

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie/Hämatologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

**DISSERTATION**

**Insertionen in der Promotorregion des *MCL-1* Gens und deren klinische Relevanz bei  
Erstrezidiven einer akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Uta C. F. Nenning

aus Jena

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. Dr. K. Seeger  
2. Prof. Dr. J. Ritter  
3. Prof. Dr. M. Horstmann

Datum der Promotion: 03. Juli 2009

## Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	4
	I    Rezidive einer akuten lymphoblastischen Leukämie	4
	II   Apoptose, Tumorentstehung und Therapieresistenz	6
	III <i>MCL-1</i> , Hintergrund der Arbeit und Fragestellung	9
B	Methoden	12
	I    Untersuchungsmaterial	12
	1    Patientenkollektiv	12
	2    Vergleichsgruppe und Zelllinien	13
	II   Untersuchungsmethoden	13
	1    Sequenzanalyse	14
	2    Genexpressionsanalyse	16
	3    Statistische Analyse	18
C	Ergebnisse	19
	I    Sequenzanalyse	19
	II   Klinische Relevanz	26
	III  Genexpressionsanalyse	28
D	Diskussion	30
	I    Prävalenz der <i>MCL-1</i> Promotorinsertionen	30
	II   Somatische Mutationen oder hereditäre Polymorphismen?	31
	III  Prognostische Bedeutung der Promotorinsertionen	32
	IV   Einfluss der Insertionen auf die Genexpression	33
	V    Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren?	34
	VI   Weitere die Genexpression beeinflussende Mechanismen	35
	VII  Ausblick	37
E	Zusammenfassung	40
	Literatur	41
	Eigenständigkeitserklärung	49
	Danksagung	50
	Lebenslauf	51

## A Einleitung

### I Rezidive einer akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) ist die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter mit einer jährlichen, im Westteil zunehmenden Inzidenz in Deutschland von etwa 500 Kindern und Jugendlichen unter 15 Jahren (1). Diese Patienten können heute mit großem Erfolg behandelt werden, die Heilungsraten liegen bei etwa 80% (2, 3). Die Behandlung ist risikoadaptiert und trägt der Heterogenität der Erkrankung sowie dem damit verbundenen Risiko eines Rückfalls Rechnung.

Dennoch erleiden 15 – 20% der Patienten ein Rezidiv (3). Die häufigste Rezidivlokalisierung ist das Knochenmark (KM), gefolgt vom Zentralnervensystem (ZNS) und dem Hoden. Weitere Manifestationsorte können Ovar, Haut, Lymphknoten, Augen und andere extramedulläre Organe sein. Die Heilungsraten eines ALL-Rezidives sind im Vergleich zur Ersterkrankung wesentlich ungünstiger und betragen 30 – 40% (4-7). Der Behandlungserfolg hängt im Einzelfall vor allem vom Zeitpunkt und Ort sowie dem Immunphänotyp des Rezidives ab: Ein früher Erkrankungsrückfall während oder kurz nach Beendigung der Erstlinientherapie, der etwa 60% der Patienten betrifft, ein isoliertes Knochenmarkrezidiv sowie ein T-Zell-Immunphänotyp beeinflussen die Prognose ungünstig (6, 8, 9). Diese Beobachtungen hat die Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) Studiengruppe zur Entwicklung von Therapiegruppen im Rahmen der Therapieoptimierungsstudien für die Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit Erstrezidiv einer ALL (ALL-REZ BFM) genutzt. Anhand der genannten Kriterien erfolgt die Zuordnung der Patienten zu den drei Hauptgruppen S1 – S3/4 (Standardrisiko=S1, Intermediärrisiko=S2, Hochrisiko=S3/S4, s. Tabelle 1).

Für die einzelnen Risikogruppen werden entsprechend ihrer Prognose eine in ihrer Intensität angepasste Chemotherapie bzw. zusätzlich eine allogene Stammzelltransplantation empfohlen. Die Reinduktionstherapie besteht dabei aus alternierenden Polychemotherapieblöcken basierend auf Glukokortikoiden, Anthrazyklinen, Mitosehemmern, Alkylantien, L-Asparaginase und Antimetaboliten. Jeder Chemotherapieblock enthält die intrathekale Verabreichung von Methotrexat (MTX), Cytarabin (Ara-C) und Prednison, die bei Beteiligung des ZNS intensiviert wird. Die Patienten der Risikogruppen S1 und S2 erhalten vor Beginn der Dauertherapie von 12 bzw. 24 Monaten eine Bestrahlung des ZNS und des eventuell befallenen Extrakompartmentes, bei den Patienten der Hochrisikogruppen S3 und S4 ist in der Remission eine allogene Stammzelltransplantation indiziert (5, 11).

Diese Patienten hätten bei alleiniger Chemotherapie ein sehr hohes Risiko, ein weiteres Rezidiv zu erleiden, und damit eine sehr schlechte Prognose. Dies verdeutlichen zwei retrospektive Analysen: Mit Chemotherapie erreichte kein Patient von 53 bzw. nur ein Patient von 15 Hochrisikopatienten eine anhaltende Remission im Vergleich zu 24 von 53 bzw. 5 von 11 Hochrisikopatienten, die eine allogene Stammzelltransplantation erhalten hatten (7, 10).

**Tabelle 1** BFM-Stratifizierung für ALL-Rezidive (aus 10)

Lokalisation / Zeitpunkt	Immunphänotyp B – Zell – ALL			T – Zell – ALL		
	Extramedullär	Kombiniertes KM-Rezidiv	Isoliertes KM-Rezidiv	Extramedullär	Kombiniertes KM-Rezidiv	Isoliertes KM-Rezidiv
Sehr früh	S 2	S 4	S 4	S 2	S 4	S 4
Früh	S 2	S 2	S 3	S 2	S 4	S 4
Spät	S 1	S 2	S 2	S 1	S 4	S 4

Sehr früh: Erste Remission < 18 Monate; Früh: Erste Remission ≥ 18 Monate und < 6 Monate nach Ende der Erstlinientherapie; Spät: Erste Remission ≥ 6 Monate nach Beendigung der Erstlinientherapie, KM=Knochenmark

Diese Beobachtungen verdeutlichen die Bedeutung von Prognosefaktoren, die eine möglichst genaue Risikoeinschätzung und damit die Wahl der für jeden Patienten notwendigen Therapie ermöglichen. Für die ALL ist ein frühes Ansprechen auf die Therapie der Faktor mit dem genauesten Rezidivvorhersagewert im Vergleich zu klinischen (z. B. Alter, Leukozytenzahl, extramedulläre Beteiligung) und biologischen (z. B. Immunphänotyp, Zytogenetik) Prognosefaktoren (2, 12): In ALL-BFM Studien charakterisiert eine Anzahl von mehr als 1000 Leukämiezellen je  $\mu\text{L}$  peripheres Blut nach 7 Tagen Prednisontherapie und einer intrathekalen Injektion von MTX eine Gruppe von etwa 8 – 10% aller Patienten mit einer ALL-Ersterkrankung (*prednisone poor responder*, PPR), die bisher eine Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (pEFS) von nur etwa 35% im Vergleich zu den Patienten mit einer adäquaten Ansprechrate auf Prednison (*prednisone good responder*, PGR, pEFS ca. 80%) hatten (ALL-BFM Studien 83, 86 und 90 [13-15]). Aufgrund dieses wichtigen Erkenntnis konnte durch Therapieintensivierung für die Patienten der PPR-Gruppe eine beachtliche Verbesserung ihrer Heilungsraten erreicht werden (ALL-BFM 95 [3]).

Etwa 70% der Patienten mit einem Rezidiv gehören allerdings der PGR-Gruppe an, eine Feststellung, die einhergeht mit der Beobachtung, dass bei einem Teil der Rezidive die leukämischen Blasten ihre Empfindlichkeit gegenüber Glukokortikoiden *in vitro* verlieren (16). Zur Identifikation dieser ursprünglich unerkannten Patienten mit einem hohen Rezidivrisiko wird daher heute auch das Auffinden von Leukämiezellen im submikroskopischen Bereich (sog. MRD, *minimal residual disease*) mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder Durchflusszytometrie genutzt. Diese Möglichkeiten erlauben eine sehr genaue Einschätzung der Leukämiezellmasse während der Therapie – die Sensitivität liegt bei  $<10^{-4}$ , d. h. eine Leukämiezelle unter mehr als 10.000 gesunden Zellen – und die Ermittlung der Patienten mit einem Rezidivrisiko mit höherer Spezifität (2, 17).

Für die Patienten mit einem ALL-Rezidiv der mittleren Risikogruppe S2 dient das MRD-Monitoring zur Identifikation der Patienten mit einer resistenten Leukämie, die bei alleiniger Chemotherapie eine sehr schlechte Prognose haben und daher ebenfalls von einer Stammzelltransplantation profitieren könnten (18).

Trotz dieser sehr sensitiven Methoden, die Ansprechrate auf die Chemoradiotherapie zu ermitteln und Patienten mit einer therapierefraktären Erkrankung ausfindig zu machen, liegen die der Therapieresistenz zugrundeliegenden biologischen Mechanismen weithin im Unklaren.

## II Apoptose, Tumorentstehung und Therapieresistenz

Ein Leukämie rezidiv ist die häufigste Form des Therapieversagens (5). Abgesehen von den Fällen, in denen die Erstlinientherapie etwa wegen der Blut-Hirn/Hoden-Schranke nicht alle Leukämiezellen erreichen konnte (isolierte extramedulläre und eventl. kombinierte Knochenmarkrezidive), liegt der Grund für den Erkrankungsrückfall v. a. im Vorhandensein therapieresistenter Tumorzellen.

Konventionelle zytotoxische Therapie wirkt, unabhängig von ihrem primären Ziel, über die Induktion der Apoptose (19, 20). Verminderte Apoptosefähigkeit einer Zelle gehört zu den Ursachen von Tumorentstehung und Therapieversagen. Sie ermöglicht es der Zelle, unter extremen strukturellen und metabolischen Bedingungen, z. B. DNA-Schäden, Sauerstoff- und Wachstumsfaktormangel, zu überleben und eventuell zu entarten. Störungen im Ablauf der Apoptose vermindern so auch die Effektivität einer Chemo- bzw. Radiotherapie und beeinflussen damit die Prognose des Patienten (21-24).

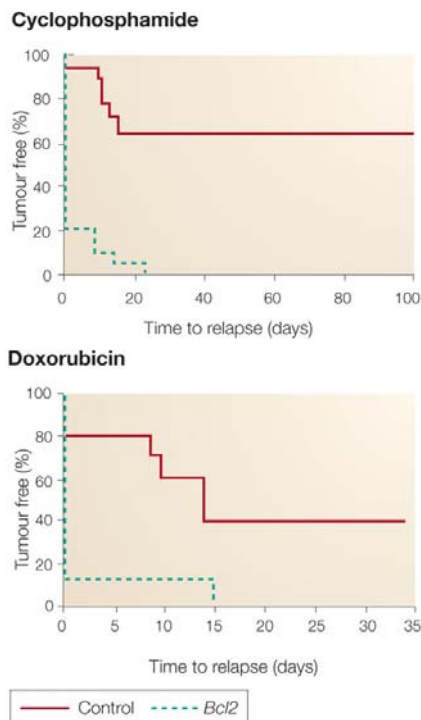
Apoptose bezeichnet den physiologischen Prozess der programmierten Selbstzerstörung. Der Zelluntergang im Rahmen der Apoptose wird durch intrazelluläre Cystein-Proteasen (Caspasen) vermittelt, die in aktivierter Form subzelluläre Strukturen, die Zellorganellen und das Genom zerstören. Die Caspasen sind in einer Kaskade organisiert, in der die übergeordneten Caspasen für die Aktivierung der nachfolgenden verantwortlich sind. Es sind zwei unterschiedliche Wege bekannt, die zur Aktivierung der Caspasen führen: Der extrinsische, Rezeptor-vermittelte Weg wird initiiert durch die Bindung von Liganden der *tumor-necrosis-factor* (TNF)-Familie an 'death receptors' (CD 95, TNF-Rezeptor, TRAIL-Rezeptor) in der Zellmembran, der intrinsische Weg erfordert die Durchlässigkeit der äußeren Membran der Mitochondrien (*mitochondrial outer membran permeabilization, MOMP*) und die Freisetzung von cytochrom c (24).

Die Kontrolle über die Durchlässigkeit der mitochondrialen Außenmembran übernimmt eine Gruppe strukturell verwandter, intrazellulärer Proteine mit Namen des bekannten Prototyps BCL-2. Zu dieser Gruppe zählen sowohl antiapoptotische (BCL-2, BCL-X, BCL-W) als auch proapoptotische Proteine (BAX, BAK und BH3-only Proteine wie BAD, BIM, NOXA). Alle diese Proteine stimmen in mindestens einem Abschnitt ihrer Sequenz mit BCL-2 überein (BH – *BCL-2 homology*). Die Steuerung der Apoptose erfolgt durch komplexe Protein-Protein-Interaktionen, wobei die einzelnen anti- bzw. proapoptotischen Proteine untereinander, vermittelt über die BH-Regionen, Homo- oder Heterodimere bilden (25, 26). Ein Ungleichgewicht im Verhältnis ihrer Aktivität zugunsten des Überlebens einer Zelle ist verbunden mit einer erhöhten Widerstandsfähigkeit dieser Zelle gegenüber Reizen, die normalerweise den Zelltod zur Folge haben, und damit einem Überlebensvorteil.

Die antiapoptotischen Gene der *BCL-2* Familie sind aufgrund ihrer Fähigkeit, die Apoptose zu verhindern, potentielle Onkogene. Das Erkennen des onkogenen Potentials des BCL-2 Proteins als Folge seiner Überexpression in Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) mit der chromosomalen Translokation t(14;18) hat zu eingehenderen Untersuchungen des Prozesses der Apoptose auf molekularer Ebene geführt. *BCL-2* transgene Zellen mit der t(14;18) entwickeln leichter B-Zell-Lymphome und in Kombination mit einer deregulierten *MYC*-Expression (bitransgene *Eμ-bcl-2/Eμ-myc*-Mäuse) wird ihre Entstehung noch erheblich beschleunigt, begründet mit der Annahme, dass sich genetische Veränderungen, die zu einer gesteigerten Zellproliferation führen (*MYC*) und solche, die den Zelluntergang blockieren (*BCL-2*) gegenseitig verstärken. Ein derartiges Zusammenspiel findet sich auch bei hämatopoietischen Vorläuferzellen, Brust- und  $\beta$ -Zell-Tumoren bzw. in Kooperation

mit dem *promyelocytic-leukemia-retinoic-acid-receptor  $\alpha$*  (PML-RAR $\alpha$ ) Fusionsprotein bei der t(15;17)-positiven akuten promyelozytischen Leukämie (APML) (20). Das Epstein-Barr-Virus (EBV) und das Humane Herpesvirus 8 (HHV8 oder Karposi's Sarkom-assoziiertes Herpesvirus) bilden Proteine, die zu BCL-2 homolog sind (BHRF1 von EBV und KSBCL-2 von HHV8), ebenfalls in ihrer apoptosehemmenden Funktion das Überleben der infizierten Zellen fördern und so zur Tumorentstehung beitragen können (20).

Verschiedene Studien betreffend u. a. die akute myeloische Leukämie (AML), die ALL, die chronische lymphatische Leukämie (CLL), das Multiple Myelom (MM), das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC) und das Melanom stützen die These, dass eine erhöhte Expression von antiapoptotischen Proteinen eine besonders therapieresistente Gruppe von Tumorzellen kennzeichnet (inkonsistent, Übersicht in 27, 28 und Abbildung 1). Auch zeigen Vergleiche der Konzentrationen von BCL-2 und anderen antiapoptotischen Proteinen vor Behandlung und zum Zeitpunkt des Rezidives bei Leukämien und soliden Tumoren eine Konzentrationszunahme bzw. ein selektives Überleben der Tumorzellen mit der höheren Proteinmenge. Umgekehrt stehen erniedrigte Konzentrationen bzw. Inaktivität von proapoptotischen Proteinen, wie BAX, mit einer schlechteren Therapierbarkeit und einer kürzeren Überlebenszeit bei Dickdarm-, Magenkrebs und bei Frauen mit Brustkrebs in Zusammenhang (27).



