

Charakterisierung der molekularen Marker BCL11b und IGFBP7 in der akuten T-lymphoblastischen Leukämie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Isabelle Bartram
aus Hamburg

Januar 2015

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 2010 bis Dezember 2014 in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Claudia D. Baldus an der Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin, in der hämatologischen / onkologischen Abteilung (Medizinische Klinik III) erstellt.

Disputation am 17.04.2015

1. Gutachterin: Prof. Dr. med. Claudia D. Baldus

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Kunze

In dieser Arbeit wurde ein Unterstrich, der sogenannte „*Gender Gap*“, als Mittel der Darstellung aller sozialen Geschlechter und Geschlechtsidentitäten verwendet. Eine eventuell schlechtere Lesbarkeit wurde dabei in Kauf genommen, um beispielsweise die erwähnten Patient_innen nicht nur wie sonst üblich als rein männliche Entität darzustellen. Laut deutscher Rechtschreibung ist die Verwendung des Unterstrichs in dieser Form zulässig.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Das hämatologische System | 1 |
| 1.2 | Leukämie | 3 |
| 1.2.1 | Klassifizierung der Leukämie | 6 |
| 1.2.2 | Akute T-lymphoblastische Leukämie | 6 |
| 1.2.3 | ETP-ALL | 10 |
| 1.2.4 | Standardtherapie | 10 |
| 1.2.4 | Neue Therapieansätze | 13 |
| 1.3 | Einleitung Teil I: BCL11b | 15 |
| 1.3.1 | Transkriptionsfaktoren in der T-Zell-Entwicklung | 15 |
| 1.3.2 | Struktur und Funktion von BCL11b | 15 |
| 1.3.3 | Die Rolle von BCL11b in der T-ALL | 17 |
| 1.4 | Einleitung Teil II: IGFBP7 | 19 |
| 1.4.1 | Das IGF-System | 19 |
| 1.4.2 | Die Bedeutung des IGF-Systems in Neoplasien | 20 |
| 1.4.3 | IGFBP7 | 22 |
| 1.5 | Zielsetzung der Arbeit | 25 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 27 |
| 2.1 | Material | 27 |
| 2.1.1 | Patient_innenkollektiv und gesunde Personen | 27 |
| 2.1.2 | Verwendete Zelllinien | 27 |
| 2.1.3 | Geräte, Software und Chemikalien | 27 |
| 2.1.4 | Expressionsvektoren und synthetische Oligonukleotide | 30 |
| 2.1.5 | Antikörper | 30 |
| 2.2 | Methoden | 33 |
| 2.2.1 | Zellbiologische Methoden | 33 |
| 2.2.1.1 | Aufreinigung mononukleärer hämatopoetischer Zellen aus dem Knochenmark | 33 |
| 2.2.1.2 | Einfrieren und Auftauen von Zelllinien | 33 |
| 2.2.1.3 | Transiente und stabile Transfektion von Zelllinien durch Nukleofektion | 33 |
| 2.2.1.4 | WST-1-Proliferationsassay | 35 |
| 2.2.1.5 | Durchflusszytometrie | 36 |
| 2.2.2 | Proteinbiochemische Methoden | 39 |
| 2.2.2.1 | Western Blot | 39 |
| 2.2.2.2 | Messung von IGFBP7-Proteinkonzentration | 41 |
| 2.2.3 | Molekulargenetische Methoden | 42 |
| 2.2.3.1 | Isolation von Nukleinsäuren aus humanen Zellen | 42 |
| 2.2.3.2 | Polymerase-Kettenreaktion | 42 |
| 2.2.3.3 | Mutationsanalysen | 44 |
| 2.2.3.4 | Gelelektrophorese | 44 |
| 2.2.3.5 | Klonierung der Überexpressionsvektoren | 44 |
| 2.2.4 | Statistik | 47 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3 | ERGEBNISSE | 48 |
| 3.1 | Ergebnisse Teil I: Expression und Mutation von <i>BCL11b</i> in adulter T-ALL | 48 |
| 3.1.1 | <i>BCL11b</i> wird in adulter T-ALL heterogen exprimiert | 48 |
| 3.1.2 | Untersuchung von <i>BCL11b</i> -Expression in Bezug auf molekulare und klinische Charakteristika | 50 |
| 3.1.3 | <i>BCL11b</i> -Expression ist in adulter T-ALL mit Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert | 50 |
| 3.1.4 | Niedrige <i>BCL11b</i> -Expression identifiziert Hochrisikopatient_innen innerhalb der thymischen T-ALL | 54 |
| 3.1.5 | <i>BCL11b</i> -Mutationen in der adulten T-ALL | 54 |
| 3.2 | Ergebnisse Teil II: IGFBP7-induzierte Chemotherapieresistenz in T-ALL-Zellen | 57 |
| 3.2.1 | Expression von <i>IGFBP7</i> in verschiedenen Leukämiezelllinien | 57 |
| 3.2.2 | <i>Knockdown</i> von <i>IGFBP7</i> in den AML-Zelllinien KG1a und HL-60 | 57 |
| 3.2.3 | Überexpression von <i>IGFBP7</i> in Leukämie-Zelllinien | 59 |
| 3.2.4 | Auswirkung von <i>IGFBP7</i> -Überexpression auf die Proliferation von Leukämiezellen | 59 |
| 3.2.5 | Veränderungen im Zellzyklus durch <i>IGFBP7</i> -Überexpression in T-ALL-Zelllinien | 62 |
| 3.2.6 | IGFBP7-induzierte Zytostatika-Resistenz in Jurkat-Zellen | 62 |
| 3.2.7 | <i>IGFBP7</i> -Überexpression reduziert IGF1-R-Protein in Jurkat-Zellen | 64 |
| 3.2.8 | Wirkung von IGF1-R-Inhibition auf <i>IGFBP7</i> -induzierte Zytostatikaresistenz | 68 |
| 4 | DISKUSSION | 70 |
| 4.1 | Diskussion Teil I: Expression und Mutationen von <i>BCL11b</i> in adulter T-ALL | 70 |
| 4.2 | Diskussion Teil II: IGFBP7-induzierte Chemotherapieresistenz in T-ALL-Zellen | 74 |
| 4.3 | Fazit | 79 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 80 |
| 6 | ABSTRACT | 81 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS | 82 |
| 8 | ANHANG | 87 |
| 8.1 | Lebenslauf | 87 |
| 8.2 | Publikationen | 88 |
| 8.2.1 | Aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangene Teilpublikationen | 88 |
| 8.2.2 | Weitere Publikationen | 88 |
| 8.2.3 | Konferenzbeiträge | 89 |
| 8.3 | Danksagung | 90 |

1 Einleitung

1.1 DAS HÄMATOLOGISCHE SYSTEM

Die humane Hämatopoese, also die Bildung von Blutzellen, findet nach der Geburt zunächst im Knochenmark des gesamten Skeletts statt, bis das Mark der langen Röhrenknochen nach und nach durch Fettgewebe ersetzt wird. Bei gesunden Erwachsenen sind die hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*: HSCs) hauptsächlich im Knochenmark des Sternums, der Rippen, der Wirbelsäule und des Beckenkamms zu finden. Hämatopoetische Stammzellen sind pluripotent, d.h. selbsterneuernd und differenzieren im klassischen Modell der Hämatopoese in zwei Arten von Progenitorzellen: myeloische und lymphatische. Aus myeloischen Vorläuferzellen (*common myeloid progenitors*: CMPs) entstehen in weiteren Differenzierungsschritten reife Zellen der myeloische Zelllinie: Erythrozyten, Thrombozyten, Makrophagen und Granulozyten. Die lymphatischen Vorläuferzellen (*common lymphoid progenitors*: CLPs) besitzen wiederum die Kapazität zur Ausdifferenzierung in verschiedene Lymphozytenformen (Abbildung 1).¹

T-Zellentwicklung

Die Differenzierung der multipotenten Stammzellen in T-Lymphozyten findet nach Verlassen der Knochenmarksnische statt. Während ihrer Relokation zum Thymus verlieren die Zellen graduell ihre Kapazität zur multilinearen Differenzierung. Die Stärke der Limitierung ihres Differenzierungspotenzials wird in unterschiedlichen Modellen diskutiert, die im murinen System charakterisiert wurden. So wurde in neueren Untersuchungen gezeigt, dass die murinen frühen thymischen Progenitorzellen (*early thymic progenitors*: ETPs) sowohl in T- als auch in myeloische Zellen differenzieren können, wobei dies *in vivo* wesentlich seltener vorkommt als *in vitro*. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde ein alternatives Modell der Hämatopoese entwickelt, bei der eine Untergruppe von lymphatisch geprägten Knochenmarksprogenitorzellen (*lymphoid-primed multipotent progenitors*: LMPPs) myeloisches und lymphatisches, aber kein megakaryozytäres oder erythrozytäres Potenzial besitzt (Abbildung 2).^{2,3} Es ist jedoch zu beachten, dass das murine hämatopoetische und immunologische System in verschiedenen Aspekten vom humanen abweicht und die Übertragbarkeit dieser neueren Erkenntnisse nicht garantiert ist.⁴

Während der Entwicklung zur reifen T-Zelle verändert sich die Expression bestimmter immunphänotypischer Oberflächenmarker. Durch diese „Unterscheidungsgruppen“-Marker (*Cluster of differentiation*: CD) kann demnach die Entwicklungsstufe der Zelle abgelesen werden. Hämatopoetische Stammzellen und stammzellnahe Zellen sind dabei beispielsweise anhand der Expression von CD34 charakterisierbar. ETPs exprimieren noch keine T-Zellrezeptoren (*T-cell receptors*: TCRs) oder für reife T-Zellen typischen Marker wie CD4 und CD8. Dieses Stadium der T-Zellentwicklung wird daher als „doppelt negativ“ (*double*

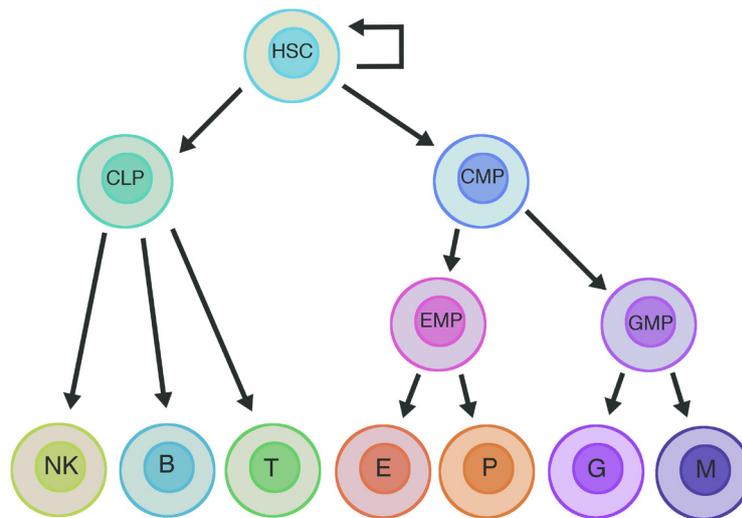


Abbildung 1: Klassisches bilineares Modell der Hämatopoese

Eine multipotente hematopoetische Stammzelle kann entweder in eine myeloische oder eine lymphatische Vorläuferzelle differenzieren. HSC = *hematopoietic stem cell*, hematopoetische Stammzelle; CLP = *common lymphoid progenitor*, lymphatische Vorläuferzelle; CMP = *common myeloid progenitor*, myeloische Vorläuferzelle; EMP = *erythrocyte-megakaryocyte precursor*, Erythrozyt-Megakaryozyt-Vorläuferzelle; GMP = *granulocyte-monocyte precursor*, Granulozyt-Monozyt-Vorläuferzelle; NK = *natural killer cell*, Natürliche Killerzelle; B = B-Zelle; T = T-Zelle; E = Erythrozyt; P = *platelet*, Thrombozyt; G = Granulozyt; M = Monozyt

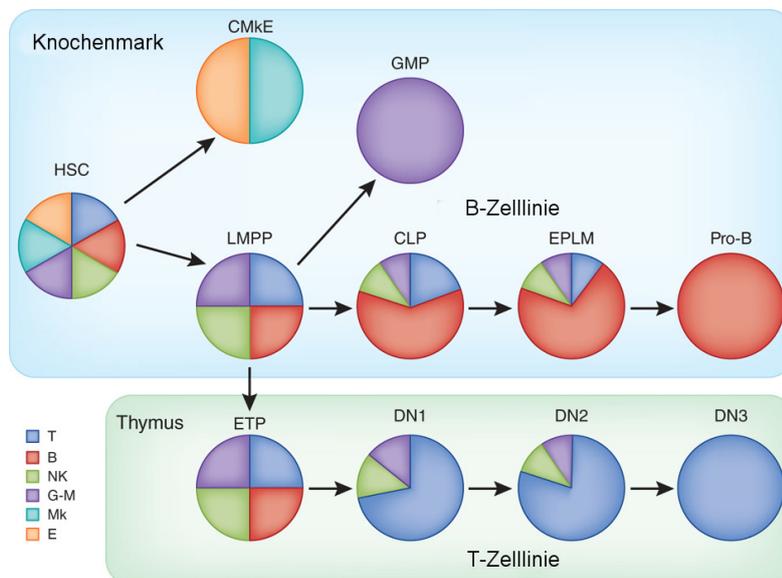


Abbildung 2: Alternatives Modell der Hämatopoese (verändert nach Ceredig 2012)⁵

LMPPs und ETPs besitzen ein multilineares Differenzierungspotenzial, das erst in den weiteren Schritten verloren geht.

HSC = *hematopoietic stem cell*, hämatopoetische Stammzelle; LMPP = *lymphoid-primed multipotent progenitors*, lymphatisch geprägte multipotente Vorläuferzelle; CMkE = *common megakaryocyte and erythroid progenitor*, megakaryozytische und erythrozytische Vorläuferzelle; GMP = *granulocyte-macrophage progenitor*, granulozytische-makrophagische Vorläuferzelle; EPLM = *early progenitor with lymphoid and myeloid potential*, frühe Vorläuferzellen mit lymphatischem und myeloischem Potenzial; Pro-B = festgelegt auf pro-B-Zellen; DN = *double negative*, doppelt-negativ; DN1-DN3 = progressive Phasen von CD4-CD8-Thymozyten; NK = *natural killer cell*, Natürliche Killerzelle; G-M = Granulozyte-Makrophage; Mk = Megakaryozyt; E = Erythrozyt

negative: DN) bezeichnet. Sie sind jedoch anhand anderer Marker wie Thy-1, c-kit/CD117, CD44 und CD25 identifizierbar. Im DN2-Stadium exprimieren die T-Vorläuferzellen bereits die typischen T-Zellgene des CD3-Komplexes, der Übergang zu DN3 ist durch die Bildung der α -Ketten des vorläufigen T-Zellrezeptors (prä-TCR α) gekennzeichnet. Nach Expression der rekombinierten β -Kette im DN4-Stadium erreichen die Zellen eine intermediäre Einzelpositiv-Phase (*intermediate single positive*: ISP) mit schwacher CD8-Expression. Die doppelt positiven (*double positive*: DP) Zellen exprimieren zusätzlich CD4 und TCR $\alpha\beta$ -Ketten. Etwa 5-10 % der DP-Thymozyten verlassen nach dem Durchlaufen von positiven und negativen Selektionsvorgängen schließlich als reife T-Zellen den Thymus.⁶

Diesen immunphänotypisch differenzierbaren Entwicklungsstufen liegen streng regulierte Transkriptionsprogramme zu Grunde, die durch Stimuli in der thymischen Mikroumgebung ausgelöst und aufrechterhalten werden. Einer der wichtigsten Faktoren sind NOTCH-Signale, von denen die T-Vorläuferzellen bis zu ihrer vollständigen Reifung abhängig bleiben. Neben Transkriptionsfaktoren, die auch in anderen hämatopoetischen Zelllinien eine Rolle spielen, ist insbesondere die Hochregulierung von *GATA binding protein 3 (GATA-3)*, *B-cell CLL/lymphoma 11B (BCL11b)* und *transcription factor 7, T-cell specific (TCF-1)* essenziell für die T-Zellentwicklung.⁷ Veränderungen oder Verlust dieser Transkriptionsprogramme können zu Differenzierungsarrest führen und an der Entstehung von Neoplasien beteiligt sein.

1.2 LEUKÄMIE

Leukämien sind klonale Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, bei denen es durch die starke Proliferation von malignen Zellen, sogenannte Blasten, zu einer Verdrängung des gesunden Knochenmarks und damit der normalen Hämatopoese kommt. Die unreifen Blasten akkumulieren auch im peripheren Blut und können andere Organe wie Milz, Leber und das zentrale Nervensystem infiltrieren. Betroffen sind vor allem einerseits Kinder und andererseits Erwachsene über 60 Jahren, wobei die altersabhängige Inzidenzrate sich zwischen den verschiedenen Leukämietypen unterscheidet.

Nach der Knudsonhypothese entstehen Neoplasien durch eine Akkumulation verschiedener aufeinander folgender Mutationen.⁸ Wovon diese ausgelöst werden, ist im individuellen Fall meistens unklar. Neben genetischen Prädispositionen können exogene Faktoren wie Kontakt mit bestimmten Chemikalien, ionisierende Strahlung oder Infektion mit bestimmten Viren auslösend sein.

Die genetischen Veränderungen betreffen verschiedene Signalwege in der transformierten Zelle und geben ihr, wie in Abbildung 3 dargestellt, durch die Aktivierung von Onkogenen oder Deletion bzw. Herunterregulation von Tumorsuppressoren nach dem „*Hallmarks of Cancer*“-Modell von Hanahan und Weinberg essenzielle Fähigkeiten.⁹ Diese Fähigkeiten ermöglichen den Blasten beispielsweise die Aufrechterhaltung von Proliferation, das Verhindern von Apoptose und eine replikative Immortalität.⁹ Dabei sind nicht alle leukämischen Blasten genetisch identisch, vielmehr treten im Verlauf der rapiden Proliferation

neben dem leukämieinitiierenden Ursprungsklon weitere Subklone mit zusätzlichen Mutationen auf. Diese können den Blasten beispielsweise Resistenzmechanismen gegenüber chemotherapeutischen Substanzen verleihen und die Grundlage für spätere Rezidive bilden.¹⁰

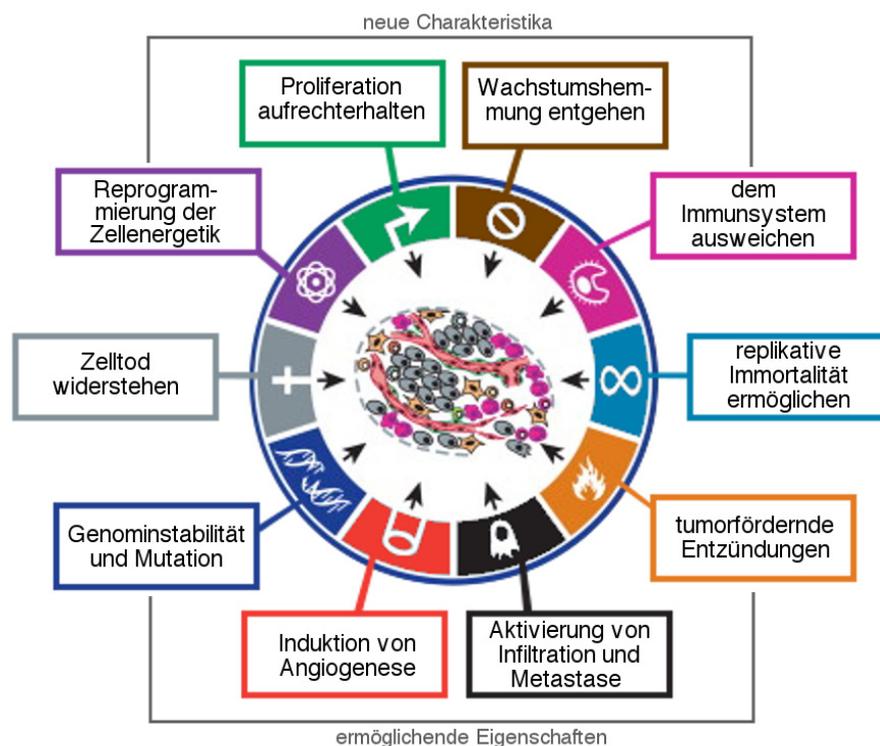


Abbildung 3: „The Hallmarks of Cancer“, Die Charakteristika von Krebs

(verändert nach Hanahan und Weinberg 2011)⁹

Nach diesem Modell beinhaltet die mehrstufige Entwicklung von Neoplasien den Erwerb von essenziellen Fähigkeiten. Vier Charakteristika wurden dem ursprünglichen Modell von 2000 in der Neufassung von 2011 hinzugefügt. An zwei dieser Eigenschaften, „Reprogrammierung der Zellenergetik“ und „dem Immunsystem ausweichen“, muss noch ausreichend geforscht werden, um sie zu etablieren. Zwei weitere, „Genominstabilität und Mutation“ und „tumorfördernde Entzündungen“, sind notwendig, um die restlichen essenziellen Fähigkeiten zu erlangen.

Tabelle 1A: WHO-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie (AML)¹¹

| AML mit genetischen Aberrationen | | Fusionsgene |
|---|--|----------------------|
| AML mit t(8;21)(q22;q22) | | <i>RUNX1-RUNX1T1</i> |
| AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22) | | <i>CBFB-MYH11</i> |
| Akute Promyelozytenleukämie mit t(15;17)(q22;q12) | | <i>PML-RARA</i> |
| AML mit t(9;11)(p22;q23) | | <i>MLLT3-MLL</i> |
| AML mit t(6;9)(p23;q34) | | <i>DEK-NUP214</i> |
| AML mit inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); | | <i>RPN1-EVI1</i> |
| AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13;q13); | | <i>RBM15-MKL1</i> |
| AML mit <i>NPM1</i> -Mutation (vorläufige Kategorie) | | |
| AML mit <i>CEBPA</i> -Mutation (vorläufige Kategorie) | | |
| AML mit vorausgegangenem myelodysplastischem Syndrom | | |
| therapieinduzierte AML | | |
| AML, nicht weiter klassifiziert | | FAB-Kriterien |
| AML mit minimaler Differenzierung | | M0 |
| AML ohne Ausreifung | | M1 |
| AML mit Ausreifung | | M2 |
| akute myelomonozytäre Leukämie | | M4 |
| akute Monoblasten/Monozyten-Leukämie | | M5 |
| akute Megakaryoblasten-Leukämie | | M7 |
| akute Basophilen-Leukämie | | M2 _{baso} |

Tabelle 1B: WHO-Klassifikation akuter lymphatischer Leukämien (ALL)¹¹

| akute B-lymphoblastische Leukämie (B-ALL) | |
|---|------------------------------|
| B-ALL, nicht weiter spezifiziert | |
| B-ALL mit genetischen Aberrationen | |
| B-ALL mit t(9;22)(q34;q11.2) | <i>BCR-ABL 1</i> |
| B-ALL mit t(v;11q23) | <i>MLL</i> umgelagert |
| B-ALL mit t(12;21)(p13;q22) | <i>TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)</i> |
| B-ALL mit Hypodiplodie | |
| B-ALL mit t(5;14)(q31;q32) | <i>IL3-IGH</i> |
| B-ALL mit t(1;19)(q23;p13.3) | <i>TCF3-PBX1</i> |
| Akute T-lymphoblastische Leukämie (T-ALL) | |

1.2.1 Klassifizierung der Leukämie

Leukämien werden nach ihrem Verlauf in chronische oder akute unterschieden. Während sich chronischen Leukämien langsam entwickeln und zunächst symptomlos sein können, sind akute Leukämien durch einen schnellen Krankheitsverlauf gekennzeichnet der unbehandelt innerhalb weniger Wochen oder Monate zum Tod führt.

Eine weitere Unterscheidung findet anhand der betroffenen Zellform statt: Leukämien, die aus myeloischen Vorläuferzellen entstehen, werden als chronische bzw. akute myeloische Leukämie (CML, AML) bezeichnet. Chronische oder akute lymphatische Leukämien (CLL, ALL) betreffen dagegen den lymphatischen Arm des blutbildenden Systems. Neben der AML und der ALL gibt es auch akute undifferenzierte und biphenotypische Leukämien. Bei diesen selten vorkommenden Leukämieformen ist eine eindeutige Linienzuordnung nicht möglich.

Die Diagnose von Leukämien erfolgt anhand zytologischer Untersuchungen von Knochenmarkaspiraten; bei einem Blastenanteil von über 20 % wird von einer akuten Leukämie ausgegangen.¹¹ Die weitere Unterteilung erfolgte früher anhand morphologischer Blasteneigenschaften nach den *French-American-British* (FAB)-Kriterien.¹² In den aktuellen Diagnose-Richtlinien der *World Health Organisation* (WHO) werden auch zytogenetische, immunphänotypische und molekulargenetische Merkmale berücksichtigt (Tabelle 1A und B).¹¹

Zytogenetische Untersuchungen dienen dabei dem Nachweis somatischer chromosomaler Veränderungen der Blasten. Durch Immunphänotypisierung lassen sich die Leukämiezellen, wie Vorläuferzellen der gesunden Hämatopoese, ihrer Entwicklungslinie und ihrem Reifegrad zuordnen. Dabei orientiert man sich an der Klassifikation der *European Group for the Immunological Characterization of Leukemias* (EGIL).¹³ Die Blasten werden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen bestimmte CD-Marker gefärbt und durchflusszytometrisch (Absatz 2.2.1.5) analysiert; ein Marker gilt als exprimiert, wenn 20 % der Blasten positiv sind. Für eine weitere Differenzierung der Patient_innen in prognostische und molekulare Subgruppen wird die Expression bestimmter Marker auf *messenger RNA* (mRNA)-Ebene durch quantitative *Real Time PCR* (qRT-PCR; Absatz 2.2.3.2) gemessen.

Neuere Methoden, wie die Sequenzierung des gesamten Genoms oder Exoms von Patient_innen durch *next generation sequencing* (NGS) sowie Genexpressionsanalysen durch Microarrays oder *RNA Sequencing* (RNA-seq), sind noch nicht Teil der Routine-Diagnostik, aber befinden sich in der Entwicklung. So können in Zukunft Mutationen und aberrante Expressionsmuster individuell bestimmt und die Diagnostik weiter verfeinert werden.

1.2.2 Akute T-lymphoblastische Leukämie

Bei der akuten T-lymphoblastischen Leukämie (T-ALL) kommt es durch genetische Veränderungen während der T-Zellentwicklung zu einem Differenzierungsarrest von unreifen T-Vorläuferzellen. 10 bis 15 % aller kindlichen und 25 % der erwachsenen ALLs werden als T-ALLs diagnostiziert. Endete der Krankheitsverlauf früher fast immer mit dem

Tod, hat sich die Prognose durch Therapieoptimierung in den letzten 30 bis 40 Jahren stark verbessert. Dennoch liegt die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei Erwachsenen, je nach Studie, nur bei ca. 30 bis 50 %.^{14,15} T-ALLs sind heterogen und lassen sich anhand von immunphänotypischen und genetischen Merkmalen weiter in verschiedene Subtypen differenzieren, was für Prognose und Behandlungsstrategien relevant ist.

Immunphänotypisierung

Laut den EGIL-Richtlinien lassen sich T-ALLs von B-ALLs durch die Expression von zytoplasmatischem CD3 abgrenzen. Es erfolgt eine weitere Unterteilung in pro-T (CD7⁺), prä-T (CD2⁺ und/oder CD5⁺ und/oder CD8⁺), kortikale/thymische (CD1a⁺) und reife (Membran-CD3⁺, CD1a⁻) T-ALL. Im Rahmen der GMALL (*German multicenter study group for adult ALL*) erfolgt eine daran angelehnte Immunphänotypisierung: Hier werden pro- und prä-T-ALL zu früher T-ALL zusammengefasst und des Weiteren thymische und reife T-ALL unterschieden. Die dafür verwendeten Markerkombinationen sind in Tabelle 2 beschrieben. In der GMALL-Kohorte liegen 56 % thymische, 23 % frühe und 21 % reife T-ALLs vor.¹⁶

Die in Tabelle 2 ebenfalls aufgeführte *early T-cell precursor* akute lymphoblastische Leukämie (ETP-ALL) ist eine in der GMALL bisher nicht verwendete, seit Kurzem beschriebene, besonders unreife Subgruppe der frühen T-ALL. Neben Merkmalen der frühen T-ALL exprimieren ETP-ALL-Blasten, wie ihr Pendant der normalen Hämatopoese, auch stammzellnahe oder myeloische Marker. In 13 % der pädiatrischen und 7 % der adulten T-ALL Patient_innen wurde dieser Immunphänotyp gefunden (siehe Absatz 1.2.3).^{17,18}

Zytogenetik

Die Hälfte aller T-ALLs besitzt einen abnormalen Karyotyp. Viele der chromosomalen Translokationen involvieren Transkriptionsfaktorgene wie *T-cell acute lymphocytic leukemia 1 (TAL1)*, *lymphoblastic leukemia associated hematopoiesis regulator 1 (LYL1)* und *T-cell leukemia homeobox 1 (TLX1/HOX11)*, die unter die Kontrolle starker Promotoren und *Enhancer*-Elemente von TCR-Genen auf Chromosom 7 (*TCRB* und *TCRG*) oder Chromosom 14 (*TCRA* und *TCRD*) gestellt werden. Sie sind das Resultat fehlerhafter TCR-Rekombinationen und führen zu aberranter Expression der involvierten Gene.¹⁹ Andere chromosomale Veränderungen führen zur Expression von chimären Fusionsproteinen mit onkogenen Eigenschaften wie beispielsweise *nucleoporin 214kDa- Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 (NUP214-ABL1)* oder zu Fusionen von *mixed-lineage leukemia (MLL)* mit anderen Genen.²⁰

Molekulargenetik

Weitere Gene, die im Zusammenhang mit Leukämien stehen, sind nicht von chromosomalen Veränderungen betroffen, sondern weisen lediglich Punktmutationen oder Deletionen bzw. Insertionen einzelner Basen auf. Andere relevante Gene sind auf DNA-Ebene unverändert, aber werden dennoch jeweils bei einem signifikanten Teil der T-ALL-Patient_innen durch die Deregulation vorgeschalteter Signalwege oder durch epigenetische Veränderungen aberrant exprimiert.

Tabelle 2: Immunphänotypisierung von T-ALL Subtypen

| Subgruppe | CD-Marker |
|--------------------------------------|--|
| ETP-ALL (Subgruppe der frühen T-ALL) | CD1a ⁻ , CD8 ⁻ , CD5-schwach mit Expression von Stammzellmarkern (CD34, HLA-DR, CD117) und/oder Koexpression myeloischer Antigene (CD13, CD33, mCD65) |
| Frühe T-ALL | zCD3 ⁺ , CD7 ⁺ , CD5 ^{+/-} , CD2 ⁻ , zCD3 ⁻ , CD4 ^{-/+} , CD8 ^{-/+} , CD1a ⁻ oder zCD3 ⁺ , CD7 ⁺ , CD5 ⁻ , CD2 ⁺ , mCD3 ⁻ , CD4 ⁻ , CD8 ⁻ , CD1a ⁻ |
| Thymische T-ALL | zCD3 ⁺ , CD7 ⁺ , CD5 ^{+/-} , CD2 ^{+/-} , mCD3 ^{+/-} , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CD1a ⁺ |
| Reife T-ALL | zCD3 ⁺ , CD7 ⁺ , CD5 ⁺ , CD2 ⁺ , mCD3 ^{+/-} , CD4 ^{+/-} , CD8 ^{+/-} , CD1a ⁻ |

Abkürzungen: m = membranständig, z = zytoplasmatisch

Tabelle 3: Häufige genetische Aberrationen in der T-ALLnach Aifantis *et al.* 2009²⁰

| Zytogenetische Abnormalität | Frequenz | Involvierte Gene |
|--|-----------------|--|
| Translokationen, die TCR-Gene auf den Chromosomen 7q34 (TCRB und TCRG) und 14q11 (TCRA und TCRD) involvieren | 35 % | HOX11, HOX11L2, TAL1, TAL2, LYL1, BHLHB1, LMO1, LMO2, LCK, NOTCH1, Zyklin D2 |
| Fusionsgen | 9-30 % | SIL-TAL1-Fusion |
| | 10 % | CALM-AF10-Fusion |
| | 4 - 8 % | MLL-Fusionen |
| | 6 % | ABL1-Fusionen |
| | selten | NUP98-Fusionen |
| Chromosomale Deletion von 9p21 und 6q | bis 65 % (9p21) | p15, p16 |
| | 20 - 30 % (6q) | unbekannt |
| Aktivierende Mutationen | 50 - 60 % | NOTCH1, FLT3, NRAS |
| Genduplikation | 15 % | c-MYB |

In Tabelle 3 sind häufige genetische Läsionen der T-ALL aufgelistet. Die für diese Arbeit relevanten Gene werden im Folgenden einzeln beschrieben. Diese Auswahl bietet keinen Querschnitt der häufigsten genetischen Aberrationen in der T-ALL, sondern beinhaltet lediglich die in der Arbeitsgruppe untersuchten Gene.

NOTCH1: Über 50 % der T-ALL Patient_innen besitzen aktivierende *NOTCH1*-Mutationen.²¹ Meistens betreffen die Mutationen Proteindomänen, die für Beginn oder Ende der Notch-Signale während der T-Zellentwicklung zuständig sind. Das *NOTCH1*-Gen kodiert für einen Transmembranrezeptor, der essenziell für die Determinierung der pluripotenten Progenitorzellen auf die T-Zelllinie und die darauf folgende Zusammenfügung der prä-T-Zellrezeptorkomplexe in unreifen Thymozyten ist.²¹ Während diese Prozesse für eine normale T-Zellentwicklung notwendig sind, fördert eine dauerhafte Aktivierung von NOTCH1 durch Mutationen jedoch die leukämische Transformation der T-Vorläuferzellen.²²

Das *F-box/WD repeat-containing protein 7 (FBXW7)*-Gen kodiert für eine Komponente eines Ubiquitin-Ligasekomplexes, der für den proteosomalen Abbau von Proteinen wie *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (MYC)*, Cyclin E und NOTCH1 relevant ist. In 12 bis 16 % der T-ALLs findet man inaktivierende Mutationen, die zu einer erhöhten Halbwertszeit der abzubauenen Proteine führen.²³ *FBXW7*-Mutationen resultieren demnach ebenfalls in verstärkten Notch-Signalen.

FLT3: *FMS-like tyrosine kinase 3* kodiert für einen Zytokinrezeptor, der zu den Klasse III Rezeptor-Tyrosinkinase gehört und in stammzellnahen hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert wird.²⁴ Eine interne Tandem-Duplikation innerhalb von *FLT3* oder Punktmutationen innerhalb der Kinasedomäne wurden vor allem in AML-Patient_innen aber auch in 2 bis 3 % aller T-ALL- und 35 % aller ETP-ALL-Fälle gefunden.^{25,26} Beide Mutationstypen führen zu einer konstitutiven Aktivierung der Tyrosinkinase und damit zu einer erhöhten Proliferation und anti-apoptischen Signalen in leukämischen Blasten.²⁷

ERG: Der *erythroblast transformation-specific-related transcription factor* ist für die normale Hämatopoese notwendig. In frühen T-Vorläuferzellen wurde eine hohe *ERG*-Expression nachgewiesen, welche nach vollständiger Festlegung auf die T-Zelllinie endet.²⁸ In T-ALL-Patient_innen war eine Überexpression des Gens mit einer höheren Rezidivwahrscheinlichkeit und einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert.²⁹ Der Mechanismus dieser Überexpression ist noch nicht entschlüsselt, aber *ERG* ist ein potentes Onkogen und eine *ERG*-Überexpression in transgenen Mäusen konnte T-ALL auslösen.³⁰

WT1: Das *Wilms Tumor 1*-Gen kodiert für einen Tumorsuppressor, der in einer Untergruppe von Wilms Tumor Patient_innen mutiert ist. Die genaue Rolle des Transkriptionsfaktors in normaler Hämatopoese und Leukämogenese ist unklar, eine höhere Expression wurde in CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen gefunden; im Laufe der Zelldifferenzierung wird *WT1* herunterreguliert.³¹ In 8 % adulter T-ALL-Patient_innen wurden *WT1*-Mutationen gefunden, diese waren mit einem unreifen Phänotyp verbunden und in thymischen T-ALLs mit einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert.³²

BAALC: Hohe *Brain and acute leukemia, cytoplasmic*-Expression war bei AML- und T-ALL-Patient_innen mit schlechterem Therapieansprechen und einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert.^{33,34} Die Expression des Gens ist in der normalen Hämatopoese auf CD34⁺-Vorläuferzellen beschränkt, die Funktion von *BAALC* ist jedoch nicht bekannt.^{35,36}

1.2.3 ETP-ALL

Wie im Absatz 1.2.2 beschrieben, handelt es sich bei der ETP-ALL um eine besonders unreife Form der T-ALL, die erst vor wenigen Jahren identifiziert wurde. In einer Studie von Coustan-Smith *et al.*¹⁷ wurde bei 12 % kindlicher T-ALL-Patient_innen ein Immunphänotyp gefunden, der dem von ETPs, den frühesten T-Zellprogenitoren im Thymus, ähnelte. Die Blasten exprimierten kein CD1a oder CD8 und CD5 nur schwach, und zusätzlich einen oder mehrere myeloische oder stammzellassoziierte Marker. Die ETP-ALL-Proben wiesen eine hohe genetische Instabilität auf und *gene set enrichment analysis* (GSEA) zeigte eine starke Anreicherung von in murinen ETPs hochregulierter Gene.

Onkogene wie *LIM domain only 1 (LMO1)*, *LYL1* und *ERG* waren hochexprimiert und die Auswertung der klinischen Daten zeigte ein wesentlich schlechteres Gesamtüberleben als bei den restlichen pädiatrischen T-ALL-Patient_innen sowie eine frühe Entwicklung von Therapieresistenzen. Eine weitere Studie fand durch NGS des gesamten Genoms ein unterschiedliches Mutationsprofil in ETP-ALLs im Vergleich zu immunphänotypisch reiferen T-ALLs. So wurde eine erhöhte Frequenz von Mutationen und Deletionen in Zytokinrezeptoren und Faktoren des *rat sarcoma* (RAS)-Signalwegs und Regulatoren hämatopoetischer und lymphatischer Entwicklung wie beispielsweise *GATA3* und *Ikaros* identifiziert.³⁷

Auch in adulten T-ALL Kohorten wurde bei 7 % der Patient_innen der ETP-ALL-Immunphänotyp gefunden.¹⁸ Die betreffenden Blasten zeigten eine hohe Expression von *BAALC* und anderen negativen prognostischen Markern. Es wurde zusätzlich eine niedrige *NOTCH1*-Mutationsrate von 7 % im Gegensatz zu 60 % in der restlichen Kohorte gefunden. Des Weiteren wurden keine *FBXW7*-Mutationen nachgewiesen, während die sonst in der T-ALL seltenen *FLT3*-Mutationen in 35 % der Patient_innen identifiziert wurden.²⁶

Wie in der pädiatrischen Studie zeigte sich auch hier ein deutlich kürzeres Gesamtüberleben der ETP-ALL-Patient_innen, das dem von frühen T-ALL-Patient_innen ähnlich war.¹⁸

1.2.4 Standardtherapie

Das Ziel der Therapie von T-ALL ist die Eliminierung aller leukämischen Blasten und eine Wiederherstellung der gesunden Hämatopoese. Dafür werden die Patient_innen in Zyklen mit verschiedenen Zytostatika, die das Wachstum der betroffenen Zellen inhibieren sollen, behandelt. In der GMALL-07/2003-Studie erfolgt die Therapie nach der Erstdiagnose phasenweise durch Induktionstherapie, Konsolidierung bzw. Intensivierung und Erhaltungstherapie (Abbildung 4).

