

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und
Onkologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*Systematische Analyse des mTOR-Signalwegs und der Bcl-2
Genfamilie bei akuten myeloischen Leukämien*

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Martina Hampel

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. P. T. Daniel
 2. Priv.- Doz. Dr. med. A. Egle
 3. Priv.- Doz. Dr. F. Eßmann

Datum der Promotion: 01.02.2013

Meinen Eltern

In tiefer Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I-III
Abkürzungsverzeichnis	IV-VIII
1. Einleitung	1-22
1.1 Akute myeloische Leukämie	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Epidemiologie	1
1.1.3 Ätiologie	1
1.1.4 Normale Hämatopoese und Leukämogenese	2
1.1.5 Zytogenetische Veränderungen bei AML	3
1.1.5.1 AML mit aberrantem Karyotyp	4
1.1.5.1.1 AML mit balancierten Translokationen	4
1.1.5.2 AML mit normalem Karyotyp	5
1.1.6 Molekulargenetische Veränderungen bei AML	5
1.1.7 Klassifikation	6
1.1.7.1 FAB-Klassifikation	6
1.1.7.2 World Health Organization- (WHO-) Klassifikation	7
1.1.8 Symptome und Diagnostik	8
1.1.9 Prognose	9
1.1.9.1 Allgemeine Prognosefaktoren	10
1.1.9.2 Zytogenetische Prognosegruppen	10
1.1.9.3 Molekulargenetische Prognosefaktoren	11
1.1.10 Therapie	11
1.1.10.1 Induktionstherapie	11
1.1.10.2 Konsolidierungs- oder Postremissionstherapie	12
1.1.10.3 Allogene Stammzelltransplantation	12
1.1.10.4 Therapie der Promyelozytenleukämie (AML M3)	13
1.1.10.5 Rezidivtherapie	13
1.2 Apoptose	13
1.2.1 Apoptoseregulation	13
1.2.1.1 Extrinsischer Signalweg	14
1.2.1.2 Intrinsischer Signalweg und Bcl-2-Familienmitglieder	15
1.2.1.3 Caspaseregulation durch IAP-Proteine	17
1.3 PI3K/Akt/mammalian target of rapamycin Signalweg	18
1.4 Zellzyklusregulation	20
1.5 Fragestellung	21

2. Material und Methoden	23-31
2.1 Erhebung der Patientendaten	23
2.2 Analyse der Patientenproben	24
2.2.1 FLT3-ITD- und NPM1-Mutationsanalysen	24
2.2.2 TaqMan-Real-Time-PCR zur relativen Quantifizierung der Genexpression	26
2.3 Statistische Auswertung	28
2.4 Charakterisierung des Patientenkollektivs	29
3. Ergebnisse	32-62
3.1 Karyotyp	32
3.2 Mutationsstatus beim Gesamtkollektiv	32
3.2.1 FLT3-Mutationsstatus beim Gesamtkollektiv	32
3.2.2 NPM1-Mutationsstatus beim Gesamtkollektiv	33
3.2.3 Interaktionsvariable FLT3/NPM1 beim Gesamtkollektiv	34
3.2.4 FLT3- und NPM1-Komutation beim Gesamtkollektiv	34
3.3 Mutationsstatus in der Subgruppe mit normalem Karyotyp	35
3.3.1 NPM1- Mutationsstatus bei AML mit normalem Karyotyp	35
3.3.2 FLT3-Mutationsstatus bei AML mit normalem Karyotyp	36
3.3.3 Kombination von NPM1- und FLT3-Mutationsstatus bei NK-AML	36
3.3.4 Interaktionsvariable FLT3/NPM1 bei normalem Karyotyp	37
3.4 Verteilung von NPM1 wt/mut und FLT3wt/mut auf die drei Karyotypen	38
3.5 mTOR-Signalweg	39
3.5.1 Auswertung der Genexpressionen des mTOR-Signalwegs und seiner Zielgene	39
3.5.2 Subgruppenanalysen	41
3.5.3 Mann-Whitney-U-Test zur Beurteilung der Genexpressionsniveaus bei FLT3(wt/mut) und NPM1(wt/mut)	45
3.5.4 Erreichen einer CR nach 1. Induktion	48
3.6 Analyse einzelner interessanter Gene	49
3.6.1 TSC1/2-Interaktionsvariable	49
3.6.2 Vergleich der TSC1- und TSC2-Genexpression zwischen ED und Rezidiv	50
3.7 Bcl-2-Genfamilie	50
3.7.1 Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen des Gesamtkollektivs	50
3.7.2 Subgruppenanalysen	53
3.7.3 Mann-Whitney-U-Test zur Beurteilung der Genexpressionsniveaus bei FLT3(wt/mut) und NPM1(wt/mut)	55
3.7.4 Vergleich der Höhe der Genexpressionen zwischen ED und Rezidiv	57
3.7.4.1 Ungepaarter Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test	57
3.7.4.2 Gepaarter Vergleich zwischen ED und Rezidiv mittels Wilcoxon-Test	60
3.7.5 Ansprechen auf 1. Induktion bzw. Erreichen einer CR	61

4. Diskussion	63-90
4.1 Allgemeines zur Arbeit	63
4.2.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs anhand etablierter genetischer Prognosefaktoren	63
4.2.2 Allgemeines zum mTOR-Signalweg	67
4.2.3 Hohe TSC2-Expression ist mit längerem DFS und OS korreliert	68
4.2.4 TSC1 und TSC2 sind im Rezidiv niedriger exprimiert	70
4.2.5 Das Vorliegen einer NPM1-Mutation ist mit hoher TSC2- und niedriger Cyclin D1- und Cyclin D2-Expression assoziiert	71
4.2.6 Günstiger prognostischer Einfluss der NPM1-Mutation könnte durch Hemmung des mTOR-Signalwegs in Folge einer erhöhten TSC2-Expression erklärt werden	73
4.2.7 Anmerkung zu anderen Ergebnissen	77
4.3 Allgemeines zur Bcl-2-Familie	77
4.3.1 BH3-only-Proteine	78
4.3.2 Niedrige Bmf-Expression ist mit besserem Gesamt- und krankheitsfreien Überleben assoziiert, insbesondere bei Vorliegen eines intermediären Karyotyps	79
4.3.3 Extrem niedrige Nbk/Bik-Expression korreliert mit verkürztem DFS	81
4.3.4 Verhalten der Genexpression im Rezidiv	85
5. Zusammenfassung	91
6. Literaturverzeichnis	92-100
7. Selbständigkeitserklärung	101
8. Danksagung	102
9. Tabellarischer Lebenslauf	103

Abkürzungsverzeichnis

ABL = Abelson-Gen

AKT = Protein Kinase B; Serin-Threonin-Kinase

ALL = akute lymphatische Leukämie

AML = akute myeloische Leukämie

AMLCG = AML Cooperative Group

AMPK = AMP-activated protein kinase

AP = alkalische Phosphatase

APAF1 = apoptotic protease activating factor 1

APL = akute Promyelozytenleukämie

AraC = Cytosin Arabinosid

ARF = alternative reading frame

ATRA = all-trans Retinsäure

BAALC = Brain and Acute Leukemia, Cytoplasmic

Bad = Bcl-2 antagonist of cell death

Bak = Bcl-2 homologous antagonist killer

Bax = Bcl-2-associated X protein

Bcl = B-cell lymphoma 2

Bfk = B-cell lymphoma 2 family kin

Bfl1/A1 = Bcl-2 related protein A1

BH = Bcl-2-Homologie

Bid = BH 3 interacting domain death agonist

Bik = Bcl-2 interacting killer

Bim = Bcl-2 interacting mediator of cell death

BIR = Baculovirus-IAP-repeat

Bmf = Bcl-2 modifying factor

Bok = Bcl-2-related ovarian killer protein

bzw. = beziehungsweise

Caspase = Cysteinyll aspartic acid protease

CBF = Core-binding-Faktor

cDNA =komplementäre DNA

CD95/FasL = CD95/FasLigand

CDK = cyclin-dependent kinase; Zyklin abhängige Kinase

CEBPA = CCAAT/enhancer-binding protein alpha

CIAP 1/2 = cellular inhibitor of apoptosis 1/2

CR = komplette Remission

CT-Wert = Cycle Threshold-Wert

DFS = disease free survival (krankheitsfreies Überleben)

DISC = Death inducing signaling complex

DNA = Desoxyribonukleinsäure

DNMT = DNA-Methyltransferase-Inhibitor

4EB-P1 = eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1

ED = Erstdiagnose

EDTA = Ethylendiamin-tetraacetat Säure

eIF4E = eukaryotic initiation factor 4E

ERG = Ets Related Gene

ETO = Eight Twenty One

FAB = French American British

FADD = Fas associated death domain

FISH = Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

FLIP = Fas linked inhibitor protein

FLT3 = FMS-like tyrosine kinase 3

FRAP1 = FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1

γ GT = gamma-glutamyl-transpeptidase

GIMEMA/EORTC = Italian Group for Adult Hematologic Diseases /European Organisation for Research and Treatment of Cancer

GSK3 = Glycogen synthase kinase 3

GvH = Graft versus host

GvL = Graft versus leukemia

Hb = Hämoglobin

HDAC = Histondeazetylase

HDM2 = human double minute 2

HIF1A = hypoxia inducible factor 1

HLA = Histokompatibilitätsantigen

Hrk = Activator of apoptosis harakiri

IAP = inhibitor of apoptosis protein

ITD = interne Tandemduplication

Itm2b = integral membrane protein 2b

5-JÜR = 5-Jahresüberlebensrate

KM = Knochenmark

LDH = Laktatdehydrogenase

LOH = Loss of heterozygotie

Mcl-1= myeloid cell leukemia-1

MDM2 = Murine Double Minute chromosome clone number 2

MDS = Myelodysplastisches Syndrom

MEFs = mouse embryonic fibroblasts

MLL-PTD = mixed lineage leukemia-partial tandem duplication

mLST8/Gbl = mammalian LST8/G-protein β -subunit like protein

MN1 = meningioma (disrupted in balanced translocation) 1

MRC = UK Medical Research Council

mRNA = Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)

mSIN1 = mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1

mTORC = mTOR Komplex

mut = mutiert

MYH11 = Smooth-muscle-myosin-heavy-chain 11

Nbk = natural born killer

NcoR = nukleärer Korepressor

NfκB = Nukleärer Faktor κ B (Nuclear Factor of Immunoglobulin κ locus in B cells / Nuclear Factor κ B)

Nix = BCL2/Adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like (BNIP3L)

NK-AML = AML mit normalem Karyotyp

NK-Zellen = Natürliche Killerzellen

NPM1 = Nucleophosmin 1

NSCLC = Non small cell lung cancer

ODN = Oligodesoxynukleotide

OS = overall survival (Gesamtüberleben)

PAS-Reaktion = Periodic acid-Schiff- Reaktion

PCR = Polymerasekettenreaktion

PKC1/2 = Phosphoinositide-dependend protein kinase 1/2

PI3K = Phosphatidylinositol-3-kinase

PIP3 = Phosphatidylinositole

PKCα = protein kinase C α

PML = Promyelocytic leukemia

pRb = product of the retinoblastoma tumor suppressor gene

PTEN = Phosphatase and Tensin homolog deleted from chromosome ten

Puma = p53 upregulated modulator of apoptosis

p70S6K = p70 ribosomal S6 kinase 1

Raptor = regulatory associated protein of mTOR

RARA = Retinoic acid receptor alpha

Rheb = Ras-homolog enriched in brain

Rictor = rapamycin-insensitive companion of mTOR

RNA = Ribonukleinsäure

ROX = 6-Carboxy-X-rhodamin

RT-PCR = Real-time (Echtzeit-) Polymerasekettenreaktion

SCLC = small cell lung cancer

SGK1 = serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1

Spike = small protein with inherent killing effect

SSCP = Single-strand conformation polymorphism

SWOG = US South West Oncology Group

SZT = Stammzelltransplantation

Taq = *Thermus aquaticus*

TKD = Tyrosinkinasedomäne

TNF alpha = Tumor Nekrose Faktor alpha

TRAIL = TNF-related apoptosis inducing ligand

TSC = Tuberous sclerosis complex

TSC1 = Hamartin

TSC2 = Tuberin

u.a. = unter anderem

v.a. = vor allem

WHO = world health organization

wt = Wildtyp

WT1 = wilms tumor 1

XIAP = X-linked IAP

z.B. = zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Akute myeloische Leukämie

1.1.1 Definition

Bei den akuten myeloischen Leukämien (AML) handelt es sich um heterogene, maligne Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, denen die maligne Transformation einer hämatopoetischen Stamm- oder Progenitorzelle durch erworbene somatische Mutationen zugrunde liegt (Dash und Gilliland 2001; Fröhling et al. 2005). Folge dieser leukämischen Transformation ist der Verlust bzw. die Einschränkung des Differenzierungspotenzials, sowie der normalen Proliferations- und Apoptoseregulation des Zellklons in einem frühen Stadium der Myelopoese. Durch die unkontrollierte klonale Expansion der myeloischen Blasten kommt es zur sukzessiven Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark mit Anämie, hämorrhagischer Diathese und Immundefizienz sowie Organinfiltration. Unbehandelt führt die Erkrankung innerhalb eines Jahres nach Diagnosestellung zum Tod (Estey und Döhner 2006).

1.1.2 Epidemiologie

Die AML macht etwa 75-80% aller akuten Leukämien des Erwachsenenalters aus (Schaich und Ehninger 2006) und zeigt eine Häufigkeit von 3% aller malignen Erkrankungen. Im Alter von 30-40 Jahren ist sie die häufigste tödlich verlaufende Neoplasie (Berger et al. 2010). Ihre Inzidenz ist alters- und geschlechtsspezifisch. So steigt sie von jährlich 2-3/100000 Einwohner in der Alterklasse bis 45 Jahren auf jährlich 15/100000 Einwohner in der Altersgruppe über 70 Jahre. Das Verhältnis Männer zu Frauen beträgt 1,4:1 (Schaich und Ehninger 2006). Das Durchschnittsalter der Patienten mit einer AML-Erstdiagnose wird in der Literatur zwischen 63 und 70 Jahren angegeben (Schaich und Ehninger 2006; Estey und Döhner 2006).

1.1.3 Ätiologie

Die Ursachen für die Entstehung einer AML sind bei den meisten Patienten unklar. Nur bei etwa 10% finden sich Hinweise auf Risikofaktoren in der Krankengeschichte (Schaich und Ehninger 2006). Zu den gesicherten leukämogenen Faktoren zählen ionisierende Strahlung, Benzol und bestimmte antineoplastische Chemotherapeutika. Die Inzidenz von therapieassoziiert AML steigt aufgrund des zunehmend erfolgreichen Einsatzes von Chemo- und/oder Strahlentherapien anderer Neoplasien und der damit verbundenen Zunahme des Patientenalters (Leone et al. 1999). Ein eindeutiger kausaler Zusammenhang konnte bisher für alkylierende Substanzen und Topoisomerase-II-Inhibitoren gezeigt werden (Fonatsch et al. 2003). Auch für Raucher wurde

eine Erhöhung des Leukämierisikos demonstriert (Severson et al. 1990; Thomas und Chelghoum 2004). Weiterhin scheint es ein genetisch erhöhtes Leukämierisiko zu geben. So ist die Erkrankungswahrscheinlichkeit bei Patienten mit genetisch bedingten Erkrankungen wie der Trisomie 21 (20fach erhöht), der Fanconi-Anämie, Li-Fraumeni-Syndrom und dem Bloom-Syndrom deutlich erhöht. Bei einigen Patienten entwickelt sich eine AML aus einem Myelodysplastischen Syndrom (MDS) oder einer Polyzythämia vera (Senn et al. 2001; Berger et al. 2010).

1.1.4 Normale Hämatopoese und Leukämogenese

Die normale Hämatopoese eines Erwachsenen ist ein streng kontrolliertes Zellsystem mit ständiger Regeneration mittels Zellteilung und Differenzierung aus wenigen hämatopoetischen Stammzellen. Ihr Anteil beträgt gerade mal 0,1% aller kernhaltigen Zellen im Knochenmark. Die hämatopoetische Stammzelle besitzt die Fähigkeit sich selbst zu duplizieren und pluripotent zu bleiben oder sich zu unreifen Progenitorzellen weiterzuentwickeln. Dabei hängt es von der Anwesenheit bestimmter Zytokine und Wachstumsfaktoren ab, ob eine gemeinsame myeloische Progenitorzelle, aus der die Zellen der myeloischen Reihe sowie die Progenitorzellen für Megakaryozyten und Erythrozyten hervorgehen, oder eine gemeinsame lymphatische Progenitorzelle, die sich zu B-, T- oder NK- (natural killer-) Zellen weiterdifferenzieren kann, entsteht. Für die weitere Differenzierung zu Vorläuferzellen und schließlich zu reifen Blutzellen ist die über Transkriptionsfaktoren regulierte Expression zellreihenspezifischer Gene von größter Bedeutung. Man geht heute davon aus, dass die Entwicklung einer Leukämie ein mehrstufiger Prozess ist, bei der es erst bei dem Aufeinandertreffen zweier genetischer Läsionen („Two-hit Modell“) wie der Aktivierung von Onkogenen und der Inhibierung von Tumorsuppressorgenen innerhalb einer Vorläuferzelle zur leukämogenen Transformation kommt (Dash und Gilliland 2001; Fröhling et al. 2005). Dabei scheinen vor allem zwei Gruppen von Mutationen eine entscheidende Rolle zu spielen: Alterationen von Transkriptionsfaktoren und Alterationen in der Signaltransduktion (siehe Abb.1.1).

Alterationen von Transkriptionsfaktoren:

Die meisten AML typischen chromosomalen Aberrationen führen zu Fusionsgenen, welche wichtige Transkriptionsfaktoren für die myeloische Differenzierung enthalten. Durch die entstehenden Fusionsproteine wird die normale Funktion der Transkriptionsfaktoren gestört, was zu einem Differenzierungsstop in einem frühen Stadium der Myelopoese führt (Steffen et al. 2005; Renneville et al. 2008).

Alterationen in der Signaltransduktion:

Die Regulation von Proliferation und Zellüberleben der hämatopoetischen Vorläuferzellen erfolgt über Wachstumsfaktorrezeptoren und intrazelluläre Signalwege, welche durch zwei Klassen von Mutationen gestört werden können. Zum einen verursachen aktivierende Mutationen in Genen, die an der Regulation der Zellproliferation beteiligt sind, eine unkontrollierte Zellvermehrung, zum anderen können Mutationen, die Gene für die Regulation des Zellüberlebens betreffen, zum Verlust der normalen Zellzyklus- und Apoptosekontrolle führen (Renneville et al. 2008).

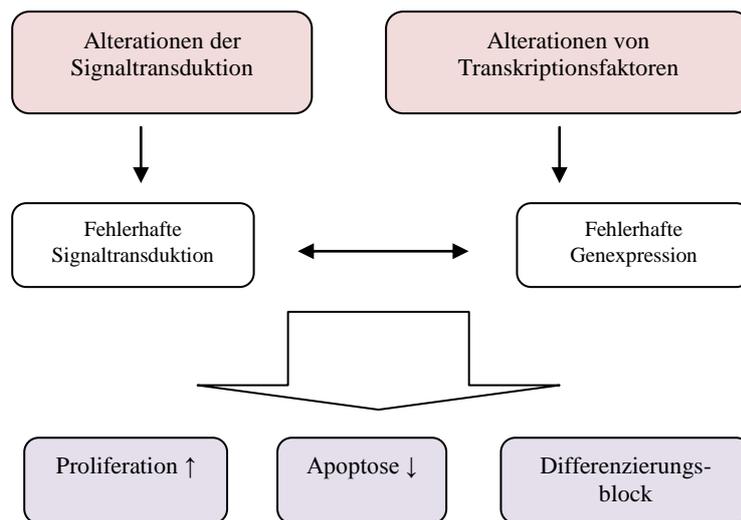


Abb.1.1: Leukämogenese. In Anlehnung an Steffen et al. (2005). Vermehrte Proliferation, verminderte Apoptoserate und gehemmte Zelldifferenzierung als Folge einer veränderten Signaltransduktion und deregulierten Genexpression bei AML. Es bestehen vielfältige komplexe Interaktionen innerhalb der aberranten Signalwege und zwischen Onkogenen, die bisher noch nicht im Detail verstanden sind.

Weiterhin scheinen auch epigenetische Faktoren wie DNA-Hypermethylierung oder Histon-Deacetylierung von Zielgenen chimärer Transkriptionsfaktoren eine Rolle in der Leukämogenese zu spielen, indem sie Einfluss auf die Genexpression nehmen (Haferlach et al. 2008).

1.1.5 Zytogenetische Veränderungen bei AML

Die zytogenetische Analyse der malignen Zellen ist ein etablierter Bestandteil in der heutigen Leukämiediagnostik und dient der Unterteilung in zytogenetische Subgruppen, die von hohem klinischem Interesse für die Prognoseeinschätzung und das Therapieansprechen sind (Hiddemann et al. 2005). Dabei können zwei Hauptgruppen unterschieden werden: Eine Gruppe mit zytogenetischen Aberrationen, die ca. 52% aller de novo AML ausmacht, und eine zweite Gruppe ohne nachweisbare Anomalien im Karyotyp (Hiddemann et al. 2005).

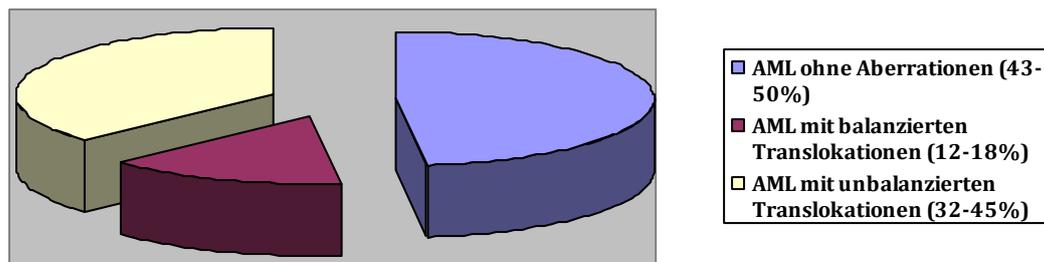


Abb.1.2: Einteilung der AML anhand zytogenetischer Charakteristika auf drei Hauptgruppen.

1.1.5.1 AML mit aberrantem Karyotyp

Diese Gruppe wird weiter in zwei Subgruppen unterteilt. Zum einen sind das AML mit balancierten Aberrationen, die hauptsächlich aus $t(8;21)$; $t(15;17)$ und $inv(16)$ bestehen, zum anderen AML mit unbalancierten Aberrationen wie $5q-$, $7q-$, -5 , -7 , sowie komplex aberrantem Karyotyp (Hiddemann et al. 2005; Fonatsch et al. 2003) (siehe auch Abb. 1.2). Als komplex aberranter Karyotyp wird das Vorhandensein von mindestens drei erworbenen chromosomalen Aberrationen in der Abwesenheit von balancierten Translokationen definiert (Döhner u. Döhner 2008). Die Subgruppe mit balancierten Aberrationen hat eine gute Prognose mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 60-70%. Dahingegen überleben nur 10-20% der Patienten, deren Karyotyp unbalancierte oder komplexe Aberrationen aufweist 5 Jahre (Berger et al. 2010).

1.1.5.1.1 AML mit balancierten Translokationen

Sowohl bei der $t(8;21)$ als auch bei der $inv(16)$ bzw. der $t(16;16)$ entstehen Fusionsgene, die den Aufbau und die Funktion des Core-binding-Faktor (CBF) behindern. Der CBF ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der bei der Aktivierung der Transkription vieler Gene, die bei der Hämatopoese eine Rolle spielen, von Bedeutung ist. Er besteht aus zwei Untereinheiten, CBFalpha (Acute myeloid leukemia1 (AML1)) und CBFbeta (Fonatsch et al. 2003; Mrózek und Bloomfield 2008; Steffen et al. 2005). Bei der $t(8;21)$, die in 90% mit der AML M2 assoziiert ist, fusioniert das AML1-Gen mit dem ETO- (Eight Twenty One-)Gen. Bei der $inv(16)$, die vor allem bei der AML M4Eo beobachtet wird, fusioniert das CBFbeta-Gen mit dem MYH11- (Smooth-muscle-myosin-heavy-chain-) Gen (Dash und Gilliland 2001; Fonatsch et al. 2003). Die entstehenden Fusionsproteine agieren als dominante Inhibitoren der Transkription und somit der normalen hämatopoetischen Differenzierung. Die $t(15;17)$ führt zur Fusion des RARA- (Retinoic acid receptor alpha-) Gens mit dem PML- (Promyelocytic leukemia-) Gen und ist gleichbedeutend mit der Diagnose einer AML M3 (akute Promyelozytenleukämie, APL). Das PML-RARA-Fusionsprotein bildet einen Komplex mit dem nukleären Korepressor (NcoR) und

der Histondeacetylase (HDAC) und unterdrückt somit die Transkription von RARA-Zielgenen, was einen zellulären Reifungsblock auf der Stufe der Promyelozyten zur Folge hat. Erst bei pharmakologischen Konzentrationen von all-trans Retinsäure (ATRA) wird die Bindung von PML-RARA an die Promotorregion gelöst und eine Ausdifferenzierung der promyeloischen Blasten erreicht. Die APL ist damit eine der wenigen neoplastischen Erkrankungen, die mit einem Therapeutikum, das direkt gegen den kausalen genetischen Defekt gerichtet ist, erfolgreich behandelt werden kann (Fenaux et al. 1992; Tallman et al. 1997).

Als weitere rekurrente genetische Anomalien finden sich bei AML die balancierten Translokation t(9;11), t(6;9), t(3;3) und t(1;22).

1.1.5.2 AML mit normalem Karyotyp

48% der Patienten weisen bei der zytogenetischen Diagnostik keine Aberrationen im Karyotyp auf. Sie werden der Gruppe mit intermediärer Prognose mit einer 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit von 35-45% zugeordnet (Berger et al. 2010). Molekulargenetische Analysen haben gezeigt, dass ein Grossteil dieser Patienten rekurrente Mutationen in Genen aufweist, die zu Alterationen im Ablauf der intrazellulären Signalkaskaden führen. Diese molekularen Genmutationen sind einerseits von prognostischer Relevanz und stellen andererseits mögliche Angriffspunkte für zukünftige Therapeutika dar (Döhner und Döhner 2008; Haferlach et al. 2008).

1.1.6 Molekulargenetische Veränderungen bei AML

Im letzten Jahrzehnt konnten somatisch erworbene Mutationen in mehreren Genen bei mehr als der Hälfte der Patienten mit zytogenetisch normalem Karyotyp gefunden werden. Aber auch bei Patienten mit aberrantem Karyotyp werden einige dieser molekularen Mutationen nachgewiesen (Döhner und Döhner 2008). Die größte Inzidenz weist die Nucleophosmin 1- (NPM1-) Mutation auf. Sie wird bei 55% der Patienten mit normalem Karyotyp bzw. 35% aller AML-Patienten nachgewiesen. Das NPM1-Gen liegt auf Chromosom 5q35 und enthält 12 Exons. Dabei handelt es sich um ein nukleäres Schuttelprotein, welches bei der Ribosombiosynthese eine Schlüsselrolle spielt, indem es den Transport von preribosomalen Partikeln aus dem Nukleus ins Zytoplasma steuert. Im Zytoplasma bindet NPM1 zudem an das unduplizierte Zentrosom und reguliert die Chromosomenverdopplung während der Zellteilung, wodurch es eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des Genoms hat. Im Gegensatz zu diesen wachstumsfördernden Eigenschaften stellt NPM1 zudem die Aktivität bzw. Integrität von Tumorsuppressoren wie p53 und ARF sicher (Falini et al. 2007; Grisendi et al. 2006). NPM1 scheint daher in Abhängigkeit

vom Expressionsniveau, Interaktionspartnern und Kompartimentierung zugleich tumorsuppressive als auch onkogene Eigenschaften zu besitzen. Tritt die Mutation allein auf, wird sie als prognostisch günstig eingeschätzt.

Eine andere häufige molekulare Genmutation ist die interne Tandemduplikation von FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3-ITD), welche zu einer konstitutiven Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase und somit der nachgeschalteten Signalwege führt, was eine erhöhte Zellproliferationsrate zum Resultat hat. Sie tritt bei ca. 25%-35% (Haferlach et al. 2008) der Patienten mit AML bzw. bei 28-34% der Patienten mit normalem Karyotyp (Döhner u. Döhner 2008) auf und bedeutet eine eher ungünstige Prognose. Auch andere Genmutationen wie „mixed lineage leukemia-partial tandem duplication“ (MLL-PTD), „CCAAT/enhancer-binding protein alpha“ (CEBPA), Wilmstumor 1 (WT1), „Brain and Acute Leukemia, Cytoplasmic“ (BAALC), „Ets Related Gene“ (ERG) oder „meningioma (disrupted in balanced translocation) 1“ (MN1) werden häufig bei AML nachgewiesen (Berger et al. 2010).

1.1.7 Klassifikation

Grundlage der Diagnosestellung der AML ist die zytomorphologische Beurteilung von Blut- und Knochenmarkausstrichen in der Pappenheimfärbung in Kombination mit zytochemischen Analysen (Peroxidase, Esterase, PAS-Reaktion) nach der French-American-British-(FAB)-Klassifikation, welche bereits 1976 eingeführt und seitdem ständig erweitert wurde.

1.1.7.1 FAB-Klassifikation

Nach den Kriterien der FAB-Klassifikation liegt eine AML dann vor, wenn mindestens 30% aller kernhaltigen oder nicht erythropoetischen Zellen im Knochenmark Blasten sind und mindestens 3% der Blasten positiv auf Peroxidase reagieren. Auf dem Boden der Zytomorphologie und Zytochemie werden anhand der Blastzellcharakteristika acht AML-Subtypen unterschieden: M0-M3 (myeloisch, vier unterschiedliche Reifestadien), M4-M5 (monozytär), M6 (erythrozytär) und M7 (megakaryozytär) (siehe Tab.1.1).

Tab.1.1: FAB-Klassifikation der AML (Pieper 2007).

FAB-Subtyp		Häufigkeit
M0	Akute undifferenzierte Leukämie	3%
M1	AML ohne Ausreifung	15-20%
M2	AML mit Ausreifung	25-30%
M3	Akute Promyelozytenleukämie (APL)	10-15%
M3v	Variante mikrogranulozytäre APL	(M3+M3v)
M4	Akute myelomonozytäre AML	20-30%
M4Eo	Akute myelomonozytäre AML mit Eosinophilie	(M4+M4Eo)
M5	Akute monozytäre Leukämie	2-9%
	a) differenziert	
	b) undifferenziert	
M6	Akute Erythroleukämie	3-5%
M7	Akute megakaryozytäre Leukämie	3-5%

1.1.7.2 World Health Organization- (WHO-) Klassifikation

Aufgrund des zunehmenden Wissens um die Biologie der AML und der Identifikation rekurrenter Chromosomenaberrationen hat die WHO 1999 eine erweiterte Klassifikation vorgeschlagen, in der die bis dato verwendeten Methoden der Zytomorphologie, Zytochemie und Immunphänotypisierung mit zyto- und molekulargenetischen Befunden kombiniert werden. Dabei behält die WHO-Klassifikation im wesentlichen die FAB-Subtypen bei. Zusätzlich werden Patienten mit AML definierenden zytogenetischen Aberrationen wie t(8;21), t(15;17), inv(16) in einer eigenen Gruppe zusammengefasst und gelten ungeachtet ihres Blastenanteils im Knochenmark als AML-Patienten. Weiterhin werden die therapieassoziierte AML und die AML mit multilineärer Dysplasie aufgrund ihrer ungünstigen Prognosen in eigenen Gruppen geführt. Schließlich wird der AML definierende Blastenanteil im Knochenmarksausstrich von 30% auf 20% reduziert. In der neuesten Version von 2008 wurden u.a. zudem neue Erkenntnisse aus der Molekulargenetik integriert. So wurde die AML mit mutiertem NPM1 oder mutiertem CEBPA als provisorische Entität eingeführt (Vardiman et al. 2009).

Tab.1.2: WHO-Klassifikation der AML, aktualisiert 2008 (Vardiman et al. 2009).

AML mit rekurrenten zytogenetischen Aberrationen	<ul style="list-style-type: none"> • t(8;21)(q22;q22); AML /ETO (FAB M2) • APL mit t(15 ;17)(q22;q12); PML/RARa (FAB M3V) und Varianten
<i>Unabhängig von Blastenzahl im Blut oder KM</i>	<ul style="list-style-type: none"> • inv(16)(p13.1;q22) oder t(16 ;16)(p13.1;q22); CBFbeta/MYH11 (FAB M4Eo)
<i>Bei allen anderen AML-Subtypen: ≥ 20% Blasten im Blut oder KM für Diagnose notwendig</i>	<ul style="list-style-type: none"> • t(9;11)(p22;q23), MLLT3-MLL oder andere 11q23 (MLL)-Anomalien • t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214 • inv(3)(q21;q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EV11 • t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1 • <i>Provisorische Entitäten:</i> <ul style="list-style-type: none"> - AML mit mutiertem NPM1 - AML mit mutiertem CEBPA
AML mit myelodysplasie verwandten Veränderungen	<ul style="list-style-type: none"> • vorangegangenes myelodysplastisches Syndrom (MDS) • ohne vorangegangenes MDS
AML, therapieinduziert	<ul style="list-style-type: none"> • Alkylantien assoziiert • Topoisomerase-II-Inhibitor assoziiert • Andere Typen
AML ohne weitere Kategorie	<ul style="list-style-type: none"> • Minimal differenzierte AML (FAB M0) • AML ohne Ausreifung (FAB M1) • AML mit Ausreifung (FAB M2) • Akute myelomonozytäre Leukämie (FAB M4) • Akute monoblastische und monozytäre Leukämie (FAB M5a und 5b) • Akute erythroide Leukämie (FAB M6) • Akute megakaryozytäre Leukämie (FAB M7) • Akute Basophilenleukämie • Akute Panmyelose mit Myelofibrose • Myelosarkom/Chlorom • Myeloische Proliferation bei Down-Syndrom • Blastische plasmazytoide dendritische Zell-Neoplasien

1.1.8 Symptome und Diagnostik

Das klinische Bild der AML ist unspezifisch und in erster Linie geprägt durch die Folgen der hämatopoetischen Insuffizienz und der Organinfiltration. Die Patienten leiden an Müdigkeit, Belastungsdyspnoe, Blässe und allgemeiner Schwäche aufgrund der Anämie (Löwenberg et al. 1999; Schaich und Ehninger 2006). Eine Thrombozytopenie führt zu Ekchymosen, Petechien, Nasen- und Zahnfleischbluten. Bei der PML kann aber auch eine schwere Koagulopathie infolge einer disseminierten intravasalen Gerinnung und Hyperfibrinolyse auftreten, die vor der Ära der ATRA-Therapie zu schwersten Blutungen und bei 10% der Patienten zum Tod geführt hat (Fonatsch et al. 2003). Weiterhin weisen die Patienten häufig pyogenes Fieber aufgrund der Granulopenie auf und sind bei Diagnose bereits immunkompromittiert, was häufige Infekte insbesondere der Lunge, des Rachens und der Haut zur Folge hat (Schaich und Ehninger 2006).

In einem Drittel der Fälle werden leichte Milz- und Leberschwellungen beobachtet, wohingegen Lymphknotenschwellungen nur bei der monozytären Variante vorkommen (Piper et al. 2007). Organinfiltrationen, sog. Chlorome, betreffen hauptsächlich Wirbelkörper, stammnahe Knochen, Haut und Lymphknoten (Senn et al. 2001), sowie Gingiva und das zentrale Nervensystem (Löwenberg et al. 1999). Bei einer Hyperleukozytose von $>100.000/\mu\text{l}$ besteht die Gefahr leukostatischer Komplikationen wie Hypoxie, pulmonaler Verschattungen, retinaler Einblutungen und neurologischer Dysfunktionen sowie arterieller Verschlüsse (Schaich und Ehninger 2006; Löwenber et al. 1999).

Für die primäre Diagnosestellung wird lichtmikroskopisch die Zytomorphologie anhand von Blut- und Knochenmarkausstrichen in der Pappenheimfärbung beurteilt, wobei das Auftreten von Auer-Stäbchen im Zytoplasma typisch für die Zugehörigkeit zur myeloischen Zellreihe ist. Zusätzlich lassen sich durch zytochemische Analysen bestehend aus Esterase- und Peroxidase-Färbung Aussagen über den Subtyp machen (Löwenberg et al. 1999). Unabhängig vom Differentialblutbild ist eine Knochenmarkpunktion obligat, bei der Knochenmarksblut sowohl für die zytologische und flow-zytometrische Diagnostik (EDTA-Blut) als auch für die zytogenetische und molekularbiologische Diagnostik (Heparin-Blut) entnommen wird. Im peripheren Blutbild werden meist quantitative Veränderungen aller Blutzellreihen wie Thrombozytopenie, (normozytäre) Anämie, Leukozytose/Leukopenie oder Blasten gefunden.

1.1.9 Prognose

Der Krankheitsverlauf einer AML ist extrem heterogen. Er variiert zwischen einer Überlebenszeit von nur wenigen Tagen und Heilung. Es existieren verschiedene klinische und biologische Marker bei Diagnosestellung, mit deren Hilfe der einzelne Patient in eine prognostische Gruppe eingeordnet werden kann. Da in den meisten Fällen mit der Induktionstherapie so schnell wie möglich nach Diagnosestellung begonnen werden sollte, spielen prognostische Marker bei der Therapieentscheidung der Induktion zunächst keine Rolle. Eine Ausnahme stellt die Promyelozytenleukämie AML M3 dar, bei der Morphologie, Immunphänotyp und Molekularbiologie eine schnelle Diagnose und somit den Einsatz einer spezifischen Therapie mit All-trans Retinsäure erlauben. Prognostischen Marker sind daher vor allem von Interesse, um die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs abschätzen zu können und je nach Risikoprofil die weitere Therapieintensität anzupassen.

1.1.9.1 Allgemeine Prognosefaktoren

Zu den allgemeinen ungünstigen Prognosefaktoren gehören Alter über 60 Jahre, Leukozytenzahl über 100.000/ μ l, sekundäre AML, schlechter Allgemeinzustand und eine erhöhte Laktatdehydrogenase (LDH) (Berger et al. 2010).

1.1.9.2 Zytogenetische Prognosegruppen

Von besonderer Bedeutung für die Prognoseeinschätzung ist das Ergebnis der zytogenetischen Diagnostik bei Diagnose, welche mit der 5-Jahresüberlebensrate korreliert ist. Es werden drei zytogenetische Prognosegruppen unterschieden. Die meisten Studiengruppen stimmen darin überein, dass AML mit t(15;17), t(8;21) oder inv(16) einen günstigen Krankheitsverlauf aufweisen. Auch AML mit normalem Karyotyp werden übereinstimmend in die prognostisch intermediäre Gruppe eingeordnet. AML mit komplex aberrantem Karyotyp stellen in allen Auswertungen die prognostisch ungünstigste Gruppe dar. Unklarer ist die Einteilung der anderen zytogenetischen Veränderungen, bei denen die Datenlage wegen geringer Fallzahlen nicht ausreicht, um eine abschließende prognostische Einordnung vornehmen zu können. So existieren mehrere Klassifikationssysteme, die sich nur teilweise voneinander unterscheiden (Ferrara et al. 2008). In Tabelle 1.3 sind exemplarisch zwei Klassifikationssysteme, wie sie von der UK Medical Research Council (MRC) und der US South West Oncology Group (SWOG) vorgeschlagen wurden, sowie ein etwas einfacheres Klassifizierungssystem der European GIMEMA/EORTC Cooperativ Group zusammengefasst dargestellt.