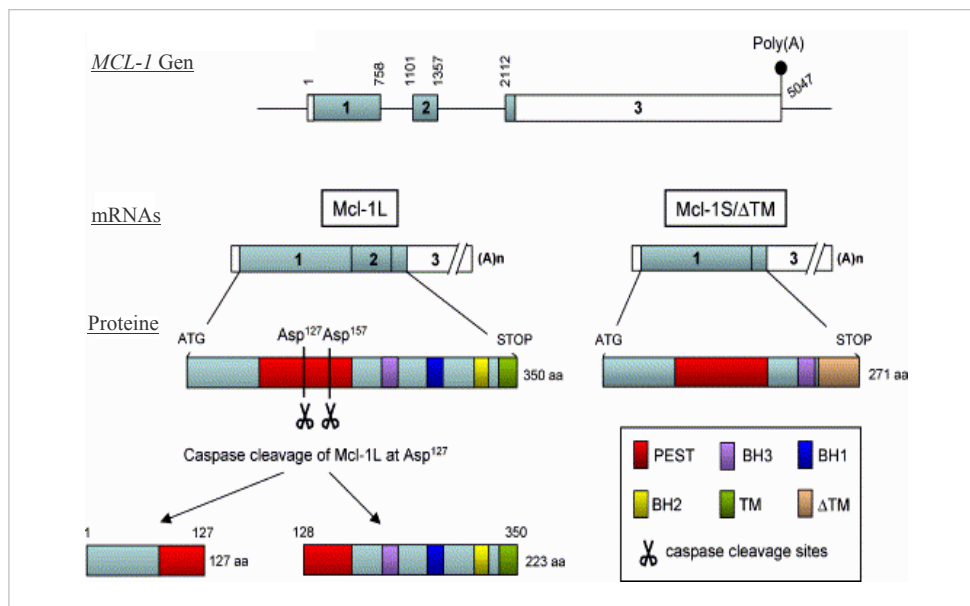
**Abbildung 1** Nebenstehende Abbildung verdeutlicht den Zusammenhang zwischen Chemotherapieresistenz und Apoptose: Die Kaplan-Meier Kurven zeigen Rezidive von Lymphomen in *E $\mu$ -myc* transgenen Mäusen nach alleiniger Behandlung mit Cyclophosphamid oder Doxorubicin, die unter dem Einfluss eines *BCL-2* exprimierenden bzw. eines Kontrollvektors stehen. Die Unterschiede zwischen den beiden Kurven sind statistisch signifikant. (aus 29)



Für die ALL haben Prokop *et al.* (30) zeigen können, dass die BAX-Konzentration und das Verhältnis von BAX zu BCL-2 in Rezidivzellen signifikant geringer im Vergleich zum Erstdiagnosematerial gewesen sind. Auch geht *in vivo* Resistenz gegenüber den vier für die Behandlung einer ALL wichtigen Medikamenten (Prednison, Vincristin, L-Asparaginase, Daunorubicin) einher mit veränderter Apoptose (31), und Genexpressionsprofile zeigen, dass u. a. die Expression apoptoseregulierender Gene eine Unterscheidung zwischen therapieresistenten und -sensiblen Zellen sowie zwischen Ersterkrankung und Rezidiv ermöglichen (32-35), und verdeutlichen damit die Bedeutung der Apoptose für die Entwicklung einer Therapieresistenz.

### III MCL-1, Hintergrund der Arbeit und Fragestellung

Das *MCL-1* Gen ist ein Mitglied der *BCL-2* Familie. Es ist lokalisiert auf Chromosom 1q21, besteht aus drei Exons und kodiert für zwei Protein-Isoformen (Abb. 2). Das längere der beiden Proteine ist ein ca. 40 kDa Polypeptid, das zu 35% mit BCL-2 identisch ist. Es enthält die BH-Regionen 1 – 3 und ist ein die Apoptose hemmendes Mitglied der BCL-2 Familie, die kürzere Isoform ist als sogenanntes BH3-only Protein proapoptotisch (36).



**Abbildung 2** Molekulare Struktur von MCL-1: Die drei Exons des *MCL-1* Gens mit den Protein-kodierenden Informationen (grau) und dem Ort der 3' Polyadenylation (Poly(A)). Die Nukleotid-Koordinaten der Exongrenzen und der 3' Polyadenylationsstelle beziehen sich auf den Ausgangspunkt der Transkription in Position 1 (GenBank AF 198614). Alternierendes Spleißen führt zu zwei *MCL-1* mRNAs, die sich durch das Fehlen bzw. das Vorhandensein des Exons 2 unterscheiden und für die lange (Mcl-1L) bzw. die kurze (Mcl-1S) Isoform kodieren. Die kurze Isoform Mcl-1S enthält im Gegensatz zu Mcl-1L nur die BH-Region 3 und keine C-terminale Transmembran-Domäne ( $\Delta$ TM) (36). Mit Asp127 und Asp157 sind zwei mögliche Orte für die Spaltung von Mcl-1L durch Caspasen gekennzeichnet (aus 37). BH=*BCL-2* homology, ATG=Ausgangspunkt der Translation.

*MCL-1* fiel 1993 durch seine gesteigerte Expression während der Differenzierung humaner myeloischer Leukämiezellen (M1-1) auf (38). Für die Bedeutung dieses Gens steht seine antiapoptotische Funktion im Vordergrund. Es ist entscheidend für das Überleben hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen verantwortlich – Deletion von *MCL-1* in Mäusen führt zur Aplasie des Knochenmarkes und damit zum Tode der Tiere (39) –, sichert die Erhaltung von B- und T-Lymphozyten (40, 41) und beeinflusst die Entstehung von Tumoren: Transgene Mäuse, die das Protein überexprimieren, haben ein um mehr als 80% erhöhtes Risiko, B-Zell-Lymphome zu entwickeln (42). Hämatopoietische Zellen dieser Tiere, gezüchtet in Anwesenheit von Interleukin-3 (IL-3), wachsen zu kontinuierlich proliferierenden und damit immortalisierten Zelllinien heran (43).

Klinische Relevanz erlangte *MCL-1*, als in zwei Studien betreffend die CLL mit 42 bzw. 37 Patienten aufgefallen ist, dass kein Patient mit erhöhter MCL-1 Proteinkonzentration ein komplettes Ansprechen gezeigt hat (44, 45). In einer weiteren Studie mit erwachsenen Patienten mit akuter Leukämie (AML und ALL) haben Vergleiche von Proben aus dem Knochenmark vor Behandlung der Leukämie und zum Zeitpunkt des Rezidives eine Erhöhung der Proteinkonzentration um mehr als das Doppelte ergeben. Der höchste quantifizierbare MCL-1 Anstieg lag 500% über dem Ausgangswert. Die Leukämien dieser Patienten sprachen auf die weitergehende Therapie schlecht an, nur zwei Patienten erreichten eine komplette Remission (46). Eine MCL-1 Überexpression war auch bei B-Zell-NHL, Brustkrebs, Hepatozellulärem Karzinom (HCC) und dem Multiplen Myelom zu beobachten, wobei eine Korrelation mit negativen prognostischen Parametern (CD38+ Subklon bei CLL), dem Tumorgrad bzw. der Überlebenschancen der Patienten nachgewiesen werden konnte (47-55).

Für Kinder mit einer ALL ergaben vergleichende Genexpressionsanalysen zwischen gegenüber Prednisolon *in vitro* resistenten und empfindlichen Zellen eine erhöhte *MCL-1* Expression in den prednisolonresistenten Leukämiezellen (56). Auch ist die MCL-1 Konzentration in ALL-Proben von Säuglingen mit Rearrangements des *MLL* Gens, die eine sehr schlechte Prognose haben (Überleben - *overall survival*, OS: 40 – 50%) im Vergleich zu älteren Kindern mit ALL gesteigert (57).

Bei der Suche nach einer Erklärung für die unterschiedliche Expression dieses Proteins in CLL-Zellen identifizierten Moshynska *et al.* (58) eine Hochrisikogruppe von Patienten mit CD38-negativer CLL. Sie entdeckten bei nahezu einem Drittel der untersuchten Patienten (29%, 17/58) zwei 6 bzw. 18 Basenpaare (bp) umfassende Insertionen in der Promotorre-

gion des *MCL-1* Gens, jedoch weder bei einer der 18 Kontrollpersonen noch in nicht leukämischen Zellen zweier Patienten. mRNA- und Proteinexpression waren gesteigert. Das Vorhandensein dieser Insertionen korrelierte mit einem schlechteren Ansprechen auf die Therapie, einem schnelleren Fortschreiten der Erkrankung und einer kürzeren Überlebenszeit der Patienten.

Vor diesem Hintergrund steht das Thema dieser Arbeit, deren Ziel es war, die Promotorregion des *MCL-1* Gens auf diese Insertionen und ihre klinische Bedeutung bei Erstrezidiven einer ALL im Kindesalter zu überprüfen.

Im Einzelnen wurde folgenden Fragen nachgegangen:

1. Wie groß ist der Anteil der Patienten mit einer der beschriebenen Insertionen?
2. Handelt es sich bei den genetischen Veränderungen um somatische Mutationen (leukämiezellspezifisch) oder um hereditäre Polymorphismen?
3. Stehen die Insertionen in einem Zusammenhang mit dem Auftreten des Rezidives?
4. Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein der Insertionen und biologischen bzw. klinischen Parametern?
5. Korreliert das Vorhandensein der Insertionen mit dem ereignisfreien Überleben der Patienten?
6. Führen diese Veränderungen in der Promotorregion des *MCL-1* Gens zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivität des *MCL-1* Promotors?

Die im Rahmen der Sequenzanalyse zu bearbeitenden Fragen 1 – 3 bauen aufeinander auf und waren sinnvoll nur nacheinander zu beantworten, so dass bei Verneinung der Leukämiezellspezifität für die Beantwortung der Frage 3 die Analyse von Erstdiagnosematerial entfallen konnte. Desweiteren sollte eine *direkte* Aktivitätsbestimmung des *MCL-1* Promotors nur im Falle einer positiven Korrelation der Insertionen mit Prognosefaktoren oder dem Überleben der Patienten erfolgen.

## B Methoden

### I Untersuchungsmaterial

#### *1 Patientenkollektiv*

Als Untersuchungsmaterial dienten zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose gewonnene KM-Aspirate von 134 Patienten aus Deutschland und der Schweiz mit Erstrezidiv einer ALL in den Jahren 2000 und 2001. Das Rezidiv betraf bei 109 Patienten isoliert das Knochenmark, bei 25 Patienten lagen zusätzliche extramedulläre Manifestationen vor. Patienten mit isoliertem extramedullärem Rezidiv wurden nicht mit eingeschlossen (s. Patientencharakteristik in Tabelle 2).

Im Vergleich zu 62 Patienten, von denen kein Material zur Verfügung stand, gab es in dem untersuchten Kollektiv bis auf eine erhöhte Zahl *TEL/AML*-positiver Patienten ( $p = .018$ ) und mehr Patienten der mittleren Risikogruppe S2 ( $p = .044$ ) keine statistisch signifikanten Unterschiede. Alle Patienten wurden risikoadaptiert entsprechend dem Protokoll der ALL-REZ BFM 96 Studie behandelt.

**Tabelle 2** Klinische und biologische Charakteristika der untersuchten Patienten (n=134) mit Erstrezidiv einer ALL im Kindesalter

<i>Gesamt</i>	<i>134</i>		<i>134</i>
Geschlecht		Immunphänotyp	
männlich	79 (59.0%)	Pro-B-ALL	9 (6.7%)
weiblich	55 (41.0%)	Common-ALL	73 (55.3%)
		Pre-B-ALL	40 (30.3%)
		T-ALL	9 (6.7%)
		Keine Angaben	3
Alter bei Erstdiagnose		Strategiegruppe	
<1 Jahr	2 (1.5%)	S1	-
≥1 Jahr und <10 Jahre	95 (70.9%)	S2	77 (57.5%)
≥10 Jahre	37 (27.6%)	S3	26 (19.4%)
		S4	31 (23.1%)
Alter bei Rezidivdiagnose		<i>BCR/ABL</i>	
<5 Jahre	23 (17.2%)	Positiv	5 (3.8%)
≥5 Jahre und <10 Jahre	50 (37.3%)	Negativ	127 (96.2%)
≥10 Jahre	61 (45.5%)	Keine Angaben	2
Rezidivzeitpunkt		<i>MLL</i> -Rearrangement	
Sehr früh	27 (20.1%)	Positiv	4 (3.2%)
Früh	36 (26.9%)	Negativ	120 (96.8%)
Spät	71 (53.0%)	Keine Angaben	10
Rezidivlokalisierung		<i>TEL/AML1</i>	
Knochenmark isoliert	109 (81.3%)	Positiv	27 (20.3%)
Knochenmark komb.	25 (18.7%)	Negativ	106 (79.7%)
Extramedullär isoliert	-	Keine Angaben	1

**Tabelle 2** Patientencharakteristik (Forts.)

<i>Gesamt</i>	<i>134</i>		<i>134</i>
<i>PBC</i>		Land	
<1/ $\mu$ l	20 (15.2%)	Deutschland	129 (96.3%)
$\geq 1$ and <10.000/ $\mu$ l	93 (70.5%)	Österreich	-
$\geq 10.000$ / $\mu$ l	19 (14.4%)	Schweiz	5 (3.7%)
Keine Angaben	2		

*PBC*: *Peripheral blast cell count*, Fehlende Angaben wurden in die Berechnung der prozentualen Anteile nicht mit einbezogen.

Zur Beantwortung der Frage nach der Leukämiezellspezifität diente Remissionsmaterial (KM-Aspirate und periphere Blutproben, jeweils 0% Blasten) von Patienten, die im Rezidivdiagnosematerial eine Insertion gezeigt haben, für die Genexpressionsmessung RNA aus zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose gewonnenen KM-Aspiraten.

## 2 *Vergleichsgruppe und Zelllinien*

Zusätzlich wurden 98 Blutproben einer gesunden Vergleichsgruppe:

Alter: 14 – 76, Median 62 Jahre; 46 Männer und 52 Frauen

sowie 9 Zelllinien (DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig):

REH (Prä – B – ALL, *TEL/AML1*), SUP-B15 (Prä – B – ALL, *BCR/ABL*), LOUCY (T – ALL, t(16;20)), PEER (T – ALL), RAJI (*Burkitt Lymphom*, t(8;14)), HSB-2 (T – ALL, SIL-SCL), JURKAT (T – ALL), MOLT-4 (T – ALL, hypertetraploider Karyotyp) und MOLT-16 (T – ALL, t(3;11) und t(8;14))

auf das Vorkommen der Insertionen untersucht.

## II Untersuchungsverfahren

Für die Sequenzanalyse stand bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagerte DNA aus den KM-Aspiraten und peripheren Blutzellen der Patienten- und Vergleichsgruppe sowie DNA der Zelllinien zur Verfügung, für die Genexpressionsmessung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerte RNA aus den KM-Aspiraten der Patienten. Die Extraktion der DNA erfolgte unter Verwendung von Puregene™ DNA-Isolierkit (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf), die der RNA mit dem RNeasy™ Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach den Angaben der Hersteller. Die Separation von mononukleären Zellen aus dem KM und dem Blut erfolgte innerhalb von 24 Stunden durch Zentri-

fugation über den Ficoll-Gradienten. In die Untersuchung waren KM-Aspirate nur bei einem Blastenanteil von >70% einbezogen worden. Ausbeute und Reinheit von DNA und RNA wurden vor Analyse durch Bestimmung der optischen Dichte mit einem Photometer (Eppendorf GmbH, Hamburg) beurteilt.