Tabelle 4: Risikogruppen der GMALL¹⁴

| Risikogruppe | Faktoren |
|----------------|--|
| Standardrisiko | Thymische T-ALL (CD1a ⁺) Komplette Remission nach der Induktion I Leukozytenzahl < 30.000/μl Keine molekularen Risikofaktoren |
| Hochrisiko | Frühe oder reife T-ALL (CD1a ⁺) Leukozytenzahl > 30.000/μl |

**Multicenter Study for Adult ALL – GMALL 07/2003
Overview Total Therapy**

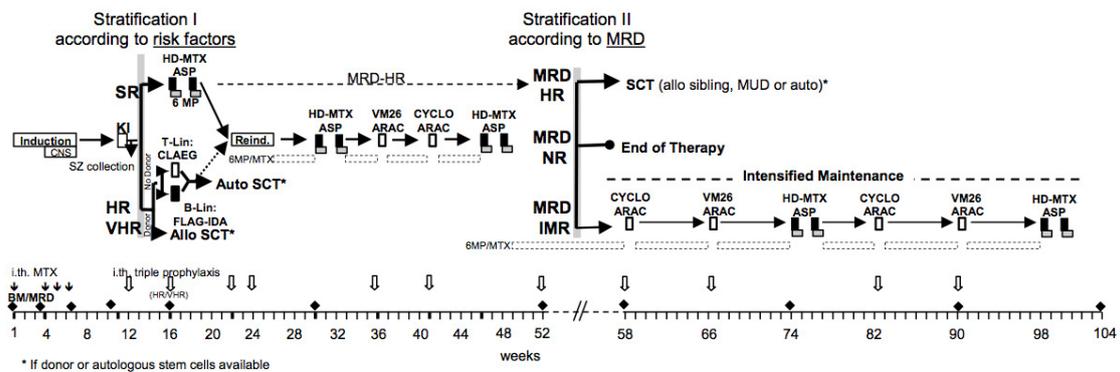


Abbildung 4: Therapieprotokoll der GMALL 07/2003-Studie³⁹

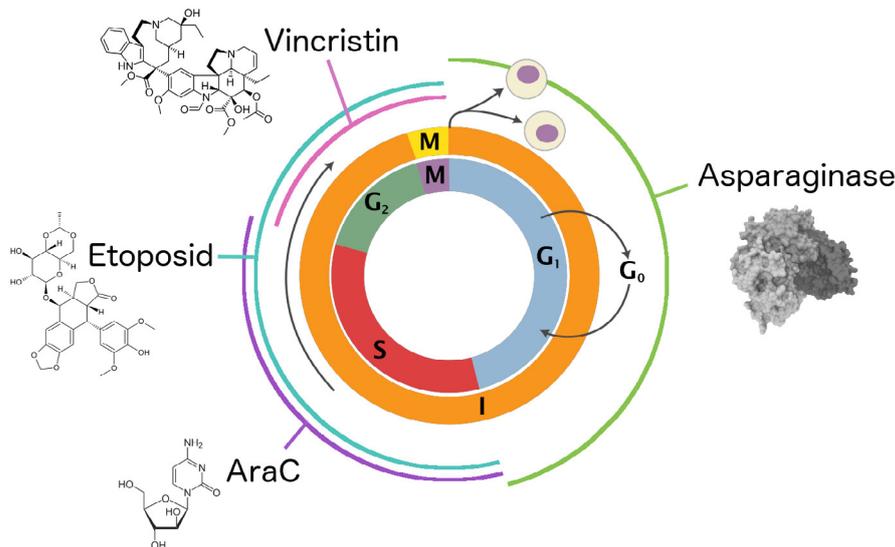


Abbildung 5: Zellzykluspezifität verschiedener Zytostatika (verändert nach Richard Wheeler)⁴¹

äußerer Ring: I = Interphase; M = Mitose
 innerer Ring: M = Mitose; G₁ = gap 1, postmitotische bzw. präsynthetische Phase 1; G₂ = gap 2, postsynthetische bzw. prämitotische Phase; S = Synthesephase
 außerhalb des Rings: G₀ = gap 0, ruhend

Die Induktionstherapie besteht aus einer Polychemotherapie in zwei Blöcken. Das Ziel soll eine komplette Remission, also eine Verdrängung der Blasten unter die Nachweisgrenze ($< 5\%$), und die Wiederherstellung eines gesunden Knochenmarks sein. Die Kombination von mindestens drei Substanzen soll dabei die Zytotoxizität verstärken, die Remissionswahrscheinlichkeit erhöhen und die Resistenzentwicklung verhindern bzw. verlangsamen.³⁸

Nach der Induktion findet eine erste Risikostratifizierung der Patient_innen statt (Tabelle 4). In der darauf folgenden Phase der Konsolidierungs- oder Intensivierungstherapie sollen die restlichen Blastenpopulationen eliminiert werden. Therapiezyklen wechseln dabei mit therapiefreien Phasen, um die Erholung des Knochenmarks zu ermöglichen. Dabei können verschiedene Supportivtherapien nötig sein, um den Nebenwirkungen der Bekämpfung der Blasten wie Knochenmarksversagen, Tumorlysesyndrom und eine hohe Empfindlichkeit der Patient_innen für Infektionen entgegenzuwirken.³⁸

Bei Hochrisikopatient_innen besteht die große Wahrscheinlichkeit eines schlechten Therapieansprechens und es wird daher, wenn möglich, eine allogene Stammzelltransplantation (alloSZT) durchgeführt. Diese Behandlung reduziert einerseits das Risiko von Rezidiven, ist jedoch andererseits durch die hohen Risiken mit einer Mortalitätsrate von 20 bis 30 % verbunden. Daher wird diese Therapieoption bei Standardrisikopatient_innen mit guter Prognose zunächst nicht durchgeführt.^{16,38}

Eine weitere Risikostratifizierung erfolgt anhand molekulargenetischer Untersuchungen, die den Nachweis minimaler Resterkrankungen (*minimal residual disease*: MRD) erlauben. Dabei können aberrante Markerexpressionen und Umlagerungen von TCR-Genen bzw. Expression von Fusionsgenen, die auf die leukämischen Blasten beschränkt sind, quantifiziert werden. Methodisch erfolgt dies durchflusszytometrisch oder durch qRT-PCR. So können submikroskopische Blastenpopulationen aufgespürt werden.

Hochrisikopatient_innen mit einem MRD-Level von $> 10^{-4}$ nach der Induktion und während der Konsolidierung werden dementsprechend mit allogener (ggf. autologer) SZT, experimentellen Therapien nach Studienprotokollen und/oder intensivierter Erhaltungstherapie behandelt.⁴⁰

Die Wirkungsmechanismen der für diese Arbeit relevanten Zytostatika werden im Folgenden beschrieben.³⁸ Die jeweils beeinflussten Zellzyklusphasen sind schematisch in Abbildung 5 dargestellt.

Vincristin: Das aus *Vinca rosea* isolierte Alkaloid ist ein Mitosehemmer. Es bindet an das Protein Tubulin und behindert so die Ausbildung der Mikrotubuli während der Zellteilung in der *gap 2*/Mitose (G2/M)-Phase des Zellzyklus. Auch die RNA- und DNA-Synthese der Zelle wird von Vincristin gestört.

Etoposid: Etoposid ist ebenfalls ein pflanzliches Alkaloid, das aus der Wurzel von *Podophyllum peltatum* gewonnen wird. Eine Hemmung der Topoisomerase II resultiert in Mitosearrest, daneben bewirkt das Medikament auch DNA-Strangbrüche. Es wirkt so in der G2/M- und Synthese (S)-Phase des Zellzyklus.

Cytarabin: Als Isomer des Nucleosids Cytidin wird Cytarabin (AraC) bei der DNA-Synthese inkorporiert, stört DNA-Reparaturmechanismen und hemmt DNA- und RNA-Polymerasen. Die zytotoxische Wirkung von AraC betrifft demnach die S-Phase der Zelle.

Asparaginase: Asparaginasen katalysieren die Hydrolyse von Asparagin zu Asparaginsäure. Während gesunde Zellen durch die Induktion von Asparaginsynthese Asparagin selbständig produzieren können, sind leukämische Blasten dazu nicht in der Lage. Durch die intravasale Depletion von Asparagin können die Blasten so in der postmitotischen bzw. präsynthetischen Phase 1 (*gap 1*: G1) des Zellzyklus spezifisch inhibiert werden.

1.2.5 Neue Therapieansätze

Akute Leukämien, und auch die Untergruppe der T-ALLs, sind keine in sich homogene Gruppe, sondern stellen genetisch heterogene Neoplasien des blutbildenden Systems dar. Die Behandlung durch Chemotherapien, die zum großen Teil nicht nur die leukämischen Blasten, sondern alle proliferierenden Gewebe belasten, verursachen auch bei einer Heilung der Leukämie zum Teil schwerwiegende kurz- und langzeitige Nebenwirkungen. Hinzu kommt eine Entwicklung von Therapieresistenzen in vielen Patient_innen, beispielsweise durch erhöhte Expression des *Multi-drug-resistance* Proteins (MDR1), das zytotoxische Substanzen aus der Zelle pumpt.⁴² Durch die Verbesserung der Risikostratifizierung mittels MRD-Diagnostik und molekulargenetischer prognostischer Faktoren ist die Heilungsrate von T-ALL in den letzten Dekaden zwar gestiegen, doch bei einem Überleben von nur 30 bis 50 % der adulten Patient_innen bleibt ein großes Potenzial für Therapieoptimierungen.^{14,15} Eine Hoffnung bietet daher die Identifizierung von molekulargenetischen Aberrationen, die als Zielstruktur für neue Medikamente dienen können.

Als erstes Medikament dieses „*targeted therapy*“-Konzepts wurde der Proteinkinaseinhibitor „Imatinib“ zur Behandlung von CML mit Philadelphia-Chromosom (Ph⁺) entwickelt. Diese für CMLs charakteristische Translokation führt zu einer Fusion der Gene *ABL1* und *breakpoint cluster region* (*BCR*), deren Translationsprodukt das Fusionsprotein BCR-ABL ist.⁴³ Imatinib hemmt die Tyrosinkinaseaktivität von BCR-ABL spezifisch und wirkt so zielgerichtet gegen die leukämischen Blasten. Nach erfolgreichen klinischen Studien wurde es auch bei Ph⁺ ALLs zugelassen.⁴⁴ Auch Therapien mit Antikörpern, die spezifisch an bestimmte Antigene auf der Blastenzelloberfläche binden, wurden entwickelt. Rituximab ist ein chimärer human-muriner anti-CD20 Antikörper. CD20 ist ein B-zelllinienspezifischer Oberflächenmarker, der von einem Großteil der B-ALL-Blasten exprimiert wird. Die Kombination von Rituximab und Chemotherapie konnte in verschiedenen Studien das Gesamtüberleben der Patient_innen verlängern.⁴⁵

Für die Behandlungen speziell von T-ALL-Patient_innen wurden dagegen bis jetzt nur wenige Fortschritte dieser Art erreicht. Ein Forschungsansatz in diesem Bereich sind niedermolekulare γ -Sekretaseinhibitoren (GSI) für den Einsatz bei aktivierenden *NOTCH1*-Mutationen, die in der Hälfte der T-ALL-Patient_innen gefunden wurden.²¹ Der γ -Sekretase-

Komplex ist ein Transmembranenzym, das für die proteolytische Spaltung von NOTCH1 verantwortlich ist. Dieser Prozess ist für die Relokation der intrazellulären NOTCH1-Domäne, und damit für die weitere Signalkaskade, notwendig. Die ersten klinischen GSI-Studien brachten jedoch ernüchternde Ergebnisse, da die durchschlagende Wirkung in murinen Modellen bei humanen T-ALLs nicht reproduziert werden konnte und die Behandlung mit einer hohen Toxizität verbunden war.⁴⁶

Die Ergebnisse aus Studien mit den beschriebenen und weiteren neuen zielgerichteten Therapien, die eine Alternative zu den herkömmlichen Chemotherapeutika bieten sollen, machen deutlich, dass dieser Therapieansatz hohes Potenzial besitzt. Durch die Entwicklung von neuen, effizienten Sequenzierungsmethoden können in Zukunft die Mutations- und Expressionsprofile leukämischer Blasten schnell bestimmt werden. So könnten dann auch bisher unbekannte oder nur bei wenigen Patient_innen vorkommende Aberrationen identifiziert und eine personalisierte Therapie eingesetzt werden. Um diese Therapien zu entwickeln, ist jedoch weitere Forschung unumgänglich. Zunächst muss die klinische Bedeutung genetischer Aberrationen erforscht werden, um im nächsten Schritt die betroffenen molekularen Signalwege zu entschlüsseln, damit schließlich maßgeschneiderte Medikamente entwickelt werden können. Nicht zuletzt ist es auch notwendig, zusätzliche Biomarker zu finden, um Patient_innen zu identifizieren, die von den jeweiligen Substanzen profitieren könnten.

1.3 EINLEITUNG TEIL I: BCL11B

1.3.1 Transkriptionsfaktoren in der T-Zell-Entwicklung

Wie in Absatz 1.1 erläutert, ist die normale T-Zellentwicklung ein streng regulierter gradueller Prozess, dem das An- und Abschalten essenzieller Transkriptionsprogramme zu Grunde liegt. Die im Folgenden erläuterten Erkenntnisse über diese Abläufe basieren größtenteils auf Versuchen mit murinen Modellen und stimmen nicht unbedingt komplett mit den Abläufen im humanen System überein.

Die Hochregulierung von NOTCH1 stellt den Anfang der Festlegung der Vorläuferzellen auf die T-Zelllinie nach ihrer Einwanderung in den Thymus dar. NOTCH1 aktiviert verschiedene Transkriptionsfaktoren, die wiederum T-Zell-Identitätsgene wie *TCR/CD3* regulieren und sich gegenseitig stabilisieren und regulieren.⁷ Während einige Transkriptionsfaktoren, die bei der T-Zellentwicklung eine Rolle spielen, auch in anderen Zelllinien von Bedeutung sind, wie c-Myb, Mitglieder der Runx-Familie, der E2A/HEB-Familie und der Ikaros-Familie, sind drei Transkriptionsfaktoren spezifisch für die T-Zellentwicklung: BCL11b, GATA3, und TCF-1 (kodiert durch *TCF-7*).⁷ TCF-1 wird von NOTCH1 direkt durch einen dem Promotor vorgelagerten Enhancer aktiviert. Dieser Transkriptionsfaktor ist das Effektorprotein der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade, agiert aber in der T-Zellentwicklung β -Catenin unabhängig.⁴⁷ TCF-1 aktiviert in weiteren Schritten GATA3 und BCL11b; bei einer künstlichen Hochregulierung von TCF-1 kann dies auch ohne NOTCH1 stattfinden.⁴⁸

Laut Rothenberg *et al.* findet die T-Zellentwicklung in drei spezifischen regulatorischen Zuständen statt: Der Übergang der ersten zur zweiten Phase ist dabei durch die Hochregulation von TCF-1 und GATA3 gekennzeichnet (Abbildung 6).⁷ Im Übergang von der zweiten zur dritten Phase beginnt die Expression von BCL11b.⁷ Die Expression von GATA3 ist essenziell für die Differenzierung von ETPs und ein potenter Repressor des B-Zellpotenzials.⁴⁹ Ein Verlust wirkt sich inhibitorisch auf die T-Zellentwicklung ab dem DN3-Stadium aus.² BCL11b ist ein C_2H_2 -Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der in der DN2-Phase zeitgleich mit der endgültigen Festlegung auf die T-Zelllinie exprimiert wird.⁷ Im nächsten Abschnitt soll BCL11b genauer charakterisiert werden.

1.3.2 Struktur und Funktion von BCL11b

Das Gen *BCL11b* ist auf dem humanen Chromosom 14 lokalisiert und besteht aus vier Exons; das letzte Exon enthält die sechs Zinkfinger-Motive (Abbildung 7). Zwei Splice-Varianten, mit oder ohne Exon 3, sind bekannt. Der Genlokus erhielt zunächst den Namen *Radiation-induced tumor suppressor gene 1 (Rit-1)*, da eine homozygote Deletion und Punktmutationen in γ -Strahlungsinduzierten Lymphomen von Mäusen gefunden wurden.⁵⁰

Bei einer Deletion beider *BCL11b*-Allele in Mäusen sterben die Tiere kurz nach der Geburt und weisen eine Vielzahl an Defekten in verschiedenen Organsystemen auf, wie z.B. dem Immunsystem, dem zentralen Nervensystem, der Haut, den Zähnen und den Haarzellen in der Cochlea.⁵¹ BCL11b ist demnach essenziell für die Entwicklung diverser Gewebe.

Im hämatopoetischen System wird *BCL11b* ausschließlich in den T-Zellen exprimiert. Der Beginn der Expression erfolgt nach dem DN1-Stadium der T-Vorläuferzellen, kurz vor der endgültigen Festlegung auf die T-Zelllinie und der Aktivierung wichtiger T-zellspezifischer Transkriptionsprogramme. Durch seine Spezifität auf die T-Zelllinie und den kritischen Zeitpunkt seines Expressionsbeginns bezeichneten Rothenberg *et al.* *BCL11b* daher als möglichen primären Regulator der T-Zellentwicklung.⁵² Dafür sprechen die Erkenntnisse bei Deletion von *BCL11b* in T-Zellvorläufern *in vitro*: Das Fortschreiten der T-Zellentwicklung wird inhibiert, die myeloische Entwicklungslinie nicht ausgeschaltet und das Differenzierungspotenzial in natürliche Killerzellen (NK) ist stark erhöht.^{53,54}

Diese *BCL11b*-negativen Vorläuferzellen erreichen einen DN2-ähnlichen Phänotyp, bei dem *GATA3* und *TCF-1* hoch-exprimiert werden, aber stammzellnahe Gene nicht ausgeschaltet sind (z.B. *ERG* und *FLT3*).⁵³ Neben dieser Funktion als „gatekeeper“ (Pfortner) für die T-Zelllinie scheint *BCL11b* auch darüber hinaus für die Identitätserhaltung von T-Zellen verantwortlich zu sein: Auch bei *Knockout* von *BCL11b* in späteren Stadien erlangen die T-Vorläuferzellen wieder das Potenzial der Entwicklung in NK-ähnliche Zellen (Abbildung 8).⁵⁵ *In vivo* kommt es im murinen Modell bei Abwesenheit von *BCL11b* zu einem Differenzierungsarrest vor der β -Selektion im Übergang vom DN3- zu DN4-Stadium.⁵⁶

Die genauen, *BCL11b* nachgeschalteten regulatorischen Netzwerke, mit denen der Transkriptionsfaktor die T-Zellentwicklung anstößt und aufrecht erhält, wurden noch nicht identifiziert. Es sind jedoch aus verschiedenen Zellkontexten Zielgene bekannt, deren Expression von *BCL11b* gehemmt oder aktiviert werden kann.

So wurde eine Kooperation von *BCL11b* mit der Histon-Lysin-N-Methyltransferase SUV39H1 bei der Repression von *p21*-Expression (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1*), einem Zellzyklusregulator, gefunden.⁵⁷ Auch die Expression eines weiteren Zellzyklusregulators der selben Proteinfamilie, *p51* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C*), wurde von *BCL11b* gehemmt, hier durch funktionelle Assoziation mit dem *nucleosome remodeling and histone deacetylase* (NuRD)-Komplex.⁵⁸ In T-Lymphozyten wurde eine direkte Transkriptionsrepression des *HIV-1 long terminal repeat (LTR)* durch *BCL11b* gefunden, ebenfalls vermittelt durch den NuRD-Komplex.⁵⁹ Auch in normalen T-Lymphozyten wurde eine Assoziation von *BCL11b* mit dem NuRD-Komplex beobachtet.⁶⁰

Neben einer Expressions-Repression wurde auch eine Hochregulation der Expression des T-Zell-Wachstumsfaktors *Interleukin 2 (IL2)* durch direkte Bindung von *BCL11b* an den *upstream sequence 1 (US1)*-Lokus in CD4+ T-Zellen gefunden.⁶¹

Der Mechanismus der Aktivierung von *BCL11b* während der T-Zellentwicklung ist ebenfalls nicht geklärt. Im murinen Modell wurde ein möglicher *Enhancer* 850 kb vor dem *BCL11b*-Promotor gefunden, der in T-Zellen mit dessen Promotor interagiert.⁶² Verschiedene, in der T-Zellentwicklung involvierte Transkriptionsfaktoren, wie unter anderen Ikaros, PU1, TCF-1, *GATA3* und *RUNX1*, binden an diesen *Enhancer*.⁶² Möglicherweise regulieren diese Transkriptionsfaktoren so die Festlegung der Vorläuferzellen auf die T-Zelllinie durch die Aktivierung von *BCL11b*. Weitere Hinweise kommen von Versuchen in einem *in vitro*-Kokultursystem mit murinen Stromazellen, die den NOTCH1-Liganden *Delta-like 4*

exprimierten, unter Zugabe spezifischer Zytokin-Cocktails. So konnte eine Verminderung der Interleukin-7-Konzentration eine stabile T-Zellentwicklung auslösen und *BCL11b* wurde als Auslöser dieser T-Zellentwicklung identifiziert.⁵⁴ Es ist daher denkbar, dass *BCL11b*-Expression, und damit das Voranschreiten der T-Zellentwicklung, auch *in vivo* durch die Veränderung von Zytokinsignalen ausgelöst wird.

1.3.3 Die Rolle von *BCL11b* in der T-ALL

Wie im vorherigen Absatz beschrieben, wurden Läsionen im *BCL11b*-Genlokus in γ -strahlungsinduzierten murinen Lymphomen gefunden.⁵⁰ Da bei einem *p53*^{+/-}-Phänotyp schon der *Knockout* eines *BCL11b*-Allels reichte, um die Anfälligkeit für Lymphome zu erhöhen, wurde *BCL11b* als haploinsuffizienter Tumorsuppressor bezeichnet. Auch bei einzelnen Patient_innen mit AMLs, T-ALLs und akuten T-Zell/myeloischen bilinearen Leukämien wurden Läsionen des *BCL11b*-Gens identifiziert.⁶³⁻⁶⁸ Bei der Untersuchung größerer Kohorten pädiatrischer T-ALLs wurden in zwei Studien Deletionen und Punktmutationen bei 9 % bzw. 16 % der Patient_innen entdeckt. Ein Großteil dieser Mutationen befanden sich im Exon 4 des Gens und beeinträchtigten die Zinkfinger-Motive.^{69,70} Eine weitere Arbeit fand bei erwachsenen Patient_innen eine größere Frequenz von *BCL11b*-Mutationen als bei pädiatrischen Patient_innen (20 % vs. 5,3 %) und eine höhere Mutationsrate bei frühen adulten T-ALLs als bei reifen adulten T-ALLs (4 % vs. 12 %).⁷¹ In dieser kleineren Studie zeigte sich ein besseres Überleben der mutierten erwachsenen Patient_innen (n = 4), in den pädiatrischen Kohorten war dies jedoch nicht der Fall.⁶⁹⁻⁷¹ Eine deskriptive Untersuchung der *BCL11b*-Expression und eine Korrelation mit klinischen Merkmalen in einer größeren Patient_innenkohorte fehlte bis zu der vorliegenden Arbeit.

Wie in der T-Zellentwicklung ist die Rolle von *BCL11b* auch in der Leukämogenese nicht eindeutig geklärt. Die Überexpression des Gens in T-ALL-Zelllinien führte zu einem Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus. Gleichzeitig waren die Zellen resistenter gegenüber bestimmten zytotoxischen Substanzen.⁷² Microarray-Analysen zeigten eine direkte oder indirekte Hochregulation der Zellzyklusregulatorgene *p57* und *p18* und eine Repression des Onkogens *MYC neuroblastoma derived homolog (MYCN)*.⁷²

Bei einem *BCL11b*-*Knockdown* durch *small interfering RNAs* (siRNAs) konnte Apoptose in T-ALL-Zelllinien induziert werden. Dabei wurde der *Tumor necrosis factors-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) hoch- und das anti-apoptotische Protein *B-cell CLL/lymphoma 2 (BCL2)-like 1 (BCL2L1)* herunterreguliert.⁷³ Interessanterweise war dagegen in reifen, normalen T-Zellen nach *BCL11b*-*Knockdown* keine Apoptose messbar.⁷³ Microarray-Daten von T-ALL-Zelllinien nach siRNA-Transfektion bestätigten eine höhere Expression von pro-apoptotischen Genen wie *Tumor Necrosis Factor Superfamily, Member 10 (TNFSF10)* und Herunterregulation von anti-apoptotischem *BCL2L1*.⁷⁴

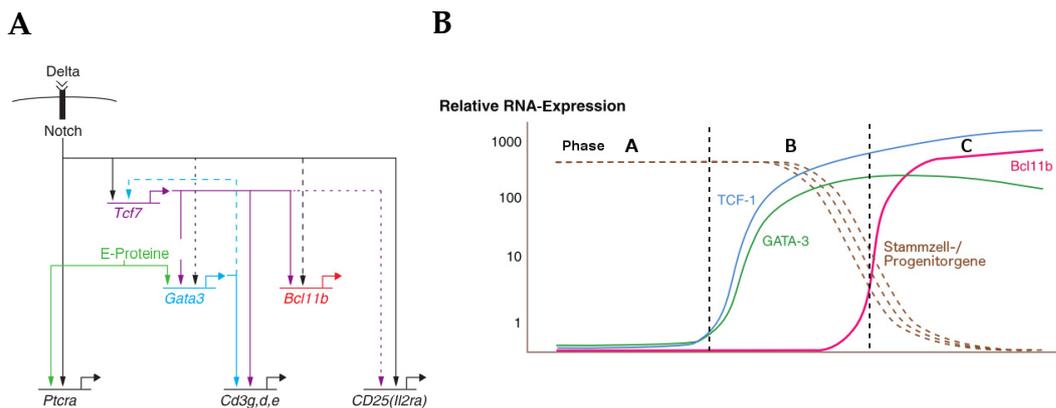


Abbildung 6: Expression von Transkriptionsfaktoren in der T-Zellentwicklung (verändert nach Rothenberg *et al*)⁷

A: Netzwerkbeziehungen zwischen Notch, TCF-1 (*TCF-7*), GATA3, BCL11b und einigen Zielgenen. durchgezogene Pfeile: unterstützt durch Störungs- und Bindungsnachweisen. gestrichelt: Störungsnachweise.

B: Phasen der T-Zellentwicklung mit Expressionsbeginn der T-Zelltranskriptionsfaktoren TCF-1, GATA3 und BCL11b und zeitgleicher Herunterregulation von Stammzell- und Progenitorgenen



Abbildung 7: Struktur des *BCL11b*-Genlokus

ZF= Zinkfinger-Motiv

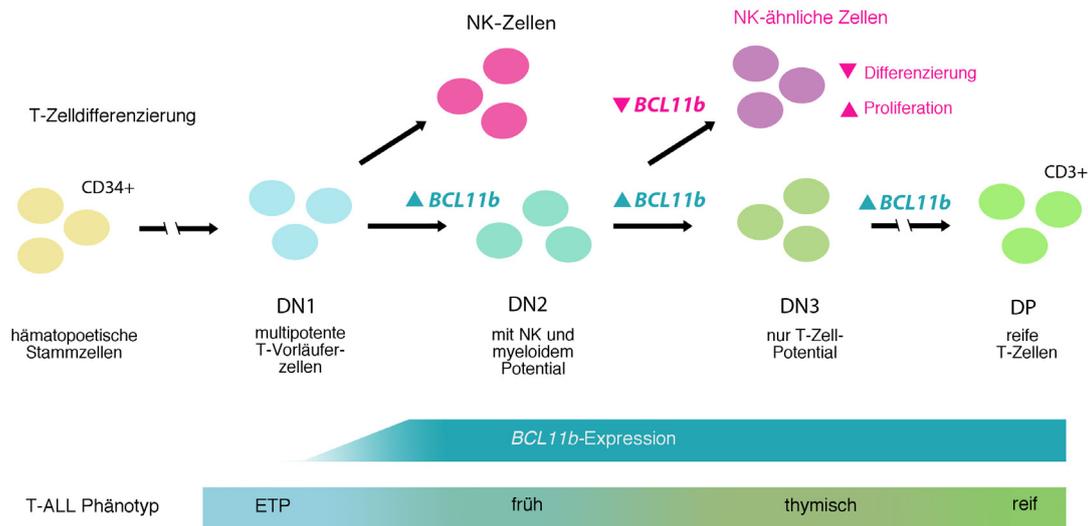


Abbildung 8: *BCL11b*-Expression in der normalen T-Zellentwicklung

Im murinen Modell beginnt die Expression von *BCL11b* während des Übergangs vom DN1- zum DN2-Stadium und bleibt während der Differenzierung bis in reifen T-Zellen erhalten.⁷ Ein Knockout des Gens im DN2-Stadium führt zu einem NK-ähnlichen Phänotyp der durch einen Differenzierungsarrest und einem hohen proliferativem Potenzial gekennzeichnet ist.⁵⁵ Die korrespondierenden T-ALL-Immunphänotypen sind eingezeichnet.

DN = „doppelt negativ“ bezogen auf CD4- und CD8-Expression, DP = „doppelt positiv“, NK = Natürliche Killerzellen, ETP = *Early T-cell progenitor ALL*

1.4 EINLEITUNG TEIL II: IGFBP7

Leukämien sind keine monogenetischen Erkrankungen, sondern sind von einer Vielzahl verschiedener genetischer Läsionen geprägt. Neben entwicklungspezifischen Transkriptionsfaktoren wie BCL11b kann die Transformation von hämatopoetischen Vorläuferzellen zu leukämischen Blasten auch von Aberrationen bei Wachstumsfaktoren und den dazugehörigen Signalwegsnetzwerken gefördert werden. Das insulinähnliche Wachstumsfaktor (*insulin-like growth factor*: IGF) -System ist ein solches Signalsystem, dessen Mitglied IGFBP7 (*IGF-binding protein 7*) im zweiten Teil dieser Arbeit funktionell untersucht wurde.

1.4.1 Das IGF-System

Das IGF-System ist ein Netzwerk bestehend aus zwei IGFs und Insulin als Liganden, verschiedenen Rezeptoren, IGF-bindenden Proteinen (IGFBPs) und IGFBP-Proteasen. Es spielt eine Rolle bei der Regulation von Wachstum, Proliferation und Apoptose verschiedener Zelltypen.

Die IGFs besitzen eine große Homologie zu Insulin und haben Charakteristika sowohl von zirkulierenden Hormonen als auch von Gewebewachstumsfaktoren. Der Großteil von IGF-1 wird in der Leber unter der Kontrolle des Wachstumshormons Somatotropin produziert. Dieses wird wiederum in der Hypophyse, reguliert durch Somatoliberin, gebildet. Jedoch wird IGF-1 nicht nur endokrin sezerniert, sondern auch autokrin und parakrin durch verschiedene Organe und Gewebetypen produziert. IGF-2 wirkt vor allem bei der fetalen Entwicklung als Wachstumsfaktor und wird ebenfalls vor allem in der Leber, aber auch von anderen Geweben freigesetzt (Abbildung 9A).^{75,76}

Das IGF-System beinhaltet drei Rezeptoren an die IGFs binden können: den IGF-1-Rezeptor (IGF1-R), den IGF-2-Rezeptor (IGF2-R) und Hybridrezeptoren aus IGF1-R und dem Insulinrezeptor (IR).⁷⁶

Der IGF1-R ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor, der aus α - und β -Ketten besteht, die von einer gemeinsamen mRNA translatiert werden.⁷⁷ Jeweils zwei α -Ketten bilden eine Untereinheit, die sich extrazellulär befindet, während zwei β -Ketten die Zellmembran als weitere Untereinheit durchspannen. Die β -Untereinheit ist für die intrazelluläre Signaltransduktion verantwortlich.⁷⁷ IGF1-R bindet vor allem IGF-1, aber mit einer sechsfach geringeren Affinität auch IGF-2 und mit einer 100-fach geringeren Affinität Insulin.⁷⁸ Nach dem Binden von Liganden autophosphoryliert die Tyrosinkinasedomäne spezifische Tyrosine, die als Bindestelle für Signalproteine dienen. Diese Signalproteine wie *Insulin receptor substrate* (IRS1-4) Proteine oder *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (Sarcoma) homology 2 domain containing sequence* (SHC) aktivieren ihrerseits verschiedene Signalkaskaden, wie den Phosphoinositid-3-Kinasen-(PI3K)-Proteinkinase B (AKT)-*Mammalian target of rapamycin* (mTOR)-Signalweg und den *Rapidly accelerated fibrosarcoma* (RAF)-*Mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalweg.⁷⁹ Abhängig vom Zellkontext führt eine Aktivierung von IGF1-R über diesen Weg zu

Zellproliferation und -überleben, Migration oder Differenzierung. Zellüberleben wird durch verschiedene nachgeschaltete Effektoren reguliert, wie u. a. BCL-2, BCL2L1, *Bcl-2-associated death promoter* (Bad), Caspase-9, p53 und *forkhead box O1* (FOXO)-Transkriptionsfaktoren.⁷⁹ IGF2-R bindet nur IGF-2, besitzt aber nach aktuellen Erkenntnissen keine Funktion außer dem Binden, Internalisieren und Degradieren von überschüssigem IGF-2.⁷⁹

Der Transport und die Verfügbarkeit von IGFs werden durch IGFBPs (IGFBP1-7) reguliert. Der Großteil der zirkulierenden IGFs ist in einem 150 kDa-Komplex gebunden, der IGFBP3 und *acid-labile subunit*-Protein (ALS) beinhaltet, welche die IGFs vor Proteasen schützen und ihre Halbwertszeit von 20-30 Minuten auf über 15 Stunden verlängern können.^{80,81} Wie die IGFs werden alle IGFBPs außer IGFBP1, das fast ausschließlich in der Leber gebildet wird, von diversen Geweben sezerniert und wirken auch auto- und parakrin.⁸¹

Die Proteine IGFBP1 bis -6 besitzen eine hoch konservierte N-terminale Domäne, eine konservierte C-terminale Domäne und einen variablen Mittelteil. Die N-terminale Domäne beinhaltet die Hauptbindungsstelle für IGFs, die C-terminale Domäne trägt jedoch auch zur IGF-Bindung bei. Der Mittelteil moduliert dagegen die Interaktionen der verschiedenen IGFBPs mit anderen Proteinen.^{81,82} IGFBP7 besitzt nur die charakteristische N-terminale Domäne und wird daher auch als IGFBP-verwandtes Protein 1 (*IGFBP-related protein 1*: IGFBP-rP1) bezeichnet.⁸² Da IGFBPs eine höhere Affinität zu IGFs als die IGF-Rezeptoren besitzen, können sie so IGF-Signale modulieren. Dabei wirken einige IGFBPs ausschließlich inhibitorisch, während andere sowohl inhibitorisch als auch potenzierend wirken können.^{81,82}

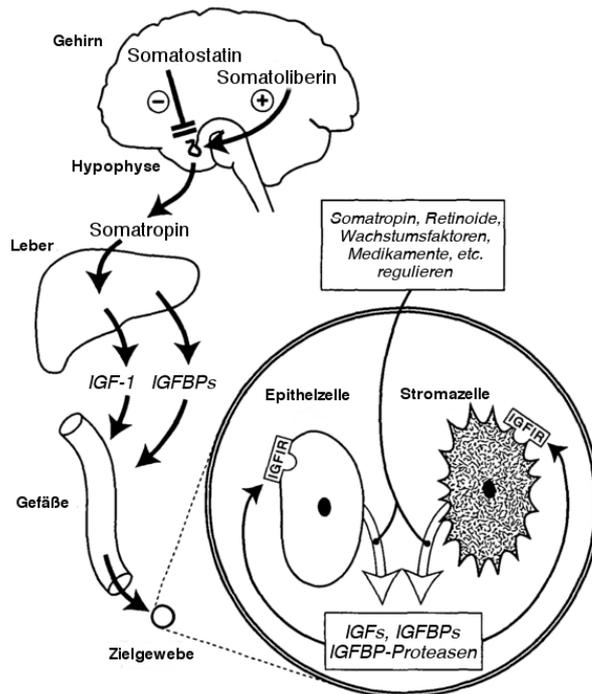
Neben diesen IGF-abhängigen Wirkungen wurden für die meisten IGFBPs auch IGF-unabhängige Funktionen beobachtet, wobei über die genauen molekularen Grundlagen meist wenig bekannt ist. Für IGFBP3 wurde beispielsweise die Interaktion mit einem eigenen Rezeptor in Brust- und Prostatakarzinomzellen nachgewiesen.⁸³ Hinweise auf nukleäre Translokation und somit auf eine mögliche direkte Beeinflussung von Transkriptionsprogrammen wurde für IGFBP3 und -5 gefunden.⁸⁴

1.4.2 Die Bedeutung des IGF-Systems in Neoplasien

Das IGF-System beeinflusst mehrere Prozesse, die laut dem „*Hallmarks of Cancer*“ -Modell (Abbildung 3) essenziell für die Entstehung und Progression von Neoplasien sind: Proliferation, Vermeidung von Zelltod und migratorische Signale, die eine Grundlage für Metastasen schaffen.⁹ Es ist daher nicht überraschend, dass in einer Vielzahl von Krebserkrankungen Veränderungen der Expression und Serumswerte von Komponenten des IGF-Systems gefunden wurden. So wurden in einer Vielzahl von Krebsformen erhöhte IGF-Werte im Serum identifiziert, die mit dem Krankheitsrisiko korrelierten.^{75,85,86} Auch Überexpression der IGFs und des IGF1-R auf mRNA-Ebene – im Vergleich zu gesunden Kontrollen – wurde in fast allen Karzinomformen gemessen und ein Verlust der genomischen Prägung (*loss of genomic imprinting*: LOI) von IGF-2 wurde in verschiedenen Karzinomzellen beobachtet.^{87,88}

Auch in hämatopoetischen Neoplasien wurden Aberrationen des IGF-System beobachtet. In

A



B

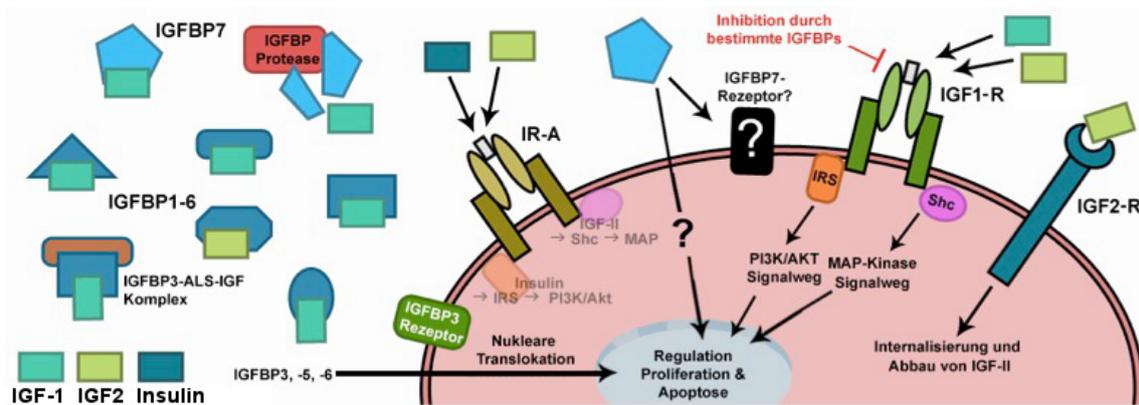


Abbildung 9: Das IGF-System

A: Der Signalweg der IGF-1-Synthese in der Leber steht unter Kontrolle von in der Hypophyse sezerniertem Somatotropin. (verändert nach Pollak *et al.*)⁷⁵

B: IGF-1 und IGF-2 binden an den IGF1-Rezeptor (IGF1-R), der durch seine Tyrosinkinasefunktion Proliferation und Apoptose der Zelle beeinflusst. IGF-2 kann auch an den IGF2-R binden, der IGF-2 daraufhin internalisiert und abbaut. Sieben verschiedene IGF-bindende Proteine (IGFBP1-7) binden die IGFs, regulieren ihren Transport und verlängern ihre Halbwertszeit. Der IGF-IGFBP-Komplex wird von IGFBP-Proteasen gespalten. Einige IGFBPs haben auch IGF-unabhängige Funktionen und beeinflussen Zellen direkt durch eigene Rezeptoren oder nukleäre Translokation.

