Prognose. Bei CR und PR nahmen die Methylierungslevel in größerem Maße ab, während bei SD und PD eine Zunahme zu verzeichnen war. Eine Korrelation zwischen Ausgangsmethylierungslevel und Ansprechen auf die Therapie bestand nicht [88].

Zur Beurteilung, ob ein fehlender Rückgang von Hypermethylierungen im Therapieverlauf ein Marker für ein schlechteres Überleben oder unzureichendes Ansprechen auf die demethylierende Therapie darstellt, sind weiterführende Studien erforderlich.

Das Auftreten von Methylierungen in multiplen Genen in den untersuchten Proben unterstützt das von Issa beschriebene Konzept des *CpG island methylator phenotype* (CIMP), das auch bei der AML beobachtet wird [88, 89]. Es definiert CIMP positive Tumoren als klinisch und ätiologisch distinkte Gruppe [90]. Die Entstehung des CIMP ist durch eine Inaktivierung von Genen zu erklären, welche den Schutz vor Methylierungen vermitteln, wodurch gleichzeitig viele Gene von Hypermethylierungen und resultierende Inaktivierung betroffen sein können. CIMP-positive Tumoren scheinen mit einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein [90]. In der vorliegenden Arbeit trat bei einem Patienten die multiple Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen und die unter Therapie abnehmende Anzahl hypermethylierter Gene in Verbindung mit einem längeren Überleben auf.

Interessanterweise resultierte die demethylierende Therapie bei drei der untersuchten Patientenproben nicht in einer Reduktion der Methylierungen. Es wurde im Gegenteil eine steigende Anzahl hypermethylierter Gene nach zwei Zyklen DAC verzeichnet.

Eine denkbare Ursache für die ungleichen Effekte der demethylierenden Therapie bei den Patienten kann das Vorliegen einer unterschiedlichen Plasmakonzentration von DAC sein. Bei der Therapie von MDS-Patienten mit AZA und Natriumphenylbutyrat in einer Studie von Gore *et al.* wurde eine Assoziation zwischen der AZA-Plasmakonzentration (bzw. der Fläche unter der AZA Plasmakonzentration-Zeitkurve) und der Demethylierung von p15 und E-Cadherin aufgefunden. Es wurde vermutet, dass das Nichtansprechen auf die demethylierende Therapie Folge einer unzureichenden Plasmakonzentration ist. Genetische Polymorphismen und daraus folgende Differenzen in katabolisierenden Enzymen können verantwortlich für eine unterschiedliche Substanzmetabolisierung und Wirkung auf hypermethylierte Gene sein [54].

Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass DAC *de novo* Methylierungen unter Umständen nicht verhindern kann. Ursache dafür kann sein, dass die DNMT-inhibierenden Substanzen DAC und AZA hauptsächlich auf DNMT1 wirken. Dieses Enzym ist für die Aufrechterhaltung der Methylierungen an der replizierten DNA verantwortlich. Die *de novo* Methylierungen vermittelnden Enzyme DNMT3a und DNMT3b werden weniger durch die epigenetisch wirksamen Substanzen beeinflusst. Es wurde festgestellt, dass nur eine Kooperation von DNMT1 und DNMT3 zur abnormalen Hypermethylierung bei der Tumorentstehung führt [2, 49]. Möglicherweise

reicht die Inhibition von DNMT1 allein nicht aus, um das Methylierungspotential von DNMT3b für neue Gene zu unterbinden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben weitere Hinweise darauf, dass das Methylierungsmuster von CpG-Inseln in verschiedenen Genen und die Dynamik der Methylierungsveränderung als Marker für Effekte der epigenetischen AML-Therapie genutzt werden kann. Das Vorhandensein von hypermethylierten Genen ist eventuell ein prädiktiver Indikator für das Ansprechen auf die demethylierende Therapie. Ein Rückgang an methylierten Genen konnte nicht als Voraussagewert für das Therapieansprechen festgestellt werden, jedoch war diese Entwicklung mit einem längeren Überleben verknüpft. Die alleinige Anzahl an hypermethylierten Genen ist kein aussagekräftiger Indikator für die Prognose. Eventuell spielen ganz bestimmte Methylierungsmuster verschiedener Gene eine Rolle.