## ***1 Sequenzanalyse***

Die DNA der Patienten, der Vergleichsgruppe und der Zelllinien wurde mittels Homo-Hetero-Duplexanalyse, Sequenzierung und GeneScan auf das Vorhandensein der 6 bzw. 18bp umfassenden Insertionen in der Promotorregion des *MCL-1* Gens untersucht.

### ***1.1 Einzel – PCR und Agarose-Gelelektrophorese***

Der Bereich der Promotorregion (Fragmentlänge 270bp), in dem die Insertionen zu erwarten waren (–190bp aufwärts der Transkriptionsstartstelle), wurde unter Verwendung eines Primerpaares (vorwärts: 5' –TGC TCA TGG AAA GAG CTC GA– 3', rückwärts: 5' –TAG GGC GGC CAG TCC TA– 3' [TIB Molbiol, Berlin]) mittels PCR (38 Zyklen: 95°C 5 min (Vordenaturierung)/95°C 1 min/60°C 2 min/72°C 3 min sowie 72°C 5 min nach den Zyklen) in einem PTC 2000 Peltier Thermal Cycler amplifiziert. Jeder Ansatz (50µL) enthielt 2µL DNA (100ng/µL), 1µL jeden Primers (10µM) und 25µL PCR-Reaktionsmix (*RED Taq™ Ready Mix™ PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub>*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) und schloss mindestens eine Negativkontrolle ohne DNA ein. Die PCR-Produkte wurden dann in einem 2%igen Agarose-Gel (2g Agarose Serva + 100mL TAE-Puffer [50xTAE<sup>a</sup> 1:50 verdünnt mit Aqua bidest.]) bei 100V elektrophoretisch nach ihrer Länge aufgetrennt und mit 4µL Ethidiumbromid (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) sichtbar gemacht. Pro Tasche waren 10µL PCR-Produkt aufgetragen und bei jeder Elektrophorese ein 100bp DNA-Längenmarker (Invitrogen™, Life Technologies, Karlsruhe) mitgeführt worden.

Da eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Genotypen mit dieser Gelelektrophorese nicht möglich war, erfolgte sie, um eventuelle Kontaminationen frühzeitig zu erkennen.

---

<sup>a</sup> TAE – Puffer : Tris 242g (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt)

Acetat 100% 57.1mL (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt)

EDTA (0.5M) 100mL (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

+ Aqua bidest. auf 1L

## 1.2 *Homo – Hetero – Duplexanalyse*

Zur Differenzierung zwischen mono- und biallelischen Genveränderungen erfolgte eine Homo-Hetero-Duplexanalyse: Nach Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten und anschließender Renaturierung bei 50°C für 60 Minuten wurden jeweils 5µL PCR-Produkt auf ein 12.5%iges Polyacrylamid-Gel (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala) aufgetragen und nach Elektrophorese bei 500V und 35mA mit einer Silberfärbung<sup>b</sup> sichtbar gemacht.

Homoduplices entstehen dabei im Zuge der Renaturierung, wenn sich zwei vollständig komplementäre DNA-Stränge binden (n/n, 6/6, 18/18), Heteroduplices bestehen dagegen aus in ihrer Basensequenz differierenden Einzelsträngen (n/6, n/18, 6/18). Im Falle eines solchen Bandenmusters wurden alle Banden ausgeschnitten, in 100µL Aqua dest. über Nacht bei 50°C gelöst und anschließend reamplifiziert. Die PCR-Bedingungen entsprachen denen der Einzel-PCR, wobei jeweils 10µL der gelösten Bande eingesetzt wurde. Das PCR-Produkt der Reamplifikation wurde dann erneut der Agarose-Gelelektrophorese und der Homo-Hetero-Duplexanalyse zugeführt. Vor dem Auftragen auf das Polyacrylamid-Gel war jedes PCR-Produkt mit 2µL Ladepuffer<sup>c</sup> vermischt und bei jeder Elektrophorese zwei 100bp DNA-Längenmarker mitgeführt worden.

## 1.3 *Sequenzierung*

Da allein anhand der Fragmentlänge mit der Homo-Hetero-Duplexanalyse eine sichere Unterscheidung zwischen dem Wildtypallel und der +6bp-Insertion nicht möglich war, wurden alle diese Fragmente sowie stichprobenartig auch die längeren (+18bp-Insertion) Fragmente sequenziert. Die enzymatische Sequenzierreaktion nach Sanger (59) beruht auf einem nukleotidspezifischen Kettenabbruch durch Einbau von didesoxy-Nukleotiden. Die einzelnen Nukleotide werden mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die von dem Laser des Sequenziergerätes dem jeweiligen Nukleotid zugeordnet werden.

---

<sup>b</sup> Silberfärbung:

1. 10% Ethanol (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) für 5 min
2. 15.4mL konz. HNO<sub>3</sub>/L (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) für 3 min
3. 2.4g AgNO<sub>3</sub>/L (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) für 20 min
4. 30g Na<sub>2</sub>NO<sub>3</sub> + 540µL Formaldehyd/L (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt)  
zwischen den Schritten 1 – 4 Waschen mit Aqua dest.
5. 10% Acetat (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) für 5 min  
anschließend mit Aqua dest. waschen.

<sup>c</sup> Ladepuffer: Bromphenolblau 0.25% (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt)  
+ Xylene Cyanol 0.25% (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt)  
+ Saccharose 40% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

Die Sequenzier-PCR (30 Zyklen: 95°C 1 min/95°C 30 sec/55°C 15 sec/60°C 4 min/60°C 7 min) erfolgte in einem GeneAmp 9700 (Perkin Elmer™ Life Sciences, Foster City, CA, USA). Jeder Ansatz (10µL) enthielt 0.5µL der entsprechenden PCR-Produkte (Einzel-PCR bzw. Reamplifikation), 0.5µL eines Primers vorwärts oder rückwärts (10µM) sowie 1µL Big Dye™ Terminator Kit (Perkin Elmer™ Life Sciences, Foster City, CA, USA).

Die Proben wurden anschließend über DyeEx™ 2.0 Sephadexsäulen (Qiagen GmbH, Hilden) entsprechend dem Protokoll aufgereinigt und jeweils 4µL aufgereinigtes Produkt nach Zugabe von 16µL HPLC gereinigtem Wasser in einem ABI PRISM™ 310 (Applied Biosystems, Frankfurt) sequenziert.

#### **1.4 GeneScan**

Zur sicheren Beurteilung des Genotypes der heterozygoten Promotorvarianten wurden sämtliche heterozygoten Varianten der Patienten- und Kontrollgruppe und jeweils eine Stichprobe der homozygoten Varianten (n/n, 6/6 und 18/18) in einem ABI PRISM™ 310 (Applied Biosystems, Frankfurt) im GeneScan-Modus analysiert. Dieses Verfahren erlaubt die präzise Bestimmung der Allelgröße durch Messung der Fluoreszenzintensität der markierten PCR-Fragmente, die elektrophoretisch aufgetrennt werden und als Elutionsgipfel erscheinen.

Die einzelnen Proben waren zuvor in einer PCR mit einem 6-FAM-markierten Primerpaar aufbereitet und zu 2µL PCR-Produkt jeweils 1µL TAMRA-markierter Größenstandard (GENESCAN 500 TAMRA, Applied Biosystems, Frankfurt) und 17µL Formamid zur Verhinderung der Doppelstrangbildung hinzugefügt worden. Primersequenzen, Temperaturprotokoll und Anzahl der Zyklen entsprachen denen der Einzel-PCR.

## **2 Genexpressionsanalyse**

Nach enzymatischer Herstellung komplementärer DNA (cDNA) im Wege der Reversen Transkription (RT) in einem PTC 2000 Peltier Thermal Cycler (Biozym Diagnostics GmbH, Oldendorf) unter folgenden Bedingungen:



Reaktionsansatz = 10 bzw. 20µL	Temperaturen
RNA (200ng/µL = 1µg RNA) 5µL + 5µL Aqua dest. = 10µL	Denaturierung: 70°C 10 min
+ 1µL dNTP (20mM) (Invitrogen™, Life Technologies, Karlsruhe) + 4µL RT-Puffer 5x (Invitrogen™, Life Technologies, Karlsruhe) + 2µL Hexamere 1x (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) + 2µL DTT (0.1M) (Invitrogen™, Life Technologies, Karlsruhe) + 1µL Superscript II (200U/µL) (Invitrogen™, Life Technologies, Karlsruhe) = 20µL	Primerbindung: 25°C 10 min Reverse Transkription: 42°C 45 min Deaktivierung der Reversen Transkriptase: 99°C 3 min hold bei 14°C

erfolgte die Messung der *MCL-1* Transkripte mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) in einem LightCycler® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim):

Reaktionsansatz = 20µL	50 Zyklen / Temperaturen
cDNA 1µL + 3µL MgCl <sub>2</sub> (50mM) (Invitrogen™, Life Technologies, Karlsruhe) + 2µL Puffer 10x PCR Rxn Buffer (-MgCl <sub>2</sub> ) (Invitrogen™, Life Technologies, Karlsruhe) + 2µL dNTP (2mM) (Invitrogen™, Life Technologies, Karlsruhe) + 0.6µL Primer up (10µM) (TIB Molbiol, Berlin) + 0.6µL Primer down (10µM) (TIB Molbiol, Berlin) + 0.4µL SYBR Green 10-fach (FMC BioProducts, Rockland, ME, USA) + 0.3µL BSA (10µg/µL) (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Taufkirchen) + 0.2µL Platinum <i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/µL) (Invitrogen™, Life Technologies, Karlsruhe) + Aqua dest 9.9µL	Vordenaturierung: 94°C 5 min  Denaturierung: 94°C 10 sec  Primerbindung: 60°C für <i>MCL-1</i> / 65°C für <i>ABL</i> je 15 sec  Verlängerung: 72°C 15 sec

Das Prinzip der Real-Time PCR basiert auf der Ermittlung der Amplifikatzunahme in jedem Zyklus durch Fluoreszenzmessung, wobei eine Hintergrundfluoreszierung überschritten werden muss (sog. *Cycle Threshold*, C<sub>t</sub>-Wert). Der C<sub>t</sub>-Wert ist direkt proportional der zu quantifizierenden Nukleinsäurenmenge (60).

Als Referenzgen diente *ABL*<sup>d</sup>, ein in Leukämiezellen stabil exprimiertes Gen, durch dessen Expressionsbestimmung auf Qualität und Quantität der isolierten RNA pro Ansatz ge-

<sup>d</sup> Primersequenzen: vorwärts: 5' -TGG AGA TAA CAC TCT AAG CAT AAC TAA AGG T- 3'  
rückwärts: 5' -GAT GTA GTT GCT TGG GAC CCA- 3' [TIB Molbiol, Berlin] (61)

geschlossen werden konnte. Die Bestimmung der *ABL*-Expression erfolgte jeweils unmittelbar vor oder nach der für *MCL-1*<sup>e</sup>. Das BSA (*bovine serum albumin*) wurde eingesetzt, um ein Binden der *Taq*-Polymerase an der Glaskapillarwand zu verhindern. Sämtliche Versuche waren in doppeltem Ansatz durchgeführt worden, jeder Lauf enthielt mindestens zwei Negativkontrollen ohne DNA.

Die Daten wurden mit der LightCycler® Software und der *second derivative maximum* Methode analysiert. Die Ermittlung der Konzentrationen der *MCL-1* Transkripte erfolgte mittels Excel unter Einbeziehung der C<sub>t</sub>-Werte für *ABL* und *MCL-1* sowie des Anstieges der Standardgeraden, der sich aus den eingesetzten Konzentrationen der Verdünnungsreihe und den C<sub>t</sub>-Werten für jede Konzentration in den einzelnen PCR-Zyklen ergibt. Für die Standardreihe dienten REH-Zellen in den Verdünnungen 10<sup>0</sup> – 10<sup>4</sup>.

### 3 *Statistische Analyse*

Unterschiede in der Verteilung von Variablen zwischen Patientengruppen wurden unter Anwendung des Mann-Whitney-U- und des Kruskal-Wallis-Tests ermittelt. Nach der Methode von Kaplan und Meier erfolgte die Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeiten (pEFS) ab Behandlungsbeginn bis zu dem Tag des Auftretens eines ungünstigen Folgeereignisses (Rezidiv, Zweitmalignom, Tod in Remission). Unterschiede zwischen den Gruppen sind mittels 2-seitigem log-rank Test bestimmt worden. Das Nichterreichen der zweiten Remission (Nonresponder, Induktionstod) wurde als Ereignis zum Zeitpunkt 0 und Patienten, die aus der Beobachtung heraus fielen, mit dem Tag des letzten Kontaktes zensiert bewertet. Ein p-Wert < 0.05 galt als statistisch signifikant (s. s.).

Die Analysen (letzte Aktualisierung Nov. 2007) erfolgten mittels *SPSS 15.0 for Windows* (Chicago, USA).

---

<sup>e</sup> Primersequenzen: vorwärts: 5' –TGC TCA TGG AAA GAG CTC GA– 3'  
rückwärts: 5' –TAG GGC GGC CAG TCC TA– 3' [TIB Molbiol, Berlin]

## C Ergebnisse

### I Sequenzanalyse

Siebenundzwanzig (20.2%) der untersuchten 134 Patienten, 20 Personen (20.4%) der gesunden Vergleichsgruppe und MOLT-4 Zellen haben eine 6 oder 18 Basenpaare umfassende Insertion in der Promotorregion des *MCL-1* Gens. Neunzehn der Patienten und 9 Kontrollpersonen sind homozygot, 8 Patienten, 11 Kontrollpersonen sowie MOLT-4 Zellen heterozygot (Tabelle 3).

**Tabelle 3** Häufigkeit und Allelkombinationen der *MCL-1* Promotorinsertionen bei 134 Kindern mit Erstrezidiv einer ALL, 98 gesunden Personen und 9 Zelllinien.

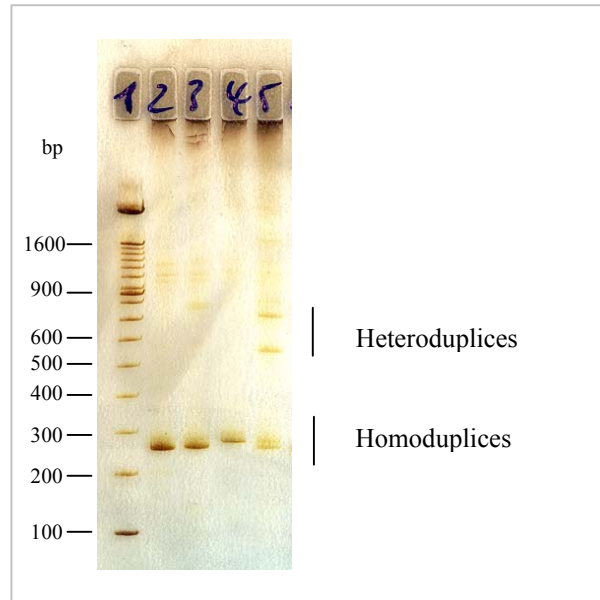
<i>MCL-1</i> Genotyp	ALL no. (%)	Kontrollen no. (%)	Zelllinien no. (%)
Wt (n/n)	107 (79.9)	78 (76.6)	8 (88.8)
Ho	19 (14.2)	9 (9.2)	-
6/6	5 (3.7)	1 (1.02)	-
18/18	14 (10.4)	8 (8.2)	-
He	8 (5.97)	11 (11.2)	1 (MOLT-4)
n/6	-	-	-
n/18	-	-	-
6/18	8 (5.97)	11 (11.2)	1 (MOLT-4)
Gesamt	134 (100)	98 (100)	9 (100)

Ho=homozygot, He=heterozygot, Wt=Wildtyp, n=keine Insertion, 6=Allel mit der 6bp-Insertion, 18=Allel mit der 18bp-Insertion

Die Promotorinsertionen zeigten sich ebenfalls im Remissionsmaterial von 12 der 27 Patienten, die eine Insertion im Rezidivdiagnosematerial aufweisen (identischer Genotyp), von den weiteren 15 Patienten stand für die Untersuchung geeignetes Remissionsmaterial nicht zur Verfügung.