Tab.1.3: Klassifikationssysteme verschiedener Studiengruppen auf Basis der Zytogenetik (Ferrara et al. 2008).

Risikogruppe	UK MRC	US intergroup	GIMEMA/EORTC
günstig	inv16/t(16;16)/del(16q), t(15;17), t(8;21) with/without secondary abnormalities	inv16/t(16;16)/del(16q), t(15;17) with/without secondary abnormalities; t(8;21) lacking del(9q) or komplex karyotyp	t(8;21), inv(16), t(15;17)
intermediär	Normal, 11q21 abn, 18, del(9q), del(7q), +21, +22, all others	Normal, +8, +6, -Y, del(12p)	Normal or -Y only
ungünstig	del(5q)/25, 27, abn (3q), complex karyotyp (5 or more unrelated abnormalities), t(9;22), t(6;9)	del(5q)/-5, -7/del(7q), abn 3q, 9q, 11q, 20q, 21q, 17p, t(6;9), t(9;22) and komplex karyotypes (3 or more unrelated abnormalities)	All others
unbekannt	-	All other abnormalities	-

UK MTC= United Kingdom Medical Research Council; GIMEMA/EORTC= Italian Group for Adult Hematologic Diseases /European Organisation for Research and Treatment of Cancer.

1.1.9.3 Molekulargenetische Prognosefaktoren

Ein Großteil der Patienten, die der intermediären Prognosegruppe zugeordnet werden, weisen in der Zytogenetik einen normalen Karyotyp auf. Um der Heterogenität dieser Gruppe gerecht zu werden, ist man bemüht durch den Nachweis molekulargenetischer Aberrationen prognostische Subgruppen zu definieren. Dabei spielt nicht nur das Vorhandensein bestimmter Aberrationen, sondern auch deren Kombination eine entscheidende Rolle für die Prognoseeinschätzung. So haben mehrere große Studien an Patienten mit normalem Karyotyp gezeigt, dass NPM1-Mutationen nur dann einen positiven Effekt auf das Gesamtüberleben (OS) und rezidivfreie Überleben haben, wenn die Patienten gleichzeitig FLT3-ITD negativ waren (Döhner et al. 2005; Thiede et al. 2006). Bei 40% der NPM1 positiven Patienten findet sich eine assoziierte FLT3-ITD-Mutation (Thiede et al. 2006; Döhner und Döhner 2008). Weiterhin fanden sich in zahlreichen Studien Hinweise darauf, dass FLT3-ITD positive Patienten eine signifikant schlechtere Prognose im Vergleich zu nicht mutierten AML-Patienten haben (Yanada et al. 2007; Fröhling et al. 2002; Schnittger et al. 2002). Hingegen wird der prognostische Einfluss einer Mutation der FLT3-Tyrosinkinasedomäne (FLT3-TKD) bisher noch kontrovers diskutiert (Whitman et al. 2008; Mead et al. 2007). Als weiterer relevanter molekulargenetische Marker wurde zudem CEBPA identifiziert, welches bei Vorliegen einer Mutation als prognostisch günstig eingeschätzt wird (Preudhomme et al. 2002).

1.1.10 Therapie

Die systemische Therapie in kurativer Intention gliedert sich in zwei Phasen: Induktionstherapie und Konsolidierung. In manchen Studienprotokollen, wie z.B. der AMLCG-2000 Studie, ist zusätzlich die Durchführung einer mehrjährigen Erhaltungstherapie in einem der Vergleichskollektive vorgesehen. Folge der intravenösen Chemotherapie ist eine Knochenmarkaplasie mit schwerer, teilweise lang andauernder Neutropenie. Trotz Breitbandantibiose erkranken viele Patienten an Infektionen, die bei ca. 5% der unter 60 Jährigen und bei 15% der über 60 Jährigen tödlich sind (Fonatsch et al. 2003).

1.1.10.1 Induktionstherapie

Ziel der Induktionstherapie ist es den malignen Klon mittels Chemotherapie soweit zu reduzieren, dass eine hämatologische komplette Remission (CR) erreicht wird. Dies bedeutet ein normozelluläres Knochenmark mit einem Blastenanteil von <5%, sowie eine Normalisierung des peripheren Blutbildes mit <1% Blastenanteil (Berger et al. 2010). Als Standard gilt eine Doppelinduktionstherapie mit zwei Zyklen einer Kombination aus Cytosin-Arabinosid (AraC)

und einem Anthrazyklin. Die deutsche AML-Intergroup benutzt beispielsweise die Kombination aus AraC 100mg/m²/Tag über sieben Tage als Dauerinfusion und Daunorubicin 60mg/m²/Tag über drei Tage bei Patienten unter 60 Jahren. Dieses „7+3-Schema“ dient als gemeinsamer Standardarm für den Vergleich mehrerer Therapiestudien (DGHO 2012).

1.1.10.2 Konsolidierungs- oder Postremissionstherapie

Da aufgrund der residuellen Leukämiezellen nach alleiniger Induktionstherapie fast alle Patienten rezidivieren würden, ist nach Erreichen der ersten CR die Durchführung einer Konsolidierungstherapie notwendig, um eine Heilung zu ermöglichen. Die Konsolidierung besteht aus mehreren Therapieblöcken, deren wichtigster Bestandteil nach heutiger Kenntnis Hochdosis-AraC ist. Über den optimalen Applikationszeitpunkt, die notwendige Dosierung und die Zyklenanzahl herrscht jedoch noch Unklarheit (Schaich und Ehninger 2006). Grundsätzlich wird die Konsolidierungstherapie risikoadaptiert. Niedrigrisikopatienten, wie. z.B. Patienten mit balancierten Translokationen, erhalten nur Hochdosis-AraC, während bei Standardrisikopatienten, im Falle des Vorhandenseins eines Histokompatibilitätsantigen- (HLA)-kompatiblen Familienspenders, eine allogene Stammzelltransplantation in erster CR durchgeführt werden sollte. Hochrisikopatienten sollte zusätzlich die Möglichkeit einer unverwandten allogenen Stammzelltransplantation angeboten werden (Schaich und Ehninger 2006).

1.1.10.3 Allogene Stammzelltransplantation

Nachdem der Patient mit knochenmarktoxischen Chemotherapeutika wie Cyclophosphamid, Busulfan oder Melphalan und Ganzkörperbestrahlung vorbehandelt wurde (Konditionierung), um restliche Leukämiezellen zu beseitigen und Platz im Knochenmark zu schaffen, werden ihm Blutstammzellen eines HLA-kompatiblen Spenders transplantiert. In der Blutleukozytentransfusion werden auch Spenderlymphozyten übertragen, die für den sogenannten Graft-versus-Leukämie- (GvL-) Effekt verantwortlich sind. Spenderlymphozyten haben ein hohes antileukämisches Potential und sind für die geringere Rezidivrate nach allogener im Vergleich zu autologer Stammzelltransplantation (SZT) verantwortlich (Kolb 2004). Eine der häufigsten Komplikationen der allogenen SZT ist die Graft-versus-host-(GvH)-Krankheit. Sie wird durch eine Immunreaktion des Transplantats gegen fremde Histokompatibilitätsantigene des Empfängers verursacht und betrifft meist Haut, Leber und Darm. Zur Prophylaxe wird der Patient nach Transplantation mit Immunsuppressiva behandelt. Dennoch tritt bei 30-50% der

HLA-identisch Transplantierten eine behandlungsbedürftige GvH-Krankheit auf, die bei 10-20% lebensbedrohlich ist (Kolb 2004).

1.1.10.4 Therapie der Promyelozytenleukämie (AML M3)

Eine therapeutische Ausnahme stellt die akute Promyelozytenleukämie dar, bei der eine kausale Therapie zur Verfügung steht. Mit der Kombination aus ATRA und einem Anthrazyklin werden Remissionsraten nach Induktionstherapie von 87-95% erreicht (Sanz 2006). Daran schließen sich üblicherweise zwei bis drei Konsolidationszyklen erneut mit einem Anthrazyklin und ATRA sowie eine zweijährige Erhaltungstherapie mit ATRA, 6-Mercaptopurin und Methotrexat an (Sanz 2006).

1.1.10.5 Rezidivtherapie

Über 50% der Patienten < 60 Jahre und die Mehrheit der Patienten > 60 Jahre erreichen entweder keine Remission oder erleiden ein Rezidiv. Rezidierte Patienten haben eine schlechte Prognose und weisen je nach Risikoprofil eine 5-Jahresüberlebensrate zwischen 46% und 4% auf (Litzow 2007). Bis heute steht keine Standardrezidivtherapie zur Verfügung. Wenn möglich sollte die Option einer allogenen SZT in Betracht gezogen werden. Allerdings herrscht Unklarheit über den optimalen Zeitpunkt (Mato et al. 2008). Bei Patienten, die keine Kandidaten für eine SZT sind und deren Remissionszeit länger als 1-2 Jahre betragen hat, wird häufig auf die zuvor erfolgreich angewandte Induktionstherapie zurückgegriffen (Litzow 2007). Im Einzelfall muss aber nach Evaluation vieler Faktoren wie Alter, Zytogenetik bei Diagnose, Dauer der ersten kompletten Remission, bereits erhaltene Therapiezyklen, Krankheitslast, Komorbiditäten usw. eine individuelle Therapieentscheidung gefällt werden (Mato et al. 2008). In mehreren Studien werden neue Chemotherapeutika, Immuntherapeutika, „epigenetic agents“, „small molecular inhibitors“, myeloablative und nicht-myeloablative allogene SZT sowie autologe SZT getestet und verglichen (Litzow 2007; Mato et al. 2008).

1.2 Apoptose

1.2.1 Apoptoseregulation

Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltodes, der Voraussetzung für die Evolution multizellulärer Organismen war. Denn erst durch genetisch programmierte und exakt regulierte Zelltodmechanismen wurde es möglich, gezielt Zellwachstum und Zellelimination zu induzieren. Zelltod spielt somit sowohl bei der Embryonalentwicklung und Organogenese als auch bei der Aufrechterhaltung der Homöostase adulter, ausgereifter Gewebe eine entscheidende Rolle

(Daniel 2008). Apoptose ist essentiell für die Differenzierung und Funktion hämatopoetischer und lymphatischer Zellen (Testa und Riccioni 2007).

Die für den Apoptosevorgang charakteristische Zellmorphologie setzt sich aus Kernschrumpfung, Kondensation des Chromatins im Zellkern, Fragmentierung des Zellkerns und Ausstülpung von Membranblasen (apoptotische Körperchen) infolge der Zerstörung des Zytoskeletts zusammen, wobei die Integrität der Plasmamembran erhalten bleibt, was Entzündungsreaktionen und Gewebsschädigung der benachbarten Zellen verhindert. Apoptotische Zellen und apoptotische Körperchen werden rasch durch Phagozytose professioneller Phagozyten aus dem Gewebsverband eliminiert (Daniel 2008). Es können zwei wesentliche Apoptosesignalwege unterschieden werden: Der extrinsische und der intrinsische Apoptoseweg. Gemeinsame Endstrecke beider Signalwege ist die Aktivierung sogenannter Effektorcaspasen, welche durch Proteolyse wichtiger regulatorischer und struktureller Proteine die Endphase der Apoptose einleiten (Riedl und Shi 2004; Fischer et al. 2006; Testa und Riccioni 2007).

1.2.1.1 Extrinsischer Signalweg

Der extrinsische Signalweg dient der Erkennung extrazellulärer Apoptosesignale, über die unerwünschte Zellen aus dem Gewebsverband eliminiert werden können. Er wird durch Todesliganden aktiviert, die benachbarte Zellen parakrin oder die betroffene Zelle selber autokrin sezernieren. Todesliganden, wie z.B. TNFalpha (Tumor Nekrose Faktor alpha), TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) und CD95/FasL (CD95/FasLigand), binden an entsprechende Todesrezeptoren, welche daraufhin oligomerisieren und einen stabilisierten Komplex bilden, an den spezielle Adapterproteine, wie FADD (Fas associated death domain) und schließlich die Initiatorcaspasen-8 (oder -10) binden. Die Bildung eines solchen Komplexes, bestehend aus Ligand, Rezeptor, Adapterprotein und Initiatorcaspase, der auch DISC (Death inducing signaling complex) genannt wird, ist von großer Bedeutung, da er der Kompartimentierung der Zelltodsignalwege dient und über das Prinzip der induzierten Nähe verhindert, dass eine versehentlich in die aktiven Untereinheiten gespaltene Initiatorcaspase ihre Enzymaktivität ausserhalb des Komplexes entfalten kann. Innerhalb des DISC können aktivierte Initiatorcaspasen nun die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 aktivieren. Die Bindung in den DISC und die Aktivierung von Caspase-8/-10 kann durch FLIP-Proteine (CD95/Fas linked inhibitor protein) gehemmt werden (Daniel 2008; Testa und Riccioni 2007).

1.2.1.2 Intrinsischer Signalweg und Bcl-2-Familienmitglieder

Der intrinsische Signalweg wird durch intrazellulär erzeugte Stress-Signale eingeleitet. Ursächlich dafür sind beispielsweise DNA-Schädigung, Hypoxie, Akkumulation fehlgefalteter Proteine, Wachstumsfaktorenentzug und zytotoxische Wirkstoffe wie Chemotherapeutika und Radiatio (Daniel 2008; Testa und Riccioni 2007). Die verschiedenen Stress-Signale führen auf unterschiedlichen Signalwegen zu einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch der Inhalt des Intermembranraums in das Zytosol gelangt. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Freisetzung proapoptotischer Moleküle wie Cytochrom c, was neben seiner Funktion in der Atmungskette eine wesentliche Rolle bei der Bildung und Aktivierung eines zytosolischen Signalkomplexes, des Apoptosoms, spielt. Das Apoptosom, welches das Korrelat des DISC aus dem extrinsischen Signalweg ist, wird dATP-abhängig aus einem Adapterprotein APAF-1 (apoptotic protease activating factor 1) und Cytochrom c gebildet und dient der Bindung und Aktivierung der Initiatorcaspase-9, welche schließlich die Effektorcaspasen aktiviert und somit den Apoptoseprozess irreversibel macht (Testa und Riccioni 2007; Daniel 2008). Reguliert wird der mitochondriale Apoptosesignalweg durch proapoptotische (Bax, Bak, Bad, Bid, Bim, Bmf, Noxa, Puma) und antiapoptotische (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Bfl-1, Mcl-1) Mitglieder der Bcl-2-Familie (siehe Tab. 1.4), die abhängig vom Vorhandensein einer Transmembrandomäne und ihrem Aktivierungszustand entweder als zytosolische oder membranassoziierte Proteine vorliegen. Reguliert wird das Zusammenspiel dieser komplexen Genfamilie durch spezifische Proteininteraktionen zwischen zelltodfördernden und zelltothemmenden Familienmitgliedern auf der Grundlage von evolutionär konservierten Domänen, den Bcl-2-Homologie-(BH-) Domänen (Chen et al. 2005). Fast alle antiapoptotischen Bcl-2-Proteine verfügen über vier BH-Domänen (BH1 bis BH4) und eine Transmembrandomäne. Einzige Ausnahme ist Bfl1/A1, welche nur drei BH-Domänen besitzt (BH1-BH3). Die zelltodfördernden Proteine werden aufgrund ihres unterschiedlichen Aufbaus in zwei Subgruppen unterteilt: die Gruppe der Bax-homologen Proteine, welche eine BH1, BH2 und BH3 Domäne sowie eine Transmembrandomäne tragen, und die Gruppe der BH3-only-Proteine, die ausschließlich eine BH3 Domäne besitzen (Fletcher und Huang 2006).

Tab.1.4: Anti- und proapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Genfamilie (In Anlehnung an Daniel 2008).

Antiapoptotisch		Proapoptotisch	
Bcl-2 Subfamilie	Bcl-2	Bax Subfamilie (Effektorproteine)	Bax
	Bcl-b		Bak
	Bcl-w		Bok/Mtd
	Bcl-xl	Weitere Multidomänen-Proteine	Bcl-gl
	Mcl-1		Bcl-rambo
			Bcl-xs
Bfl1/A1	Bfk		
		BH3-only Subgruppe:	Nbk/Bik
			Bmf
			Spike
			Hrk
			Bad
			Noxa
			Nix
			Itm2b
			Puma
			Bid
		Bim/Bod	

Der apoptoseregulierende Mechanismus der Bcl-2-Familienmitglieder ist noch nicht vollständig klar. Als gesichert gilt, dass Bax, Bak und vielleicht auch Bok direkt Mitochondrien aktivieren und somit die Freisetzung von Cytochrom c induzieren können, ein Vorgang der durch antiapoptotische Bcl-2 gehemmt werden kann (Daniel et al. 2003). Die Hemmung von Bax und seinen Homologen durch antiapoptotische Bcl-2-Mitglieder kann von Mitgliedern der BH3-only Familie antagonisiert werden, welche somit ihre zelltodfördernde Wirkung indirekt über die fehlende Hemmung von Bax und Bak entfalten (Chen et al. 2005; Fletcher und Huang 2006). Voraussetzung für dieses Sensitizer-Modell wäre aber eine ständige spontane Aktivität von Bax und Bak, die mittels doppelter Hemmebene (zum einen durch BH3-only-Proteine und zum anderen durch Bcl-2-Homologa) reguliert wird. Es existiert ein weiteres Modell, welches auf die Beobachtung aufbaut, dass die BH3-only-Proteine Bim, Bid und Puma direkt an Bax bzw. Bak binden können. Das sogenannte Aktivatormodell postuliert daher eine direkte Aktivierung von Bax und Bak durch die drei genannten BH3-only-Proteine (Kuwana et al. 2005), was allerdings weder im Mausmodell noch in Zellkulturmodellen bestätigt werden konnte (Daniel 2008). Die meisten Arbeitsgruppen favorisieren daher derzeit noch ein "Mischmodell" (Letai et al. 2002), in dem BH3-only-Proteine sowohl Bax und Bak aktivieren (Bim, Bid, Puma) als auch Bcl-2 und

dessen antiapoptotische Homologa sequestrieren können (alle BH3-only-Proteine (Daniel 2008; Chipuk et al. 2010)). Da BH3-only-Proteine durch sehr unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert werden, wird ein hohes Maß an Regulierbarkeit des intrinsischen Apoptosesignalweges ermöglicht.

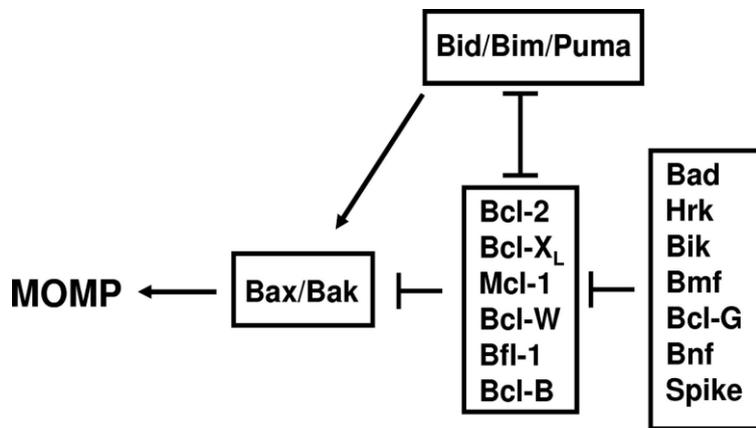


Abb. 1.3: Interaktionen der pro- und antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Genfamilie. Dargestellt ist das "Mischmodell", bei dem sowohl eine indirekte Aktivierung von Bax und Bak durch die Hemmung antiapoptotischer Proteine, als auch eine direkte Aktivierung durch Bid, Bim und Puma möglich ist (Reed 2008). MOMP (mitochondrial outer membrane permeabilization). In diesem stark vereinfachten Schema sind die spezifischen Bindungsaffinitäten zwischen BH3-only-Proteinen und Bcl-2-Homologa nicht dargestellt.

1.2.1.3 Caspaseregulation durch IAP-Proteine

IAPs (inhibitor of apoptosis protein) gehören zu den wichtigsten Regulatoren der Apoptose, da sie deren aktivierte Effektoren, die Caspasen, inhibieren. Bisher wurden beim Menschen acht IAPs identifiziert, die alle durch mindestens eine Baculovirus-IAP-repeat (BIR)-Domäne charakterisiert sind. Die IAP-Familie wird basierend auf dem Vorhandensein oder der Abwesenheit einer Ringfinger-Domäne und der Anzahl der BIR-Domänen in drei Klassen unterteilt. Mitglieder der ersten Klasse sind XIAP (X-linked IAP), cIAP1 und cIAP2. Sie haben einen Ringfinger und drei BIR-Domänen. Survivin besitzt nur eine BIR-Domäne und keinen Ringfinger und wird daher der dritten Klasse zugeteilt (Schimmer 2004), welche ihre Hauptaufgabe nicht in der Apoptose-, sondern in der Mitoseregulation zu haben scheint (Wei et al. 2008). Die IAP-Sequenz wurde erstmals 1993 im Genom von Baculoviren entdeckt als man deren Beteiligung an der Zelltodunterdrückung von Baculovirus-infizierten Zellen erkannte (Crook 1993).

1.3 Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt-kinase/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR-) Signalweg

Die PI3K/Akt/mTor-Signalkaskade ist essentiell für eine Vielzahl wichtiger physiologischer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Transkription, Translation, Proteinsynthese, Apoptose, Autophagie, Endozytose und Metabolismus und ist einer der am häufigsten fehlregulierten Signalwege in Malignomen (Engelman et al. 2006). Die physiologische Aufgabe der PI3-Kinase besteht darin, aktivierende Signale von Zelloberflächenrezeptoren in das Zellinnere zu transduzieren. Dies erreicht sie durch die Phosphorylierung von Membranphospholipiden zu Phosphatidylinositolen (PIP3), wodurch eine fokale erhöhte Plasmamembranbindung der zytosolischen PDK1 (Phosphoinositide-dependent protein kinase 1) und Akt-Kinase vermittelt wird (Daniel 2008). Akt stellt den zentralen Knotenpunkt in einem komplexen Netzwerk aus miteinander interagierenden Signalkaskaden dar (Yap et al. 2008). Für seine Aktivierung bedarf es der Phosphorylierung an den Positionen Thr308 und Ser473. Durch seine Rekrutierung an die Plasmamembran findet ein Konformationswechsel statt, der es der PDK1-Kinase ermöglicht, Akt an Position Thr308 zu phosphorylieren, während Ser473 Ziel des mTor-Komplex 2 (mTORC2) ist (Martelli et al. 2010). Aktiviertes Akt migriert in das Zytosol, zu den Mitochondrien und zum Nukleus. Bisher sind über 100 Akt Substrate identifiziert worden, von denen viele einen direkten oder indirekten Einfluss auf Zellüberleben, Proliferation und Differenzierung haben.

mTor ist eine Serin/Threonin Kinase, von der zwei Multiprotein-Komplexe existieren: mTor-Komplex 1 und 2 (mTORC1/2). mTORC1 setzt sich aus mTor, Raptor, mLST8, PRAS40, FKBP38 und Deptor zusammen und ist sensitiv gegenüber Rapamycin und seinen Derivaten (Oshiro et al. 2004). mTORC2 besteht aus mTor, Rictor, mLST8, SIN1, Protor und Deptor und wird allgemein als nicht sensitiv gegenüber Rapamycin beschrieben, obwohl bei längerer Einwirkzeit ebenfalls eine Hemmung gesehen wurde (Sarbasov et al. 2006).

mTORC1 reguliert die Translation in Abhängigkeit vom Vorhandensein von Wachstumsfaktoren und insbesondere der der Zelle zur Verfügung stehenden Energie. Als Energiesensor fungiert AMPK (AMP-activated protein kinase), welche durch die Bestimmung des AMP/ATP Quotienten das zelluläre Energiereservoir ermittelt und im Falle von Energiemangel TSC2 (Tuberous sclerosis complex 2) durch Phosphorylierung an Ser1345 aktiviert. Dieser Prozess stellt die Grundlage für die zusätzliche Phosphorylierung von TSC2 an unter anderem Ser1337 und Ser1341 durch GSK3 β dar (Inoki et al. 2006). TSC2 überführt dann die kleine GTPase Rheb (Ras-homolog enriched in brain) durch Hydrolyse in seine inaktive Form (Tee et al. 2003). Daraus resultiert eine Downregulation von mTORC1, was die Dephosphorylierung von an der

Proteinsynthese beteiligter Proteine wie p70S6K (p70 ribosomal S6 kinase 1) und 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1) zur Folge hat (Fingar und Blenis 2004) und die Translation inhibiert. Denn durch aktiven mTORC1 phosphoryliertes p70S6K aktiviert S6 und veranlasst somit die Translation von mRNAs, wohingegen 4E-BP1 durch die Phosphorylierung seine hemmende Wirkung auf eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E) verliert, welcher dann als wichtiger Bestandteil für die Translation von 5' capped mRNA zur Verfügung steht (Martelli et al. 2010). Zudem hat AMPK durch Phosphorylierung von Raptor eine direkte hemmende Wirkung auf mTORC1 (Gwinn et al. 2008). Damit es zur Akkumulation von GTP-Rheb und somit zur Aktivierung von mTORC1 kommen kann, muss zunächst TSC2 durch Akt unter anderem an Ser939, Ser981 und Thr1462 phosphoryliert werden, da es dann im Komplex mit TSC1 seine GAP Aktivität verliert (Bai und Jiang 2010). Des Weiteren existiert ein negativer Feedbackmechanismus, in dem mTORC1 und S6K1 die Entstehung von PIP3 bei Aktivierung durch Wachstumsfaktoren hemmen können (Huang und Manning 2009).

Die Mechanismen der Regulation des mTORC2, welcher die langgesuchte, Akt phosphorylierende PDK2 ist, sind bisher noch nicht so gut verstanden. mTORC2 scheint eine Rolle bei der Organisation des Zytoskeletts zu spielen, indem es die Polymerisierung von Actin und die Phosphorylierung von PKC α (protein kinase C α) kontrolliert (Jacinto et al. 2004; Juang und Manning 2009). Ein weiteres Zielprotein von mTORC2 ist SGK1 (serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1). Sie reguliert die Effekte von extrazellulären Signalen durch Phosphorylierung von Proteinen, die regulatorisch an Ionentransport und Wachstum beteiligt sind (García-Martínez und Alessi 2008).

Ein wichtiger Inhibitor des PI3K-Signalweges ist die Phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin homolog deleted from chromosome ten), die PIP3 in die inaktive Form PIP2 überführt. PTEN ist ein Tumorsuppressorgen, welches bei einer Vielzahl von Malignomen durch somatische Mutationen oder genetische Deletionen inaktiviert worden ist (Engelmann et al. 2006). Verlust von PTEN führt zu einer dauerhaft hohen Konzentration von PIP3, wodurch eine Stimulation durch Wachstumsfaktoren imitiert wird (Keniry und Parsons 2008).

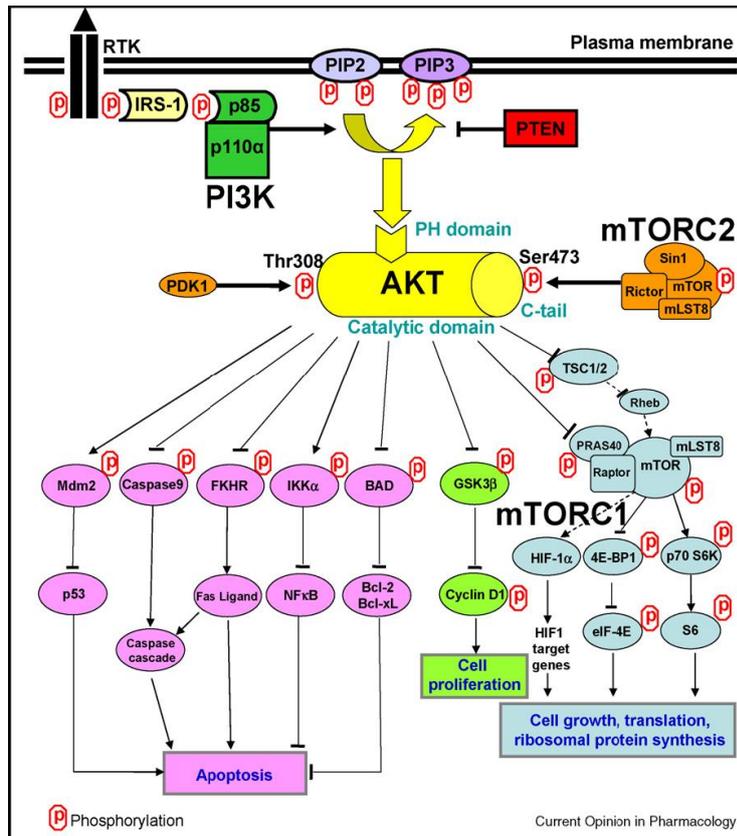


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des PI3K-AKT-Signalwegs (aus Yap et al. 2008). Unter Stimulation durch Wachstumsfaktoren aktivieren Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) die PI3-Kinase, welche dann die Bildung des „second messenger“ PIP3 katalysiert. Dieser Vorgang kann von PTEN antagonisiert werden. Hauptziel von PIP3 ist AKT, welche nach Konformationsänderung durch die PDK1 phosphoryliert werden kann. Eine weitere Phosphorylierung durch den mTORC2 (PDK2) ist für eine vollständige AKT-Aktivierung notwendig. Aktiviertes AKT phosphoryliert nun eine Vielzahl von Substraten, durch die u.a. mTORC1 aktiviert wird, was zu Zellwachstum, verstärkter Translation und Verstärkung der ribosomalen Proteinsynthese führt (blau). Die Enthemmung der D-Cycline fördert Zellproliferation (grün). Durch vielseitige Regulationsmechanismen wird auch Apoptose gehemmt (rosa).

1.4 Zellzyklusregulation

Der Zellzyklus besteht aus vier Phasen: G1-, Synthese-, G2- und Mitose-Phase. Ein Großteil der Zellen befindet sich jedoch in der G0-Phase, die auch Ruhephase genannt wird. Vielen Geweben ist es möglich ruhende Zellen bei Bedarf wieder in die G1-Phase zu überführen. Der Übergang von einer Phase in die andere wird an sogenannten Checkpoints durch CDK (cyclin-dependent kinases)/Zyclin Komplexe streng kontrolliert, um ungewünschte Zellproliferation zu verhindern. Zykline sind regulatorische Untereinheiten der CDKs, deren Proteinspiegel periodisch und phasenabhängig während des Zellzyklus schwankt, da jedes Zyclin nur in einer bestimmten Zellzyklusphase benötigt wird (Takahashi-Yanaga und Sasaguri 2008). So bedarf es beispielsweise für den Übertritt von der G1- in die S-Phase zunächst der D-Zykline, welche im

Komplex mit CDK4 oder CDK6, pRb (product of the retinoblastoma tumor suppressor gene) anteilig phosphorylieren, was die Transkription einiger Gene, wie z.B. das Gen für Zyklin E, durch den Transkriptionsfaktor E2F möglich macht. Zyklin E bindet und aktiviert dann CDK2, das pRb nun vollständig phosphoryliert. Als Folge verliert pRb seine inhibierende Bindung mit E2F, wodurch schlussendlich die für die folgende S-Phase wichtigen Gene transkribiert werden können (Lavia und Jansen-Dürr 1999).

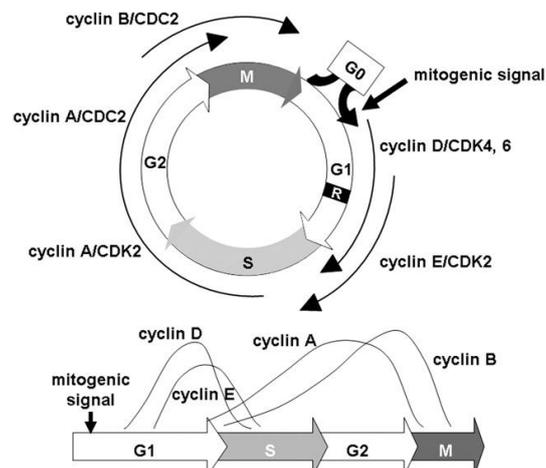


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des Zellzyklus und daran beteiligter Proteine (aus Takahashi-Yanaga und Sasaguri 2008).

Während eines Zyklus werden vier Phasen durchlaufen: die Gap1-(G1), Synthese-(S), Gap2-(G2) und Mitose-(M)Phase. Die Passage wird von Zyklin/CDK-Komplexen reguliert. Es besteht eine phasenabhängige Aktivierung der CDKs durch Bindung spezifischer Zykline, welche regulatorische Untereinheiten darstellen und phasenabhängig exprimiert werden. Jedes Zyklin weist einen charakteristischen Expressionsverlauf auf. R (Restriktionspunkt). G0 (Ruhephase).

Die CDK-Aktivität kann durch CDK-Inhibitoren, welche entweder an CDK oder den CDK/Zyklin-Komplex binden, gehemmt werden. Es wurden zwei Inhibitor-Familien beschrieben: die INK4-Familie und die Cip/Kip-Familie (Sherr und Roberts 1995). Erstere hemmt vor allem die G1-Phasen-CDKs. Eine Studie über maligne Ovarialtumoren legt nahe, dass der CDK-Inhibitor p16^{INK4} durch die p70S6-Kinase1 aus dem mTor-Signalweg inhibiert wird und somit eine Hemmung des mTor-Signalweges indirekt zu einem Stop in der G1-Phase führen kann (Gao et al. 2004).

1.5 Fragestellung

Apoptosedefekte sind eine häufige Ursache für die Entstehung von malignen Tumoren. Bei einer Vielzahl von Neoplasien konnte bereits die Inaktivierung zelltodfördernder oder die Überexpression zelltothemmender Gene nachgewiesen werden. Fehlregulierte

Apoptosesignalwege spielen aber nicht nur bei der Tumorentstehung eine entscheidende Rolle, sondern bedingen ebenso die Entstehung von Therapieresistenzen, da die Mehrzahl der aktuellen onkologischen Therapeutika auf der Induktion genetischer Zellschäden basiert. Durch Fortschritte in der Erforschung von Zelltodsignalwegen konnte das Verständnis der Pathogenese vieler maligner Erkrankungen wesentlich verbessert werden, was die Voraussetzung für den Einsatz zielgerichteter therapeutischer Ansätze darstellt. Es besteht jedoch aufgrund der hohen Komplexität der regulierenden Signalwege eine enorme genetische Diversität innerhalb der malignen Tumore. Insbesondere die AML ist eine genetisch sehr heterogene Erkrankung, für deren variablen Verlauf möglicherweise auch verschiedentlich gestörte Zelltod-Signalkaskaden verantwortlich sind. Daher ist es das Anliegen dieser Arbeit bei AML zwei wichtige, das Zellüberleben und den Zelltod regulierende Signalwege zu analysieren und ihren Einfluss auf Prognose und Therapieresistenz zu untersuchen. Es sollte hierfür die Expression der Gene des mTOR-Signalweges und der Bcl-2-Genfamilie in leukämischen Zellen von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und, falls möglich, auch des Rezidivs bestimmt werden mit dem Ziel folgende Fragen beantworten zu können:

1. Gibt es in Abhängigkeit von der Höhe der Genexpression Unterschiede im Therapieansprechen und Krankheitsverlauf bei Patienten mit AML?
2. Können einzelne Gene als molekulare Marker identifiziert werden, die eine bessere Prognoseeinschätzung innerhalb der AML-Subgruppen erlauben?
3. Korrelieren die Genexpressionsprofile mit bereits bekannten Prognosefaktoren wie Karyotyp und NPM1- bzw. FLT3-Mutationsstatus?
4. Gibt es messbare Unterschiede in der Genexpressionshöhe zwischen Erstdiagnose und Rezidiv? Und wenn ja, könnten sie ein Hinweis für die Pathogenese der häufigen Therapieresistenz im Rezidiv sein?

2. Material und Methoden

2.1 Erhebung der Patientendaten

Als Erstes wurde mir eine Liste jener an AML erkrankter Patienten zur Verfügung gestellt, deren periphere Blut- oder Knochenmarkproben in den Jahren zwischen 2002 und 2007 in der Routinediagnostik der AG Daniel untersucht worden waren. Dabei handelte es sich um 229 Patienten. Mit Hilfe von Name und Geburtsdatum konnte nun Einsicht in die Patientenakten im Zentralarchiv Wedding des Virchowklinikums genommen werden. Akten, die älter als fünf Jahre waren, wurden aus dem Alt-Archiv der Charité am Rohrdamm bestellt. Von insgesamt 185 Patienten konnten Akten eingesehen und ausgewertet werden. Es wurden eine Vielzahl von Daten über den Krankheitsverlauf, die Ergebnisse aus apparativer und laborchemischer Diagnostik sowie anamnestiche Parameter erhoben und anonymisiert in einer Excel-Tabelle dargestellt. Erhobene Parameter:

- Geschlecht
- Geburtsdatum
- Datum: Erstdiagnose, Therapiebeginn, Rezidiv, Tod
- Todesursache
- Laborparameter: Hb, Thrombozyten, Leukozyten, Quick, Fibrinogen, γ GT, AP, Bilirubin, LDH, Blasten im KM, periphere Blasten
- Therapieschema
- Ansprechen auf 1. und 2. Induktion, Konsolidierung, Rezidivtherapie
- Stammzelltransplantation
- Vorerkrankungen
- Primäre/Sekundäre AML
- MDS
- FAB-Subtyp
- Zytogenetik

Um Informationen über den Gesundheitszustand und Krankheitsverlauf derjenigen Patienten erhalten zu können, die im Jahr 2008 nicht mehr in der Klinik vorstellig geworden waren, wurden die Hausarztpraxen telefonisch und/oder per Fax kontaktiert und um Auskunft gebeten. Bei einem Patienten konnte kein behandelnder Arzt ausfindig gemacht werden und bei drei Patienten hatte der angegebene Hausarzt oder Onkologe schon jahrelang keinen Kontakt zu dem Patienten gehabt. In diesen Fällen wurde der Krankheitsverlauf nur bis zu dem zuletzt

dokumentierten Patientenkontakt und nicht bis zum Beobachtungsende Dezember 2008 für die Auswertung verwendet. In mehreren Fällen wurde nur Auskunft über den zu der Zeit des Anrufs bestehenden Gesundheitszustand des Patienten und den letzten Arztbesuch, nicht aber über den Krankheitsverlauf gegeben. Es wurde dann mit der Annahme weitergearbeitet, dass Patienten, die zum Zeitpunkt des Anrufes als gesund beschrieben worden waren, seit dem letzten verzeichneten Krankenhausaufenthalt auch kein Rezidiv erlitten hatten. Ein Arzt verweigerte ganz die Auskunft. Bei den 38 Patienten, die eine Stammzelltransplantation erhalten hatten, konnte der ausführlich dokumentierte Krankheitsverlauf in den Akten der hämatologisch/onkologischen Ambulanz eingesehen werden, da diese Patienten regelmäßig ambulant nachuntersucht werden.