Bei der Verwendung Gen-spezifischer Methylierungsanalysen als Biomarker ergibt sich bis heute das Problem, dass trotz einer großen Zusammenstellung von Kandidatengenens bedeutsame Gene in der Untersuchung eventuell nicht erfasst werden. Es kann nur eine Annäherung an das gesamte Genom erzielt werden. Es ist also nicht ganz auszuschließen, dass relevante Informationen fehlen können.

Die demethylierenden Effekte von DAC sind nachgewiesen und es hat sich herausgestellt, dass eher die DNMT-Inhibition als die zytotoxischen Effekte die Hauptwirkungsmechanismen von DAC sind. Es ist jedoch noch unklar, was die genaue Folge der DNMT-Inhibition ist. Alternativ zur demethylierenden Wirkung könnte DAC durch andere Mechanismen ein Therapieansprechen induzieren. Hinweise darauf geben Untersuchungen von Tamm *et al.* zur globalen Genexpression, in denen DAC die Reexpression von Genen induziert, von denen nur die Hälfte CpG-Inseln enthalten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass DAC zusätzlich methylierungsunabhängige Effekte hat, die für die Prognose und den Therapieerfolg entscheidend sein können [91].

5.6 Weitere potentielle Surrogatmarker

Es ist noch unklar, ob Methylierungen einen adäquaten Surrogatmarker für positive Effekte der Therapie mit epigenetisch aktiven Substanzen darstellen und welche

speziellen Methylierungsanalysen dafür am besten geeignet sind. Ein weiterer untersuchter Surrogatmarker - neben einzelnen hypermethylierten Genen und Methylierungsprofilen von verschiedenen Genen - ist die globale DNA-Methylierung. Im Gegensatz zur Gen-spezifischen Methylierungsanalyse wird in Untersuchungen von repetitiven Sequenzen der DNA wie *long interspersed nucleotide elements* (LINE) und *Alu elements* die globale DNA-Methylierung erfasst. Diese Sequenzen sind normalerweise methyliert, in Tumorzellen jedoch hypomethyliert. LINE-Methylierungen können durch die Bisulfit-Pyrosequenzierung quantifiziert werden und Veränderungen dieser könnten als Surrogatmarker für globale Methylierungsveränderungen eingesetzt werden [92].

Bei LINE-Analysen wurde eine Abnahme der Methylierung nach DAC-Behandlung in AML-/MDS-Patientenproben festgestellt [64]. In einer Studie zur *low-dose* DAC-Therapie war die LINE-Hypomethylierung mit dem Ansprechen auf die DAC-Therapie assoziiert [92]. Vergleichbare Studien zeigten keinen Unterschied in der Ausprägung der LINE-Hypomethylierung zwischen Patienten die auf die Therapie ansprachen und nicht ansprechenden Patienten [64, 83]. Die genomweite Hypomethylierung hat sich als sehr variabel herausgestellt und erschwert daher den Einsatz von LINE-Methylierungen als Surrogatmarker [37]. Weiterhin ist problematisch, dass besonders die repetitiven Einheiten in normalen Zellen methyliert werden, so dass eine Abnahme dieser Methylierungen die Aktivität von demethylierenden Substanzen messen kann, jedoch keine direkten Informationen über deren Einfluss auf aberrant methylierte Gene liefert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die LINE-Hypomethylierung ein guter Marker für die hypomethylierende Aktivität von DAC sein kann, aber nicht unbedingt ein biologischer Surrogatmarker für die klinische Aktivität ist [93].

5.7 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurden CpG-Insel-Hypermethylierungen auf ihr Potential als Surrogatmarker für die Prognose und für eine wahrscheinliche Ansprache auf epigenetische Therapeutika bei AML-Patienten untersucht.

Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen unter Berücksichtigung vorausgegangener Studien, dass DAC eine demethylierende Aktivität aufweist, die zu einer Veränderung des Methylierungsprofils bei AML Patienten führen kann. Es ist aber auch unter DAC Therapie eine Zunahme der Methylierungen möglich. Ein einzelnes spezifisches Gen, das bei vorliegender Hypermethylierung für die Prognose bestimmend ist, wurde nicht

identifiziert. Auch vorherige Studien sind zu keinen eindeutigen Ergebnissen gelangt und lassen vermuten, dass eine Reihe von Genen relevant ist. Es konnte nicht nachgewiesen werden, ob die Methylierungsänderung spezifischer Gene im Verlauf der Therapie einen geeigneten Biomarker für ein Therapieansprechen darstellen kann. Ein Zusammenhang zwischen der Demethylierung von Genen und einem besseren Überleben ist unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit denkbar. Diese Studie bestätigt, dass eine Ausweitung der Untersuchung von Methylierungsprofilen an mit DAC behandelten AML-Patienten sinnvoll ist. Es wird kein Anspruch auf Vollständigkeit für die Liste der hier untersuchten Gene erhoben, aber es wurde zum ersten Mal diese große Auswahl an Genen im Therapieverlauf untersucht.