Im Einzelnen erlaubte die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) die Identifizierung von Sequenzunterschieden zwischen den Allelen eines Fragmentes; eine zuverlässige Aussage jedoch, ob und welche Insertion homo- oder heterozygot vorliegt, konnte aufgrund der geringen Längenunterschiede (6 Basenpaare) v. a. für die kürzeren Fragmente (Wildtyp bzw. +6bp-Insertion) nicht gemacht werden.

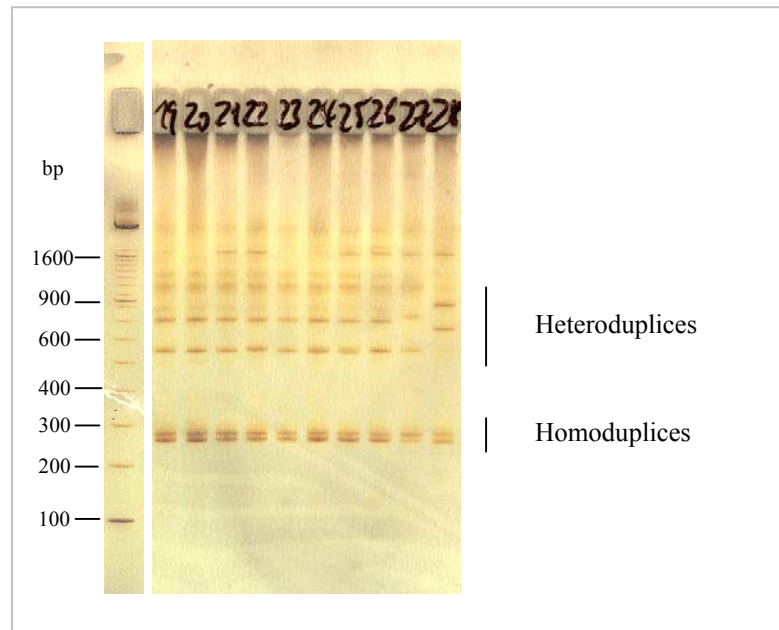
Folgende Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus einem Polyacrylamid-Gel nach Elektrophorese im Rahmen der Homo-Hetero-Duplexanalyse:



**Abbildung 3** Auftrennung der PCR-Produkte mittels PAGE: Die Reihen 2 bis 4 enthalten jeweils ein DNA-Fragment mit gleicher Allelkonstellation (Reihe 2=n/n, Reihe 3=6/6, Reihe 4=18/18), die Reihe 5 ein Fragment, das heterozygot ist (6/18), erkennbar an den sich hier ausbildenden Heteroduplices und den beiden Homoduplices unterschiedlicher Länge. Aufgrund der geringen Längenunterschiede zwischen den Homoduplices ohne Insertion und v. a. der +6bp-Insertion (s. Reihen 2 und 3) kann der Genotyp nicht sicher bestimmt werden.

Dabei zeigten die Banden aller heterozygoten Fragmente die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit, so dass die Vermutung nahe lag, dass innerhalb dieser Gruppe sich die Allelfrequenzen nicht unterscheiden, also entweder immer die Kombination n/6, n/18 oder 6/18 vorliegt.

Die folgende Abbildung verdeutlicht dies:

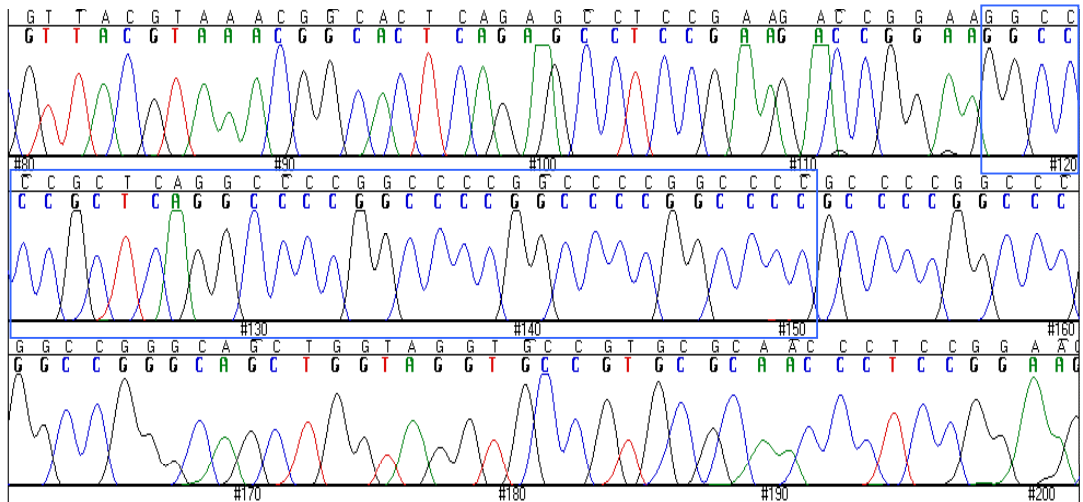


**Abbildung 4** Die Reihen 19 bis einschließlich 27 enthalten die heterozygoten Promotorfragmente der Patientengruppe (n=8), die Reihe 28 das Promotorfragment der MOLT-4 Zelllinie, das sich in der Wanderungsgeschwindigkeit der Heteroduplices geringfügig unterscheidet, jedoch denselben Genotyp aufweist (6/18 – bestätigt durch GeneScan).

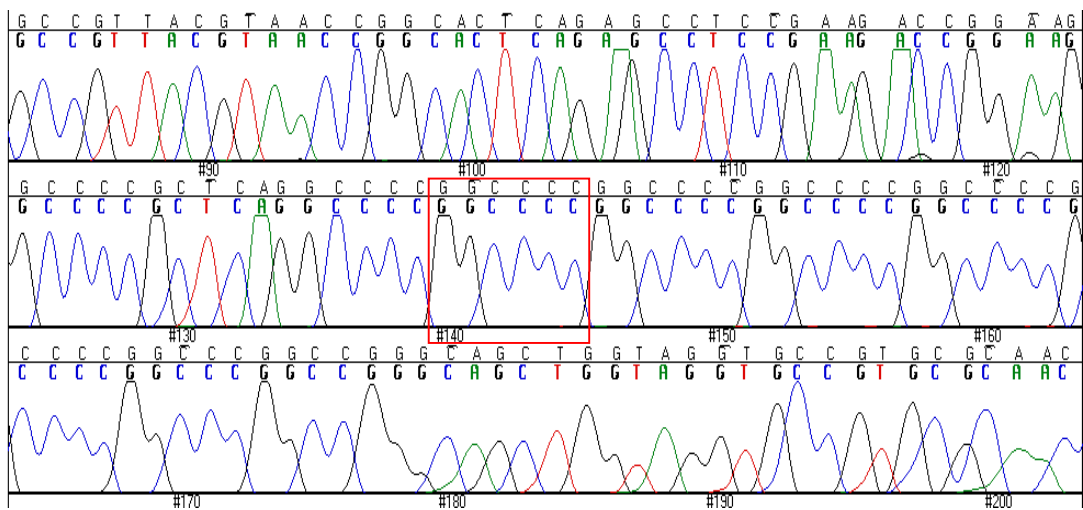
Mit der anschließenden Sequenzierung konnte für die kürzeren DNA-Fragmente, die in der Homo-Hetero-Duplexanalyse lediglich Homoduplices gezeigt haben und deren Länge eine eindeutige Zuordnung nicht erlaubte, die genaue Basenfolge ermittelt und so der Genotyp bestimmt werden (n/n bzw. 6/6 und stichprobenartig für 18/18).

Für die Gruppe der heterozygoten Fragmente gelang dies nur eingeschränkt, da es zu Überlagerungen der beiden Allele auch nach wiederholter Aufreinigung und Reamplifikation der einzelnen Duplices aus dem Polyacrylamid-Gel kam.

Zur Veranschaulichung sind im Folgenden Ausschnitte der Chromatogramme der drei homozygoten Promotorvarianten (Wildtyp (n/n), 6/6, 18/18) sowie einer heterozygoten Promotorvariante abgebildet:



**Abbildung 5** Ausschnitt der Nukleotidsequenz des *MCL-1* Promotors eines Patienten mit der Wildtyp-Promotorvariante (n/n): Der Bereich, in dem sich die Insertionen befinden, besteht aus 5 GGCCCC – Abschnitten und einem GCTCA – Motiv nach dem ersten GGCCCC – Abschnitt (blau umrandet).

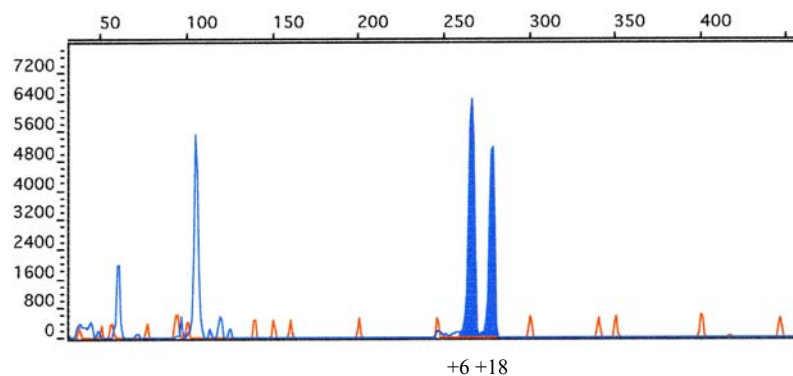


**Abbildung 6** Ausschnitt aus der Sequenzfolge des *MCL-1* Promotors eines Patienten mit einer homozygoten +6nt-Insertion (rot umrandet) – es folgen 5 GGCCCC – Abschnitte dem GCTCA – Motiv.

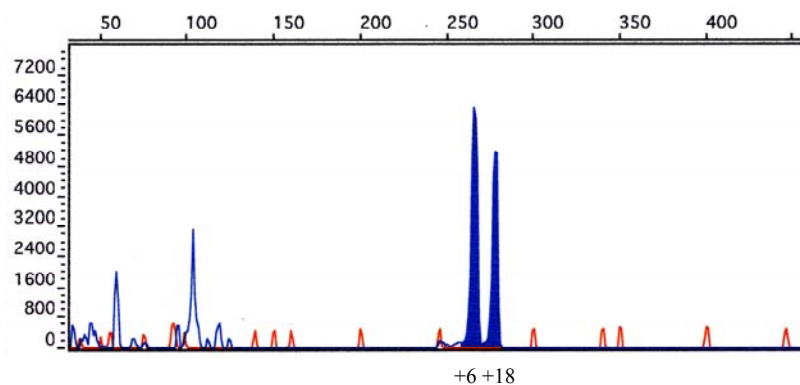


Um den Genotyp der heterozygoten Promotorvarianten sicher zu ermitteln, wurde für diese Gruppe daher zusätzlich eine Sequenzanalyse im GeneScan-Modus durchgeführt. Diese ergab den Genotyp 6/18 für alle Patienten und Kontrollpersonen dieser Gruppe sowie für die MOLT-4 Zellen.

Die beiden folgenden Abbildungen zeigen die GeneScan-Analyse am Beispiel eines Patienten mit einer solchen heterozygoten Promotorvariante (Rezidivdiagnose- und Remissionsmaterial):



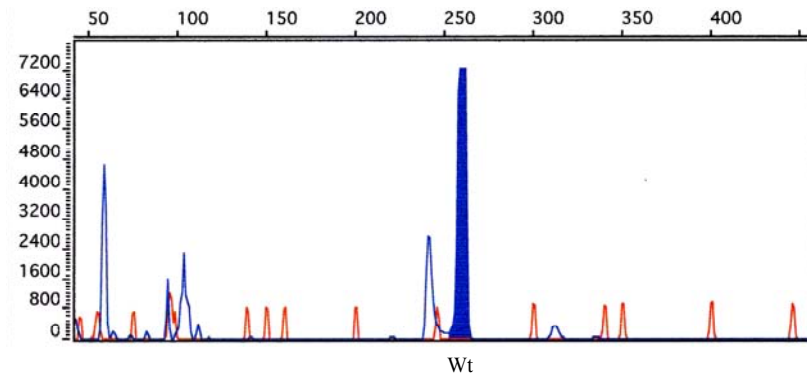
**Abbildung 9** Ergebnis der GeneScan-Analyse eines Patienten mit einer heterozygoten *MCL-1* Promotorvariante. Auf der x-Achse der Abbildung ist die Fragmentlänge in Basenpaare abzulesen, die Höhe der Elutionsspitzen (y-Achse) ist der Produktmenge des gemessenen PCR-Produktes proportional. Die heterozygoten Promotorvarianten tragen auf jedem Allel eine Insertion, zu erkennen an der Fragmentlänge des +6bp-Allels (bei 266bp) und des +18bp-Allels (bei 278bp).



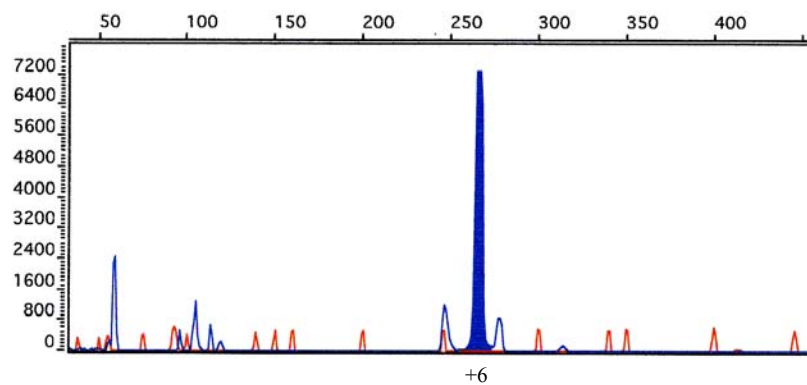
**Abbildung 10** Ergebnis der GeneScan-Analyse von Remissionsmaterial des Patienten aus Abb. 9: Der Genotyp der *MCL-1* Promotorinsertionen von Rezidivdiagnosematerial und Remissionsmaterial ist auch bei allen anderen untersuchten Patienten jeweils identisch (6/18).



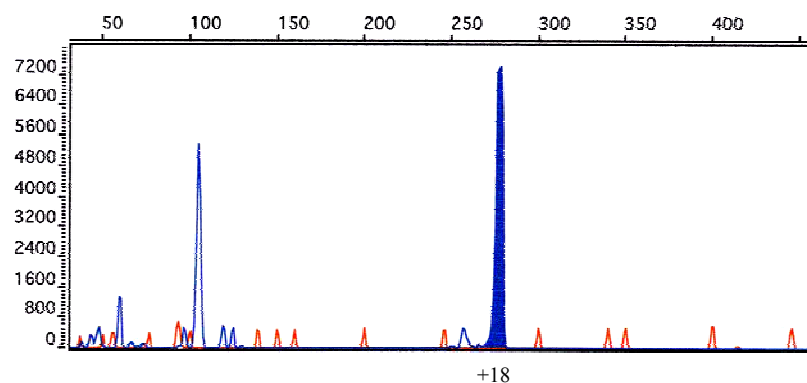
Für die homozygoten Promotorvarianten (n/n, 6/6 und 18/18) wurde jeweils eine Stichprobe mittels GeneScan-Verfahren analysiert (Abbildungen 11 – 13), wobei sich zeigte, dass die Ergebnisse der GeneScan-Analyse mit denen der Sequenzierung übereinstimmen:



**Abbildung 11** Das Ergebnis der GeneScan-Analyse eines Patienten mit der Wildtyp-Promotorvariante (n/n), erkennbar an der Fragmentlänge, die hier am kürzesten ist (ca. 260bp).



**Abbildung 12** Das Ergebnis der GeneScan-Analyse eines Patienten mit einer homozygoten +6nt-Insertion (6/6), erkennbar an der im Vergleich zur Abb. 11 um 6bp größeren Fragmentlänge (ca. 266bp).



**Abbildung 13** Das Ergebnis der GeneScan-Analyse eines Patienten mit einer homozygoten +18nt-Insertion (18/18), erkennbar an der im Vergleich zu Abb. 11 um 18bp größeren Fragmentlänge (ca. 278bp).

