

1 Einleitung

1.1 Akute Leukämien im Kindesalter

Akute Leukämien sind klonale Erkrankungen maligne transformierter hämatopoetischer Vorläuferzellen. Diese sind nicht mehr in der Lage zu den funktionellen Endzellen der jeweils betroffenen Zellreihe heranzureifen. Daraus resultieren die Akkumulation leukämischer Zellen im Blut und den parenchymatösen Organen sowie vor allem eine Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark. Anhand ihrer Ursprungszelle werden akute Leukämien in myeloische oder lymphatische Formen unterteilt.

Die Ätiologie akuter Leukämien ist unbekannt, jedoch spielen ionisierende Strahlen und kanzerogene Substanzen wie bestimmte Zytostatika oder Chemikalien pathogenetisch eine Rolle. Auch bei Kindern mit angeborenen Immundefekten, wie z.B. dem Wiskott-Aldrich-Syndrom, der kongenitalen Hypogammaglobulinämie oder der Ataxia telangiectasia, im Rahmen einer immunsuppressiven Therapie, wie z. B. nach Organtransplantation sowie bei Kindern mit Trisomie 21 treten vermehrt Leukämien auf. Zwillingsstudien haben gezeigt, dass es bei einigen Kindern schon pränatal zu pathogenetisch bedeutsamen molekularen Veränderungen kommt. Die postnatale Latenzperiode nach solch einem initialen Ereignis ist dann aber sehr variabel und die Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen ist nur ca. 20%, so dass noch weitere molekulargenetische Veränderungen und exogene Einflußfaktoren bei der Leukämogenese eine Rolle spielen müssen.^{1,2,3}

Mit 35% sind Leukämien die häufigsten Neoplasien des Kindesalters. Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) ist mit ca. 80% vorherrschend, gefolgt von der akuten myeloischen Leukämie (AML) mit knapp 20%. Die chronische Form ist im Kindesalter selten. Eine genauere Charakterisierung der leukämischen Blasten nach zytomorphologischen, immunologischen sowie molekulargenetischen Gesichtspunkten zeigt, dass die ALL eine biologisch heterogene Erkrankung ist. Diese Heterogenität folgt aus der Tatsache, dass die Leukämie in jedem Stadium der normalen lymphatischen Differenzierung entstehen kann. Das Expressionsmuster verschiedener zellulärer Oberflächenantigene spiegelt den Reifegrad der hämatopoetischen Zellen wider. So können die Leukämiezellen anhand der Bestimmung eines Oberflächenmarker-Expressionsprofils in weitere Untergruppen eingeteilt werden. 85% der ALL bei Kindern sind B-Vorläuferzell-ALL (5% pro-B, 65% common, 15% prä-B). Reife B-Zellen exprimieren Immunglobuline an ihrer Oberfläche; sie sind bei 3% der ALL im Kindesalter Ursprung

der monoklonalen Proliferation. Die restlichen 12% sind prä-T oder T-ALL (siehe Tab. 1). Bei einigen ALL exprimieren die entarteten Zellen sowohl lymphatische als auch myeloische Marker. Diese Leukämien werden als biphänotypische oder MY-positive ALL bezeichnet; sie kommen vor allem bei Säuglingen vor.

Tabelle 1: Immunologische Klassifikation der ALL anhand der Antigenexpression

Antigen	pro-B	common	prä-B	B	prä-T	T-ALL
TdT	+	+	+	-	+	+
HLA-DR	+	+	+	+	-/+	-
CD10	-	+	+/-	+/-	-/+	-/+
CD19	+	+	+	+	-	-
Cy Ig	-	-	+	-	-	-
S Ig	-	-	-	+	-	-
cy CD3	-	-	-	-	+	+
CD7	-	-	-	-	+	+
CD1a/2/3	-	-	-	-	-	+/-

TdT = terminale Desoxynucleotidyltransferase; CD = *cluster of differentiation*;

cy Ig = zytoplasmatisches Ig; s Ig = Oberflächen (*surface*) Ig

Anhand von morphologischen Kriterien unterscheidet die FAB (*French-American-British*)-Klassifikation in den Blut- oder Knochenmarkausstrichen von ALL-Patienten drei Gruppen von Lymphoblasten (L1 – L3). Diese Einteilung hat aber heute an Bedeutung verloren, da sie praktisch keine prognostischen und therapeutischen Konsequenzen hat.