2.2 Analyse der Patientenproben

Zunächst erfolgte eine Bestandsaufnahme der relevanten Patientenproben von Erstdiagnose und/oder Rezidiv, die in der Routinediagnostik der AG Daniel zu Forschungszwecken als Zellpellets, RNA oder cDNA in Kühlschränken bei einer Temperatur von -80°C bzw. -20°C gelagert wurden. Es wurde die asservierte Probenmenge bestimmt und anhand von Aufzeichnungen in Laborbüchern die Konzentration der einzelnen RNA-Proben ermittelt. Anschließend wurde entschieden in welchen Fällen eine RNA Synthese aus Zellpellets notwendig war, um genügend Ausgangsmaterial für die weiteren Analysen zu erhalten. Bei insgesamt 66 Patienten war nicht genügend Material vorhanden, so dass das Kollektiv der vorliegenden Arbeit schlussendlich 119 Patienten beinhaltet.

2.2.1 FLT3-ITD- und NPM1-Mutationsanalysen

Die FLT3-ITD- und NPM1-Mutationsanalysen des AML-Patientenkollektivs wurden von Jörg Bernhard durchgeführt und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Aus den in der Routinediagnostik der AG Daniel asservierten RNA Proben des Patientenkollektivs wurde cDNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase synthetisiert und anschließend mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. In einigen Fällen musste die RNA erst aus Zellpellets isoliert werden. RNA und Pellets wurden bei -80°C gelagert, cDNA bei -20°C bzw. $+4^{\circ}\text{C}$. Dabei wurden die in Tabelle 2.1 und 2.2 dargestellten PCR-Protokolle verwendet.

Tab. 2.1: PCR-Protokoll zur Detektierung einer ITD-Mutation der FLT3.

Denaturierung	95°C	4 min	
Denaturierung	95°C	30s	
Annealing	62°C	30s	35x
Elongation	72°C	1 min	
Elongation	72°C	10 min	
Hold	8°C	∞	

FLT3 = FMS-like tyrosine kinase 3; ITD= Interne Tandemduplikation.

Tab. 2.2: PCR-Protokoll zur Detektierung einer NPM1-Mutation.

Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	30s	
Annealing	60°C	30s	35x
Elongation	72°C	30s	
Elongation	72°C	10 min	
Hold	8°C	∞	

NPM1 = Nucleophosmin 1.

Die optimalen Annealingtemperaturen für die Primer wurden jeweils per Gradienten PCR ermittelt. Die Primersequenzen für die zu amplifizierenden Genabschnitte waren im Labor der AG Daniel bereits etabliert.

Primer	Primersequenz (5'-3')	WT-Amplifikatgröße
FLT3-11F	gCAATTTAaggTATgAAAgCCAgC	270bp
FLT3Ex13R	AgTgCCTCTCTTTCAgAgCTgTCTgCTT	
NPM1eigenF	AAAgTggAAgCCAAATTCATCAAT	263bp
NPM1R	ggCATTTTggACAACACATTC	

Die laborinternen Primerbezeichnungen sind veraltet. Das frühere Exon 11 des FLT3-Gens wird mittlerweile als Exon 14, das frühere Exon 13 als Exon 16 bezeichnet.

Zur Detektion der FLT3-ITD- und NPM1-Mutationen wurde die Single-strand conformation polymorphism- (SSCP-) Gelelektrophorese verwendet, weil sie eine sehr hohe Auftrennung liefert und auch einzelne Punktmutationen nachweisbar sind. Die einzelnen Proben wurden hierfür im Verhältnis 1:1 mit SSCP-Ladepuffer vermischt und für zehn Minuten bei 95°C denaturiert. Jeweils 8 µl des Proben/Ladungspuffergemisches wurden anschließend auf ein 10%iges Polyacrylamidgel aufgetragen, welches zuvor für zehn Minuten mit 100V konditioniert

wurde. Nach Probenauftragung wurde zunächst für 30 Minuten eine Spannung von 300V und anschließend für 90 Minuten eine Spannung von 90V an das Gel angelegt. Im Anschluss wurden die Gele mit DNA Silver Staining Kit von GeHealthcare gemäß den Herstellerangaben gefärbt und die Banden sichtbar gemacht. Während der gesamten Elektrophoresedauer wurde die Elektrophoresekammer mittels Durchlaufkühler konstant auf 21°C gekühlt. Als Kontrolle wurden immer auch nicht denaturierte Wildtyp- (wt-) Proben mit auf die Gele aufgetragen. Für die NPM1-Analyse war dies cDNA der Zelllinie *HL-60* und für die FLT3-ITD-Analyse cDNA der Zelllinie *OCI-AML3*. Da bei den NPM1-Genen die Identifikation der Mutationen schwieriger ist, wurden zusätzlich Proben eines denaturierten Wildtyp und Schwellenwertproben, die üblicherweise bei der Lightcycler-Analyse eingesetzt werden, mitaufgetragen. Als Kriterium für das Vorhandensein einer Mutation galt ein deutliches Abweichen vom Bandenmuster des Wildtyps.

2.2.2 TaqMan-Real-Time-PCR zur relativen Quantifizierung der Genexpression

Die relative Quantifizierung der Genexpressionen mittels Real-Time-PCR erfolgte in Zusammenarbeit mit Gábor Egervári und Thomas Pretzsch.

Bei der Real-Time-PCR handelt es sich um eine Detektionsmethode, bei der die Vermehrung der PCR-Produkte in der exponentiellen Phase gemessen wird, was eine genaue Quantifizierung der Zielsequenzen im Untersuchungsmaterial ermöglicht. In den Versuchsansatz werden zusätzlich zu den für die PCR benötigten spezifischen Primern fluoreszenzmarkierte Sonden gegeben, welche am 5' und am 3' Ende mit zwei unterschiedlichen Konjugaten (Quencher und Reporterfarbstoff) versehen sind. Der Quencher unterdrückt die Fluoreszenz des Reporters solange bis die Sonde während der PCR durch die 5'Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase abgebaut wird und die beiden Konjugate voneinander getrennt werden. Liegen die Fluoreszenzfarbstoffe in freier Form vor wird ein Lichtsignal emittiert, welches von der optischen Einheit des Taqman-Gerätes detektiert wird. Um Fluoreszenzschwankungen aufgrund von Konzentrations- oder Volumenunterschieden zu korrigieren, wird zur Normalisierung des „Reporter“-Signals eine passive Referenz ROX (6-Carboxy-X-rhodamin) als interne Referenz hinzugegeben und zu jedem Messzeitpunkt ein Quotient aus dem Signal des „Reporter“-Farbstoffs und dem Signal von ROX gebildet. Dieser Quotient wird als „normiertes Reportersignal“ (Rn) bezeichnet. Die Normierung gleicht nicht nur Fluoreszenzschwankungen von einem Reaktionsgefäß zum anderen aus (Well-to-Well Schwankungen), sondern auch Fluoreszenzschwankungen von einer 96-Well-Plate zur anderen (Plate-to-Plate Schwankungen). Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Allerdings herrschen

nur in der exponentiellen Phase optimale Bedingungen für eine korrekte Quantifizierung. Um genau am Anfang der exponentiellen Phase messen zu können, wird der CT- (Cycle Threshold-) Wert verwendet, der den Zyklus beschreibt, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über dem Grundrauschen ansteigt. Die Fluoreszenzstärke des zu untersuchenden Gens wird gegen die eines konstant vorliegenden Gens (house keeping Gen), welches mit dem Zielgen koexprimiert aber nicht transkriptionell reguliert wird, in Relation gesetzt. Dadurch wird eine relative Quantifizierung des untersuchten Gens erreicht.

Für das Ansetzen der Proben wurde der ABI Gene Expression Master Mix, 5 ml Applied Biosystem, sowie Sonden und Primer von TIB MOLBIOL verwendet. Pro Durchlauf der Eppendorf TaqMan-RT-PCR konnte eine 96-well Platte analysiert werden, auf der jeweils Patientenproben, Negativproben und die Standardverdünnungsreihe je als Triplikate geführt wurden. Als PCR-Programm wurde folgendes Schema gewählt: Denaturierung bei 94°C für 7 Minuten, dann 50mal Annealing bei 61°C für 15 Sekunden und schließlich Elongation bei 94°C für 30 Sekunden.

Es wurden die Expressionen folgender Gene im Verhältnis zum Housekeeping-Gen „ABL“ ermittelt (siehe auch Tab. 2.3):

<u>Bcl-2 Familie:</u>	Bcl-2, Bcl-b, Bcl-w, Bcl-xl, Bfl-1/A1, Mcl-1 Bak, Bax, Bak, Bcl-g, Bcl-rambo, Bfk, Bid, Nbk/Bik, Bim, Bmf, Hrk, Itm2b, Nix, Noxa, Puma, Spike, Bad
<u>mTor Signalweg:</u>	4EBP1, AKT, FRAP1, GSK3A, GSK3B, HIF1A, IF4E, mLST8_GbL, p70S6K, PDK1, PDK2, PTEN, Raptor, Rheb, Rictor, SGK, TSC1, TSC2
<u>mTor-Zielgene:</u>	CIAP1, CIAP2, XIAP, Survivin, Cyclin D1, Cyclin D2, Cyclin D3

Tab. 2.3: Tabellarischer Überblick über die Ergebnisse der relativen Quantifizierung mittels Real Time PCR.

Gen	Median	Bereich
4EBP1	87,6900	0,0000-943,635
Akt	3165,5600	0,0000-111252,1667
FRAP1	29,0333	0,0000-299,01
GSK3A	84,0033	0,0000-4971,6933
GSK3B	0,4200	0,0000-23,4500
HIF1A	1,2867	0,0000-23,45
IF4E	0,4167	0,0000-5,6633
mLST8/Gbl	6,1833	0,0000-124,3133
p70S6K	0,1333	0,0000-1,82
PDK1	0,0033	0,0000-0,97
PDK2	35,6200	0,0000-719,4467
PTEN	94,5850	0,0000-3293,0533
Raptor	163,2800	0,0000-4679,8233
RHEB	0,2300	0,0000-3,815
Rictor	0,0250	0,0000-2,955
SGK	0,0000	0,0000-2,42
TSC1	4,7467	0,0000-97,74
TSC2	69,2233	0,0000-1120,3533
CIAP1	2,2000	0,00-253,24
CIAP2	0,0000	0,00-0,28
XIAP	0,0000	0,00-0,04
Survivin	0,5767	0,00-45,74
Cyclin D1	0,2367	0,00-0,979
Cyclin D2	21,4333	0,01-469,62
Cyclin D3	11,7933	0,00-435,14

Gen	Median	Bereich
Bcl-2	9,0533	0,31-859,185
Bcl-b	0,0800	0,0000-61,055
Bcl-w	0,0100	0,0000-0,3367
Bcl-xl	18,7167	0,69-982,31
Bfl1/A1	9,1433	0,11-1220,3733
Mcl-1	11,0400	0,63-268,6633
Bax	3,2167	0,0000-52,04
Bak	2,1133	0,0000-34,245
Bok	0,0000	0,0000-1,44
Bcl-g	0,000000.	0,0000-2,6433
Bcl-rambo	3,0900	0,3433-62,9067
Bmf	1,4467	0,1133-27,7933
Bfk	0,2233	0,0000-204,9967
Bik/Nbk	0,8200	0,04-70,3967
Spike	0,0100	0,0000-1,4433
Hrk	0,0067	0,0000-8,1067
Puma	0,0667	0,0000-28,25
Noxa	0,1333	0,0000-8,8633
Bid	16,0133	1,6767-416,2333
Bim	0,6750	0,0000-61,875
Itm2B	19,8567	0,0000-638,7533
Nix	21,3667	1,83-537,3967
Bad	0,8100	0,13-23,26

Dargestellt sind der Median und der Bereich zwischen minimal und maximal gemessener relativer Genexpression aller Gene bei Erstdiagnose (n=107) im Verhältnis zum Housekeepinggen ABL. Linke Spalte mTOR-Gene; rechte Spalte Bcl-2-Familiengene.

2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogrammes PASW 18/19. Das Gesamt- und krankheitsfreie Überleben wurde ab dem Zeitpunkt der Ersttherapie mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode geschätzt. Der Vergleich der Überlebenskurven erfolgte mittels log-rang-Mantel-Cox-Test, wobei für die Kategorisierung in „hohe“ bzw. „niedrige“ Genexpression der jeweilige Median als Grenzwert verwendet wurde. Auf diese Weise war die Anzahl der Proben beiderseits des Grenzwerts etwa gleich verteilt. Für die Analysen des Gesamtüberlebens standen 107 Patientenproben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose zur Verfügung. Bei den Analysen des krankheitsfreien Überlebens wurden nur jene Patienten miteingeschlossen, die zuvor eine CR

erreicht hatten. Voraussetzung für das Erreichen einer CR ist die Normalisierung des peripheren Blutbildes mit maximal 1% Blastenanteil und weniger als 5% Blasten im Knochenmark. Die Einteilung des Karyotyps in drei zytogenetische Prognosegruppen (günstig, intermediär, ungünstig) erfolgte anhand der Klassifizierung nach GIMEMA/EORTC. Als komplex aberranter Karyotyp galten > 3 numerische und/oder strukturelle Chromosomenaberrationen. Zudem wurden Patientengruppen mit bestimmten Merkmalskombinationen unter Verwendung von Interaktionsvariablen gebildet. Positiv gewertete Merkmale wurden mit der Zahl „1“ kategorisiert, negative Merkmale mit der Zahl „0“. Die Patientengruppe mit optimaler Merkmalskombination erhielt daher als Multiplikationsergebnis der untersuchten Merkmale eine „1“, während die Patientengruppe mit nicht optimaler Merkmalskombination schon durch ein negatives Merkmal im Multiplikationsergebnis mit „0“ kategorisiert wurde.

Für den Vergleich von Variablen untereinander wurden je nach Fall nichtparametrische Tests wie der Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben bzw. für kategoriable Variablen der chi²-Test oder Fisher´s exact Test, der Kruskal-Wallis-Test für mehrere unabhängige Stichproben und der Wilcoxon-Test für zwei abhängige Stichproben verwendet. Außerdem wurden Rangkorrelationsanalysen nach Spearman und Kendall berechnet. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert $< 0,05$ festgelegt.

2.4 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Das untersuchte Patientenkollektiv setzt sich aus 119 Patienten zusammen, von denen 60 weiblich (50,4%) und 59 männlich (49,6%) waren. Das mediane Lebensalter bei Erstdiagnose lag bei 58 Jahren (Altersspanne 17-86 Jahre). Bei 107 Patienten (90,8%) waren Proben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose vorhanden. Von den 49 Patienten, die ein erstes Rezidiv erlitten hatten, waren nur in 18 Fällen Proben asserviert worden. Eine patientenbezogene Probenpaarung war daher nur in 13 Fällen möglich. Weitere relevante Daten bezüglich des untersuchten Kollektivs siehe in den folgenden Tabellen 2.4 und 2.5:

Tab. 2.4: Übersicht über relevante Patientendaten des AML-Kollektivs.

(n=107)	Anzahl (n)	Prozent (%)	fehlend (n)	(n=107)	Anzahl (n)	Prozent (%)	fehlend (n)
Geschlecht				anamn. Malignom			1
männlich	53	49,5		ja	13	12,1	
weiblich	54	50,5		nein	93	86,9	
Probe von ED	107	89,9	11	SZT			
Probe von Rezidiv	18	30,5	41	ja	27	25,2	
Probenpaar ED/Rez	13	76,5	4	HLA-ident. Geschwister	12	11,2	
AML			8	HLA-ident. Fremdspender	10	9,3	
primär	70	65,4		Fremdspender mit Mismatch	5	4,7	
sekundär	29	27,1		1. Rezidiv			3
FAB			6	ja	49	45,8	
M0	10	9,3		nein/überlebt	26	24,3	
M1	20	18,7		nein/verstorben	29	27,1	
M2	25	23,4		2. Rezidiv			4
M3	8	7,5		ja	9	8,4	
M4/Eo	20	18,7		nein/überlebt	31	29	
M5	12	11,2		nein/verstorben	63	58,9	
M6	2	1,9		Therapie			3
M7	0	0		AMLCG 2000	83	77,6	
aus REAB	2	1,9		AML7+3	5	4,7	
biphänotyp.	2	1,9		primär palliativ	9	8,4	
Karyotyp			8	andere	7	6,5	
günstig	15	15,1		CR nach 1. Induktion			16
intermediär	44	44,4		ja	60	56,1	
ungünstig	40	40,4		nein	30	28	
zytogen. Aberration			7	Erreichen einer CR			1
t(8;21)	5	4,7		ja	79	73,8	
t(15;17)	8	7,5		nein	27	25,2	
inv(16)	2	1,9					
FLT3-ITD			2				
wt	84	78,5		Alter bei Diagnose	Monate	Jahre	
mut	21	19,6		Median		58	
NPM1			2	Bereich		17-86	
wt	76	71		Medianes Überleben			
mut	29	27,1		Median	15		
FLT3/NPM1			2	Bereich	0-82		
wt/wt	66	61,7		Monate bis 1. Rezidiv			
wt/mut	18	16,8		Median	10		
mut/wt	10	9,3		Bereich	2-47		
mut/mut	11	10,3					

ED=Erstdiagnose; Rez=Rezidiv; FAB=French-American-British-Klassifikation; REAB=refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss; mut=mutiert; wt=Wildtyp; HLA=Histokompatibilitätsantigen; ident.=identisch; CR= komplette Remission; AMLCG=Deutsche AML-Studiengruppe (Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group); Studienprotokolle: **AMLCG 2000**: Hochdosis versus Standarddosis AraC im ersten Induktionskurs; mehrfaches Priming mit G-CSF versus kein Priming; Eskalierende Konsolidierung mit autologer Blutstammzelltransplantation versus Standard-Postremissionstherapie. **AML 7+3**: Gemeinsamer Standardarm der German AML-Intergroup mit mehreren Zyklen bestehend aus jeweils 7 Tagen AraC und 3 Tagen Daunorubicin.

Tab. 2.5: Tabellarischer Überblick der laborchemischen Parameter des AML-Kollektivs.

	Median	Bereich	fehlend
Hb (g/dl)	9,15	3,20-14,70	1
Leukozyten (/nl)	8,81	0,39-1078,00	0
Thrombozyten (/nl)	54,5	4,00- 385,00	1
Quick (%)	78	28,00- 130,00	4
LDH (U/l)	404	131,00 - 4613,00	6
Periphere Blasten (%)	30	0,00- 100,00	16
Blasten im KM (%)	80	0,00-99,00	13
Bilirubin (mg/dl)	0,6	0,10- 32,10	11
AP (U/l)	78,5	37,00- 646,00	23
γGT (U/l)	31,5	4,10- 272,00	22
Gesamteiweiß (g/dl)	7,6	4,20- 75,00	25

Hb= Hämoglobin; LDH= Laktatdehydrogenase; AP=alkalische Phosphatase; γ GT = Gamma-Glutamyl-Transferase.

3. Ergebnisse

3.1 Karyotyp

15 Patienten konnten dem günstigen, 44 dem intermediären und 40 dem ungünstigen Karyotyp zugeordnet werden. In der Überlebenszeitanalyse zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben (OS) ($p < 0,001$) und krankheitsfreien Überleben (DFS) ($p < 0,001$), wobei die Vergleiche zwischen ungünstigem Karyotyp und günstigem bzw. intermediärem mit $p = 0,001$ signifikant waren, der Unterschied zwischen günstigem und intermediärem Karyotyp mit $p = 0,099$ aber nicht. Bei der Analyse des krankheitsfreien Überlebens verhält es sich ähnlich. Das DFS des ungünstigen Karyotyps ist signifikant schlechter als das des intermediären ($p = 0,001$) und des günstigen ($p = 0,001$) Karyotyps, wohingegen es keinen signifikanten Unterschied zwischen intermediärem und günstigem Karyotyp ($p = 0,407$) gab.

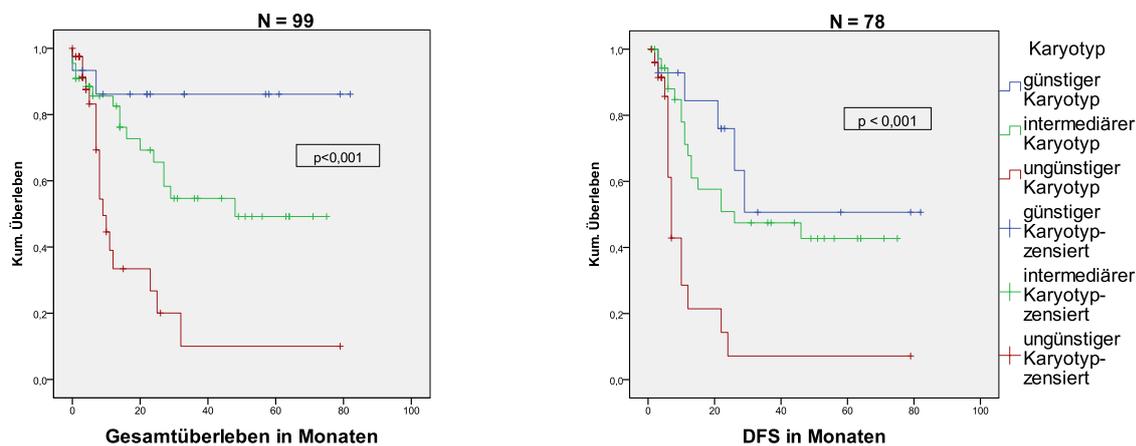


Abb. 3.1: Kaplan-Meier-Kurven von Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben. Aufteilung in drei Karyotypgruppen günstig/intermediär/ungünstig. Zeitangabe in Monaten. Ungünstiger Karyotyp zeigt signifikant kürzeres OS und DFS gegenüber dem intermediären bzw. günstigen Karyotyp.

3.2 Mutationsstatus beim Gesamtkollektiv

3.2.1 FLT3-Mutationsstatus beim Gesamtkollektiv

Bei dem vorliegenden Kollektiv war bei 105 Patientenproben die Analyse des FLT3-Status möglich. 21 Patienten zeigten bei Erstdiagnose eine Mutation der internen Tandem-Duplikation (ITD) von FLT3. Die Überlebenszeitanalysen des Gesamtüberlebens und des krankheitsfreien Überlebens zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen FLT3wt ($p = 0,74$) und FLT3mut ($p = 0,935$).

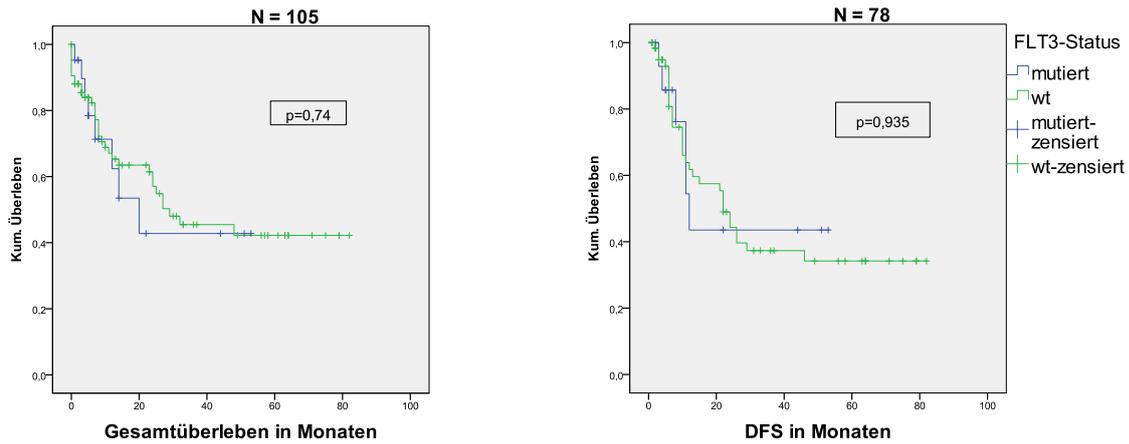


Abb. 3.2: Kaplan-Meier-Analysen von Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben. Aufteilung anhand des FLT3-Mutationsstatus in wt (Wildtyp) oder mutiert. Zeitangaben in Monaten. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im OS oder DFS.

3.2.2 NPM1-Mutationsstatus beim Gesamtkollektiv

29 Patienten wiesen eine Mutation des NPM1-Gens auf. Das krankheitsfreie Überleben dieser Patienten war signifikant besser ($p=0,003$) als das der Patienten mit NPM1-Wildtyp. Patienten mit NPM1-Mutation hatten eine 5-Jahresüberlebensrate von 54% und eine 5-Jahres-Rezidivfreiheit von 65%. Im Gegensatz dazu zeigte der Wildtyp eine 5-Jahresüberlebensrate von 35% und ein Rezidivfreiheit in den ersten 5 Jahren von 17%. Im Vergleich des Gesamtüberlebens zeigte sich kein signifikanter Überlebensvorteil ($p=0,2$).

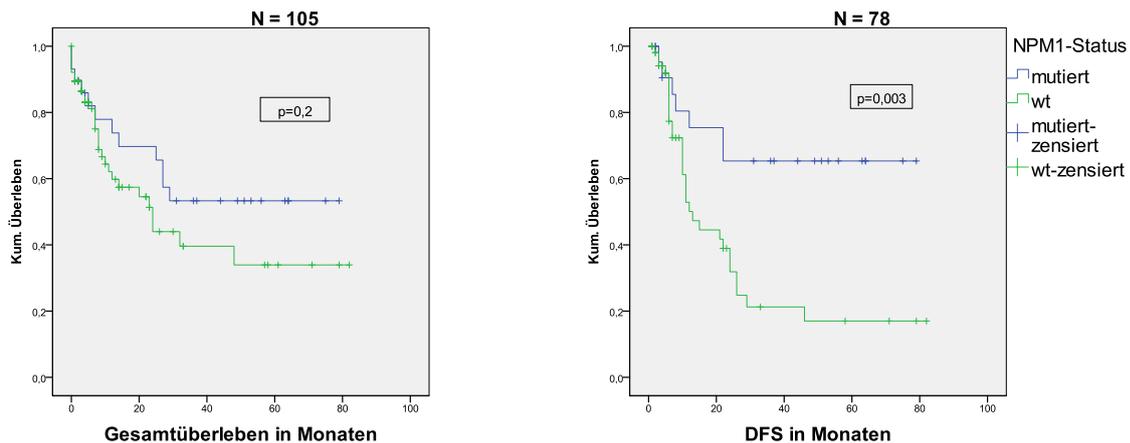


Abb. 3.3: Kaplan-Meier-Analysen von Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben. Aufteilung anhand des NPM1-Mutationsstatus in wt (Wildtyp) und mutiert. Zeitangaben in Monaten. Signifikant längeres DFS bei NPM1mut.

3.2.3 Interaktionsvariable FLT3/NPM1 beim Gesamtkollektiv

Für den Mutationsstatus von FLT3 und NPM1 wurde eine Interaktionsvariable gebildet und deren prognostische Bedeutung auf das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Überleben analysiert. Die als optimal angenommene Kombination von FLT3wt und NPM1mut zeigt gegenüber den anderen Kombinationen ein signifikant längeres Gesamtüberleben ($p=0,047$) und krankheitsfreies Überleben ($p=0,002$).

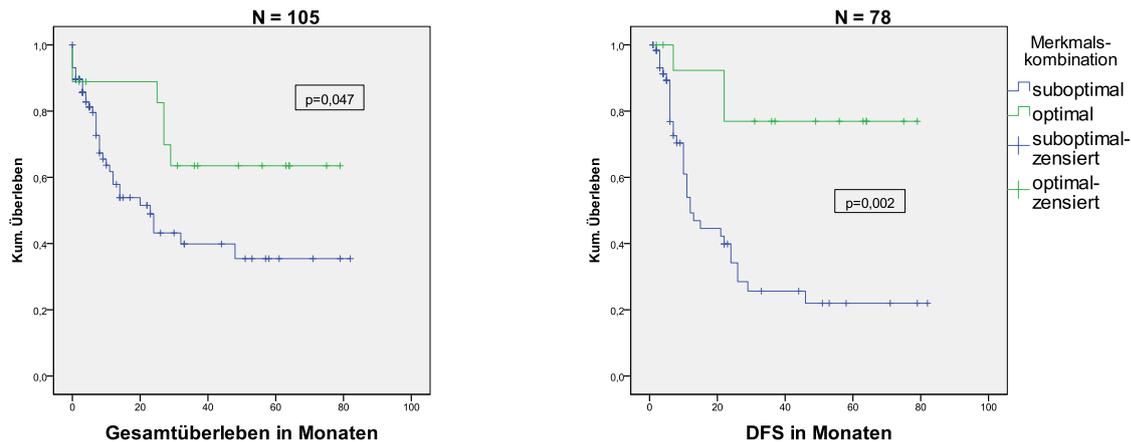


Abb. 3.4: Kaplan-Meier-Analysen von Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben. Aufteilung anhand der optimalen bzw. suboptimalen Merkmalskombinationen. Optimal: NPM1mut/FLT3wt. Suboptimal: NPM1mut/FLT3mut; NPM1wt/FLT3wt; NPM1wt/FLT3mut. Zeitangaben in Monaten. Signifikant längeres OS und DFS bei optimaler Merkmalskombination.

3.2.4 FLT3- und NPM1-Komutation beim Gesamtkollektiv

Da in der Literatur die günstige Prognose einer NPM1-Mutation häufig als abhängig von der Abwesenheit einer FLT3-Komutation beschrieben wird, wurden im untersuchten AML-Kollektiv beide Kombinationen miteinander verglichen. Patienten mit NPM1-Mutation zeigten keinen signifikanten Überlebensunterschied in Abhängigkeit vom FLT3-Mutationsstatus.

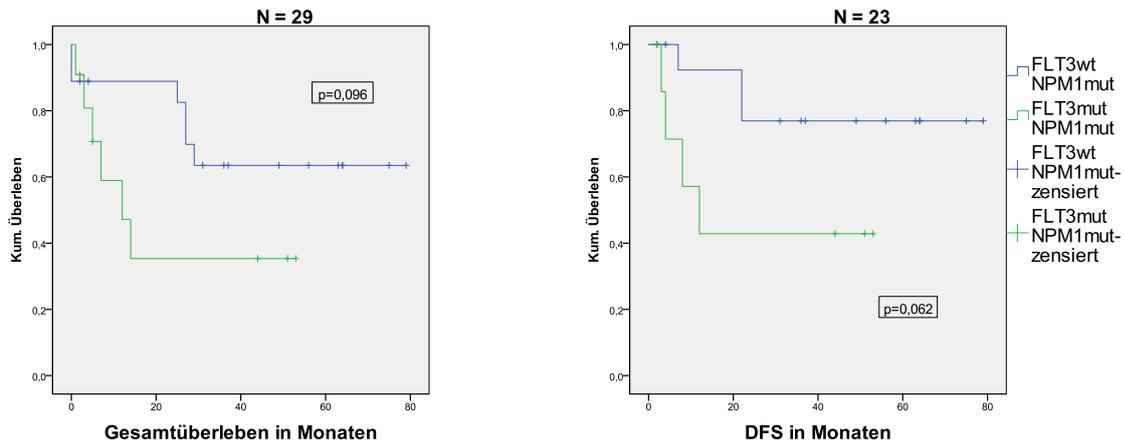


Abb. 3.5: Kaplan-Meier-Analysen von Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben. Aufteilung anhand der beiden Kombinationsmöglichkeiten des FLT3- und NPM1-Mutationsstatus. Zeitangaben in Monaten. Kein signifikanter Überlebensunterschied zwischen Komutation und singulärer NPM1-Mutation.

3.3 Mutationsstatus in der Subgruppe mit normalem Karyotyp

3.3.1 NPM1-Mutationsstatus bei AML mit normalem Karyotyp (NK-AML)

Da NPM1-Mutationen vor allem in der Gruppe der Patienten mit normalem Karyotyp gefunden werden, wurde der prognostische Einfluss innerhalb dieser Subgruppe separat geprüft. Es zeigte sich ein signifikant längeres krankheitsfreies Überleben ($p=0,001$), bei fehlendem Unterschied in Bezug auf das Gesamtüberleben ($p=0,404$).

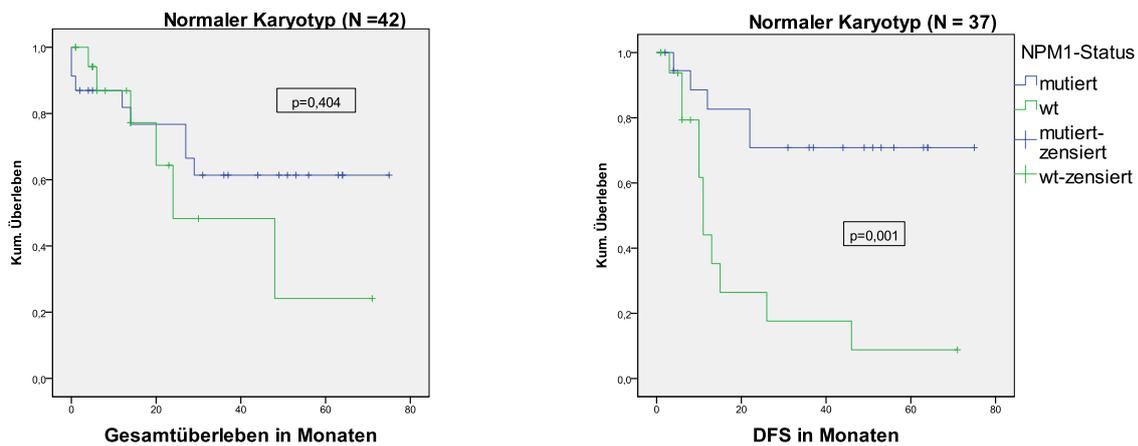


Abb. 3.6: Kaplan-Meier-Analysen von Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben bei Patienten mit normalem Karyotyp (NK). Aufteilung anhand des NPM1-Mutationsstatus in wt (Wildtyp) und mutiert. Zeitangaben in Monaten. Signifikant längeres DFS bei NPM1mut und NK.

3.3.2 FLT3-Mutationsstatus bei NK-AML

Weiterhin wurde in der Subgruppe mit normalem Karyotyp der prognostische Einfluss einer FLT3-ITD geprüft. Es ergab sich wie auch schon bei Betrachtung des Gesamtkollektivs kein signifikanter Unterschied im Gesamt- ($p=0,317$) und krankheitsfreien Überleben ($p=0,488$).

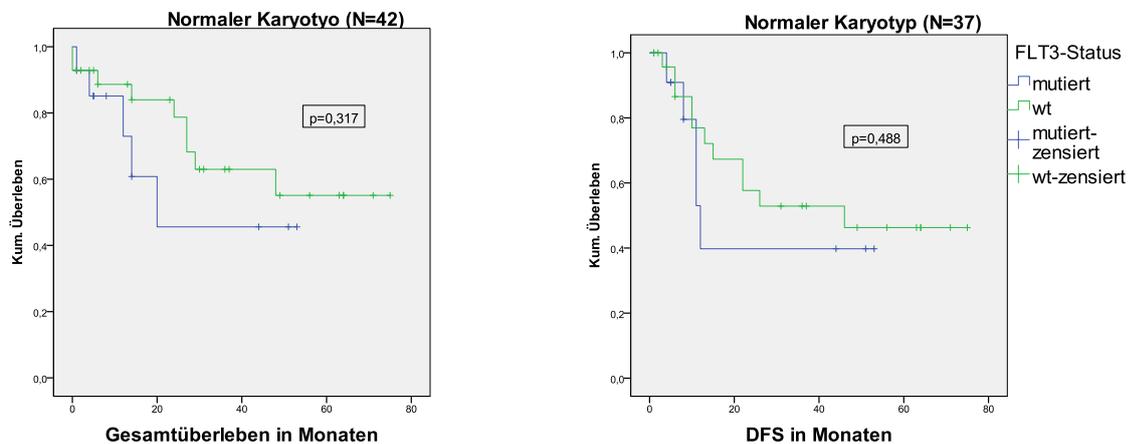


Abb. 3.7: Kaplan-Meier-Analysen von Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben bei Patienten mit normalem Karyotyp (NK). Aufteilung anhand des FLT3-Mutationsstatus in wt (Wildtyp) und mutiert. Zeitangaben in Monaten. Kein signifikanter Überlebensunterschied des OS und DFS.

3.3.3 Kombination von NPM1- und FLT3-Mutationsstatus bei NK-AML

Weiterhin wurde auf Unterschiede bezüglich der Kombination aus FLT3- und NPM1-Mutation getestet. Hierbei ergab sich bei Betrachtung aller Gruppen ein signifikanter Unterschied im DFS ($p=0,006$) bei fehlendem Einfluss auf das Gesamtüberleben ($p=0,605$).

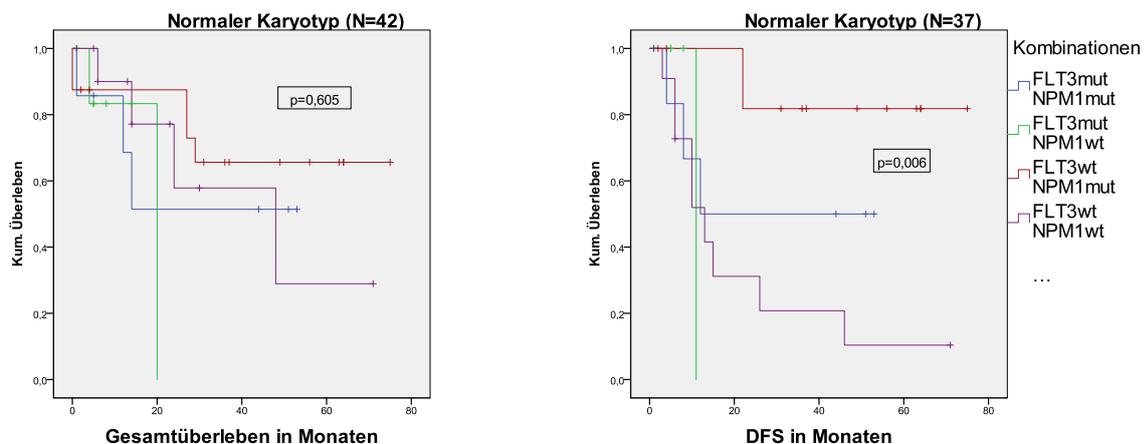


Abb. 3.8: Kaplan-Meier-Analysen von Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben bei Patienten mit normalem Karyotyp (NK). Aufteilung anhand der vier Kombinationsmöglichkeiten des FLT3- und NPM1-Mutationsstatus. Zeitangaben in Monaten. Signifikant längeres DFS von FLT3wt/NPM1mut im Vergleich zu den anderen Kombinationen.

Von besonderem Interesse ist es, den Einfluss einer FLT3-Komutation auf die prognostische Relevanz der NPM1-Mutation zu prüfen. Daher wurden diese beiden Kombinationen separat analysiert. Der zuvor gesehene signifikante Unterschied im krankheitsfreien Überleben ließ sich nicht auf das Vorhandensein einer FLT3-Komutation bei NPM1mut zurückführen ($p=0,088$). Der Vergleich des Gesamtüberlebens zwischen beiden Gruppen blieb ebenfalls über dem Signifikanzniveau ($p=0,47$).