## II Klinische Relevanz

Das Vorhandensein der Insertionen korrelierte weder mit biologischen und prognostischen Parametern zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose (Tabelle 4),

**Tabelle 4** Genotyp und Korrelationen der *MCL-1* Promotorinsertionen mit klinischen bzw. biologischen Besonderheiten der untersuchten 134 Kinder mit Erstrezidiv einer ALL

	<i>MCL-1 Promotorinsertionen</i>			<i>p</i>
	Wt (n=107)	Ho (n=19)	He (n=8)	
<b>Geschlecht</b>				
männlich	62 (57.9%)	11 (57.9%)	6 (75%)	.571
weiblich	45 (42.1%)	8 (42.1%)	2 (25%)	
<b>Alter bei Erstdiagnose</b>				
<1 Jahr	2 (1.9%)	-	-	.848
≥1 Jahr und <10 Jahre	74 (69.2%)	15 (78.9%)	6 (75%)	
≥10 Jahre	31 (29%)	4 (21.1%)	2 (25%)	
<b>Alter bei Rezidivdiagnose</b>				
<5 Jahre	20 (18.7%)	1 (5.3%)	2 (25%)	.949
≥5 Jahre und <10 Jahre	38 (35.5%)	10 (52.6%)	2 (25%)	
≥10 Jahre	49 (45.8%)	8 (42.1%)	4 (50%)	
<b>Rezidivzeitpunkt</b>				
Sehr früh	19 (17.8%)	4 (21.1%)	4 (50%)	.090
Früh	32 (29.9%)	2 (10.5%)	2 (25%)	
Spät	56 (52.3%)	13 (68.4%)	2 (25%)	
<b>Rezidivlokalisierung</b>				
Knochenmark isoliert	90 (84.1%)	14 (73.7%)	5 (62.5%)	.145
Knochenmark kombiniert	17 (15.9%)	5 (26.3%)	3 (37.5%)	
Extramedullär isoliert	-	-	-	
<b><i>PBC</i></b>				
<1/μl	14 (13.2%)	5 (27.8%)	1 (12.5%)	.563
≥1 and <10.000/μl	78 (73.6%)	10 (55.6%)	5 (62.5%)	
≥10.000/μl	14 (13.2%)	3 (16.7%)	2 (25%)	
Keine Angaben	1 (.9%)	1 (5.3%)	-	
<b>Immunphänotyp</b>				
Pro-B-ALL	8 (7.7%)	1 (5.3%)	-	.232
Common-ALL	60 (57.7%)	10 (52.6%)	3 (37.5%)	
Pre-B-ALL	31 (29.8%)	4 (21.1%)	5 (62.5%)	
T-ALL	5 (4.8%)	4 (21.1%)	-	
Keine Angaben	3 (2.8%)	-	-	
<b>Strategiegruppe</b>				
S1	-	-	-	.316
S2	62 (57.9%)	12 (63.2%)	3 (37.5%)	
S3	24 (22.4%)	1 (5.3%)	1 (12.5%)	
S4	21 (19.6%)	6 (31.6%)	4 (50%)	
<b><i>BCR/ABL</i></b>				
Positiv	4 (3.8%)	1 (5.3%)	-	.920
Negativ	101 (96.2%)	18 (94.7%)	8 (100%)	
Keine Angaben	2 (1.9%)	-	-	

**Tabelle 4** (Forts.)

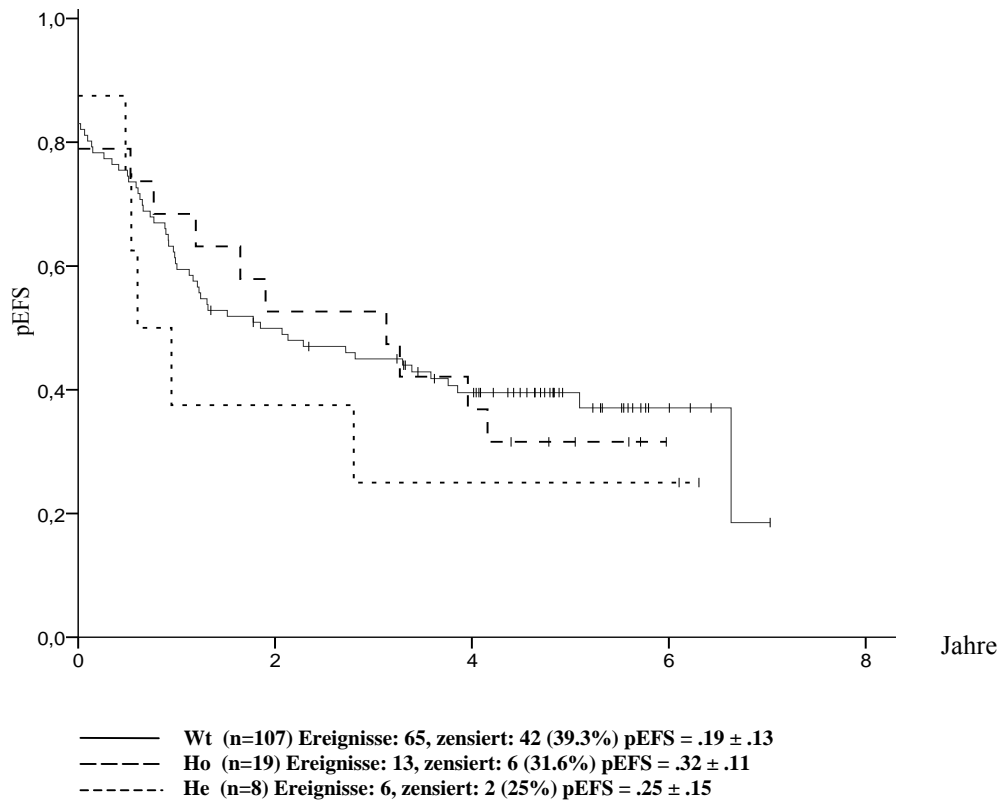
<i>MCL-1 Promotorinsertionen</i>				
	Wt (n=107)	Ho (n=19)	He (n=8)	<i>p</i>
<i>MLL</i> -Rearrangement				
Positiv	3 (3%)	1 (5.9%)	-	n. s.
Negativ	96 (96.9%)	16 (94.1%)	8 (100%)	
Keine Angaben	8 (7.5%)	2 (10.5%)	-	
<i>TEL/AML1</i>				
Positiv	22 (20.8%)	4 (21.1%)	1 (12.5%)	n. s.
Negativ	84 (79.2%)	15 (78.9%)	7 (87.5%)	
Keine Angaben	1 (.9%)	-	-	
Ereignisse				
<i>NR/PD</i>	14 (13.1%)	1 (5.3%)	1 (12.5%)	n. s.
<i>ID</i>	4 (3.7%)	3 (15.8%)	-	
<i>CRD</i>	13 (12.1%)	1 (5.3%)	2 (25%)	
<i>SN</i>	1 (.9%)	-	-	
<i>SR</i>	33 (30.8%)	8 (42.1%)	3 (37.5%)	
<i>CCR</i>	42 (39.3%)	6 (31.6%)	2 (25%)	

Wt=Wildtyp (n/n), Ho=homozygot (6/6, 18/18), He=heterozygot (6/18), n. s.= nicht signifikant

*PBC*: *Peripheral blast cells*, periphere Blastenzahl, *NR/PD*: *Nonresponse/Progressive disease*, Fehlendes Ansprechen auf die Therapie/Fortschreitende Erkrankung, *ID*: *Induction death*, Induktionstod, *CRD*: *Chemotherapy-related death*, Therapietod, *SN*: *Secondary neoplasms*, Zweitmalignom, *SR*: *Second relapse*, Zweitrezidiv, *CCR*: *Complete continuous remission*, Komplette anhaltende Remission.

Fehlende Angaben wurden in die Berechnung der prozentualen Anteile und der *p*-Werte nicht mit einbezogen.

noch mit dem ereignisfreien Überleben der Patienten (Abbildung 14).



**Abbildung 14** Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (pEFS ± SF) in Abhängigkeit vom Genotyp der *MCL-1* Promotorinsertionen: Die Unterschiede in der pEFS zwischen den einzelnen Gruppen sind nicht statistisch signifikant ( $p = .672$ ). Wt=Wildtyp, Ho=homozygot, He=heterozygot, pEFS von 6 Jahren, SF=Standardfehler.

### III Genexpressionsanalyse

Trotz des Vorkommens der Insertionen auch in der Vergleichsgruppe und in nicht leukämischen Zellen von Patienten mit einer Insertion im Rezidivdiagnosematerial besteht die Möglichkeit, dass die Insertionen durch eine Steigerung der *MCL-1* Expression zur Rezidiventstehung beitragen. Aus diesem Grunde und zur Klärung der Diskrepanz der gewonnenen Erkenntnisse in Bezug auf die prognostische Relevanz der Insertionen im Vergleich zu denen der Arbeitsgruppe um Moshynska *et al.* (58) erfolgte im Anschluss an die beschriebenen Untersuchungen eine vergleichende indirekte Genexpressionsanalyse von zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose gewonnenen KM-Aspiraten von Patienten jeden Genotyps. Dabei zeigte sich, dass die mittels qRT-PCR gemessene Konzentration der *MCL-1* Transkripte in leukämischen Zellen der insgesamt 32 untersuchten Patienten (17 Wildtyp, 12

homozygot, 3 heterozygot) sich nicht signifikant zwischen den Gruppen mit und ohne Promotorinsertionen unterscheidet (s. Tabelle 5).

**Tabelle 5** *MCL-1* Expression in Abhängigkeit vom Vorliegen der Promotorinsertionen bei 32 Patienten mit Erstrezidiv einer ALL im Kindesalter

	<i>MCL-1</i> Expression				
	No	min – max	Median	Mittelwert	Standardabweichung
Wt	17	0.1 – 26.6	3.2	6.01	7.28
Ho + He	15	1.8 – 14.8	4.4	6.22	4.42

Wt=Wildtyp (n/n), Ho=homozygot (6/6, 18/18), He=heterozygot (6/18)

Unabhängig vom Vorhandensein der Promotorinsertionen war jedoch zu erkennen, dass die Höhe der *MCL-1* Expression den Erkrankungsverlauf zu beeinflussen scheint. Patienten mit einer hohen *MCL-1* Expression ( $>$  Median) erlitten doppelt so häufig ein Folgerezidiv bzw. verstarben während der Induktionstherapie, Tabelle 6.

In einer multivariaten Analyse erwies sich die *MCL-1* Expression als unabhängiger prognostischer Parameter für das Auftreten eines Folgerezidives. Dieser Beobachtung ist weiter nachgegangen worden und hat sich auch bei einem größeren Kollektiv bestätigt. Da sie jedoch außerhalb der Fragestellung dieser Arbeit liegt, wird von der Darstellung der weiteren Ergebnisse abgesehen.

**Tabelle 6** *MCL-1* Expression und Folgeereignisse von 32 Patienten mit Erstrezidiv einer ALL im Kindesalter

<i>Ereignis</i>	<i>MCL-1</i> Expression					
	No (%)	Median (=3.6)	min – max	SA	Gering ( $<$ Median)	Hoch ( $>$ Median)
<i>CCR</i>	14 (43.8)	3.55	0.7 – 11.5	2.86	7 (43.8%)	7 (43.8%)
<i>CRD</i>	4 (12.5)	2.85	0.1 – 3.2	1.47	4 (25%)	-
<i>SR</i>	9 (28.2)	10.1	1.8 – 26.6	7.82	3 (18.8%)	6 (37.5%)
<i>NR</i>	2 (6.3)	3.05	0.8 – 5.3	3.18	1 (6.3%)	1 (6.3%)
<i>ID</i>	3 (9.4)	4.4	2.1 – 21.1	10.37	1 (6.3%)	2 (12.5%)

*CCR*: Complete continuous remission, Komplette anhaltende Remission, *CRD*: Chemotherapy-related death, Therapietod, *SR*: Second relapse, Zweitrezidiv, *NR*: Nonresponse, Fehlendes Ansprechen auf die Therapie, *ID*: Induction death, Induktionstod, SA=Standardabweichung.

## D Diskussion

### I Prävalenz der *MCL-1* Promotorinsertionen

Die Häufigkeit des Vorkommens der beiden 6 und 18bp umfassenden *MCL-1* Promotorinsertionen in dem untersuchten Kollektiv von 134 Patienten mit Erstrezidiv einer ALL im Kindesalter in Höhe von 20.2% (27/134) ist vergleichbar mit der Häufigkeit, in der diese Insertionen von Moshynska *et al.* (58) bei 58 Patienten mit CLL nachgewiesen worden sind (29%, 17/58). Das gilt auch für die einzelnen Allelfrequenzen, wobei Allele mit der +18bp umfassenden Insertion im Vergleich zu denen mit der +6bp-Insertion doppelt so häufig sind: Die Frequenz des +6bp-Allels liegt bei 6.7% (18/268), die des +18bp-Allels bei 13.4% (36/268) für die Gruppe der Patienten (Tabelle 7). Dabei ist bemerkenswert, dass im Falle der heterozygoten Promotorvarianten jeweils beide Allele eine Insertion tragen.

**Tabelle 7** Allelfrequenzen der 6nt und 18nt Insertionen in der *MCL-1* Promotorregion bei Patienten mit CLL und ALL sowie gesunden Kontrollen (Allele mit einer Insertion/untersuchte Allele)

<i>Allelfrequenzen (%)</i>						
CLL		ALL		Kontrollen		<i>Ref.</i>
6 nt	18 nt	6 nt	18 nt	6 nt	18 nt	
8/116 (6.9)	17/116 (14.7)	-	-	2/146 (1.4)	1/146 (0.7)	Moshynska <i>et al.</i> (58, 62)
52/346 (15)	81/346 (23.4)	-	-	42/210 (20)	52/210 (24.8)	Tobin <i>et al.</i> (63)
6/52 (11.5)	7/52 (13.5)	-	-	5/40 (12.5)	7/40 (17.5)	Iglesias-Serret <i>et al.</i> (64)
25/144 (17.4)	28/144 (19.4)	-	-	19/80 (23.8)	22/80 (27.5)	Dicker <i>et al.</i> (65)
20/108 (18.5)	21/108 (19.4)	-	-	-	-	Coenen <i>et al.</i> (66)
-	-	-	-	24/118 (20)	39/118 (33)	Freeman <i>et al.</i> (67)
-	-	18/268 (6.7)	36/268 (13.4)	13/196 (6.6)	27/196 (13.8)	diese Arbeit

CLL: Chronische Lymphatische Leukämie, ALL: Akute Lymphoblastische Leukämie; 6nt: 6 Nukleotide, 18nt: 18 Nukleotide

Die Prävalenz der Insertionen in der untersuchten Vergleichsgruppe (20.4%) entspricht der des Patientenkollektivs (20.2%), wobei sie abgesehen von den Daten der Arbeitsgruppe um Moshynska *et al.* (58) im Vergleich zu der anderer Forschergruppen, die die Insertionen in

bis zu 75% bei gesunden Personen (65) und in bis zu 69% bei CLL-Patienten (66) nachweisen konnten, deutlich geringer ist (für die einzelnen Allelfrequenzen s. Tabelle 7). Neben der unterschiedlichen genetischen Ausstattung der untersuchten Patienten- und Vergleichsgruppen können technische Gründe für die verschiedenen Häufigkeiten v. a. der heterozygoten Promotorvarianten eine Rolle spielen. Die Analyse der PCR-Fragmente mittels Gelelektrophorese könnte zum einen mangels ausreichender Auflösung der einzelnen Banden eine eindeutige Zuordnung erschweren oder unmöglich machen. So ist der Genotyp von K562-Zellen mit 6/6 von der einen Arbeitsgruppe nach Polyacrylamid-Gelelektrophorese (67) und mit n/18 nach Agarose-Gelelektrophorese von einer anderen Arbeitsgruppe beurteilt worden, letztere bestätigte diesen durch Sequenzierung (68).