1.2 Zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen

Während es früher mit zytogenetischen Methoden schwierig war, genetische Veränderungen nachzuweisen, erlauben heute Techniken wie die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) oder die RT-PCR (Reverse Transkription – Polymerase Ketten Reaktion) viel spezifischere und sensitivere Untersuchungen. So werden bei ca. 80% der ALL-Patienten chromosomale Veränderungen festgestellt.⁴ Diese betreffen sowohl die Anzahl (Ploidie; numerische Aberration) als auch die Struktur (strukturelle Aberration) der Chromosomen und scheinen zum großen Teil prognostisch relevant zu sein.

Eine Hyperdiploidie mit über 50 Chromosomen (DNA-Index > 1,16) ist mit einer guten Prognose assoziiert, was unter anderem damit erklärt wird, dass hyperdiploide Lymphoblasten verstärkt Methotrexat empfindlich sind. Patienten mit hypodiploiden oder fast haploiden Lymphoblasten haben dagegen eine wesentlich schlechtere Prognose.^{4,5,6}

Strukturelle Chromosomenanomalien können grundsätzlich durch zwei Mechanismen zur malignen Transformation der Zelle beitragen. Zum Einen kann ein Protoonkogen durch Translokation, Inversion oder Punktmutation zu einem Onkogen aktiviert werden. Protoonkogene kodieren für Proteine, die Proliferation, Differenzierung und Überleben der Zellen steuern. Mutationen, die eine direkte Strukturveränderung des Gens bewirken, haben zur Folge, dass ein verändertes Protein mit neuer Funktion gebildet wird. Von der Veränderung kann aber auch der regulatorische Bereich des Gens betroffen sein, was zu einer Überproduktion des normalen Genprodukts führen kann. In beiden Fällen kommt es zu einem Funktionsgewinn, der sich dominant gegenüber dem nicht veränderten Allel auswirkt.

Im Gegensatz hierzu steht der Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen durch Deletion oder Inaktivierung. Tumorsuppressorgene sind negative Regulatoren der Zellproliferation. Um die Funktion ihrer Genprodukte vollständig auszuschalten, müssen beide Allele inaktiviert werden. Dies geschieht am häufigsten durch Mutation des einen Allels und somit Reduktion zur Homozygotie mit anschließendem Verlust des zweiten Allels (*loss of heterozygosity*, LOH).

Bei ca. 75% der ALL im Kindesalter sind chromosomale Translokationen erkennbar (siehe Abb. 1).⁷ Die hiervon betroffenen Protoonkogene kodieren meistens für Transkriptionsfaktoren, seltener auch für Tyrosinkinasen oder Wachstumsfaktoren. Die Translokation t(1;19)(q23;p13) führt zur Bildung des chimären *E2A-PBX1* Fusionsgens und kommt bei ca. 25% der prä-B-ALL vor. Die Gene *E2A* und *PBX1* kodieren beide für Transkriptionsfaktoren. Früher galt diese Fusion als schlechter Prognosefaktor, durch neue, intensivere Therapien ist das jedoch nicht mehr so.^{6,8,9}

Das Philadelphia-Chromosom, das bei der Translokation t(9;22)(q34;q11) entsteht, kommt auch bei der ALL im Kindesalter vor, ist mit 3-5% jedoch wesentlich seltener als bei der ALL im Erwachsenenalter. Die Translokation fusioniert das *BCR*- mit dem *ABL*-Gen, welches für eine Tyrosinkinase kodiert, die durch diese Fusion aktiviert wird. Diese Veränderung ist mit einer schlechten Prognose assoziiert und gilt als Stratifizierungskriterium für eine Hoch-Risiko-Therapie.^{6,8,9}

Translokationen, die die Chromosomenbande 11q23 betreffen, werden bei ungefähr 6% aller ALL im Kindesalter beobachtet; die Inzidenz im Säuglingsalter liegt bei ca. 75%. Die häufigsten Veränderungen sind die t(4;11)(q21;q23) mit Bildung des *MLL-AF4* Fusionsgens, gefolgt von der t(11;19)(q23;p13), bei der das *MLL-ENL* Fusionsgen entsteht. *MLL*-Veränderungen gelten ebenfalls als schlechter Prognosefaktor und werden für die Therapiestratifizierung genutzt.^{2,6,8-10}