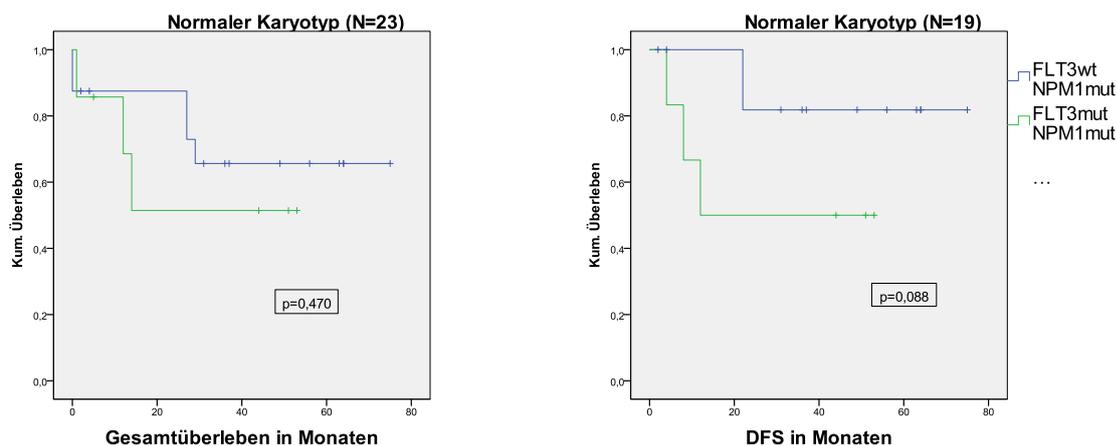


Abb. 3.9: Kaplan-Meier-Analysen von Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben. Aufteilung anhand der beiden Kombinationsmöglichkeiten des FLT3- und NPM1-Mutationsstatus. Zeitangaben in Monaten. Kein signifikanter Überlebensunterschied zwischen Komutation und singulärer NPM1-Mutation.

3.3.4 Interaktionsvariable FLT3/NPM1 bei normalem Karyotyp

Schließlich wurde geprüft wie sich die als optimal angesehene Kombination aus NPM1mut und FLT3wt gegenüber den anderen suboptimalen Kombinationen bei alleiniger Betrachtung des normalen Karyotyps prognostisch auswirkt. Dabei ergab sich in den Überlebenszeitanalysen ein signifikant längeres krankheitsfreies Überleben ($p=0,002$) der optimalen Merkmalskombination ohne einen prognostischen Vorteil auf das Gesamtüberleben zu haben ($p=0,258$).

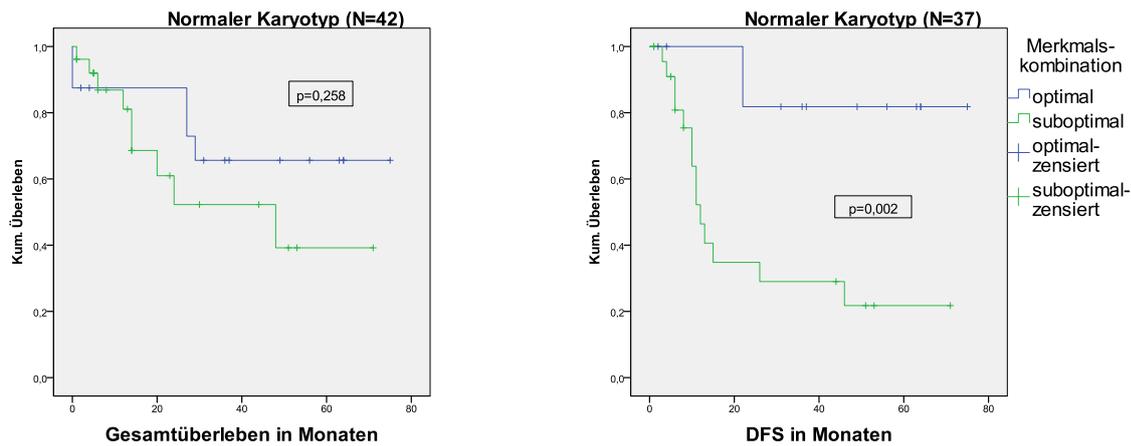


Abb. 3.10: Kaplan-Meier-Analysen von Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben. Aufteilung anhand der optimalen bzw. suboptimalen Merkmalskombinationen. Optimal: NPM1mut/FLT3wt. Suboptimal: NPM1mut/FLT3mut; NPM1wt/FLT3wt; NPM1wt/FLT3mut. Zeitangaben in Monaten. Signifikant längeres DFS bei optimaler Merkmalskombination.

3.4 Verteilung von NPM1wt/mut und FLT3wt/mut auf die drei Karyotypen

Um einen Überblick über die Verteilung der Genmutationen auf die drei Karyotypen zu erhalten, wurden Kreuztabellen angelegt und Signifikanztests zur Überprüfung der Verallgemeinerbarkeit durchgeführt. 70% der FLT3 mutierten Patienten gehörten dem intermediären Karyotyp an und innerhalb dieses Karyotypes wies ein Drittel der Patienten eine FLT3-Mutation auf (33,3%). Der FLT3-Wildtyp wurde am häufigsten bei Patienten mit ungünstigem Karyotyp gefunden (46,8%), wobei insgesamt 90% der Patienten mit ungünstigem Karyotyp keine FLT3-ITD-Mutation aufwiesen. Die beschriebenen Verteilungen waren mit einem Likelihood-Quotient von $p=0,024$ signifikant. Weiterhin zeigte sich, dass die Mehrzahl der NPM1 mutierten Patienten (82,1%) ebenfalls dem intermediären Karyotyp angehörte, wobei die Verteilung innerhalb dieses Karyotypes mit 54,8% mutiertem zu 45,2% nicht mutiertem NPM1 fast ausgeglichen war. Patienten, die dem günstigen bzw. ungünstigen Karyotyp zugeordnet waren, wiesen mehrheitlich (93,3% bzw. 90%) den Wildtyp auf. Auch diese Beobachtungen lagen mit $p<0,001$ deutlich unterhalb des Signifikanzniveaus (siehe Tab. 3.1 und 3.2).

Tab. 3.1: Verteilung der FLT3-ITD-Mutation auf die drei Karyotypen.

		FLT3-ITD		Gesamt
		mutiert	wt	
günstiger Karyotyp	Anzahl	2	13	15
	% innerhalb Karyotyp	13,30%	86,70%	100,00%
	% innerhalb von FLT3-ITD	10,00%	16,90%	15,50%
	% der Gesamtzahl	2,10%	13,40%	15,50%
intermediärer Karyotyp	Anzahl	14	28	42
	% innerhalb Karyotyp	33,30%	66,70%	100,00%
	% innerhalb von FLT3-ITD	70,00%	36,40%	43,30%
	% der Gesamtzahl	14,40%	28,90%	43,30%
ungünstiger Karyotyp	Anzahl	4	36	40
	% innerhalb Karyotyp	10,00%	90,00%	100,00%
	% innerhalb von FLT3-ITD	14,30%	52,20%	41,20%
	% der Gesamtzahl	4,10%	37,10%	41,20%
Gesamt	Anzahl	20	77	97
	% innerhalb Karyotyp	20,60%	79,40%	100,00%
	% innerhalb von FLT3-ITD	100,00%	100,00%	100,00%
	% der Gesamtzahl	20,60%	79,40%	100,00%

70% der FLT3 mutierten Patienten gehörten dem intermediären Karyotyp an und innerhalb dieses Karyotypes wies ein Drittel der Patienten eine FLT3 Mutation auf (33,3%). Die Verteilungen waren mit einem Likelihood-Quotient von $p=0,024$ signifikant.

Tab. 3.2: Verteilung der NPM1-Mutation auf die drei Karyotypen.

		NPM1		Gesamt
		mutiert	wt	
günstiger Karyotyp	Anzahl	1	14	15
	% innerhalb Karyotyp	6,70%	93,30%	100,00%
	% innerhalb von NPM1	3,60%	20,30%	15,50%
	% der Gesamtzahl	1,00%	14,40%	15,50%
intermediärer Karyotyp	Anzahl	23	19	42
	% innerhalb Karyotyp	54,80%	45,20%	100,00%
	% innerhalb von NPM1	82,10%	27,50%	43,30%
	% der Gesamtzahl	23,70%	19,60%	43,30%
ungünstiger Karyotyp	Anzahl	4	36	40
	% innerhalb Karyotyp	10,00%	90,00%	100,00%
	% innerhalb von NPM1	14,30%	52,20%	41,20%
	% der Gesamtzahl	4,10%	37,10%	41,20%
Gesamt	Anzahl	28	69	97
	% innerhalb Karyotyp	28,90%	71,10%	100,00%
	% innerhalb von NPM1	100,00%	100,00%	100,00%
	% der Gesamtzahl	28,90%	71,10%	100,00%

Die Mehrzahl der NPM1 mutierten Patienten (82,1%) gehört dem intermediären Karyotyp an. Innerhalb des intermediären Karyotyps überwiegen nur knapp Patienten mit NPM1-Mutation (54,8% mutiertes zu 45,2% nicht mutiertes NPM1). Patienten, die dem günstigen bzw. ungünstigen Karyotyp zugeordnet waren, wiesen mehrheitlich (93,3% bzw. 90%) den Wildtyp auf. Likelihood-Quotient $p<0,001$.

3.5 mTOR-Signalweg

3.5.1 Auswertung der Genexpressionen des mTOR-Signalweg und seiner Zielgene

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen des Gesamtkollektivs dargestellt. Es wurde nach signifikanten Unterschieden zwischen hohem und niedrigem Genexpressionsniveau jedes Gens in Bezug auf das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Überleben gesucht, wobei als Schwellenwert der zuvor ermittelte Median des

jeweiligen Transkripts herangezogen wurde. Hohe Expression (high) bedeutet daher ein Expressionsniveau oberhalb des Medians und niedrige Expression (low) Messwerte unterhalb oder gleich des Medians. Zur Unterscheidung, ob eine hohe oder eine niedrige Genexpression zu besseren OS bzw. DFS führte, wurden die p-Werte in die jeweilige Zeile „high“ (höhere Expressionsraten zeigen bessere Ergebnisse) oder „low“ (niedrigere Expressionsraten zeigen bessere Ergebnisse) eingetragen.

Im Ergebnis zeigte sich, dass Patienten mit einer über dem Median liegenden Genexpression von TSC2 oder Raptor signifikant länger (OS) und auch krankheitsfrei (DFS) lebten. Eine hohe Expression von Akt, 4EBPI, PDK2 oder TSC1 führte zu einem längeren krankheitsfreien Überleben, hatte aber keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben (siehe Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Auflistung der Ergebnisse (p-Werte) des Log-rang-Tests der mTOR-Gene.

Genexpression		OS	DFS	N=107 (OS) N=79 (DFS)	Genexpression		OS	DFS
4EBP1	high	0,193	0,04		Rheb	high	0,201	0,121
	low				low			
Akt	high	0,234	0,009	Rictor	high	0,388		
	low				low		0,975	
FRAP1	high	0,336	0,492	SGK	high	0,089	0,086	
	low				low			
GSK3A	high	0,521	0,445	TSC1	high	0,306	0,026	
	low				low			
GSK3B	high	0,54	0,341	TSC2	high	0,016	0,006	
	low				low			
HIF1A	high	0,457		CIAP1	high	0,394	0,697	
	low		0,902		low			
IF4E	high	0,137	0,558	CIAP2	high	0,704		
	low				low		0,577	
mLST8/Gbl	high	0,686	0,121	XIAP	high	0,991	0,223	
	low				low			
p70S6K	high	0,451	0,561	Survivin	high		0,343	
	low				low	0,329		
PDK1	high	0,208		Cyclin D1	high	0,663	0,711	
	low		0,428		low			
PDK2	high	0,061	0,018	Cyclin D2	high	0,775		
	low				low		0,813	
PTEN	high	0,334		Cyclin D3	high			
	low		0,977		low	0,233	0,254	
Raptor	high	0,005	0,008					
	low							

In den Kaplan-Meier-Analysen wurden die Gruppen mit hoher und niedriger Genexpression verglichen. Die Aufteilung in die Gruppe hoch („high“) und in die Gruppe niedrig („low“) exprimierend erfolgte anhand des Medians des jeweiligen Gens. Zur Unterscheidung, ob eine hohe oder eine niedrige Genexpression zu besserem OS bzw. DFS führt, wurden die p-Werte in die jeweilige Zeile „high“ (höhere Expressionsraten zeigen bessere Ergebnisse) oder „low“ (niedrigere Expressionsraten zeigen bessere Ergebnisse) eingetragen. Signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) sind fett geschrieben und grau unterlegt.

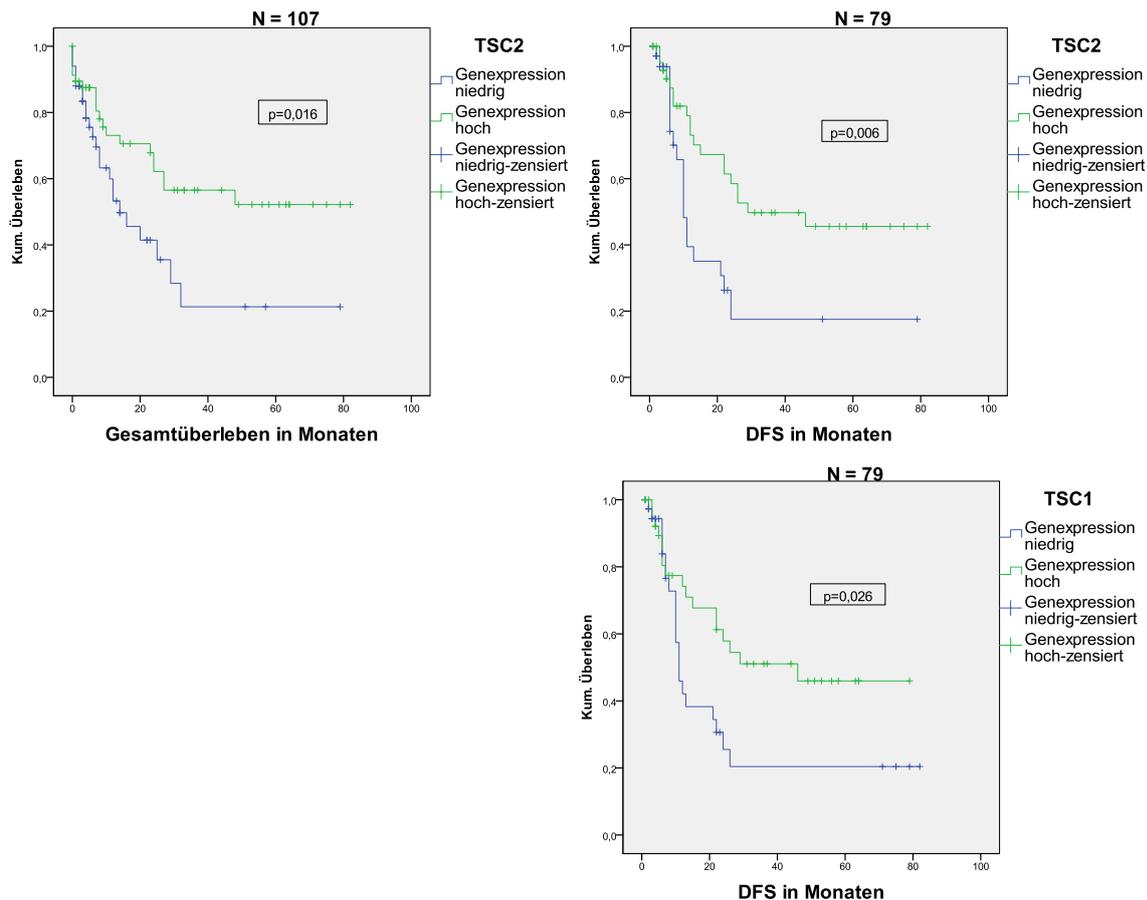


Abb. 3.11: Exemplarische Darstellung der Kaplan-Meier-Kurven von TSC2 (OS, DFS) und TSC1 (DFS). Die Gruppen mit hoher Genexpression (grüne Linie) zeigten jeweils einen signifikanten, positiven Einfluss auf die Prognose. Zeitangaben in Monaten.

3.5.2 Subgruppenanalysen

Weiterhin wurden zahlreiche Subgruppenanalysen durchgeführt, um mögliche Unterschiede in den Genexpressionsniveaus und deren Einfluss auf das Überleben innerhalb definierter Subgruppen zu detektieren. Kaplan-Meier-Analysen wurden daraufhin für folgende Subkollektive erstellt: Frauen/Männer, Karyotyp günstig/intermediär/ungünstig, FLT3wt/mut und NPM1wt/mut. Als Schwellenwert zwischen hoher und niedriger Genexpression wurde erneut der Median des jeweiligen Transkripts herangezogen.

In den folgenden Tabellen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die Ergebnisse mit einem p-Wert kleiner 0,1 dargestellt.

Bei der univariaten Analyse mittels Kaplan-Meier-Methode und log-rang-Test ergab sich in der Gruppe der Männer ein signifikant längeres Gesamtüberleben ($p=0,036$) bei hoher Raptor-Expression und ein signifikant längeres krankheitsfreies Überleben bei hoher TSC2-Expression ($p=0,01$). Bei Frauen wurde das krankheitsfreie Überleben durch hohe Expressionsniveaus von Akt ($p=0,011$) und TSC1 ($p=0,015$) signifikant verbessert (siehe Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Darstellung der Ergebnisse (p-Werte) des log-rang-Tests für OS und DFS in den nach Geschlecht aufgeteilten Subgruppen „Männer und Frauen“.

Männer (N=53;37)

Genexpression		OS	DFS
Raptor	high	0,036	0,093
	low		
TSC2	high		0,01
	low		
Survivin	high	0,08	
	low		

Frauen (N=54;42)

Genexpression		OS	DFS
4EBP1	high		0,079
	low		
Akt	high		0,011
	low		
IF4E	high		0,057
	low		
PDK2	high		0,062
	low		
Raptor	high	0,088	0,062
	low		
TSC1	high		0,015
	low		

Aufteilung in „high“ und „low“ wie in Tabelle 3.3 beschrieben. Ausschließliche Darstellung der Gene, bei denen ein p-Wert $< 0,1$ errechnet wurde. Fallzahl: (N=OS;DFS).

Der Kategorie des günstigen Karyotyps konnten nur 15 Patienten zugeordnet werden. Daher kam es vor allem bei der Analyse des Gesamtüberlebens häufig dazu, dass in einer Gruppe (hohe vs. niedrige Expression) alle Fälle zensiert waren. Die Ergebnisse wurden in solchen Fällen mit einem „z“ markiert. Es ergaben sich ein signifikant bessere Ergebnisse im Gesamtüberleben für hoch exprimiertes IF4E ($p=0,006$). Ein niedriges Expressionsniveau von Cyclin D3 führte zu einem deutlich längerem krankheitsfreien Überleben ($p=0,038$).

Bei Patienten mit intermediärem Karyotyp zeigten sich für hohe Transkripte von PDK2, Raptor und TSC2 signifikant bessere Ergebnisse sowohl im Gesamt- als auch im krankheitsfreien Überleben. Akt, mLST8, SGK und TSC1 zeigten ein signifikant längeres krankheitsfreies Überleben bei hohen Expressionswerten.

In der Gruppe des ungünstigen Karyotyps ergab eine niedrige TSC1-Expression ein signifikant längeres Gesamtüberleben. Schließlich verlängerte XIAP bei hohem Transkript signifikant das krankheitsfreie Überleben (siehe Tab. 3.5).

Tab. 3.5: Darstellung der Ergebnisse (p-Werte) des log-rang-Tests für OS und DFS in den nach Karyotyp aufgeteilten Subgruppen „günstig“, „intermediär“ und „ungünstig“.

Karyotyp günstig (N=15;14)				Karyotyp intermediär (N=44;38)			
Genexpression		OS	DFS	Genexpression		OS	DFS
HIF1A	high	0,055z		4EBP1	high		0,053
	low				low		
IF4E	high	0,006z		Akt	high		0,004
	low				low		
PDK1	high	0,055z		mLST8	high		0,006
	low				low		
PTEN	high	0,099z		PDK2	high	0,019	0,004
	low				low		
Rictor	high	0,078z		Raptor	high	0,004	<0,001
	low				low		
Cyclin D3	high			SGK	high	0,085	0,073
	low	0,055z	0,038	low			
Karyotyp ungünstig (N=40;26)				TSC1	high	0,096	0,033
Genexpression		OS	DFS	low			
TSC1	high			TSC2	high	0,003	0,001
	low	0,019		low			
XIAP	high	0,081	0,036z				
	low						

Aufteilung wie in Tabelle 3.3 beschrieben. Ausschließliche Darstellung der Gene, bei denen ein p-Wert < 0,1 errechnet wurde. Fallzahl: (N= OS;DFS). „z“: bei kleiner Fallzahl sind in einer der beiden Gruppen alle Fälle zensiert.

Bei der Unterteilung des Kollektivs anhand des Mutationsstatus von FLT3 und NPM1 ergaben sich folgende Signifikanzen. Patienten mit FLT3wt zeigten ein längeres krankheitsfreies Überleben, wenn sie ein hohes Transkript von Akt, PDK, TSC2 oder Raptor aufwiesen. Bei letzterem konnte zudem ein positiver Einfluss auf das Gesamtüberleben nachgewiesen werden. Nicht mutiertes FLT3 in Kombination mit einer niedrigen Expression von Cyclin D3 ergab ebenfalls ein signifikant längeres Gesamtüberleben. In der Subgruppe der FLT3 mutierten konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genexpressionen gefunden werden. Bei Patienten ohne NPM1-Mutation hatte lediglich ein hohes TSC2-Transkript einen positiven Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben. Lag eine NPM1-Mutation vor, führten hohe Expressionsniveaus von 4EBP1 (p=0,01z) und Akt (p=0,046) zu einem verbesserten krankheitsfreien Überleben und von PDK2 zu einem längeren Gesamtüberleben (p=0,029) (siehe Tab. 3.6).

Tab. 3.6: Darstellung der Ergebnisse (p-Werte) des log-rang-Tests für OS und DFS in den anhand des Mutationsstatus von FLT3 bzw. NPM1 aufgeteilten Subgruppen in „FLT3wt“, „FLT3mut“, „NPM1wt“ und „NPM1mut“.

FLT3wt (N=84;62)

Genexpression		OS	DFS
4EBP1	high		0,063
	low		
Akt	high		0,023
	low		
PDK2	high		0,007
	low		
Raptor	high	0,018	0,007
	low		
Rheb	high		0,056
	low		
TSC1	high		0,089
	low		
TSC2	high	0,065	0,002
	low		
Cyclin D3	high		0,041
	low		

NPM1wt (N=76;55)

Genexpression		OS	DFS
4EBP1	high		0,051
	low		
GSK3B	high		0,052
	low		
Raptor	high	0,064	
	low		
TSC2	high		0,024
	low		
Cyclin D3	high		0,055
	low	0,067	

FLT3mut (N=21;16)

Genexpression		OS	DFS
Survivin	high		0,04
	low		

NPM1mut (N=29;23)

Genexpression		OS	DFS
4EBP1	high		0,01z
	low		
Akt	high		0,046
	low		
mLST8	high	0,08	0,064
	low		
PDK2	high	0,029	0,09
	low		
Raptor	high		0,087
	low		
SGK	high	0,057	
	low		
TSC1	high	0,061	
	low		
TSC2	high	0,061	
	low		

Aufteilung wie in Tabelle 3.3 beschrieben. Ausschließliche Darstellung der Gene, bei denen ein p-Wert < 0,1 errechnet wurde. Fallzahl: (N= OS;DFS). „z“: bei kleiner Fallzahl sind in einer der beiden Gruppen alle Fälle zensiert.

3.5.3 Mann-Whitney-U-Test zur Beurteilung der Genexpressionsniveaus bei FLT3(wt/mut) und NPM1(wt/mut)

Zur Klärung der Frage, ob es signifikante Unterschiede bei der Genexpression zwischen den Patienten mit einer Mutation (mut) und jenen ohne Mutation (wt) des FLT3 oder NPM1-Genlokus gab, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. In den anschließenden Tabellen 3.7 und 3.8 sind die Ergebnisse als Übersicht dargestellt.

FLT3wt/mut:

Es zeigte sich eine jeweils signifikant höhere Genexpression von GSK3B, Rheb und Cyclin D1 bei Patienten mit FLT3-Wildtyp ($p=0,011$, $p=0,032$ und $p=0,043$) (siehe Tab. 3.7).

Tab. 3.7: Darstellung der Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests von FLT3wt/mut.

	4EBP1	Akt	FRAP1	GSK3A	GSK3B	HIF1A	IF4E
Genexpression bei Mutation	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
p-Wert	0,065	0,68	0,405	0,394	0,011	0,126	0,634

	mLST8	p70S6K	PDK1	PDK2	PTEN	Raptor	Rheb
Genexpression bei Mutation	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
p-Wert	0,336	0,393	0,1	0,064	0,153	0,135	0,032

	Rictor	SGK	TSC1	TSC2	CIAP1	CIAP2	Cyclin D1
Genexpression bei Mutation	↓	↔	↓	↓	↑	↓	↓
p-Wert	0,127	0,909	0,671	0,313	0,274	0,84	0,043

	Cyclin D2	Cyclin D3	Survivin	XIAP
Genexpression bei Mutation	↑	↓	↓	↔
p-Wert	0,816	0,752	0,342	0,131

Bedeutung der Pfeile: „↓“ Genexpression ist bei FLT3-Mutation niedriger als beim Wildtyp. „↑“ Genexpression ist bei FLT3-Mutation höher als beim Wildtyp. „↔“ kein Unterschied der Genexpression zwischen Mutation und Wildtyp. Signifikante Ergebnisse ($p<0,05$) sind fett geschrieben und grau unterlegt.

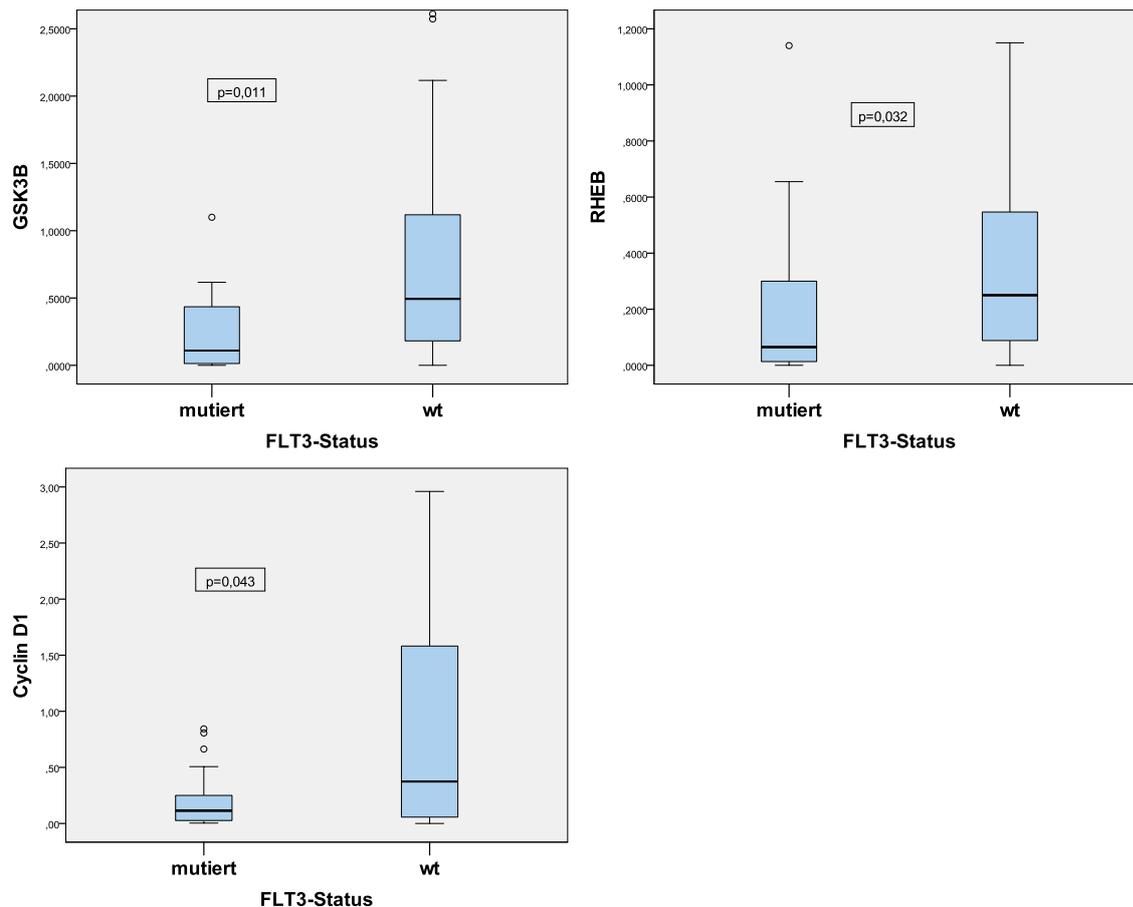


Abb. 3.12: Boxplots der signifikanten Ergebnisse aus dem Mann-Whitney-U-Test zur Überprüfung der Verteilung der Genexpressionsniveaus zwischen Mutation und Wildtyp.

NPM1wt/mut:

Bei der Analyse des NPM1-Status ergab sich ein signifikanter Unterschied bei FRAP1, TSC2 sowie Cyclin D1 und D2 ($p=0,042$, $p=0,039$, $p=0,015$ und $p=0,045$). Die Genexpressionen von FRAP1 und TSC2 waren bei Vorliegen einer NPM1-Mutation signifikant höher, während Cyclin D1 und Cyclin D2 niedriger exprimiert waren (siehe Tab. 3.8).

Tab. 3.8: Darstellung der Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests von NPM1wt/mut.

	4EBP1	Akt	FRAP1	GSK3A	GSK3B	HIF1A	IF4E
Genexpression bei Mutation	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↓
p-Wert	0,19	0,105	0,042	0,22	0,141	0,994	0,566

	mLST8	p70S6K	PDK1	PDK2	PTEN	Raptor	Rheb
Genexpression bei Mutation	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
p-Wert	0,08	0,322	0,717	0,167	0,501	0,094	0,185

	Rictor	SGK	TSC1	TSC2	CIAP1	CIAP2	Cyclin D1
Genexpression bei Mutation	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↓
p-Wert	0,451	0,075	0,222	0,039	0,489	0,632	0,015

	Cyclin D2	Cyclin D3	Survivin	XIAP
Genexpression bei Mutation	↓	↓	↓	↓
p-Wert	0,045	0,443	0,675	0,98

Bedeutung der Pfeile: „↓“ Genexpression ist bei NPM1-Mutation niedriger als beim Wildtyp. „↑“ Genexpression ist bei NPM1-Mutation höher als beim Wildtyp. „↔“ kein Unterschied der Genexpression zwischen Mutation und Wildtyp. Signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) sind fett geschrieben und grau unterlegt.

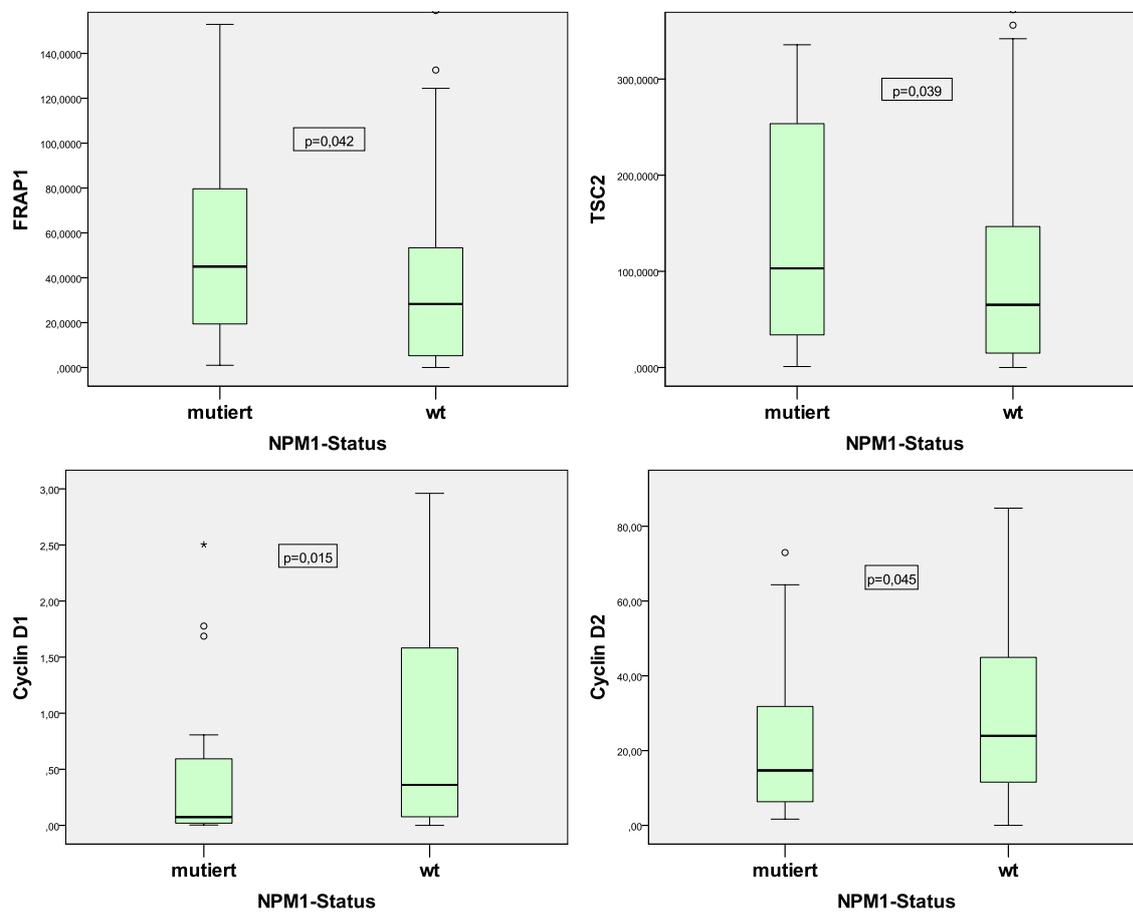


Abb. 3.13: Boxplots der signifikanten Ergebnisse aus dem Mann-Whitney-U-Test zur Überprüfung der Verteilung der Genexpressionsniveaus zwischen Mutation und Wildtyp.

3.5.4 Erreichen einer CR nach 1. Induktion

60 von 90 Patienten erreichten eine komplette Remission nach 1. Induktion. Mögliche Einflüsse der Gene des mTOR-Signalweges auf das Erreichen einer kompletten Remission nach 1. Induktion wurden mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert. Patienten, welche nicht auf die 1. Induktion angesprochen hatten, zeigten signifikant höhere Expressionsniveaus von Cyclin D1 ($p=0,001$), Cyclin D2 ($p=0,002$) und Survivin ($p<0,001$). Bei hoher Expression von PDK1 ergab sich lediglich eine Tendenz zum Nicht-Ansprechen auf die 1. Induktion ($p=0,087$).

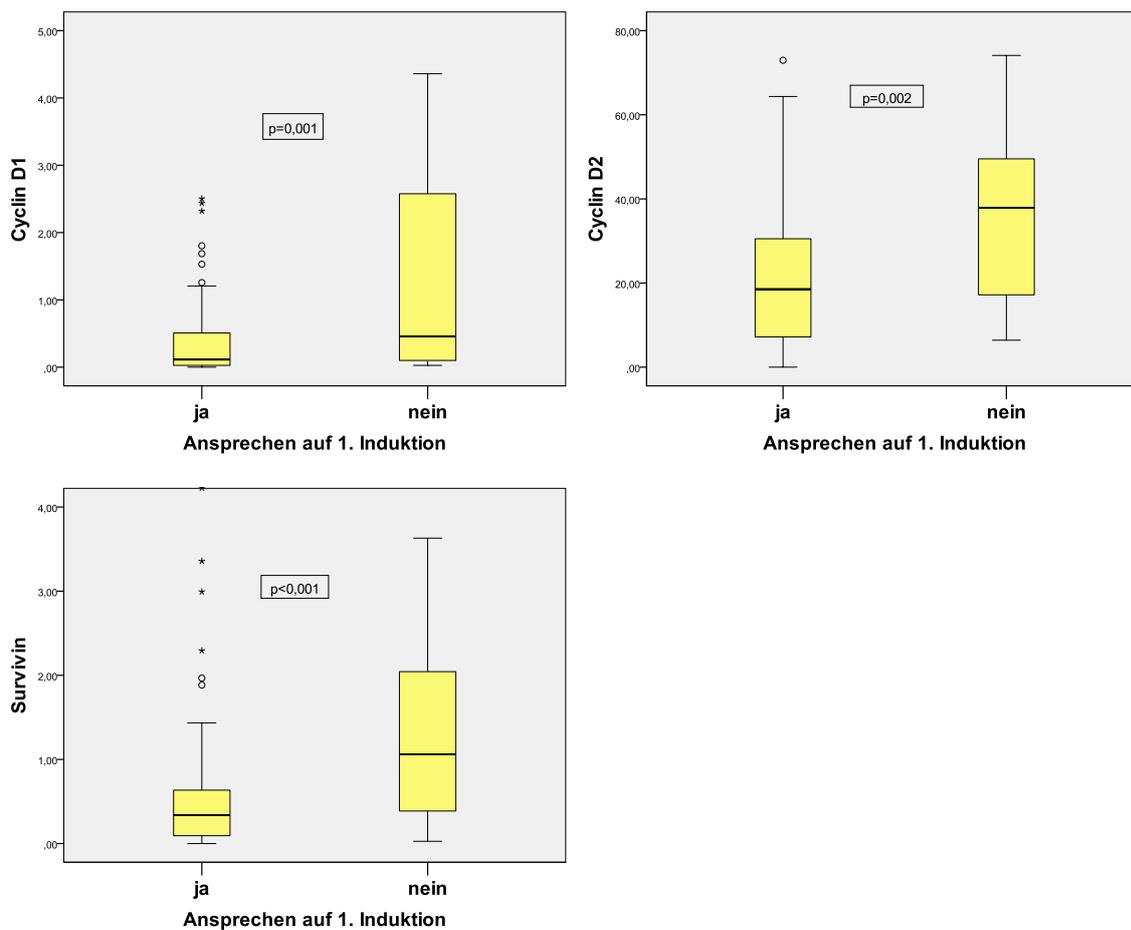


Abb. 3.14: Boxplots der signifikanten Ergebnisse des Mann-Whitney-U Test zum Einfluss der Genexpression auf das Erreichen einer CR nach 1. Induktionstherapie.

3.6 Analyse einzelner interessanter Gene

Aufgrund der vorausgegangenen Analysen erschienen als mögliche prognostische Faktoren insbesondere TSC1 und TSC2 von Interesse. Beide hatten bei hoher Expression in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben signifikant bessere Ergebnisse gezeigt. Ein hohes TSC2-Transkript hatte sich zudem als signifikanter Marker für ein längeres Gesamtüberleben herausgestellt. Zudem war ein interessanter Zusammenhang mit der NPM1-Mutation aufgefallen.