Andererseits sind sowohl Gelelektrophorese als auch Sequenzierung und GeneScan-Verfahren PCR-basierte Methoden und Interaktionen zwischen den einzelnen Allelen können zur Unterdrückung des einen Allels durch das andere führen (69).

## II Somatische Mutationen oder hereditäre Polymorphismen?

Im Unterschied zu den Beobachtungen von Moshynska *et al.* (58) konnten die Promotorinsertionen auch in nicht leukämischen Zellen von Patienten und in einem beachtlichen Teil des gesunden Vergleichskollektivs nachgewiesen werden, wobei die Prävalenzen in der Patienten- und Kontrollgruppe sowie die einzelnen Allelfrequenzen für die +6bp-Insertion und die +18bp-Insertion in beiden Gruppen nahezu identisch sind (s. Tabelle 7).

Mit diesen Ergebnissen kann die These von Moshynska *et al.*, bei den Insertionen handele es sich um somatische Mutationen, da sie weder bei ihren 18 gesunden Kontrollpersonen (bzw. in einer Frequenz von jeweils nur 0.01 für beide Insertionen nach Untersuchung von 55 weiteren Kontrollpersonen [62]) noch in nicht leukämischen Zellen zweier Patienten nachgewiesen werden konnten, nicht stützen. Hier liegen vielmehr hereditäre Polymorphismen vor. Dafür spricht zum einen das Vorhandensein von Allelen mit einer der Insertionen in einer Häufigkeit von mehr als 1% in der Bevölkerung, zum anderen ihr Nachweis auch im Remissionsmaterial von Patienten, die im Rezidivdiagnosematerial eine Insertion aufweisen.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen anderer Forschergruppen, die beide Insertionen ebenfalls in der gesunden Bevölkerung gefunden haben (s. Tabelle 7). Neben dem Nachweis bei ALL- und CLL-Patienten konnten die beiden *MCL-1* Insertionen auch bei

Patienten mit Lungenkrebs sowie in mehreren Brustkrebs- und Lungenkrebs-Zelllinien gesehen werden (67). Diese Arbeitsgruppe um Freeman *et al.* hat neben dem untersuchten malignen Gewebe von 15 Patienten mit Lungenkrebs jeweils auch gesundes Lungengewebe dieser Patienten analysiert, welches im Zuge der Thorakotomie für die chirurgische Resektion gewonnen wurde, und ist zu dem Ergebnis gekommen, dass die betreffende *MCL-1* Promotornukleotidsequenz in dem korrespondierenden Lungengewebe der des Tumorgewebes entspricht (67).

Diese Beobachtung machten auch Coenen *et al.* (66) und Dicker *et al.* (65), die die Insertionen ebenfalls in nicht leukämischen Zellen (T-Zellen nach Separation der malignen B-Zellen bzw. Zellen der Mundschleimhaut) von jeweils zwei CLL-Patienten gesehen haben.

Die Diskrepanz zu den Ergebnissen von Moshynska *et al.* (58) kann durch Unterschiede in der Sensitivität der Untersuchungsmethoden, der Größe des Vergleichskollektives und der genetischen Ausstattung aufgrund der ethnischen Herkunft der Vergleichsgruppen bedingt sein.

### III Prognostische Bedeutung der Insertionen

In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen ist eine prognostische Bedeutung der Insertionen für das Überleben der Patienten bzw. eine Korrelation mit bekannten Risikofaktoren im Gegensatz zu den Beobachtungen von Moshynska *et al.* (58) von weiteren Studiengruppen auch für die CLL nicht festgestellt worden (63, 66).

Insgesamt sprechen die gewonnenen Ergebnisse wegen der fehlenden Leukämiezellspezifität der Insertionen und deren Vorkommen auch in der gesunden Vergleichsgruppe gegen die Annahme, dass die Insertionen im Zuge der Entstehung der Leukämie bzw. des Auftretens des Rezidives erworben worden sind, sowie gegen eine Bedeutung der Insertionen für die Prognose der Patienten mit Erstrezidiv einer ALL im Kindesalter.



#### IV Einfluss der Insertionen auf die Genexpression

Die Analysen der *MCL-1* Expression ließen eine Beeinflussung durch die Promotorinsertionen nicht erkennen, ein Umstand, der allein die mangelnde Assoziation mit prognostischen Parametern und dem Überleben der Patienten zu erklären vermag.

Dies steht ebenfalls im Einklang mit den Ergebnissen weiterer Forschergruppen (s. Tabelle 8).

**Tabelle 8** *MCL-1* Promotorvarianten und ihr Einfluss auf die Genexpression

	Genexpression	Experimentelles Design	Ref.
Promotor mit der +18bp Insertion	Erhöht	Luciferase assay mit U937-Zellen	Akgul <i>et al.</i> (70)
Promotor mit der +6bp oder +18bp Insertion	Erhöht	RNase protection assay, Western blot und Luciferase assay mit HeLa, K562 und DB-Zellen	Moshynska <i>et al.</i> (58) und Saxena <i>et al.</i> (68)
	Erniedrigt	Luciferase assay mit K562, MCF7-Zellen	Freeman <i>et al.</i> (67)
	Kein s. s. Unterschied	Affymetrix U133 Plus 2.0 microarrays	Dicker <i>et al.</i> (65)
	Kein s. s. Unterschied	qRT-PCR	diese Arbeit

bp=Basenpaare, s. s.: statistisch signifikant, qRT-PCR: quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Bezüglich der Untersuchungen von Akgul *et al.* (70) ist zu bemerken, dass kein Vergleich der Aktivität des Promotors mit der +18bp umfassenden Insertion zu der des Wildtyp-Promotors stattgefunden hat, sondern zu einer künstlich erzeugten Promotorvariante, bei der weitere 29 Basenpaare deletiert sind (47bp im Vergleich zu der +18bp-Promotorvariante zwischen –215 und –168bp aufwärts der Transkriptionsstartstelle). Im Vergleich zu dieser Deletionsmutante zeigte der +18bp-Promotor eine erhöhte Aktivität, sowohl unter normalen zellulären Bedingungen, als auch unter Zugabe von Phorbol-12-Myristate-13-Acetat (PMA) bzw. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF).

Freeman *et al.* (67) führten einen Luciferase assay mit NIH/3T3-, K562- und MCF7-Zellen durch und beobachteten jeweils 48 Stunden nach Transfektion eine erniedrigte Luciferaseaktivität der +6 und +18bp-Varianten sowohl unter normalen, als auch unter transkriptionsaktivierenden Umständen (durch Zusatz von PMA). Demgegenüber bestätigten Saxena *et*

al. (68) kürzlich ihre ursprüngliche Annahme eines direkten Einflusses der Promotorinsertionen auf die Genexpression: Beide Promotorvarianten zeigten im Vergleich zum Wildtyp-Promotor eine erhöhte Luciferaseaktivität, wobei die +18bp-Variante die höchste Aktivität erreichte.

Da eine direkte Messung der Aktivität der einzelnen Promotorvarianten in dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde, können diese Ergebnisse mit den gewonnenen Daten weder bestätigt noch widerlegt werden; es bleibt aber zu bemerken, dass die Arbeitsgruppe um Moshynska und Saxena (58, 68) die bisher einzige ist, die sowohl eine positive Korrelation zwischen dem Vorliegen der Promotorvarianten und einer erhöhten mRNA- und Proteinkonzentration als auch eine Steigerung der Promotoraktivität durch die Insertionen festgestellt hat.

Bemerkenswert ist auch, dass diese Arbeitsgruppe neben den beiden Insertionen vier *single nucleotide polymorphisms* (SNP) in der *MCL-1* Promotorregion bei einigen der untersuchten Patienten entdeckt hat, die unabhängig vom Vorhandensein der Insertionen die Transkription beeinflussen können, wie z. B. der im Bereich der Bindungsstelle des den Zellzyklus regulierenden Transkriptionsfaktors CRE-BP (*cAMP response element-binding protein*) liegende C(-236)A SNP (58).

#### V Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren?

Die beiden Insertionen befinden sich in einer GC-reichen Region des *MCL-1* Promotors, der im Falle der Wildtyp-Variante aus fünf GGCCCC-Wiederholungen und einem GCTCA-Motiv unmittelbar hinter dem ersten GGCCCC-Abschnitt besteht (s. Abbildung 5) Das +6bp-Allel enthält einen zusätzlichen GGCCCC-Abschnitt, das +18bp-Allel zwei zusätzliche GGCCCC-Abschnitte und ein GGCTCA-Motiv. Diese Region gilt wegen ihrer offenen Konfiguration des Chromatins als leicht zugänglich für Transkriptionsfaktoren (71). Die gesamte Promotorregion des *MCL-1* Gens verfügt über verschiedene mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, wie CRE-BP, NF- $\kappa$ B, Sp1, Ets, STAT, E2F1 und SRE (70); die Insertionen selbst stellen jedoch keine zusätzlichen Bindungsstellen dar (68). Allerdings liegen die Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B am Beginn und für Sp1 am Ende der 35bp umfassenden Region, in der sich die Insertionen befinden (-158bp bis -168bp für Sp1 und -210 bis -219bp für NF- $\kappa$ B aufwärts der Transkriptionsstartstelle), so dass ein Einfluss auf die Bindung dieser Transkriptionsfaktoren durch die Insertionen nicht ausgeschlossen werden kann.

## VI Weitere die Genexpression regulierende Mechanismen

Die nach den gewonnenen Daten und der allgemeinen Studienlage eher unwahrscheinliche Beeinflussung der Genexpression durch die beiden Promotorinsertionen lenkt den Blick auf weitere Mechanismen, die die *MCL-1* Expression auf transkriptioneller Ebene regeln: So kann die Genexpression durch den Zusatz von Phosphorsäureestern (z. B. TPA) in hämatopoietischen Zelllinien über die *extracellular signal-regulated kinase* (ERK)-vermittelte Aktivierung eines Transkriptionsfaktorkomplexes (u. a. *serum response factor* (SRF) und Elk-1), der an der entsprechenden Stelle im *MCL-1* Promotor bindet (–107bp aufwärts der Transkriptionsstartstelle), stimuliert werden (72). Ein weiterer Regelkreis beinhaltet Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), AKT und die Aktivierung eines Transkriptionsfaktorkomplexes, der CRE-BP enthält, und wird u. a. in hämatopoietischen Vorläuferzellen durch IL-3 und GM-CSF induziert (73). Alternativ erfolgt die Erhöhung der Genexpression durch IL-3 auch über den P38 MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-abhängigen Mechanismus (74), ebenso die Hypoxie- und EGF-induzierte Expression in humanen Leukozyten und in Ösophaguskarzinomzellen (75, 76). Eine weitere Möglichkeit der Signalübertragung involviert *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription* (JAK-STAT), hervorgerufen durch IL-6 und Interferon  $\alpha$  in humanen Myelomzellen bzw. durch GM-CSF in neutrophilen Granulozyten (77, 78).

Auch konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des *MCL-1* Promotors durch den Transkriptionsfaktor E2F1 direkt unterdrückt werden kann. Der p16/Rb/E2F1-Signalübertragungsmechanismus ist einer der am häufigsten genetisch alterierten in menschlichen Tumoren (79). E2F1 reguliert den Zellzyklus und fördert den Zelluntergang durch Apoptose, sowohl abhängig als auch unabhängig von p53, letzteres durch die Bindung an eine 26bp umfassende Region im *MCL-1* Promotor (–117 bis –143bp vor der Transkriptionsstartstelle) und die dadurch resultierende Hemmung der *MCL-1* Transkription (80).

Neben der Beeinflussung der Transkription wird die *MCL-1* Expression posttranskriptionell, translational und posttranslational reguliert. Posttranskriptionell beeinflusst v. a. alternatives Spleißen (*Exon-2 skipping*) die Expression, durch das neben dem längeren anti-apoptotischen Transkript eine kürzere proapoptotische Variante hervorgeht (s. einleitende Ausführungen und Abbildung 2).

Die Proteinsynthese kann u. a. durch Aspirin gehemmt werden und zwar zumindest teilweise über die Phosphorylierung einer Untereinheit des *initiation factors* eIF2 (eIF2 $\alpha$ ); hingegen beruht die Induktion der Apoptose durch Verhinderung der Translation mittels Cycloheximid auf dem raschen proteasomalen Abbau von MCL-1 (81, 82).

Die posttranslationale Regulierung der Expression umfasst die MCL-1 Phosphorylierung, den proteasomalen Abbau und die Spaltung durch Caspasen. Die Phosphorylierung von MCL-1 kann dabei wiederum auf verschiedene Weise erfolgen. Ein kürzlich aufgedeckter Mechanismus involviert Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), deren Aktivierung via PI3K/AKT durch Wachstumsfaktormangel (IL-3) die Phosphorylierung von MCL-1 und schließlich den Untergang der Zelle zur Folge hat (83). Das bedeutet, dass die Expression durch IL-3 via PI3K/AKT sowohl transkriptionell als auch posttranslational gesteuert werden kann.

Der proteasomale Abbau von MCL-1 kann neben der Phosphorylierung auch durch Ubiquitinierung eingeleitet werden, und zwar durch die ebenfalls kürzlich entdeckte MULE/ARF-BP1, eine BH3-only E3 Ubiquitin-Ligase, die auch die Ubiquitinierung von p53 katalysiert (84).

Neben Caspase-vermittelter Proteolyse von MCL-1 (Abbildung 2) hat auch die Interaktion von MCL-1 mit TCTP (*translationally-controlled tumor protein*, auch bekannt als Fortilin) einen Einfluss auf die MCL-1 Konzentration. Eine TCTP-Überexpression fördert die Stabilität von MCL-1 durch die Verhinderung des Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Abbaus und führt so zu einem erhöhten zellulären MCL-1 Proteingehalt (85).

Insgesamt wird so die MCL-1 Expression auf verschiedenste Weise geregelt. Sie ist gewebespezifisch und abhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen (86). Verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine (IL-3 – 7, IL-10, IL-13, IL-15, GM-CSF, EGF, VEGF), Hypoxie, LPS und Phosphorsäureester führen zu einer Erhöhung der Expression und ermöglichen es den Zellen, sich zu differenzieren und zu proliferieren, aber auch u. U. zu entarten (86, 87).

Die Bedeutung von MCL-1 für die Behandlung von Tumoren wird auch dadurch deutlich, dass eine Überexpression dieses Proteins als Folge verschiedener apoptotischer Stimuli, wie HDACi, Etoposid und Bestrahlung, beobachtet werden kann (88-90).

Gänzlich resistent gegenüber ionisierender Bestrahlung zeigten sich MCL-1 überexprimierende AML-Zellen mit *FLT3*-ITD (*internal tandem duplications*, MV4-11-Zellen), deren Vorhandensein mit einer schlechten Prognose sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern mit dieser Leukämie assoziiert ist (91, 92).

## VII Ausblick

Aufgrund der Fähigkeit von BCL-2 Proteinen, den Zelltod induziert durch Chemotherapeutika zu verhindern, hat man sie als neue Form von *multidrug-resistance* (MDR)-Proteinen angesehen. Im Gegensatz aber zu den MDR-1 Proteinpumpen, die den Ausstrom der Wirkstoffe aus der Zelle bewirken, spielen antiapoptotische Proteine keine Rolle bei deren Ein- bzw. Ausstrom und Anhäufung in den Tumorzellen. Auch verhindern sie nicht die initiale Schädigung der Zellen. Vielmehr bewirken sie, dass der therapeutisch verursachte Zellschaden nicht in den Untergang der Zelle mündet. Die geschädigten Zellen leben, erfahren jedoch die zellzyklusinhibierende Wirkung der Therapeutika, d. h. die DNA-Synthese und die Anordnung der Mikrotubuli während der Mitose sistiert. Antiapoptotische Proteine wandeln so das zytotoxische Potential der Therapeutika in ein zytostatisches um.