IGF = *Insulin-like growth factor*, IGFBP = *IGF-binding protein*, IRS = *Insulin receptor substrate*, PI3K = *Phosphoinositid-3-Kinasen*, AKT = *Proteinkinase B*, MAP-Kinase = *mitogen-activated protein kinase*

leukämischen Blasten von AML-Patient_innen wurde eine geringe Expression von *IGFBP3* und *IGF-1* gefunden, während ALL-Blasten mehrere Komponenten des IGF-Systems erhöht exprimierten.^{89,90} Eine Studie fand in 50 % von AML-Patient_innen ein LOI des *IGF-2*-Gens und in CML war dies mit einer fortschreitenden Erkrankung korreliert.^{91,92}

In-vitro- und *in-vivo*-Experimente untermauern eine funktionelle Rolle des IGF-Signalwegs in der Leukämogenese. In 50 % der AML-Proben einer Studie wurde eine konstitutive Aktivierung von PI3K gefunden, die mit einer dauerhaften Phosphorylierung von IGF1-R korrelierte. Nach Behandlung mit einem IGF1R-Antikörper konnte diese PI3K-Aktivierung in einem Großteil der AML-Proben aufgehoben werden und die Proliferation der Zellen wurde inhibiert.⁹³ In einem murinen Modell waren CMPs mit verringerter *IGF1-R*-Expression weniger empfänglich für leukämische Transformation. Behandlung von murinen AML-Zellen mit einem IGF1-R-Inhibitor führte hier ebenfalls zu einem verringerten Wachstum der Zellen.⁹⁴ Auch in T-ALL-Blasten hatte eine Hemmung der IGF1-R-Aktivität oder Deletion des Rezeptors eine Inhibition der Proliferation und Viabilität der Zellen zur Folge.⁹⁵ Es wurde gezeigt, dass es sich bei *IGF1-R* um ein direktes transkriptionelles Ziel von NOTCH1 handelt und NOTCH1 notwendig ist, um in T-ALL-Zellen hohe *IGF1-R*-Expressionswerte aufrecht zu erhalten.^{95,96} Dauerhafte NOTCH1-Aktivierung, wie sie in der Hälfte der T-ALL-Patient_innen durch Mutationen vorliegt, fördert die leukämische Transformation von T-Vorläuferzellen.^{21,97} Die Aktivierung des IGF-Signalwegs könnte dabei einen integralen Schritt der Transformation darstellen, der die Blasten befähigt, durch autokrine Signale die eigene Proliferation zu steigern und aufrecht zu erhalten.

Aufgrund dieser Erkenntnisse ist die Inhibierung von IGF-Signalen ein möglicher Ansatz zielgerichteter Krebstherapien und folglich wurden in den letzten Jahren fast 30 verschiedene Antikörper und niedermolekulare Inhibitoren mit IGF1-R als Zielstruktur entwickelt.⁹⁸ Während für Leukämien noch keine klinischen Studien mit Substanzen, die ausschließlich auf den IGF1-R wirken, existieren, wurden diese Medikamente in einer Vielzahl von anderen Neoplasien getestet.⁹⁹ Bis jetzt profitierten jedoch nur wenige Patient_innen von der Monotherapie mit IGF1-R-inibitorischen Substanzen und der erhoffte durchschlagende Effekt blieb aus.⁹⁸ Daher wurden die darauf ausgerichteten Entwicklungsprogramme von den meisten Pharmafirmen inzwischen eingestellt.¹⁰⁰ Ein Teil von „*targeted therapy*“-Konzepten muss jedoch auch die Identifizierung von Biomarkern sein, um Patient_innen, die von dieser Therapie profitieren würden, individuell identifizieren zu können. Dieser Aspekt fehlte jedoch in den meisten klinischen Studien bis jetzt.¹⁰¹ Ebenso könnte auch in der Kombination von IGF1-R-Inhibition und etablierten Chemotherapeutika ein Potenzial liegen.

1.4.3 IGFBP7

IGFBP7 ist ein ca. 30 kDa Protein, dessen Genlokus auf dem Chromosom 4 liegt (4q12–13). Die Homologie mit anderen IGFBPs ist auf die IGFBP-Domäne am N-terminalen Proteinende beschränkt, während der Rest des Proteins strukturell, und als Konsequenz davon auch funktionell, abweicht. Die Affinität von IGFBP7 zu IGFs ist geringer als die von IGFBP1-6



Abbildung 10: Struktur des IGFBP7-Genlokus mit eingezeichneten Proteindomänen
 IGFBP = IGFBP-Domäne, Kazal = Kazal-like domain, Ig-like = Immunoglobulin-like C2-type domain
 Proteindomänen nach SMART (a Simple Modular Architecture Research Tool)¹⁰³

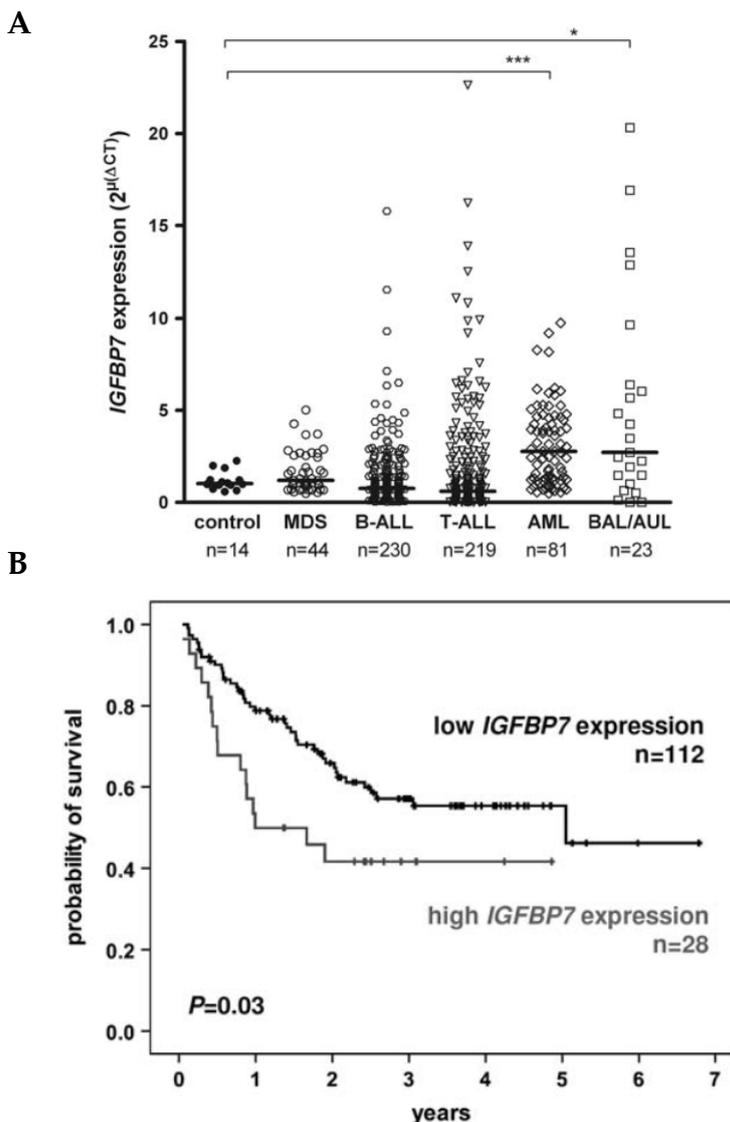


Abbildung 11: Expression von IGFBP7 in akuten Leukämien (Heesch *et al.* 2010)¹¹¹
A: Expression von IGFBP7 in hämatologischen Neoplasien. qRT-PCR-Ergebnisse von 611 Proben. Die Linien stellen Mediane dar. * P < 0,05, *** P < 0,001 (Mann-Whitney U-Test)
 MDS = Myelodysplastisches Syndrom, BAL = Akute biphänotypische Leukämie, AUL = Akute undifferenzierte Leukämie
B: Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens in T-ALL in Bezug auf IGFBP7-Expression. T-ALL-Patient_innen (GMALL 06/99 und 07/03) mit hoher IGFBP7-Expression hatten ein kürzeres Gesamtüberleben im Vergleich zu Patient_innen mit niedriger IGFBP7-Expression (P = 0,03; Log-Rank-Test)

und im Gegensatz zu diesen bindet es mit der gleichen Affinität auch Insulin.⁸² Eine der drei Transkript-Varianten von *IGFBP7* ist proteinkodierend. Dieses Transkript besteht aus 5 Exons (Abbildung 10). Neben der IGF-bindenden Domäne enthält das Protein auch eine *Kazal-like domain*, die oft kennzeichnend für Serin-Proteaseinhibitoren ist, und eine *Immunoglobulin-like C2-type domain*.^{102,103}

Über die Funktion von *IGFBP7* in gesunden Zellsystemen ist wenig bekannt; es wurde jedoch im Kontext von Neoplasien als Tumorsuppressor beschrieben: Bei Brust-, Kolorektal- und Leberzellkarzinomen war eine hohe *IGFBP7*-Expression mit einer guten Prognose der Patient_innen assoziiert.^{104–106} In Studien in heptozellulärem Karzinom und malignen Melanom wurde *IGFBP7* als Therapeutikum vorgeschlagen, da das Protein *in vitro* und *in vivo* Tumorzellviabilität senkte und Apoptose förderte.^{107–110}

In der akuten Leukämie wurde dagegen eine Ko-Expression von *IGFBP7* mit dem negativen Prognosefaktor *BAALC* bei T-ALL- und AML-Patient_innen gemessen. In T-ALL-Patient_innen war das Gen sehr heterogen exprimiert und in AML- und AUL/BAL-Patient_innen überexprimiert (Abbildung 11A). Eine hohe Expression war mit einer primären Therapieresistenz und kürzerem Überleben in T-ALL-Patient_innen assoziiert (Abbildung 11B).¹¹¹ Wie in anderen *in-vitro*-Studien mit verschiedenen Krebszelllinien, konnte die Zugabe von rekombinantem *IGFBP7* die Proliferation der leukämischen Zelllinien Jurkat und KG1a inhibieren.^{107,111–115}

Weitere Studien zeigten eine ähnliche Verbindung von *IGFBP7* zu Leukämien. So war *IGFBP7* in pädiatrischen AML- und ALL-Patient_innen hochreguliert und eine hohe Expression des Gens in Ph B-Vorläufer-ALL-Patient_innen mit einem kürzeren Überleben assoziiert.^{116,117} Des Weiteren wurde eine Resistenz gegenüber Asparaginase in ALL-Blasten beobachtet, die, induziert durch Ko-Kultivierung mit Knochenmarksstromazellen, *IGFBP7* exprimierten.¹¹⁷ Über die genauen molekularen Mechanismen, die der beobachteten Verbindung von *IGFBP7* mit einer schlechteren Überlebensrate in akuten Leukämien zu Grunde liegen, ist jedoch nichts bekannt.

1.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Um neue Therapiekonzepte für T-ALL-Patient_innen zu entwickeln, ist es notwendig, molekulare Subgruppen zu identifizieren, die Prognosen und damit risikostratifizierte Behandlungen verbessern können. Des Weiteren müssen die biologischen Grundlagen aufgeklärt werden, die zur Pathogenese und Progression der Erkrankung führen. Anhand dieses Wissens können dann mögliche Zielstrukturen für *target-therapy*-Konzepte identifiziert werden. Vor diesem Hintergrund sollten im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene Faktoren untersucht werden, deren Rollen in der Leukämogenese bis jetzt wenig definiert sind.

BCL11b ist nach dem heutigen Erkenntnisstand zumindest einer der Schlüsseltranskriptionsfaktoren in der T-Zellentwicklung und die bis jetzt identifizierten häufigen Mutationen und Translokationen des Gens in T-ALL-Patient_innen deuten auf eine ebenso zentrale Rolle in diesem Kontext hin. In dieser Arbeit wurden die Expression und der Mutationsstatus von *BCL11b* erstmals in einer großen Kohorte adulter T-ALL-Patient_innen untersucht. Durch die vorhandene GMALL-Datenbank aus klinischen Merkmalen und Expressions-Daten prognostischer Faktoren wurden im nächsten Schritt mögliche Assoziationen von *BCL11b*-Expression und Mutationen mit T-ALL-Subtypen, Gesamtüberlebensdaten und molekularen Charakteristika analysiert.

Für **IGFBP7** waren derartige deskriptive Untersuchungen bereits durchgeführt worden, und die prognostische Relevanz des Gens in der T-ALL war offen gelegt worden. Es fehlte jedoch Wissen über die Grundlagen der identifizierten Assoziation von *IGFBP7*-Expression mit kürzerem Überleben und primärem Therapieresistenz in T-ALL-Patient_innen. Daher wurde in funktionellen Experimenten die Auswirkung von Modulation der *IGFBP7*-Expression auf leukämische Zellen untersucht. Des Weiteren wurden *IGFBP7*-vermittelte Resistenzen gegenüber verschiedenen Zytostatika analysiert und in einem weiteren Schritt der dahinterstehende Mechanismus entschlüsselt.

Im Einzelnen widmeten sich die beiden Teile dieser Arbeit folgenden Fragen:

Teil I: Untersuchung von Expression und Mutationsstatus von *BCL11b* in der T-ALL

- » Wie ist *BCL11b* in verschiedenen T-ALL Subtypen exprimiert? Gibt es einen Zusammenhang zwischen Blasten-Reifegrad und *BCL11b*-Expression?
- » Gibt es in der adulten T-ALL Mutationen von *BCL11b*?
- » Hat die *BCL11b*-Expressionshöhe oder der Mutationsstatus eine prognostische Bedeutung?

Teil II: Charakterisierung der funktionellen Rolle von IGFBP7 in der T-ALL

- » Wie wirkt sich ein *Knockdown* oder Überexpression von *IGFBP7* auf die Proliferation von Leukämie-Zellen aus?
- » Kann der in T-ALL-Patient_innen festgestellte Zusammenhang zwischen *IGFBP7*-Überexpression und schlechtem Ansprechen auf Zytostatika *in vitro* reproduziert werden?
- » Durch welchen Mechanismus wirkt *IGFBP7*?

2 Material und Methoden

2.1 MATERIALIEN

2.1.1 Patient_innenkollektiv und gesunde Personen

Für Untersuchungen von mRNA-Expression und Mutationsstatus von *BCL11b* wurden Reste diagnostischer Materialien verwendet. Von 264 adulten T-ALL-Patient_innen standen Knochenmarksaspirate zur Verfügung, die bei der Erstdiagnose entnommen wurden. Die Patient_innen waren im Rahmen der GMALL 06/1999 und 07/2003 behandelt worden und die Proben wurden im GMALL-Referenzlabor der Charité Berlin bei Routineuntersuchungen immunphänotypisch charakterisiert.^{118,119} Die Messung bestimmter CD-Marker und die daraus folgende Einteilung in frühe (n=50), thymische (n=112) und reife (n=33) T-ALL fand anhand der EGIL-Richtlinien statt (siehe Absatz 1.2.2, Tabelle 2).¹³ Weitere 68 Patient_innen wurden einer kürzlich erstmalig charakterisierten Subgruppe, der ETP-ALL, zugeordnet.^{17,18} Die ETP-ALL-Kohorte wurde in der Auswertung separat analysiert.

Als Kontrollkohorte wurde Material von 24 gesunden Personen verwendet; von zehn Spender_innen wurde peripheres Blut entnommen, um reife CD3⁺-Lymphozyten anzureichern und von 14 gesunden Personen wurde Knochenmark aspiriert, um stammzellnahe CD34⁺-Zellen oder Gesamtknochenmark zu analysieren.

Entsprechend der Deklaration von Helsinki hatten Patient_innen und gesunde Personen ihr Einverständnis zur wissenschaftlichen Analyse und Speicherung ihrer Daten gegeben und die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt/Main bewilligt.¹²⁰

2.1.2 Verwendete Zelllinien

Als Modell für funktionelle Untersuchungen wurden verschiedene humane Zelllinien verwendet (Tabelle 5), die vom DMSZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) erworben wurden.

2.1.3 Geräte, Software und Chemikalien

Die in Tabelle 6 benannten Geräte wurden neben der in Laboren üblichen Grundausstattung wie Pipetten, Gelelektrophoresekammern, Heizblöcken, Sterilbänken, Inkubatoren etc. verwendet. Die Datenanalyse und Bildbearbeitung fanden mit der in Tabelle 7 aufgelisteten Software statt. Die in dieser Arbeit verwendeten Nicht-Standard-Chemikalien und Kits werden im Folgenden in Tabelle 8 aufgelistet; selbst hergestellte Reagenzien und Pufferlösungen werden im entsprechenden Methodenteil im Einzelnen benannt.

Tabelle 5: Ursprung und Kultivierungsbedingungen der verwendeten humanen Zelllinien

| DMSZ Nr. | Name | Ursprung | Medium | Zellkonzentration |
|----------|----------|----------|--------------------|---|
| ACC 396 | BE-13 | T-ALL | RPMI 1640, 20% FKS | 5 x 10 ⁵ Zellen / ml |
| ACC 57 | HeLa | GHK | DMEM, 10% FKS | 1-2 x 10 ⁶ Zellen / 80 cm ² |
| ACC 3 | HL-60 | AML | RPMI 1640, 10% FKS | 5 x 10 ⁵ Zellen / ml |
| ACC 282 | Jurkat | T-ALL | RPMI 1640, 10% FKS | 3 x 10 ⁵ Zellen / ml |
| ACC 10 | K562 | CML | RPMI 1640, 10% FKS | 1 x 10 ⁵ Zellen / ml |
| ACC 220 | Kasumi-1 | AML | RPMI 1640, 20% FKS | 5 x 10 ⁵ Zellen / ml |
| ACC-14 | KG1 | AML | RPMI 1640, 10% FKS | 1 x 10 ⁵ Zellen / ml |
| ACC 421 | KG1a | AML | RPMI 1640, 10% FKS | 4 x 10 ⁵ Zellen / ml |
| ACC 362 | Molt-4 | T-ALL | RPMI 1640, 20% FKS | 3,3 x 10 ⁵ Zellen / ml |

Abkürzungen: FKS = fetales Kälberserum, GHK = Gebärmutterhalskarzinom

Tabelle 6: Verwendete Geräte

| Gerät | Bezeichnung | Hersteller |
|----------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Chemiluminiszenz-Detektion | Image Reader LAS-4000 mini | GE Healthcare, Little Chalfont, UK |
| Durchflusszytometer | FACSCalibur™ | BD, Franklin Lakes, USA |
| Elektroporator | Amaxa Nucleofactor I | Lonza, Basel, CH |
| ELISA-Plattenlesegerät | Sunrise | Tecan, Männedorf, CH |
| Geldokumentationsstation | Transluminator BioDoc Analyze | Biometra, Jena, D |
| Spektrometer | Nanodrop® 1000 Spektrophotometer | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| Thermocycler | Mastercycler® gradient | Eppendorf, Hamburg, D |
| Thermocycler | Corbett RotorGene 6000 | Qiagen, Hilden, D |

Tabelle 7: Verwendete Software

| Bezeichnung | Verwendung | Hersteller |
|-------------|--|---|
| Cellquest | Aufzeichnung von Durchflusszytometrie-Daten | BD, Franklin Lakes, USA |
| FlowJo 8.7 | Auswertung von Durchflusszytometrie-Daten | FlowJo, Ashland, USA |
| Geneious | Sequenzierungsanalyse | Biomatters Ltd., Auckland, NZ |
| Gimp 2.8 | Bildbearbeitung | GIMP Development Team |
| Primer3 | Primer-Design | Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, USA |
| Prism 6 | Statistik und Diagrammerstellung | GraphPad Software Inc., San Diego, USA |

Tabelle 8: Verwendete Chemikalien und Kits

| Bezeichnung | Verwendung | Hersteller |
|---|-------------------------------------|--|
| 7AAD-Lösung | FACS | BD, Franklin Lakes, USA |
| Accutase | Zellkultur | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit II | FACS | BD, Franklin Lakes, USA |
| BSA = Rinderalbumin | FACS, Western Blot, ELISA | Sigma Aldrich, St. Louis, USA |
| cOmplete Mini protease inhibitor cocktail | Western Blot und ELISA | Roche, Basel, CH |
| DMEM Medium | Zellkultur | Biochrom AG, Berlin, D |
| dNTP-Mix | PCR, cDNA-Synthese | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| EcoRI | Klonierung Überexpressionsvektor | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| Ficoll Paque Plus | Isolation mononuklearer Zellen | GE Healthcare, Little Chalfont, UK |
| FITC BrdU Flow Kit | FACS | BD, Franklin Lakes, USA |
| FKS = fetales Kälberserum | Zellkultur | PAN Biotech, Aldenbach, D |
| G418 | Zellkultur | Biochrom AG, Berlin D |
| IQ-Mastermix | qRT-PCR | Bio-Rad, Hercules, USA |
| MACS Micro beads | Isolation mononuklearer Zellen | Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach |
| NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up | Klonierung Überexpressionsvektor | Macherey-Nagel, Düren, D |
| One SHOT Top10 <i>E. coli</i> | Klonierung Überexpressionsvektor | Invitrogen, Calsbad, USA |
| pCR™2.1-TOPO® Kit | Klonierung Überexpressionsvektor | Invitrogen, Calsbad, USA |
| Proteinleiter 10-170 kDa, #26616 | Western Blot | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| PVDF-Membran | Western Blot | Bio-Rad, Hercules, USA |
| Plasmid Maxi Kit | Plasmid-Isolation | Qiagen, Hilden, D |
| QIAprep Spin Miniprep | Plasmid-Isolation | Qiagen, Hilden, D |
| QIAshredder Säulen | RNA-Isolation | Qiagen, Hilden, D |
| Reverse Transkriptase | cDNA-Synthese | Epicentre, Madison, USA |
| RNAse-free DNase Sets | RNA-Isolation | Qiagen, Hilden, D |
| RNAse-Inhibitor | cDNA-synthese | Roche, Basel, CH |
| RNeasy | RNA-Isolation | Qiagen, Hilden, D |
| RPMI 1640 Medium | Zellkultur | Biochrom AG, Berlin D |
| Streptavidin-HRP | ELISA | R&D Systems |
| SUPER X IGF1P7 ELISA Kit | ELISA | Antigenix America, Huntington Station, USA |
| SYBR GREEN Mastermix | qRT-PCR | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| T4-DNA-Ligase | Klonierung Überexpressionsvektor | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| Taq-Polymerase | PCR | Qiagen, Hilden, D |
| TMB Solution A+B | ELISA | BD, Franklin Lakes, USA |
| TRIzol | RNA/DNA-Isolation | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| Trypanblau | Zellkultur | Biochrom AG, Berlin D |
| Western Lightning Plus ECL | Western Blot | Perkin Elmer, Waltham, USA |
| WST-1 solution | Proloferationsassay | Roche, Basel, CH |

2.1.4 Expressionsvektoren und synthetische Oligonukleotide

Zur Überexpression von *IGFBP7* in Zelllinien wurde der Vektor „pcDNA 3.1/myc-His C“ (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Der *Human cytomegalovirus* (CMV)-Promotor sorgte für eine hohe Expression des klonierten Transkriptes und das Neomycin/Geneticin-Resistenzgen ermöglichte die Selektion stabil transfizierter Zellen. Seine Sequenz ist in Abbildung 12 schematisch dargestellt.

In Tabelle 9 sind die für die *Knockdown*-Experimente verwendeten siRNAs dargestellt und in Tabelle 10 die mit dem Programm „Primer 3“ im Rahmen dieser Arbeit entworfenen Primer.

2.1.5 Antikörper

Die in Tabelle 11 aufgelisteten Antikörper wurden verwendet, um Proteine im Western Blot-Verfahren nachzuweisen oder Proteinexpression mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (FACS) zu messen.

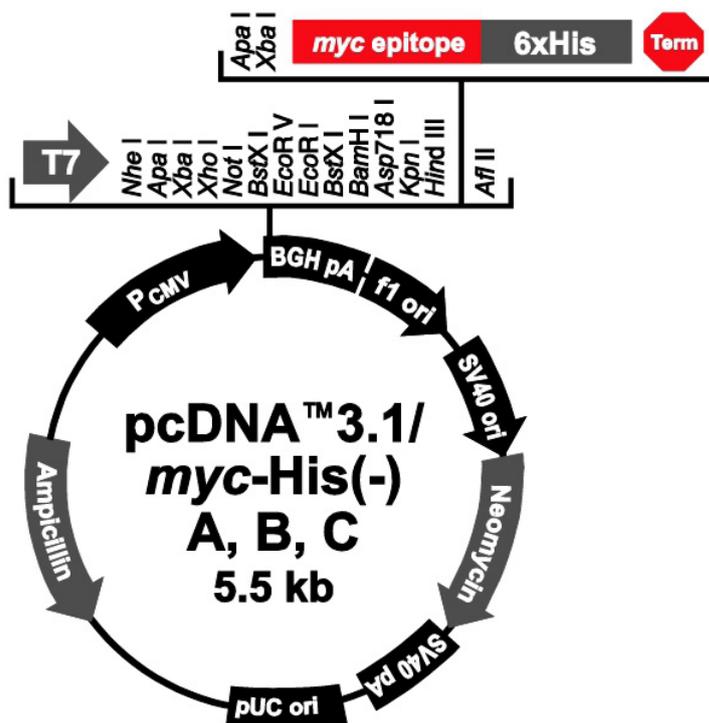


Abbildung. 12: pcDNA 3.1/myc-His C Vektorkarte (Quelle: invitrogen.com)

CMV-Promotor: 209-863 bp, T7 Promotor/Priming Ort: 863-882 bp, Multiple cloning site: 895-1006 bp, myc-Epitop: 1007-1036 bp, Polyhistidin-Tag:1052-1069 bp, BHG reverser Priming Ort: 113-1130 bp, BGH Polyadenylations-Signal: 1116-1343 bp, F1 Ursprung: 1844-1817 bp, SV40 Promotor und Ursprung: 1844-2152 bp, Neomycin (Geneticin / G418)-Resistenzgen: 2227-3021 bp, pUC Ursprung: 3708-4381 bp, Ampicillin-Resistenzgen: 4526-5386 bp.

Tabelle 9: Verwendete siRNAs, synthetisiert von Thermo Scientific, Waltham, USA

| Name | Gen | Bezeichnung | Cat # |
|----------|---------------|----------------------------------|----------------|
| siGFP | <i>GFP</i> | GFP Duplex I | P-002048-01-20 |
| siIGFBP7 | <i>IGFBP7</i> | ON-TARGETplus Human IGFBP7 siRNA | L-00875-00 |

Tabelle 10: Primer, synthetisiert von Metabion, Martinsried, D

| Name | Zielsequenz | Verwendung | Sequenz 5'-3' |
|-------------------------------------|---------------|---|---|
| BB01 | <i>BCL11b</i> | qRT-PCR forward | GGCGATGCCAGAATAGATG |
| BB02 | <i>BCL11b</i> | qRT-PCR reverse | ATTTGACACTGGCCACAGGT |
| BB03 | <i>BCL11b</i> | Mutationsanalyse forward (PCR und Sequenzierung) | ACGCTGTCTCTGCCTTTCTG |
| BB03P | <i>BCL11b</i> | qRT-PCR probe | FAM-CTCATCACCCCAGAGGCTG- ACCAT-BHQ1 |
| BB04 | <i>BCL11b</i> | Mutationsanalyse reverse (PCR und Sequenzierung) | CTCCGAGTCCATGCTGAAG |
| BB05 | <i>BCL11b</i> | Mutationsanalyse forward (PCR und Sequenzierung) | GCTGCTACTGGAGAACGAGAG |
| Fw 3 (Firma Dr. Meixner GmbH) | <i>BCL11b</i> | Mutationsanalyse forward (Sequenzierung) | CCACCACGAGAGCGACC |
| Fw 4 (Firma Dr. Meixner GmbH) | <i>BCL11b</i> | Mutationsanalyse forward (Sequenzierung) | GCCAAGCGCATCAAGGTG |
| Rv 2 ⁷⁰ | <i>BCL11b</i> | Mutationsanalyse reverse (PCR und Sequenzierung) | CCACCACGAGAGCGACC |
| Rv 3 (Firma Dr. Meixner GmbH) | <i>BCL11b</i> | Mutationsanalyse reverse (Sequenzierung) | TTGACGTCGTTAGTCAGCAAG |
| HK04 | <i>GAPDH</i> | qRT-PCR forward | GGTATCGTGGAAGGACTCATGAC |
| HK05 | <i>GAPDH</i> | qRT-PCR reverse | ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG |
| HK01 | <i>GPI</i> | qRT-PCR forward | TCTTCGATGCCAACAAGGAC |
| HK02 | <i>GPI</i> | qRT-PCRn probe | JOE-TTCAGCTTGACCCTCAACAC- CAAC-TAMRA |
| HK03 | <i>GPI</i> | qRT-PCR reverse | GCATCACGTCCTCCGTCAC |
| IGFR05 | <i>IGF1-R</i> | qRT-PCR forward | ACGGGGCGATCTCAAAAGTT |
| IGFR06 | <i>IGF1-R</i> | qRT-PCR reverse | CTCTCCGGCCATCTGAATCA |
| I03 | <i>IGFBP7</i> | qRT-PCR forward | CATCACCCAGGTCAGCAAG |
| I04 | <i>IGFBP7</i> | qRT-PCR reverse | TCACAGCTCAAGTACACCTG |
| I05 | <i>IGFBP7</i> | qRT-PCRn probe | FAM-TGCGAGCAAGGTCCTTCCA- TAGT-TAMRA |
| I17 | <i>IGFBP7</i> | Klonierung Überexpressionsvektor | CACCCCGCCATGGAG |
| I18 | <i>IGFBP7</i> | Klonierung Überexpressionsvektor | TATAGCTCGGCACCTTCACC |
| dT20 | mRNAs | cDNA-Synthese | TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT |

Tabelle 11: Verwendete Antikörper

| Bezeichnung | Isotyp | Verwendung | Hersteller |
|--|---|--------------|--|
| Anti-beta Actin (AC-15) antibody (HRP) | Maus-IgG ₁ , monoklonal | Western Blot | Abcam, Cambridge, UK |
| Anti-IGF-IR, clone α IR3 | Maus-IgG ₁ , monoklonal | FACS | Merck Millipore, Billerica, USA |
| Anti-IGF-IR β (C-20) sc-713 | Kaninchen-IgG, polyklonal | Western Blot | Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA |
| Anti-Kaninchen-HRP sc-2004 | Ziege-IgG | Western Blot | Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA |
| Anti-Maus (Alexa Fluor® 488 Conjugate) | IgG (H+L), F(ab) ₂ ' ₂ Fragment | FACS | Cell Signaling Technology, Cambridge, GB |
| Maus Isotyp-Kontrolle sc-2035 | Maus-IgG ₁ | FACS | Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA |

2.2 METHODEN

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Die Arbeiten mit humanen Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank durchgeführt und die Kulturen in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Alle zwei bis drei Tage wurde die Vitalität der Zellen mittels Trypanblaufärbung geprüft und mit einem Hämozytometer gezählt. Dabei wurde 50 µl Trypanblau-Lösung zu 50 µl Zellsuspension gegeben. Da Trypanblau nur die poröse Zellwand toter Zellen durchdringt, konnten so unter dem Mikroskop tote von lebenden Zellen unterschieden werden.

War die Zellkonzentration höher, als die für die jeweilige Zelllinie ideale Konzentration (Tabelle 5), wurde die Zellsuspension mit einer entsprechenden Menge frischen Mediums verdünnt. Für Versuche wurden nur Zellen verwendet, die mindestens dreimal nach dem Auftauen passagiert worden waren und höchstens zwei Monate in Kultur waren. Vor dem Aussäen wurden die Zellen am Vortag passagiert, um ein exponentielles Wachstum und eine hohe Vitalität der Zellen sicherzustellen.

2.2.1.1 Aufreinigung mononukleärer hämatopoetischer Zellen aus dem Knochenmark

Von den im Rahmen der GMALL-Studien behandelten Patient_innen wurde Knochenmark aspiriert und das für diagnostische Untersuchungen nicht genutzte Material für eine Materialbank an eingefrorenen Zellen, RNA- und DNA-Proben gesammelt. Diese Materialbank wurde in der vorliegenden Arbeit für die Untersuchung des Mutationsstatus und der mRNA-Expression von *BCL11b* genutzt. Die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden demnach nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

Um ausschließlich mononukleäre Zellen zu untersuchen, wurden die Knochenmarkaspirate mittels Dichtegradzentrifugation mit „Ficoll“ (Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer) durchgeführt. Dabei wurde das Protokoll des Herstellers verwendet. Um Erythrozyten zu lysieren, wurden die Zellen anschließend in 5-10 ml RCLB-Puffer (RCLB: *red cell lysis buffer*; 155 mM NH₄Cl, 10 mM NH₄HCO₃, and 100 µM EDTA pH 7,4) suspendiert. Die Zellsuspension wurde 5 Minuten inkubiert (Raumtemperatur) und anschließend 1 : 4 mit PBS aufgefüllt und bei 1200 *revolutions per minute* (rpm) bei 4 °C 10 Minuten zentrifugiert. Nach einer Resuspension in einer an die Größe des Zellpellets angepassten PBS-Menge wurden die Zellen am Mikroskop gezählt und entsprechend ihrer Verwendung weiterverarbeitet.

Um CD3⁺- oder CD34⁺-positive Zellen zu selektieren, wurde ein magnetisches Zellsortierungssystem (MACS) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese fünf Minuten bei 800 rpm zentrifugiert, in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert, um Mediumreste und tote Zellen zu entfernen (die adhäsive Zelllinie HeLa wurde vor diesem Waschschrift zunächst mit „Accutase“ in Suspension gebracht). Dann wurde das Zellpellet entsprechend der Zellzahl (ca. $0,5 \cdot 10^7$ Zellen/ml) in einer FKS-Lösung mit 10 % DMSO als Gefrierschutz resuspendiert und je 1 ml in Cryoröhrchen pipettiert. Die Kryoröhrchen wurden in einer Gefrierbox bei -80 °C langsam heruntergekühlt. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden die gefrorenen Zellen ab dem nächsten Tag in einem Tank mit flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zum Auftauen der im Stickstofftank gelagerten Zellen wurden die Cryoröhrchen bei 37 °C im Wasserbad kurz inkubiert und die frisch aufgetauten Zellen in 4 ml FKS transferiert. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 800 rpm (Raumtemperatur) wurden die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt. Diese wurden aufrecht in den Inkubator gestellt (bei Suspensionszellen), bis am nächsten Tag die Zellkonzentration überprüft und korrekt eingestellt wurde.

2.2.1.3 Transiente und stabile Transfektion von Zelllinien durch Nukleofektion

Um einen *Knockdown* von *IGFBP7* durch siRNAs oder eine Überexpression des Gens durch Plasmide zu erreichen, wurden Zellen durch Elektroporation unter Verwendung des „Amaxa“-Systems der Firma Lonza transfiziert. Bei dieser Methode werden durch Elektropulse temporäre Poren in Zell- und Nukleusmembran erzeugt, sodass die verwendeten Nukleinsäuren nicht nur in das Zytoplasma, sondern direkt in den Nukleus der Zellen gelangen. Die genauen jeweiligen Transfektionsbedingungen für jede Zelllinie wurden der Online-Datenbank des Herstellers entnommen (lonza.com, Stand Juni 2011). Zur Überexpression von *IGFBP7* in der Zelllinie Jurkat mittels des pcDNA3.1-Vektors, wurden beispielsweise pro Transfektionsansatz jeweils $1\text{ }\mu\text{g}$ Vektor in Elektroporationsküvetten vorgelegt und $1\text{-}2 \cdot 10^6$ Zellen in $100\text{ }\mu\text{l}$ „Solution V“ resuspendierte Zellen hinzupipettiert. Die Küvetten wurden dann in die Elektroporationsmaschine gestellt und das Programm „S-18“ gestartet. Nach Beendigung der Elektroporation wurde die Zellsuspension vorsichtig in vorgewärmtes Medium in einer 12-Well-Platte transferiert. Die verwendeten Transfektionsbedingungen für jede Zelllinie sind in Tabelle 12 aufgelistet. Für siRNA-Transfektionen wurden $2\text{ }\mu\text{l}$ auf $100\text{ }\mu\text{M}$ verdünnte siRNA pro Ansatz verwendet.

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde jeweils ein Transfektionsansatz mit dem im Amaxa-Kit enthaltenen Plasmid pMAX transfiziert. Es enthält das Gen *Green fluorescent protein (GFP)*, dessen Proteinexpression einen Tag später durchflusszytometrisch gemessen wurde.

Die transfizierten Zellen wurden entweder am nächsten Tag als transient transfizierte Zellen für Versuche ausgesät oder es wurden zunächst durch Selektion mit einem Antibiotikum stabile Klone erzeugt.

Erzeugung von stabilen Expressionsklonen

Der Expressionvektor pcDNA3.1 myc/his C enthält ein Resistenzgen gegen Geneticin/G418. G418 ist ein vom Bakterium *Micromonospora rhodorangea* synthetisiertes Antibiotikum, das an 80S-Ribosomen bindet und so die Proteinbiosynthese inhibiert.