Bei den die Chromosomenbande 8q24 involvierenden Translokationen gerät das Protoonkogen *MYC* unter die Kontrolle der Promotoren verschiedener Immunglobulingene, nämlich IgH bei der t(8;14), IgK bei der t(2;8) und IgL bei der t(8;22). Dies führt dazu, dass durch den aktiven Ig-Promotor *MYC* übermäßig hoch exprimiert wird und so zur malignen Entartung der Zelle beiträgt. Einen ähnlichen Mechanismus zeigen Rekombinationen von T-Zell-Rezeptorgenen mit verschiedenen anderen Proteinen, die meist für Transkriptionsfaktoren kodieren. Diese Art von Translokationen kommen bei ca. 30% der T-ALL vor.^{6,9}

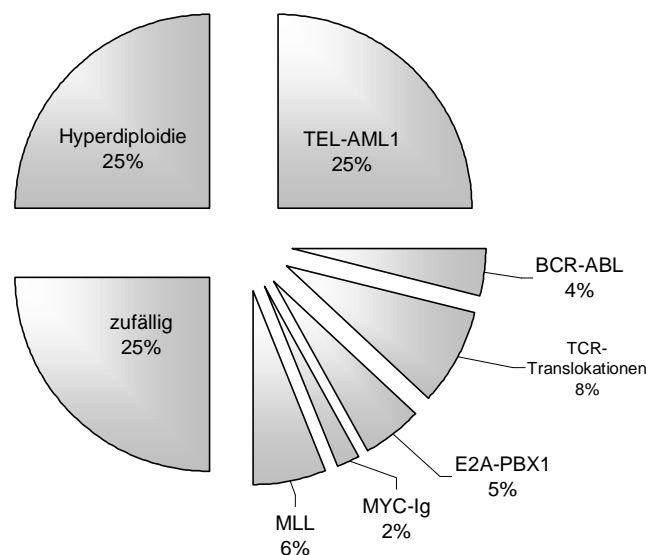


Abbildung 1: Häufigkeit chromosomaler Veränderungen bei ALL im Kindesalter

1.3 Therapie der ALL

Die Heilungsrate der ALL bei Kindern konnte von 5% vor 1965 auf heute über 70% gesteigert werden.^{11,12} Die wichtigsten Therapieänderungen, die diesen Fortschritt bewirkt haben, waren die Einführung einer Kombinations-Chemotherapie, einer prophylaktischen ZNS-Behandlung und die Identifizierung verschiedener Risikogruppen aufgrund klinischer und molekulargenetischer Merkmale, die Behandlungen unterschiedlicher Intensität nach sich ziehen.^{5,13} Auch die Identifizierung von weiteren zytogenetischen Markern, ihre Charakterisierung auf molekularem Niveau und ihre Assoziation mit der Leukämogenese trug wesentlich dazu bei, besser angepasste Therapiestrategien zu entwickeln.⁴ Die Therapie erfolgt stratifiziert in unterschiedlichen Risikogruppen und unterteilt sich bei der initialen Erkrankung in vier Abschnitte: die Induktions-, die Konsolidierungs-, die Reinduktions- und die Erhaltungstherapie. Stratifizierungskriterien bei ALL-Ersterkrankung sind das Alter des Patienten, der Immunphänotyp der ALL, die initiale Leukozytenzahl, das Ansprechen auf die Therapie (Prednison-*response* am Tag 8 im Blut; Nachweis leukämischer Restzellen im Knochenmark am Tag 35 und 78) sowie der zytogenetische oder molekulargenetische Nachweis der Translokationen t(4;11) oder t(9;22).^{12,14} Zur Therapiestratifizierung kommt heutzutage der Beurteilung des Ansprechens auf die Therapie durch sensitive und spezifische Methoden besondere Bedeutung zu (s. Abschnitt 1.4). Beim ALL-Rezidiv spielen andere Kriterien für die Einteilung in Risikogruppen eine Rolle, nämlich die Dauer der ersten Remission, der Immunphänotyp der ALL (Non-T-ALL oder prä-T/T-ALL) und der Ort des Rezidivs (isoliert extramedullär, KM kombiniert, KM isoliert). Während Patienten mit ALL-Ersterkrankung eine eher kontinuierliche Therapie erhalten, werden Patienten mit ALL-Rezidiv mit einer Blocktherapie behandelt, bei der die verschiedenen Polychemotherapieblöcke im Abstand von ca. drei Wochen gegeben werden.