Um die Effektivität einer Chemotherapie zu verbessern, gelangen daher Medikamente in den Blickpunkt des Interesses, die den Prozess der Apoptose direkt fördern. Versuche in dieser Hinsicht betreffen die Verringerung der Expression einzelner antiapoptotischer Proteine mit Antisense-Oligonukleotiden (ASO), RNA-Interferenz und die Förderung der apoptotischen Aktivität der Zellen durch BH3-Mimetika.

Die durch Überexpression von MCL-1 vermittelte Apoptoseresistenz einer Zelle und die damit verbundene Bedeutung dieses Proteins für das Ansprechen auf die Therapie und die Prognose der Patienten bei den verschiedensten malignen Erkrankungen haben zu Bestrebungen geführt, die durch MCL-1 vermittelte Therapieresistenz therapeutisch zu durchbrechen. So konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der *MCL-1* Expression durch siRNA oder Antisense-Moleküle ausreichend für die Initiation der Apoptose in Myelomzellen (Zelllinien und Patientenzellen), U-937-Zellen, Melanom-Zelllinien, K562-Zellen, Mastzellen (HMC-1), ALL-Zellen (697), primären CLL-Zellen, HCC- und Pankreaskarzinom-Zellen ist (93-100) bzw. die Empfindlichkeit gegenüber einer Radio- oder Chemotherapie erhöht, so z. B. in Kombination mit niedrig dosiertem Cyclophosphamid in humanen Sar-

kom-Xenotransplantaten, mit Gemcitabin in Pankreaskarzinomzellen oder mit Cisplatin in HCC-Zellen (100-102).

Auch führte die Beobachtung, dass das Onkogen *BCR/ABL* die *MCL-1* Promotoraktivität, mRNA- und Proteinexpression steigert, zum Nachweis eines synergistischen Effektes von Imatinib (ST1571) und *MCL-1* ASO (in K562-Zellen) (103).

Die Hemmung der *MCL-1* Expression erhöht auch die Sensitivität gegenüber Rituximab, HDACi (SAHA + Valproinsäure) und Bortezomib, weitere Medikamente mit antileukämischer Aktivität, die zur Zeit in klinischen Studien getestet werden (98, 104-108).

Neben den genannten Möglichkeiten der Transkriptions- bzw. posttranskriptionellen Hemmung der *MCL-1* Expression durch siRNA und ASO gibt es Medikamente, die die *MCL-1* Expression indirekt vermindern, z. B. Honokiol, Seliciclib, Etodolac und Homoharringtonine (HHT), und dadurch den Zelluntergang in den entsprechend getesteten Zellen vermitteln (B-CLL, Myelomzellen, AML-Zellen [HL-60]) bzw. in sub-zytotoxischen Dosen (Etodolac) MM-Zellen für den Dexamethason-induzierten Zelltod sensibilisieren (109-112).

Viel Aufmerksamkeit kommt derzeit dem BH3-Mimetikum ABT-737 zu, das die antiapoptischen Proteine BCL-2, BCL-X<sub>L</sub> und BCL-W bindet und so ihre Funktion antagonisiert. Es zeigte bei alleiniger Anwendung Toxizität gegen verschiedene Zelllinien und Patientenzellen (CLL-Zellen, Follikuläre Lymphom-Zellen, Lymphomzelllinien, SCLC-Zelllinien, CML-Zellen, AML- und MM-Zellen) (113-118). *In vivo* induziert ABT-737 die komplette Regression von NHL in Mäusen bei Gabe in Kombination und von SCLC-Xenografttransplantaten bei alleiniger Anwendung (113, 28).

Bald zeigte sich jedoch, dass eine erhöhte *MCL-1* Expression Resistenz auch gegenüber diesem vielversprechenden Therapeutikum vermittelt und deshalb viele Zellen ABT-737-refraktär sind (116, 119, 120). Untersuchungen bezüglich der Wirkungen von ABT-737 bei CML ergaben, dass dadurch der Erfolg einer Imatinib-Therapie zwar verbessert werden kann, nicht jedoch bei Vorliegen von ABL mit Mutationen, die gegenüber Imatinib unempfindlich sind, wie T3151. *BCR/ABL*-positive Zellen mit einer solchen Mutation konnten allerdings mit einer Kombination aus Homoharringtonine (Verminderung der *MCL-1* Expression) und ABT-737 zerstört werden (114), ein weiteres Beispiel für die Bedeutung von *MCL-1* in therapierefraktären Fällen.

Auch für die ALL (Ersterkrankung und Rezidiv) ist eine Wirksamkeit des BH3-Mimetikums ABT-737 *in vitro* und *in vivo* beobachtet worden, sowohl als alleiniges Therapeutikum als auch in Kombination mit Vincristin, L-Asparaginase und Dexamethason (121, 122).

Vor ein paar Monaten wurde nun berichtet, dass mit Obatoclax (GX15-070) ein BH3-Mimetikum zur Verfügung steht, das auch MCL-1 antagonisiert. Die Wirksamkeit von Obatoclax wird derzeit in Phase Ib- und Phase II-Studien für Leukämien, Lymphome und solide Tumoren geprüft. Damit besteht die Möglichkeit, die durch MCL-1 vermittelte Resistenz u. a. gegenüber ABT-737 zu überwinden (123, s. auch 124).

Vor dem Hintergrund der Bedeutung von *MCL-1* für das Überleben hämatopoietischer Stammzellen einerseits und besonders therapieresistente und aggressive Tumoren (*BCR/ABL*-positiv, Glukokortikoid-resistent, Imatinib-resistent, CD 38-positiv CLL, *MLL*-Rearrangement-positiv ALL) andererseits erscheint eine auch auf *MCL-1* gerichtete Tumorthherapie zumindest bedenkenswert.

## **E Zusammenfassung**

Eine erhöhte Expression des antiapoptotischen *MCL-1* Gens trägt zur Immortalisation und Tumorentstehung sowie zur Therapieresistenz bei den verschiedensten Tumoren bei; für die ALL besteht eine Korrelation mit der Resistenz gegenüber Prednisolon. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Expression dieses Gens lieferte die Entdeckung zweier 6 und 18bp umfassende Insertionen in der Promotorregion des *MCL-1* Gens bei 17 von 58 CLL-Patienten, wobei ein somatischer Ursprung angesichts ihres fehlenden Nachweises in der Vergleichsgruppe (n=18) und in nicht leukämischen Zellen zweier Patienten vermutet wurde. Das Vorhandensein der Insertionen korrelierte mit einem fehlenden Ansprechen auf die Therapie und der Prognose der Patienten sowie einer erhöhten mRNA- und Proteinkonzentration.

In dieser Arbeit wurde der Bedeutung dieser Insertionen für Rezidive einer ALL nachgegangen, die die häufigste Form des Therapieversagens darstellen und zumeist Ausdruck einer therapierefraktären Erkrankung sind. Die Insertionen zeigten sich in nahezu gleicher Häufigkeit im Patienten- und Vergleichskollektiv (27/134 [20.2%] bzw. 20/98 [20.4%]) sowie in korrespondierendem Remissionsmaterial der Patienten (identischer Genotyp). Ihr Vorhandensein korrelierte weder mit klinischen prognostischen Parametern zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose noch mit dem ereignisfreien Überleben der Patienten und die Analyse der Genexpression ergab keinen Anhalt für eine Beeinflussung durch die Insertionen.

Die gewonnenen Ergebnisse sprechen für das Vorliegen von hereditären Polymorphismen und gegen eine Bedeutung der Insertionen für das Auftreten des Rezidives und die Prognose der Patienten mit Erstrezidiv einer ALL im Kindesalter. Allerdings konnte unabhängig vom Vorhandensein der Insertionen ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten *MCL-1* Expression und dem Auftreten eines Folgerezidives gesehen werden, eine Beobachtung, die der Bedeutung des *MCL-1* Gens für die Entwicklung einer Therapieresistenz entspricht und weitergehende Untersuchungen rechtfertigt.

Diese Arbeit wurde gefördert durch die Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung; die Daten sind zu einem Teil publiziert im *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1091.



## Literatur

- 1 [www.kinderkrebsregister.de](http://www.kinderkrebsregister.de), Jahresbericht 2006/07
- 2 Pui C-H, Evans WE: Drug Therapy: Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. Review. N Engl J Med 2006; 354: 166-78.
- 3 Möricke A, Reiter A, Zimmermann M, et al.: Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. Blood 2008; 111: 4477-89.
- 4 Henze G: Leukämien. in: Gutjahr, Peter (Hrsg.). Krebs bei Kindern und Jugendlichen. Deutscher Ärzte-Verlag, 5. Aufl. 2004.
- 5 Gaynon PS: Childhood acute lymphoblastic leukaemia and relapse. Br J Haematol 2005; 131: 579-87.
- 6 Graf Einsiedel H, von Stackelberg A, Hartmann R, et al: Long-Term Outcome in Children With Relapsed ALL by Risk-Stratified Salvage Therapy: Results of Trial Acute Lymphoblastic Leukemia-Relapse Study of the Berlin-Frankfurt-Münster Group 87. J Clin Oncol 2005; 23: 7942-50.
- 7 Roy A, Cargill A, Love S, et al: Outcome after first relapse in childhood acute lymphoblastic leukaemia – lessons from the United Kingdom R2 trial. Br J Haematol 2005; 130: 67-75.
- 8 Gaynon PS, Qu RP, Chappell RJ, et al.: Survival after relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: impact of site and time to first relapse – the Children’s Cancer Group Experience. Cancer 1998; 82: 1387-95.
- 9 Rivera GK, Zhou Y, Hancock ML, Gajjar A, Rubnitz J, Ribeiro RC, et al: Bone marrow recurrence after initial intensive treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer 2005; 103: 368-76.
- 10 Borgmann A, Stackelberg A v, Hartmann R, et al.: Unrelated donor stem cell transplantation compared with chemotherapy for children with acute lymphoblastic leukemia in a second remission: a matched pair analysis. Blood 2003; 101: 3835-9.
- 11 v. Stackelberg A, Hartmann R, Bühner C, et al.: High-dose compared with intermediate-dose methotrexate in children with first relapse of acute lymphoblastic leukemia. Blood 2008; 111: 2573-80.
- 12 Gaynon PS, Desai AA, Bostrom BC, et al.: Early response to therapy and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia: a review. Cancer 1997; 80: 1717-26.
- 13 Riehm H, Reiter A, Schrappe M, Berthold F, Dopfer R, Gerein V, et al: Corticosteroid-dependent reduction of leukocyte count in blood as a prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia in childhood (therapy study ALL-BFM 83). Klin Pädiatr 1987; 199: 151-60.
- 14 Reiter A, Schrappe M, Ludwig W-D, et al.: Chemotherapy in 998 Unselected Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. Results and Conclusions of the Multicenter Trial ALL-BFM 86. Blood 1994; 84: 3122-33.

- 15 Schrappe M, Reiter A, Ludwig W-D, et al.: Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. *Blood* 2000; 95: 3310-22.
- 16 Klumper E, Pieters R, Veerman AJP, et al.: In Vitro Cellular Drug Resistance in Children With Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* 1995; 86: 3861-8.
- 17 Schrappe M: Evolution of BFM trials for Childhood ALL. *Ann Hematol* 2004; 83 (Suppl. 1): S121-S123.
- 18 Eckert C, Biondi A, Seeger K, et al.: Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2001; 358: 1239-41.
- 19 Longley DB & Johnston PG: Molecular mechanisms of drug resistance, *J Pathol* 2005; 205: 275-92.
- 20 Igney FH, Krammer PH: Death and Anti-Death: Tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 277-88.
- 21 Hanahan D, Weinberg RA: The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
- 22 Pui C-H, Relling MV, Downing JR: Mechanisms of disease: Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004; 350: 1535-48.
- 23 Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW: Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy. *Cell* 2002; 108: 153-64.
- 24 Brady HJM: Apoptosis and leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 123: 577-85.
- 25 Youle RJ, Strasser A: The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 47-59.
- 26 Danial NN, Korsmeyer SJ: Cell Death: Critical Control Points. *Cell* 2004; 116: 205-19.
- 27 Reed JC: Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2941-53.
- 28 Fesik SW: Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 876-85.
- 29 Brown JM, Attardi LD: The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 231-7.
- 30 Prokop A, Wieder T, Sturm I, et al.: Relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with a decrease of the Bax/Bcl-2 ratio and loss of spontaneous caspase-3 processing *in vivo*. *Leukemia* 2000; 14: 1606-13.
- 31 Holleman A, Boer ML d, Kazemier KM, Janka-Schaub GE, Pieters R: Resistance to different classes of drugs is associated with impaired apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2003; 102: 4541-6.
- 32 Cario G, Stanulla M, Fine BM, et al.: Distinct gene expression profiles determine molecular treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005; 105: 821-6.
- 33 Holleman A, Boer ML d, Menezes RX d, et al.: The expression of 70 apoptosis genes in relation to lineage, genetic subtype, cellular drug resistance, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2006; 107: 769-76.

- 34 Cheok MH, Yang W, Pui C-H, et al: Treatment-specific changes in gene expression discriminate in vivo drug response in human leukaemia cells. *Nat Genet* 2003; 34: 85-90.
- 35 Beesley AH, Cummings AI, Freitas JR, et al.: The gene expression signature of relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia: implications for mechanisms of therapy failure. *Br J Haematol* 2005; 131: 447-56.
- 36 Bingle CD, Craig RW, Swales BM, Singleton V, Zhou P and Whyte MKB: Exon Skipping in Mcl-1 Results in a Bcl-2 Homology Domain 3 Only Gene Product That Promotes Cell Death. *J Biol Chem* 2000; 275: 22136-46.
- 37 Michels J, Johnson PWM, Packham G: Mcl-1. *Int J Biochem & Cell Biol* 2005; 37: 267-71.
- 38 Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P, Craig RW: MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3516-20.
- 39 Opferman JT, Iwasaki H, Ong CC, et al: Obligate Role of Anti-Apoptotic MCL-1 in the Survival of Hematopoietic Stem Cells. *Science* 2005; 307: 1101-04.
- 40 Opferman JT, Letai A, Beard C, et al: Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* 2003; 426: 671-76.
- 41 Lomo J, Smeland EB, Krajewski S, Reed JC, Blomhoff HK: Expression of the Bcl-2 homologue Mcl-1 correlates with survival of peripheral blood B lymphocytes. *Cancer Res* 1996; 56: 40-3.
- 42 Zhou P, Levy NB, Xie H et al: Mcl1 transgenic mice exhibit a high incidence of B cell lymphoma manifested as a spectrum of histologic subtypes. *Blood* 2001; 97: 3902-09.
- 43 Zhou P, Qian L, Bieszczad CK, et al: Mcl1 in transgenic mice promotes survival in a spectrum of hematopoietic cell types and immortalization in the myeloid lineage. *Blood* 1998; 92: 3226-39
- 44 Kitada S, Andersen J, Akar S, et al.: Expression of apoptosis-regulating proteins in CLL: Correlations with in vitro and in vivo chemoresponses. *Blood* 1998; 91(9): 3379-89.
- 45 Saxena A, Viswanathan S, Moshynska O, et al: Mcl1 and Bcl2/Bax ratio are associated with treatment response but not with Rai stage in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 2004; 75(1): 22-33.
- 46 Kaufmann SH, Karp JE, Svingen PA, et al: Elevated expression of the apoptotic regulator Mcl1 at the time of leukemic relapse. *Blood* 1998; 91: 991-1000.
- 47 Cho-Vega JH, Rassidakis GZ, Admirand JH, et al: MCL-1 expression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Hum Pathol* 2004; 35: 1095-100.
- 48 Véronèse L, Tournhilhac O, Vereelle P: Low MCL-1 mRNA expression correlates with prolonged survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2007; Nov 29 Advance online publication.
- 49 Petlickovski A, Laurenti L, Xiaoping L, et al.: Sustained signalling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2005; 105: 4820-7.
- 50 Johnstone JB, Paul JT, Neufeld NJ, et al.: Role of myeloid cell factor-1 (Mcl-1) in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk & Lymph* 2004; 45: 2017-27.