Um stabile Klone aus einzelnen Zellen heranzuziehen, die das Expressionsplasmid erfolgreich in ihr Genom integriert hatten, wurden die Zellen einen Tag nach der Transfektion in frischem Medium mit G418 ausgesät. Die Konzentration von 800 µg/ml G418 ist der in der Arbeitsgruppe allgemein etablierte Wert für die Zelllinien Jurkat, K562 und Molt-4, bei der ca. 99 % der untransfizierten Zellen nach 14 Tagen Inkubationszeit nekrotisch waren. Nachdem die G418-sensitiven Zellen nach zwei Wochen abgestorben waren, wurde die Zellkonzentration bestimmt und die Zellsuspension mit frischem Medium (inklusive G418) auf 15 Zellen pro 1 ml eingestellt. Die Zellen wurden dann in 100 µl pro Well in 96-Well-Platten ausgesät, sodass pro Well durchschnittlich 1,5 Zellen kultiviert wurden. Unter täglicher Kontrolle wurden die Zellen drei Wochen lang kultiviert, bis in einigen Wells G418-resistente Populationen aus einzelnen Zellen herangewachsen waren. Bei anhaltendem Selektionsdruck wurden diese weiter kultiviert, bis genügend Zellen vorhanden waren, um durch Messung der *IGFBP7*-Expression auf mRNA-Ebene die erfolgreiche Integration des Vektors in den einzelnen Klonen zu überprüfen. Die *IGFBP7* überexprimierenden Klone und Kontrollklone mit dem leeren Vektor wurden aliquotiert, eingefroren und bis zu ihrer Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Tabelle 12: Transfektionsbedingungen der verschiedenen Zelllinien, nach Lonza, Basel, CH

| Zelllinie | Solution | Programm |
|-----------|------------|----------|
| Jurkat | Solution V | S-18 |
| Molt-4 | Solution V | C-05 |
| KG1a | Solution L | V-01 |
| K562 | Solution V | T-03 |

2.2.1.4 WST-1-Proliferationsassay

Um die Auswirkung von *Knockdown* und Überexpression von *IGFBP7* in verschiedenen Zelllinien zu bestimmen, wurde ein WST-1-Assay verwendet.

WST-1 (*Water Soluble Tetrazolium salt 1*) ist ein Tetrazoliumsalz, das von mitochondrialen Dehydrogenasen zu Formazan gespalten wird, und dabei seine Farbe ändert. Ein Anstieg in Enzymaktivität führt zu einer größeren Menge Formazan, welches mit der Anzahl an metabolisch aktiven Zellen pro Well korreliert. Der entsprechende Farbumschlag von rot zu gelb kann photometrisch gemessen werden und ist so ein sensibler Indikator für die Viabilität und Proliferation von Zellen.

Für den Versuch wurden Zellen jeweils in Triplikaten in 96-well-Platten ausgesät und bis zum Messzeitpunkt unter Normalbedingungen kultiviert. Bei Versuche wurde je 10 μl WST-1-Reagenz mit 10 μl Medium gemischt und mittels einer 8-Kanal-Pipette zu jedem Well gegeben. Die Platte wurde dann weitere zwei Stunden inkubiert, bevor die optische Dichte jedes Wells bei 450 nm mit einem ELISA-Plattenlesegerät gemessen wurde. 620 nm dienten dabei als Referenzwellenlänge und der Leerwert von Medium ohne Zellen wurde in der weiteren Analyse abgezogen.

Effekt der Auswirkung von IGFBP7-Knockdown

Zur Durchführung des Assays wurden KG1a-Zellen wie beschrieben transient mit siRNAs gegen *IGFBP7* oder einer Kontroll-siRNA gegen *GFP* transfiziert (siehe Absatz 2.2.1.3). Nach 24 Stunden wurden jeweils $2,5 \times 10^4$ transfizierte Zellen pro Well in je 70 μl frischem Medium in Triplikaten ausgesät. An den darauffolgenden beiden Tagen (Tag 1 und 2) wurde pro Well 50 μl Medium vorsichtig von der Oberfläche entnommen und durch 70 μl frisches Medium ersetzt. So sollte bei einem erfolgreichen *Knockdown* von IGFBP7 für eine geringere Konzentration des Proteins im Medium gesorgt werden. Der WST-1 Assay erfolgte jeweils an Tag 0, 2 und 3.

Effekt der Auswirkung von stabiler IGFBP7-Überexpression

Um die Auswirkung von stabiler Überexpression zu bestimmen, wurden je 1×10^5 K562, Jurkat- oder Molt-4-Zellen in 100 μl Medium in Triplikaten in 96-well-Platten ausgesät. Das Medium wurde nicht ausgetauscht, um eine IGFBP7-Anreicherung zu erzielen. Die Messung der Proliferation erfolgte an den Tagen 0 bis 4.

Zytostatikabehandlung

In einem WST-1-Assay wurde die Sensitivität von *IGFBP7*-überexprimierenden Zellen gegenüber verschiedenen, in Chemotherapie-Protokollen zur Behandlung akuter Leukämien verwendeten Zytostatika getestet. Dafür wurden zunächst optimale Konzentrationen der benutzten Wirkstoffe Asparaginase, AraC, Etoposid, Vincristin und des IGF1-R-Inhibitors NVP-AEW541 (AEW541, Novartis) ermittelt. Durch Literaturrecherche wurde jeweils ein *in vitro* verwendeter Konzentrationsbereich ermittelt und dann die jeweilige Zelllinie entsprechend in verschiedenen Konzentrationen des Medikaments ausgesät. Nach 24 und 48 Stunden wurde die Viabilität der Zellen bestimmt. Für nachfolgende Versuche wurde jeweils eine Konzentration mit mittlerer Toxizität verwendet.

2.2.1.5 Durchflusszytometrie

Während andere Proteinquantifizierungsmethoden Durchschnittswerte einer Population von Zellen messen, können, wie in Abbildung 13A dargestellt, bei der Durchflusszytometrie einzelne Zellen auf intra- und extrazelluläre Proteinexpression oder DNA-Gehalt hin untersucht werden. Je nach Gerät können dabei verschieden viele Parameter gleichzeitig

erfasst und Zellen nach ihren Markern hin sortiert werden (*Flourescence activated cell sorting*: FACS).

Das für diese Arbeit verwendete Gerät FACScalibur™ besitzt einen 488 nm Argon-Ionen-Laser, einen 635 nm Helium-Neon-Laser und vier Detektoren für Fluoreszenzparameter. Ihre Anordnung ist in Abbildung 13B dargestellt.

In der „*flow cell*“ des FACS-Gerätes werden die Zellen perlenschnurartig aufgereiht und einzeln an den Lasern vorbeigespült. Das von der Zelle selbst und von fluoreszenzmarkierten Partikeln gestreute Licht enthält Informationen über Partikelgröße und -form, Granularität und Fluoreszenzintensität. Das Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*: FCS) gibt dabei Informationen zur Zellgröße, während das Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*: SSC) die Granularität der Zelle abbildet. Die Messwerte der Detektoren werden digitalisiert und durch die „Cellquest“-Software dargestellt.

Apoptosemessung nach Zytostatikabehandlung durch Annexin-V/7AAD Färbung

Zur Messung von Apoptose wurde das Annexin-V-FITC Kit von BD verwendet. Zellen die sich in der frühen Phase des programmierten Zelltods befinden, exprimieren auf ihrer noch intakten Oberfläche Phosphatidylserine, an die das Protein Annexin-V bindet. Durch die Färbung von Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Annexin-V können so früh-apoptotische Zellen erfasst werden.¹²² Um auch spät-apoptotische Zellen zu registrieren, wurde eine Doppelfärbung mit 7-Aminoactinomycin D (7AAD) durchgeführt. 7AAD gelangt durch die poröse Zellwand nekrotischer Zellen und färbt sie durch Interkalation mit der DNA.

Um den Effekt von Zytostatika auf die Apoptoserate von *IGFBP7*-überexprimierenden Zellen zu messen, wurden 1×10^6 Zellen/ml für 24 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden jeweils in Triplikaten mit den Zytostatika Asparaginase, AraC, Etoposid und Vincristin alleine oder in Kombination mit AEW541, in denen per WST-1-Assay ermittelten optimalen Konzentrationen ausgesät (siehe Absatz 2.2.1.4). Am Endpunkt des Experiments wurden pro Ansatz $1-5 \times 10^5$ Zellen in 5 ml FACS-Röhrchen transferiert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in $100 \mu\text{l}$ „Annexin Binding Buffer“ suspendiert. Nach Zugabe von je $2,5 \mu\text{l}$ Annexin-V-FICT- und 7AAD-Lösung wurden die Proben 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

Zellzyklusanalysen durch Bromdesoxyuridin-Messung

Zur Analyse der Verteilung in Zellzyklusphasen von Zellpopulationen wurde ein Kit von BD nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Bromdesoxyuridin (BrdU) wird dabei unter normalen Kulturbedingungen zur Zellkultur hinzugegeben und Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden, inkorporieren phosphoryliertes BrdU anstelle von Desoxythymidintriphosphat (dTTP) in die neu synthetisierte DNA. Dieses kann später mit einem fluoreszenzmarkiertem Antikörper im FACS-Verfahren nachgewiesen werden. Zusätzlich werden die Zellen auch mit 7AAD gefärbt, welches in DNA interkaliert, um die DNA-Menge der einzelnen Zellen nachweisen zu können. Aus dieser Färbungs-Kombination

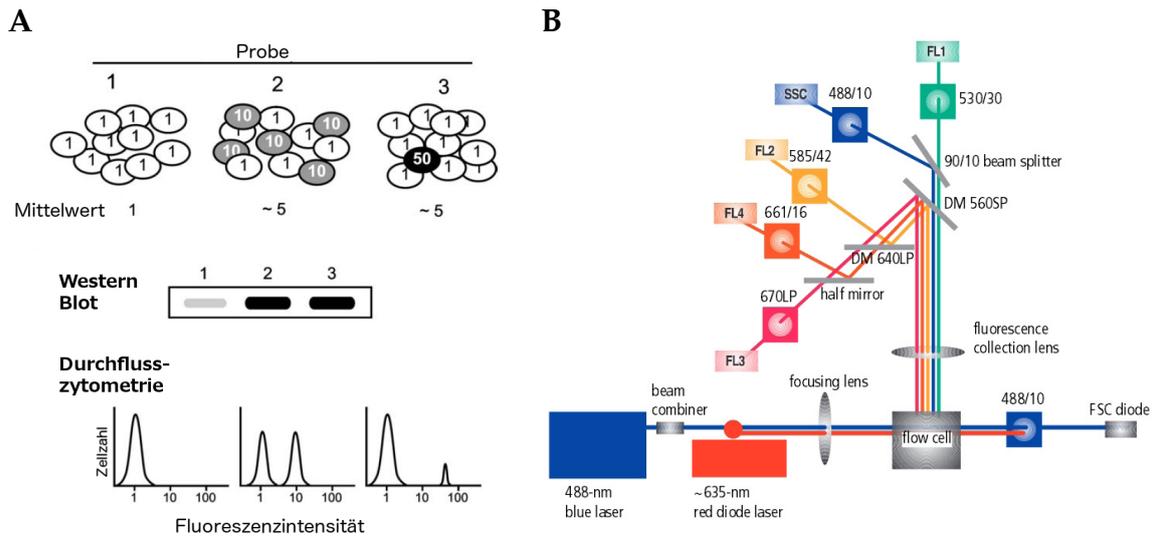


Abbildung 13: Fluoreszenz-Durchflusszytometrie/FACS

A: Vergleich der FACS-Methode mit dem Western Blot-Verfahren (verändert nach Krutzik *et al.*¹²¹)

Während beim Western Blot-Verfahren nur Durchschnittswerte einer Zellpopulation abgebildet werden können, werden bei der Durchflusszytometrie individuelle Zellen analysiert.

B: Aufbau des in dieser Arbeit verwendeten FACSCalibur™ Gerätes. (Quelle: BD,bdbiosciences.com)

In der "flow cell" werden die Zellen perlchnurartig aufgereit und einzeln an den Lasern vorbei gespült. Das von der Zelle selbst und von fluoreszenzmarkierten Partikeln gestreute Licht enthält Informationen über Partikelgröße und -form, Granularität und Fluoreszenzintensität.

FCS: *forward scatter*, Vorwärtsstreulicht; SSC: *side scatter*, Seitwärtsstreulicht

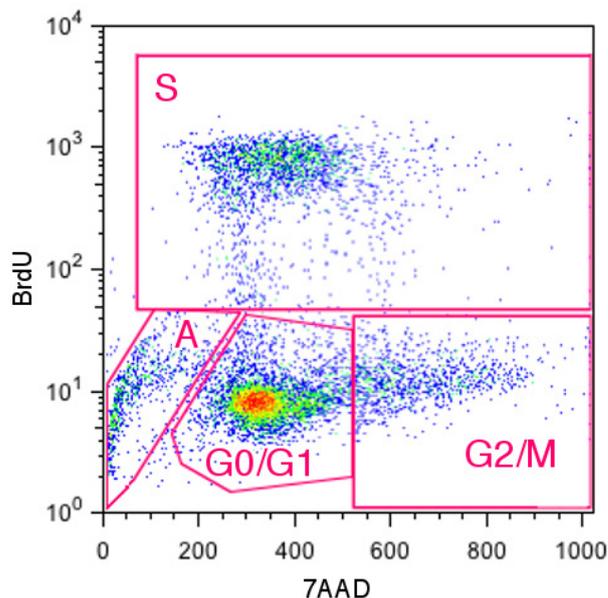


Abbildung 14: FACS-Zellzyklusanalyse mittels BrdU und 7AAD-Färbung

Zellen in der S-Phase bauen BrdU statt Desoxythymidin in die neu-synthetisierte DNA ein und sind durch anschließende Färbung mit einem Fluorophor-konjugiertem Antikörper gegen BrdU in FACS-Analysen identifizierbar. Eine gleichzeitige Färbung mit 7-AAD markiert den DNA-Gehalt der Zellen, so dass sie durch Darstellung in einem „Dot-Blot“-Diagramm nach Zellzyklusphasen unterteilt werden können.

BrDU: Bromdesoxyuridin, 7-AAD: 7-Aminoactinomycin, A: apoptotische Zellen, S: S-Phase, G0/G1: G0/G1-Phase, G2/M: G2/M-Phase

lassen sich, wie in Abbildung 14 beispielsweise dargestellt, alle Zellzyklusphasen ableiten.

Für die BrdU-Färbung wurden Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in Triplikaten ausgesät und nach Ende der jeweiligen Inkubationszeit mit $10 \mu\text{M}$ BrdU versetzt. Nach weiteren vier Stunden Inkubation wurden je $1-5 \times 10^5$ Zellen pro Probe in 5 ml FACS-Glasröhrchen gegeben und nach dem Protokoll des Herstellers fixiert, permeabilisiert und mit einem anti-BrdU-Antikörper und 7AAD gefärbt. Wie in Abbildung 14 ersichtlich, wurden zur Datenanalyse (nach Augenmaß) Abgrenzungs-linien (*gates*) um die einzelnen Zellpopulationen gesetzt, um den Prozentsatz der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen zwischen den Proben vergleichen zu können.

Messung der Expression des Zelloberflächenrezeptors IGF1-R

Um die IGF1-R Expression der *IGFBP7*-überexprimierenden Jurkat- und Molt-4-Zellen zu messen, wurden die Zellen mit einem primären anti-IGF1-R und einem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper gefärbt. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 8 in Abschnitt 2.1.6 beschrieben.

1×10^6 Zellen/ml wurden in Triplikaten in 24-well-Platten ausgesät und unter Normalbedingungen inkubiert. Bei Versuchende, nach vier Tagen, wurden je $1-5 \times 10^5$ Zellen pro Ansatz in 5 ml FACS-Röhrchen transferiert und zweimal mit 2 ml „FACS-Puffer“ (PBS mit 0,5 % Rinderalbumin und 0,05 % Natriumazid) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit dem auf $0,5 \mu\text{g/ml}$ in $50 \mu\text{l}$ PBS verdünnten primären Antikörper eine Stunde bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurde der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper in einer Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ in $50 \mu\text{l}$ PBS hinzugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln gebunden. Nach erneutem Waschschrift erfolgte die FACS-Analyse. In der späteren Datenanalyse wurde die mediane Fluoreszenz-Intensität (MFI) der im FSC/SCC-Streudiagramm als lebend identifizierten Zellen gemessen.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Western Blot

Um die relative Gesamtproteinmenge von IGF1-R in verschiedenen Zellpopulationen vergleichen zu können, wurden die Zellen zunächst lysiert und die denaturierten Proteine dann durch SDS-Gelelektrophorese in einem elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Membran übertragen, um IGF1-R mit Hilfe von konjugierten Antikörpern enzymatisch nachzuweisen.

Im Folgenden werden die verwendeten Protokolle beschrieben.

Aufbereitung der Proben

Zur Herstellung der Zelllysate wurden 5×10^6 Zellen je Ansatz zweimal in PBS gewaschen und

in 500 μ l Lysepuffer (20mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 1 mM NaCl, 1 mM Na₂-EDTA, 1 mM EGTA, 1 % NP-40, 1 % Natriumdeoxycholate, 2,5 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM Na₃VO₄ und Proteaseinhibitor) resuspendiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen anschließend durch hydrodynamisches Scheren mit einer 21-g-Nadel lysiert und bei 15.000 rpm (4 °C) 15 Minuten zentrifugiert. Die lösliche Phase der Lysate wurde in neue Zentrifugationsröhrchen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

Vor der Gelelektrophorese wurden die Zellysate auf Eis aufgetaut, mit 2x Probenpuffer (20 % Glycerin, 100 mM Tris-HCL pH 6,8, 4 % SDS, 200 mM DTT, 0,2 % Bromphenolblau) versetzt und bei 95 °C für fünf Minuten erhitzt, um die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufzubrechen.

SDS-Gelelektrophorese und Proteintransfer

Die Gelelektrophorese erfolgte nach einem Standardprotokoll.¹²³ Für die Auftrennung der Proteine wurde ein 12%-Acrylamidgel verwendet, dessen Zusammensetzung in Tabelle 13 beschrieben ist. Neben den zu untersuchenden Proben wurde eine 10-170-kDa-Proteinleiter als Größenstandard und optische Kontrolle aufgetragen. Die Übertragung der elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran erfolgte über Nacht im Nassblot-Verfahren.

Tabelle 13: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele

| Inhaltsstoff | Trenngel | Sammelgel |
|--------------------|-----------|-----------|
| Polyacrylamid | 12 % | 4 % |
| Tris-Base (pH 8.8) | 375 mM | 125 mM |
| Ammoniumpersulfat | 0,075 % | 0,1 % |
| SDS | 0,1 % | 0,1 % |
| Temed | 0,00075 % | 0,002 % |

Entwicklung

Um die übertragenen Proteine nachzuweisen, wurde die PVDF-Membran erst mit TBST-Puffer (0,04 M Trisbase, 0,3 M NaCl, 0,05 % Tween20) gewaschen und dann mit 3 % Rinderalbumin in TBST-Puffer inkubiert, um unspezifische Bindungen der im nächsten Schritt verwendeten Antikörper zu verhindern. Anschließend wurde die Membran über Nacht mit einem auf 200 ng/ml in TBST-Puffer verdünntem IGF-IR-Antikörper inkubiert und nach weiteren Waschschritten mit einem Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*: HRP)- konjugiertem Sekundärantikörper in 80 ng/ml Verdünnung für 45 Minuten inkubiert. Die Entwicklung erfolgte mit einem Elektrochemilumineszenz (ECL)-System. Die Chemilumineszenz, die bei der Umsetzung des Substrats durch die antikörperkonjugierte Peroxidase entstand, wurde mit einem digitalen Lesegerät detektiert.

Um die verwendete Proteinmenge zu kontrollieren, wurde die Membran mit einem

Stripping-Puffer von Antikörpern befreit. Danach wurde die Membran für 45 Minuten mit einem β -Aktin-Antikörper (80 ng/ml) inkubiert. β -Aktin ist essenzieller Teil des Zytoskeletts aller humanen Zellen und relativ gleichmäßig exprimiert, sodass es als Referenz verwendet werden kann. Die Entwicklung erfolgte wie oben beschrieben.

2.2.2.2 Messung von IGFBP7-Proteinkonzentration

IGFBP7 ist ein sezerniertes Protein, das im Mediumüberstand von Zellkulturen detektierbar ist. Um die genaue Proteinkonzentration zu bestimmen, wurde ein *sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) verwendet.

Zu analysierende Mediumüberstände wurden von Zellen isoliert, die in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in Triplikaten ausgesät und vier Tage inkubiert worden waren. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 1000 rpm wurde der Überstand mit Proteinaseinhibitor versetzt und bei -80°C gelagert.

96-well-Platten, die mit einem anti-IGFBP7-Antikörper vorbeschichtet waren, wurden von Antigenix America erworben. Der ELISA wurde nach verändertem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurde mit im Kit enthaltenem rekombinantes IGFBP7 eine Standardreihe von 100 bis 1,56 ng/ml durch sechs 1:2 Verdünnungen (mit PBS, 0,1 % Rinderalbumin) hergestellt.

Die vorbeschichteten Platten wurden in PBS mit 0,05 % Tween20 gewaschen und jeweils 100 μl der auf Eis aufgetauten Mediumüberstände und die Standardreihe in die entsprechenden Wells pipettiert. Während einer zweistündigen Inkubationszeit band das in den Proben gelöste IGFBP7 an die Antikörperbeschichtung am Boden der Wells. Im nächsten Schritt wurden die Platten gewaschen, um Mediumreste zu entfernen und ein biotinylierter *Tracer*-anti-IGFBP7-Antikörper hinzugegeben. Dieser band während weiteren zwei Stunden an das bereits gebundene IGFBP7 und bildete so einen „Sandwich“. Nach erneutem Waschen der Platte wurden dann HRP-konjugierte Streptavidin-Kügelchen hinzugegeben. Diese banden mit hoher Affinität an das Biotin des *Tracer*-Antikörpers. Dazugegebenes Substrat wurde von der Peroxidase umgesetzt und verfärbte sich proportional zur HRP-Menge, und damit proportional zur Menge IGFBP7 pro Well. Um die Reaktion zu stoppen wurden nach 10-20 Minuten 100 μl 1 M H_2SO_4 hinzupipettiert und die Platte im ELISA-Plattenlesegerät bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen.

Durch die OD-Werte der Standardreihe konnte die IGFBP7-Konzentration in den gemessenen Proben berechnet werden.

2.2.3 Molekulargenetische Methoden

2.2.3.1 Isolation von Nukleinsäuren aus humanen Zellen

Die RNA und DNA-Isolation der für die *BCL11b*-Analysen verwendeten Patient_innenproben erfolgte nicht im Rahmen dieser Arbeit, sondern routinemäßig bei Entnahme von Patient_innenmaterial. Es wurde das TRIzol-Reagenz nach Angaben des Herstellers verwendet, um eine möglichst große Ausbeute zu erreichen.¹²⁴

Zur Expressionsmessung von *IGFBP7* und *IGF1R* auf mRNA-Ebene in Zelllinien wurden Zellen mit *QIAshredder*-Säulen homogenisiert und RNA durch das *RNeasy Mini Kit* aufgereinigt. Es wurde sich an das Protokoll des Herstellers gehalten, bis auf eine Verlängerung des DNA-Verdaus durch DNase-I-Behandlung mit dem *RNase-free DNase Sets* auf 30 Minuten, um sicherzugehen, dass die verwendeten Überexpressionsplasmide vollkommen entfernt waren und nachfolgende Analysen nicht beeinflussen würden.

Die Messung der RNA und DNA-Konzentration erfolgte spektrometrisch mit einem Nanodrop-Gerät.

2.2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifizierung bestimmter DNA-Sequenzen wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Die in Tabelle 10 aufgelisteten PCR-Primer wurden mit dem Programm Primer3 entworfen.

Tabelle 14 stellt die die Bedingungen für Standard-PCRs dar. Die jeweilige *Annealing*-Temperatur wurde jeweils nach Durchführung einer Gradienten-PCR angepasst.

Tabelle 14: Standard-PCR-Bedingungen

| Inhalt | Menge (μ l) | Endkonzentration |
|----------------------------------|------------------|------------------|
| H ₂ O | 27 | |
| dNTP-Mix (je 10 mM) | 0,5 | je 0,1 mM |
| Puffer 10x | 5 | 1x |
| Solution Q | 10 | |
| Taq-Polymerase | 0,5 | |
| Primer forward (10 μ M) | 2,5 | 0,5 μ M |
| Primer reverse (10 μ M) | 2,5 | 0,5 μ M |
| Template DNA (50 ng/ μ l) | 2 | |

| PCR-Schritt | Temperatur | Dauer |
|---------------|------------|--------|
| Denaturierung | 95 °C | 15 min |
| Denaturierung | 94 °C | 15 sec |
| Annealing | ca. 60 °C | 25 sec |
| Elongation | 72 °C | 15 sec |
| Elongation | 72 °C | 10 min |
| Hold | 4 °C | |

40 PCR-Zyklen

Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Um die Expression von mRNA zu messen, wurde die isolierte RNA zunächst von einer reversen Transkriptase in stabilere *complementary DNA* (cDNA) umgeschrieben. Ein Oligo dT20 Primer band an den Poly-A-Schwanz der mRNAs, sodass nur diese von der Reversen Transkriptase umgeschrieben wurden.

Es wurden zwei verschiedene Assays verwendet, um mRNA-Expression quantitativ zu bestimmen: Bei der „Taqman“-Methode werden im selben Reaktionsgefäß zwei PCRs gleichzeitig durchgeführt. Durch die zusätzliche Verwendung von Probes, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, können beide PCRs unabhängig voneinander gemessen werden. So kann die Expression des *gene of interest* (gemessenes Gen, GOI) mit der eines immer gleich exprimierten Standards, dem *housekeeping gene* (Haushaltsgen, HK), verglichen werden.

Bei der „SYBR Green“-Methode dagegen findet jeweils nur eine PCR pro Reaktionsgefäß statt, sodass der Vergleich des GOI mit dem HK von Pipettierungenauigkeiten beeinflusst wird. Der Fluoreszenz-Farbstoff SYBR Green bindet dabei die amplifizierte DNA und ihr exponentieller Zuwachs mit jedem PCR-Zyklus kann so gemessen werden. Die genauen Bedingungen der beiden Assays sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Tabelle 15: Zusammensetzung und Bedingungen von qRT-PCR-Reaktionen

| REVERSE TRANSKRIPTION | | | THERMOCYCLER-PROGRAMM | | |
|-----------------------|----------|------------------|-----------------------|------------|--------|
| Inhalt | Menge | Endkonzentration | PCR-Schritt | Temperatur | Dauer |
| H ₂ O | ad 40 µl | | Synthese | 37 °C | 60 min |
| MMLV RT (200 U/µl) | 1 µl | 5 U/µl | Inaktivierung | 85 °C | 5 min |
| RNAse-Inhibitor | 1 µl | 1 U/µl | Hold | 4 °C | |
| dNTP-Mix (je 10 mM) | 4 µl | 1 mM | | | |
| dT20 Primer | 4 µl | 1 µM | | | |
| Puffer (10x) | 4 µl | 1x | | | |
| Template RNA | 1000 ng | | | | |

| TAQMAN-ASSAY | | | THERMOCYCLER-PROGRAMM | | |
|--------------------|------------|------------------|---------------------------|---------------|--------|
| Inhalt | Menge (µl) | Endkonzentration | PCR-Schritt | Temperatur | Dauer |
| H ₂ O | 3,25 | | Denaturierung | 95 °C | 3 min |
| IQ-Mix | 12,5 | | Denaturierung | 95 °C | 15 sec |
| HK- forward Primer | 1,5 | 0,6 µM | Annealing / Elongation | 60 °C | 1 min |
| HK reverse Primer | 1,5 | 0,6 µM | | 50 PCR-Zyklen | |
| HK Probe | 0,63 | 0,25 µM | | | |
| GOI forward Primer | 1,5 | 0,6 µM | | | |
| GOI reverse Primer | 1,5 | 0,6 µM | | | |
| GOI Probe FAM | 0,63 | 0,25 µM | | | |
| Template cDNA | 2 | | | | |

| SYBR GREEN-ASSAY | | | THERMOCYCLER-PROGRAMM | | |
|-----------------------|-------------------------|-------------------|--------------------------|------------|--------|
| Inhalt | Menge (μl) | Endkonzentration | PCR-Schritt | Temperatur | Dauer |
| H ₂ O | 10 | | Denaturierung | 95 °C | 15 sec |
| SYBR Green Master Mix | 12,5 | | Annealing/ Elongation | 60 °C | 1 min |
| Forward Primer | 0,25 | 0,1 μM | 50 PCR-Zyklen | | |
| Reverse Primer | 0,25 | 0,1 μM | | | |
| Template cDNA | 2 | | | | |

Die Berechnung von relativen Expressionswerten fand durch die „vergleichende Schwellenwert-Methode“ statt bei der ein Zyklus-Schwellenwert (*cycle threshold*: CT) im linearen Zuwachsbereich des GOI und HK bestimmt, voneinander subtrahiert (ΔCT) und als $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Wert ausgedrückt wird.¹²⁵

2.2.3.3 Mutationsanalysen

Die Suche nach möglichen Mutationen von *BCL11b* bei T-ALL- und ETP-ALL-Proben wurde auf Exon 4 limitiert. Es wurde sich für die Auswahl dieser Region entschieden, da bei pädiatrischen Kohorten zuvor fast ausschließlich hier Mutationen gefunden wurden, und sich alle funktionell wichtigen Zinkfinger-Domänen in diesem Exon befinden.^{69,70} Zunächst wurde eine PCR mit zwei Primerpaaren durchgeführt (Tabelle 10), die PCR-Produkte durch eine Gelelektrophorese kontrolliert und anschließend an die Firma Dr. Meixner GmbH (Chausseestraße 117, 10115 Berlin) geschickt. Hier erfolgte ihre Aufreinigung und Sequenzierung nach Sanger. Die Auswertung der Sequenzen wurde im Rahmen der Arbeit zu der vorliegenden Dissertation mit der Software Geneious vorgenommen.

2.2.3.4 Gelelektrophorese

Die Sichtbarmachung von DNA-Fragmenten nach PCRs oder Restriktionsverdau erfolgte durch eine Standard-Gelelektrophorese. Hier wurde, je nach Größe des Fragments, ein 1-2 %-Agarosegel verwendet, das mit Ethidiumbromid gefärbt wurde.

2.2.3.5 Klonierung der Überexpressionsvektoren

Um *IGFBP7* in den Überexpressionsvektor pcDNA3.1 myc/his C zu klonieren, wurde die *IGFBP7*-cDNA (NM_001553.1) Sequenz durch eine PCR vervielfältigt (Abschnitt 2.2.3.2) und nach Angaben des Herstellers in den „pCR™2.1-TOPO®“-Vektor eingebracht. Nach Anreicherung des Plasmids in *E. coli* wurde die Insert-Sequenz mit Restriktionsenzymen ausgeschnitten, durch Gelaufreinigung isoliert und in den Zielvektor kloniert. Durch Restriktionsverdau und Sequenzierung (Firma Dr. Meixner GmbH; Chausseestraße 117, 10115

Berlin) wurde das Überexpressionskonstrukt vor der Verwendung für funktionelle Versuche kontrolliert. Der Ablauf der Klonierung ist in Abbildung 15 dargestellt; die einzelnen Methoden werden im Folgenden beschrieben. Der fertige Überexpressionsvektor wird in dieser Arbeit als „**pIGFBP7**“ bezeichnet, der leere Kontrollvektor (pcDNA3.1 myc/his C) als „**pCntrl**“.

Transformation von E. coli

Die Anreicherung von Plasmiden erfolgte mit dem kompetenten *E. coli* Stamm „One Shot® TOP10“, der von Invitrogen erworben wurde. Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen in LB-Agar und LB-Medium bei 37 °C.¹²⁶

Die chemisch kompetenten Bakterien wurden mittels Hitzeschocks transformiert: Ein Röhrchen One SHOT TOP10 *E. coli* wurde pro Ansatz auf Eis aufgetaut, 1 µl Plasmid hinzugefügt, vorsichtig durch Schwenken gemischt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Für den Hitzeschock wurden die Bakterien 45 Sekunden bei 42 °C in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien weitere 2 Minuten auf Eis inkubiert und danach 250 µl S.O.C.-Medium von Invitrogen dazugegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C im Schüttler wurden 100 µl der Bakteriensuspension auf einer LB-Agarplatte mit 50 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C gelagert.

Isolation von Plasmiden aus Bakterien

Um eine Startkultur herzustellen, wurden Kolonien von einer Agarplatte isoliert und in je 3 ml selektives LB-Medium überführt. Nachdem die Bakterien eine Nacht gewachsen waren, wurden 2 ml verwendet, um das Plasmid zu überprüfen. Die Isolation erfolgte mit einem Miniprep-Kit nach dem Protokoll des Herstellers.

War die im nächsten Abschnitt beschriebene Kontrolle des Plasmids positiv, wurden die restlichen 1 ml Startkultur verwendet um 250 ml LB-Medium zu beimpfen und über Nacht wachen zu lassen. Unter Verwendung des Maxiprep-Kits erfolgte dann die Isolation größerer Mengen Plasmids. Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte spektrometrisch mit einem Nanodrop-Gerät. Das Plasmid wurde anschließend auf 1 µg/ml mit ddH₂O verdünnt, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau von Plasmiden erfolgte mit dem Enzym EcoR1 unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen. War die *IGFBP7*-Sequenz erfolgreich in den Vektor integriert, war es in der anschließenden Gelelektrophorese sichtbar. Als Kontrolle wurde der leere Vektor mitgeführt.

Gelaufreinigung

Zur Isolation des aus dem Topo-Vektor mit Restriktionsenzymen herausgeschnittenen *Inserts* wurde nach einer Agarose-Gelelektrophorese das entsprechende Gelstück aus dem Gel entnommen und mit einem „Gel and PCR Clean-up“-Kit nach Anweisungen des Herstellers aufgereinigt.

Ligation

Die Ligation des *Inserts* in den pcDNA3.1-Vektor erfolgte mit einer T4-DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers. Der Vektor war zuvor durch Restriktionsverdau (EcoR1) linearisiert worden.

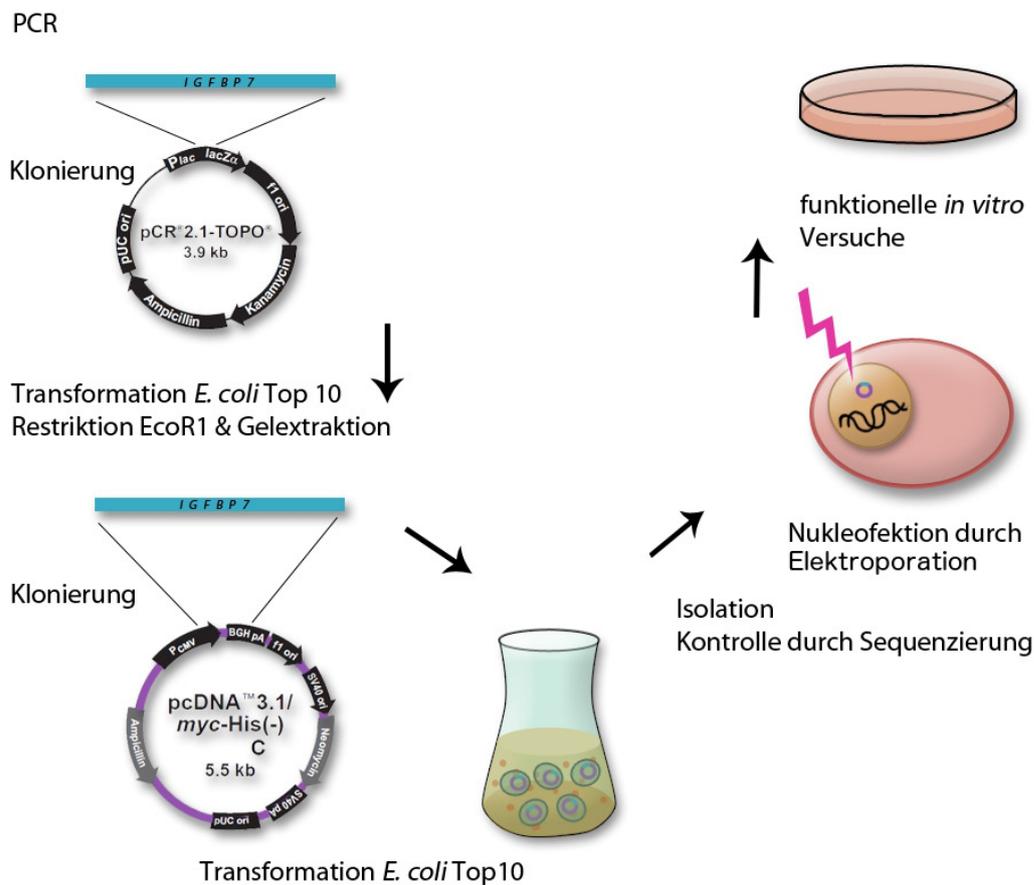


Abbildung 15: Klonierungsstrategie des *pcDNA3.1-IGFBP7* Überexpressionskonstrukts

2.2.4 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Graphpad-Prism-Software. Um signifikante Unterschiede zwischen unabhängigen Gruppen von Messwerten zu identifizieren, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurde verwendet um zwei Gruppen mit gepaarten Werten miteinander zu vergleichen. Kaplan-Meier-Analysen zum Vergleich von Überlebensdaten verschiedener Patient_innen-Gruppen wurden im GMALL-Zentrum in Frankfurt erstellt und statistische Signifikanzen mit dem Lok-Rank-Test ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 ERGEBNISSE TEIL I:

EXPRESSION UND MUTATION VON *BCL11B* IN ADULTER T-ALL

Um die Bedeutung einer eventuellen Deregulation von *BCL11b* in der T-ALL zu untersuchen, wurden zunächst Expressions- und Mutationsanalysen bei Proben von 264 adulten Patient_innen durchgeführt und die entsprechenden Ergebnisse dann mit vorhandenen klinischen und molekulargenetischen Datensätzen in Kontext gesetzt.

3.1.1 *BCL11b* wird in adulter T-ALL heterogen exprimiert

Die *BCL11b*-mRNA-Expression wurde durch eine qRT-PCR bei 262 Proben mit ausreichendem Material verschiedener immunphänotypischer T-ALL-Subtypen bestimmt. Die Expressionswerte wurden relativ zu der internen Kontrolle *Glucose-6-phosphat-Isomerase* (*GPI*) als $2^{-\Delta CT}$ dargestellt.

Zum Vergleich mit der gesunden Hämatopoese wurden zudem Zellen gesunder Personen untersucht. In den hämatopoetischen CD34⁺-Vorläuferzellen und unselektiertem Knochenmark (KM) war *BCL11b* nicht detektierbar, während eine vergleichsweise hohe Expression in reifen CD3⁺-T-Zellen gemessen wurde (Spannbreite: 1,7 – 3,0; Median: 2,5; $P < 0,001$ vs. KM und CD34⁺).