3.6.1 TSC1/2-Interaktionsvariable

Daher wurde für diese beiden Gene eine Interaktionsvariable gebildet und deren prognostischer Einfluss anhand von Überlebenszeitanalysen untersucht. Als optimale Kombination wurde das Auftreten von hoher TSC1- und hoher TSC2-Expression angenommen. Die optimale Merkmalskombination aus hoher Genexpression von TSC1 und TSC2 ergab ein signifikant längeres krankheitsfreies Überleben ($p=0,035$), während sich bei der Analyse des Gesamtüberleben mit $p=0,155$ kein Vorteil ergab.

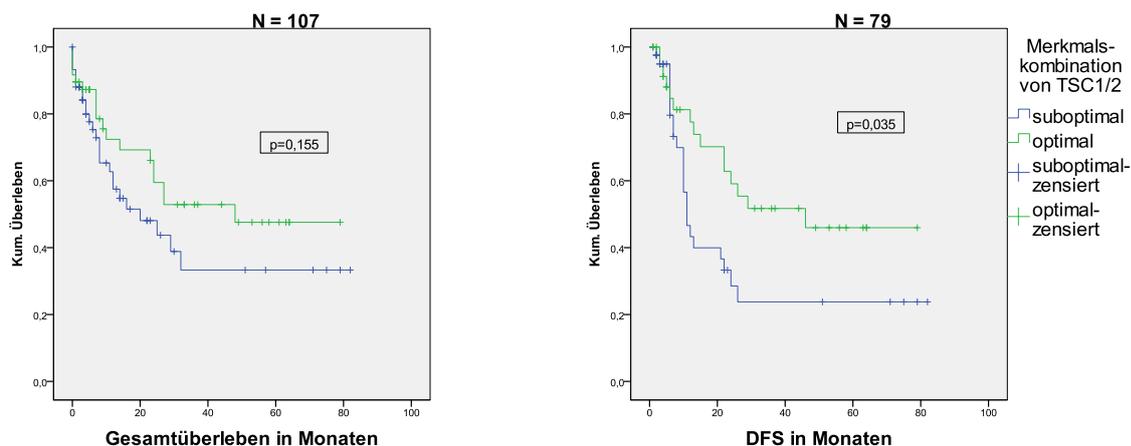


Abb. 3.15: Kaplan-Meier-Analysen der Interaktionsvariable aus hoher bzw. niedriger Genexpression von TSC1 und TSC2. Optimale Merkmalskombination: hohe Genexpression von TSC1 und TSC2. Suboptimale Merkmalskombination: TSC1 niedrig/TSC2 hoch; TSC1niedrig/TSC2 niedrig; TSC1 hoch/TSC2 niedrig. Zeitangaben in Monaten. Optimale Kombination zeigt signifikant längeres DFS. Beschreibung zur Einteilung hoch/niedrig siehe Tabelle 3.3.

3.6.2 Vergleich der TSC1- und TSC2-Genexpression zwischen ED und Rezidiv

Aufgrund der interessanten Ergebnisse der Kaplan-Meier-Analysen von TSC1 und TSC2 wurde anschließend auch auf einen möglichen Unterschied ihrer Genexpressionsniveaus zwischen Erstdiagnose und Rezidiv hin untersucht.

Tab. 3.9: Darstellung des Verhaltens der Genexpression von TSC1 und TSC2 im Rezidiv.

ungepaarter Vergleich	Genexpression im Rezidiv	p-Wert
TSC1	↓	0,013
TSC2	↓	0,01
gepaarter Vergleich		
TSC1	↓	0,221
TSC2	↓	0,048

Oben ungepaarter Vergleich. Unten gepaarter Vergleich. Pfeil ↓: Genexpression ist im Rezidiv niedriger als bei Erstdiagnose. Signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) sind fett geschrieben und grau unterlegt.

Dazu kam für den ungepaarten Vergleich der Mann-Whitney-U-Test und für den gepaarten Vergleich der Wilcoxon-Test zur Anwendung. Für den ungepaarten Vergleich standen 108 Erstdiagnoseproben und 18 Rezidivproben zur Verfügung. Es zeigte sich, dass sowohl TSC1 ($p=0,013$) als auch TSC2 ($p=0,01$) im Rezidiv signifikant niedriger exprimiert waren. Für den gepaarten Vergleich standen insgesamt 18 Probenpaare zur Verfügung. Hierbei ergab sich nur noch für TSC2 eine signifikant niedrigere Genexpression im 1. Rezidiv ($p=0,048$) (siehe Tab. 3.9).

3.7 Bcl-2 Genfamilie

3.7.1 Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen des Gesamtkollektivs

Um einen möglichen prognostischen Einfluss des Genexpressionsniveaus auf das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Leben zu untersuchen, wurden für eine Vielzahl von Genen der Bcl-2-Familie Kaplan-Meier-Analysen durchgeführt. Im Folgenden sind die Ergebnisse tabellarisch dargestellt (siehe Tab. 3.10). Als Schwellenwert zwischen den beiden Kategorien hohe/niedrige Expression wurde erneut der jeweilige Median gewählt.

Tab. 3.10: Auflistung der Ergebnisse (p-Werte) des Log-rang-Tests der Bcl-2-Genfamilie.

Antiapoptotisch:				N=107 (OS) N=79 (DFS)	Proapoptotisch:			
Genexpression		OS	DFS		Genexpression		OS	DFS
Bcl-2	high	0,172		Bcl-rambo	high	0,129	0,429	
	low		0,999		low			
Bcl-b	high	0,306	0,718	Bfk	high	0,387		
	low			low			0,472	
Bcl-w	high			Itm2b	high			
	low	0,622	0,118	low		0,684	0,843	
Bcl-xl	high		0,098	Bid	high	0,255	0,453	
	low	0,707		low				
Bfl-1/a1	high	0,904		Nbk/Bik	high	0,114	0,226	
	low		0,877	low				
Mcl-1	high	0,152	0,307	Bim	high		0,744	
	low			low		0,546		
Proapoptotisch:					Bmf	high		
Genexpression		OS	DFS		low	0,037	0,035	
Bak	high			Hrk	high			
	low	0,518	0,851	low		0,631	0,969	
Bax	high	0,338		nix	high	0,987	0,882	
	low		0,963	low				
Bok	high			Noxa	high			
	low	0,853	0,329	low		0,788	0,649	
Bcl-g	high			Puma	high			
	low	0,782	0,676	low		0,694	0,679	
				Spike	high			
				low		0,336	0,56	
				Bad	high	0,926	0,776	
				low				

In den Kaplan-Meier-Analysen wurden die Gruppen mit hoher und niedriger Genexpression verglichen. Die Aufteilung in die Gruppe hoch („high“) und in die Gruppe niedrig („low“) exprimierend erfolgte anhand des Medians des jeweiligen Gens. Zur Unterscheidung, ob eine hohe oder eine niedrige Genexpression zu besserem OS bzw. DFS führt, wurden die p-Werte in die jeweilige Zeile „high“ (höhere Expressionsraten zeigen bessere Ergebnisse) oder „low“ (niedrigere Expressionsraten zeigen bessere Ergebnisse) eingetragen. Signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) sind fett geschrieben und grau unterlegt.

Im Gesamtkollektiv konnte als einziges Gen für Bmf ein signifikanter Einfluss auf OS und DFS ermittelt werden ($p=0,037$ bzw. $p=0,035$).

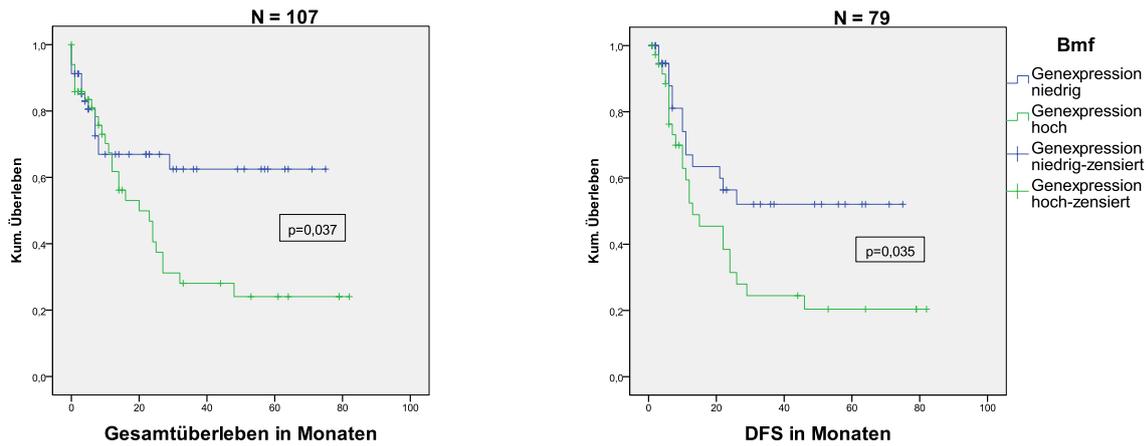


Abb. 3.16: Kaplan-Meier-Analysen zum Vergleich hoher und niedriger Bmf-Genexpression beim Gesamtkollektiv. Beschreibung der Aufteilung in hoch/niedrig siehe Abb.3.3. Ein niedriges Bmf-Transkript zeigt signifikant längeres OS und DFS. Zeitangaben in Monaten.

Da extreme Schwellenwerte in der Vergangenheit bei der Auswertung anderer Tumorentitäten bereits Anwendung gefunden haben und hierdurch legitimiert sind, wurden in dieser Arbeit bei den Mitgliedern der Bcl-2-Genfamilie zusätzliche Analysen mit extremen Schwellenwerte bei 10. und 20. Perzentile durchgeführt. Dabei fanden sich für Nbk/Bik in den jeweils höher exprimierenden Gruppen erwähnenswerte Ergebnisse mit signifikant besserem krankheitsfreien Überleben ($p=0,012$, $p=0,027$) (siehe Tab. 3.11).

Tab. 3.11: Darstellung der p-Werte des log-rang-Tests zu OS und DFS von Nbk/Bik bei Verwendung der 10. bzw. 20. Perzentile als Schwellenwert.

	Expression	10.Perzentile		20.Perzentile	
		OS	DFS	OS	DFS
Nbk/Bik	high	0,67	0,012	0,547	0,027
	low				

Die Aufteilung in die Gruppe hoch („high“) und in die Gruppe niedrig („low“) exprimierend erfolgte anhand der 10. bzw. 20.Perzentile. Zur Unterscheidung, ob eine hohe oder eine niedrige Genexpression zu besserem OS bzw. DFS führt, wurden die p-Werte in die jeweilige Zeile „high“ (höhere Expressionsraten zeigen bessere Ergebnisse) oder „low“ (niedrigere Expressionsraten zeigen bessere Ergebnisse) eingetragen. Signifikante Ergebnisse ($p<0,05$) sind fett geschrieben und grau unterlegt.

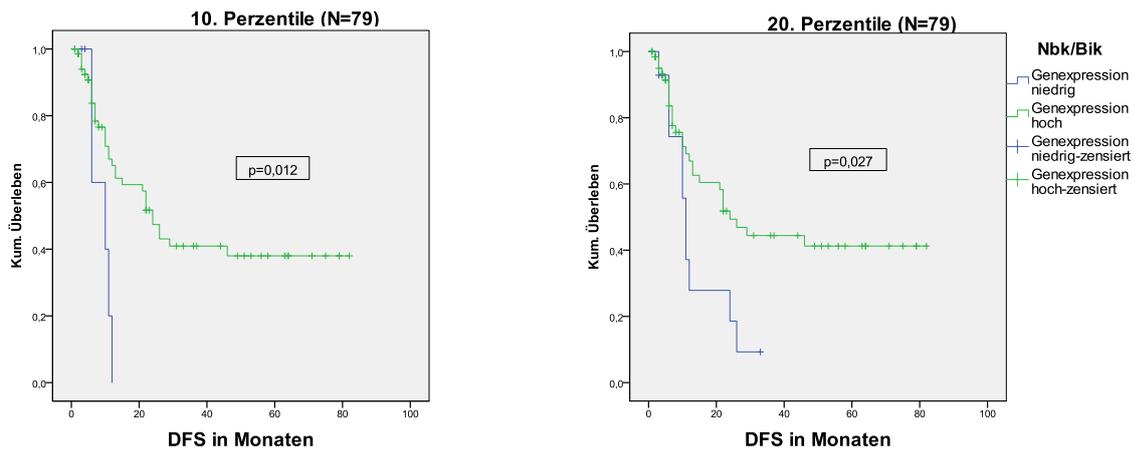


Abb. 3.17: Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurven zum Vergleich vom krankheitsfreien Überleben bei hoher bzw. niedriger Nbk/Bik-Expression. Eine hohe Nbk/Bik-Expression zeigt sowohl beim Schwellenwert der 10. als auch der 20. Perzentile ein signifikant besseres DFS.

3.7.2 Subgruppenanalysen

Weiterhin wurden mehrere Subgruppenanalysen wie bereits unter 3.5.2 erläutert durchgeführt.

In den folgenden Tabellen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die Ergebnisse mit einem p-Wert kleiner 0,1 dargestellt.

Bei der univariaten Analyse mittels Kaplan-Meier-Methode und log-rang-Test ergab sich in der Gruppe der Männer kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der Expressionsniveaus. Bei Frauen ging ein niedriges Transkript von Bim mit einem signifikant längeren Gesamtüberleben ($p=0,04$) einher (siehe Tab. 3.12).

Tab. 3.12: Darstellung der Ergebnisse (p-Werte) des log-rang-Tests für OS und DFS in den nach Geschlecht aufgeteilten Subgruppen „Männer und Frauen“.

Männer (N=53;37)

Genexpression		OS	DFS
Bcl-b	high	0,068	
	low		

Frauen (N=54;42)

Genexpression		OS	DFS
Bcl-xl	high		0,074
	low		
Bim	high		
	low		0,04

Aufteilung in „high“ und „low“ wie in Tabelle 3.3 beschrieben. Ausschließliche Darstellung der Gene, bei denen ein p-Wert < 0,1 errechnet wurde. Fallzahl: (N=OS;DFS).

Bei der Analyse der drei Karyotypsubgruppen ergab sich beim günstigen Karyotyp ein signifikant längeres krankheitsfreies Überleben bei niedriger Bok-Expression ($p=0,036$). In der Gruppe des intermediären Karyotyps ging ein niedriges Expressionsniveau von Bmf sowohl mit einem längeren Gesamt- als auch krankheitsfreien Überleben einher ($p=0,001$ bzw. $p=0,026$). Schließlich zeigte sich bei Vorliegen eines ungünstigen Karyotyps ein positiver Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben, wenn Patienten ein niedriges Bcl-g Transkript aufwiesen ($p=0,037$) (siehe Tab.3.13).

Tab. 3.13: Darstellung der Ergebnisse (p-Werte) des log-rang-Tests für OS und DFS in den nach Karyotyp aufgeteilten Subgruppen „günstig“, „intermediär“ und „ungünstig“.

Karyotyp günstig (N=15;14)

Genexpression		OS	DFS
Bax	high		
	low		0,054z
Bok	high		
	low		0,036
Bad	high		
	low	0,078z	

Karyotyp intermediär (N=44;38)

Genexpression		OS	DFS
Bak	high		
	low	0,093	
Bcl-xl	high		0,055
	low		
Bmf	high		
	low	0,001	0,026
Spike	high		
	low	0,073	

Karyotyp ungünstig (N=40;26)

Genexpression		OS	DFS
Bcl-g	high		
	low		0,037
Noxa	high	0,079	
	low		

Aufteilung wie in Tabelle 3.3 beschrieben. Ausschließliche Darstellung der Gene, bei denen ein p-Wert $< 0,1$ errechnet wurde. Fallzahl: (N= OS;DFS). „z“: bei kleiner Fallzahl sind in einer der beiden Gruppen alle Fälle zensiert.

In der Subgruppe der Patienten mit FLT3-Wildtyp zeigten sich bei niedriger Bmf-Expression signifikant bessere Ergebnisse beim krankheitsfreien und beim Gesamtüberleben ($p=0,041$ bzw. $p= 0,03$), wohingegen sich bei FLT3-Mutation keine Unterschiede ergaben (siehe Tab. 3.14).

Patienten mit NPM1-Wildtyp wiesen ein verlängertes krankheitsfreies Überleben auf, wenn Bcl-w niedrig exprimiert war ($p=0,036$). Bei Vorliegen einer NPM1-Mutation hatten hohe Transkripte von Bim und Puma einen positiven Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben, wobei durch die kleine Fallzahl in beiden Fällen in der hoch exprimierenden Gruppe alle Fälle zensiert waren. Bcl-xl führte, wenn hoch exprimiert, zu längerem Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben ($p= 0,013$ bzw. $p=0,01$) (siehe Tab. 3.14).

Tab. 3.14: Darstellung der Ergebnisse (p-Werte) des log-rang-Tests für OS und DFS in den anhand des Mutationsstatus von FLT3 bzw. NPM1 aufgeteilten Subgruppen in „FLT3wt“, „FLT3mut“, „NPM1wt“ und „NPM1mut“.

FLT3wt (N=84;62)

Genexpression		OS	DFS
Bmf	high		
	low	0,03	0,041

NPM1wt (N=76;55)

Genexpression		OS	DFS
Bcl-xl	high		
	low	0,081	
Bcl-w	high		
	low		0,036

FLT3mut (N=21;16)

Genexpression		OS	DFS
Bcl-xl	high		0,086z
	low		

NPM1mut (N=29;23)

Genexpression		OS	DFS
Bcl-xl	high	0,013	0,01
	low		
Bim	high		0,022z
	low		
Bmf	high		
	low		0,081
Hrk	high		0,081
	low		
Mcl-1	high	0,06	
	low		
Puma	high		0,049z
	low		
Spike	high		
	low	0,077	
Bad	high	0,094	0,69
	low		

Aufteilung wie in Tabelle 3.3 beschrieben. Ausschließliche Darstellung der Gene, bei denen ein p-Wert < 0,1 errechnet wurde. Fallzahl: (N= OS;DFS). „z“: bei kleiner Fallzahl sind in einer der beiden Gruppen alle Fälle zensiert.

3.7.3. Mann-Whitney-U-Test zur Beurteilung der Genexpressionsniveaus bei FLT3(wt/mut) und NPM1(wt/mut)

Im Rangkorrelationstest fand sich in Bezug auf den FLT3-Status kein signifikanter Unterschied der Genexpression der Bcl2-Familie (siehe Tab. 3.15). Patienten mit NPM1-Wildtyp hatten eine signifikant höhere Bcl-g-Expression als NPM1 mutierte (p=0,012), während das Expressionsniveau von Nbk/Bik bei NPM1mut signifikant höher war (p=0,043). Bei Bfl-1/A1, Bok und Puma zeigte sich eine Tendenz zu höherer Genexpression beim NPM1-Wildtyp (siehe Tab. 3.16).

Tab. 3.15: Darstellung der Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests von FLT3wt/mut.

antiapoptotisch:	bcl-2	bcl-b	bcl-w	bcl-xl	bfl1/A1	mcl-1
Genexpression bei Mutation	↓	↑	↔	↓	↓	↓
p-Wert	0,968	0,659	0,438	0,265	0,823	0,785

proapoptotisch:	bax	bak	bok	bcl-g	bcl-rambo	bmf	bfk
Genexpression bei Mutation	↓	↑	↑	↔	↓	↓	↓
p-Wert	0,476	0,841	0,621	0,429	0,203	0,486	0,427

proapoptotisch:	nbk/bik	spike	hrk	puma	nox	bid	bim
Genexpression bei Mutation	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↑
p-Wert	0,176	0,493	0,385	0,628	0,308	0,904	0,574

proapoptotisch:	itm2b	nix	bad
Genexpression bei Mutation	↑	↑	↑
p-Wert	0,99	0,559	0,780

Bedeutung der Pfeile: „↓“ Genexpression ist bei FLT3-Mutation niedriger als beim Wildtyp. „↑“ Genexpression ist bei FLT3-Mutation höher als beim Wildtyp. „↔“ kein Unterschied der Genexpression zwischen Mutation und Wildtyp.

Tab. 3.16: Darstellung der Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests von NPM1wt/mut.

antiapoptotisch:	bcl-2	bcl-b	bcl-w	bcl-xl	bfl1/A1	mcl-1
Genexpression bei Mutation	↓	↑	↔	↓	↓	↓
p-Wert	0,538	0,085	0,678	0,41	0,087	0,398

proapoptotisch:	bax	bak	bok	bcl-g	bcl-rambo	bmf	bfk
Genexpression bei Mutation	↑	↑	↓	↓	↑	↓	↓
p-Wert	0,394	0,646	0,057	0,012	0,173	0,559	0,755

proapoptotisch:	nbk/bik	spike	hrk	puma	nox	bid	bim
Genexpression bei Mutation	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↓
p-Wert	0,043	0,471	0,281	0,051	0,669	0,742	0,586

proapoptotisch:	itm2b	nix	bad
Genexpression bei Mutation	↑	↓	↓
p-Wert	0,485	0,566	0,712

Bedeutung der Pfeile: „↓“ Genexpression ist bei NPM1-Mutation niedriger als beim Wildtyp. „↑“ Genexpression ist bei NPM1-Mutation höher als beim Wildtyp. „↔“ kein Unterschied der Genexpression zwischen Mutation und Wildtyp. Signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) sind fett geschrieben und grau unterlegt.

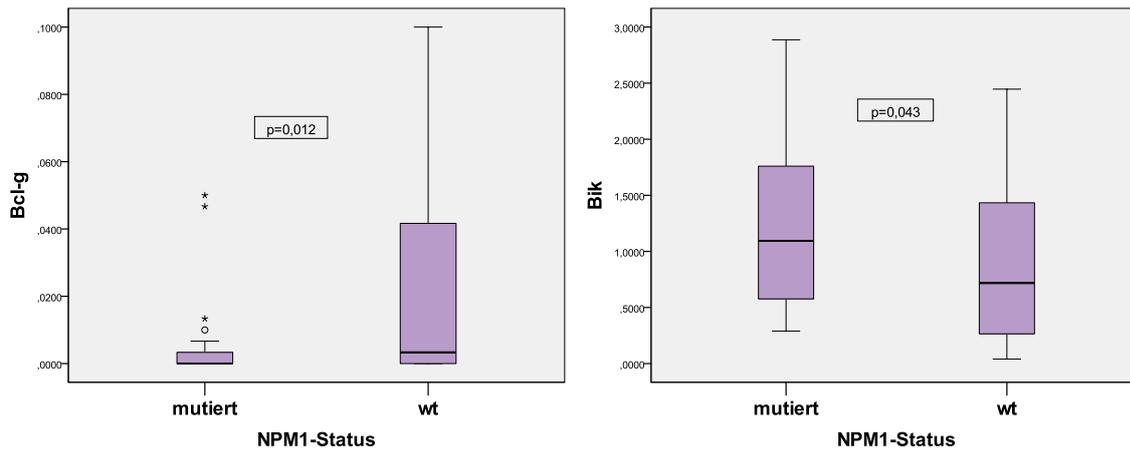


Abb. 3.18: Boxplots der signifikanten Ergebnisse aus dem Mann-Whitney-U-Test zur Überprüfung der Verteilung der Genexpressionsniveaus zwischen Mutation und Wildtyp.

3.7.4 Vergleich der Höhe der Genexpressionen zwischen ED und Rezidiv

3.7.4.1 Ungepaarter Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test

Bei der Analyse des ungepaarten Vergleichs zwischen den Genexpressionsniveaus von Erstdiagnose und Rezidiv lagen zur Auswertung 108 Proben der ED und 18 Proben des 1. Rezidivs vor.

Bei den antiapoptotisch wirkenden Genen zeigte Bcl-2 bei ED eine signifikant höhere Genexpression als beim 1. Rezidiv. Im Gegensatz dazu wiesen Bcl-w, Bfl1/A1 und Mcl-1 im Rezidiv signifikant höhere Expressionsniveaus auf.

In der Gruppe der proapoptotisch wirksamen Gene ergaben sich ebenfalls mehrere signifikante Unterschiede zwischen ED und Rezidiv. Bax und Bfk zeigten bei ED höhere Expressionen wohingegen bei Bok, Hrk, Puma, Bim, Itm2B und Nix höhere Expressionen beim 1. Rezidiv gemessen wurden (siehe Tab. 3.17 und Abb. 3.19).

Tab. 3.17: Darstellung des Expressionsverhaltens aller Bcl-2 Gene im Rezidiv.

Antiapoptotische Gene:	Genexpression im Rezidiv	p-Wert
bcl-2	↓	0,012
bcl-b	↓	0,492
bcl-w	↑	0,003
bcl-xl	↑	0,165
bfl1/A1	↑	0,046
mcl-1	↑	<0,001

Proapoptotische Gene:	Genexpression im Rezidiv	p-Wert
bax	↓	0,041
bak	↓	0,302
bok	↑	0,048
bcl-g	↓	0,771
bcl-rambo	↓	0,151
bfk	↓	0,014
itm2B	↑	0,047
bid	↑	0,183
nbk/bik	↑	0,451
bim	↑	0,007
bmf	↑	0,292
hrk	↑	0,004
nix	↑	0,046
noxa	↓	0,775
puma	↑	0,005
spike	↑	0,453
bad	↑	0,489

Ungepaarter Vergleich. Pfeile: „↓“ Genexpression ist im Rezidiv niedriger als bei Erstdiagnose; „↑“ Genexpression ist im Rezidiv höher als bei Erstdiagnose. Signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) sind fett geschrieben und grau unterlegt.

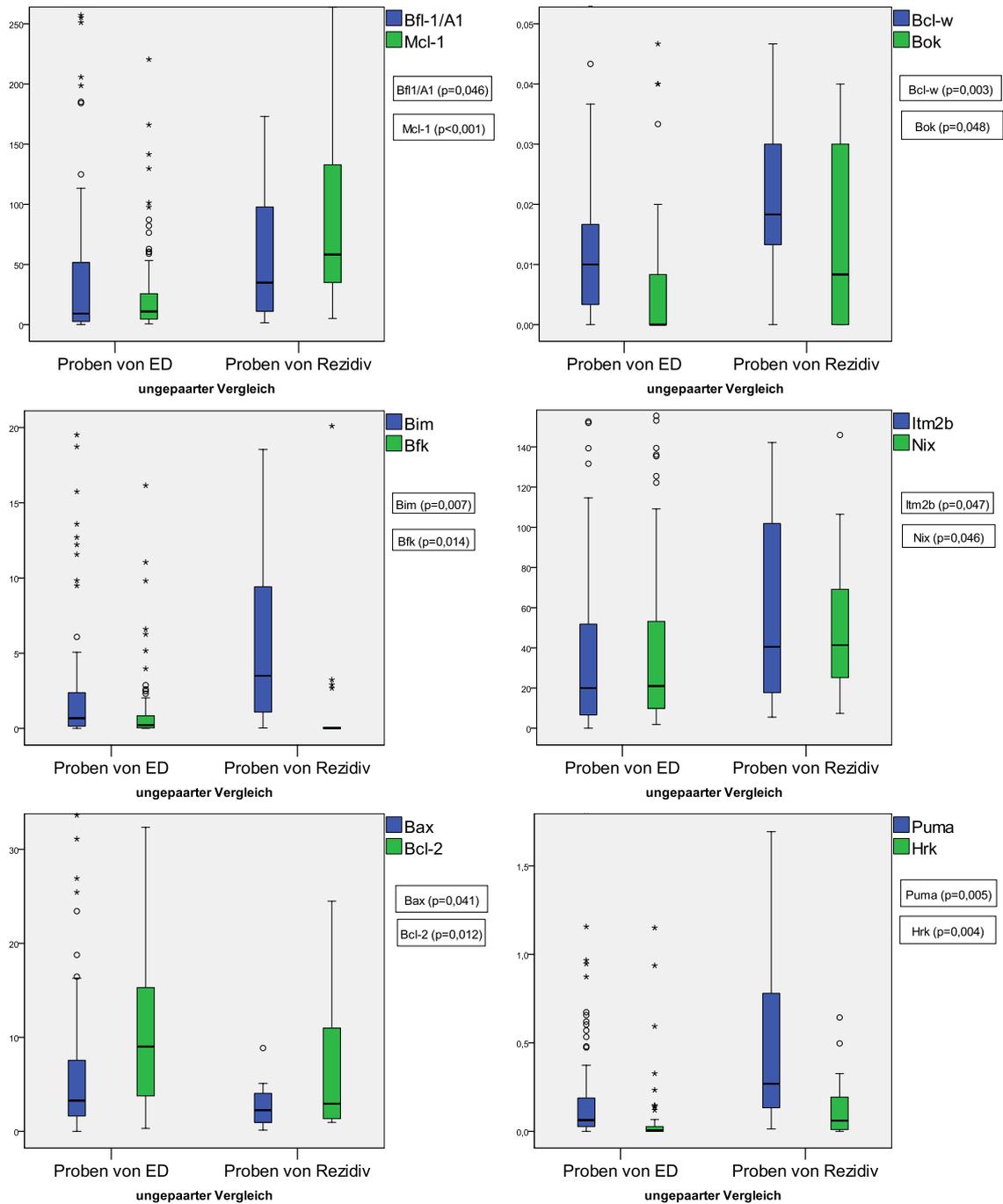


Abb. 3.19: Boxplots der signifikanten Gene zur Veranschaulichung des Verhaltens zwischen ED und Rezidiv. Ungepaarter Vergleich.

3.7.4.2 Gepaarter Vergleich zwischen ED und Rezidiv mittels Wilcoxon-Test

Für den gepaarten Vergleich der Genexpressionsniveaus zwischen ED und Rezidiv standen insgesamt 18 Probenpaare zur Verfügung. Die Patienten wiesen im Rezidiv eine signifikant höhere Expression von Mcl-1 auf. Bei den proapoptotischen Genen zeigte sich in der gepaarten Analyse bei Bax und Bcl-rambo eine höhere Expression bei ED, während das Expressionsniveau von Bim bei ED signifikant niedriger als im 1. Rezidiv war (siehe Tab. 3.18 und Abb. 3.20).

Tab. 3.18: Darstellung des Expressionsverhaltens aller Bcl-2-Gene im Rezidiv.

Antiapoptotische Gene:	Genexpression im Rezidiv	p-Wert
bcl-2	↓	0,158
bcl-b	↓	0,177
bcl-w	↓	0,485
bcl-xl	↓	0,435
bfl1/A1	↑	0,326
mcl-1	↑	0,015

Proapoptotische Gene:	Genexpression im Rezidiv	p-Wert
bax	↓	0,049
bak	↓	0,397
bok	↓	0,937
bcl-g	↓	0,944
bcl-rambo	↓	0,006
bfk	↓	0,28
itm2B	↓	0,492
bid	↑	0,91
nbk/bik	↓	0,981
bim	↑	0,013
bmf	↓	0,918
hrk	↓	0,778
nix	↑	0,758
noxa	↓	0,067
puma	↑	0,301
spike	↓	0,101
bad	↑	0,422

Gepaarter Vergleich. Pfeile: „↓“ Genexpression ist im Rezidiv niedriger als bei Erstdiagnose; „↑“ Genexpression ist im Rezidiv höher als bei Erstdiagnose. Signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) sind fett geschrieben und grau unterlegt.

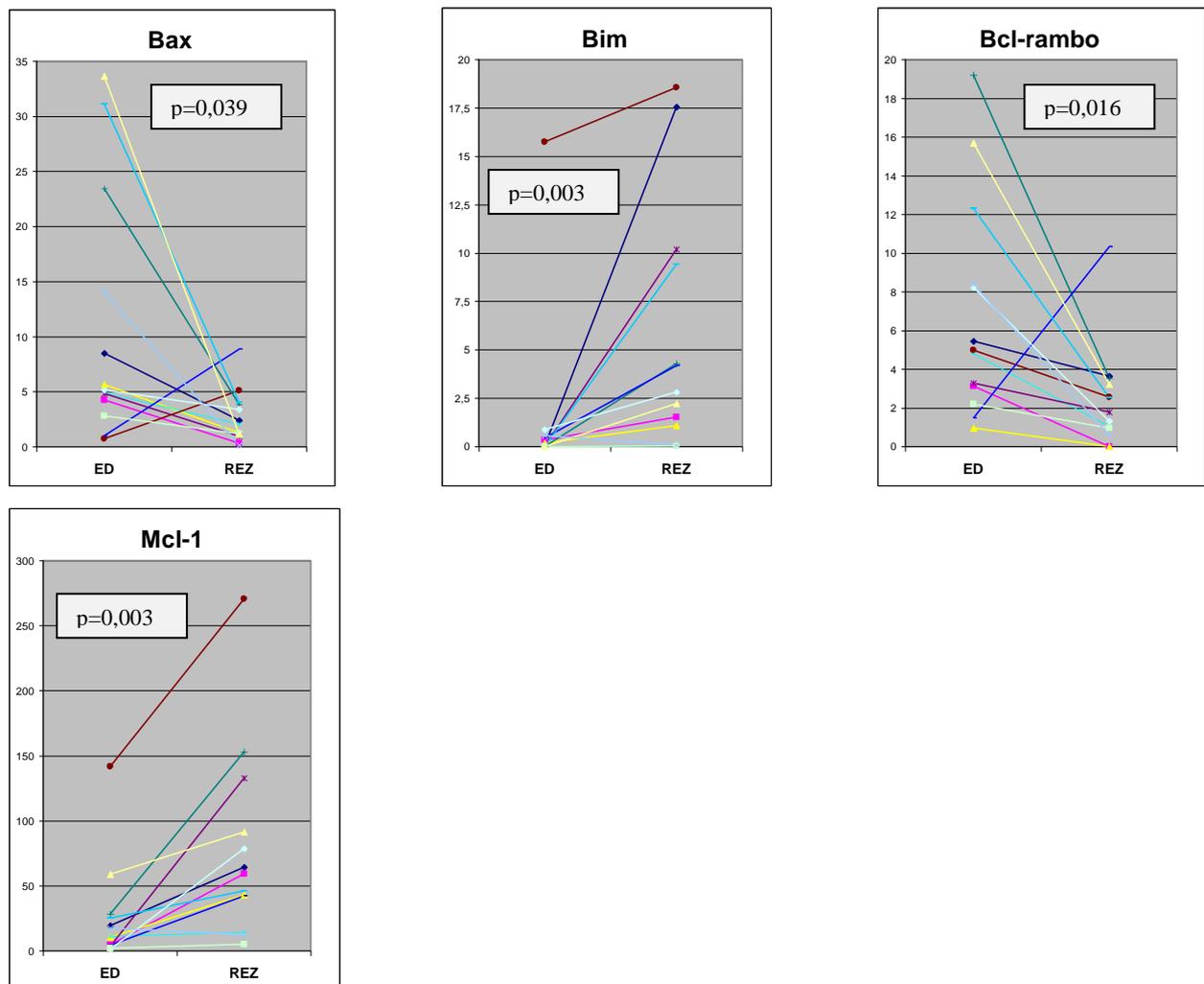


Abb. 3.20: Darstellung der Expressionsverläufe der 13 Probenpaare der Bcl-2-Genfamilie, die einen signifikanten Expressionsunterschied zwischen ED und Rezidiv im Wilcoxon-Test gezeigt haben.

3.7.5 Ansprechen auf 1. Induktion bzw. Erreichen einer CR

Um einen möglichen Einfluss des Genexpressionsniveaus einzelner Gene auf das Induktionstherapieansprechen beurteilen zu können, wurden für sämtliche in der Studie analysierten Gene der Bcl-2 Genfamilie Mann-Whitney-U Tests durchgeführt. Dabei ergab sich für Bfk ein signifikantes Ergebnis. Patienten, die nicht auf die erste Induktion ansprachen, wiesen höhere Expressionswerte von Bfk auf ($p=0,045$) (siehe Abb. 3.21).

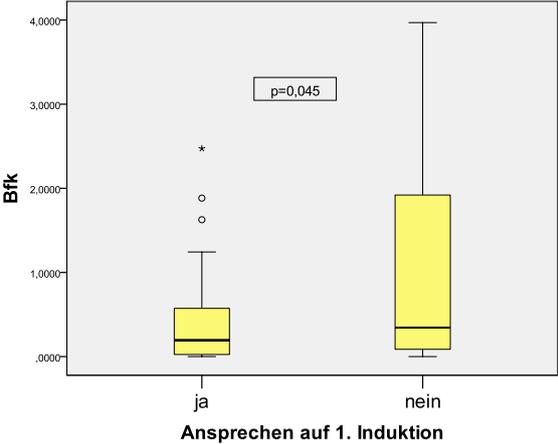


Abb. 3.21: Boxplots des signifikanten Ergebnises des Mann-Whithney-U-Tests zum Einfluss der Genexpression auf das Erreichen einer CR nach 1. Induktionstherapie.

4. Diskussion

4.1 Allgemeines zur Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob der Entstehung von akuten myeloischen Leukämien Veränderungen von Apoptose-regulierenden Signalwegen bzw. von zellulärem Überleben zu Grunde liegen. Hierbei wurde der Fokus auf den mTOR-Signalweg und die Bcl-2-Genfamilie gelegt. Mit Hilfe quantitativer RT-PCR-Techniken wurden Expressionsdaten zu den einzelnen Genen ermittelt und die Expressionsniveaus innerhalb des Kollektivs miteinander verglichen und auf relevante prognostische Unterschiede hin untersucht. Daher handelt es sich bei der vorliegenden Studie um einen Vergleich innerhalb eines erkrankten Kollektivs, was bei der Betrachtung der Ergebnisse nicht außer Acht gelassen werden darf. Eine hier als niedrig beschriebene Genexpression ist nicht notwendigerweise gleichbedeutend mit einer Reduktion der Expression unterhalb des Wertes einer gesunden Zelle. Stattdessen handelt es sich hierbei um eine niedrige Expression in Bezug auf alle anderen hier analysierten Leukämiezellen. Denn das Kollektiv wurde für jedes Gen in eine hoch und eine niedrig exprimierende Gruppe aufgeteilt, wobei der jeweilige Median als Grenze verwendet wurde. Dadurch konnte eine ausgewogene Verteilung der Patienten auf die Gruppen erreicht werden, was bei Auswahl eines extremeren Schwellenwertes nicht der Fall gewesen wäre. Trotzdem wurde anfangs die Verteilung der Expressionsniveaus graphisch dargestellt, um zu prüfen, ob sich möglicherweise eine deutliche Trennung von Expressionsgruppen jenseits des Medians abzeichnen würde und somit die Verwendung anderer Schwellenwerte gerechtfertigt gewesen wäre. Zudem ist die Verwendung des Medians für die Dichotomisierung kontinuierlicher Variablen innerhalb einer Patientenpopulation bereits von anderen Arbeitsgruppen wie z.B. Molica et al. 2006 (Syndecan-1 bei B-CLL) oder Pickard et al. 2009 (Bcl-2 bei Mammakarzinomen) verwendet worden. Weiterhin wurde geprüft, ob es Korrelationen zu klinischen bzw. paraklinischen und molekularen Patientenmerkmalen gab.