- 51 Ding Q, He X, Xia W, et al.: Myeloid cell leukemia-1 inversely correlates with glycogen synthase kinase-3 $\beta$  activity and associates with poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 4564-71.
- 52 Fleischer B, Schulze-Bergkammen H, Schuchmann M, et al: Mcl-1 is an antiapoptotic factor for human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2006; 28: 25-32.
- 53 Wuillème-Toumi S, Robillard N, Gomez P, et al.: Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia*. 2005; 19: 1248-52.
- 54 Pepper C, Ward R, Lin TT, et al.: Highly purified CD38+ and CD38– sub-clones derived from the same chronic lymphocytic leukemia patient have distinct gene expression signatures despite their monoclonal origin. *Leukemia* 2007; 21: 687-96.
- 55 Stijn A v, Pol MA v, Kok A, et al.: Differences between the CD34+ and CD34– blast compartments in apoptosis resistance in acute myeloid leukaemia. *Haematologica* 2003; 88: 497-508.
- 56 Holleman A, Cheok MH, den Boer ML, et al.: Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N Engl J Med* 2004; 351: 533-42.
- 57 Stam RW, den Boer ML, Pieters R: Towards targeted therapy for infant acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2006; 132: 539-551.
- 58 Moshynska O, Sankaran K, Pahwa P, Saxena A. Prognostic Significance of a Short Sequence Insertion in the MCL-1 Promoter in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 673-82.
- 59 Sanger F, Nicklen S, Coulsen AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-7.
- 60 Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM: Real Time Quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6: 986-94.
- 61 Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VHJ, et al.: Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program. *Leukemia* 2003; 17: 2474-86.
- 62 Moshynska O, Saxena A: Response: Re: Prognostic Significance of a Short Sequence Insertion in the MCL-1 Promoter in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1093-5.
- 63 Tobin G, Skogsberg A, Thunberg U, Laurell A, Aleskog A, Merup M et al. Mcl-1 gene promoter insertions do not correlate with disease outcome, stage or VH gene mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2005; 19: 871-3.
- 64 Iglesias-Serret D, Coll-Mulet L, Santidrián AF, Navarro-Sabaté A, Domingo A, Pons G et al. Re: Prognostic Significance of a Short Sequence Insertion in the MCL-1 Promoter in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1090-1.
- 65 Dicker F, Rauhut S, Kohlmann A, Kern W, Schoch C, Haferlach T, et al. Re: Prognostic Significance of a Short Sequence Insertion in the MCL-1 Promoter in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1092-3.

- 66 Coenen S, Pickering B, Potter KN, Johnson PWM, Stevenson FK, Packham G. The relevance of sequence insertions in the Mcl-1 promoter in chronic lymphocytic leukaemia and in normal cells. *Haematologica* 2005; 90: 1285-6.
- 67 Freeman SN, Bepler G, Haura E, Sutphen R, Cress WD: Re: Prognostic Significance of a Short Sequence Insertion in the MCL-1 Promoter in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1088-9.
- 68 Saxena A, Moshynska OV, Moshynskyy ID, et al.: Short nucleotide polymorphic insertions in the MCL-1 promoter affect gene expression. *Cancer Lett* 2007; 251: 114-131.
- 69 Wilkening S, Hemminki K, Thirumaran RK, et al.: Determination of allele frequency in pooled DNA: comparison of three PCR-based methods. *Biotechniques* 2005; 39: 853-8.
- 70 Akgul C, Turner PC, White MRH, Edwards SW: Functional analysis of the human *MCL-1* gene. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 684-691.
- 71 Cross SH, Bird AP: CpG islands and genes. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5: 309-14.
- 72 Townsend KJ, Zhou P, Bieszczad CK, Qian L, Craig RW: Regulation of MCL1 by a serum response factor/Elk-1– mediated mechanism links expression of a viability-promoting member of the Bcl-2 family to the induction of hematopoietic cell differentiation. *J Biol Chem* 1999; 274: 1802-13.
- 73 Wang JM, Chao JR, Chen W, et al.: The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signalling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 6195-6206.
- 74 Wang JM, Lai MZ, Yang-Yen HF: Interleukin-3 stimulation of mcl-1 gene transcription involves activation of the PU.1 transcription factor through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 1896-1909.
- 75 Leuenroth SJ, Grutkoski PS, Ayala A, Simms HH: Suppression of PMN apoptosis by hypoxia is dependent on Mcl-1 and MAPK activity. *Surgery* 2000; 128: 171-7.
- 76 Leu CM, Chang C, Hu C: Epidermal growth factor (EGF) suppresses staurosporine-induced apoptosis by inducing mcl-1 via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene* 2000; 19: 1665-75.
- 77 Puthier D, Bataille R, Amiot M: IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK/STAT rather than ras/MAP kinase pathway. *Eur J Immunol* 1999; 29: 3945-50.
- 78 Epling-Burnette PK, Zhong B, Bai F, et al. Cooperative regulation of Mcl-1 by Janus kinase/stat and phosphatidylinositol 3-kinase contribute to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-delayed apoptosis in human neutrophils. *J Immunol* 2001; 166: 7486-95.
- 79 Fueyo J, Gomez-Manzano C, Yung WKA, et al.: Overexpression of E2F-1 in glioma triggers apoptosis and suppresses tumor growth *in vitro* and *in vivo*. *Nat Med* 1998; 4: 685-90.
- 80 Croxton R, Ma Y, Song L, Haura EB, Cress WD: Direct repression of the Mcl-1 promoter bei E2F1. *Oncogene* 2002; 21: 1359-69.
- 81 Adams KW, Cooper GM: Rapid Turnover of Mcl-1 Couples Translation to Cell Survival and Apoptosis. *J Biol Chem* 2007; 282: 6192-200.

- 82 Iglesias-Serret D, Piqué M, Gil J, Pons G, López JM: Transkriptional and translational control of Mcl-1 during apoptosis. *Archiv Biochem Biophys* 2003; 417: 141-52.
- 83 Maurer U, Charvet C, Wagman AS, Dejardin E, Green DR: Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membran permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell* 2006; 21: 749-60.
- 84 Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X: Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyses the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* 2005; 121: 1085-95.
- 85 Lui H, Peng HW, Cheng YS, Yuan HS, Yang-Yen HF: Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 3117-26.
- 86 Craig RW: MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. Review. *Leukemia* 2002; 16: 444-54.
- 87 Yang-Yen HF: Mcl-1: a highly regulated cell death and survival controller. *J Biomed Sci* 2006;
- 88 Zhan Q, Bieszczađ CK, Bae I, Fornace Jr A, Craig RW: Induction of Bcl-1 family member Mcl-1 as an early response to DNA damage. *Oncogene* 1997; 14: 1031-39.
- 89 Skvara H, Thallinger C, Wachek V, et al.: Mcl-1 blocks radiation-incuced apoptosis and inhibits clonogenic cell death. *Anticancer Res* 2005; 25: 2696-703.
- 90 Zhou P, Qian L, Kozopas KM, Craig RW: Mcl-1, a Bcl-1 Family Member, Delays the Death of Hematopoietic Cells Under a Varsity of Apoptosis-Inducing Conditions. *Blood* 1997; 89: 630-43.
- 91 Wergeland L, Sjøholt G, Haaland I, Hovland R, Bruslerud O, Gjertsen BT: Pre-apoptotic response to therapeutic DNA damage involves protein modulation of Mcl-1, Hdm2 and Flt3 in acute myeloid leukemia cells. *Mol Cancer* 2007; 6: 33.
- 92 Rubnitz JE:: Childhood acute myeloid leukemia. *Curr Treat Options Oncol* 2008; May 28 (Epub ahead of print).
- 93 Derenne S, Monia B, Dean NM, Taylor JK, Rapp M-J, Harousseau J-L, et al: Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-xL is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood* 2002; 100: 194-99.
- 94 Le Gouill S, Podar K, Amiot M, et al: VEGF induces Mcl-1 up-regulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis. *Blood* 2004; 104: 2886-92.
- 95 Moulding DA, Giles RV, Spiller DG, White MR, Tidd DM, Edwards SW: Apoptosis is rapidly triggered by antisense depletion of MCL-1 in differentiating U937 cells. *Blood* 2000; 96: 1756-63.
- 96 Chetoui N, Sylla K, Gagnon-Houde JV, Alcaide-Loridan C, Charron D, Al-Daccak R, et al: Down-regulation of mcl-1 by small interfering RNA sensitises resistant melanoma cells to fas-mediated apoptosis. *Mol Cancer Res* 2008; 6: 42-52.
- 97 Aichberger KJ, Mayerhofer M, Gleixner KV, Krauth MT, Gruze A, Pickl WF, et al: Identification of MCL1 as a novel target in neoplastic mast cells in systemic mastocytosis: inhibition of mast cell survival by MCL1 antisense oligonucleotides and synergism with PKC412. *Blood* 2007; 109: 3031-41.

- 98 Hussain S-RA, Cheney CM, Johnson AJ, Lin TS, Grever MR, Caligiuri MA, et al.: Mcl-1 is a relevant therapeutic target in acute and chronic lymphoid malignancies: Down-regulation enhances Rituximab-mediated apoptosis and complement-dependent cytotoxicity. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2144-50.
- 99 Sieghart W, Losert D, Strommer S, et al.: Mcl-1 overexpression in hepatocellular carcinoma: A potential target for antisense therapy. *J Hepatol* 2006; 44: 151-7.
- 100 Wei SH, Dong K, Lin F, et al.: Inducing apoptosis and enhancing chemosensitivity to Gemcitabine via RNA interference targeting Mcl-1 gene in pancreatic carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; Feb 23 (Epub ahead of print).
- 101 Thallinger C, Wolschek MF, Maierhofer H, et al.: Mcl-1 is a novel therapeutic target for human sarcoma: synergistic inhibition of human sarcoma xenotransplants by a combination of Mcl-1 antisense oligonucleotides with low-dose cyclophosphamide. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4185-91.
- 102 Schulze-Bergkammen H, Fleischer B, Schuchmann M, et al.: Suppression of Mcl-1 via RNA interference sensitizes human hepatocellular carcinoma cells towards apoptosis induction. *BMC Cancer* 2006; 6: 232.
- 103 Aichberger KJ, Mayerhofer M, Krauth M-T, Skvara H, Florian S, Sonneck K, et al.: Identification of Mcl-1 as a BCR/ABL-dependent target in chronic myeloid leukemia (CML): evidence for cooperative antileukemic effects of imatinib and Mcl-1 antisense oligonucleotides. *Blood* 2005; 105: 3303-11.
- 104 Inoue S, Walewska R, Dyer MJ, Cohen GM: Downregulation of Mcl-1 potentiates HDACi-mediated apoptosis in leukemic cells. *Leukemia* 2008; Jan 31 (Epub ahead of print).
- 105 Rosato RR, Almenara JA, Maggio SC, Atadja P, Craig R, Vrana J, et al.: Potentiation of lethality of the histone deacetylase inhibitor LAQ824 by the cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine in human leukemia cells. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 1772-85.
- 106 Pérez-Galán P, Roué G, Villamor N, Montserrat E, Campo E, Colomer D: The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and NOXA activation independent of p53 status. *Blood* 2006; 107: 257-64.
- 107 Podar K, Gouill SL, Zhang J, Opferman JT, Zorn E, Tai YT, et al.: A pivotal role for Mcl-1 in Bortezomib-induced apoptosis. *Oncogene* 2008; 27: 721-31.
- 108 Nencioni A, Hua F, Dillon CP, et al.: Evidence for a protective role of Mcl-1 in proteasome inhibitor-induced apoptosis. *Blood* 2005; 105: 3255-62.
- 109 Battle TE, Arbiser J, Frank DA: The natural product honokiol induces caspase-dependent apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells. *Blood* 2005; 106: 690-7.
- 110 Raje N, Kumar S, Hideshima T, Roccaro A, Ishitsuka K, Yasui H, et al.: Seliciclib (CYC202 or R-roscovitine), a small-molecule cyclin-dependent kinase inhibitor, mediates activity via down-regulation of Mcl-1 in multiple myeloma. *Blood* 2005; 106: 1042-7.
- 111 Yasui H, Hideshima T, Hamasaki M, Roccaro AM, Shiraishi N, Kumar S, et al.: SDX-101, the R-enantiomer of etodolac, induces cytotoxicity, overcomes drug resistance, and enhances the activity of dexamethason in multiple myeloma. *Blood* 2005; 106: 706-12.

- 112 Tang R, Faussat AM, Majdak P, Marzac C, Dubrulle S, Marjanovic Z, et al.: Semisynthetic homoharringtonine induces apoptosis via inhibition of protein synthesis and triggers rapid myeloid cell leukemia-1 down-regulation in myeloid leukemia cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 723-31.
- 113 Olterdsorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, et al: An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 2005; 435: 677-81.
- 114 Kuroda J, Kimura S, Andreeff M, Ashihara E, Kamitsuji Y, Yokota A, et al.: ABT-737 is a useful component of combinatory chemotherapies for chronic myeloid leukaemias with diverse drug-resistance mechanisms. *Br J Haematol* 2008; 140: 181-90.
- 115 Del Gaizo Moore V, Brown JR, Certo M, Love TM, Novina CD, Letai A: Chronic lymphocytic leukemia requires Bcl2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to Bcl2 antagonist ABT-737. *J Clin Invest* 2007; 117: 112-21.
- 116 Konopleva M, Contractor R, Tsao T, Samudio I, Ruvolo PP, Kitada S, et al.: Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2006; 10: 375-88.
- 117 Kline MP, Rajkumar SV, Timm MM, et al.: ABT-737, an inhibitor of Bcl-2 family proteins, is a potent inducer of apoptosis in multiple myeloma cells. *Leukemia* 2007; 21: 1549-60.
- 118 Trudel S, Stewart AK, Li Z, et al.: The Bcl-2 family protein inhibitor, ABT-737, has substantial antimyeloma activity and shows synergistic effect with dexamethasone and melphalan. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 621-9.
- 119 van Delft MF, Wei AH, Mason KD, Vandenberg CJ, Chen L, Czabotar PE, et al.: The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* 2006; 10: 389-99.
- 120 Lin X, Morgan-Lappe S, Huang X, et al.: 'Seed' analysis of off-target siRNAs reveals an essential role of Mcl-1 in resistance to the small-molecule Bcl-2/Bcl-XL inhibitor ABT-737. *Oncogene* 2007; 26: 3972-9.
- 121 Kang MH, Kang YH, Szymansa B, Wilczynska-Kalak U, Sheard MA, Harned TM, et al.: Activity of vincristine, L-ASP, and dexamethasone against acute lymphoblastic leukemia is enhanced by the BH3-mimetic ABT-737 in vitro and in vivo. *Blood* 2007; 110: 2057-66.
- 122 Del Gaizo Moore V, Schlis KD, Sallan SE, Armstrong SA, Letai A: BCL-2 dependence and ABT-737 sensitivity in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007; Dec 4 (Epub ahead of print).
- 123 Nguyen M, Marcellus RC, Roulsten A, Watson M, Serfass L, Madiraju SRM, et al.: Small molecule Obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 19512-17.
- 124 Chen S, Dai Y, Harada H, Dent P, Grant S: Mcl-1 down-regulation potentiates ABT-737 lethality by cooperatively inducing Bak activation and Bax translocation. *Cancer Res* 2007; 67: 782-91.



**Erklärung**

Ich, Uta Nenning, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema  
``Insertionen in der Promotorregion des *MCL-1* Gens und deren klinische Relevanz bei  
Erstrezidiven einer akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter`` selbst verfasst  
und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzu-  
lässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten darge-  
stellt habe.

Berlin, den 15. Juli 2008

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. Dr. K. Seeger für die Überlassung des Themas und das entgegengebrachte Vertrauen, Frau Dr. C. Eckert und Herrn Dr. S. Wellmann für die gute Betreuung, Frau C. Hanel, Frau S. Hollmann, Frau W. Keune, Frau G. Körner, Frau J. Proba für die jederzeitige Hilfestellung bei technischen Fragen und Frau A. Barth bei Fragen der Statistik.