In der T-ALL-Kohorte zeigte sich ein aberrantes und sehr heterogenes Expressionsmuster, das mit dem Immunphänotyp der Proben assoziiert war. Die *BCL11b*-Expression der immunphänotypisch sehr frühen ETP-ALL war niedrig (Spannbreite: 0,0 - 1,4; Median: 0,1) und bei der restlichen T-ALL-Kohorte im Median höher und heterogener (Spannbreite: 0,0 - 12,3; Median: 0,5; $P < 0,001$; Abbildung 16A). Bei Auftrennung letzterer in frühe, thymische und reife T-ALL zeigte sich eine signifikant niedrigere Expression bei früher (Spannbreite: 0,0 - 7,6; Median: 0,3) als bei reifer (Spannbreite: 0,0 - 9,7; Median: 0,6; $P = 0,03$) und thymischer T-ALL (Spannbreite: 0,0 - 12,3; Median: 0,6; $P < 0,001$; Abbildung 16B).

Zur weiteren Analyse der Korrelation von *BCL11b*-Expression mit molekulargenetischen und klinischen Daten wurde die T-ALL-Kohorte in eine *BCL11b*-niedrige und eine *BCL11b*-hohe Gruppe unterteilt. Da dies die erste derartige Untersuchung einer größeren T-ALL-Patient_innenkohorte darstellte, war es nicht möglich sich für einen Schwellenwert an vorherigen Studien zu orientieren. Auch gesundes Knochenmark konnte nicht als Richtwert dienen, da *BCL11b* hier nicht exprimiert wurde. Daher wurden die Proben explorativ in *BCL11b*-Expressionsquartile unterteilt (Q1-Q4) und das niedrigste Expressionsquartil (Q1) als „*BCL11b*-niedrig“ und die restlichen Proben (Q2-4) als „*BCL11b*-hoch“ definiert.

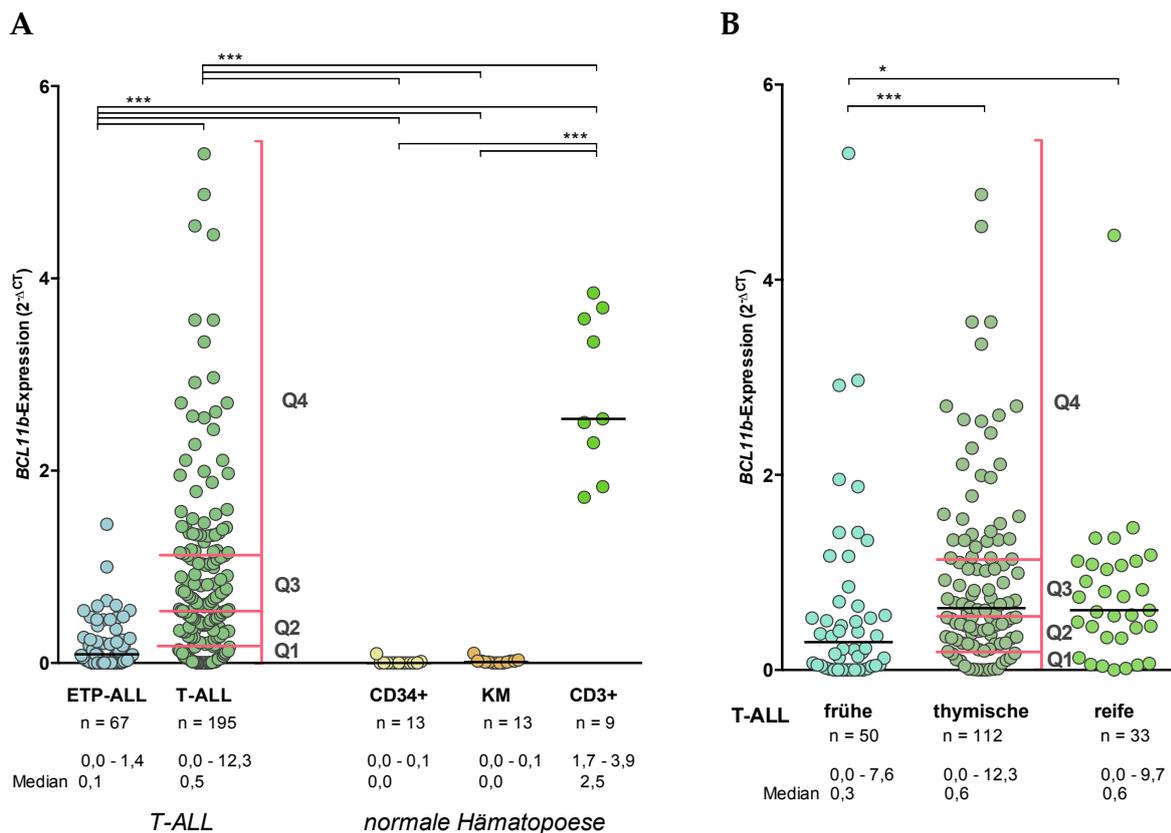


Abbildung 16: *BCL11b*-Expression in T-ALL-Patient_innenproben und Zellpopulationen normaler Hämatopoese

Gemessen durch eine qRT-PCR und als $2^{-\Delta CT}$ mit *GPI* als interner Kontrolle dargestellt.

A: Die T-ALL-Kohorte zeigte heterogenes Expressionsmuster mit einer niedrigeren Expression in ETP-ALL-Patient_innen als bei immunphänotypisch-reiferen T-ALL-Patient_innen. Keine Expression war in stammzellnahen CD34⁺-Zellen und unselektiertem Knochenmark gesunder Kontrollpersonen messbar. Reife CD3⁺-Zellen exprimierten *BCL11b* dagegen hoch.

Für weitere Analysen wurden die T-ALL-Proben anhand von Quartilen (Q1-Q4) in *BCL11b*-niedrig (Q1) und *BCL11b*-hoch (Q2-4) geteilt.

B: Die 195 T-ALL-Patient_innen aufgegliedert nach immunphänotypischem T-ALL Subtyp: Adulte T-ALL-Patient_innen mit frühem T-ALL-Immunphänotyp exprimierten *BCL11b* geringer als die thymische oder reife T-ALL-Subgruppe

Vier Messwerte wurden nicht im Diagramm dargestellt, aber in die statistische Analyse eingeschlossen.

KM = Knochenmark, * $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,001$ (Mann-Whitney-U-Test)

3.1.2 Untersuchung von *BCL11b*-Expression in Bezug auf molekulare und klinische Charakteristika

Für die Analyse in Bezug auf verschiedene klinische und molekulare Faktoren wurde die *BCL11b*-niedrig- (n = 49; 0 - 0,2) mit der *BCL11b*-hoch-Patient_innengruppe (n = 146; > 0,2 - 12,3) verglichen.

Bei Vergleich der klinischen Patient_innendaten unterschieden sich die *BCL11b*-Expressionsgruppen nicht in der Verteilung von Geschlecht oder Alter, allerdings wiesen in der *BCL11b*-niedrig-Gruppe mehr Patient_innen eine niedrige Leukozytenzahl (62 % vs. 18 % < 30.000 x 10⁹/l Leukozytenzahl; P = 0,01) auf. Kein Unterschied bestand für das Induktionstherapieansprechen der Patient_innen. In Tabelle 16 sind die klinischen Charakteristika der 169 Patient_innen mit ausreichenden Datensätzen zusammengefasst.

In vorherigen Untersuchungen wurden die verwendeten GMALL 06/99 und 07/03 Patient_innenkollektive bereits auf eine Vielzahl verschiedener T-Zell- und leukämiespezifische Gene untersucht.^{32,34,111,118} Die entsprechende Datenbank wurde für die Untersuchung der Relevanz der ermittelten *BCL11b*-Expression herangezogen

Während *IGFBP7* in *BCL11b*-niedrig-Patient_innen hoch exprimiert war (P = 0,02), bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Expression von weiteren beschriebenen negativen Prognosefaktoren wie *BAALC*, *ERG* und *WT1*. *GATA3*, ein Transkriptionsfaktor, der in der DN1-Phase normaler T-Zellentwicklung hochreguliert wird, war in der *BCL11b*-niedrig-Gruppe signifikant schwächer exprimiert (Median: 2,1 vs. 5,7; P < 0,001).⁷ Die Frequenz von TCR-Rekombinationen war signifikant geringer in der *BCL11b*-niedrig-Gruppe im Vergleich zu der *BCL11b*-hoch-Gruppe (50 % vs. 80 %; P = 0,01). Es bestand kein Unterschied in der Frequenz von *NOTCH1*- oder *WT1*-Mutationen (Tabelle 17).

3.1.3 *BCL11b*-Expression ist in adulter T-ALL mit Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert

In der GMALL-Studienzentrale in Frankfurt werden klinische Verlaufsuntersuchungsdaten der Patient_innen gesammelt und analysiert. Hier fand eine Untersuchung des Therapieansprechens und der Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf *BCL11b*-Expression statt.

Während die *BCL11b*-niedrig- und die *BCL11b*-hoch-Patient_innengruppen keinen Unterschied in ihrem Ansprechen auf die Induktionstherapie zeigten, war die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit nach fünf Jahren in der *BCL11b*-niedrig-Gruppe signifikant geringer (Q1: n = 40, 35 %; Q2-4: n = 129, 53 %; P = 0,02; Abbildung 17A). Eine Abhängigkeit der *BCL11b*-Expressionswerte und dem Überleben der Patient_innen wurde ist

Tabelle 16: Klinische Charakteristika der GMALL T-ALL-Patient_innen mit ausreichenden Datensätzen in Bezug auf *BCL11b*-Expression

| Charakteristika | <i>BCL11b</i> -niedrig Q1 | <i>BCL11b</i> -hoch Q2-4 | P-Wert |
|--------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------|
| n | 40 | 129 | |
| <i>BCL11b</i> -Expression | | | |
| Median | 0,1 | 0,8 | |
| Spannweite | 0 - 0,2 | > 0,2 - 12,3 | |
| Alter | | | n.s. |
| 15-35 Jahre | 27 | 70 | |
| 36-55 Jahre | 13 | 48 | |
| 56-65 Jahre | 0 | 11 | |
| Geschlecht | | | n.s. |
| weiblich | 20 % | 26 % | |
| Leukozytenzahl, x 10 ⁹ /l | | | 0,01 |
| < 30,000 | 24 | 42 | |
| 30-100,000 | 10 | 53 | |
| >100,000 | 5 | 30 | |
| T-ALL-Subtyp | | | 0,01 |
| Frühe n (%) | 17 (42) | 23 (18) | |
| Reife n (%) | 5 (13) | 22 (17) | |
| Thymische n (%) | 18 (45) | 84 (65) | |
| Ansprechen auf Induktionstherapie | | | n.s. |
| CR n (%) | 37 (95) | 115 (94) | |
| FT n (%) | 1 (3) | 3 (2) | |
| Therapieversagen n (%) | 1 (3) | 5 (4) | |

Abkürzungen: CR = *complete remission*, komplette Remission; FT = früher Tod

Tabelle 17: Molekulargenetische Charakteristika der GMALL T-ALL-Patient_innen in Bezug auf *BCL11b*-Expression

| Charakteristika | | <i>BCL11b</i> -niedrig Q1 | <i>BCL11b</i> -hoch Q2-4 | P-Wert |
|----------------------------|---------------------|------------------------------|-----------------------------|--------|
| n | | 49 | 146 | |
| Genexpression mRNA | | | | |
| <i>IGFBP7</i> | n | 48 | 141 | 0,02 |
| | Median | 1,4 | 0,5 | |
| | Spannweite | 0 - 45,3 | 0 - 79,1 | |
| <i>BAALC</i> | n | 34 | 130 | n.s. |
| | Median | 0,1 | 0,1 | |
| | Spannweite | 0 - 7,2 | 0 - 160,3 | |
| <i>ERG</i> | n | 45 | 124 | n.s. |
| | Median | 6,1 | 7,3 | |
| | Spannweite | 0 - 62,7 | 0 - 136,7 | |
| <i>WT1</i> | n | 49 | 135 | n.s. |
| | Median | 0 | 0 | |
| | Spannweite | 0 - 0,4 | 0 - 1,5 | |
| <i>GATA3</i> | n | 28 | 74 | < 0,01 |
| | Median | 2,1 | 5,7 | |
| | Spannweite | 0,1 - 15,6 | 0,2 - 42,7 | |
| Mutationen | | | | |
| <i>WT1</i> | | | | |
| | mut / gesamt (%) | 8 / 49 (16) | 16 / 146 (11) | n.s. |
| <i>NOTCH1</i> | | | | |
| | mut / gesamt (%) | 10 / 18 (56) | 43 / 67 (64) | n.s. |
| TCR-Rekombinationen | | | | |
| | klonal / gesamt (%) | 16 / 32 (50) | 44 / 55 (80) | 0,01 |

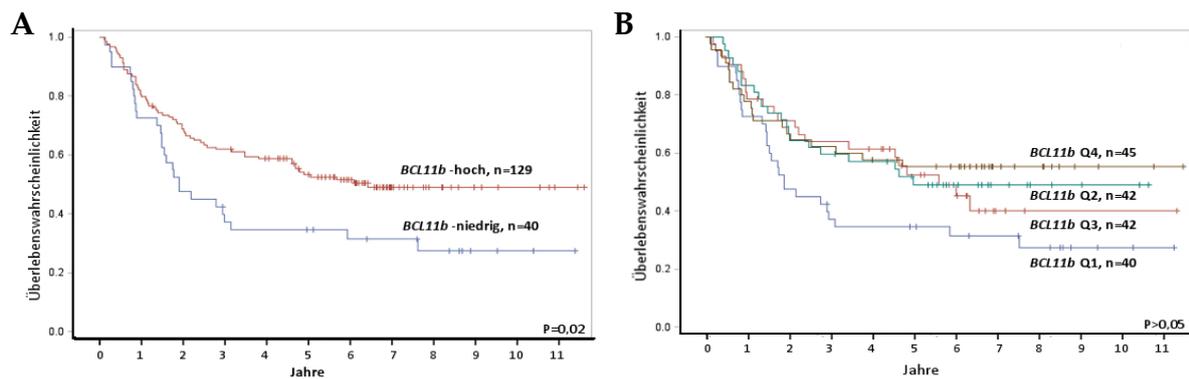


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens von T-ALL-Patient_innen in Bezug auf *BCL11b* mRNA-Expression

A: T-ALL-Patient_innen in der *BCL11b*-niedrig-Gruppe zeigten eine signifikant schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit als Patient_innen mit hoher *BCL11b*-Expression ($P = 0,02$).

B: Die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit der T-ALL-Kohorte bei Aufteilung in einzelne Expressions-Quartile (nach fünf Jahren: Q1: $n = 40$, 35%; Q2: $n = 42$, 52 %; Q3: $n = 42$, 52 %; Q4: $n = 45$, 55 %)

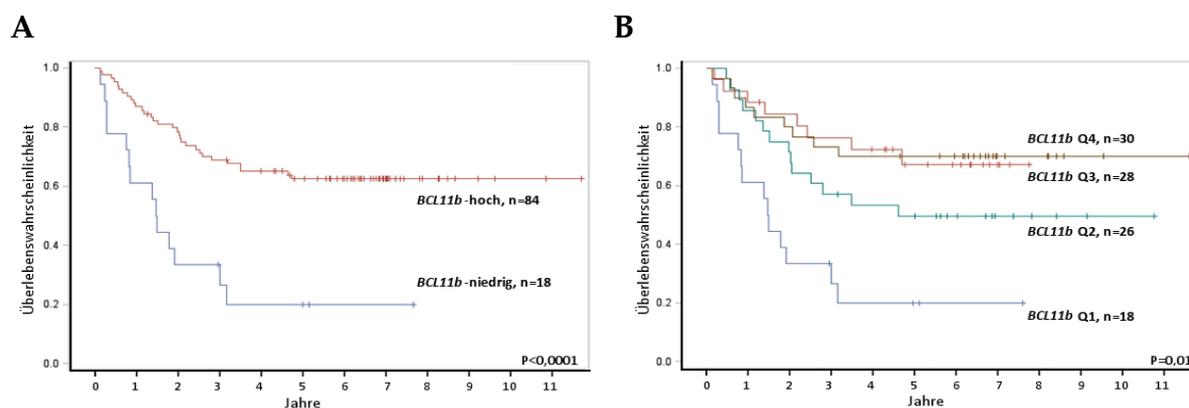


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens thymischer T-ALL-Patient_innen in Bezug auf *BCL11b*-mRNA-Expression

A: Thymische T-ALL Patient_innen in der *BCL11b*-niedrig-Gruppe zeigten eine signifikant niedrigere Überlebenswahrscheinlichkeit als Patient_innen mit hoher *BCL11b*-Expression ($P < 0,001$).

B: Die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit der thymischen T-ALL-Kohorte bei Aufteilung in einzelne Expressionsquartile (nach fünf Jahren: Q1: $n = 18$, 20 %; Q2 $n = 26$, 67 %, Q3 $n = 18$, 50 %; Q4 $n = 30$, 70 %; $P = 0,01$)

auch bei einem Vergleich der separaten Expressionsquartile erkennbar (Q1: n = 40; 35 %; Q2: n = 42; 52 %; Q3: n = 42; 52 %; Q4: n = 45, 55 %; nicht signifikant; Abbildung 17B).

3.1.4 Niedrige *BCL11b*-Expression identifiziert Hochrisiko-patient_innen innerhalb der thymischen T-ALL

Die Patient_innen mit thymischer T-ALL, die zuvor anhand ihres Immunphänotyps als Standardrisiko eingestuft und behandelt worden waren, wurden separat analysiert. Hier zeigte sich ein noch stärkerer Zusammenhang zwischen *BCL11b*-Expression und Überlebenswahrscheinlichkeit.

Weniger thymische T-ALL-Patient_innen der *BCL11b*-niedrig-Gruppe verblieben nach fünf Jahren in kontinuierlicher vollständiger Remission im Vergleich zu *BCL11b*-hohen thymischen T-ALL-Patient_innen (Q1: n = 15, 38 %; Q2-4: n = 78, 72 %; P = 0,02). Nur 20 % der Patient_innen der *BCL11b*-niedrig-Gruppe (n = 18) waren nach fünf Jahren noch am Leben, während es 62 % in der *BCL11b*-hoch-Gruppe (n = 84; P < 0,001; Abbildung 18A) waren. Auch bei weiterer Differenzierung in separate Expressionsquartile war dieser Zusammenhang zwischen niedriger *BCL11b*-Expression und geringerer Überlebenswahrscheinlichkeit in der thymischen T-ALL signifikant (Q1: n = 18, 20 %; Q2 n = 26, 67 %, Q3 n = 18, 50 %; Q4 n = 30, 70 %; P = 0,01; Abbildung 18B).

3.1.5 *BCL11b*-Mutationen in der adulten T-ALL

Von 178 T-ALL- und 68 ETP-ALL-Proben war genügend DNA-Material vorhanden, um eine Sanger-Sequenzierung des Exon 4 von *BCL11b* durchzuführen. Die Sequenzierung des PCR-Produktes erfolgte extern durch die Firma Dr. Max Meixner GmbH, die Auswertung wurde selber durchgeführt.

Dabei wurden in der ETP-ALL-Kohorte bei zwei (3 %) und in der T-ALL-Kohorte bei 24 (14 %) Patient_innen proteinverändernde Modifikationen gefunden. Bei den beiden Mutationen der ETP-ALL-Kohorte handelte es sich um Punktmutationen, die durch den Austausch einzelner Basenpaare zu Veränderungen der Aminosäuresequenz führten. Eine Patientin der T-ALL-Kohorte besaß zwei Mutationen. 16 der Aberrationen waren ebenfalls Punktmutationen, die Veränderungen der Aminosäuresequenz zur Folge hatten. Bei drei Patient_innen führte eine Punktmutation zu einem Translationsstopp. Sieben Patient_innen besaßen Deletionen und zwei Insertionen, die jeweils eine Verschiebung des Leserasters bewirkten. 22 der insgesamt 26 Mutationen beider Kohorten befanden sich entweder innerhalb von Zinkfingermotiven oder beeinflussten diese durch Leserasterverschiebungen (Tabelle 18 und Abbildung 19A).

Fast alle der betroffenen Patient_innen der T-ALL-Kohorte befanden sich in der *BCL11b*-hoch-Expressionsgruppe (n = 22/23; P = 0,01) und es wurde ein Zusammenhang zwischen T-ALL-Immunphänotyp und Mutationsfrequenz deutlich. So hatte nur eine Patientin der

frühen T-ALL-Subgruppe eine *BCL11b*-Exon-4-Mutation, während 21 der 24 Patient_innen mit Mutationen Teil der thymischen Subgruppe waren (86 %; $P = 0,03$).

Bei der Untersuchung von molekularen und genetischen Charakteristika wurde eine Datenbank aus vorherigen Studien der Arbeitsgruppe verwendet.^{32,34,111,118} Dabei wurde eine signifikant niedrigere Expression des negativen Prognosefaktors *WT1* innerhalb der *BCL11b*-mutierten Gruppe gefunden. Bei anderen bekannten Onkogenen oder prognostischen Faktoren bestand kein Unterschied zwischen der *BCL11b*-Wildtyp- und der mutierten Gruppe (nicht dargestellt). Überlebensanalysen ergaben ebenfalls keine signifikante Assoziation mit *BCL11b*-Exon-4-Mutationen (Abbildung 19B).

Tabelle 18: *BCL11b*-Exon-4-Mutationen bei T-ALL-Patient_innen; *BCL11b*, Transkript NM_138576.2

| T-ALL ID | Basenaustausch | AS-Austausch | Lokalisation |
|----------|----------------|--------------|--------------|
| 3 | C792T | L470F | ZF3 |
| 3 | C844T | P454L | ZF2 |
| 4 | G851A | R472A | ZF3 |
| 5 | 1128 ins(TT) | E590fs | fs |
| 29 | C780T | T450M | ZF2 |
| 30 | C844T | L470F | ZF3 |
| 31 | 1705 ds(16bp) | P783fs | fs |
| 31 | C797A | Y455* | Stopp, ZF3 |
| 34 | 355ds | F317fs | fs |
| 38 | G851A | R472A | ZF3 |
| 40 | C780T | T450M | ZF2 |
| 41 | G320T | G306C | ZF1 |
| 50 | 498ds | S358fs | fs |
| 53 | 90ds | Q238fs | ZF1 |
| 57 | G718T | E430* | Stopp, ZF1 |
| 76 | 1109 ins(GG) | A584fs | fs |
| 87 | C865T | T476M | ZF3 |
| 99 | C850T | R472C | ZF3 |
| 101 | G812C | C460S | ZF3 |
| 105 | C780T | T450M | ZF2 |
| 108 | C499A | S358* | Stopp |
| 110 | A1903G | Q848R | - |
| 111 | 611ds | F395fs | fs |
| 120 | 817ds | D461fs | ZF3 |
| 139 | 828ds | S465fs | ZF3 |
| ETP-22 | G811A | E452K | ZF2 |
| ETP-27 | C865T | T476M | ZF3 |

Abkürzungen: AS = Aminosäure, ds = Deletion, ins = Insertion, fs = *frame shift*, bp = Basenpaar, * = Translationsstopp, ZF = Zinkfinger

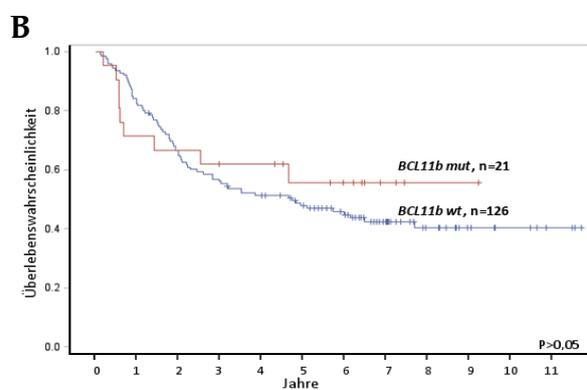
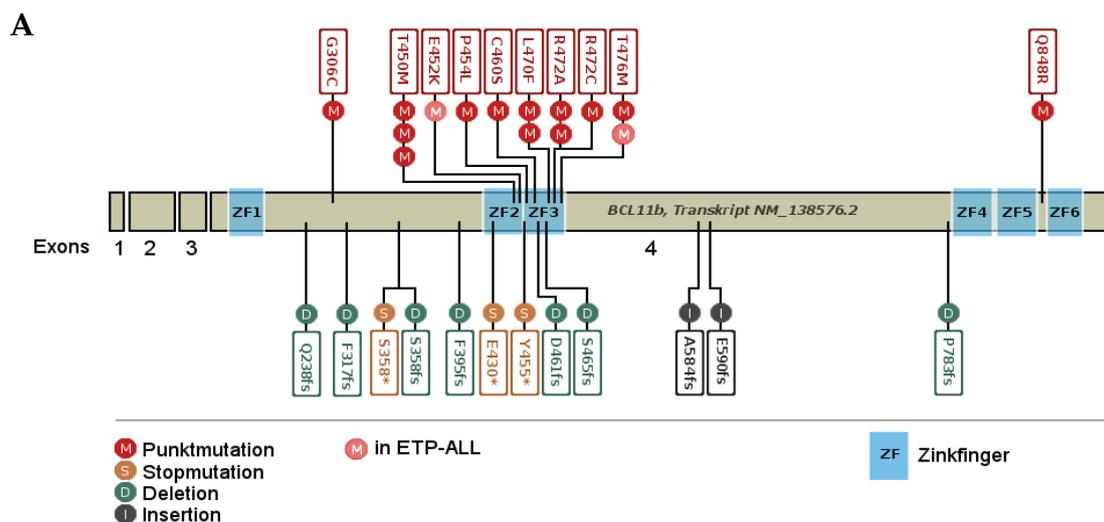


Abbildung 19: Mutationsanalyse *BCL11b* Exon 4

A: Position und Art der gefundenen Mutationen in Exon 4 von *BCL11b* in einer Kohorte von 178 T-ALL-Patient_innen und 69 ETP-ALL-Patient_innen

B: Kaplan-Meier-Analyse der Überlebenswahrscheinlichkeit von T-ALL-Patient_innen mit (mut) und ohne (wt) Mutationen in *BCL11b* Exon 4

3.2 ERGEBNISSE TEIL II:

IGFBP7-INDUZIERTE CHEMOTHERAPIERESISTENZ IN T-ALL-ZELLEN

IGFBP7 ist ein interessantes Kandidatengen in der T-ALL, da seine Expression bei Patient_innen mit einer schlechten Prognose und Therapieversagen assoziiert war. Die molekularen Grundlagen dieses Zusammenhangs wurden jedoch noch nicht entschlüsselt. Um die Funktion von *IGFBP7* in der T-ALL zu definieren, wurde seine Expression in humanen Leukämiezelllinien moduliert und die Auswirkung auf Proliferation, Apoptose und Resistenz gegen Zytostatika untersucht. Anschließend sollte durch weitere Versuche der mögliche Wirkungsmechanismus von *IGFBP7* offen gelegt werden.

3.2.1 Expression von *IGFBP7* in verschiedenen Leukämiezelllinien

Um geeignete Modell-Leukämiezelllinien für funktionelle Untersuchungen von *IGFBP7* zu identifizieren, wurde die mRNA-Expression von *IGFBP7* in verschiedenen Zelllinien unter Standardkulturbedingungen gemessen. Dies erfolgte teilweise durch Dr. rer. nat. Sandra Heesch.

Während die getesteten AML-Zelllinien alle *IGFBP7* exprimierten, war *IGFBP7*-mRNA in den aus T-ALLs gewonnenen Zellen nicht detektierbar; ebenso wenig in der CML-Zelllinie K562 (Abbildung 20). Daher wurden in den Versuchen, in denen die Auswirkung einer *IGFBP7*-Herunterregulation untersucht werden sollte, die Zelllinien KG1a und HL-60 verwendet. Die Überexpressionsversuche wurden in den T-ALL-Zelllinien Molt-4, Jurkat und in der CML-Zelllinie K562 durchgeführt.

3.2.2 *Knockdown* von *IGFBP7* in den AML-Zelllinien KG1a und HL-60

Durch Nukleofektion wurden KG1a- und HL-60-Zellen mit siRNAs gegen *IGFBP7* und *GFP* als unspezifische Kontrolle transfiziert und nach 24 Stunden in frischem Medium ausgesät. Nach 48 Stunden wurde die Expression durch qRT-PCR mit β -*Glucuronidase* (*GUS*) als interner Kontrolle bestimmt. Es wurde zu diesem Zeitpunkt ein durchschnittlicher *IGFBP7*-*Knockdown* von 88 % in KG1a und 67 % in HL-60 erreicht (Abbildung 21A).

Die Auswirkung dieses *IGFBP7*-*Knockdowns* auf die Proliferation der Zellen wurde anschließend in einem WST-1-Assay an verschiedenen Zeitpunkten getestet. Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen si*IGFBP7* und si*GFP* transfizierten Zellen festgestellt werden (für KG1a beispielhaft in Abbildung 21B dargestellt). Es wurde auch die Apoptoserate der KG1a- und HL-60-Zellen durch AnnexinV/7AAD-Färbung untersucht und kein messbarer Effekt einer verminderten *IGFBP7*-Expression gefunden (nicht dargestellt).

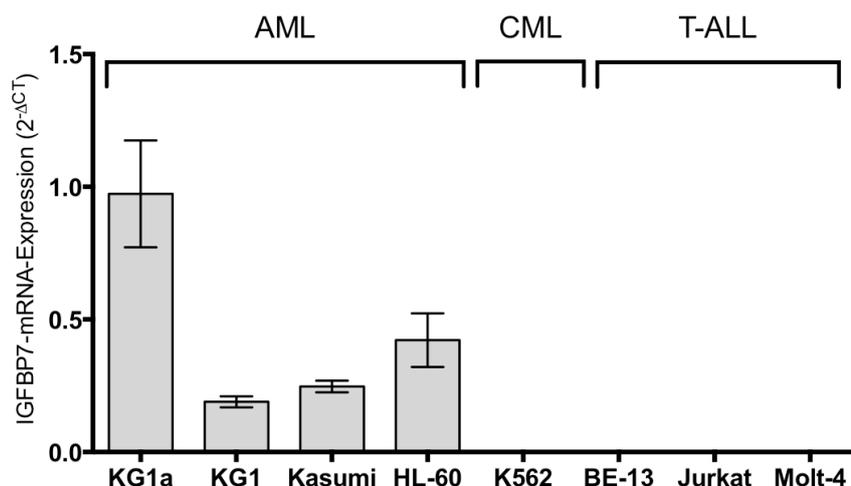


Abbildung 20: IGFBP7-mRNA-Expression in Leukämiezelllinien verschiedenen Ursprungs

Gemessen durch eine qRT-PCR und als $2^{-\Delta CT}$ mit β -Glucuronidase (*GUS*) als interner Kontrolle dargestellt. Mittelwerte \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM) der Triplikate einer Messung.

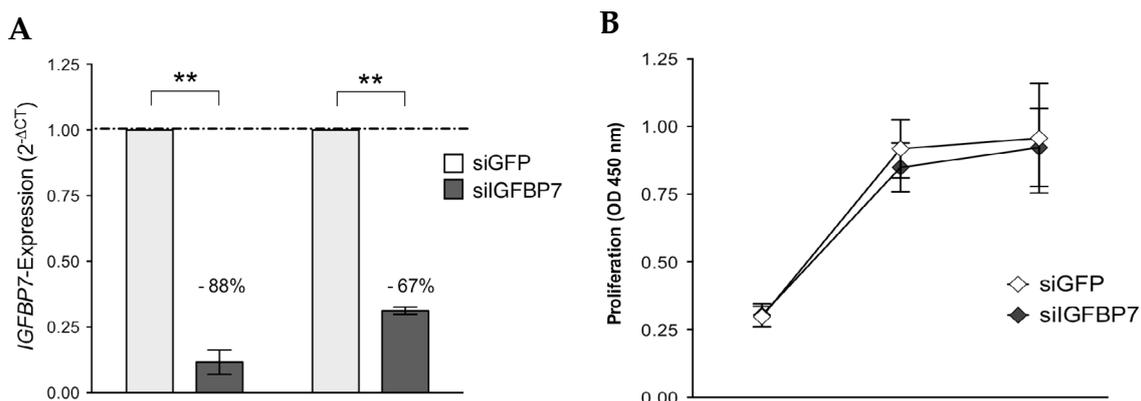


Abbildung 21: Knockdown von IGFBP7 durch siRNAs gegen IGFBP7

A: *IGFBP7*-mRNA-Expression in KG1a- und HL-60-Zellen nach 48 Stunden. Die Expression der kontrolltransfizierten Zellen (siGFP) wurde jeweils auf 1 gesetzt (100% Expression) um den *Knockdown* der *IGFBP7*-Expression errechnen zu können. Expressionsmessung durch eine qRT-PCR und als $2^{-\Delta CT}$ mit *GUS* als interner Kontrolle dargestellt. Mittelwerte \pm SEM von fünf unabhängigen Versuchen in Duplikaten. ** $P < 0,01$ (Mann-Whitney-U-Test)

B: WST-1-Proliferationsassay mit KG1a-Zellen, die an Tag -1 mit siRNAs gegen *IGFBP7* oder *GFP* als Kontrolle transfiziert wurden. $2,5 \times 10^4$ Zellen wurden an Tag 0 pro 96-well in $70 \mu\text{l}$ ausgesät und inkubiert. An Tag 1 und 2 wurde das Medium ausgetauscht. Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Versuchen in Triplikaten.

3.2.3 Überexpression von *IGFBP7* in Leukämie-Zelllinien

Nach einer Transfektion mit dem Überexpressionsvektor pIGFBP7 oder dem leeren Kontrollvektor, pCntrl, wurden aus den Zelllinien K562, Jurkat und Molt-4 durch Selektion mit G418 stabile Klone erzeugt. Die Expression von *IGFBP7* wurde in einer qRT-PCR überprüft und es zeigte sich eine erfolgreiche Überexpression des Gens, die zwischen den Zelllinien aber auch zwischen den Klonen variierte (Abbildung 22A).

Die Etablierung der im Folgenden beschriebenen Versuche erfolgte mit allen Überexpressions- und Kontrollklonen, um sicherzustellen, dass eventuelle beobachtete Unterschiede mit hoher Wahrscheinlichkeit auf der Überexpression von *IGFBP7* beruhten. Für die statistischen Analysen und grafischen Darstellungen in dieser Arbeit wurden die Versuche mit jeweils einem repräsentativen pCntrl- und einem pIGFBP7-Klon wiederholt (jeweils Klon #1, Abbildung 22A). Diese Jurkat- und Molt-4-pIGFBP7-Klone exprimierten *IGFBP7* auf mRNA-Ebene > 2000-fach höher als die dazugehörigen Kontrollklone (Abbildung 22B, $P = 0,01$). Im Western Blot-Verfahren konnte das sezernierte IGFBP7-Protein im Zelllysate nicht nachgewiesen werden (nicht dargestellt). In einem ELISA-Assay wurde jedoch nach vier Tagen Kultivierung eine 7- (Jurkat) bzw. 19-fache (Molt-4) Anreicherung von IGFBP7 im Mediumüberstand der pIGFBP7-transfizierten Klone im Vergleich zu kontrolltransfizierten Klonen gemessen (Abbildung 22C).

3.2.4 Auswirkung von *IGFBP7*-Überexpression auf die Proliferation von Leukämiezellen

Um einen möglichen Effekt von *IGFBP7*-Hochregulierung auf das Proliferationsverhalten der Zellen zu messen, wurde ein WST-1-Assay durchgeführt. Zur Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der Proliferationsverminderung bei Nährstofflimitierung wurden die Zellen dabei ohne Mediumwechsel inkubiert.

Es zeigte sich, dass die CML-Zelllinie K562 generell sehr resistent gegen den durch Nährstoffmangel verursachten Zelltod war und die verschiedenen Klone keinen Unterschied in ihrer Proliferationskurve im WST-1 Assay aufwiesen (Abbildung 23). Diese Zelllinie wurde daher in den folgenden Versuchen nicht berücksichtigt sondern sich auf die T-ALL-Zelllinien Molt-4 und Jurkat fokussiert. Die Jurkat-Klone hingegen zeigten einen IGFBP7-spezifischen Effekt in ihrem Proliferationsverhalten: Die drei pIGFBP7-Klone proliferierten an Tag zwei niedriger als die Kontrollklone, blieben jedoch an Tag drei und vier wesentlich viabler als diese. Erhöhte *IGFBP7*-Expression führte in Jurkat demnach zu einem geringeren Wachstumsanstieg und somit zu einem längeren Überleben der Zellpopulationen in nährstofflimitierter Umgebung. In einer Wiederholung des Versuchs mit repräsentativen Klonen war die Proliferation des pIGFBP7-transfizierten Jurkat-Klons nach vier Tagen im Durchschnitt 8-fach höher als die des pCntrl-transfizierten Klons ($P = 0,002$; Abbildung 24). In der Zelllinie Molt-4 war jedoch nur ein leichter und nicht signifikanter dämpfender Effekt der *IGFBP7*-Expression auf das Proliferationsverhalten der Zellen zu sehen (Abbildung 24).

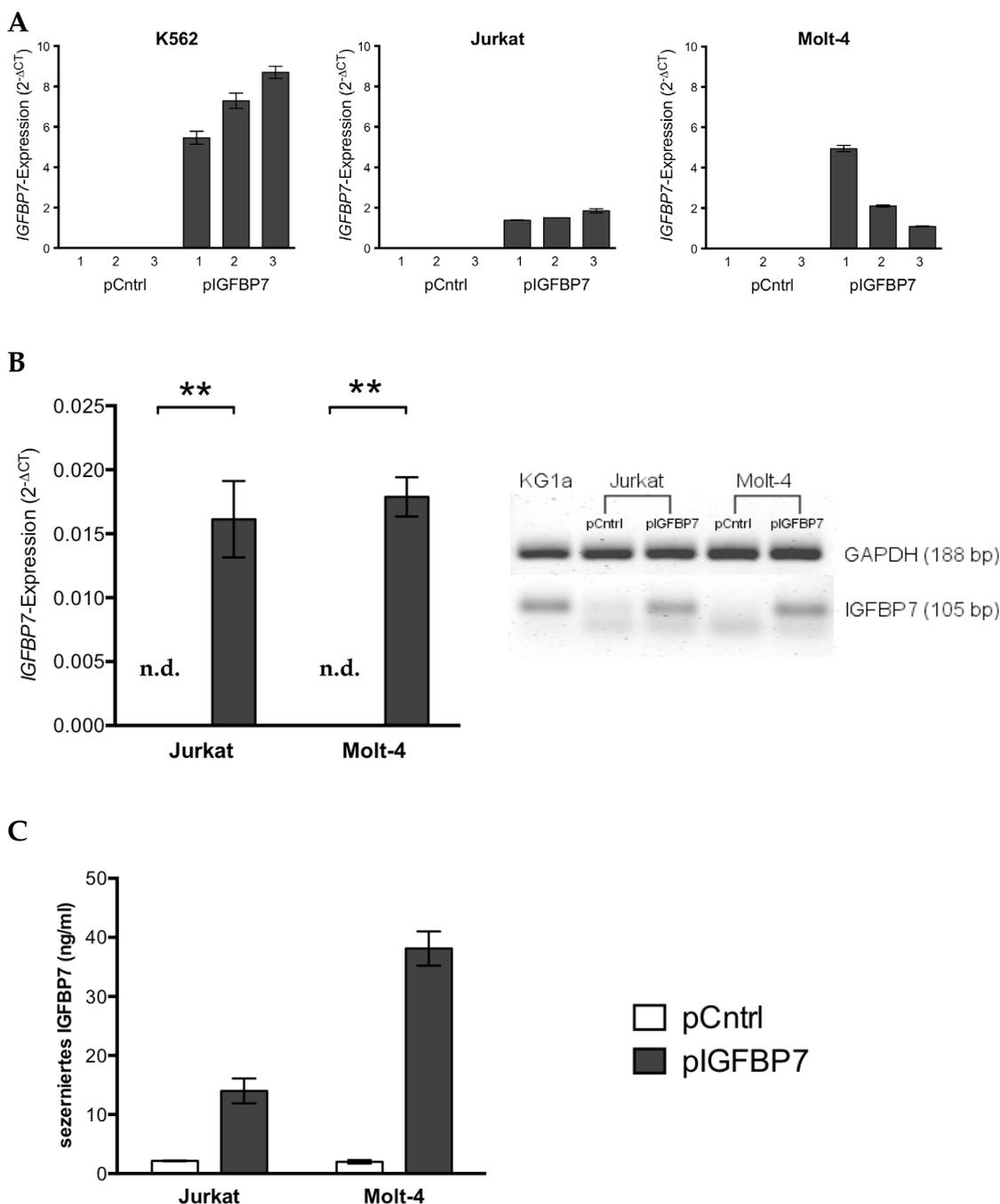


Abbildung 22: IGFBP7-Expression in Leukämie-Zelllinien nach Transfektion mit einem IGFBP7-Überexpressionsplasmid

K562-, Jurkat- und Molt-4-Zellen wurden mit pIGFBP7 oder pCntrl transfiziert und durch die Behandlung mit G418 kloniert.