Die Erkenntnisse über identifizierte Gene, die in hämatopoetischen Neoplasien durch Hypermethylierung inhibiert werden, nehmen weiter zu. Für die Verifizierung der Ergebnisse und für die Bestimmung von eventuell relevanten Genen eines Methylierungsprofils als Kriterium zur Therapieentscheidung sind Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven notwendig. In weiterführenden Studien könnte ermittelt werden, ob es ein für das Therapieansprechen typisches Methylierungsprofil von spezifischen Genen gibt. Es kann eine Fokussierung auf häufiger betroffene Gene erfolgen, die in einer größeren Patientenpopulation untersucht werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob eine bestimmte Anzahl von hypermethylierten Genen zum Diagnosezeitpunkt oder der Rückgang an Methylierungen für ein besseres Überleben verantwortlich sind. Die Ermittlung eines Methylierungsprofils als Biomarker kann zur zukünftigen Entscheidungshilfe für die Therapie mit demethylierenden Substanzen beitragen. Es zeigt sich, dass die weitere Erforschung epigenetischer Veränderungen an größeren Patientenkollektiven zur Gewinnung von neuen Erkenntnissen zu epigenetischen Faktoren als Biomarker und zum Einsatz von Therapien, die in epigenetische Mechanismen eingreifen, von großer Bedeutung ist.

6 Zusammenfassung

Die Akute myeloische Leukämie betrifft hauptsächlich ältere Menschen über 60 Jahre. Für viele dieser Patienten ist die Standardchemotherapie, unter anderem aufgrund ihres reduzierten Allgemeinzustandes, nicht geeignet. Sie sind daher Kandidaten für neue Therapieregime im Rahmen von klinischen Studien.

Inzwischen ist bekannt, dass nicht nur genetische Aberrationen, sondern auch epigenetische Modifikationen in der Pathogenese der AML eine wichtige Rolle spielen. Aberrante Methylierungen von CpG-Inseln in Gen-Promotorregionen beeinflussen die Tumorgenese durch transkriptionelle Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Die Umkehr der aberranten Methylierung durch Inhibitoren von DNA-Methyltransferasen - z.B. DAC - ist eine neue therapeutische Strategie in der Behandlung von myeloischen Neoplasien. Die von Lübbert *et al.* initiierte Phase II Studie FR00331 hat nachgewiesen, dass niedrig-dosiertes DAC ein wirksames Therapeutikum bei älteren AML-Patienten ist, für die eine Standardchemotherapie nicht in Frage kommt. Zur individuellen Entscheidung für eine Therapie sind prädiktive Biomarker, die auf ein Ansprechen hinweisen, hilfreich. Ein Ansatzpunkt bei epigenetisch wirksamen Substanzen ist die Evaluierung von Gen-Promotor-Hypermethylierungen als Biomarker.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methylierungsdynamik in DNA-Proben von fünf älteren AML-Patienten untersucht, die nach dem Studienprotokoll FR00331 behandelt wurden. Der Methylierungsstatus von 19 bekannten Tumorsuppressorgenen wurde mittels MSP zum Zeitpunkt der Diagnose sowie nach zwei DAC-Zyklen analysiert und mit den klinischen Daten der Patienten verglichen. In der ersten Analyse wiesen die Proben unterschiedliche Methylierungsprofile auf (0 bis 6 methylierte Gene). Eine Zunahme an hypermethylierten Genen im Verlauf wurde bei drei Patienten festgestellt. Der Patient mit der größten Anzahl an methylierten Genen zum Diagnosezeitpunkt wies als einziger eine Abnahme an methylierten Genen auf und hatte die längste Überlebenszeit.