4.2.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs anhand etablierter genetischer Prognosefaktoren

Ein etabliertes Verfahren in der Leukämiediagnostik ist die zytogenetische Analyse mittels klassischer Chromosomenbänderung und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Die Unterteilung in zytogenetische Subgruppen ist von hohem klinischen Interesse für die Prognoseeinschätzung und das Therapieansprechen, wobei die Zuordnung in die drei

übergeordneten Karyotypgruppen etwas zwischen den verschiedenen Arbeitsgruppen variieren kann. Allen gemein ist aber die Klassifizierung der balancierten Aberrationen t(8;21), t(15;17) und inv(16) als prognostisch günstig, des komplex aberranten Karyotyps als prognostisch ungünstig und des normalen Karyotyps als Subgruppe mit intermediärer Prognose. In der vorliegenden Arbeit wurde die zytogenetische Einteilung nach GIMEMA/EORTC gewählt, bei der zum intermediären Karyotyp ausschließlich Patienten mit normaler Zytogenetik oder dem Verlust des Y-Chromosoms zugeordnet werden (siehe Abschnitt 1.1.9.2). Letzteres war bei keinem der 44 Patienten mit intermediärem Karyotyp der Fall, so dass in der aktuellen Arbeit der intermediäre Karyotyp mit dem Vorliegen einer normalen Zytogenetik gleichgesetzt werden kann. Die Verteilung des untersuchten AML-Kollektivs auf die drei Karyotypsubgruppen ist repräsentativ (15,2 % günstig/ 44,4 % normal bzw. intermediär/ 40,4 % ungünstig), denn in der Literatur wird ebenfalls von 43-50% AML-Patienten mit normalem Karyotyp (NK-AML) berichtet (Hiddemann et al. 2005; Döhner et al. 2008; Schnittger et al. 2002; Thiede et al. 2006), während bei 12-18% der AML-Patienten balancierte Translokationen gefunden wurden (Schnittger et al. 2002; Thiede et al. 2006). Weiterhin zeigt das untersuchte AML-Kollektiv eine typische Verteilung der drei Subgruppen in der Überlebenszeitanalyse, mit hoch signifikanten Unterschieden sowohl im Gesamt- (OS) als auch im krankheitsfreien Überleben (DFS) (beide $p < 0,001$). Die 5-Jahresüberlebensrate bzw. das leukämiefreie Überleben lagen bei Patienten mit günstigem Karyotyp bei 87% bzw. 51%, beim intermediären Karyotyp bei 49% bzw. 42% und beim ungünstigen Karyotyp bei 10% bzw. 7%. In der Literatur wird das leukämiefreie Überleben mit 60-70% beim günstigen, 35-45% beim intermediären und 10-20% beim ungünstigen Karyotyp angegeben (Berger et al. 2010).

Im letzten Jahrzehnt konnten zudem die ersten molekulargenetischen Prognosefaktoren identifiziert werden, von denen die NPM1-Mutation die größte Inzidenz aufweist. Das NPM1-Gen kodiert für ein Shuttleprotein, welches zwischen Nukleolus und Zytoplasma hin- und her pendelt. Es spielt eine Schlüsselrolle bei der Ribosomenbiosynthese, indem es u.a. den nukleolären Export von präribosomalen Bestandteilen vermittelt. Dadurch beeinflusst es wichtige zelluläre Funktionen wie Proteinbiosynthese, Zellwachstum und Proliferation. Durch seine Kontrollfunktion bei der Zentrosomenduplikation und DNA-Reparatur trägt es zur Genomstabilität während der Mitose bei (Falini et al. 2007). Schließlich steht es über die Interaktion mit dem p53-Signalweg in unmittelbarer Verbindung mit der Weichenstellung zwischen Proliferation und Apoptose.

Falini und Mitarbeiter (2005) beschrieben als Erste die durch Mutation des Exon 12 bedingte zytoplasmatische Fehllage von NPM1. Durch Leserasterverschiebung kommt es zu Veränderungen am C-Terminus des NPM1-Proteins, was den Verlust der nukleolären Bindungsfähigkeit und die Generierung eines zusätzlichen Nukleus-Exportsignals bedingt. Die Folge ist eine Akkumulation von aberrantem zytoplasmatischen NPM1, was in seiner Funktion gestört ist und durch Heterodimerisierung auch das Wildtypprotein im Zytoplasma bindet.

Im untersuchten Kollektiv konnte bei insgesamt 27,6 % (29 von 105 Patienten) eine Mutation im NPM1-Genlocus nachgewiesen werden. In der Subgruppe mit normalem Karyotyp wiesen 54,8% (23 von 42 Patienten) eine Mutation auf. Diese Verteilung deckt sich mit den in der Literatur beschriebenen Häufigkeitsangaben, welche für AML insgesamt 25-35% und für AML mit normalem Karyotyp 46-64% NPM1-Mutationen angeben (Gale et al. 2008; Thiede et al. 2006; Suzuki et al. 2005; Falini et al. 2007).

Zur Klärung der prognostischen Relevanz einer NPM1-Mutation wurden Kaplan-Meier-Analysen durchgeführt. Dabei ergab sich für das Gesamtkollektiv, in Übereinstimmung mit der Arbeit von Thiede et al. (2006), ein signifikant längeres krankheitsfreies Überleben ($p=0,003$) bei Nachweis einer NPM1-Mutation. Hingegen ließ sich im untersuchten Kollektiv, anders als bei Thiede et al., dieser positive prognostische Einfluss nicht auf das Gesamtüberleben übertragen.

Wie bereits erwähnt wird die NPM1-Mutation hauptsächlich bei Patienten mit normalem Karyotyp gefunden. Auch unsere Analysen ergaben, dass 82,1% der NPM1-Mutationen in der Gruppe des intermediären Karyotyps zu finden sind, wo sie einen Anteil von 54,8% ausmachen. Aus diesem Grund haben viele Arbeitsgruppen (Falini et al. 2007, Schnittger et al. 2005, Thiede et al. 2006) ihren Schwerpunkt im Kontext von NPM1 auf die Betrachtung des normalen Karyotyps gelegt. Wir konnten den positiven prognostischen Einfluss der NPM1-Mutation bei Patienten mit normalem Karyotyp in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben bestätigen ($p=0,001$), während sich, wie schon bei der Analyse des Gesamtkollektivs, kein Unterschied hinsichtlich des Gesamtüberlebens ergab ($p=0,404$). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Schnittger et al. (2005), die bei Analysen für NK-AML nur ein signifikant längeres DFS beobachteten.

Die genannten Arbeitsgruppen berichten ferner, dass der positive Einfluss der NPM1-Mutation bei normalem Karyotyp abhängig von der Abwesenheit einer FLT3-ITD-Mutation sei. Die interne Tandem-Duplikation (ITD) in der FLT3 führt zur konstitutiven Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase. Hierdurch werden noch unbekannte Resistenzmechanismen aktiviert. Ein

solcher Einfluss der FLT3-ITD-Mutation konnte im vorliegenden Kollektiv nicht bestätigt werden. Hier wurde bei normalem Karyotyp kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (NPM1mutFLT3wt und NPM1mutFLT3mut) ausgemacht. Es zeichnete sich allerdings eine leichte Tendenz zu besserer Prognose bei Fehlen einer FLT3-ITD-Mutation ab ($p=0,47$ für OS und $p=0,088$ für DFS). Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Anzahl der Kombination NPM1mutFLT3wt in diesem Kollektiv aufgrund der kleineren Fallzahl im Vergleich zu den genannten Arbeiten relativ hoch war und weniger als ein Drittel der Patienten (30,5%) eine simultane FLT3-Mutation aufwies (siehe Tab.4.1). In der Literatur wird die Assoziation zwischen beiden Mutationen dagegen zumeist mit gut 40% beschrieben (Schnittger et al. 2005, Thiede et al. 2006, Döhner et al. 2005).

Tab. 4.1: NPM1- und FLT3-Mutationsstatus bei AML mit normalem Karyotyp (NK-AML).

NPM1/FLT3	Schnittger et al. (2005) n=395	Thiede et al. (2006) n=709	Döhner et al. (2005) n=300	Aktuelle Arbeit n=105
wt/wt	34,9%	43,6%	39%	28,6%
mut/wt	31,9% (59,4%)	25,7% (56,2%)	28,6% (59,3%)	38,1% (69,5%)
wt/mut	11,4%	10,7%	12,6%	16,7 %
mut/mut	21,8% (40,6%)	20% (43,8%)	19,7% (40,7%)	16,7 % (30,5%)

Wt=Wildtyp; mut=mutiert. In Klammern ist der jeweilige prozentuale Anteil bei alleiniger Betrachtung von NPM1-mutierten Patienten dargestellt.

Wenn man allerdings innerhalb des normalen Karyotyps anstelle der vier Subgruppen eine Interaktionsvariable bildet und somit die optimale Merkmalskombination FLT3wtNPM1mut gegen die Gesamtheit der drei anderen suboptimalen Kombinationen abgrenzt, ergibt sich für diese optimale Kombination ein signifikant längeres krankheitsfreies Überleben ($p=0,026$). Da weder der FLT3-Mutationsstatus allein noch das Vorliegen einer Komutation in den Einzelanalysen signifikante Unterschiede erbracht haben, handelt es sich hierbei am ehesten um einen Summationseffekt der prognostisch ungünstigeren aber in diesem Kollektiv für sich allein nicht signifikanten Merkmale, insbesondere um das Fehlen einer NPM1-Mutation. Denn, wie bereits diskutiert, führt das Vorliegen einer NPM1-Mutation mit einem p-Wert von 0,001 (NK-AML) bzw. 0,003 (Gesamtkollektiv) zu einem signifikant längeren krankheitsfreien Überleben und ist damit der stärkste prognostische Marker.

Gleiches gilt für die Anwendung der FLT3wtNPM1mut-Interaktionsvariablen auf das Gesamtkollektiv, bei der sowohl DFS ($p=0,002$) als auch Gesamtüberleben ($p=0,047$) signifikant verlängert sind. Auch hier wirkt sich vor allem die Abwesenheit einer NPM1-Mutation negativ aus, denn beim Einzelvergleich von NPM1mutFLT3wt mit NPM1mutFLT3mut ergeben sich für das OS mit einem p-Wert von 0,096 und für das DFS mit einem p-Wert von 0,062 für Erstere nur positive Tendenzen, die jedoch nicht signifikant sind. In dieser Arbeit wurde daher bei Analysen des NPM1-Status im Weiteren keine Rücksicht auf den assoziierten FLT3-Status genommen. Das Fehlen einer Signifikanz zwischen Vorliegen und Abwesenheit einer assoziierten FLT3-ITD-Mutation bei NPM1 mutierten Patienten schien dies nicht zwingend erforderlich zu machen. Diese Entscheidung wird durch die Arbeit von Gale et al. (2008) untermauert, in der ebenfalls keine negative Interaktion der beiden Mutationen gefunden wurde und NPM1mut in der multivariaten Analyse als ein unabhängiger und signifikanter prognostischer Prädiktor beschrieben wurde. Zudem hätte eine Unterteilung des normalen Karyotyps nach NPM1- und FLT3-Mutationsstatus zu sehr kleinen Fallzahlen in den vier Subgruppen geführt. Außerdem manifestiert sich der positive prognostische Einfluss der NPM1-Mutation auf das krankheitsfreie Überleben auch bei Betrachtung des Gesamtkollektivs.

4.2.2 Allgemeines zum mTOR-Signalweg

Wie bereits in Abschnitt 1.3 beschrieben wirkt der mTOR-Signalweg als Sensor für zellulären Stress. Ihm obliegt zudem eine zentrale regulatorische Rolle im Zellmetabolismus. Kommt es durch Wachstumsfaktormangel, Nährstoffdefizit oder Hypoxie zum Verlust von Überlebenssignalen über die PI3-Kinase, werden der mTORC1 und mTORC2 durch den nun ungehemmten TSC1/2-Komplex inaktiviert, was in einer Hemmung der ribosomalen Proteinbiosynthese, Verminderung von Zellgröße und Apoptose resultiert. Bei vielen Tumoren wurde die Überaktivierung dieses Signalweges bereits mit Therapieresistenz, vermehrter Proliferation und Metastasierung assoziiert (Choo und Blenis 2006). Bevor man jedoch durch pharmakologische Interaktion gezielt in den Signalweg eingreifen kann, ist es von größter Wichtigkeit Biomarker zu identifizieren, die die Art der Signalwegderegulation der malignen Zelle verlässlich anzeigen. Die vorliegende Arbeit soll daher dazu beitragen, Veränderungen der Expression von Genen des mTOR-Signalweges bei der AML aufzudecken.

4.2.3 Hohe TSC2-Expression ist mit einem längeren DFS und OS korreliert

TSC1 (Hamartin) und TSC2 (Tuberin) sind Tumorsuppressoren, die ursprünglich im Zusammenhang mit der autosomal dominanten Erbkrankheit Tuberoöse Sklerose entdeckt wurden. Mutationen in den TSC-Genloci auf Chromosom 9q34.1 (TSC1) und 16p13.3 (TSC2) können im Rahmen der Erkrankung zum Wachstum von benignen Tumoren in ZNS und anderen Organen wie Niere, Lunge, Herz, Haut und Augen führen (Consortium 1993, van Slechtenhorst et al. 1997).

Inzwischen wurde gezeigt, dass Hamartin und Tuberin einen intrazellulären Komplex bilden, der mittels seiner GTPase-Aktivität das kleine G-Protein Rheb (Ras homologue enriched in brain) inaktiviert und somit mTORC1 hemmt (Tee et al. 2003). Aktiver mTORC1 verstärkt die mRNA-Translation von Proteinen, die für die Zellzyklusprogression essentiell sind, indem es p70S6K (p70 ribosomal protein S6 kinase) und 4EBP1 (eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1) phosphoryliert. Die Hemmung von mTORC1 führt daher zu einer Verlängerung der G1 Phase und/oder Zellzyklusstop (Soucet et al. 1997).

Weiterhin wird der TSC1/2-Komplex über AMPK (AMP-Kinase) reguliert (Inoki et al. 2003). Wenn das zelluläre Energieniveau sinkt und die Konzentration von AMP steigt, wird die AMP-Kinase aktiv und aktiviert wiederum TSC durch Phosphorylierung, welches dann den mTOR Signalweg und somit Energie verbrauchende Prozesse wie die CAP-abhängige ribosomale Proteinsynthese hemmt.

Damit koordiniert der TSC1/2-Komplex die über den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg vermittelten mitogenen Signale mit dem aktuellen Energiestatus der Zelle. Wenn Energiespiegel und mitogene Signale (beispielsweise in Form von Wachstumssignalen) hoch sind, ist die hemmende TSC-Aktivität unterdrückt und die Proteinsynthese aktiv (Lu et al. 2008).

In den letzten Jahren wurde von mehreren Arbeitsgruppen eine Beteiligung der TSC-Gene bei der Entstehung von sporadischen Tumoren beschrieben. Eine erniedrigte Expression von TSC2 scheint beispielsweise mit einem höheren Tumorstadium und einem tendenziell kürzeren Gesamtüberleben bei Pankreaskarzinomen assoziiert zu sein (Kataoka et al. 2005). Bei oralen Plattenepithelkarzinomen wurde, im Vergleich zu Normalgewebe, eine erniedrigte TSC1- und TSC2-Expression gefunden, jedoch ohne Einfluss auf die erhobenen klinisch-pathologischen Parameter (Chakraborty et al. 2008). Auch bei Patientinnen mit Endometriumkarzinom wurde ein Verlust der TSC2-Expression beschrieben (Lu et al. 2008). Zudem werden Mutationen im

TSC1-Gen als mitursächlich für die Entstehung von Blasenkarzinomen angesehen (Knowles et al. 2003).

2009 waren Xu et al. schließlich die Ersten, die mittels RT-PCR die TSC-Expression bei neu diagnostizierten akuten Leukämien (myeloisch, lymphatisch und biphänotypisch) analysiert haben. Sie konnten zeigen, dass die TSC2-Expression bei Patienten mit akuter Leukämie im Vergleich zu jener von gesunden Stammzellspendern signifikant reduziert war. Ein möglicher Einfluss des TSC2-Expressionsniveaus auf die Prognose wurde in dieser Studie nicht geprüft.

Auch in anderen Studien wurde nur selten Bezug auf die prognostische Relevanz einer veränderten TSC1- bzw. TSC2-Expression genommen. Stattdessen wurde lediglich das Vorhandensein einer reduzierten Expression im Tumorgewebe bzw. das Auftreten einer Mutation in den TSC-Genloci analysiert.

Daher sollte das vorliegende Kollektiv auf Expressionsunterschiede der Gene des mTOR-Signalweges untersucht und deren prognostische Relevanz geprüft werden. Zur Beurteilung des Einflusses auf das Überleben wurden Kaplan-Meier-Analysen durchgeführt.

Wir fanden bei der Analyse der Erstdiagnoseproben tatsächlich eine prognostische Relevanz bezüglich der Höhe der TSC1- und TSC2-Expressionen. AML-Patienten mit hoher TSC2-Expression weisen ein signifikant längeres Gesamtüberleben auf. Ihre 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei ca. 52%, wohingegen nur ca. 22 % der Patienten mit niedrigem TSC2-Transkript 5 Jahre überleben. Der Einfluss einer hohen TSC1-Expression erreichte keine Signifikanz, es ist aber eine deutliche Tendenz zu einer besseren Prognose zu erkennen.

Weiterhin zeigte sich ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen hoher TSC1- bzw. hoher TSC2-Genexpression und der Länge des krankheitsfreien Überlebens, welcher sich auch bei Verwendung der Interaktionsvariable, bestehend aus TSC1hoch/niedrig und TSC2hoch/niedrig, bestätigte. Jedoch war der Vorteil einer hohen Genexpression bei optimaler Merkmalskombination aus hohem TSC1 und hohem TSC2 ($p=0,035$) weniger deutlich, wenn auch nur marginal, als bei Betrachtung des TSC1- ($p=0,026$) bzw. TSC2- ($p=0,006$) Transkripts allein. Ursächlich dafür könnte der starke Einfluss einer alleinigen hohen TSC2-Expression sein, die im Interaktionsvariablenmodell bei gleichzeitiger niedriger TSC1-Expression in die Kategorie der suboptimalen Merkmalskombinationen fällt. Diese Beobachtung lässt, zusammen mit der fehlenden Signifikanz des TSC1-Transkripts auf das Gesamtüberleben, eine stärkere prognostische Relevanz von TSC2 vermuten. Auch Xu et al. (2009) fanden beim Vergleich von Patienten mit akuter Leukämie und Normalgewebe nur eine Reduktion von Tuberin, nicht jedoch

von Hamartin. Das Zusammenspiel von TSC1 und TSC2 ist für die Funktion des TSC1/2-Komplexes im mTOR-Signalweg essentiell (Benvenuto et al. 2000; Chong-Kopera et al. 2006), da TSC1 die Ubiquitinierung von TSC2 verhindert und somit dessen Gap-Aktivität sichert. Von daher wäre anzunehmen, dass auch eine niedrige TSC1-Expression durch Aktivitätsverlust des TSC1/2-Komplexes einen negativen prognostischen Einfluss haben dürfte. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch nur für TSC2 eine prognostische Relevanz nachgewiesen werden, so dass Tuberin möglicherweise noch weitere, bisher unbekannte Funktionen (Xu et al. 2009; Huang und Manning 2008) außerhalb des TSC1/2-Komplexes besitzt, welche die Prognose mitbeeinflussen können.

4.2.4 TSC1 und TSC2 sind im Rezidiv niedriger exprimiert

Im untersuchten Kollektiv ergab der Paarvergleich von Erstdiagnose- und Rezidivprobe, dass Patienten, die ein Rezidiv erleiden, signifikant niedrigere Expressionswerte von TSC1 und TSC2 zum Zeitpunkt des Rezidivs aufweisen. Diese Beobachtung lies sich nur im ungepaarten Vergleich der Proben von Erstdiagnose und Rezidiv erheben. Im gepaarten Vergleich zeigten sich zwar tendenziell niedrigere Werte im Rezidiv, sie erreichten aber keine Signifikanz, was an der sehr kleinen Fallzahl (13 gepaarte Proben) liegen mag. Um diesbezüglich aussagekräftigere Ergebnisse zu erzielen, wäre die Durchführung einer größeren Studie wünschenswert. Bei der Interpretation des ungepaarten Vergleichs ist zudem zu beachten, dass im vorliegenden Kollektiv das krankheitsfreie Überleben bei niedriger TSC1- und TSC2-Expression verkürzt ist und somit vor allem jene Patienten mit bei Diagnose erniedrigtem TSC-Transkript Rezidive erleiden. Diese Tatsache könnte aufgrund der kleinen Fallzahl die Auswertung teilweise beeinflusst haben. Auch hier wäre das Ergebnis einer größeren Studie zur Verifizierung unserer aktuellen Ergebnisse sehr interessant. Unseres Wissens nach war das Expressionsniveau von TSC1/2 im Rezidiv einer Leukämie bisher nie Gegenstand einer Studie. Auch bei der Auswertung solider Tumoren war das Expressionsniveau von TSC1/2 im Rezidiv in der Literaturrecherche einzig bei einer Mammakarzinom-Studie (Jiang et al. 2005) bestimmt worden. Diese hatte ebenfalls eine erniedrigte TSC1- und TSC2-Expression zum Zeitpunkt eines Lokalrezidivs zum Ergebnis.

Die beschriebene Beobachtung unterstützt die These, dass TSC1/2 eine antileukämische Wirkung hat. Im Verlauf der Erkrankung lässt seine Expression als mTOR-Bremse nach und es kommt zum Rezidiv. Zudem weist das Analyseergebnis auf eine ursächliche Rolle von TSC1/2 bei der Entstehung von Chemotherapieresistenz hin. Denn im untersuchten Kollektiv erreichten nur 50 % der Patienten nach Rezidivchemotherapie eine komplette Remission, wohingegen es

nach Ersttherapie noch 74 % waren. Das könnte dafür sprechen, dass das erniedrigte TSC1/2-Transkript durch die verminderte Hemmung der Zellproliferation die Wirksamkeit zytotoxischer Substanzen entscheidend reduziert haben könnte.

4.2.5 Das Vorliegen einer NPM1-Mutation ist mit hoher TSC2- und niedriger Cyclin D1- und Cyclin D2-Expression assoziiert

Mittels des parameterfreien Mann-Whitney-U-Tests wurde geprüft, ob sich die zentrale Tendenz der Genexpressionen der zwei NPM1 Kategorien (wt/mut) voneinander unterscheidet. Interessanterweise befanden sich in der Gruppe der NPM1-mutierten Patienten signifikant mehr Patienten mit hoher TSC2 ($p=0,039$) sowie niedriger Cyclin D1 ($p=0,015$) und Cyclin D2 ($p=0,045$) Expression.

D-Cycline sind zusammen mit ihren katalytischen Partnern, CDK4 und CDK6 (cyclin-dependent kinase) für die Passage durch die G1-Phase des Zellzyklus verantwortlich. Sie phosphorylieren pRb (retinoblastoma protein), welches dadurch seine inhibierende Wirkung auf den Transkriptionsfaktor E2F verliert (Baldin et al. 1993, Weinberg 1995). Befreites und somit aktives E2F kann dann, nach Dimerisation mit DP-Proteinen (Helin et al. 1993), Gene aktivieren, die für den Übergang von der G1 in die S-Phase und für die S-Phase essentiell sind. Damit spielen D-Cycline eine äußerst wichtige Rolle bei der Regulierung der Zellproliferation und sind bei vielen malignen Tumoren dereguliert bzw. überexprimiert (Diehl 2002).

Bei der Forschung an Zelllinien identifizierten Soucet et al. (1997) erstmalig TSC2 als einen potenten Zellzyklusregulator, der durch den indirekten Einfluss auf die G1-CDKs an der Zellzyklusprogression beteiligt ist. TSC2 verringert die Aktivität der CDKs, indem es das CDK-inhibierende Protein p27 stabilisiert (Soucet et al. 1998), vor Abbau schützt (Rosner et al. 2004) und dessen nukleäre Lage sichert (Rosner et al. 2007) (siehe Abb.4.2). p27 gehört zur Cip/Kip Familie, deren Mitglieder nicht selektiv u.a. D- und E-Cycline hemmen können (Sherr und Roberts 1995). Die Inhibition scheint allerdings vom Tyrosin 88- Phosphorylierungszustand des p27 abhängig zu sein, denn an phosphoryliertes p27 gebundene CDK/Cyclin D-Komplexe sind katalytisch aktiv (James et al. 2006). Zudem lies sich bei experimenteller TSC2-Hemmung eine erhöhte Cyclin D1-Expression nachweisen (Soucet et al. 1997).

Dass es auch eine direkte Abhängigkeit zwischen den G1-Phase assoziierten Proteinen und dem mTOR-Signalweg gibt, konnte in einer Studie über Ovarialkarzinomzellen dargestellt werden. Durch die Hemmung des CDK-Inhibitors p16^{ink4A} durch p70S6K (aus dem mTOR-Signalweg)

konnte eine erhöhte Expression des Komplexes aus CDK4 und Cyclin D1 und ein Fortschreiten innerhalb des Zellzyklus erreicht werden (Gao et al. 2004) (siehe Abb.4.2).

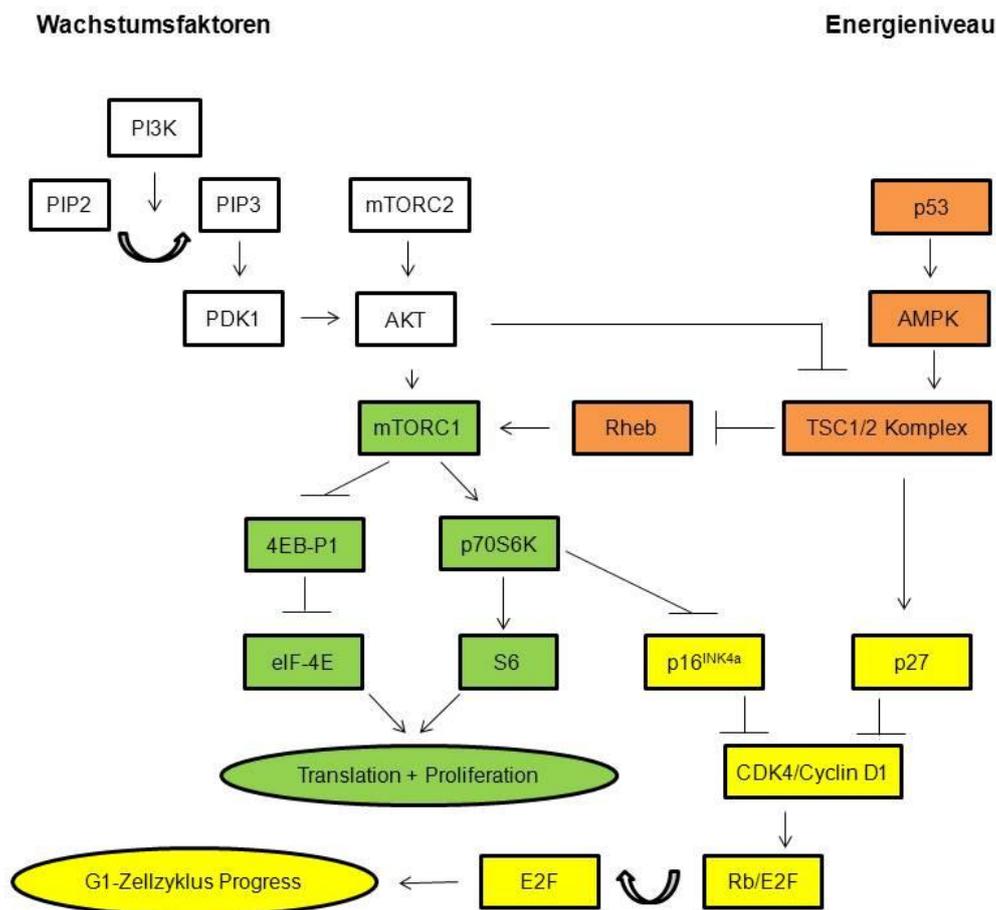


Abb. 4.2: PI3K/Akt/mTOR-Signalweg, Hemmung durch p53 und Verbindung mit Zellzykluskontrolle.

Wachstumsfaktoren aktivieren Rezeptortyrosinkinasen, wodurch es zu einer Aktivierung der PI3-Kinase kommt. Diese bildet phosphorylierte Phosphatidylinositole (PIP3), welche wiederum die PDK1-Kinase aktivieren. PDK1-Kinase und mTORC2 (PDK2) phosphorylieren und aktivieren nun die Akt-Kinase, welche mTORC1 zum einen direkt und zum anderen indirekt über die Hemmung des TSC1/2-Komplexes aktiviert. Durch die Freisetzung des Translationsinitiationsfaktors eIF-4E und die Aktivierung der S6 Kinase wird schließlich Translation und Zellwachstum gefördert (grün). Über die AMP-Kinase, die u.a. durch p53 aktiviert werden kann, wird die Aktivität des mTOR-Signalweges dem aktuellen Energieniveau der Zelle angepasst. Dies geschieht durch Aktivierung der Tumorsuppressoren TSC1 und TSC2 (rot). Weiterhin kann über p70S6K des mTOR-Signalweges Einfluss auf die Zellzyklusprogression von der G1- in die S-Phase genommen werden. Durch Hemmung des CDK-Inhibitors p16^{INK4a} wird der Komplex aus CDK4 und Cyclin D1 aktiviert und so E2F aus der inhibierenden Bindung mit Rb befreit (gelb). Im Gegensatz dazu hat der TSC1/2 Komplex einen hemmenden Effekt auf die Aktivität der CDKs, indem er das CDK-inhibierende p27 stabilisiert (gelb).

Passend dazu wiesen in der aktuellen Arbeit jene Patienten, die nach erstem Induktionszyklus keine komplette Remission erreicht hatten, signifikant höhere Expressionsniveaus von Cyclin D1 ($p=0,001$) und Cyclin D2 ($p=0,002$) im Sinne einer aktiven Proliferation auf.

Unter Berücksichtigung der beschriebenen Signalweginteraktionen, legt das gegenläufige Expressionsverhalten von TSC2 und Cyclin D1 bzw. Cyclin D2 in Abhängigkeit vom NPM1-Mutationsstatus ebenfalls ein Zusammenspiel zwischen diesen Genen nahe. Obwohl diese Analyse natürlich keine Aussagen über mögliche Korrelationen machen kann, scheint es hier dennoch berechtigt, von einem kausalen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer NPM1-Mutation und einer hohen TSC2- und niedrigen D-Cyclin-Expression auszugehen.

Unseres Wissens ist dies das erst Mal, dass gezielt Genexpressionsdaten des mTOR-Signalwegs systematisch in Verbindung mit dem NPM1-Mutationsstatus bei AML analysiert wurden. Was also bedeutet der gefundene Zusammenhang für Patienten mit NPM1-Mutation?

4.2.6 Günstiger prognostischer Einfluss der NPM1-Mutation könnte durch Hemmung des mTOR-Signalweges in Folge einer erhöhten TSC2-Expression erklärt werden

Im vorherigen Abschnitt wurde beschrieben, dass AML-Patienten mit einer NPM1-Mutation im Vergleich zu jenen ohne NPM1-Mutation eine höhere TSC2- und niedrigere Cyclin D1- und D2-Expression aufweisen, und dass diese Beobachtung nicht auf einem Zufall beruht.

In der aktualisierten WHO-Klassifikation von 2008 wurde erstmalig die „AML mit mutiertem NPM1“ als eigenständige provisorische Entität eingeführt (Vardiman et al. 2009). Dieser Schritt war aufgrund ihrer prognostischen Relevanz mehrfach gefordert worden. Das Vorliegen einer prototypischen Mutation im NPM1-Gen wird als prognostisch günstig angesehen. Wie in Abschnitt 1.5 diskutiert herrscht allerdings kein eindeutiger Konsens darüber, ob eine assoziierte FLT3-ITD-Mutation diese positive Prognose negativ beeinflusst. In der Mehrzahl der Publikationen wurde von einer Verschlechterung der Prognose durch Komutation berichtet.

NPM1 mutierte AML-Patienten sprechen mit bis zu 86% gut auf die 1.Induktion an (im vorliegenden Kollektiv 72,4%) (Suzuki et al. 2005; Schnittger et al. 2005; Döhner et al. 2005; Thiede et al. 2006). Zudem korreliert mutiertes NPM1 mit einer deutlicheren Blastenreduktion eine Woche nach Induktionstherapie und wurde daher als unabhängiger positiver prognostischer Marker für das Erreichen einer Tag-16-Blastenfreiheit identifiziert. (Schneider et al. 2009). Die Gründe für diese besonders gute Chemotherapiesensibilität blieben aber ungeklärt.

Bisher wurde in vielen Arbeiten darüber diskutiert wie das mutierte NPM1-Protein zur Leukämogenese beitragen könnte (Falini et al. 2011; Grisendi et al. 2006; den Besten et al. 2005, Colombo et al. 2006). Bisher wurde aber nicht aufgeklärt, welche zellulären Prozesse für die bessere Prognose bei NPM1-Mutation verantwortlich sein könnten. Daher liefert die Assoziation von NPM1mut und hoher TSC2-Expression sowie niedriger D-Cyclin-Expression in der vorliegenden Arbeit einen Hinweis auf eine mögliche kausale Einbeziehung des mTOR-Signalweges bei NPM1-Mutation.

Die Arbeit von Li et al. (2005) liefert indirekt sehr interessante Anhaltspunkte dafür, wie die NPM1-Mutation zu einer erhöhten TSC2-Expression beitragen könnte. Sie fanden heraus, dass NPM1 als zellulärer p53-Inhibitor fungiert und so normale und maligne hämatopoetische Zellen vor stressinduzierter Apoptose schützt. Im Umkehrschluss könnte der Verlust der normalen NPM1-Funktion durch Mutation eine verstärkte Empfindlichkeit gegenüber zellulären Stressoren wie Chemotherapeutika und Bestrahlung bedeuten (siehe Abb.4.3).

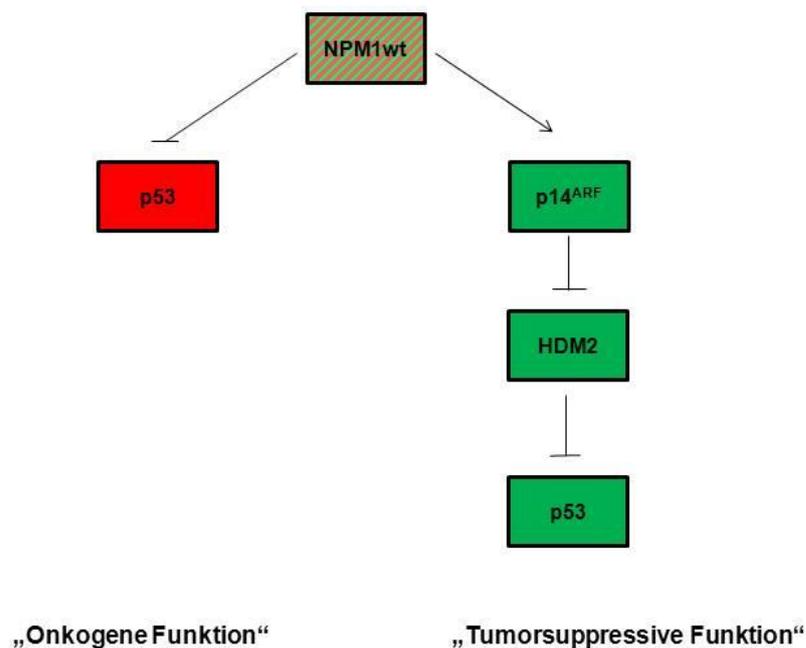


Abb.4.3: NPM1wt - p53 Achse.

NPM1wt kann als zellulärer p53-Inhibitor fungieren und so Zellen vor Stress induzierter Apoptose schützen (rot). Im Gegensatz dazu steht seine Funktion als Stabilisator des p14^{ARF}-Proteins, welches seinerseits den p53-Inhibitor HDM2 inhibiert (grün).

Unsere Ergebnisse unterstützten diese Hypothese unter Berücksichtigung des Befundes, dass es eine Verbindung zwischen p53 und dem TSC1/2-Komplex zu geben scheint. Bei Experimenten in MEFs (mouse embryonic fibroblasts) ergaben sich Hinweise, dass p53 über AMPK und den TSC1/2-Komplex mit dem mTOR-Signalweg kommuniziert und diesen hemmt (Feng et al. 2005) (siehe Abb.4.2). Daher ließe sich zusammenfassend mutmaßen, dass es durch die Mutation im NPM1-Gen von leukämischen Blasten zu einer geringeren Hemmung des p53-Tumorsuppressors kommt, welcher daher über AMPK den TSC1/2-Komplex aktiviert und so als mTOR-Bremse fungiert (siehe Abb.4.2). Somit könnte die niedrige Cyclin D1- und D2-Expression in diesem Zusammenhang am ehesten Ausdruck zweier Mechanismen sein: der durch TSC2 bedingten Hemmung des mTOR-Signalweges und der durch TSC2 vermittelten Stabilisierung des CDK-Inhibitors p27 (Burgstaller et al. 2009) (siehe Abb.4.4).

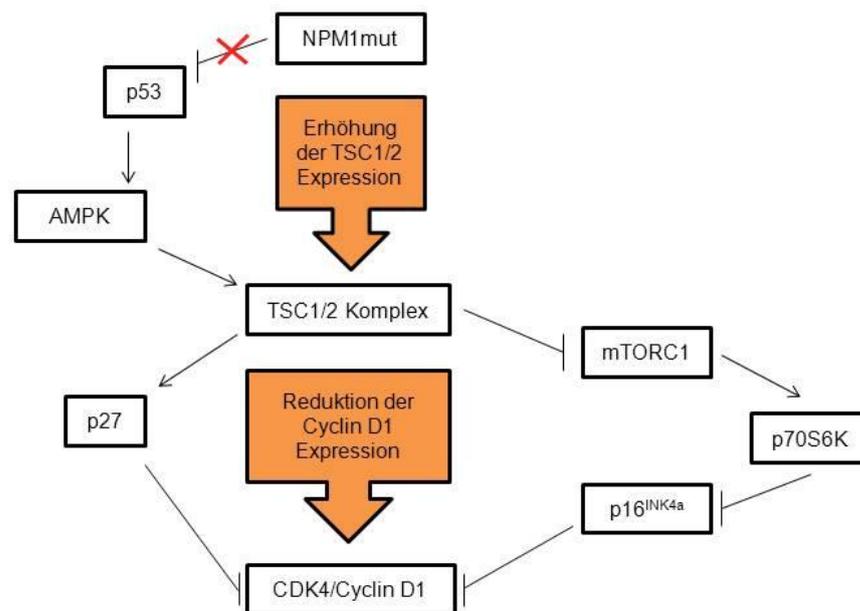


Abb. 4.4: Modell der Interaktionen von NPM1mut, TSC2-Expressionszunahme und Cyclin D1-Expressionsreduktion.