A: IGFBP7-Expression wurde mit einer qRT-PCR in jeweils drei pCntrl- und drei pIGFBP7-Klonen pro Zelllinie mit *GUS* als interner Kontrolle gemessen ($2^{-\Delta CT}$). Mittelwerte \pm SEM der Duplikate einer Messung.

B: IGFBP7-Expression der in dieser Arbeit verwendeten repräsentativen Jurkat- und Molt-4-pCntrl- und pIGFBP7-Klone. Die Expression wurde mit einer Sybrgreen qRT-PCR mit *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* als interner Kontrolle gemessen ($2^{-\Delta CT}$) und die PCR-Produkte mit einem 1,5 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. KG1a diente dabei als Kontrolle für konstitutive IGFBP7-Expression. Mittelwerte \pm SEM von fünf unabhängigen Messungen in Duplikaten, ** $P \leq 0,01$ (Mann-Whitney-U-Test)

C: IGFBP7-Protein sezerniert von repräsentativen Jurkat und Molt-4 Klonen wurde im Mediumüberstand durch einen ELISA nach vier Tagen in Kultur ohne G418 quantifiziert. Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Messungen in Triplikaten.

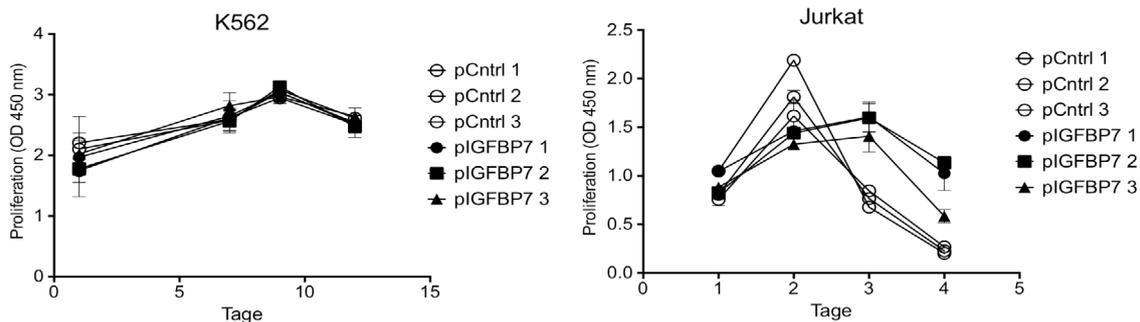


Abbildung 23: Proliferation von K562- und Jurkat-Zellen bei IGFBP7-Überexpression
 K562- und Jurkat-Klone (transfiziert mit pCntrl oder pIGFBP7) wurden ohne Mediumswechsel vier (Jurkat) oder 12 (K562) Tage kultiviert und WST-1-Assays durchgeführt, um die Proliferation der Zellen zu bestimmen. Mittelwerte ± SEM der Triplikate eines Versuches.

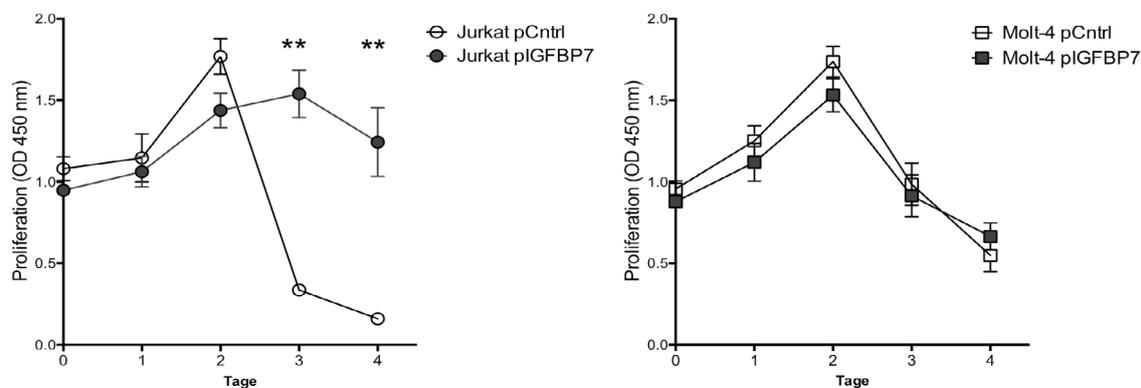


Abbildung 24: Proliferation von repräsentativen IGFBP7-überexprimierenden Jurkat- und Molt-4-Klonen
 Die Proliferation von repräsentativen pCntrl- und pIGFBP7-Jurkat- und Molt-4-Klonen wurden über eine Zeitreihe von vier Tagen ohne Mediumswechsel per WST-1-Assay gemessen. Mittelwerte ± SEM von fünf unabhängigen Versuchen in Triplikaten. ** $P \leq 0.01$ (Mann-Whitney-U-Test)

3.2.5 Veränderungen im Zellzyklus durch *IGFBP7*-Überexpression in T-ALL-Zelllinien

Die Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen wurde bei Jurkat- und Molt-4-Klonen mit einem BrdU-Assay durchflusszytometrisch bestimmt. Zur Etablierung wurden verschiedene Zeitpunkte getestet, um einen Messpunkt zu finden, an dem wenige Zellen apoptotisch waren (< 10 %), aber gleichzeitig lange kultiviert wurden, um eine möglichst hohe Anreicherung von *IGFBP7* im Medium zu garantieren (nicht dargestellt). Es zeigte sich die Messung nach einem Tag für Molt-4 und drei Tagen für Jurkat als geeignet. Die Gatingstrategie bei der FACS-Analyse ist in Abbildung 25A ersichtlich. Da die Triplikate innerhalb einer Messreihe größere Unterschiede aufwiesen, wurde kein Mittelwert pro Versuchsdurchführung gebildet, sondern alle Replikate in die Auswertung aufgenommen (wie in Abbildung 25B dargestellt) und Signifikanzen mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test errechnet.

Ein hoch signifikanter Unterschied war in beiden Zelllinien zwischen dem Anteil an Zellen in der G0/G1-Arrest des pCntrl- und des p*IGFBP7*-transfizierten Klons zu sehen. Während sich im Durchschnitt 51 % der Zellen des pCntrl-Jurkat-Klons in der G0/G1-Phase befanden, waren es bei dem p*IGFBP7*-Klon 59 % ($P < 0,001$). Für Molt-4 waren es bei dem pCntrl-Klon 40 % und 46 % bei dem p*IGFBP7*-Klon ($P < 0,001$).

Auch die anderen Phasen des Zellzyklus wiesen Unterschiede auf. Jurkat-p*IGFBP7*-transfizierte Zellen waren weniger in der G2/M-Phase (Mittelwert: 11 % vs. 21 %, $P < 0,001$) und weniger apoptotisch (Mittelwert: 5 % vs 9 %, $P = 0,003$). Es befanden sich ebenfalls mehr *IGFBP7*-überexprimierende Zellen in der S-Phase (Mittelwert: 23 % vs. 17 %, $P = 0,005$).

Bei der Zelllinie Molt-4 war ein ähnlicher, aber schwächerer Effekt der *IGFBP7*-Überexpression auf den Zellzyklus zu sehen. Weniger Zellen des p*IGFBP7*-Klons befanden sich in der G2/M-Phase (Mittelwert: 2 % vs 4 %, $P = 0,02$) und weniger in Apoptose (Mittelwert: 4 % vs. 8 %, $P < 0,001$). Kein Unterschied wurde hier für die S-Phase gemessen.

3.2.6 *IGFBP7*-induzierte Zytostatika-Resistenz in Jurkat-Zellen

Für den Test der Auswirkung von *IGFBP7*-Überexpression auf Sensitivität gegenüber verschiedener Zytostatika wurden der Literatur Konzentrationen entnommen und diese dann in drei (vier bei AraC) verschiedenen Konzentrationen in einem WST-1-Assay nach 48 Stunden Inkubation getestet. Der Jurkat p*IGFBP7*-Klon zeigte dabei eine höhere Resistenz gegenüber Vincristin, Etoposid und Asparaginase (Abbildung 26A) als der pCntrl-Klon, während in der Zelllinie Molt-4 keine Unterschiede bestanden (nicht dargestellt).

Es wurden für darauf folgende Versuche Konzentrationen mit mittlerem Ansprechen gewählt: 1 ng/ml Vincristin, 1 µg/ml Etoposid, 1 µg/ml AraC und 1 IU/ml Asparaginase. Der beobachtete Effekt einer *IGFBP7*-induzierten Resistenz gegenüber Vincristin und Asparaginase in Jurkat-Zellen bestätigte sich nach 24 Stunden Inkubation: Der p*IGFBP7*-transfizierte Jurkat-Klon war im WST-1-Assay im Durchschnitt viermal resistenter gegenüber Vincristin ($P = 0,03$) und doppelt so resistent gegenüber Asparaginase ($P = 0,03$; Abbildung

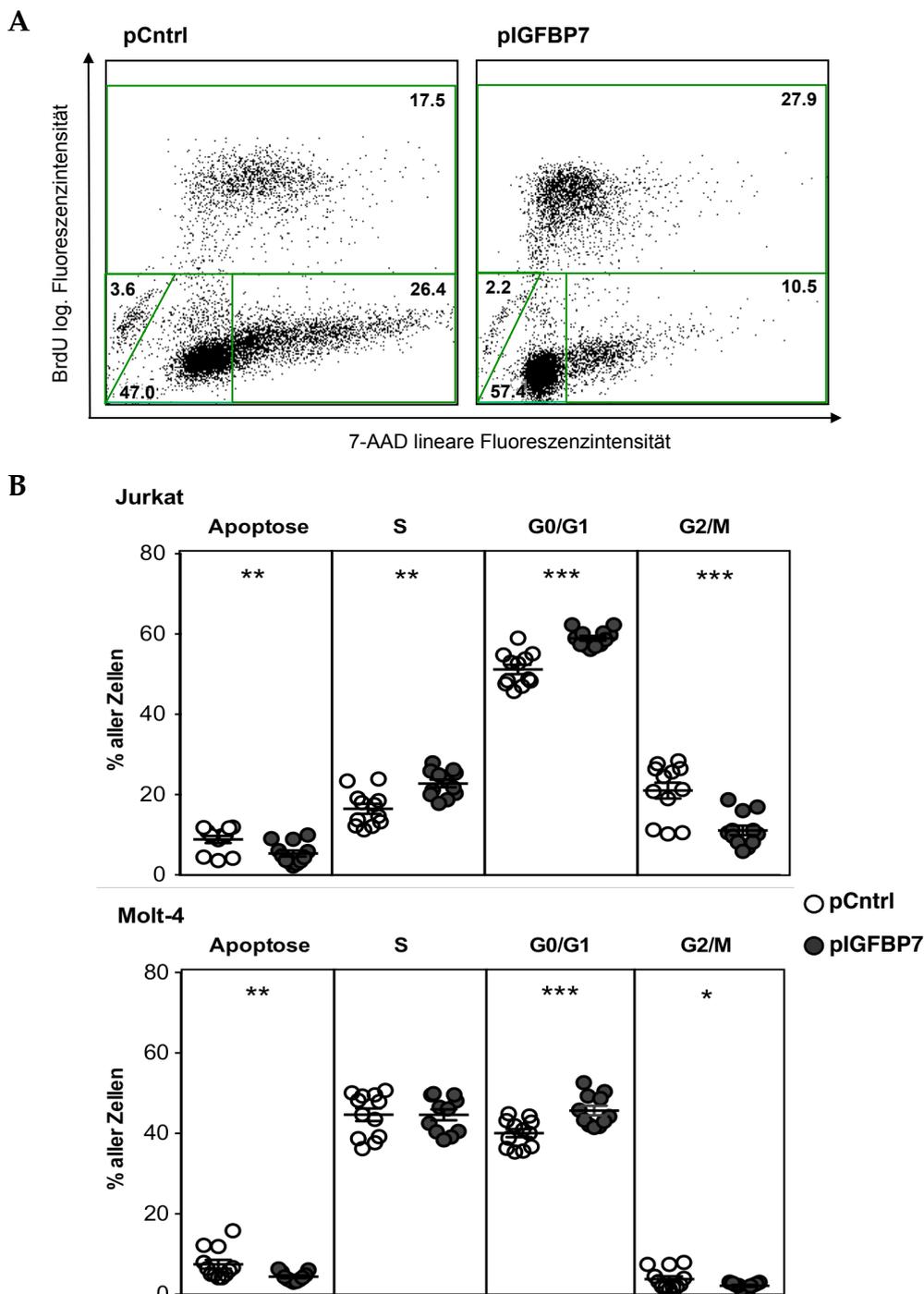


Abbildung 25: Zellzyklusanalysen von Jurkat- und Molt-4-IGFBP7-Überexpressionsklone

pCntrl- oder pIGFBP7-transfizierte Klone wurden für einen (Molt-4) oder drei Tage (Jurkat) kultiviert. Der Zellzyklusstatus der Zellen wurde durchflusszytometrisch nach BrdU-Inkoooperation und nachfolgender anti-BrdU-Antikörper- und 7AAD-Färbung analysiert.

A: Repräsentative Streudiagramme von transfizierten Jurkat-Zellen zur Darstellung der Gatingstrategie: BrdU⁺ Zellen (obere Region) waren in der S-Phase, BrdU7AAD^{hoch} (untere rechte Region) in der G2/M-Phase, BrdU7AAD^{niedrig} in G0/G1-Arrest (untere mittlere Region) und apoptotisch (untere linke Region). Die Prozentzahlen der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase sind angegeben.

B: Relative Verteilung von Jurkat- und Molt-4-Zellen in den Zellzyklusphasen von vier unabhängigen Versuchen in Triplikaten. Die Linien stellen Mittelwerte \pm SEM dar; * $P \leq 0,05$, ** $\leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test)

26B). Der resistenzinduzierende Effekt von IGFBP7 bei Behandlung mit Etoposid erwies sich als nicht signifikant.

Um die Apoptoserate der Zellen zu messen, wurden die pCntrl- und pIGFBP7-transfizierten Jurkat-Klone nach Inkubation mit den verschiedenen Zytostatika durch Annexin-V/7AAD-Färbung durchflusszytometrisch auf frühen und späten Zelltod untersucht. In Abbildung 27A sind repräsentative Streudiagramme aus einer von vier Messreihen dargestellt. Der Quadrant links unten beinhaltet jeweils die ungefärbten, also vitalen Zellen und der Quadrant rechts unten die früh-apoptotischen Zellen (Annexin-V⁺/7ADD⁻). Links oben sind die nekrotischen Zellen dargestellt (Annexin-V⁺/7ADD⁺) und der Quadrant rechts oben beinhaltet Zellen, die sowohl für frühe als auch späte Apoptose positiv waren (Annexin-V⁺/7ADD⁺). In der Gesamtauswertung der Versuche wurden alle apoptotischen und nekrotischen Zellen zusammengezählt.

Nach 24 Stunden Behandlung mit Vincristin waren im Durchschnitt 34 % der pCntrl-transfizierten Jurkat-Zellen apoptotisch, während es 15 % der pIGFBP7-transfizierten Zellen waren ($P = 0,03$). Kein signifikanter Unterschied war nach Behandlung mit Etoposid oder AraC festzustellen, während bei den mit Asparaginase inkubierten Zellen im Durchschnitt 22 % des pCntrl-Klons und nur 10 % der Zellen des pIGFBP7-Klons apoptotisch waren ($P = 0,03$; Abbildung 27B). Die IGFBP7-induzierte Resistenz gegenüber Vincristin und Asparaginase in Jurkat-Zellen konnte so bestätigt werden. Wie bei dem WST-1-Assay war auch hier kein Unterschied zwischen den Molt-4-Klonen zu sehen (nicht dargestellt).

3.2.7 IGFBP7-Überexpression reduziert IGF1-R-Protein in Jurkat-Zellen

Um zu untersuchen, ob die gemessenen Auswirkungen der IGFBP7-Überexpression durch Beeinflussung des IGF-Signalwegs zustande kamen, wurde die Zelloberflächen-Expression von IGF1-R in pIGFBP7- und pCntrl-transfizierten Klonen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Zellen wurden nach vier Tagen Inkubation ohne Mediumswechsel mit Antikörpern gegen IGF1-R gefärbt und, durch Setzen eines entsprechenden Gates im FCC/SCC-Streudiagramm, nur die lebenden Zellen analysiert. Der pIGFBP7-transfizierte Jurkat-Klon exprimierte IGF1-R im Durchschnitt 69 % geringer im Vergleich zur pCntrl-transfizierten Kontrolle ($P < 0,001$; Abbildung 28A und B). Die Molt-4-Klone exprimierten IGF1-R ohne Unterschied zwischen den Klonen sehr gering (nicht dargestellt).

Um die Gesamtproteinmenge von IGF1-R zu erfassen, wurden Zellen nach 24 Stunden Kultivierung lysiert und eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Während die Jurkat pCntrl-transfizierten Zellen eine leichte Bande bei 95kDa zeigten, war die IGF1-R-Proteinmenge des pIGFBP7-transfizierten Klons unter der Nachweisgrenze. Auch in Molt-4-Zellen wurde kein IGF1-R-Protein detektiert (Abbildung 28C).

Die IGF1-R-mRNA-Expressionsmessung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen

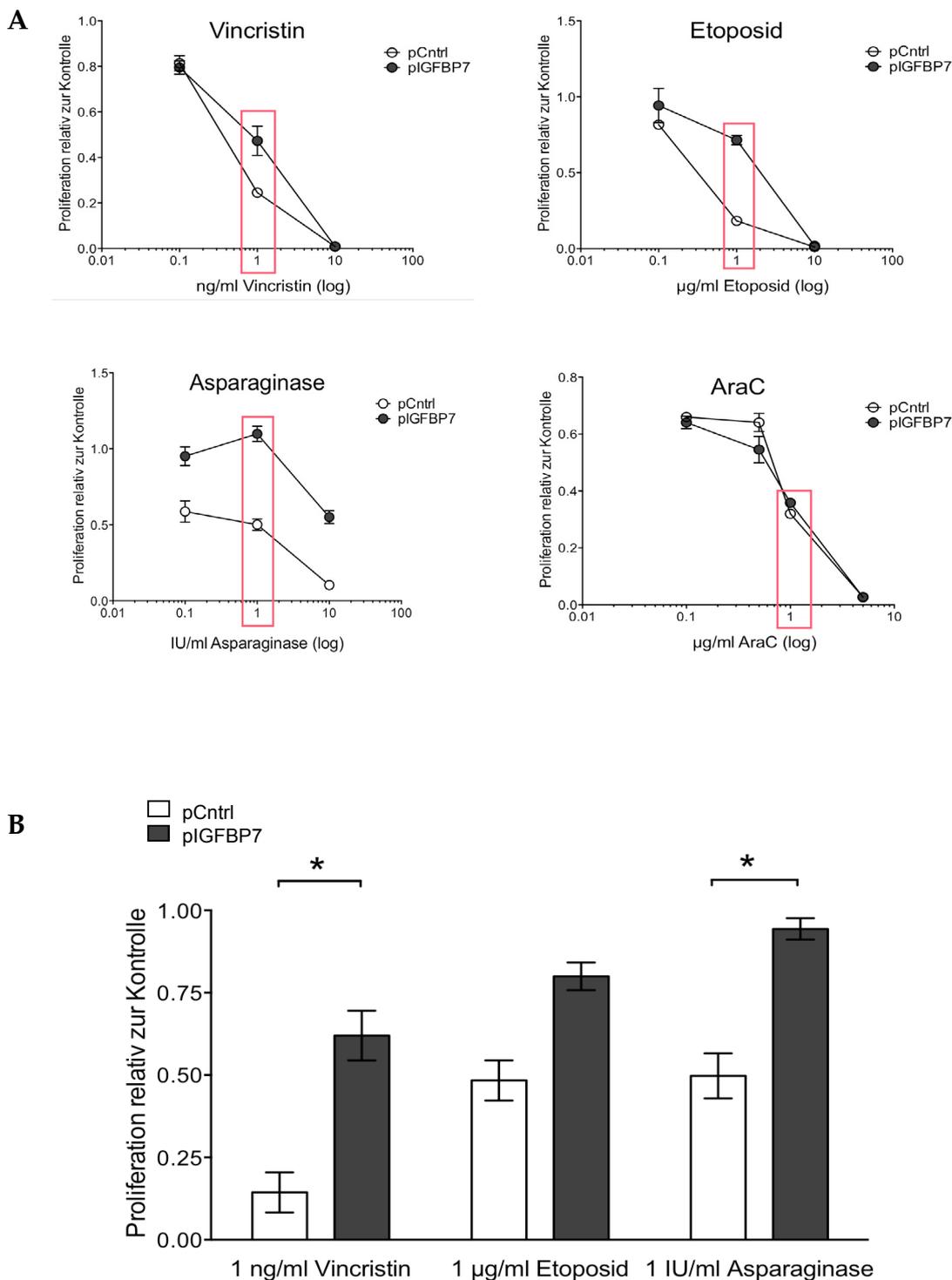


Abbildung 26: Zytostatika-Sensitivität von *IGFBP7*-transfiziertem Jurkat-Klon

Jurkat-pCntrl- oder pIGFBP7-transfizierte Klone wurden mit verschiedenen Zytostatika inkubiert und ihre Viabilität mit einem WST-1-Assay bestimmt.

A: Repräsentative Ergebnisse zur Ermittlung geeigneter Zytostatika-Konzentrationen nach 48 Stunden für weiterführende Versuche. Die aufgrund der Ergebnisse gewählten Konzentrationen sind rot markiert. Mittelwerte \pm SEM von einem Versuch in Triplikaten

B: Durchschnittliche Viabilität von zytostatikabehandelten Jurkat-Klonen relativ zu unbehandelten Klonen nach 24 Stunden. Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Versuchen in Triplikaten. * $P \leq 0.05$ (Mann-Whitney-U-Test)

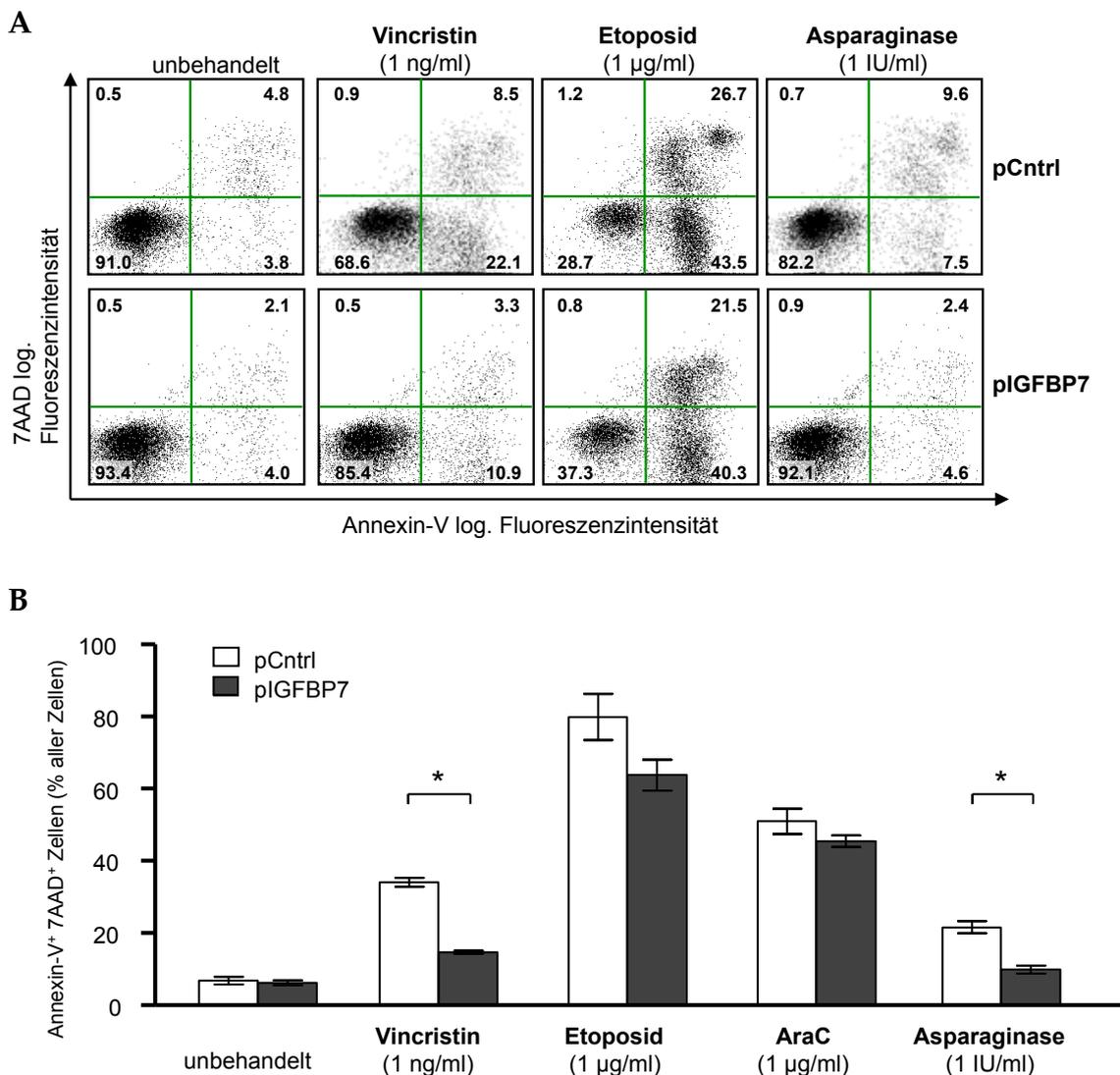


Abbildung 27: Zytostatika-Behandlung von Jurkat-Klon mit stabiler *IGFBP7*-Expression

Jurkat pCntrl- oder pIGFBP7-Klone wurden 24 Stunden mit Vincristin, Etoposid, Asparaginase oder AraC behandelt.

A: Die Annexin-V- und 7AAD-Färbung der behandelten Zellen wurde durchflusszytometrisch analysiert. Es sind repräsentative Streudiagramme aus vier verschiedenen Versuchen dargestellt. Der jeweilige Prozentsatz an Zellen pro Quadrant ist angegeben. Es wurden so sowohl früh-apoptotische Zellen (Quadrant links unten, Annexin-V⁺/7AAD⁻) als auch nekrotische Zellen (Quadrant links oben, Annexin-V⁻/7AAD⁺ und Quadrant rechts oben, Annexin-V⁺/7AAD⁺) gemessen.

B: Mittelwerte ± SEM der Apoptoseraten von vier unabhängigen Versuchen in Triplikaten. * $P \leq 0,05$ (Mann-Whitney-U-Test)

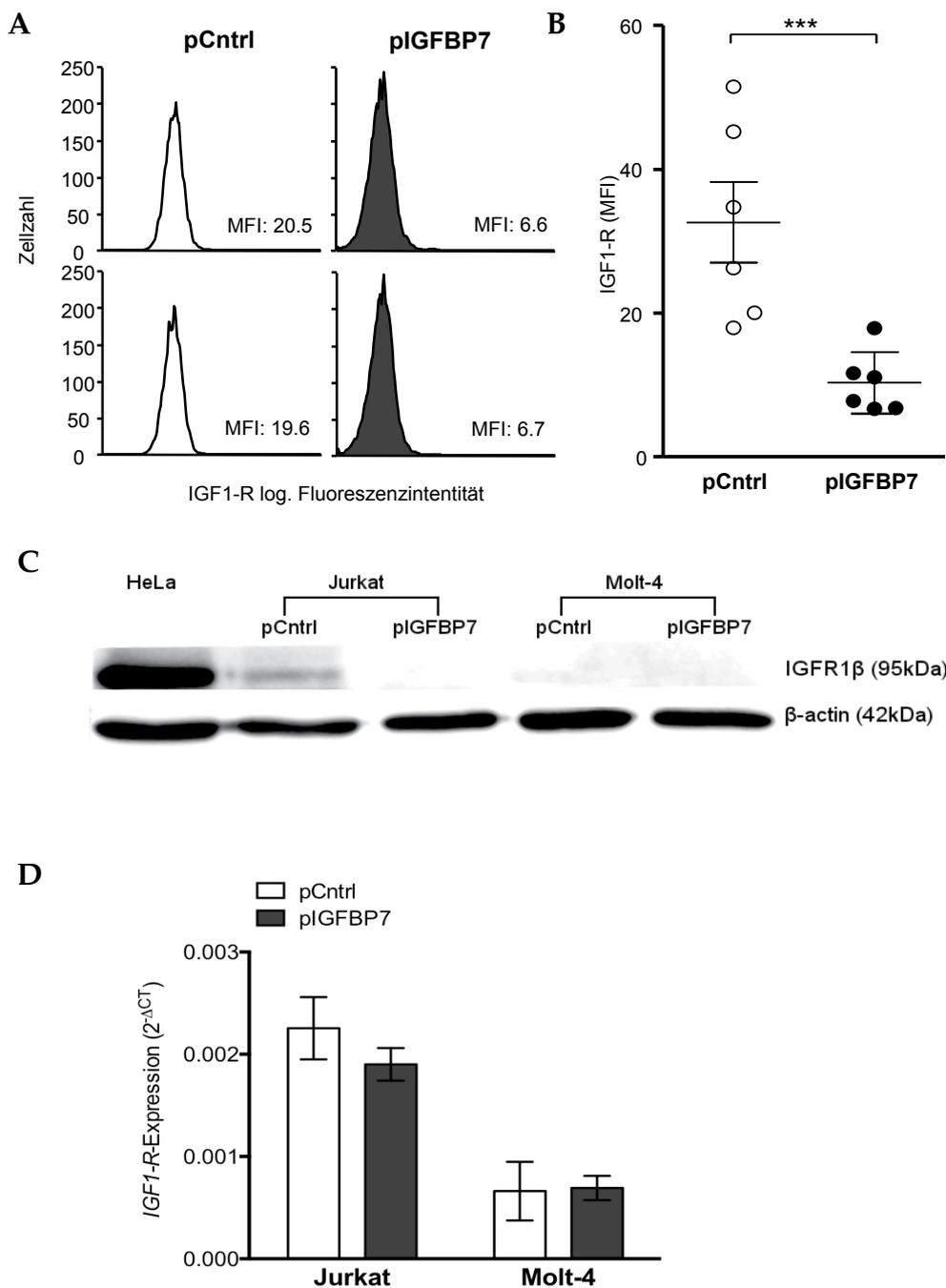


Abbildung 28: IGF1-R-Expression in Jurkat-Klonen

A: Jurkat-pCntrl- oder pIGFBP7-transfizierte Zellen wurden vier Tage ohne Mediumswechsel inkubiert. Die IGF1-R-Expression der Zellen wurde durchflusszytometrisch in lebenden Zellen (ausgewählt nach FCC/SCC-Eigenschaften) bestimmt. Repräsentative Histogramme in Duplikaten für jeden Klon aus einer von fünf Messreihen. MFI = mediane Fluoreszenzintensität

B: Ergebnisse von fünf verschiedenen IGF1-R-Analysen. Die Mittelwerte von Duplikaten sind eingezeichnet, die Linien stellen die Gesamtmittelwerte \pm SEM dar. *** $P \leq 0,001$ (Mann-Whitney-U-Test)

C: Jurkat- und Molt-4-Klone wurden nach 24 Stunden Kultivierung lysiert und die IGF1-R β - und β -Aktin-Menge per Western Blot analysiert. Die Zelllinie HeLa diente als Positivkontrolle für IGF1-R β . Repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen.

D: Die *IGF1-R*-mRNA-Expression wurde nach 24h Kultivierung in Jurkat- und Molt-4-pCntrl- und pIGFBP7-transfizierten Klonen bestimmt. Gemessen durch eine SybrGreen-qRT-PCR und als $2^{-\Delta CT}$ mit *GAPDH* als interner Kontrolle dargestellt. Mittelwerte \pm SEM von fünf unabhängigen Messungen in Duplikaten.

pCntrl- und pIGFBP7-transfizierten Klonen (Abbildung 28D).

IGFBP7-Überexpression führte demnach in der Zelllinie Jurkat zu einer post-translativen Reduktion der IGF1-R-Proteinmenge an der Zelloberfläche und Gesamtproteinmenge, während es in der IGF1-R gering exprimierenden Zelllinie Molt-4 keine Auswirkungen hatte.

3.2.8 Wirkung von IGF1-R-Inhibition auf *IGFBP7*-induzierte Zytostatikaresistenz

Um zu ermitteln, ob die beobachtete Wirkung der *IGFBP7*-Überexpression durch den Einfluss von *IGFBP7* auf den IGF1-R zustande kam, wurde der IGF1-R-Inhibitor AEW541 eingesetzt.

Dieser wurde zunächst alleine zu den pCntrl- und pIGFBP7-transfizierten Klonen gegeben und in einem WST-1-Assay die Viabilität der Zellen getestet. Die Jurkat-Klone zeigten eine hohe Sensitivität gegenüber AEW541, die im pIGFBP7-transfizierten Klon höher war, während die Toxizität bei Molt-4-Klonen insgesamt gering war (Abbildung 29A).

Anschließend wurde die Konzentration von 0,5 μ M AEW541 in Kombination mit den zuvor getesteten Zytostatika (Absatz 3.2.5) eingesetzt und die Apoptoserate der Zellen bestimmt. Während bei dem Jurkat-pCntrl-transfizierten Klon im Durchschnitt 42 % der Zellen bei Behandlung mit AEW541 apoptotisch und nekrotisch waren, waren es bei dem pIGFBP7-transfizierten Klon im Durchschnitt 64 % ($P = 0,03$). Die zuvor gemessene Resistenz gegenüber Vincristin wurde durch Zugabe des IGF1-R-Inhibitors umgekehrt: Nach 24 Stunden Inkubation mit beiden Substanzen lag die Apoptoserate bei pCntrl-transfizierten Jurkat-Zellen durchschnittlich bei 52 % und bei den pIGFBP7-transfizierten Zellen bei 80 % ($P = 0,03$). Die Apoptoserate bei Kombination von AEW541 mit Asparaginase blieb jedoch signifikant niedriger in den pIGFBP7-transfizierten Zellen als bei den kontrolltransfizierten Zellen ($P = 0,03$; Abbildung 29B).

Die *IGFBP7*-induzierte Resistenz gegenüber Vincristin in der Zelllinie Jurkat war demnach durch IGF1-R-Inhibition überwindbar, während die Resistenz gegenüber Asparaginase nicht IGF1-R-abhängig war.

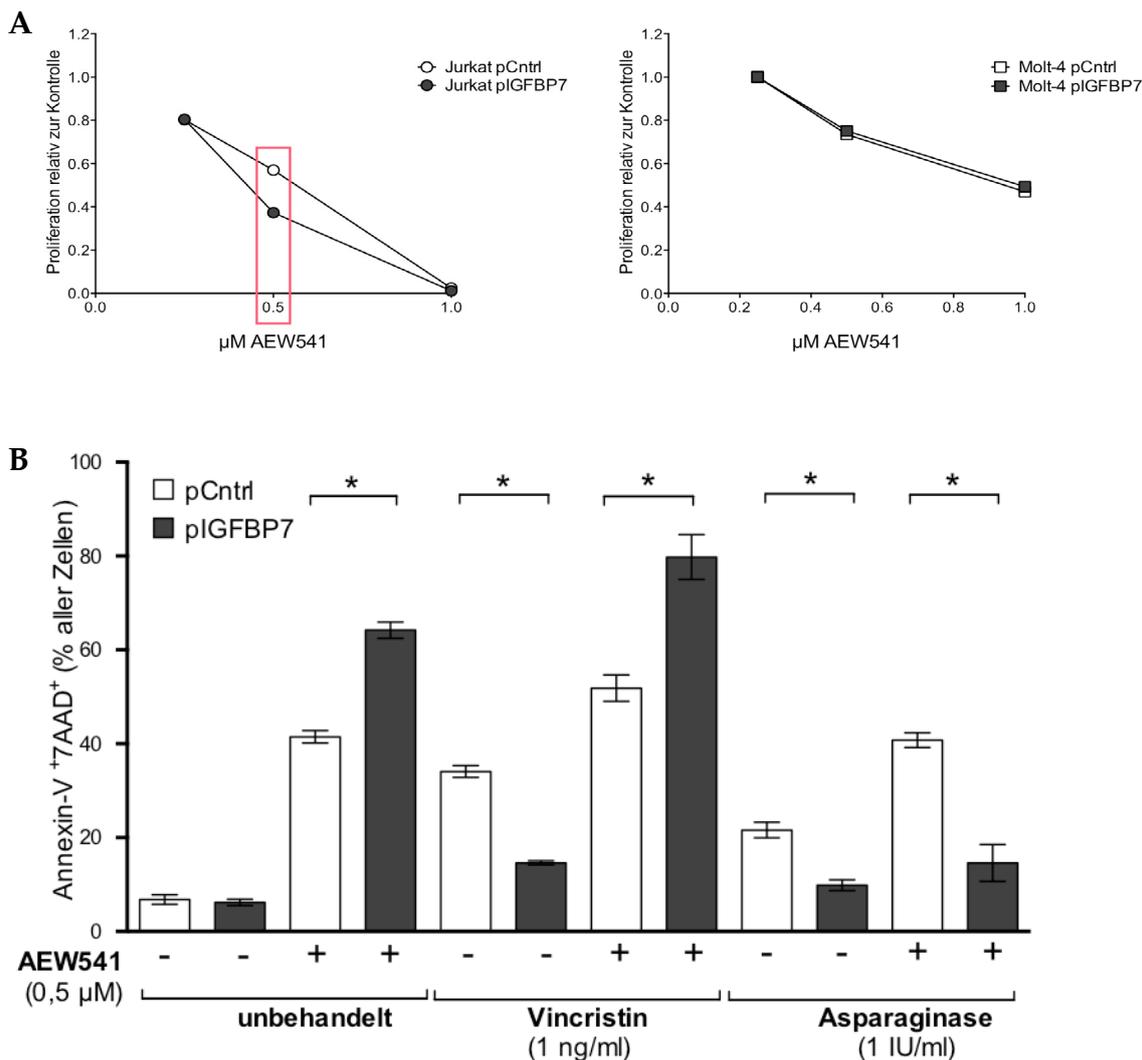


Abbildung 29: Auswirkung von IGF-1-Inhibition auf IGF1R-induzierte Zytostatika-Resistenz in Jurkat-Klonen

A: Jurkat- und Molt-4 Klonen wurden mit dem IGF1-R-Inhibitor AEW541 inkubiert und die Viabilität der Zellen nach 24 Stunden in einem WST-1-Assay gemessen. Die aufgrund der Ergebnisse gewählte Konzentration für weiterführende Versuche ist rot markiert. Mittelwerte \pm SEM von jeweils einem repräsentativen Versuch in Triplikaten

B: Jurkat-pCntrl- und pIGFBP7-transfizierte Klone wurden mit verschiedenen Zytostatika in Kombination mit 0,5 μM AEW541 inkubiert und die Apoptoserate nach 24 Stunden durch Annexin-V/7AAD-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Versuchen in Triplikaten. * P \leq 0,05 (Mann-Whitney-U-Test)

4 Diskussion

Um die Pathogenese von T-ALLs zu verstehen, ist es notwendig molekulare Aberrationen zu identifizieren und im nächsten Schritt in Experimenten die Konsequenz der betroffenen Alterationen zu entschlüsseln. Nur dann ist es möglich, das heterogene Spektrum der T-ALLs in molekulare Untergruppen aufzufächern und spezifische Therapien zu entwickeln, die gezielt leukämische Zellen angreifen.