Die Ergebnisse zeigen, bei einer limitierten Anzahl an untersuchten Patienten, dass die Methylierungsprofile zum Diagnosezeitpunkt und die Methylierungsdynamik im Verlauf der DAC-Therapie heterogen sind. Weiterführende Untersuchungen sind für die Fragestellung sinnvoll, ob Methylierungsprofile als Biomarker zur Entscheidungshilfe für die Therapie von älteren AML-Patienten mit demethylierenden Substanzen eingesetzt werden können.

7 Literaturverzeichnis

1. Hanahan, D., Weinberg, R.A.: *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. 100(1): S. 57-70.
2. Jones, P.A., Baylin, S.B.: *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nat Rev Genet, 2002. 3(6): S. 415-428.
3. Esteller, M., et al.: *A gene hypermethylation profile of human cancer*. Cancer Res, 2001. 61(8): S. 3225-3229.
4. Lowenberg, B., et al.: *Acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 1999. 341(14): S. 1051-1062.
5. Deschler, B., Lübbert, M.: *Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology*. Cancer, 2006. 107(9): S. 2099-2107.
6. Frohling, S., et al.: *Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications*. J Clin Oncol, 2005. 23(26): S. 6285-6295.
7. Grignani, F., et al.: *Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia*. Nature, 1998. 391(6669): S. 815-818.
8. Sanderson, R.N., et al.: *Population-based demographic study of karyotypes in 1709 patients with adult acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2006. 20(3): S. 444-450.
9. Stirewalt, D.L., et al.: *FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia*. Blood, 2001. 97(11): S. 3589-3595.
10. Esteller, M.: *Epigenetics in cancer*. N Engl J Med, 2008. 358(11): S. 1148-1159.
11. Galm, O., et al.: *Clinical implications of aberrant DNA methylation patterns in acute myelogenous leukemia*. Ann Hematol, 2005. 84 Suppl : S. 39-46.
12. Vardiman, J.W., et al.: *The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms*. Blood, 2002. 100(7): S. 2292-2302.
13. Thiede, C., et al.: *Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML)*. Blood, 2006. 107(10): S. 4011-4020.
14. Bienz, M., et al.: *Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype*. Clin Cancer Res, 2005. 11(4): S. 1416-1424.
15. Grimwade, D., et al.: *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, 1998. 92(7): S. 2322-2333.
16. Deschler, B., et al.: *Treatment decision-making for older patients with high-risk myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia: problems and approaches*. Haematologica, 2006. 91(11): S. 1513-1522.
17. Tallman, M.S., et al.: *Drug therapy for acute myeloid leukemia*. Blood, 2005. 106(4): S. 1154-1163.
18. Ravandi, F., et al.: *New agents in acute myeloid leukemia and other myeloid disorders*. Cancer, 2004. 100(3): S. 441-454.
19. Estey, E.: *Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in older patients*. J Clin Oncol, 2007. 25(14): S. 1908-1915.
20. Sekeres, M.A., et al.: *Decision-making and quality of life in older adults with acute myeloid leukemia or advanced myelodysplastic syndrome*. Leukemia, 2004. 18(4): S. 809-816.
21. Appelbaum, F.R., et al.: *Age and acute myeloid leukemia*. Blood, 2006. 107(9): S. 3481-3485.