Unter der Annahme, dass NPM1wt als p53-Inhibitor fungiert, kommt es beim Vorliegen einer NPM1-Mutation zur Desinhibierung von p53 (rotes Kreuz), welches nun über die AMP-Kinase den TSC1/2-Komplex aktiviert und so zum einen über die Hemmung des mTOR-Signalwegs und zum anderen über Aktivierung des CDK-Inhibitors p27 eine Hemmung von Cyclin D1 bedingt.

Dieser Zusammenhang würde auch erklären, warum TSC1/2 gerade bei dem AML-Kollektiv mit normalem Karyotyp prognostisch relevant ist, da gerade dort eine NPM1-Mutation mit besserer Prognose korreliert ist (p-Werte von TSC2 bei intermediären (normalen) Karyotyps: 0,003 (OS) und 0,001 (DFS); bei Gesamtkollektiv 0,016 (OS) und 0,006 (DFS)). Ebenfalls gut in dieses Modell passt der Analysebefund, dass eine hohe Expression des 4EB-P1-Transkripts ein positiver Prädiktor für ein krankheitsfreies Überleben im Gesamtkollektiv und bei Patienten mit NPM1-Mutation zu sein scheint. Denn eine Folge der Inhibierung des mTOR-Signalweges bzw. des mTORC1 durch beispielsweise den TSC1/2-Komplex ist die Enthemmung und somit Aktivitätszunahme von 4EB-P1.

Unsere Daten (höhere TSC2-Genexpression und niedrigere D-Cyclin-Expression bei NPM1 mutierten Patienten) unterstützen das oben beschriebene Erklärungsmodell und bieten erstmalig auf molekularer Ebene ein kausales Korrelat für die bekannte günstige klinische Prognose der NPM1-Mutation. Es sind jedoch weitere Studien notwendig, um dieses Modell zu bestätigen bzw. mögliche weitere Interaktionen zwischen NPM1-Mutation und mTOR-Signalweg bzw. anderen in die Apoptoseregulation involvierter Signalwege zu eruieren. Dafür wäre die Erweiterung der Untersuchung von der RNA-Ebene auf die Proteinebene und dort stattfindende Phosphorylierungsereignisse im mTOR-Signalweg sicherlich sehr interessant und informativ.

Obwohl sich die von Li et al. (2005) beschriebene p53-Hemmung durch NPM1 gut mit den Ergebnissen dieser Arbeit vereinbaren lässt, soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass der NPM1-Wildtyp in der Literatur auch mit tumorsuppressiven Funktionen in Verbindung gebracht wurde (siehe Abb.4.3). Es wurde gezeigt, dass NPM1wt für die nukleoläre Stabilisierung des ARF-Proteins wichtig ist, welches seinerseits über p53-abhängige und -unabhängige Signalwege die Zellproliferation inhibiert (Grisendi et al. 2006; Weber et al. 1999; Sherr 2001). Das Vorliegen einer NPM1-Mutation soll dann durch die mutationsbedingte, aberrante zytoplasmatische Lage zu einem fehlerhaften Export des an NPM1 gebundenen ARF-Proteins aus dem Nukleolus ins Zytoplasma führen, wodurch dieses zum einen einem beschleunigten Abbau unterliegt und zum anderen seine Fähigkeit zur negativen Interaktion mit dem p53-Inhibitor MDM2 (HDM2 beim Menschen) verliert (Kuo et al. 2004; den Besten et al. 2005). Die Folge ist ein Verlust der ARF abhängigen Stabilisierung von p53 (den Besten et al. 2005). Daher wird angenommen, dass der Verlust vom NPM1wt durch die resultierende Destabilisierung des ARF-Tumorsuppressorsignalweges seinerseits auch zur Tumorentstehung beitragen könnte.

Es werden noch einige Puzzleteile gefunden werden müssen bis man das äußerst komplexe Netzwerk an Signalwegen und ihren gegenseitigen Interaktionen besser verstehen gelernt hat.

Möglicherweise finden auch vom Zelltyp abhängige, unterschiedliche Regulationen und Interaktionen innerhalb gleicher Signalwege statt, so dass Ergebnisse aus sehr exakt genetisch definierten und vereinfachten Zelllinienexperimenten nicht einfach auf alle Zelltypen bzw. Tumorentitäten übertragen werden können.

4.2.7 Anmerkung zu anderen Ergebnissen

Die Überlebenszeitanalysen des Gesamtkollektivs und auch der Subgruppen ergaben weitere signifikante Ergebnisse, die nach heutigem Wissensstand zum Großteil paradox erscheinen und schwer interpretierbar sind. So zeigten beispielsweise hohe AKT-, PDK2- und Raptorexpressionen sowohl im Gesamtkollektiv als auch in mehreren Subgruppenanalysen signifikante Verlängerungen des Gesamt- und/oder krankheitsfreien Überlebens. Im Falle der AKT-Kinase könnte als Erklärungsmöglichkeit herangezogen werden, dass es einen negativen Feedbackmechanismus zwischen mTORC1 und AKT gibt (Harrington et al. 2005). Da bei NPM1-Mutation, wie in den vorausgegangenen Abschnitten beschrieben, der mTOR-Signalweg supprimiert zu sein scheint, fiel somit auch der negative Feedbackmechanismus (Harrington et al. 2005) zwischen mTORC1 und AKT weg, was eine Aktivitätszunahme von AKT bedeuten würde. Demnach könnte die erhöhte AKT-Aktivität in unseren Analysen (zumindest bei den signifikanten Ergebnissen der Subgruppen mit normalem Karyotyp oder NPM1mut) auch ein indirekter Ausdruck des durch den TSC1/2-Komplex inhibierten mTOR-Signalweges sein.

4.3 Allgemeines zur Bcl-2-Familie

Auf der Suche nach molekularen Markern, die eine prognostische Einschätzung innerhalb der variierenden Verläufe bei AML erlauben, sind jene Gene, die an der Zelltodregulierung beteiligt sind, von besonderem Interesse. Denn die korrekte Regulation des programmierten Zelltod ist vor allem für Zellen des hämatopoetischen Systems relevant, da die Gewebemöostase in solchen Zellen mit hoher intrinsischer proliferativer Kapazität und Zellumsatz kritisch von einer straff regulierten Balance zwischen Proliferation und Apoptose abhängen (Reed und Pellecchia 2005; Schimmer 2008).

Der intrinsische Apoptosesignalweg wird genauestens von den Mitgliedern der Bcl-2-Genfamilie reguliert. Die proapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder Bax, Bak und Bok können nach Oligomerisierung die äußere Mitochondrienmembran permeabilisieren und so den Apoptoseprozess induzieren. Die Aktivität dieser sogenannten Effektoren wird durch die anderen Bcl-2-Familienmitglieder reguliert. Zu den antiapoptotischen Mitgliedern, welche hemmend auf

die Effektoren einwirken, zählen Bcl-2, Bcl-b, Bcl-w, Bcl-xl, Mcl-1 und Bfl1/A1. Dagegen wirken sowohl Bcl-g, Bcl-rambo, Bfk als auch die BH3-only-Proteine zelltodfördernd.

Als bekanntestes Beispiel einer Deregulierung des mitochondrialen Apoptosesignalweges im Rahmen einer Tumorentstehung ist sicherlich die veränderte Bcl-2-Expression bei humanen folliculären Lymphomen, welche durch die Translokation t(14;18) charakterisiert sind. Durch diese Translokation gerät das Bcl-2-Gen unter die Kontrolle eines Immunglobulinschwerkettenenhancers, was eine konstitutive Expression von Bcl-2 zur Folge hat (Graninger et al. 1987; Cleary et al. 1986). Dies resultiert in einer klinisch schlechten Prognose folliculärer Lymphome.

Inzwischen ist deutlich geworden, dass die Entstehung von malignen Tumoren nicht nur auf exzessiver, deregulierter Proliferation wie im genannten Beispiel basiert, sondern dass es sich um eine Imbalance von Zellproduktion und –eliminierung handelt (Malaguarnera 2004).

Daher war es das Anliegen dieser Arbeit die Expressionen einer Vielzahl von pro- und antiapoptotischen Genen der Bcl-2-Familie zu bestimmen und ihre Relevanz hinsichtlich Prognose, Therapieansprechen und Rezidivhäufigkeit systematisch zu evaluieren. Denn nur mittels funktionierender Apoptosesignalwege können konventionelle Chemo- und Strahlentherapien effektiv sein. Andernfalls kommt es zu Therapieresistenz und der selektiven Persistenz maligner Zellen, welche schließlich Rezidive und schlechtere Heilungsraten bedingen. Zudem ist ein besseres Verständnis der Funktionsweisen und Interaktionen der zur Bcl-2-Familie gehörenden Proteine wichtig, um in Zukunft durch gezielten Eingriff in die Zelltodsignalwege Medikamentenresistenzen zu überwinden und Apoptose in Tumorzellen induzieren zu können.

Unseres Wissen ist dies die erste Studie, in der eine so große Anzahl von pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Familiengenen auf ihren prognostischen Einfluss und ihr Verhalten im Rezidiv analysiert worden sind.

4.3.1 BH3-only-Proteine

Veränderungen der Expressionshöhe von BH3-only-Proteinen wie Bim, Bid, Puma, Bik oder Bad wurden bei einer Vielzahl von hämatologischen Malignomen beschrieben (Egle et al. 2004; Tagawa et al. 2005; Kuribara et al. 2004; Krajewska et al. 2002; Karst et al. 2005; Sturm et al. 2006; Köhler et al. 2002). Ziel der vorliegenden Genexpressionsanalysen von AML-Patienten war es u.a. BH3-only-Proteine als potenzielle molekulare Marker zu identifizieren, die eine exaktere Vorhersage über den individuellen Krankheitsverlauf und die Prognose möglich machen würden. Durch die Identifizierung relevanter Gene könnte zukünftig ein diagnostisches Instrument zur Verfügung stehen, mit dessen Hilfe Entscheidungen über beispielsweise

Therapieintensität und die Notwendigkeit zu (frühzeitiger) Stammzelltransplantation je nach molekularem Risikoprofil gefällt werden könnten.

4.3.2 Niedrige Bmf-Expression ist mit besserem Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben assoziiert, insbesondere bei Vorliegen eines intermediären Karyotyps

Bcl-2 modifying factor (Bmf) ist, ebenso wie Bim, ein Sensor für zytoskelettalen Stress, durch welchen Bmf von seiner inaktivierenden Bindung an das Aktinzytoskelett freigesetzt wird (Daniel et al. 2003; Kirkin et al. 2004). Man ist gerade erst dabei die Rolle von Bmf bei der Tumorentstehung zu erforschen. Erst wenige Studien wurden diesbezüglich durchgeführt. So wurde gezeigt, dass der Verlust von Bmf bei Mäusen zu einer beschleunigten Entstehung von Thymuslymphomen nach ionisierender Bestrahlung führt (Labi et al. 2008). Bei Menschen konnte bisher nur ein indirekter Bezug zur Karzinogenese hergestellt werden. Es wurde berichtet, dass der Verlust des Chromosoms 15q14/15, welches den Bmf-Lokus enthält, mit fortgeschrittenen Mamma- und Lungenkarzinomstadien assoziiert ist (Schmutte et al. 1999; Wick et al. 1996).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei der Überlebenszeitanalyse des Gesamtkollektivs ein signifikant längeres Gesamt- ($p=0,037$) und krankheitsfreies Überleben ($p=0,035$) bei Patienten mit niedriger Bmf-Expression zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. Dieser Effekt schien insbesondere mit dem Vorliegen eines intermediären Karyotyps zusammenzuhängen, denn bei der Karyotyp-Subgruppenanalyse zeigte das Expressionsverhalten von Bmf nur beim intermediären Karyotyp einen signifikanten Einfluss auf Gesamt- und krankheitsfreies Überleben, welcher mit einem p-Wert von 0,001 (OS) bzw. 0,026 (DFS) auch wesentlich deutlicher als bei der Betrachtung des Gesamtkollektivs war. Die beschriebenen Ergebnisse sind überraschend, da man eher einen umgekehrten Zusammenhang zwischen Bmf-Expression und Prognose erwarten würde, da Bmf wie alle BH3-only-Proteine proapoptotische Funktionen besitzt. Eine mögliche Erklärung für die unerwartete Korrelation könnte sein, dass die Transkriptspiegel nicht notwendigerweise die Proteinspiegel repräsentieren. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass jene Zellen mit niedrigem Bmf-Transkript im Rahmen einer Chemotherapie noch Kapazitäten hätten ihr Expressionsniveau zu erhöhen und so sensibler und effektiver auf Apoptosereize reagieren könnten als Zellen mit bereits ausgeschöpfter Genreserve. Niedrige Bmf-Transkripte könnten aber auch ein indirekter Hinweis auf die Aktivität anderer Zelltodsignalwege sein, wodurch auf die Funktion der proapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder verzichtet werden könnte. Als weitere Hypothese für den ungünstigen Einfluss einer hohen Bmf-Expression wäre zu erwägen, dass es sich dabei um einen

Kompensationsversuch bei vermehrter posttranslationaler Proteininaktivierung handeln könnte (Puthalakath und Strasser 2002). Das heißt effektiv wäre der Proteinspiegel von Bmf trotz gemessener hoher Genexpression durch Proteininaktivierung niedrig und sein proapoptotischer Effekt gering. Im Umkehrschluss könnte also der hier gesehene prognostisch günstige Einfluss einer unterhalb des Median liegenden, niedrigen Bmf-Genexpression auf ein Fehlen von posttranslationaler Proteininaktivierung hinweisen und somit eine ausreichende proapoptotische Funktion gewährleistet sein, was die bessere Prognose erklären würde. An dieser Stelle soll erinnert werden, dass es sich bei der Einteilung in hohe und niedrige Genexpression um eine Aufteilung entlang des Medians innerhalb eines erkrankten Kollektivs handelt. Möglicherweise sind die hier als niedrig bezeichneten Expressionswerte im Vergleich zu gesunden hämatopoetischen Zellen dennoch erhöht. Es wäre daher sehr interessant das vorliegende Kollektiv auch mit einem gesunden Kollektiv oder myeloischen Zelllinien bzw. CD34⁺-Zellen zu vergleichen, um einordnen zu können, ob es sich bei der „niedrigen“ Bmf-Genexpression der vorliegenden Arbeit tatsächlich um im Vergleich zu Gesunden reduzierte Expressionsspiegel handelt.

Auch wenn die Korrelation zwischen niedrigem Transkript eines proapoptotischen Gens und besserem Therapieansprechen nicht in das aktuell gültige Balancekonzept passt, so finden sich bei einer Vielzahl von Studien doch ähnliche vermeintlich paradoxe Ergebnisse, die die Allgemeingültigkeit des Modells in Frage stellen. Denn die dichotome Einteilung in ausschließlich pro- oder antiapoptotische Proteinfunktionen werden der Komplexität der Interaktionen und feinsten Regulierbarkeit innerhalb der Zellzyklus- und Apoptosesignalwege nicht gerecht. So fanden Köhler et al. (2002) bei AML-Patienten eine schlechte Prognose bei hoher Bax- und Bad-Expression und Bairey et al. (1999) eine verkürzte Überlebenszeit durch hohes Bax bei diffus großzelligem B-NHL. Hess et al. (2007) berichten, dass hohe Expressionsspiegel von sowohl pro- als auch antiapoptotischen Genen bei AML eine ungünstige Prognose bedingen. Sie werten dieses Phänomen als Ausdruck einer allgemeinen Aktivierung der Apoptosemaschinerie. In diesem Zusammenhang identifizierten sie, analog zu unseren Ergebnissen, u.a. Bmf als signifikanten Prädiktor für ein verkürztes Gesamtüberleben.

Auch in der Subgruppe der Patienten mit FLT3-Wildtyp fanden wir den gleichen positiven Einfluss auf OS und DFS ($p=0,03$ bzw. $p=0,041$) bei niedrigem Bmf-Transkript, was bedeutet, dass im untersuchten Kollektiv Patienten ohne FLT3-Mutation im Falle einer niedrigen Bmf-Expression eine günstigere Prognose aufweisen. Im Mann-Whitney-U-Test war das Vorliegen des FLT3-Wildtyps per se aber nicht mit einem niedrigeren Bmf-Transkript assoziiert, was gegen einen kausalen Zusammenhang spricht. Warum eine niedrige Bmf-Genexpression

hingegen bei Vorliegen einer FLT3-Mutation ihren positiven Einfluss verliert, ist spekulativ. In der Literatur weisen AML-Patienten mit FLT3-ITD-Mutation eine schlechtere Prognose auf (Yanada et al. 2005; Fröhling et al. 2002; Schnittger et al. 2002), was in dieser Patientenpopulation möglicherweise den positiven Effekt eines niedrigen Bmf-Transkript aufgehoben haben könnte. Wie in Abschnitt 4.2.1 bereits beschrieben kommt es durch die ITD-Mutation in der FLT3 zu einer konstitutiven Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase und der nachgeschalteten Signalwege, was eine erhöhte Zellproliferationsrate zum Resultat hat. Allerdings war im untersuchten Kollektiv, wie ebenfalls in Abschnitt 4.2.1 diskutiert, kein Überlebensunterschied zwischen FLT3wt und FLT3mut auszumachen gewesen.

Zusammenfassend liefern die Ergebnisse dieser Arbeit wichtige Hinweise dafür, dass es sich bei Bmf um einen relevanten prognostischen Marker bei AML handeln könnte. Wenn die beschriebenen Daten in weiteren Studien bestätigt werden, könnte die Messung vom Bmf-Transkript, ggf. in Kombination mit anderen molekularen Charakteristika, in Zukunft zur Planung risikoadaptierter Therapien, insbesondere bei Vorliegen eines intermediären Karyotyps, verwendet werden. Es werden jedoch noch weitere Studien und experimentelle Arbeiten notwendig sein, um unser Verständnis vom Zusammenspiel der Bcl-2-Familienmitglieder und insbesondere der BH3-only-Proteine zu verbessern. Scheinbar paradoxe Ergebnisse wie die hier beschriebene günstige Prognose eines niedrig exprimierten proapoptotischen Gens zeigen uns die Schwachstellen des aktuellen Modells und die Notwendigkeit zur Aufklärung der vielfältigen Interaktionen und zur Identifikation noch unbekannter Pathomechanismen auf.

4.3.3 Extrem niedrige Nbk/Bik-Expression korreliert mit verkürztem krankheitsfreien Überleben und mit genetischer Subgruppe der AML

Natural born killer (Nbk), welcher auch Bcl-2 interacting killer (Bik) genannt wird, wurde 1995 als erstes Mitglied der BH3-only-Proteinfamilie von Boyd et al. (1995) identifiziert. Nbk wird durch unterschiedlichste Stresstimuli induziert (Mathai et al. 2002) und durch Phosphorylierung in seiner proapoptotischen Funktion verstärkt (Verma et al. 2001). Eine verringerte Nbk-Aktivität in Tumoren kann Folge von genomischen Deletionen am Nbk-Lokus auf Chromosom 22q13.3 (Verma et al. 2001), von selektiver Stilllegung des Nbk-Gens durch epigenetische Regulationsmechanismen wie DNA-(Hyper-)Methylierung (Sturm et al. 2006) bzw. Histondeacetylierung (Dai et al. 2006) und/oder von posttranskriptioneller Inaktivierung des Nbk-Proteins durch proteasomalen Abbau sein (Chinnadurai et al. 2009). Dagegen scheinen Mutationen keine Rolle zu spielen (Sturm et al. 2006), obwohl beispielsweise bei B-Zell

Lymphomen Nbk-Mutationen gefunden wurden (Arena et al. 2003), die jedoch Polymorphismen entsprechen.

Bisher ist allerdings die genaue Funktion von Nbk in der Tumorgenese noch nicht komplett verstanden (Karst und Li 2007). Sturm et al. (2006) beschrieben eine fehlende Nbk/Bik-Expression bei Nierenkarzinomzellen durch Heterozygotie-Verlust (Loss of Heterozygosity „LOH“) am Nbk-Lokus des Chromosom 22q13.2 bzw. durch epigenetische Stilllegung. Dagegen ist die reguläre Nbk-Expression bei normalen Nierenepithelzellen hoch (Daniel et al. 1999). Auch bei kolorektalen Karzinomen und Mammakarzinomen wurden kurze Chromosomendeletionen am Nbk-Lokus gefunden (Castells et al. 2000). Paradoxerweise zeigte sich bei einer anderen Studie zu sporadischen Mammakarzinomen eine hohe Nbk-Expression (Garcia et al 2005). Ebenso fand sich bei NSCLC (Non small cell lung cancer) eine Korrelation zwischen schlechter Prognose und hohem Nbk-Transkript (Lu et al. 2006). Allerdings ging bei NSCLC die hohe Nbk-Expression interessanterweise mit hoher Bcl-2-Expression einher, wodurch der proapoptotische Effekt von Nbk während der Tumorgenese unterdrückt worden sein könnte.

Aufgrund der beschriebenen, teils konträren Hinweise, auf einen prognostischen Einfluss des Nbk-Expressionsniveaus, war die Analyse des Nbk-Transkripts und seiner Relevanz bei akuter myeloischer Leukämie für uns von besonderem Interesse. Insbesondere weil bei Experimenten an hämatologischen Zellen eine ausreichende Nbk-Expression Voraussetzung für eine funktionierende Apoptose zu sein schien. So konnte beispielsweise bei Therapie-resistenten T-ALL-(akute lymphatische Leukämie-) Zelllinien durch die Vektor-vermittelte Nbk-Expressionserhöhung eine erneute Sensitivität gegenüber Kortikosteroid-induziertem Zelltod verliehen werden (Daniel et al. 1999). Valdez et al. (2008) fanden bei Patienten mit myeloischer Leukämie eine erniedrigte Nbk-Expression. Interessanterweise zeigte sich diese auch bei Busulfan-resistenten leukämischen Zelllinien. Busulfan (bifunktionelles Alkylans) wird häufig in der Konditionierung vor allogener/autologer Stammzelltransplantation eingesetzt und könnte für seine zytostatische Funktion auf eine ausreichende Nbk-Expression angewiesen sein. Denn Nbk ist ein Effektor des p53-Signalweges, der z.B. nach DNA-Schädigung aktiviert wird (Mathai et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der Überlebenszeitanalyse des Gesamtkollektivs für Nbk kein signifikanter Vorteil bei hoher Expression. Wie im Methodenteil beschrieben wurde für die dichotome Aufteilung in hohe bzw. niedrige Expression der Median als Schwellenwert verwendet. Dabei handelt es sich um einen willkürlich festgelegten Trennpunkt, der nicht zuletzt aus Gründen einer gleichmäßigen Fallzahlverteilung auf beide Gruppen häufig Verwendung

findet (bsp. Molica et al. 2006, Pickard et al. 2009). In ausgewählten Fällen mag es sich dabei aber nicht um eine günstige Wahl handeln, insbesondere wenn es sich wie in dieser Arbeit um eine Aufteilung innerhalb eines erkrankten Kollektivs handelt. Daher entschieden wir uns für eine zusätzliche Auftrennung entlang extremerer Schwellenwerte. Diese Vorgehensweise wurde auch von anderen Arbeitsgruppen wie z.B. Sturm et al. (1999) angewandt, indem sie bei kolorektalen Tumoren die Bax-Expression $\leq 10\%$ als niedrig und $>10\%$ als hoch exprimierend einstufen. Wir prüften analog für Nbk die Überlebenszeiten unter Zuhilfenahme der extremen Schwellenwerte entlang der 10. bzw. 20. Perzentile. Dadurch konnte nun der positive Effekt einer hohen Nbk-Expression demaskiert werden. Nur extrem niedrige Nbk-Expressionslevel unterhalb der 10. bzw. 20. Perzentile bedeuteten ein signifikant schlechteres krankheitsfreies Überleben ($p=0,012$ bei Schwellenwert 10% bzw. $p=0,027$ bei Schwellenwert 20%), bei fehlendem Einfluss auf das Gesamtüberleben. Das macht deutlich, dass sich erst sehr niedrige Expressionsniveaus negativ auf die Apoptosefunktion auswirken und dass sich ein Abweichen vom Median als Schwellenwert in bestimmten Fällen rechtfertigt.

Weiterhin konnten wir zeigen, dass das Vorliegen einer NPM1-Mutation signifikant mit höheren Nbk-Expressionsniveaus korreliert ist. Wie bereits in Abschnitt 1.1.6 beschrieben, wird das Vorliegen einer NPM1-Mutation als prognostisch günstig angesehen, was in der vorliegenden Arbeit durch ein signifikant längeres krankheitsfreies Überleben bei NPM1-Mutation bestätigt wurde. Nun könnten die signifikant höheren Nbk-Expressionswerte bei Patienten mit NPM1-Mutation einen Hinweis darauf geben, dass die bessere Prognose der NPM1mut u.a. auch auf einer Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalweges beruht. Dabei könnte die in Abschnitt 4.2.6 bereits diskutierte Rolle des NPM1-Proteins als p53-Inhibitor (Li et al. 2005) herangezogen werden, welcher durch die Mutation seine hemmende Funktion verliert und damit über den p53-Signalweg Nbk induziert. Zudem sind p53-Mutationen in den zytogenetischen Subgruppen der AML, in denen NPM1-Mutationen hauptsächlich vorkommen, sehr selten (p53-Mutation bei AML ohne komplexen Karyotyp: 2,1%) (Haferlach et al. 2008). Ob dies tatsächlich ein zugrundeliegender Mechanismus der gefundenen Korrelation zwischen NPM1-Mutation und Nbk-Expressionshöhe sein könnte, muss erst noch durch gezielte experimentelle Studien geklärt werden. Vor allem, da die Interaktion zwischen NPM1 und p53 kontrovers ist.

Das proapoptotische Bcl-g, welches erstmalig im Jahr 2000 von Guo et al. (2001) beschrieben wurde, stellte sich als zweites Gen mit signifikanter Korrelation zum NPM1-Mutationsstatus heraus. Überraschenderweise ergab sich dabei aber ein inverser Zusammenhang, wobei die prognostisch günstige NPM1-Mutation signifikant niedrigere Bcl-g-Werte aufwies. Auch bei

Vorliegen eines ungünstigen Karyotyps war eine niedrige Bcl-g-Expression mit einer günstigeren Überlebensprognose (längeres krankheitsfreies Überleben, $p=0,037$) assoziiert.

Kornblau et al. (2000) berichteten von einem Karyotyp-abhängigen Effekt des antiapoptotischen Bcl-2 bei akuter myeloischer Leukämie. Sie fanden heraus, dass eine hohe Bcl-2-Genexpression bei günstigem und intermediärem Karyotyp erwartungsgemäß prognostisch ungünstig war, wohingegen beim ungünstigen Karyotyp ein entgegengesetzter Effekt, nämlich eine günstige Prognose bei hohem Transkript, zu beobachten war. In der vorliegenden Arbeit könnte es sich auch um einen Karyotyp-abhängigen Effekt handeln, da sich bei Analyse des Gesamtkollektivs bzw. des günstigen oder intermediären Karyotyps keine weiteren Signifikanzen bezüglich der Bcl-g-Expressionshöhe zeigten. Das Fehlen eines relevanten Einflusses der Bcl-g-Transkripthöhe auf die Prognose im Gesamtkollektiv wird durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen wie z.B. Pickard et al. (2010) bestätigt. Diese fanden bei der Analyse von Prostatakarzinomen im Vergleich zu gesundem Gewebe ebenfalls nur tendenziell erniedrigte Bcl-g-mRNA-Level. Eine andere Arbeitsgruppe konnte jedoch eine signifikante Bcl-g Reduktion bei Prostatakarzinomen nachweisen (Kibel et al. 2004). Passend dazu wurde in einer weiteren Studie von Pickard et al. (2009) zu Mammakarzinomen ebenfalls eine signifikant verminderte Bcl-g-Expression in Tumorzellen gefunden, welche aber keine Korrelation zu der Überlebenszeit ergab. Daher liegt es nahe, dass die Regulation der Bcl-g-Aktivität eher nicht über dessen Transkription bzw. Expressionsniveau, sondern vor allem über posttranslationale Modifikationen erfolgt (Pickard et al. 2009). Dies könnte zum einen den fehlenden prognostischen Einfluss der Bcl-g-Genexpressionshöhe im Gesamtkollektiv und zum anderen die scheinbar paradoxe Korrelation zwischen niedrigem Transkript eines proapoptotischen Gens und günstiger Prognose (längeres Überleben in der Gruppe mit ungünstigem Karyotyp bzw. Assoziation mit NPM1-Mutation) erklären. Bcl-g hat zudem zwei Splicevarianten, von denen Bcl-g_L nur schwach apoptotisch wirkt, während Bcl-g_S potenter ist. Allerdings scheint es sich um einen gewebeabhängigen Splicevorgang zu handeln, da Bcl-g_S mRNA bisher nur im Hoden gefunden wurde (Guo et al. 2000). Daher ist anzunehmen, dass es sich bei den hämatologischen Zellen um die nur schwach proapoptotische Variante Bcl-g_L handelt dürfte.

Zusammengefasst könnte Nbk ein vielversprechender prognostischer Marker bei akuter myeloischer Leukämie sein, solange ein niedriger Schwellenwert Anwendung findet. Durch gezielte therapeutische Ansätze, die zu seiner Expressionszunahme führen, könnte zudem das klinische Ansprechen auf Chemotherapien verbessert werden. Dabei würden sich bezüglich der anfangs beschriebenen epigenetischen Stilllegung des Nbk-Genlokus vor allem DNA-

Methyltransferase (DNMT)-Inhibitoren und Histondeacetylase (HDAC)-Inhibitoren anbieten. Denn sowohl die Methylierung von DNA als auch die Modifikation von Histonen stellen epigenetische Alterationen dar, durch die die Genexpression reversibel und unabhängig von der DNA-Sequenz reguliert werden kann. Durch die Acetylierung von Histonen, um die der DNA-Strang platzsparend gewickelt ist, kommt es zur Übertragung von negativ geladenen Acetylgruppen auf die Histone. Dadurch wird die ebenfalls negativ geladene DNA abgestoßen und ihre Struktur lockert sich auf, was es Transkriptionsfaktoren erleichtert Zugang zur DNA zu erhalten und die Gentranskription zu initiieren. Histondeacetylasen bewirken hingegen durch Abspaltung von Acetylgruppen eine enge Bindung von Histonen und DNA, wodurch regulatorische Genabschnitte für die Transkription blockiert werden. In einer Studie von Dai et al. (2006) zeigte sich bereits die Beeinflussbarkeit der Genexpression von Nbk durch epigenetische Therapeutika. Dai und Mitarbeiter identifizierten Nbk als einziges unter 376 in den Apoptoseprozess involvierten Gene, für welches eine Zunahme der Genexpression durch den DNMT-Inhibitor 5-Aza-2'-Desoxycytidine und den HDAC-Inhibitor Depsipeptid in allen getesteten Tumorzelllinien beschrieben werden konnte (Dai et al. 2006).

Dagegen scheint die alleinige Bestimmung des Expressionsniveaus von Bcl-g bei akuter myeloischer Leukämie nicht sinnvoll zu sein. Einzig in der Subgruppe mit ungünstigem Karyotyp ist ein niedriges Bcl-g-Transkript prognostisch günstig.

4.3.4 Verhalten der Genexpression im Rezidiv

Bei 50% bis 85% aller AML-Patienten kommt es nach Erreichen einer kompletten Remission zu einem Rezidiv (Farag et al. 2005; Xu et al. 2006; Liu Yin et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit erreichten insgesamt 79 Patienten eine komplette Remission, von denen dann 41 (51,9%) rezidierten (davon 58,5% innerhalb des ersten Jahres). Das Auftreten eines Rezidivs ist mit einer schlechten Prognose verbunden, insbesondere wenn die krankheitsfreie Zeit weniger als 12 Monate angehalten hatte. Selbst wenn eine erneute Blastenfreiheit mittels intensiver Chemotherapie oder Stammzelltransplantation erreicht werden konnte, liegt die 5-Jahresüberlebenschance je nach Risikoprofil (Länge der ersten Remission, Alter, Zytogenetik, bereits erfolgte Stammzelltransplantation) nur bei 4% bis 46% (Breems et al. 2005). Um die unbefriedigenden Therapieergebnisse im Rezidivfall verbessern zu können, wird aktuell nach Faktoren gesucht, die eine individuellere Risikoeinschätzung erlauben und die Möglichkeit zu gezielten Therapieansätzen darstellen.

Um einen Eindruck davon erhalten zu können, inwiefern sich die Genexpressionsprofile vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum Auftreten eines Rezidivs verändert hatten, wurden mittels Mann-Whitney-U-Test ungepaarte und mittels Wilcoxon-Test gepaarte Vergleiche der verfügbaren Proben durchgeführt. In den wenigsten der uns bekannten Studien wurden Genexpressionen der Bcl-2-Familie von Erstdiagnose und Rezidiv direkt miteinander verglichen. Stattdessen stand zumeist der Überlebenszeitenvergleich zweier Gruppen (hohe vs. niedrige Genexpression zum Diagnosezeitpunkt) bis zu den Endpunkten Tod oder Rezidiv im Mittelpunkt. Der Vergleich der Expressionshöhe zu beiden Zeitpunkten ist aber vor allem deshalb von Interesse, weil dadurch Veränderungen innerhalb der Apoptosesignalwege widerspiegelt werden, die erst nach Stellung der Erstdiagnose bzw. Induktionstherapie stattgefunden haben. Solche Veränderungen geben Aufschluss darüber, wie durch zelluläre Anpassungsmechanismen und durch Selektion besonders aggressiver Tumorzellen das Auftreten von Rezidiven und Therapieresistenz favorisiert werden. Denn zum einen mag der initiale Zellklon im Verlauf der mutagenen Induktionschemotherapie durch zusätzliche Mutationen in seinem Phänotyp verändert worden sein. Zum anderen kann man von einer bei Erstdiagnose bereits bestehenden Heterogenität der entarteten hämatologischen Zellen ausgehen, von denen unter dem Selektionsdruck der Induktionschemotherapie einige wenige therapieresistente Zellen überleben, welche zu einem späteren Zeitpunkt das nun therapierefraktäre Rezidiv verursachen. In dieser Arbeit wurden im ungepaarten Vergleich insgesamt 4 antiapoptotische Gene und 8 proapoptotische Gene identifiziert, deren Expressionsspiegel sich im Rezidiv signifikant von jenem bei Erstdiagnose unterscheidet. Bei drei antiapoptotischen Genen (Mcl-1, Bcl-w und Bfl1-A1) zeigte sich erwartungsgemäß eine deutlich erhöhte Expression zum Zeitpunkt des Rezidivs als Ausdruck einer verminderten Apoptoseaktivität. Diese Veränderung im Expressionsmuster könnte also (mit-)verantwortlich für das schlechtere Ansprechen auf die Rezidivchemotherapie sein, denn im analysierten Kollektiv sprachen nur 13 von 36 Patienten auf die Rezidivtherapie an (auch bei Exklusion der stammzelltransplantierten Patienten lag die Remissionsrate bei knapp 50%), wohingegen 74% eine komplette Remission nach Ersttherapie erreicht hatten. Für rezidierte Patienten, die keine autologe oder allogene Stammzelltransplantation aufgrund von Komorbiditäten oder fehlendem Spender erhalten können, ist die Prognose oft infaust (Shipley und Butera 2009). Doch auch jene AML-Patienten mit geplanter Stammzelltransplantation sollten zunächst eine zweite komplette Remission erreichen. Dies schaffen jedoch nur 10% -20% der Patienten, bei denen die erste Remission weniger als 12 Monate angehalten hatte (Estey 2000). Insgesamt herrscht noch viel Unsicherheit über die Therapiewahl und den günstigsten Transplantationszeitpunkt im Falle eines Rezidivs.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen nun vermuten, dass Mcl-1 ($p < 0,001$), Bcl-w ($p = 0,003$) und Bfl1/A1 ($p = 0,046$) im Rezidiv ursächlich zur Zytoprotektion beitragen könnten. Das ist sehr interessant, da heutzutage einige Substanzen zur Verfügung stehen, die durch gezielte Interaktionen dem Übergewicht der antiapoptotischen Bcl-2-Gene bzw. -Proteine entgegenwirken können. Als epigenetische Therapiestrategie können beispielsweise Antisense-Oligodesoxynukleotide (ODNs) zur Degradierung von mRNA angewendet werden. Oblimersen, das erste Bcl-2-Antisense-Oligonukleotid, wurde bereits mit vielversprechendem Ergebnis in einigen Studien mit rezidivierender oder refraktärer AML getestet (Marcucci et al. 2003; Marcucci et al. 2005). Aufgrund geringer Wirksamkeit (wegen fehlender Inhibierung der anderen Bcl-2-homologen Apoptosehemmer) und der ungünstigen Pharmakokinetik wurde die Entwicklung von Oblimersen (Genasense) jedoch eingestellt. Vielversprechender scheint hingegen die Entwicklung von „small-molecule-inhibitors“ zu sein, welche antiapoptotische Bcl-2-Mitglieder direkt auf Proteinebene hemmen (Reed et al. 2005). Diese niedermolekularen Bcl-2-Antagonisten entfalten ihre Wirkung indem sie die, aus den BH1-3-Domänen gebildete, Bindetasche von Bcl-2 besetzen und so die proapoptotischen BH3-only-Proteine aus der inhibierenden Bindung mit Bcl-2 freisetzen und die Aktivierung von Bax und Bak erleichtern. So wurde beispielsweise von GeminX Biotechnologies ein Pan-Bcl-2-Inhibitor entwickelt (Obatoclax), welcher an Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1 und Bfl1/A1 bindet und deren Aktivität inhibiert. Eine kürzlich durchgeführte randomisierte Phase-II-Studie bei SCLC (small cell lung cancer) ergab einen positiven Trend hinsichtlich der Ansprechrate, dem progressionsfreien Überleben sowie dem Gesamtüberleben zugunsten der Kombination aus Carboplatin/Etoposid und Obatoclax (Paik et al. 2011). Ein weiteres niedermolekulares BH3-Mimetikum ist ABT-737 von Abbott Laboratories, welches präferentiell an Bcl-2, aber auch an Bcl-xl und Bcl-w bindet und in der Monotherapie eine eindrucksvolle präklinische Aktivität bei Lungenkarzinomen gezeigt hat (Oltersdorf et al. 2005). In einer weiteren präklinischen Studie an AML-Zellen beschrieben Konopleva und Mitarbeiter (2006) jedoch einen Wirkverlust bei Mcl-1-Überexpression, der auf die fehlende Affinität von ABT-737 zu Mcl-1 zurückzuführen ist. Durch Hemmstoffe mit Aktivität gegen Mcl-1 könnte die Resistenz gegenüber ABT-737 überwunden werden.

Im ungepaarten Vergleich erlangte überraschenderweise eine erniedrigte Genexpression von Bcl-2 zum Zeitpunkt des Rezidivs ($p = 0,012$) ebenfalls Signifikanz, welche sich im direkten Paarvergleich aber nicht bestätigte. Grund für das paradoxe Ergebnis könnte zum einen die niedrige Anzahl der Rezidivproben (18) sein, die womöglich zu einem irrtümlich signifikanten Ergebnis geführt hat. Oder aber das Überwiegen der drei anderen hoch exprimierenden

antiapoptotischen Gene im Rezidiv hat die Notwendigkeit eines hohen Bcl-2-Transkripts überflüssig gemacht. Ebenfalls gegen einen relevanten Einfluss vom Bcl-2-Transkript bei AML sprechen die Ergebnisse einer anderen Studie, bei welcher sowohl erhöhte als auch erniedrigte Bcl-2-Expressionswerte zum Zeitpunkt des Rezidivs ermittelt wurden (Kaufmann et al. 1998).