In dieser Arbeit wurden zu diesem Zweck zwei Faktoren untersucht: Zum ersten BCL11b als T-Zelltranskriptionsfaktor, dessen Expressionsmuster und Mutationsfrequenz in adulten T-ALL-Patient_innen bis zu dieser Arbeit noch nicht in größeren Kohorten beschrieben wurden. Und im zweiten Teil der Arbeit IGFBP7, dessen Überexpression in adulter T-ALL mit einer schlechten Prognose in T-ALL-Patient_innen korrelierte, ohne dass die dahinterstehenden molekularen Zusammenhänge bisher aufgeklärt waren.

4.1 DISKUSSION TEIL I:

EXPRESSION UND MUTATIONEN VON BCL11B IN ADULTER T-ALL

Die T-Zellentwicklung wird von einem komplexen Netzwerk aus Transkriptionsfaktoren gesteuert, die es der undifferenzierten Stammzelle erlauben, die sequenziellen Stufen der Differenzierung bis hin zur reifen T-Zelle zu durchlaufen. Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor BCL11b wird in der DN2-Phase der Vorläuferzellen exprimiert und ist essenziell sowohl für die Festlegung der T-Vorläuferzellen auf die T-Zelllinie, als auch für die Limitierung von Stammzeleigenschaften wie der Selbsterneuerung.⁷ So exprimieren Zellen im DN2-Stadium, bei denen *BCL11b* künstlich herunterreguliert wurde, stammzellnahe Gene (unter anderem Proto-Onkogene und Zytokinrezeptoren) sowie NK-Zellgene, die in diesem Stadium normalerweise ausgeschaltet sind.⁵³ Gleichzeitig werden jedoch andere T-Zelltranskriptionsfaktoren (wie *GATA3*, *TCF7* und *ETS1*) in normaler Höhe exprimiert, ein Indiz für die essenzielle Rolle von BCL11b in dieser Phase der endgültigen Festlegung auf die T-Zelllinie.⁵³ Auch für die spätere Beibehaltung eines T-Zellphänotyps ist BCL11b ausschlaggebend – wird es künstlich herunterreguliert, können auch reife T-Zellen einen NK-zellähnlichen Phänotyp entwickeln.⁵⁵

Eine aberrante *BCL11b*-Expression durch vorgeschaltete Signalwegs deregulierungen oder Mutationen des Gens sollte demnach eine gravierende Auswirkung auf die T-Zellentwicklung haben. Konsistent mit dieser Annahme wurden in pädiatrischen T-ALLs Mutationen in 9 bis 16 % der Patient_innen gefunden und BCL11b als haploinsuffizienter Tumorsuppressor beschrieben.^{69,70} Um die Rolle von BCL11b in der T-ALL genauer zu definieren, wurde in dieser Arbeit eine große Kohorte von T-ALL-Patient_innen auf ihre Expression und Mutationsstatus von BCL11b hin untersucht. Bei diesen Untersuchungen verhielt sich die *BCL11b*-Expression von Zellen gesunder Personen entsprechend des T-Zellentwicklungsmodells: In stammzellennahen CD34⁺-Zellen und in unselektiertem Knochenmark war keine *BCL11b*-Expression messbar, während die Expression in reifen CD3⁺-Zellen hoch war.

In Proben von T-ALL-Patient_innen war *BCL11b* sehr heterogen und signifikant höher exprimiert als in unselektiertem Knochenmark oder CD34⁺-Zellen von gesunden Personen. Das *BCL11b*-Expressionsmuster in der T-ALL war zuvor nur in Studien mit kleinen Kohorten gemessen worden, deren Untersuchungsmaterial mit dem in dieser Arbeit verwendeten nicht direkt vergleichbar ist. Zusätzlich waren die Ergebnisse dieser Studien uneinheitlich. In einer Studie zu einer Sonderform von T-ALLs, die durch den *Human T-cell lymphotropic virus type I* (HTLV-I) ausgelöst wird (T-ALL/Lymphom = ATLL), wurde bei acht ATLL-Patient_innen eine geringere *BCL11b*-Proteinexpression in reifen CD4⁺-Zellen des peripheren Blutes (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*: PBMC) gefunden als bei zwei gesunden Personen.¹²⁷ In einer anderen Studie wurde bei neun T-ALL-Patient_innen, im Vergleich zu gesunden Personen, eine erhöhte mRNA-Expression in PBMCs gefunden.¹²⁸ Dieser Unterschied könnte jedoch auch auf einen durchschnittlich höheren Anteil an CD3⁺-Zellen, also reifen, *BCL11b*-positiven T-Zellen, bei den analysierten T-ALL-Proben beruhen.¹²⁸

Als weiterer Unterschied zu vorherigen Studien wurde in der vorliegenden Arbeit eine separate Betrachtung der immunphänotypischen T-ALL-Subgruppen vorgenommen. Diese Subgruppen sind von großer Bedeutung für Prognose und Behandlungsstrategie nach dem GMALL-Protokoll, da für thymische T-ALL-Patient_innen eine signifikant höhere Überlebenswahrscheinlichkeit gezeigt wurde.^{14,39} Es zeigte sich hier, wie bei den Zellen der normalen Hämatopoese, eine niedrigere Expression von *BCL11b* bei unreiferen Zellstadien: Während die ETP-ALL- und frühen T-ALL-Patient_innen *BCL11b* niedrig exprimierten, war die Expression in reifen und thymischen T-ALLs signifikant höher.

Ein weiteres Indiz für die Abhängigkeit der *BCL11b*-Expression vom Reifegrad der Zellen, auch in der T-ALL, war die signifikant niedrigere Expression von *GATA3* in der *BCL11b*-niedrig-Gruppe. Der Beginn der *GATA3*-Expression liegt in gesunden T-Zellprogenitoren vor dem Beginn der *BCL11b*-Expression im ETP-Stadium.⁷ Es sollte daher in unreiferen Blasten niedriger exprimiert sein (siehe Abbildung 6, Absatz 1.3.1). Auch dazu passend war *IGFBP7*, für das in der T-ALL eine stammzellnahe Expression beschrieben wurde, bei *BCL11b*-niedrig-Patient_innen signifikant höher exprimiert als bei Patient_innen der *BCL11b*-hoch-Gruppe.¹¹¹

Bei Auswertung der Gesamtüberlebenszeit in Bezug auf *BCL11b*-Expression hatten T-ALL-Patient_innen der *BCL11b*-niedrig-Gruppe eine signifikant niedrigere 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate als Patient_innen mit hoher *BCL11b*-Expression. Eine noch größere Signifikanz erhielt diese Beobachtung bei separater Untersuchung der thymischen T-ALL-Kohorte: Während das Gesamtüberleben nach 5 Jahren bei nur 20 % in der *BCL11b*-niedrig-Gruppe lag, lag es in der *BCL11b*-hoch-Gruppe bei 62 % der Patient_innen. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch mit einer Untersuchung einer pädiatrischen T-ALL-Kohorte von Gutierrez *et al.*, bei der eine niedrige *BCL11b*-Expression zwar mit Induktionstherapie-Versagen verbunden war, aber keine Assoziation von *BCL11b*-Expression und Gesamtüberleben gefunden wurde.⁶⁹ Es ist jedoch möglich, dass diese Differenz aufgrund der geringen Kohortengröße in der zitierten Studie und der fehlenden Klassifizierung der Patient_innen in immunphänotypische Subgruppen zustande kam.

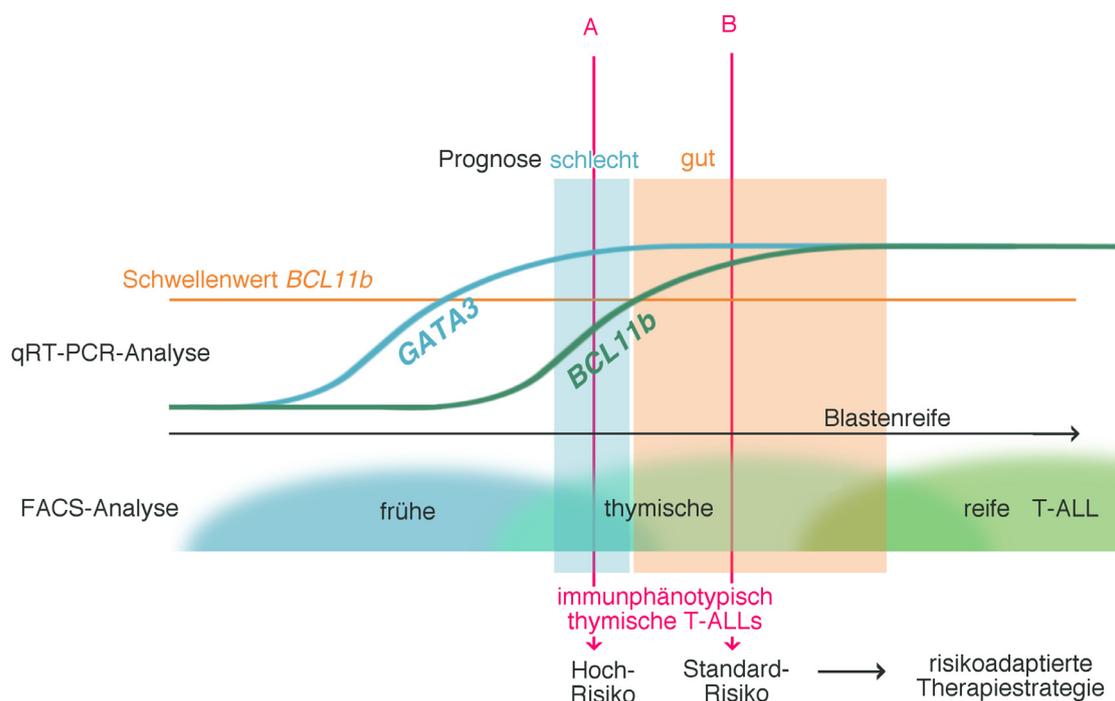


Abbildung 30: Modell zur Verwendung von *BCL11b*-Expression als prognostischen Faktor in der thymischen T-ALL

A und B bezeichnen zwei nach immunphänotypischen FACS-Analysen als thymische T-ALLs klassifizierte Beispielpatient_innen. Durch die Bestimmung der Expressionshöhe von *BCL11b* ist es möglich, die Blastenreife durch eine qRT-PCR genauer zu bestimmen und eine korrekte Einordnung der Patient_innen in Risikogruppen vorzunehmen. Aus dieser Klassifizierung ergibt sich eine risikoadaptierte Behandlungsstrategie durch die eine erhöhte Überlebenswahrscheinlichkeit erreicht werden kann.

Da eine fehlende *BCL11b*-Expression mit einer schlechten Prognose einherging, wurde *BCL11b* auf Mutationen untersucht. In vorherigen Studien betrafen Mutationen zum großen Teil die Zinkfinger motive im Exon 4; die Untersuchung wurde daher auf diese Region beschränkt.^{69,70} Es zeigte sich eine Mutationsfrequenz von 3 % in der ETP-ALL-Kohorte und 14 % in der T-ALL-Kohorte. Die Mutationsfrequenz bei adulten Patient_innen lag damit im Rahmen der zuvor in pädiatrischen Kohorten gefundenen 9 bis 16 % und war vom Immunphänotyp der Blasten abhängig: Wie ETP-ALL-Patient_innen wiesen auch in der frühen T-ALL-Subgruppe nur 3 % der Patient_innen *BCL11b*-Mutationen auf, während es in der thymischen T-ALL-Subgruppe 21 % waren.^{69,70} Dieses Ergebnis deckt sich mit einer vorherigen Studie, bei der Patient_innen, die als „früher/unreifer“ Phänotyp klassifiziert waren, weniger Mutationen aufwiesen.⁷¹ Anders als in der zitierten Studie wurde in dieser Arbeit keine Assoziation zwischen Prognose und *BCL11b*-Mutationen gefunden. In der Studie von van Vlierberghe *et al.* wurden jedoch nur insgesamt vier Patient_innen mit *BCL11b*-Mutationen identifiziert; die statistische Aussagekraft der prognostischen Auswertung ist daher fraglich.⁷¹

Ob *BCL11b* nun ein Tumorsuppressor ist, dessen Deregulation zur Leukämogenese führt oder ob die Expressionshöhe des Gens lediglich den Reifegrad kennzeichnet, bei dem die Blasten

durch andere genetische Lesionen arretiert sind, kann hier nicht abschließend geklärt werden. Der hohe Anteil an Patient_innen mit *BCL11b*-Mutationen deutet jedoch auf eine Involvierung des Gens bei der Leukämogenese hin. Warum Patient_innen mit Mutationen einen reiferen Immunphänotyp besitzen und Mutationen keine prognostische Relevanz besitzen, kann in dieser deskriptiven Untersuchung jedoch nicht geklärt werden. Um den exakten Einfluss von *BCL11b*-Mutationen auf die Differenzierung von T-Vorläuferzellen zu untersuchen, bedarf es daher weiterführender funktioneller Untersuchungen.

Dafür, dass die Expressionshöhe von *BCL11b* einen Indikator für die Blastendifferenzierungsstufe darstellt, spricht die Assoziation mit der Expression eines anderen reifespezifischen T-Zelltranskriptionsfaktors: *GATA3*. Eventuell bildet die qRT-PCR-Messung der *BCL11b*-Expression die genaue T-Zellentwicklungsstufe der Blasten sensitiver ab, als es die durchflusszytometrische Bestimmung immunphänotypischer Marker vermag. Diese Vermutung wird unterstützt von dem Ergebnis, dass die *BCL11b*-Expression ein signifikanter Prädiktor für die Prognose von T-ALL-Patient_innen ist; vor allem in der thymischen T-ALL-Subgruppe.

Bei der routinemäßigen Einteilung der T-ALL-Patient_innen in Risikogruppen zur risikoadaptierten Behandlung führt ein thymischer Immunphänotyp normalerweise zu einer Klassifizierung als Standardrisiko. Dennoch zeigt ein signifikanter Teil der thymischen T-ALL-Patient_innen ein unerwartet schlechtes Therapieanprechen und eine kurze Überlebenszeit. Es bleibt also notwendig, diese Patient_innen frühzeitig zu identifizieren und entsprechend durch intensivierete MRD-Beobachtung und Therapie, inklusive alloSZT, zu behandeln. Dies könnte in Zukunft, wie in Abbildung 30 dargestellt, durch die Bestimmung der *BCL11b*-Expression, eventuell in Kombination mit anderen stadiumsspezifischen T-Zelltranskriptionsfaktoren, geschehen. Um *BCL11b* als prognostischen Marker zu etablieren, wäre es jedoch zunächst notwendig, die Ergebnisse dieser Arbeit an einer unabhängigen Kohorte zu überprüfen. Dabei müsste vor allem der hier explorativ gewählte Referenzwert zur Klassifizierung der *BCL11b* „hoch“ oder „niedrig“ exprimierenden Patient_innen überprüft und methodisch für Routineuntersuchungen etabliert werden. Des Weiteren müssten nach diesen retrospektiven Untersuchungen prospektive Studien mit *BCL11b*-Expression als Risikofaktor folgen.

Als weitere Konsequenz der Erkenntnisse dieser Arbeit könnte *BCL11b* eine Zielstruktur für differenzierungsgerichtete Therapien darstellen, wie dies schon erfolgreich für promyelozytische Leukämien durch Behandlung mit all-*trans*-Retinsäure entwickelt wurde.¹²⁹ Eine Hochregulation von *BCL11b* in T-ALL-Blasten mit fehlender oder geringer Expression könnte die Differenzierung der Blasten zu funktionalen T-Zellen in T-ALL-Patient_innen bewirken. Um diesen Therapieansatz zu entwickeln, ist es jedoch zunächst essenziell ein genaueres Wissen über Transkriptionsmuster und Funktion von *BCL11b* und anderer Kandidatengene während der humanen T-Zellentwicklung zu gewinnen. Die meisten Studien wurden bisher *in vivo* in Maus-Modellen oder durch *in-vitro*-Kokultivierungssysteme mit der murinen Stromazelllinie OP9 (ATCC CRL-2749) durchgeführt; es ist daher notwendig geeignete Methoden zu entwickeln, die Vorgänge im humanen System präzise abbilden.¹³⁰

4.2 DISKUSSION TEIL II:

IGFBP7-INDUZIERTE CHEMOTHERAPIERESISTENZ IN T-ALL-ZELLEN

Durch die Ko-Expression von *IGFBP7*- in AML- und T-ALL-Patient_innen mit dem negativen prognostischen Marker *BAALC* wurde das Gen erstmals als potenzieller Akteur in akuten Leukämien identifiziert.¹¹¹ Weitere Analysen zeigten eine heterogene Expression des Gens in der T-ALL, die mit Chemotherapieversagen und kürzerem Gesamtüberleben assoziiert war.¹¹¹ Um diesen Zusammenhang *in vitro* zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von *IGFBP7*-Expression auf Proliferationsverhalten und Sensitivität gegenüber chemotherapeutischen Substanzen von Leukämie-Zelllinien getestet.

Es zeigte sich, dass durch Transfektion mit siRNAs zwar eine starke Reduktion der *IGFBP7*-Expression in den AML-Zelllinien KG1a und HL-60 erreicht werden konnte, dieser *Knockdown* jedoch keine messbare Auswirkung auf Proliferation und Apoptoserate der Zellen hatte. In einer vorherigen Studie war eine signifikante Reduktion der Viabilität der Zelllinie U937 durch Transfektion einer gegen *IGFBP7* gerichteten siRNA erreicht worden.¹¹⁶ Diese adhärente Zelllinie entstammt jedoch einem histiozytischen Lymphom (Histiozyt: Gewebsmakrophage) und keiner akuten Leukämie; dies könnte, neben methodischen Differenzen, die abweichenden Ergebnisse erklären.

Bei Transfektion der T-ALL-Zelllinie Jurkat mit einem *IGFBP7*-Überexpressionsplasmid konnte dagegen eine verminderte Proliferation gemessen werden, die bei nährstofflimitierter Umgebung zu einer höheren Proliferation nach vier Tagen führte. Diese Beobachtung stimmt mit einer Vielzahl an Studien in malignen Zellen überein, bei denen eine Proliferationshemmung durch *IGFBP7*-Überexpression oder Zugabe von rekombinantem *IGFBP7*-Protein (r*IGFBP7*) erreicht wurde.^{107,109,110,115} Auch für Leukämiezellen wurde dieser Effekt bereits beschrieben.¹¹¹ Bei Messung der Zellzyklusphasenverteilung von *IGFBP7*-transfizierten im Vergleich zu kontrolltransfizierten Molt-4- und Jurkat-Klonen wurde eine Beeinflussung des Zellzyklus durch *IGFBP7* beobachtet: *IGFBP7*-Überexpression führte zu einem vermehrten G0/G1-Arrest der Zellen, während weniger Zellen in der G2/M-Phase oder apoptotisch waren.

G0/G1-Arrest ist ein Mechanismus leukämischer Blasten zytostatischen Substanzen zu widerstehen, die während der Mitose wirken.¹³¹ Korrespondierend damit waren die *IGFBP7*-transfizierten Jurkat-Zellen in Proliferations- und Apoptoseassays signifikant resistenter gegenüber Vincristin, das in der G2/M-Phase des Zellzyklus wirkt. Gegen Etoposid, das neben der G2/M-Phase auch in der S-Phase wirkt, zeigten die Zellen nur eine leichte, nicht signifikante Resistenz. Gar kein Unterschied zwischen *IGFBP7*- und kontrolltransfizierten Zellen war bei Behandlung mit AraC zu messen, das seine zytotoxische Wirkung ausschließlich in der S-Phase des Zellzyklus entfaltet.

Neben Vincristin waren *IGFBP7*-transfizierte Jurkat-Zellen auch gegen Asparaginase, das unabhängig vom Zellzyklusstatus wirkt, resistent. Eine Assoziation von *IGFBP7* mit Asparaginase-Resistenz war bereits bei ALL-Blasten gezeigt worden.¹¹⁷ Hier induzierte *IGFBP7* Asparaginsynthase-Expression. *IGFBP7*-vermittelte Resistenz gegenüber Vincristin

war jedoch bis zu dieser Arbeit noch nicht gezeigt worden.

Um die beobachtete funktionelle Rolle von IGFBP7 in den Kontext des IGF-Systems zu setzen, wurde die Untersuchung auf den Knotenpunkt des IGF-Signalwegs, IGF1-R ausgeweitet. In einer Studie von Evdokimova *et al.* konnte eine direkte Interaktion von IGFBP7 mit der extrazellulären Domäne von IGF1-R nachgewiesen werden.¹³² Hier führte rIGFBP7-Zugabe bei einer Brustkrebszelllinie zu einer verminderten Internalisierung von IGF1-R und damit einer erhöhten Oberflächenpräsenz des Rezeptors. In der vorliegenden Arbeit wurde ein gegenteiliger Effekt beobachtet: Nach *IGFBP7*-Überexpression in Jurkat-Zellen wurde eine niedrigere IGF1-R-Expression im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen gemessen. Nicht nur die durchflusszytometrisch gemessene IGF1-R-Expression an der Zelloberfläche war geringer, sondern auch die IGF1-R-Gesamtproteinmenge. Die mRNA-Expression von *IGF1-R* war dabei nicht verändert. Eine mögliche Erklärung dieser Ergebnisse ist, dass sezerniertes IGFBP7 an IGF1-R band und eine posttranslative Reduzierung des Rezeptors durch vermehrte Internalisierung und Degradierung induzierte. Um diese Vermutung zu bestätigen, müssten jedoch weitere Versuche, wie z.B. eine Co-Immunpräzipitation von IGFBP7 und IGF1-R, durchgeführt werden. Interessant wäre auch eine immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung um eine vermehrte Internalisierung von IGF1-R nach *IGFBP7*-Transfektion zu beobachten.

Interessanterweise wurde in der T-ALL-Zelllinie Molt-4 eine geringere Veränderung des Zellzyklus durch *IGFBP7*-Überexpression gemessen und kein signifikanter Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Zellen beobachtet. Auch waren *IGFBP7*-transfizierte Molt-4-Zellen nicht resistenter gegenüber Zytostatika als kontrolltransfizierte Zellen. Dieser Unterschied zu den Ergebnissen von Versuchen mit Jurkat kann eventuell durch die geringe native IGF1-R-Expression von Molt-4 erklärt werden. Wenn IGFBP7 durch Modulation des IGF-Signalwegs wirkt, sollte eine Deregulation der IGFBP7-Expression in einer Zelllinie mit einer geringeren Bedeutung dieses Signalwegs konsequenterweise weniger Einfluss haben.

Auf den ersten Blick gegensätzlich zu den Ergebnissen dieser Arbeit ist eine kürzlich erschienene Publikation von Verhagen *et al.* zu IGFBP7 in AML-Zelllinien.¹³³ Hier wurde durch Überexpression oder Zugabe von rIGFBP7 auch eine signifikante Verminderung der Proliferation beobachtet, diese jedoch einer Erhöhung der Apoptoserate zugeschrieben. Bei Zellzyklusanalysen der Zelllinie Kasumi-1 nach rIGFBP7-Zugabe wurde ein größerer Anteil der Zellen in der G2/M-Phase und ein niedrigerer Anteil in der G1-Phase gemessen. Es ist jedoch zu beachten, dass in der Studie weder für Apoptose- noch für Zellzyklusanalysen statistische Signifikanzen berechnet wurden.

Verhagen *et al.* beobachteten zusätzlich eine größere Sensitivität der Zelllinie NB4 gegenüber den Zytostatika Doxorubicin, AraC und Etoposid bei gleichzeitiger Behandlung mit rIGFBP7. Die Zelllinie K562 war ebenfalls bei Behandlung mit rIGFBP7 sensitiver gegenüber Doxorubicin, zeigte aber, wie in der vorliegenden Arbeit, keine IGFBP7-induzierte Veränderung der Proliferation.

Wenn IGFBP7 in den verwendeten AML-Zelllinien zu einem erhöhten Anteil an Zellen in der G2/M-Phase führt, so ist es einleuchtend, dass sich die Sensitivität für Etoposid und Doxorubicin erhöhte, da diese (unter anderem) in der G2/M-Phase wirken. Warum die

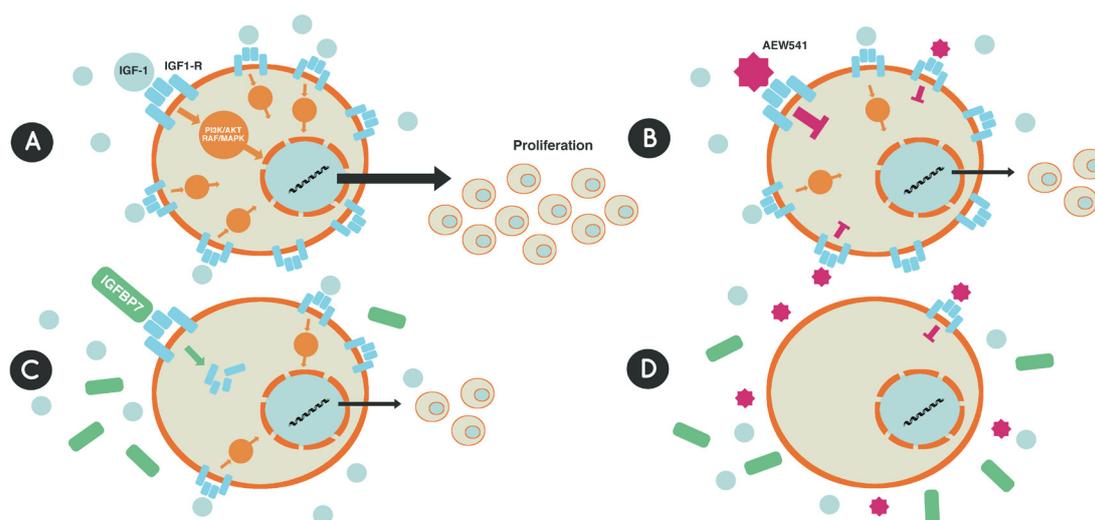


Abbildung 31: Modell der Wirkung von IGFBP7 im Zusammenspiel mit IGF1-R-Inhibition auf leukämische Blasten

A: Nach Binden von Liganden aktiviert IGF1-R durch den PI3K/AKT- und den RAF-MAPK-Signalweg Proliferation und anti-apoptotische Signale.

B: Der IGF1-R-Inhibitor AEW541 bindet spezifisch an IGF1-R und hemmt so die dem Rezeptor nachgeschalteten Signalwege und die Proliferation der IGF1-R exprimierenden Blasten.

C: IGFBP7 interagiert mit dem IGF1-R-Rezeptor und bewirkt dessen Internalisierung und Abbau. Durch weniger IGF-Signale wird die Proliferation reduziert und die Zellen verharren länger in der G0/G1-Phase des Zellzyklus.

D: Die Kombination von IGFBP7 und IGF1-R-Inhibition durch AEW541 führt zu einer vollständigen Blockade von IGF-Signalen und damit zur Apoptose.

Sensitivität auch für das in der S-Phase wirkende AraC durch rIGFBP7 erhöht wurde, ist weniger nachvollziehbar. Der unterschiedliche Effekt von IGFBP7 auf den Zellzyklus in dieser Arbeit und in der Studie von Verhagen *et al.* ist ebenfalls anhand des jetzigen Wissensstands nicht nachvollziehbar und kann nur durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Eventuell ist die funktionelle Rolle von IGFBP7 zellkontextabhängig und unterscheidet sich zwischen AML- und T-ALL-Blasten.

Die zitierten Autor_innen schließen aus ihren Ergebnissen, dass IGFBP7 zumindest in Teilen IGF-unabhängig wirkt, da auch eine Zelllinie ohne IGF1-R-Expression von rIGFBP7 proliferationsinhibiert wurde. Es wurde hier jedoch in keiner Zelllinie eine Messung des IGF1-R-Gesamtproteins ohne Kombination von rIGFBP7- mit rIGF-1-Zugabe durchgeführt, daher sind die Ergebnisse mit den Messungen in dieser Arbeit in T-ALL-Zelllinien schwer vergleichbar.

Eine Gemeinsamkeit zu Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit ist der fehlende Einfluss von IGFBP7 auf Phosphorylierung und Gesamtmenge von den IGF1-R nachgeschalteten Signalwegsproteinen ERK und AKT. Veränderungen dieser Signalwege wurden versuchsweise auch im Rahmen der Arbeit zur vorliegenden Dissertation durchflusszytometrisch bei IGFBP7-transfizierten Jurkat-Zellen untersucht (nicht dargestellt). Dabei wurde kein Unterschied zwischen IGFBP7- und kontrolltransfizierten Jurkat-Zellen festgestellt. Es ist jedoch möglich, dass der fehlende Effekt auf den PI3K/AKT-Signalweg auf der konstitutiven

AKT-Aktivierung bei Jurkat beruht, die durch Depletion des Tumorsuppressors *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) zustande kommt.¹³⁴

Da *IGFBP7*-Überexpression Auswirkungen auf den IGF-1-Signalweg hatte, wurde im nächsten Schritt die Kombination von *IGFBP7*-Überexpression und IGF-1R-Hemmung untersucht. Dafür wurde der niedermolekulare IGF1-R-Inhibitor AEW541 verwendet. Während die Molt-4 Zellen, bei denen zuvor nur eine sehr niedrige IGF1-R-Expression gemessen worden war, nur geringe Proliferationsinhibition zeigten, waren Jurkat-Zellen sensitiv gegenüber AEW541. Da AEW541 eine hohe Spezifität gegen IGF1-R besitzt, ist es unwahrscheinlich, dass die Toxizität des Inhibitors durch Wirkung auf andere Tyrosinkinaserzeptoren zustande kam.¹³⁵ *IGFBP7*-transfizierte Jurkat-Zellen zeigten eine stärkere Proliferationshemmung bei Behandlung mit AEW541 als die Kontrollklone. Auch die Apoptoserate war größer in den *IGFBP7*-exprimierenden Jurkat-Zellen bei IGF1-R-Inhibition. Ein mögliches Erklärungsmodell ist in Abbildung 31 schematisch dargestellt: Die *IGFBP7*-Überexpression führte zu einer geringeren IGF1-R-Abundanz und damit geringerer Proliferation; bei zusätzlicher Proliferationsinhibition durch Blockierung des IGF-Signalwegs durch AEW541 kam es vermehrt zu Apoptose als bei kontrolltransfizierten Zellen.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass *IGFBP7* in einem *in-vitro*-T-ALL-Modell G0/G1-Arrest und Chemotherapieresistenz fördert. Beide Eigenschaften zeichnen sogenannte Krebsstammzellen aus, deren Existenz das spätere Erscheinen von Rezidiven nach vermeintlich erfolgreicher Eliminierung der Tumorzellen bei Krebserkrankungen erklärt.¹³⁶ Die malignen Zellen einer Krebserkrankung sind keine genetisch homogene Population, sondern gehören Subpopulationen an, die sich in ihren genetischen Läsionen, ihrer Epigenetik und daraus folgend in ihrem Proliferationsverhalten unterscheiden. Einige Zellen besitzen einen stammzellartigen Phänotyp, der zu einem Zustand der Quieszenz führt. Diese ruhenden Krebszellen verbleiben in der G0/G1-Phase des Zellzyklus, sind metabolisch inaktiver und überstehen dadurch Behandlungen mit zytostatischen Medikamenten. Ähnlich wie normale Stammzellen können sie später wieder aus dem Ruhezustand in den mitotischen Zellzyklus eintreten und so den Grundstein von Rezidiven darstellen.¹³⁷ Krebsstammzellen, im Kontext akuter Leukämien als Leukämienstammzellen (*leukemic stem cells*: LSCs, Abbildung 32) bezeichnet, umgehen Chemotherapeutika aber nicht nur passiv, sondern besitzen auch aktive Resistenzmechanismen wie die Expression von Effluxpumpen und effiziente DNA-Reparaturmechanismen.¹³⁸

IGFBP7 könnte eine Rolle bei der Induktion und Erhaltung eines quieszenten Blasten-Phänotyps spielen. Analog zu HSCs werden LSCs von der Mikroumgebung der Knochenmarksnische durch Interaktion mit Knochenmarksstromazellen erhalten.¹³⁹ Es wurde bereits gezeigt, dass *IGFBP7* Anteil an resistenzinduzierender Interaktion zwischen Blasten und Stromazellen trägt.¹¹⁷ Ein weiteres Indiz für die Wirkung von *IGFBP7* in dieser LSC-schützenden Mikroumgebung ist die bis zu 100-fach höhere *IGFBP7*-Proteinexpression in Stromazellen des Knochenmarks im Vergleich zu Serumwerten.³⁶ Eine hohe *IGFBP7*-Konzentration in der Knochenmarksnische könnte in einer positiven Feedback-Schleife die Erhöhung der *IGFBP7*-Expression in LSC bewirken, wie es *in vitro* in Leukämiezelllinien

bei Zugabe von rIGFBP7 gezeigt wurde.¹¹¹ Weitere Hinweise kommen von Microarray-Expressionsstudien von T-ALL-Patient_innen: Bei *IGFBP7*-hochexprimierenden Patient_innen wurde eine Hochregulation unter anderem von *ANG1* (*Angiopoietin-1*), *ITGA9* (*Integrin, alpha 9*) und *ALCAM* (*Activated leukocyte cell adhesion molecule*) gefunden, die alle eine Rolle bei Adhäsion und *engraftment* (Anwachsen) von HSCs in der Knochenmarksnische spielen.¹⁴⁰⁻¹⁴³

In verschiedenen *in-vitro*-Studien wurde gezeigt, dass die Behandlung mit IGF1-R-Inhibitoren in der Lage ist, auch chemoresistente Krebsstammzellen zu eliminieren.^{144,145} In klinischen Studien zeigte die Behandlung mit diesen Substanzen jedoch bis jetzt keine überzeugenden Erfolge, da nur wenige Patient_innen auf die Behandlung mit IGF1-R-Inhibitoren ansprachen.⁹⁸ Es ist also notwendig, der genetischen Komplexität von Krebserkrankungen gerecht zu werden und Biomarker zu finden, mit denen die Patient_innen identifiziert werden können, für die IGF1-R-Inhibition von Vorteil wäre. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass *IGFBP7*-Expression im Kontext von T-ALL-Erkrankungen ein solcher prädiktiver Marker sein könnte. In Kombination mit der *IGF1-R*-Expressionshöhe könnte er eine mögliche Chemotherapieresistenz voraussagen und Indikation für eine sensibilisierende Behandlung mit IGF1-R-Inhibitoren darstellen.

Um diesen potenziellen Therapieansatz weiterzuentwickeln, muss zunächst die funktionelle Rolle von *IGFBP7* und nachgeschalteter Signalwege noch weiter definiert werden. Die hier in einem Zelllinienmodell gezeigten Mechanismen müssen in primären Blasten von Patient_innen überprüft werden. Über die Rolle von LSCs in der Stammzellnische ist bei T-ALLs momentan wenig bekannt und die Hinweise auf ein Wirken von *IGFBP7* in diesem Kontext bedürfen weitere Untersuchungen.

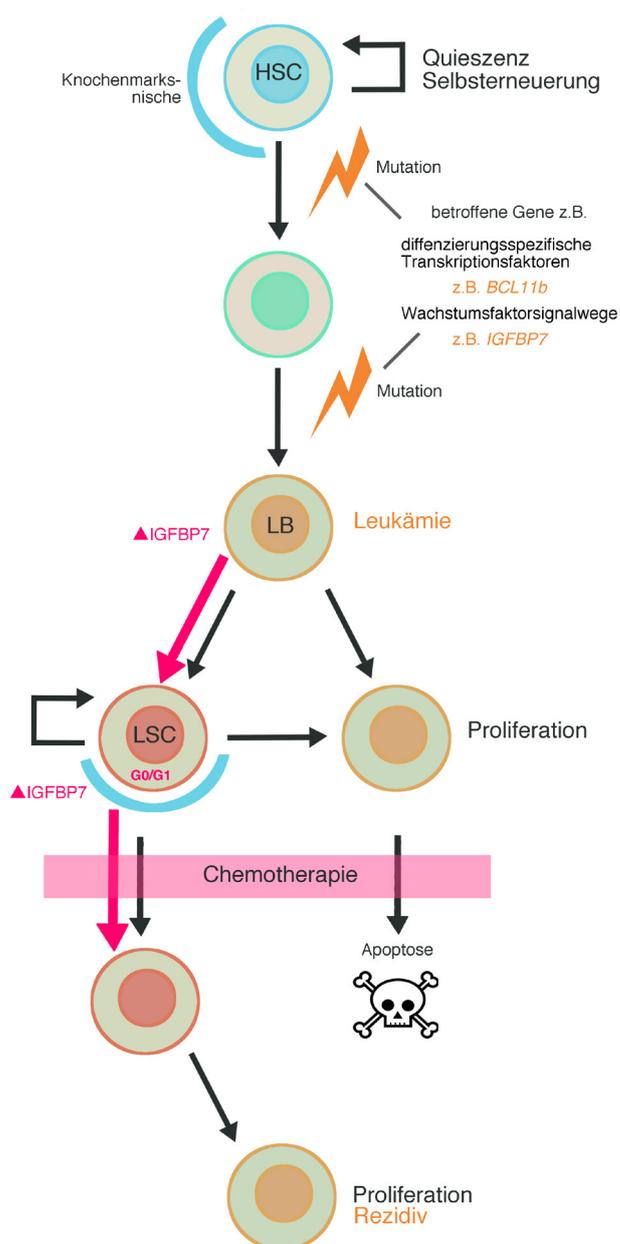


Abbildung 32: Leukämienstammzellen-Modell

Durch verschiedene Mutationen kommt es zu einer leukämischen Transformation hämatopoetischer Vorläuferzellen. Einige dieser Blasten besitzen, ähnlich den HSC, das Potenzial zur Selbsterneuerung und Quieszenz und können in der hämatopoetischen Nische des Knochenmarks Behandlungen mit Chemotherapeutika überstehen. Hochregulation von *IGFBP7* fördert die Erhaltung dieser LSC in der Knochenmarksnische und damit Chemotherapieresistenz.