22. Kantarjian, H., *et al.*: *Results of intensive chemotherapy in 998 patients age 65 years or older with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: predictive prognostic models for outcome.* Cancer, 2006. 106(5): S. 1090-1098.
23. Hiddemann, W., *et al.*: *Management of acute myeloid leukemia in elderly patients.* J Clin Oncol, 1999. 17(11): S. 3569-3576.
24. Feinberg, A.P., Tycko, B.: *The history of cancer epigenetics.* Nat Rev Cancer, 2004. 4(2): S. 143-153.
25. Herman, J.G., Baylin, S.B.: *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation.* N Engl J Med, 2003. 349(21): S. 2042-2054.
26. Bestor, T.H.: *The DNA methyltransferases of mammals.* Hum Mol Genet, 2000. 9(16): S. 2395-2402.
27. Rhee, I., *et al.*: *DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells.* Nature, 2002. 416(6880): S. 552-556.
28. Bird, A.: *DNA methylation patterns and epigenetic memory.* Genes Dev, 2002. 16(1): S. 6-21.
29. Jaenisch, R., Bird, A.: *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals.* Nat Genet, 2003. 33 Suppl: S. 245-254.
30. Cosgrove, M.S., *et al.*: *Regulated nucleosome mobility and the histone code.* Nat Struct Mol Biol, 2004. 11(11): S. 1037-1043.
31. Jenuwein, T., Allis, C.D.: *Translating the histone code.* Science, 2001. 293(5532): S. 1074-1080.
32. Nakayama, J., *et al.*: *Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly.* Science, 2001. 292(5514): S. 110-113.
33. Razin, A.: *CpG methylation, chromatin structure and gene silencing-a three-way connection.* Embo J, 1998. 17(17): S. 4905-4908.
34. Jones, P.A., Baylin, S.B.: *The epigenomics of cancer.* Cell, 2007. 128(4): S. 683-692.
35. Jones, P.A., Laird, P.W.: *Cancer epigenetics comes of age.* Nat Genet, 1999. 21(2): S. 163-167.
36. Knudson, A.G.: *Two genetic hits (more or less) to cancer.* Nat Rev Cancer, 2001. 1(2): S. 157-162.
37. Estecio, M.R., *et al.*: *LINE-1 hypomethylation in cancer is highly variable and inversely correlated with microsatellite instability.* PLoS ONE, 2007. 2(5): S. 399.
38. Baylin, S.B., *et al.*: *DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas.* Cancer Res, 1986. 46(6): S. 2917-2922.
39. Greger, V., *et al.*: *Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma.* Hum Genet, 1989. 83(2): S. 155-158.
40. Herman, J.G., *et al.*: *Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers.* Cancer Res, 1995. 55(20): S. 4525-4530.
41. Baylin, S.B., Ohm, J.E.: *Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction?* Nat Rev Cancer, 2006. 6(2): S. 107-116.
42. Dahl, C., Guldberg, P.: *DNA methylation analysis techniques.* Biogerontology, 2003. 4(4): S. 233-250.
43. Herman, J.G., *et al.*: *Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(18): S. 9821-9826.
44. Laird, P.W.: *The power and the promise of DNA methylation markers.* Nat Rev Cancer, 2003. 3(4): S. 253-266.

45. Paz, M.F., *et al.*: CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. Clin Cancer Res, 2004. 10(15): S. 4933-4938.
46. Jost, E., Galm, O.: EHA Scientific Workshop Report: The Role of Epigenetics in Hematological Malignancies. Landes Bioscience, 2007. 2(2): S. 71-79.
47. Jost, E., *et al.*: Targeting the Epigenome in Hematopoietic Malignancies. Letters in Drug & Discovery, 2006. 3: S. 242-252.
48. Jones, P.A., Taylor S.M.: Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. Cell, 1980. 20(1): S. 85-93.
49. Claus, R., Lübbert M.: Epigenetic targets in hematopoietic malignancies. Oncogene, 2003. 22(42): S. 6489-6496.
50. Issa, J.P.: Optimizing therapy with methylation inhibitors in myelodysplastic syndromes: dose, duration, and patient selection. Nat Clin Pract Oncol, 2005. 2 Suppl 1: S. S24-29.
51. Bender, C.M., *et al.*: Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. Cancer Res, 1998. 58(1): S. 95-101.
52. Daskalakis, M., *et al.*: Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment. Blood, 2002. 100(8): S. 2957-2964.
53. Cameron, E.E., *et al.*: Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. Nat Genet, 1999. 21(1): S. 103-107.
54. Gore, S.D., *et al.*: Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. Cancer Res, 2006. 66(12): S. 6361-6369.
55. Garcia-Manero, G., Gore, S.D.: Future directions for the use of hypomethylating agents. Semin Hematol, 2005. 42(3 Suppl 2): S. S50-59.
56. Aggerholm, A., *et al.*: Extensive intra- and interindividual heterogeneity of p15INK4B methylation in acute myeloid leukemia. Cancer Res, 1999. 59(2): S. 436-441.
57. Issa, J.P., *et al.*: Phase I study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. Blood, 2004. 103(5): S. 1635-1640.
58. Wijermans, P., *et al.*: Low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent, for the treatment of high-risk myelodysplastic syndrome: a multicenter phase II study in elderly patients. J Clin Oncol, 2000. 18(5): S. 956-962.
59. Silverman, L.R., *et al.*: Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. J Clin Oncol, 2002. 20(10): S. 2429-2440.
60. Kantarjian, H., *et al.*: Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. Blood, 2007. 109(1): S. 52-57.
61. Silverman, L.R., *et al.*: Effects of treatment with 5-azacytidine on the in vivo and in vitro hematopoiesis in patients with myelodysplastic syndromes. Leukemia, 1993. 7 Suppl 1: S. 21-29.
62. Kantarjian, H., *et al.*: Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. Cancer, 2006. 106(8): S. 1794-1803.