Eine weitere Überlegung bezieht sich auf die Funktion von Bcl-2 als reinen Bax-Antagonisten (Hanada et al. 1995; Willis et al. 2005). Da sich die Bax-Expression im AML-Kollektiv zum Rezidivzeitpunkt als signifikant reduziert darstellte (wird noch im folgenden Abschnitt diskutiert), könnte die Höhe der Bcl-2-Expression hier weitestgehend irrelevant für das Tumorüberleben bzw. die diskutierte Therapieresistenz gewesen sein. Hingegen wird Bak durch Mcl-1, Bcl-xl und Bfl1/A1 inhibiert, wobei es in Bezug auf Bfl1/A1 kontroverse Berichte gibt (Willis et al. 2005; Holmgreen et al. 1999). Bei den beiden endogenen Bak-Inhibitoren Mcl-1 und Bfl1/A1 ergab sich in den Analysen zum Rezidivzeitpunkt eine signifikante Expressionszunahme, wodurch es zu einer Hemmung des Bak-Proteins gekommen sein dürfte. Dies, zusammen mit der bereits erwähnten Reduktion der Bax-Expression, würde folglich in einer potenten Hemmung des intrinsischen Apoptosesignalweges resultieren und könnte als Erklärungsmöglichkeit für die Therapieresistenz im Rezidiv herangezogen werden.

Bezüglich der proapoptotischen Gene ergab sich im ungepaarten Vergleich bei knapp der Hälfte der analysierten Gene ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen Erstdiagnose und Rezidiv. Nur zwei von ihnen (Bax und Bfk) zeigten zum Rezidivzeitpunkt eine niedrigere Expression, während es bei der Mehrheit (Bok, Hrk, Puma, Bim, Itm2b, Nix) zu einer Expressionszunahme gekommen war. Dieses Ergebnis deutet eher auf eine Zunahme der Apoptoseaktivität zum Zeitpunkt des Rezidivs gegenüber jener bei Erstdiagnose hin, was nicht gut zu der klinischen Therapieresistenz passt. Nun mag es durch die ungleiche und kleine Probenanzahl an beiden Zeitpunkten (108 Proben von Erstdiagnose und 18 Proben vom Rezidiv) zu einer Verzerrung der Ergebnisse gekommen sein. Außerdem ist zu bedenken, dass im ungepaarten Vergleich alle Patientenproben der Erstdiagnose mit in die Analyse einfließen, egal ob sie später ein Rezidiv erleiden (49 Patienten), ohne zu rezidivieren versterben (29 Patienten) oder im Beobachtungszeitraum rezidivfrei bleiben (26 Patienten). Die allgemeine Genexpressionszunahme sowohl der pro- als auch antiapoptotischen Bcl-2 Mitglieder könnte aber auch Ausdruck einer verstärkten Deregulation des intrinsischen Apoptosesignalweges als solchen und eines erhöhten Zellumsatzes durch den schnell und unkontrolliert proliferierenden malignen Zellklon sein. Oder es handelt sich bei der Expressionszunahme der proapoptotischen Gene im Rezidiv um einen Kompensationsmechanismus bei gleichzeitig erhöhter Mcl1-, Bcl-w-

und Bfl1/A1-Expression. Zudem könnten im Laufe der Tumorprogression andere zelltodinhibierende Mechanismen an Bedeutung gewonnen haben.

Aufschlussreicher, was die Veränderung des Gentranskripts bei den einzelnen Patienten angeht, ist wohl der gepaarte Vergleich der Proben von Erstdiagnose und Rezidiv, für den uns leider nur 13 Probenpaare zur Verfügung standen. Dennoch zeichneten sich hierbei interessante Ergebnisse ab: Als einziges antiapoptotisches Mitglied zeigte sich bei Mcl-1 (myeloid cell leukemia-1) eine signifikante Erhöhung der Genexpression ($p=0,003$) im Rezidiv, was die bereits diskutierte Beobachtung aus dem ungepaarten Test bestätigt. Mcl-1, welches auf Chromosom 1q21 lokalisiert ist, wurde erstmalig 1993 von der Arbeitsgruppe um Kozopas in sich differenzierenden myeloischen Zellen identifiziert (Kozopas et al. 1993). Man weiß, dass Mcl-1 für die Homöostase hämatopoetischer Progenitorzellen eine wichtige Rolle spielt (Opferman et al. 2005) und bei einer Vielzahl von Malignomen überexprimiert ist (Krajewska et al. 1996; Kaufmann et al. 1998; Kitada et al. 1998). In Übereinstimmung mit unserem Ergebnis fanden auch Kaufmann und Mitarbeiter (1998) einen Zusammenhang zwischen Chemotherapieresistenz und erhöhten Expressionswerten von Mcl-1 bei rezidivierten myeloischen und lymphatischen Leukämiezellen.

Passend zu der reduzierten Apoptoserate durch das erhöhte Mcl-1-Transkript scheinen auch Bax ($p=0,039$) und Bcl-rambo ($p=0,016$) durch Reduktion ihres ursprünglichen Expressionsniveaus zur Rezidiventstehung bzw. Therapieresistenz beizutragen. Beide gehören zu den zelltodfördernden Mitgliedern der Bcl-2 Familie, wobei Bax (Bcl-2 associated protein X) als Effektorprotein eine Schlüsselrolle obliegt. In gesunden Zellen ist Bax ein zytosolisches Protein, welches durch Apoptosestimuli zur äußeren Mitochondrienmembran transloziert, sie permeabilisiert und so den Zelltod induziert (Wolter et al. 1997; Gross et al. 1998). Zusammen mit Bak ist es daher ein essentieller Bestandteil des intrinsischen Apoptosesignalweges.

Die in dieser Arbeit gesehene Reduktion des Bax-Transkriptes im Rezidiv unterstützt das Ergebnis einer ALL-Studie von Prokop et al. (2000), bei der ebenfalls eine erniedrigte Bax-Expression zum Zeitpunkt des Rezidivs sowohl im gepaarten als auch ungepaarten Vergleich gefunden wurde. Dagegen konnte bei einer anderen Studie, dort zur AML, kein signifikanter Unterschied der Bax-Expression zwischen Erstdiagnose und Rezidiv gefunden werden (Ong et al. 2000). Hierbei wurde allerdings eine noch kleinere, nicht repräsentative Fallzahl analysiert (8 Probenpaare). Obwohl der prognostische Einfluss des Bax-Expressionsniveau zum Diagnosezeitpunkt aufgrund vieler kontroverser Studienergebnisse unklar ist (Köhler et al. 2002; Bairey 1999; Kornblau et al. 2000; Srinivas et al. 2000) und daher aktuell nicht als prognostischer Marker verwendet werden kann (siehe auch fehlende Signifikanz in der

vorliegenden Arbeit), scheint die Bestimmung des Bax- (und auch Bcl-rambo-) Transkriptes zum Rezidivzeitpunkt wichtige Informationen über die im Krankheitsverlauf verlorengangene Apoptosefähigkeit zu liefern, welche den rezidierten Zellklon resistent(er) gegenüber der Salvagetherapie macht. Vielleicht könnte durch Bestimmung des Bax- und Bcl-rambo-Expressionsverlaufs, analog zur erhöhten Expression von Mcl-1, Bcl-w und Bfl1/A1 ein Indikator entstehen, der Patienten identifiziert, die beispielsweise ohne eine zweite Remission erreicht zu haben direkt eine Stammzelltransplantation erhalten sollten. Aufgrund der kleinen Fallzahl in dieser Arbeit können die Ergebnisse allerdings nur als erste Hinweise für die Verwendung von Bax- und Bcl-rambo und anderen Faktoren als mögliche Indikatoren angesehen werden, die Anlass zu weiteren Studien geben sollten.

Im Gegensatz zur Reduktion des Bax- und Bcl-rambo-Transkripts im gepaarten Wilcoxon-Test fanden wir eine signifikante Zunahme der proapoptotischen Bim-Expression im Rezidiv. Bim (Bcl-2 interacting mediator of cell death) wird ebenso wie Bmf durch Schädigung des Zytoskeletts, an das es im inaktiven Zustand gebunden ist, aktiviert und induziert anschließend Apoptose (Puthalakath et al. 1999; Lei und Davis 2003). Warum also die Bim-Genexpression im untersuchten Kollektiv im Rezidiv höher als bei Erstdiagnose war, ist nicht klar. Certo und Mitarbeiter (2006) beschrieben ein Phänomen, bei dem Tumorzellen von der Anwesenheit antiapoptotischer Bcl-2-Proteine abhängig sind, um dem programmierten Zelltod durch bereits hochregulierte BH-3-only-Proteine zu entgehen. Dieser als „primed-to-death“ benannte Zustand wurde beispielsweise auch bei CLL beschrieben, wo erhöhte Expressionswerte von Bim mit einer Überexpression von antiapoptotischen Bcl-2 assoziiert waren (Del Gaizo Moore et al. 2007).

Unter Vorstellung dieses Modells könnte, in Zusammenhang mit der simultanen Mcl-1-Expressionszunahme, das im Rezidiv signifikant erhöhte Bim-Transkript erklärt werden.

5. Zusammenfassung

Aberrationen innerhalb von Signalwegen, die an der Regulation von Zelltod und Zellüberleben beteiligt sind, spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Tumoren und deren Therapieresistenz. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher bei der akuten myeloischen Leukämie den mTOR-Signalweg und die Bcl-2-Genfamilie auf ihren prognostischen Einfluss und ihre Beteiligung an der Entstehung von Resistenzmechanismen zu untersuchen. Hierdurch sollte das Verständnis der der Krankheit zugrunde liegenden molekularen Veränderungen verbessert werden, was eine Voraussetzung für die Entwicklung und den Einsatz zielgerichteter Therapeutika darstellt. Dafür wurden mittels quantitativer Taqman-PCR systematisch (1) die Expressionen der wesentlichen bekannten Regulatoren, sowie ausgewählter Zielgene des mTOR-Signalwegs und (2) die komplette Bcl-2-Genfamilie zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und, teilweise, des Rezidivs analysiert. Weiterhin wurde der FLT3- und NPM1-Mutationsstatus bestimmt, die Daten in Relation zu den zytogenetischen Risikogruppen gebracht und in Relation zum Krankheitsverlauf korreliert. Zusammenfassend ergaben sich bei den systematischen Genanalysen neue interessante Erkenntnisse zur Regulation von Zellüberleben und Proliferation durch NPM1 und den mTOR-Signalweg. Es ergaben sich erstmalig Hinweise darauf, dass Veränderungen im mTOR-Signalweg ursächlich an der günstigen Prognose einer NPM1-Mutation beteiligt sein könnten. Denn das Vorliegen einer NPM1-Mutation korrelierte mit hoher TSC2- und niedriger D-Typ-Cyclin-Expression, was für eine Inhibierung des mTOR-Signalweges durch den TSC1/2-Komplex spräche. Hohes TSC2 (Tuberin) und, in geringerem Ausmaß, hohes TSC1 (Hamartin) wiesen zudem ein längeres Gesamt- und krankheitsfreies Überleben sowie eine Reduktion der Genexpression im Rezidiv auf, was TSC zu einem interessanten Biomarker macht. Weiterhin ergaben sich neue wesentliche Einblicke in die Zelltodregulation durch die Bcl-2-Genfamilie. Eine extrem niedrige Nbk/Bik-Expression korrelierte mit einem verkürzten krankheitsfreien Überleben. Außerdem fanden wir signifikant höhere Nbk-Expressionswerte in der Subgruppe mit NPM1-Mutation, was ebenfalls auf eine Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalweges bei NPM1-Mutation hindeutet. Neben einer Reihe von weiteren Ergebnissen fanden wir bemerkenswerte Hinweise auf Mechanismen der Apoptoseresistenz im Rezidiv. Dabei scheint es durch die simultane Hemmung von Bak und Bax zu einer potenten Inhibierung der Apoptose zu kommen, worauf die Expressionszunahme der endogenen Bak-Inhibitoren Mcl-1 und Bfl1/A1 und die Reduktion der Bax-Expression im Rezidiv hindeutet.

6. Literaturverzeichnis

- Arena V, Martini M, Luongo M, Capelli A, Larocca LM. Mutations of the BIK Gene in Human Peripheral B-Cell Lymphomas. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 2003; 38:91-96
- Bai X, Jiang Y. Key factors in mTor regulation. *Cell Mol Life Sci*. 2010; 67:239-53
- Bairey O, Zimra Y, Shaklai M, Okon E, Rabizadeh E. Bcl-2, Bcl-X, Bax, and Bak Expression in Short- and Long-Lived Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *Clinical Cancer Research*. 1999; 5:2860-66
- Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes & Development*. 1993; 7:812-21
- Benvenuto G, Li S, Brown SJ, et al. The tuberous sclerosis-1 (TSC1) gene product hamartin suppresses cell growth and augments the expression of the TSC2 product tuberin by inhibiting its ubiquitination. *Oncogene*. 2000; 19:6306-16
- Berger DP, Engelhardt R, Mertelsmann, Engelhardt M, Henß H. Akute myeloische Leukämie. *Das Rote Buch/Hämatologische und internistische Onkologie*. 2010; 4.Aufl.; 582-91
- Besten den W, Kuo M-L, Williams RT, Sherr CJ. Myeloid Leukemia-Associated Nucleophosmin Mutants Perturb p53-Dependent and Independent Activities of the Arf Tumor Suppressor protein. *Cell Cycle*. 2005; 4:1593-8
- Boyd JM, Gallo GJ, Elangovan B, et al. Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene*. 1995;11:1921-8
- Breems DA, Van Putten W, Huijgens PC, et al. Prognostic Index for Adult Patients With Acute Myeloid Leukemia in First Relapse. *J Clin Oncol*. 2005; 23:1969-78
- Burgstaller S, Rosner M, Lindengrün C, et al. Tuberin, p27 and mTOR in different cells. *Amino Acids* (Springer Verlag). 2009; 36:297-302
- Castells A, Gusella JF, Ramesh V, Rustgi AK. A Region of Deletion on Chromosome 22q13 Is Common to Human Breast and Colorectal Cancers. *Cancer Research*. 2000; 60:2836-39
- Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M, et al. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic Bcl-2 family members. *Cancer Cell*. 2006; 9:351-65
- Chakraborty S, Mohiyuddin AM, Gopinath KS, Kumar A. Involvement of TSC genes and differential expression of other members of the mTOR signaling pathway in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2008; 8:163-75
- Chen L, Willis SN, Wei A, et al. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell*. 2005; 17:393-403
- Chinnadurai G, Vijayalingam S, Rashmi R. BIK, the founding member of the BH3-only family proteins: mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenetic processes. *Oncogene*. 2009; 27:20-29
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Douglas RE. The Bcl-2 Family Reunion. *Mol Cell*. 2010; 37:299-310
- Chong-Kopera H, Inoki K, Li Y, et al. TSC1 Stabilizes TSC2 by Inhibiting the Interaction between TSC2 and the HERC1 Ubiquitin Ligase. *J Biol Chem*. 2006; 281:8313-6
- Choo AY and Blenis J. TORgeting oncogene addiction for cancer therapy. *Cancer Cell*. 2006; 9:77-9
- Cleary ML, Smith SD, Sklar J. Cloning and Structural Analysis of cDNAs for bcl-2 and Hybrid bcl-2/Immunoglobulin Transcript Resulting from the t(14;18) Translocation. *Cell*. 1986; 47:19-28
- Colombo E, Martinelli P, Zamponi R, et al. Delocalization and Destabilization of the Arf Tumor Suppressor by the Leukemia-Associated NPM Mutant. *Cancer Res*. 2006; 66:3044-50

- Consortium (The European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium). Identification and Characterization of the Tuberous Sclerosis Gene on Chromosome 16. *Cell*. 1993; 75:1305-15
- Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An Apoptosis-Inhibiting Baculovirus Gene with a Zinc Finger-Like Motif. *J Virol*. 1993; 67:2168-74
- Dai Z, Liu S, Marcucci G, Sadee W. 5-Aza-20-deoxycytidine and depsipeptide synergistically induce expression of BIK (BCL2-interacting killer). *BBRC*. 2006; 351: 455–61
- Daniel PT, Pun K-T, Ritschel S, et al. Expression of the Death Gene Bik/Nbk Promotes Sensitivity to Drug-Induced Apoptosis in Corticosteroid-Resistant T-Cell Lymphoma and Prevents Tumor Growth in Severe Combined Immunodeficient Mice. *Blood*. 1999; 94:1100-07
- Daniel PT, Schultz-Osthoff K, Belka C, Güner D. Guardians of cell death: the bcl-2 family proteins. *The Biochemical Society*. 2003; 39:73-88
- Daniel P. Molekulare Grundlagen der Apoptose. *Grundlagen der molekularen Medizin*. Hrsg. Ganten/Ruckpaul. 3. Aufl. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2008
- Dash A, Gilliland DG. Molecular genetics of acute myeloid leukemia. *Best Pract Res. Clin Haematol*. 2001;14:49-64
- Del Gaizo Moore V, Brown JR, Certo M, Love TM, Novina CD, Letai A. Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J. Clin. Invest*. 2007; 117:112-21
- Diehl JA. Cycling to Cancer with Cyclin D1. *Cancer Biology & Therapy*. 2002; 3:226-31
- Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*. 2005; 106:3740-46
- Döhner K, Döhner H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Hematologica*. 2008; 93(7):976-982
- Egle A, Harris AW, Bouillet P, Cory S. Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *PNAS*. 2004; 101:6164-69
- Engelman J, Luo J, Cantley L. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinase as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*. 2006; 7:606-619
- Estey E. Treatment of relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2000; 14:476-79
- Estey E und Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2006; 368:1894-907
- Falini B, Mecucci C, Tiacci E et al. Cytoplasmatic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotyp. *N Engl J Med*. 2005; 352:254-66
- Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmatic/mutated nucleophosmin (NPMc+AML): biologic and clinical features. *Blood*. 2007; 109:874-85
- Falini B, Gionfriddo I, Cecchetti F, Ballanti S, Pettirossi V, Martelli MP. Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): Any hope for a targeted therapy? *Blood*. 2011; 25:247-254
- Farag SS, Ruppert AS, Mrózek K, et al. Outcome of Induction and Postremission Therapy in Younger Adults With Acute Myeloid Leukemia With Normal Karyotyp; A Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol*. 2005; 23:482-93

- Fenaux P, Castaigne S, Dombret H. All-Transretinoic Acid Followed by Intensive Chemotherapy Gives a High Complete Remission Rate and May Prolong Remissions in Newly Diagnosed Acute Promyelocytic Leukemia: A Pilot Study on 26 Cases. *Blood*. 1992; 80:2176-81
- Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *PNAS*. 2005; 102:8204-9
- Ferrara F, Palmieri S und Leoni F. Clinically useful prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Oncology/Hematology*. 2008; 66:181-193
- Fingar D, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 2004; 23:3151-71
- Fischer U, Stroh C und Schulze-Osthoff K. Unique and overlapping substrate specificities of caspase-8 and caspase-10. *Oncogene*. 2006; 25:152-9
- Fletcher JI and Huang DC. BH3-only proteins:orchestrating cell death. *Cell Death and Differentiation*. 2006;13:1268-71
- Fonatsch C, Schwarzingler I, Mitterbauer G et al. Akute myeloische Leukämien. Molekulargenetische Grundlagen von hämatologischen Neoplasien. Hrsg. Ganten/Ruckpaul. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2003
- Fröhling S, Schlenk R, Breitnick J, et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood*. 2002; 100:4372-80
- Fröhling S, Scholl C, Gilliland D, Levine R. Genetics of Myeloid Malignancies: Pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol*. 2005; 23:6285-6295
- Gale RE, Green C, Allen C, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008; 111:2776-84
- Gao N, Flynn DC, Zhang Z, et al. G₁ cell cycle progression and the expression of G₁ cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004; 287:C281-91
- Garcia N, Salamanca F, Astudillo-de la Vega H, et al. A molecular analysis by gene expression profiling reveals Bik/NBK overexpression in sporadic breast tumor samples of Mexican females. *BMC Cancer*. 2005; 5:93
- García-Martínez J, Alessi D. mTor complex 2 controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced kinase 1 (SGK1). *Biochem J*. 2008; 416:375-85
- Graninger WB, Seto M, Boutain B, Goldman P, Korsmeyer SJ. Expression of Bcl-2 and Bcl-2-Ig Fusion Transcript in Normal and Neoplastic Cells. *J.Clin.Invest*. 1987;80:1512-15
- Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. *Nature*. 2006; 6:493-505
- Gross A, Jockel J, Wie MC, Korsmeyer SJ. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *The EMBO Journal*. 1998; 17:3878-85
- Guo B, Godzik A, Reed JC. Bcl-G, a Novel Pro-apoptotic Member of the Bcl-2 Family. *JBC*. 2001; 276:2780-85
- Gwinn D, Shackelford D, Egan D et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic Checkpoint. *Mol. Cell*. 2008; 30:214–226
- Haferlach T. Molecular genetic pathways as therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008; 400-11

- Hanada M, Aimé-Sempé C, Sato T, Reed JC. Structure-function analysis of Bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax. *J Biol Chem.* 1995; 270:11962-9
- Harrington LS, Findlay GM, Lamb RF. Restraining PI3K: mTOR signaling goes back to the membrane. *Trends Biochem Sci.* 2005; 1:35-42
- Helin K, Wu C-L, Fattaey AR, et al. Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation. *Genes Dev.* 1993; 7:1850-61
- Hess CJ, Berkhof J, Denkers F, et al. Activated Intrinsic Apoptosis Pathway Is a Key Related Prognostic Parameter in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol.* 2007; 25:1209-15
- Hiddemann W, Spiekermann K, Buske C, et al. Towards a pathogenesis-orientated therapy of acute myeloid leukemia. *Onkology/Hematology.* 2005; 56:235-245
- Holmgren SP, Huang DC, Adams JM, Cory S. Survival activity of Bcl-2 homologs Bcl-w and A1 only partially correlates with their ability to bind pro-apoptotic family members. *Cell Death Differ.* 1999; 6:525-32
- Huang J and Manning BD. The TSC1-TSC2 complex: a molecular swithboard controlling cell growth. *Biochem. J.* 2008; 412:179-90
- Huang J and Manning B. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTor complexes. *Biochem Soc Trans.* 2009; 37:217-22
- Inoki K, Zhu T, Guan K-L. TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell.* 2003; 115:577-90
- Jacinto E, Loewith R, Schmidt A et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol.* 2004; 6:1122-1128
- James MK, Ray A, Leznova D, Blain SW. Differential Modification of p27KIP1 Controls Its Cyclin D-cdk4 Inhibitory Activity. *Mol Cell Biol.* 2006; 28(1):498-510
- Jiang WG, Sampson J, Martin TA, et al. Tuberin and hamartin are aberrantly expressed and linked to clinical outcome in human breast cancer: The role of promotor methylation of TSC genes. *European Journal of Cancer.* 2005; 41:1628-36
- Karst AM, Dai DL, Martinka M, Li G. PUMA expression is significantly reduced in human cutaneous melanomas. *Oncogene.* 2005; 24:1111-16
- Karst AM und Li G. BH3-only proteins in tumorigenesis and malignant melanoma. *Cell.Mol.Life.Sci.* 2007; 64:318-330
- Kataoka K, Fujimoto K, Ito D, et al. Expression and prognostic value of tuberous sclerosis complex 2 gene product tuberin in human pancreatic cancer. *Surgery.* 2005; 138:450-5
- Kaufmann SH, Karp JE, Svingen PA, et al. Elevated Expression of the Apoptotic Regulator Mcl-1 at the Time of Leukemic Relapse. *Blood.* 1998; 91:991-1000
- Keniry M and Parsons R. The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy. *Oncogene.* 2008; 27:5477-85
- Kibel AS, Huagen J, Guo C, et al. Expression mapping at 12p12-13 in advanced prostate carcinoma. *Int. J. Cancer.* 2004; 109:668-72
- Kirkin V, Joos S, Zörnig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2004; 1644:229-249

- Kitada S, Andersen J, Akar S, et al. Expression of Apoptosis-Regulating Proteins in Chronic Lymphocytic Leukemia: Correlations With In Vitro and In Vivo Chemoresponses. *Blood*. 1998; 91:3379-89
- Knowles MA, Habuchi T, Kennedy W, Cuthbert-Heavens D. Mutation Spectrum of the 9q34 Tuberous Sclerosis Gene TSC1 in Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Cancer Research*. 2003; 63:7652-6
- Köhler T, Schill C, Deininger MW, et al. High Bad and Bax mRNA expression correlate with negative outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Leukemia*. 2002; 16:22-29
- Kolb HJ. Transplantation hämatopoetischer Stammzellen (Zellen). *Innere Medizin*. 5. Aufl. Hrsg. Berdel/Böhm/Classen/Diehl/Kochsiek. Urban & Fischer Verlag. München Jena 2004
- Konopleva M, Contractor R, Tsao T et al. Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2006; 10:375-88
- Kornblau SM, Vu HAT, Ruvolo P, et al. BAX and PKC α Modulate the Prognostic Impact of BCL2 Expression in Acute Myelogenous Leukemia. *Clinical Cancer Research*. 2000; 6:1401-09
- Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P, Craig RW. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci*. 1993; 90:3516-20
- Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, et al. Immunohistochemical Analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 Expression in Prostate Cancers. *Am J Pathol*. 1996; 148:1567-76
- Krajewska M, Zapata JM, Meinhold-Heerlein I, et al. Expression of Bcl-2 Family Member Bid in Normal and Malignant Tissues. *Neoplasia*. 2002; 4:129-140
- Kuo M, den Besten W, Bertwistle D, Roussel MF, Sherr CJ. N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumour suppressor. *Genes dev*. 2004; 18:1862-74
- Kuribara R, Honda H, Matsui H, et al. Roles of Bim in Apoptosis of Normal and Bcr-Abl-Expressing Hematopoietic Progenitors. *Molecular And Cellular Biology*. 2004; 24:6172-83
- Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD. BH3 Domains of BH3-Only Proteins Differentially Regulate Bax-Mediated Mitochondrial Membrane Permeabilization Both Directly and Indirectly. *Molecular Cell*. 2005; 17:525-35
- Labi V, Grespi F, Baumgartner F, Villunger A. Targeting the Bcl-2-regulated apoptosis pathway by BH3 mimetics: a breakthrough in anticancer therapy?. *Cell Death and Differentiation*. 2008; 15:977-87
- Lavia P, Jansen-Dürr P. E2F target genes and cell-cycle checkpoint control. *BioEssays*. 1999; 21:221-30
- Lei K and Davis RJ. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *PNAS*. 2003; 100:2432-37
- Leone G, Mele L, Pulsoni A, Equitani F, Pagano L. The incidence of secondary leukemias. *Haematologica*. 1999; 84:937-945
- Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*. 2002; 2:183-92
- Li J, Zhang X, Sejas DP, Pang Q. Negative regulation of p53 by nucleophosmin antagonizes stress-induced apoptosis in human normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia Research*. 2005; 29:1415-23
- Litzow MR. Progress and strategies for patients with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2007; 14:130-37
- Liu Yin JA, Wheatley K, Rees JK, Burnett AK. Comparison of 'sequential' versus 'standard' chemotherapy as re-induction treatment, with or without cyclosporine, in refractory/relapsed acute myeloid leukemia (AML): results of the UK Medical Research Council AML-R trial. *British Journal of Haematology*. 2001; 113:713-26

- Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999; 341:1051-1062
- Lu KH, Wu W, Dave B, et al. Loss of Tuberous Sclerosis Complex-2 Function and Activation of Mammalian Target of Rapamycin Signaling in Endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008; 14:2543-50
- Lu Y, Lemon W, Liu P-Y, et al. A Gene Expression Signature Predicts Survival of Patients with Stage I Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS Med.* 2006; 3:2229-43
- Malaguarnera L. Implications of apoptosis regulators in tumorigenesis. *Cancer and Metastasis Reviews.* 2004; 23:367-87
- Marcucci G, Byrd JC, Dai G, et al. Phase I and pharmacodynamic studies of G3139, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with chemotherapy in refractory or relapsed acute leukemia. *Blood.* 2003; 101:425-32
- Marcucci G, Stock W, Dai GD, et al. Phase I study of Oblimersen Sodium, an Antisense to Bcl-2, in Untreated Older Patients With Acute Myeloid Leukemia: Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Clinical Activity. *J Clin Oncol.* 2005; 23:3404-11
- Martelli A, Evangelisti C, Chiarini F et al. The emerging role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling network in normal myelopoiesis and leukemogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2010; 1803:991-1002
- Mathai JP, Germain M, Marcellus RC, Shore GC. Induction and endoplasmic reticulum location of BIK/NBK in response to apoptotic signaling by E1A and p53. *Oncogene.* 2002; 21:2534-44
- Mato AR, Morgans A und Luger SM. Novel strategies for relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol.* 2008; 15:108-14
- Mead AJ, Linch DC, Hills RK, Wheatley K, Burnett AK, and Gale RE. FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2007; 110:1262-1270
- Molica S, Vitelli G, Mirabelli R, Digiesu G, Giannarelli D, Cuneo A, Ribatti D, Vacca A. Serum levels of syndecan-1 in B-cell chronic lymphocytic leukemia: Correlation with the extent of angiogenesis and disease-progression risk in early disease. *Leukemia & Lymphoma.* 2006; 47:1034-40
- Mrózek K, Bloomfield C. Clinical significance of the most common chromosome translocations in adult acute myeloid leukemia. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2008; 39:52-57
- Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature.* 2005; 435:677-81
- Ong YL, McMullin MF, Bailie KE, Lappin TR, Jones FG, Irvine AE. High Bax expression is a good prognostic indicator in acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology.* 2000; 111:182-89
- Opferman JT, Iwasaki H, Ong CC, Suh H, Mizuno S, Akashi K, Korsmeyer SJ. Obligate role of antiapoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science.* 2005; 307: 1101-04
- Oshiro N, Yoshino K-I, Hidayat S, Tokunaga C, Hara K, Eguchi S, Avruch J, Yonezawa K. Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes to Cells.* 2004; 9: 359-366
- Paik PK, Rudin CM, Pietanza MC, et al. A phase II study of obatoclax mesylate, a Bcl-2 antagonist, plus topotecan in relapsed small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2011; 74:481-5
- Pickard MR, Green AR, Ellis IO, Caldas C, Hedge VL, Mourta-Maarabouni M, Williams GT. Dysregulated expression of Fau and MELK is associated with poor prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Research.* 2009; 11:R60

- Pickard MR, Edwards SE, Cooper CS, Williams GT. Apoptosis regulators Bax and Bcl-2 are down-regulated in prostate cancer. *Prostate*. 2010;70:1513-23
- Piper W. 2007. *Innere Medizin*. 1. Auflage. Springer Verlag. Heidelberg
- Preudhomme C, Sagot C, Boissel N et al. Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood*. 2002. 15; 100:2717-23
- Prokop A, Wieder T, Sturm I, et al. Relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with a decrease of the Bax/Bcl-2 ratio and loss of spontaneous caspase-3 processing in vivo. *Leukemia*. 2000; 14:1606-13
- Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A. The Proapoptotic Activity of the Bcl-2 Family Member Bim Is Regulated by Interaction with the Dynein Motor Complex. *Molecular Cell*. 1999; 3:287-96
- Puthalakath H, Strasser A. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and posttranslational control of the proapoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death and Differentiation*. 2002; 9:505-12
- Reed JC and Pellecchia M. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood*. 2005; 106:408-418
- Reed JC. Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood*. 2008; 111:3322-30
- Renneville A, Roumier C, Biggio V, et al. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia : a review of the literature. *Leukemia*. 2008;22:915-931
- Riedl SJ und Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004; 5:897-907
- Rosner M and Hengstschläger M. Tuberin Binds p27 and Negatively Regulates Its Interaction with the SCF Component Skp2. *J. Biol. Chem*. 2004; 279:48707-15
- Rosner M, Freilinger A, Hanneder M, Fujita N, Lubec G, Tsuruo T, Hengstschläger M. p27^{Kip1} localization depends on the tumor suppressor protein tuberin. *Human Molecular Genetics*. 2007; 16:1541-56
- Sanz MA. Treatment of acute promyelocytic leukemia. *Hematology. Am Soc Hematol Educ Program*. 2006;147-55
- Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*. 2006; 22:159-68.
- Schaich M, Ehninger G. Diagnostik und Therapie der akuten myeloischen Leukämie des Erwachsenen. *Onkologie*. 2006; 12:1003-1011. Springer Medizin Verlag
- Schimmer AD. Inhibitor of Apoptosis Proteins: Translating Basic Knowledge into Clinical Practice. *Cancer Res*. 2004; 64: 7183-90
- Schimmer AD. Apoptosis in leukemia: From molecular pathways to targeted therapies. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2008; 21:5-1
- Schmutte C, Tomblin G, Rhiem K, et al. Characterization of the Human Rad51 Genomic Locus and Examination of Tumors with 15q14-15 Loss of Heterozygosity (LOH). *Cancer Research*. 1999; 59:4564-69
- Schneider F, Hoster E, Unterhalt M, et al. NPM1 not FLT3-ITD mutations predict early blast cell clearance and CR rate in patients with normal karyotype AML (NK-AML) or high-risk myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood*. 2009; 113:5250-53
- Schnittger S, Schoch C, Dugas M, et al. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood*. 2002; 100:59-66

- Schnittger S, Schoch S, Kern W, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Blood*. 2005; 106:3733-39
- Senn H-J et al. 2001. Checkliste Onkologie, 5. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Severson RK, Davis S, Heuser L, Daling JR, Thomas DB. Cigarette smoking and acute nonlymphocytic leukemia. *Am J Epidemiol*. 1990; 3:418-22
- Sherr CJ and Roberts JM. Inhibitors of mammalian G 1cyclin-dependent kinases. *Genes & Development*. 1995; 9:1149-63
- Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol*. 2001; 2:731-7
- Shipley JL and Butera JN. Acute myelogenous leukemia. *Experimental Hematology*. 2009;37:649-58
- Slegtenhorst van M, Hoogt R, Hermans C et al. Identification of the Tuberous Sclerosis Gene TSC1 on Chromosome 9q34. *Science*. 1997; 277:805-808
- Soucet T, Pusch O, Wienecke R, DeClues JE, Hengstschläger M. Role of the Tuberous Sclerosis Gene-2 Product in Cell Cycle Control. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272:29301-08
- Soucet T, Yeung RS, Hengstschläger M. Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 upon loss of the tuberous sclerosis complex gene-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998; 95:15653-58
- Srinivas G, Kusumakumary P, Nair MK, Ramachandra Panicker KR, Radhakrishna Pillai M. Mutant p53 protein, Bcl-2/Bax ratios and apoptosis in paediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2000; 126:62-67
- Steffen B, Müller-Tidow C, Schwäble J et al. The molecular pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Oncology/Hematology*. 2005; 56:195-221
- Sturm I, Köhne C-H, Wolff G, et al. Analysis of the p53/BAX Pathway in Colorectal Cancer: Low BAX IS a Negative Prognostic Factor in Patients With Resected Liver Metastases. *J Clin Oncol*. 1999; 17:1364-74
- Sturm I, Stephan C, Gillissen B, et al. Loss of the tissue-specific proapoptotic BH3-only protein Nbk/Bik is a unifying feature of renal cell carcinoma. *Cell Death and Differentiation*. 2006; 13:619-27
- Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K et al. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005; 106:2854-61
- Tagawa H, Karnan S, Suzuki R, et al. Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene*. 2005; 24:1348-58
- Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T. GSK3b regulates cyclin D1 expression: A new target for chemotherapy. *Cell Sign*. 2008; 20:581-89
- Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA, et al. All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*. 1997. 337; 15:1021-8
- Tee RA, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J. Tuberous Sclerosis Complex Gene Products, Tuberin and Hamartin, Control mTOR Signaling by Acting as a GTPase-Activating Protein Complex toward Rheb. *Current Biology*. 2003; 13:1259-68
- Testa U und Riccioni R. Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2007; 92:81-94
- Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, Ehninger G. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2006; 107:4011-20
- Thomas X, Chelghoum Y. Cigarette smoking and acute leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2004; 6:1103-9.

- Valdez BC, Murray D, Ramdas L, et al. Altered gene expression in busulfan-resistant human myeloid leukemia. *Leukemia Research*. 2008; 32:1684-97
- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009; 114:937-51
- Verma S, Zhao L, Chinnadurai G. Phosphorylation of the Pro-apoptotic Protein BIK. *JBC*. 2001; 7:4671-76
- Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ, Bar-Sagi D. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nature Cell Biol*. 1999; 1:20-26
- Wei Y, Fan T, Yu M. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2008; 40:278-88
- Weinberg RA. The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control. *Cell*. 1995; 81:323-30
- Whitman SP, Ruppert AS, Radmacher MD, et al. FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications. *Blood*. 2008;111:1552-59
- Wick W, Peterson I, Schmutzler RK, et al. Evidence for a novel tumor suppressor gene on chromosome 15 associated with progression to a metastatic stage in breast cancer *Oncogene*. 1996; 12:973-8
- Willis SN, Chen L, Dewson, G et al. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev*. 2005; 19:1294-1305
- Wolter KG, Hsu Y-T, Smith CL, Nechushtan A, Xi X-G, Youle RJ. Movement of Bax from the Cytosol to Mitochondria during Apoptosis. *Journal of Cell Biology*. 1997; 139:1281-92
- Xu W-L, Shen H-L, Ao Z-F, et al. Combination of tetrandrine as a potential-reversing agent with daunorubicin, etoposide and cytarabine for the treatment of refractory and relapsed acute myelogenous leukemia. *Leukemia Research*. 2006; 30:407-13
- Xu Z, Wang M, Wang L, et al. Aberrant expression of TSC2 gene in the newly diagnosed acute leukemia. *Leukemia Research*. 2009; 33:891-7
- Yanada M, Matsuo K, Suzuki T, et al. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia : a meta-analysis. *Leukemia*. 2005; 19:1345-49
- Yap TA, Garrett MD, Walton MI, Raynaud F, de Bono FS, Workman P. Targeting the PI3K–AKT–mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. *Current Opinion in Pharmacology*. 2008; 8:393-412

Internetquellen:

<http://www.dgho-onkopedia.de/onkopedia/leitlinien/aml> am 09.03.2012 10:47

7. Selbständigkeitserklärung

„Ich, Martina Hampel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Systematische Analyse des mTOR-Signalweges und der Bcl-2-Genfamilie bei akuten myeloischen Leukämien“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

8. Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Peter Daniel herzlich für die Überlassung dieses sehr interessanten Dissertationsthemas und die gute Zusammenarbeit danken.

Dann möchte ich mich bei Gabór Egervári, Thomas Pretzsch und Jörg Bernhard aus der AG Daniel für ihre Mitarbeit und Unterstützung bedanken.

Meinen engen Freunden und meiner Familie möchte ich meinen Dank dafür aussprechen, dass sie mir während des Entstehungsprozesses dieser Arbeit stets Verständnis, Geduld und Interesse entgegengebracht haben.

9. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.