HCS = *hematopoietic stem cell*, hämatopoetische Stammzelle; LB = leukämische Blaste; LSC = *leukemic stem cell*, Leukämienstammzelle

4.3 FAZIT

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei bedeutende Kandidatengene der T-ALL untersucht und damit ein Beitrag zur Aufklärung der molekulargenetischen Grundlagen der Pathogenese von T-ALLs geleistet. Beide Teile der Arbeit deuten Ansätze zu Therapieoptimierungen an, deren Relevanz nur durch weiterführende Forschungsarbeit geklärt werden kann.

5 Zusammenfassung

Akute T-lymphoblastische Leukämien (T-ALL) sind genetisch heterogene Erkrankungen, deren Überlebensrate in den letzten Jahrzehnten durch Therapieoptimierung zwar verbessert werden konnte, aber dennoch heute bei erwachsenen Patient_innen bei nur 30 bis 50 % liegt. Es ist daher notwendig die Auswirkung von für T-ALLs charakteristischer genetischer Aberrationen zu entschlüsseln und basierend auf diesen Erkenntnissen neue Therapien zu entwickeln, die spezifisch gegen leukämische Blasten wirken.

In dieser Arbeit konnten zwei Kandidatengene genauer charakterisiert werden, die auf unterschiedlichem Wege jeweils T-ALL-Pathogenese und Progression beeinflussen.

B-Cell CLL/Lymphoma 11B (BCL11b) ist ein essenzieller T-Zell-Transkriptionsfaktor. In dieser Arbeit wurde bei insgesamt 264 Patient_innen der German Multicenter Acute Lymphoblastic Leukemia Study Group (GMALL)-Kohorte und gesunden Kontrollpersonen die BCL11b-mRNA-Expression durch quantitative Real-Time PCR bestimmt. Es zeigte sich eine Assoziation einer niedrigen BCL11b-Expression mit einem unreifen Blasten-Immunphänotyp und einer geringeren Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit nach 5 Jahren (Ü) (BCL11b-niedrig: n = 40, 35 % Ü; BCL11b-hoch: n = 129, 53 % Ü; P = 0,02). Besonders ausgeprägt war dieser Zusammenhang bei Patient_innen der als Standardrisiko bewerteten thymischen T-ALL-Subgruppe (BCL11b-niedrig: n = 18, 20 % Ü; BCL11b-hoch: n = 84, 62 % Ü; P < 0,001). Zusätzlich wurde durch Sanger-Sequenzierung eine hohe Mutationsrate des Exon 4 von BCL11b bei T-ALL-Patient_innen gefunden (14 %). Diese Ergebnisse charakterisieren BCL11b als wichtigen prognostischen Faktor der T-ALL, der besonders bei thymischen T-ALL-Patient_innen ein niedrigere Überlebenswahrscheinlichkeit anzeigt und Indikation für eine intensiviertere Therapie geben könnte.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde mit Insulin-like growth factor binding protein 7 (IGFBP7) ein Mitglied des Insulin-like growth factors (IGF)-Systems untersucht.

Vor dem Hintergrund der Assoziation einer hohen IGFBP7-Expression mit Chemotherapie-resistenz bei T-ALL-Patient_innen wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung von Knockdown und Überexpression von IGFBP7 in Leukämiezelllinien untersucht. Eine Überexpression des Gens führte dabei in der T-ALL-Zelllinie Jurkat zu einer geringeren Proliferation. In den T-ALL-Zelllinien Molt-4 und Jurkat war ein größerer Anteil an IGFBP7-transfizierten Zellen in G0/G1-Arrest als kontrolltransfizierte Zellen. Zusätzlich induzierte IGFBP7-Überexpression in Jurkat-Zellen Resistenz gegenüber den Zytostatika Vincristin und Asparaginase. Sowohl die Oberflächenexpression als auch die Gesamtproteinmenge des IGF-1-Rezeptors (IGF1-R) war in IGFBP7-transfizierten Jurkat-Zellen reduziert und Behandlung mit dem IGF1-R-Inhibitor AEW541 konnte die IGFBP7-induzierte Resistenz gegenüber Vincristin aufheben.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse ein Modell zu IGFBP7-assoziiertem Therapieversagen in T-ALL-Patient_innen auf: Möglicherweise reduziert eine erhöhte Expression von IGFBP7 auf parakrinem oder autokrinen Weg IGF1-R-Signale. Dies resultiert in einem G0/G1-Arrest der Blasten, der mit einer Resistenz gegen bestimmte Zytostatika einhergeht. IGFBP7-Expression könnte daher als Biomarker fungieren, der auf mögliche Chemotherapieresistenzen hinweist, und eine Indikation für den Einsatz von IGF1-R-Inhibitoren darstellt.

6 Abstract

Acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) is a genetically heterogeneous disease and although its survival rate has increased during the last decades, it still remains only at 30 to 50 % in adult patients. Therefore it is necessary to decipher the consequences genetic aberrations characteristic for T-ALL and, based on these findings, develop new therapies, which specifically target leukemic blasts.

This work was able to characterize two candidate genes, who influence the pathogenesis and progression of T-ALL through different pathways, respectively.

B-Cell CLL/Lymphoma 11B (BCL11b) is an essential T-cell transcription factor.. In this study BCL11b mRNA expression was determined in 264 T-ALL patients of the German Multicenter Acute Lymphoblastic Leukemia Study Group (GMALL) cohort and healthy controls by qRT-PCR. Low BCL11b expression in T-ALL patients was associated with an immature blast immunophenotype and a lower 5-year overall survival (OS) (BCL11b-low: n = 40, 35 % OS; BCL11b-high: n = 129, 53 % OS; P = 0.02). This association was especially strong in the subgroup of thymic T-ALL patients, normally rated as standard risk (BCL11b-low: n = 18, 20 % OS; BCL11b-high: n = 84, 62 % OS; P < 0.001). Additionally Sanger sequencing identified a high mutation rate (14%) of BCL11b exon 4 in T-ALL patients. These results characterize BCL11b as an important prognostic factor in T-ALL which low expression indicates, especially in thymic T-ALL patients, a poor prognosis and could imply the need for therapy intensification.

In the second part of this work the functional role of Insulin-like growth factor binding protein 7 (IGFBP7), a member of the Insulin-like growth factors (IGF) system was investigated.

In light of the association of high IGFBP7 expression with chemotherapy resistance in T-ALL patients this study investigated the effect of a knockdown or an overexpression of IGFBP7 in human leukemic cell lines. Overexpression of the gene in the T-ALL cell line Jurkat resulted in reduced proliferation. In the T-ALL cell lines Molt-4 and Jurkat a larger percentage of IGFBP7-transfected cells were in G0/G1 arrest than control-transfected cells. IGFBP7 overexpression additionally induced resistance against the cytostatic drugs vincristine and asparaginase. Both surface expression and total protein abundance of the IGF-1 receptor (IGF1-R) was reduced in IGFBP7-transfected Jurkat cells and treatment with small molecule IGF1-R inhibitor AEW451 was able to abrogate the IGFBP7-induced resistance against vincristine.

In summary these results illustrate a model of IGFBP7-associated therapy failure in T-ALL patients: an increased expression of IGFBP7 possibly reduces IGF1-R signalling in a paracrine or autocrine manner. This in turn results in an increase of G0/G1 arrest in the leukemic blasts, which leads to their resistance against certain cytostatic drugs inactive in this cell cycle phase. High IGFBP7 expression could represent a biomarker for chemotherapy resistance and indicate treatment with IGF1-R inhibitors.

7 Literaturverzeichnis

1. Rodak B, Frisma G, Keohane E. Hematology: Clinical Principles and Applications. Saunders Elsevier; 2007. 4. Auflage, ISBN 978-1-4160-3006-5.
2. Koch U, Radtke F. Mechanisms of T cell development and transformation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2011;27:539–62.
3. Luc S, Luis T, Boukarabila H, et al. The earliest thymic T cell progenitors sustain B cell and myeloid lineage potential. *Nat. Immunol.* 2012;13(4):412–19.
4. Parekh C, Crooks GM. Critical Differences in Hematopoiesis and Lymphoid Development Between Humans and Mice. *J. Clin. Immunol.* 2013;33(4):711–15.
5. Ceredig R. Fates and potentials of thymus-seeding progenitors. *Nat. Immunol.* 2012;13(4):309–310.
6. Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester G-R. Taschenatlas der Immunologie. 2006. 2. Auflage, ISBN 978-3-13-115382-1.
7. Rothenberg E V. Transcriptional drivers of the T-cell lineage program. *Curr. Opin. Immunol.* 2012;24(2):132–8.
8. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1971;68(4):820–3.
9. Hanahan D, Weinberg R a. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.
10. Ding L, Ley TJ, Larson DE, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature.* 2012;481(7382):506–10.
11. 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.
12. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br. J. Haematol.* 1976;33:451–58.
13. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K.* 1995;9:1783–6.
14. Gökbuget N, Hoelzer D. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. *Semin. Hematol.* 2009;46(1):64–75.
15. Faderl S, O'Brien S, Pui C-H, et al. Adult acute lymphoblastic leukemia: concepts and strategies. *Cancer.* 2010;116(5):1165–76.
16. Bassan R, Hoelzer D. Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2011;29(5):532–43.
17. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, et al. Early T-cell precursor leukemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukemia identified in two independent cohorts. *Lancet Oncol.* 2009;10(2):147–156.
18. Neumann M, Heesch S, Gökbuget N, et al. Clinical and molecular characterization of early T-cell precursor leukemia: a high-risk subgroup in adult T-ALL with a high frequency of FLT3 mutations. *Blood Cancer J.* 2012;2(1):e55.
19. Cauwelier B, Dastugue N, Cools J, et al. Molecular cytogenetic study of 126 unselected T-ALL cases reveals high incidence of TCRbeta locus rearrangements and putative new T-cell oncogenes. *Leukemia.* 2006;20(7):1238–44.
20. Aifantis I, Raetz E, Buonamici S. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat. Rev. Immunol.* 2008;8(5):380–90.
21. Weng AP, Ferrando A a, Lee W, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science.* 2004;306(5694):269–71.
22. Lin Y, Nichols RA, Letterio JJ, Aplan PD. Notch1 mutations are important for leukemic transformation in murine models of precursor-T leukemia / lymphoma. *Blood.* 2006;107(6):2540–3.
23. Kraszewska MD, Dawidowska M, Szczepański T, Witt M. T-cell acute lymphoblastic leukaemia: recent molecular biology findings. *Br. J. Haematol.* 2012;156(3):303–15.
24. Small D. FLT3 mutations: biology and treatment. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2006;178–84.
25. Kraszewska MD, Dawidowska M, Kosmalka M, et al. BCL11B, FLT3, NOTCH1 and FBXW7 mutation status in T-cell acute lymphoblastic leukemia patients. *Blood Cells. Mol. Dis.* 2013;50(1):33–8.
26. Neumann M, Coskun E, Fransecky L, et al. FLT3 mutations in early T-cell precursor ALL characterize a stem cell like leukemia and imply the clinical use of tyrosine kinase inhibitors. *PLoS One.* 2013;8(1):e53190.
27. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood.* 2002;100(5):1532–42.
28. Anderson MK, Hernandez-Hoyos G, Diamond R a, Rothenberg E V. Precise developmental regulation of Ets family transcription factors during specification and commitment to the T cell lineage. *Development.* 1999;126(14):3131–48.
29. Baldus CD, Burmeister T, Martus P, et al. High expression of the ETS transcription factor ERG predicts adverse outcome in acute T-lymphoblastic leukemia in adults. *J. Clin. Oncol.* 2006;24(29):4714–20.
30. Thoms J, Birger Y, S SF, et al. ERG promotes T-acute lymphoblastic leukemia and is transcriptionally regulated in leukemic cells by a stem cell enhancer. *Blood.* 2011;117(26):7079–89.

31. Ariyaratana S, Loeb DM. The role of the Wilms tumour gene (WT1) in normal and malignant haematopoiesis. *Expert Rev. Mol. Med.* 2007;9:1–17.
32. Heesch S, Goekbuget N, Stroux A, et al. Prognostic implications of mutations and expression of the Wilms tumor 1 (WT1) gene in adult acute T-lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2010;95:942–9.
33. Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS, et al. BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics : a Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood.* 2003;102(5):1613–8.
34. Baldus CD, Martus P, Burmeister T, et al. Low ERG and BAALC Expression Identifies a New Subgroup of Adult Acute T-Lymphoblastic Leukemia With a Highly Favorable Outcome. *J. Clin. Oncol.* 2007;25(24):3739–45.
35. Baldus CD, Tanner SM, Kusewitt DF, et al. BAALC, a novel marker of human hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.* 2003;31(11):1051–6.
36. Disserationsschrift: Heesch S. Die Bedeutung von BAALC (brain and acute leukemia, cytoplasmic) und assoziierter Gene in akuten Leukämien. 2010; diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000019966
37. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature.* 2012;481(7380):157–63.
38. Berger DP, Engelhardt R, Mertelsmann R. Das rote Buch: Hämatologie und internistische Onkologie. ecomed Medizin; 2014, 5. Auflage, ISBN 978-3-609-51217-4.
39. GMALL Short Version Study Protocol, 2004; *European LeukemiaNet*; www.leukemia-net.org.
40. Gökbüget N, Kneba M, Raff T, et al. Risk-adapted treatment according to minimal residual disease in adult ALL. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2002;15(4):639–52.
41. Wheeler R. Abbildung „Cell cycle“. wikipedia.org; 2011
42. Sonneveld P. Multidrug resistance in haematological malignancies. *J. Intern. Med.* 2000;247(5):521–34.
43. Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, Talpaz M. Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias: From Basic Mechanisms to Molecular Therapeutics. *Ann. Intern. Med.* 2003;138:819–30.
44. Iqbal N, Iqbal N. Imatinib: a breakthrough of targeted therapy in cancer. *Chemother. Res. Pract.* 2014; 2014:357027.
45. Hoelzer D. Novel antibody-based therapies for acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2011;2011:243–9.
46. Palomero T, Ferrando A. Therapeutic targeting of NOTCH1 signalling in T-ALL. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 2009;9 Suppl 3:205-10
47. Jeannot G, Scheller M, Scarpellino L, et al. Long-term, multilineage hematopoiesis occurs in the combined absence of β -catenin and γ -catenin. *Blood.* 2008;111:142–9.
48. Weber BN, Chi AW-S, Chavez A, et al. A critical role for TCF-1 in T-lineage specification and differentiation. *Nature.* 2011;476(7358):63–8.
49. Scripture-Adams DD, Damle SS, Li L, et al. GATA-3 Dose-Dependent Checkpoints in Early T Cell Commitment. *J. Immunol.* 2014;193(7):3470-91.
50. Wakabayashi Y, Inoue J, Takahashi Y, et al. Homozygous deletions and point mutations of the Rit1/Bcl11b gene in γ -ray induced mouse thymic lymphomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003;301(2):598–603.
51. Kominami R. Role of the transcription factor Bcl11b in development and lymphomagenesis. *Proc. Japan Acad. Ser. B.* 2012;88:72–87.
52. Rothenberg E V, Zhang J, Li L. Multilayered specification of the T-cell lineage fate. *Immunol. Rev.* 2010;238(1):150–68.
53. Li L, Leid M, Rothenberg E V. An early T cell lineage commitment checkpoint dependent on the transcription factor Bcl11b. *Science.* 2010;329(5987):89–93.
54. Ikawa T, Hirose S, Masuda K, et al. An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage. *Science.* 2010;329(5987):93–6.
55. Liu P, Li P, Burke S. Critical roles of Bcl11b in T-cell development and maintenance of T-cell identity. *Immunol. Rev.* 2010;238(1):138–49.
56. Wakabayashi Y, Watanabe H, Inoue J, et al. Bcl11b is required for differentiation and survival of alphabeta T lymphocytes. *Nat. Immunol.* 2003;4(6):533–9.
57. Cherrier T, Suzanne S, Redel L, et al. p21WAF1 gene promoter is epigenetically silenced by CTIP2 and SUV39H1. *Oncogene.* 2009;28(38):3380-9.
58. Topark-ngarm A, Golonzhka O, Peterson VJ, et al. CTIP2 Associates with the NuRD Complex on the Promotor of p57KIP2, a Newly Identified CTIP2 Target Gene. *J. Biol. Chem.* 2006;281(43):32272–83.
59. Cismasiu VB, Paskaleva E, Daya SS, Canki M, Avram D. BCL11B is a General Transcriptional Repressor of the HIV-1 Long Terminal Repeat in T Lymphocytes through recruitment of the NuRD Complex. *Virology.* 2008;380(2):173–81.
60. Cismasiu VB, Adamo K, Gecewicz J, et al. BCL11B functionally associates with the NuRD complex in T lymphocytes to repress targeted promoter. *Oncogene.* 2005;24(45):6753–64.
61. Cismasiu VB, Ghanta S, Duque J, et al. BCL11B participates in the activation of IL2 gene expression in CD4+ T lymphocytes. *Blood.* 2006;108(8):2695–702.
62. Li L, Zhang J a, Dose M, et al. A far downstream enhancer for murine Bcl11b controls its T-cell specific expression. 2013;122(6):902-11

63. MacLeod R a F, Nagel S, Kaufmann M, Janssen JWG, Drexler HG. Activation of HOX11L2 by juxtaposition with 3'-BCL11B in an acute lymphoblastic leukemia cell line (HPB-ALL) with t(5;14)(q35;q32.2). *Genes. Chromosomes Cancer*. 2003;37(1):84–91.
64. Przybylski GK, Dik W a, Wanzeck J, et al. Disruption of the BCL11B gene through inv(14)(q11.2q32.31) results in the expression of BCL11B-TRDC fusion transcripts and is associated with the absence of wild-type BCL11B transcripts in T-ALL. *Leukemia*. 2005;19(2):201–8.
65. Bezroukove V, van Zelderen-Bhola SL, Brink A, et al. A novel t(6;14)(q25~q27;q32) in acute myelocytic leukemia involves the BCL11B gene. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2004;149(1):72–6.
66. Abbas S, Sanders M a, Zeilemaker A, et al. Integrated genome-wide genotyping and gene expression profiling reveals BCL11B as a putative oncogene in acute myeloid leukemia with 14q32 aberrations. *Haematologica*. 2014;99(5):848–57.
67. Oliveira JL, Kumar R, Khan SP, et al. Successful treatment of a child with T/myeloid acute bilineal leukemia associated with TLX3/BCL11B fusion and 9q deletion. *Pediatr. Blood Cancer*. 2011;56(3):467–9.
68. Fujimoto R, Ozawa T, Itoyama T, et al. HELIOS-BCL11B fusion gene involvement in a t(2;14)(q34;q32) in an adult T-cell leukemia patient. *Cancer Genet.* 2012;205(7-8):356–64.
69. Gutierrez A, Kentsis A, Sanda T, et al. The BCL11B tumor suppressor is mutated across the major molecular subtypes of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011;118(15):4169–73.
70. De Keersmaecker K, Real PJ, Gatta G Della, et al. The TLX1 oncogene drives aneuploidy in T cell transformation. *Nat. Med.* 2010;16(11):1321–7.
71. Van Vlierberghe P, Ambesi-Impimbato A, De Keersmaecker K, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2013;122(1):74–82.
72. Grabarczyk P, Nähse V, Delin M, et al. Increased expression of bcl11b leads to chemoresistance accompanied by G1 accumulation. *PLoS One*. 2010;5(9):
73. Grabarczyk P, Przybylski GK, Depke M, et al. Inhibition of BCL11B expression leads to apoptosis of malignant but not normal mature T cells. *Oncogene*. 2007;26(26):3797–810.
74. Huang X, Shen Q, Chen S, et al. Gene expression profiles in BCL11B -siRNA treated malignant T cells. *J. Hematol. Oncol.* 2011;4(1):23.
75. Pollak M. Insulin-like Growth Factors and Prostate Cancer. *Epidemiologic Rev.* 2001;90(12):911-5
76. Annunziata M, Granata R, Ghigo E. The IGF system. *Acta Diabetol.* 2011;48(1):1–9.
77. Ullrich A, Gray A, Tam AW, et al. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J.* 1986;5(10):2503–12.
78. Germain-Lee EL, Janicot M, Lammers R, Ullrich a, Casella SJ. Expression of a type I insulin-like growth factor receptor with low affinity for insulin-like growth factor II. *Biochem. J.* 1992;281(2):413–7.
79. Le Roith D. The insulin-like growth factor system. *Exp. Diabesity Res.* 2003;4(4):205–12.
80. Boisclair YR, Rhoads RP, Ueki I, Wang J, Ooi GT. The acid-labile subunit (ALS) of the 150 kDa IGF-binding protein complex: an important but forgotten component of the circulating IGF system. *J. Endocrinol.* 2001;170(1):63–70.
81. Duan C, Xu Q. Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2005;142:44–52.
82. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld R. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr. Rev.* 1999;20(6):761–87.
83. Ingermann AR, Yang Y, Han J, et al. Identification of a Novel Cell Death Receptor Mediating IGFBP-3-induced Antitumor Effects in Breast and Prostate Cancer. *J. Biol. Chem.* 2010;285(39):30233–46.
84. Schedlich LJ, Page SL Le, Firth SM, et al. Nuclear Import of Insulin-like Growth Factor-binding Protein-3 and -5 Is Mediated by the Importin beta-Subunit. *J. Biol. Chem.* 2000;275(31):23462–70.
85. Palmqvist R, Hallmans G, Rinaldi S, et al. Plasma insulin-like growth factor 1, insulin-like growth factor binding protein 3, and risk of colorectal cancer: a prospective study in northern Sweden. *Gut*. 2002;50(5):642–6.
86. Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Roddam AW. Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: pooled individual data analysis of 17 prospective studies. *Lancet Oncol.* 2010;11:530–42.
87. Samani AA, Yakar S, Leroith D, Brodt P. The Role of the IGF System in Cancer Growth and Metastasis: Overview and Recent Insights. *Endocr. Rev.* 2007;28(1):20 – 47.
88. Macaulay VM. Insulin-like growth factors and cancer. *Br. J. Cancer.* 1992;65(3):311–20.
89. Dawczynski K, Steinbach D, Wittig S, et al. Expression of components of the IGF axis in childhood acute myelogenous leukemia. *Pediatr. Blood Cancer.* 2008;50(1):24–28.
90. Vorwerk P, Wex H, Hohmann K, et al. Expression of components of the IGF signalling system in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Mol. Pathol.* 2002;22:40–45.
91. Wu H, Weksberg R, Minden MD, Squire JA. Loss of Imprinting of Human Insulin-like Growth Factor II Gene, IGF2, in Acute Myeloid Leukemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997;231:466–72.
92. Randhawa GS, Cui H, Barletta J a, et al. Loss of Imprinting in Disease Progression in Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood*. 1998;91(9):3144–7.
93. Chapuis N, Tamburini J, Cornillet-lefebvre P, et al. Autocrine IGF-1/IGF-1R signalling is responsible for constitutive PI3K/Akt activation in acute myeloid leukemia: therapeutic value of neutralizing anti-IGF-

- 1R antibody. *Haematologica*. 2009;95(3):415-23.
94. Jenkins CR, Shevchuk OO, Giambra V, et al. IGF signaling contributes to malignant transformation of hematopoietic progenitors by the MLL-AF9 oncoprotein. *Exp. Hematol*. 2012;40(9):715-723.e6.
95. Medyouf H, Gusscott S, Wang H, et al. High-level IGF1R expression is required for leukemia-initiating cell activity in T-ALL and is supported by Notch signaling. *J. Exp. Med*. 2011;208(9):1809-22.
96. Hales EC, Taub JW, Matherly LH. New insights into Notch1 regulation of the PI3K-AKT-mTOR1 signaling axis: targeted therapy of γ -secretase inhibitor resistant T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cell. Signal*. 2014;26(1):149-61.
97. Demarest RM, Ratti F, Capobianco A J. It's T-ALL about Notch. *Oncogene*. 2008;27(38):5082-91.
98. Gualberto A, Pollak M. Emerging role of insulin-like growth factor receptor inhibitors in oncology: early clinical trial results and future directions. *Oncogene*. 2009;28:3009-3021.
99. Webseite: ClinicalTrials.gov, U.S. National Institutes of Health, Stand: 31.12.2014.
100. Allison M. Clinical setbacks reduce IGF-1 inhibitors to cocktail mixers. *Nat. Biotechnol*. 2012;30(10):906-7.
101. Pollak M. The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nat. Rev. Cancer*. 2012;12(3):159-69.
102. Laskowski M, Qasim MA. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol*. 2000;1477:324-337.
103. Webseite: ensembl.org, Ensembl Genome Browser. Transcript: IGFBP7-001 ENST00000295666. Stand: 31.12.2014.
104. Landberg G, Ostlund H, Nielsen NH, et al. Downregulation of the potential suppressor gene IGFBP-rP1 in human breast cancer is associated with inactivation of the retinoblastoma protein, cyclin E overexpression and increased proliferation in estrogen receptor negative tumors. *Oncogene*. 2001;20(27):3497-505.
105. Ruan W, Xu E, Xu F, et al. IGFBP7 Plays a Potential Tumor Suppressor Role in Colorectal Carcinogenesis. *Cancer Biol. Ther*. 2007;6(3):354-359.
106. Tomimaru Y, Enguchi H, Wada H, et al. IGFBP7 downregulation is associated with tumor suppression and clinical outcome in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer*. 2012;130(2):319-27.
107. Chen D, Siddiq A, Emdad L, et al. Insulin-like growth factor-binding protein-7 (IGFBP7): a promising gene therapeutic for hepatocellular carcinoma (HCC). *Mol. Ther*. 2013;21(4):758-66.
108. Chen R, Chen H, Lin J, et al. In-vivo transfection of pcDNA3.1-IGFBP7 inhibits melanoma growth in mice through apoptosis induction and VEGF downexpression. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2010;29(13):1-8.
109. Chen R-Y, Chen H-X, Jian P, et al. Intratumoral injection of pEGFC1-IGFBP7 inhibits malignant melanoma growth in C57BL/6J mice by inducing apoptosis and down-regulating VEGF expression. *Oncol. Rep*. 2010;23(4):981-8.
110. Wajapeyee N, Kapoor V, Mahalingam M, Green MR. Efficacy of IGFBP7 for treatment of metastatic melanoma and other cancers in mouse models and human cell lines. *Mol. Cancer Ther*. 2009;8(11):3009-14.
111. Heesch S, Schlee C, Neumann M, et al. BAALC-associated gene expression profiles define IGFBP7 as a novel molecular marker in acute leukemia. *Leukemia*. 2010;24(8):1429-36.
112. Vizioli MG, Sensi M, Miranda C, et al. IGFBP7: an oncosuppressor gene in thyroid carcinogenesis. *Oncogene*. 2010;29:3835-3844.
113. Benatar T, Yang W, Amemiya Y, et al. IGFBP7 reduces breast tumor growth by induction of senescence and apoptosis pathways. *Breast Cancer Res. Treat*. 2012;133(2):563-73.
114. Zuo S, Liu C, Wang J, et al. IGFBP-rP1 induces p21 expression through a p53-independent pathway, leading to cellular senescence of MCF-7 breast cancer cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 2012;138:1045-1055.
115. Ma Y, Lu B, Ruan W, et al. Tumor suppressor gene insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 (IGFBP-rP1) induces senescence-like growth arrest in colorectal cancer cells. *Exp. Mol. Pathol*. 2008;85(2):141-5.
116. Hu S, Chen R, Man X, et al. Function and expression of insulin-like growth factor-binding protein 7 (IGFBP7) gene in childhood acute myeloid leukemia. *Pediatr. Hematol. Oncol*. 2011;28(4):279-87.
117. Laranjeira a B a, de Vasconcellos JF, Sodek L, et al. IGFBP7 participates in the reciprocal interaction between acute lymphoblastic leukemia and BM stromal cells and in leukemia resistance to asparaginase. 2012;26(5):1001-11.
118. Baldus CD, Burmeister T, Martus P, et al. High Expression of the ETS Transcription Factor ERG Predicts Adverse Outcome in Acute T-Lymphoblastic Leukemia in Adults. *J. Clin. Oncol*. 2009;24(29):4714-20.
119. Gökbüget N, Raff R, Brüggemann M, et al. Risk/MRD Adapted GMALL Trials in Adult ALL. *Ann. Hematol*. 2004;83 Suppl 1:129-131.
120. Rickham PP. Human Experimentation. Code of ethics of the World Medical Association. Declaration of Helsinki. *Br. Med. J*. 1964;2:177.
121. Krutzik PO, Irish JM, Nolan GP, Perez OD. Analysis of protein phosphorylation and cellular signaling events by flow cytometry: techniques and clinical applications. *Clin. Immunol*. 2004;110(3):206-21.
122. Van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*. 1998;31:1-9.
123. Scopes RK, Smith JA. Analysis of Proteins. *Curr. Protoc. Mol. Biol*. 2006;10:10.0
124. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-

- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156–9.
125. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 2008;3:1101–8.
 126. Lennox ES. Transduction of Linked Genetic Characters of the Host by Bacteriophage PI. *Virology.* 1:190–206.
 127. Kurosawa N, Fujimoto R, Ozawa T, et al. Reduced level of the BCL11B protein is associated with adult T-cell leukemia/lymphoma. *PLoS One.* 2013;8(1):e55147.
 128. Huang X, Chen S, Shen Q, et al. Analysis of the expression pattern of the BCL11B gene and its relatives in patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *J. Hematol. Oncol.* 2010;3(1):44.
 129. Kogan SC, Bishop JM. Acute promyelocytic leukemia : from treatment to genetics and back. *Oncogene.* 1999;18(38):5261–7.
 130. Schmitt TM, Ciofani M, Petrie HT, Zúñiga-Pflücker JC. Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. *J. Exp. Med.* 2004;200(4):469–79.
 131. Shah MA, Schwartz GK. Cell Cycle-mediated Drug Resistance : An Emerging Concept in Cancer Therapy Cell Cycle-mediated Drug Resistance : An Emerging Concept in. *Clin. Cancer Res.* 2001;7:2168–81.
 132. Evdokimova V, Tognon CE, Benatar T, et al. IGFBP7 binds to the IGF-1 receptor and blocks its activation by insulin-like growth factors. *Sci. Signal.* 2012;5(255):ra92.
 133. Verhagen HJ, de Leeuw DC, Roemer MG, et al. IGFBP7 induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells and synergizes with chemotherapy in suppression of leukemia cell survival. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1300.
 134. Abraham RT, Weiss A. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat. Rev.* 2004;4(4):301–8.
 135. García-Echeverría C, Pearson M a, Marti A, et al. In vivo antitumor activity of NVP-AEW541-A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase. *Cancer Cell.* 2004;5(3):231–9.
 136. Misaghian N, Ligresti G, Steelman LS, et al. Targeting the leukemic stem cell: the Holy Grail of leukemia therapy. *Leukemia.* 2009;23(1):25–42.
 137. Aguirre-ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat. Rev. Cancer.* 2007;7(11):834–846.
 138. Essers MAG, Trumpp A. Targeting leukemic stem cells by breaking their dormancy. *Mol. Oncol.* 2010;4(5):443–50.
 139. Lane SW, Scadden DT, Gilliland DG. Review article The leukemic stem cell niche : current concepts and therapeutic opportunities. *Blood.* 2009;114(6):4–6.
 140. Heesch S, Bartram I, Neumann M, et al. Expression of IGFBP7 in acute leukemia is regulated by DNA methylation. *Cancer Sci.* 2011;102(1):253–9.
 141. Arai F, Hirao A, Suda T. Regulation of hematopoietic stem cells by the niche. *Trends Cardiovasc. Med.* 2005;15(2):75–9.
 142. Schreiber TD, Steinl C, Essl M, et al. The integrin alpha9beta1 on hematopoietic stem and progenitor cells: involvement in cell adhesion, proliferation and differentiation. *Haematologica.* 2009;94(11):1493–501.
 143. Chitteti BR, Kobayashi M, Cheng Y, et al. CD166 regulates human and murine hematopoietic stem cells and the hematopoietic niche. *Blood.* 2014;124:519–29.
 144. Chang W-W, Lin R-J, Yu J, et al. The expression and significance of insulin-like growth factor-1 receptor and its pathway on breast cancer stem/progenitors. *Breast Cancer Res.* 2013;15(3):R39.
 145. Dallas N a, Xia L, Fan F, et al. Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. *Cancer Res.* 2009;69(5):1951–7.

8 Anhang

8.1 LEBENSLAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

8.2 PUBLIKATIONEN

8.2.1 Aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangene Teilpublikationen

Inhibition of IGF1-R overcomes IGFBP7-induced chemotherapy resistance in T-ALL

Isabelle Bartram, Ulrike Erben, Jutta Ortiz-Tanchez, Martin Neumann, Sandra Heesch, Claudia D. Baldus

[eingereicht bei BMC Cancer]

Low expression of T-cell transcription factor *BCL11b* predicts inferior survival in adult standard risk T-cell acute lymphoblastic leukemia patients

Isabelle Bartram, Nicola Goekbuget, Cornelia Schlee, Sandra Heesch, Lars Fransecky, Stefan Schwartz, Norbert Schmitz, Martin Wilhelm, Albrecht Reichle, Dieter Hoelzer, Claudia D. Baldus, Martin Neumann

Journal of Hematology and Oncology. 07/2014 ;7(1):51

8.2.2 Weitere Publikationen

Mutational spectrum of adult T-ALL

Martin Neumann, Sebastian Vosberg, Cornelia Schlee, Sandra Heesch, Stefan Schwartz, Nicola Gökbuget, Dieter Hoelzer, Alexander Graf, Stefan Krebs, **Isabelle Bartram**, Helmut Blum, Monika Brüggemann, Jochen Hecht, Stefan K. Bohlander, Philipp A. Greif, Claudia D. Baldus
Oncotarget, July 15, 2014

Acute leukemias of ambiguous lineage in adults: molecular and clinical characterization.

Sandra Heesch, Martin Neumann, Stefan Schwartz, **Isabelle Bartram**, Cornelia Schlee, Thomas Burmeister, Matthias Hänel, Arnold Ganser, Michael Heuser, Clemens-Martin Wendtner, Wolfgang E Berdel, Nicola Gökbuget, Dieter Hoelzer, Wolf-Karsten Hofmann, Eckhard Thiel, Claudia D Baldus

Annals of Hematology. 02/2013; 92(6):747-58.

FLT3 Mutations in Early T-Cell Precursor ALL Characterize a Stem Cell Like Leukemia and Imply the Clinical Use of Tyrosine Kinase Inhibitors.

Martin Neumann, Ebru Coskun, Lars Fransecky, Liliana H Mochmann, **Isabelle Bartram**, Nasrin Farhadi Sartangi, Sandra Heesch, Nicola Gökbuget, Stefan Schwartz, Christian Brandts, Cornelia Schlee, Rainer Haas, Ulrich Dührsen, Martin Griesshammer, Hartmut Döhner, Gerhard Ehninger, Thomas Burmeister, Olga Blau, Eckhard Thiel, Dieter Hoelzer, Wolf-Karsten Hofmann, Claudia D Baldus

PLoS ONE. 01/2013; 8(1):e53190.

Expression of *IGFBP7* in acute leukemia is regulated by DNA methylation.

Sandra Heesch*, **Isabelle Bartram***, Martin Neumann, Jana Reins, Maximilian Mossner, Cornelia Schlee, Andrea Stroux, Torsten Haferlach, Nicola Gökbuget, Dieter Hoelzer, Wolf-Karsten Hofmann, Eckhard Thiel, Claudia D Baldus; (* geteilte Koautorinnenschaft)
Cancer Science. 09/2010; 102(1):253-9.

8.2.3 Konferenzbeiträge

Poster: Low Expression Of *BCL11B* Predicts Poor Overall Survival In Adult Standard Risk T-ALL

American Society for Hematology Annual Meeting 2013, New Orleans, USA

Isabelle Bartram, Nicola Gökbuget, Cornelia Schlee,, Sandra Heesch, Lars Fransecky, Stefan Schwartz, Dieter Hoelzer, Martin Neumann, Claudia D Baldus

Poster: Differential expression of *BCL11b* in adult T-ALL

Modern Trends in Human Leukemia and Cancer Wilsede Meeting 2012

Isabelle Bartram, Sandra Heesch, Martin Neumann, Nicola Goekbuget, Dieter Hoelzer, Stefan Schwartz, Claudia D. Baldus

8.3 DANKSAGUNG

Ich möchte mich zunächst besonders bei meiner Betreuerin Prof. Dr. Claudia Baldus für die Möglichkeit bedanken, unter ihrer exzellenten Betreuung die vorliegende Promotionsarbeit fertig zu stellen. Seit meinem ersten Praktikumstag in der Arbeitsgruppe vor sechs Jahren unterstützte sie mich fortwährend und war auch in Zeiten des größten Stresses immer ansprechbar und hilfsbereit.

Auch bei Prof. Dr. Reinhard Kunze möchte ich mich für die Übernahme der Zweitbetreuung und seine wertvollen Korrekturhinweise bedanken.

Bei allen meinen Kolleg_innen aus der Arbeitsgruppe möchte ich mich ebenfalls ganz herzlich für die Zusammenarbeit bedanken. Vor allem bei Dr. Sandra Heesch, die mich in der Vorbereitung und Anfangsphase meiner Arbeit intensiv betreute und Dr. Martin Neumann, der mir vor allem in den letzten Jahren bei Fragen geduldig zur Seite stand. Mein Dank gilt auch Frauke Liebertz für die hervorragende Zusammenarbeit und die schönen Mittagspausen.

Für die wissenschaftliche Zusammenarbeit möchte ich auch besonders Dr. Ulrike Erben danken, deren methodischen und inhaltlichen Anregungen unentbehrlich bei der Arbeit zu dieser Dissertation waren.

Des Weiteren waren meine Freund_innen außerordentlich wichtig um Dissertations-Durststrecken zu überwinden. Besonders bei meiner Mitbewohnerin seit sechs Jahren, Anne, möchte ich bedanken, dass sie mich auch in schlecht gelaunten Phasen ertragen hat. Auch meinem Freund Jan möchte ich für die Unterstützung in der Endphase der Promotion danken. Besonders großen Anteil am Zustandekommen dieser Arbeit trägt die „Doktorand_innen-Selbsthilfegruppe“ in der Sofia-Bar; ohne unseren wöchentlichen Austausch, wissenschaftlich und weniger wissenschaftlich, hätte ich eventuell nicht durchgehalten.