63. Petti, M.C., *et al.*: *Pilot study of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) in the treatment of poor prognosis acute myelogenous leukemia patients: preliminary results.* Leukemia, 1993. 7 Suppl 1: S. 36-41.
64. Garcia-Manero, G., *et al.*: *Phase 1/2 study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid in patients with leukemia.* Blood, 2006. 108(10): S. 3271-3279.
65. Di Croce, L., *et al.*: *Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor.* Science, 2002. 295(5557): S. 1079-1082.
66. Bennett, J.M., *et al.*: *Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group.* Ann Intern Med, 1985. 103(4): S. 620-625.
67. Chim, C.S., *et al.*: *Infrequent hypermethylation of CEBPA promotor in acute myeloid leukaemia.* Br J Haematol, 2002. 119(4): S. 988-990.
68. Melki, J.R., *et al.*: *Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia.* Cancer Res, 1999. 59(15): S. 3730-3740.
69. Yu, L., *et al.*: *Global assessment of promoter methylation in a mouse model of cancer identifies ID4 as a putative tumor-suppressor gene in human leukemia.* Nat Genet, 2005. 37(3): S. 265-274.
70. Esteller, M., *et al.*: *Hypermethylation-associated Inactivation of the Cellular Retinol-Binding-Protein 1 Gene in Human Cancer.* Cancer Res, 2002. 62(20): S. 5902-5905.
71. Jost, E., *et al.*: *Epigenetic inactivation of secreted Frizzled-related proteins in acute myeloid leukaemia.* Br J Haematol, 2008. 142(5): S. 745-753.
72. Johan, M.F., *et al.*: *Aberrant methylation of the negative regulators RASSF1A, SHP-1 and SOCS-1 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia.* Br J Haematol, 2005. 129(1): S. 60-65.
73. He, B., *et al.*: *SOCS-3 is frequently silenced by hypermethylation and suppresses cell growth in human lung cancer.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(24): p. 14133-14138.
74. Galm, O., *et al.*: *Inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene by promoter hypermethylation in lymphoid malignancies.* Oncogene, 2005. 24(30): S. 4799-4805.
75. Agrelo, R., *et al.*: *Epigenetic inactivation of the premature aging Werner syndrome gene in human cancer.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(23): S. 8822-8827.
76. Frommer, M., *et al.*: *A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(5): S. 1827-1831.
77. Clark, S.J., *et al.*: *High sensitivity mapping of methylated cytosines.* Nucleic Acids Res, 1994. 22(15): S. 2990-2997.
78. Shapiro, R., *et al.*: *Nucleic acid reactivity and conformation. II. Reaction of cytosine and uracil with sodium bisulfite.* J Biol Chem, 1973. 248(11): S. 4060-4064.
79. Gilbert, J., *et al.*: *The clinical application of targeting cancer through histone acetylation and hypomethylation.* Clin Cancer Res, 2004. 10(14): S. 4589-4596.
80. Lübbert, M., Claus, R.: *Epigenetische Inaktivierung von Genexpression.* Der Onkologe, 2007. 13: S. S46-55.
81. Lübbert, M. *et al.*: *Low-Dose Decitabine (DAC), alone or in combination with All-Trans Retinoic Acid (ATRA), is an active first-line treatment in older AML*

- patients of all cytogenetic risk groups: Final results of the FR00331 Multicenter Phase II Study.* Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2009 114: [abstract 4141].
82. Lübbert, M., et al.: *Continued low-dose Decitabine (DAC) is an active first-line treatment in all cytogenetic subgroups of older AML patients: Results of the FR00031 Multicenter Phase II Study* Blood, 2007. 110(11): [abstract 300].
 83. Soriano, A.O., et al.: *Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome.* Blood, 2007. 110(7): S. 2302-2308.
 84. Wijermans, P.W., et al.: *An epigenetic approach to the treatment of advanced MDS; the experience with the DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in 177 patients.* Ann Hematol, 2005. 84 Suppl 13: S. 9-17.
 85. Lübbert, M., et al.: *Cytogenetic responses in high-risk myelodysplastic syndrome following low-dose treatment with the DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine.* Br J Haematol, 2001. 114(2): S. 349-357.
 86. Grovdal, M., et al.: *Negative effect of DNA hypermethylation on the outcome of intensive chemotherapy in older patients with high-risk myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia following myelodysplastic syndrome.* Clin Cancer Res, 2007. 13(23): S. 7107-7112.
 87. Oki, Y., et al.: *Hypomethylation induction in MDS after treatment with decitabine at three different doses.* Journal of Clinical Oncology, ASCO Annual Meeting Proceedings, 2005. 23(16): [abstract 6546].
 88. Shen, L., et al.: *CpG island methylation is a poor prognostic factors in myelodysplastic syndrome patients and is reversed by decitabine therapy-results of a phase III randomized study.* Blood, 2005. 106(11): [abstract 790].
 89. Toyota, M., et al.: *Methylation profiling in acute myeloid leukemia.* Blood, 2001. 97(9): S. 2823-2829.
 90. Issa, J.P.: *CpG island methylator phenotype in cancer.* Nat Rev Cancer, 2004. 4(12): S. 988-993.
 91. Schmelz, K., et al.: *Induction of gene expression by 5-Aza-2'-deoxycytidine in acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) but not epithelial cells by DNA-methylation-dependent and -independent mechanisms.* Leukemia, 2005. 19(1): S. 103-111.
 92. Yang, A.S., et al.: *DNA methylation changes after 5-aza-2'-deoxycytidine therapy in patients with leukemia.* Cancer Res, 2006. 66(10): S. 5495-5503.
 93. Oki, Y., et al.: *Decitabine--bedside to bench.* Crit Rev Oncol Hematol, 2007. 61(2): S. 140-152.

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Rainhardt Osieka für die Ermöglichung dieser Arbeit und die stetige Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin Herrn Priv.-Doz. Dr. Oliver Galm für die außerordentliche wissenschaftliche wie menschliche Betreuung sowohl während der experimentellen Ausarbeitung als auch während der schriftlichen Abfassung der Dissertation. Ebenso danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. Edgar Jost und Herrn Dr. Stefan Wilop für die hilfreichen Ideen und anregenden Gespräche.

Professor Dr. Michael Lübbert und seinem Studienteam an der Universitätsklinik Freiburg danke ich für die Aufnahme unserer Probanden in die Studie FR00331 und für die zur Verfügung gestellten Informationen zur Studiendurchführung und zu den Studienergebnissen.

Dem gesamten Laborteam danke ich für die einmalige Atmosphäre, die die Arbeit im Labor zu etwas sehr besonderem gemacht hat und mir immer in schöner Erinnerung bleiben wird. Ramona Latton danke ich ganz besonders für die geduldige und kompetente Einführung in die Laborarbeit und die Unterstützung während der Durchführung der Experimente. Peter Glatte, Lucia Vankann und Claudia Schubert danke für Ihre freundliche Hilfsbereitschaft. Für die technische Hilfe und die Ratschläge bei Computerproblemen gilt mein Dank Herrn Albert Esser. Den Stationsärzten der Medizinischen Klinik IV danke ich für die vorgenommenen Blutentnahmen, Knochenmarkpunktionen und die Befundung der Knochenmarkausstriche.

Ein spezieller Dank geht an alle meine Mitdoktoranden für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit, die Kaffeepausen im Büro, die zahlreichen antreibenden Gespräche und die gegenseitige Hilfe bei den Korrekturen.

Besonderer Dank gilt den Patienten, die ihr Knochenmark und Blutproben für die Forschung zur Verfügung gestellt haben.

Vor allem möchte ich auch meiner Familie für den liebevollen Beistand danken. Insbesondere danke ich meinen Eltern, die mich während meiner gesamten schulischen und akademischen Ausbildung in jeder Hinsicht außerordentlich unterstützt haben.

Erklärung zur Datenaufbewahrung

Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten in der Medizinischen Klinik IV des Universitätsklinikums Aachen hinterlegt sind.