1.4 MRD (minimal residual disease)

Über 95% der Kinder mit einer ALL-Ersterkrankung, die nach aktuellen Therapieprotokollen behandelt werden, erreichen heute eine komplette Remission.¹³ Das bedeutet, dass im Knochenmark morphologisch weniger als 5% Lymphoblasten nachzuweisen sind. Trotzdem können sich zu diesem Zeitpunkt aber noch bis zu 10^{10} Leukämiezellen im Körper befinden, so dass der Begriff Remission nicht beinhaltet, dass die Leukämie bereits ausreichend therapiert ist. Von den Patienten in Remission erleiden 15-60% ein Rezidiv.¹⁵ Eine wichtige Aufgabe ist also, Patienten, die eine intensivere Therapie benö-

tigen, von solchen zu unterscheiden, bei denen eine Heilung wahrscheinlich auch mit einer weniger intensiven Therapie erzielt werden kann. An MRD-Untersuchungen knüpft sich die Hoffnung, dieses individuelle Rezidivrisiko besser als mit den zuvor bekannten Faktoren abschätzen zu können. Anhand des molekulargenetischen Nachweises leukämischer Restzellen im Therapieverlauf läßt sich die Dynamik des chemotherapieinduzierten Zelluntergangs bestimmen. Die Therapie kann dem dann angepaßt werden, um so einerseits die Heilungsrate der ALL zu erhöhen und andererseits die Therapietoxizität zu minimieren.^{16,17}

1.4.1 MRD in klinischen Untersuchungen

Anhand der MRD-Untersuchungen kann die Abnahme der Leukämiezelllast gemessen und so das Ansprechen auf die Therapie beurteilt werden. In verschiedenen klinischen Studien hat sich gezeigt, dass die Dynamik dieser Reduktion von MRD einen signifikanten prognostischen Faktor darstellt. Unabhängig von allen bekannten Risikofaktoren, wie dem Alter des Patienten, dem Immunphänotyp der ALL, der Anzahl weißer Blutzellen oder der Stratifizierungsgruppe, geht ein frühzeitiges Therapieansprechen mit einer besseren Prognose einher und umgekehrt.^{18,19} Dies wurde übereinstimmend sowohl für ALL-Ersterkrankungen als auch für ALL-Rezidive ermittelt.²⁰ Mit Hilfe der MRD-Ergebnisse können die Patienten in verschiedene Risikogruppen eingeteilt und so die Therapie besser individuell angepaßt werden. Ebenso wurde in mehreren Studien die Bedeutung von MRD-Untersuchungen vor allogenen Knochenmarkstransplantationen (KMT) gezeigt.^{21,22} MRD-Werte von 10^{-2} - 10^{-3} waren mit einem höheren Rezidivrisiko nach der Transplantation assoziiert. Auch bei diesen Patienten kann anhand der MRD-Ergebnisse die Therapie vor und nach der KMT optimiert werden.

1.5 Transkriptionsfaktoren

Je nach Zelltyp, Gewebe und Entwicklungsstadium sind in einer Zelle immer nur bestimmte Gene aktiv, ausgenommen solche, die für grundlegende Zellfunktionen nötig sind („*housekeeping genes*“). Die Kontrolle der Genexpression erfolgt auf Ebene der Transkription, der Translation und durch posttranslationelle Modifikation des Genprodukts.

Eukaryote RNA-Polymerasen können die Transkription nicht von sich aus einleiten, vorher müssen DNA-bindende Proteine sequenzspezifisch an proximale oder distale

Regulationselemente des jeweiligen Gens binden. Man unterscheidet regulierende DNA-Sequenzen in *cis* und in *trans*-Position, je nachdem, ob sie auf demselben DNA-Molekül liegen (*cis*) oder auf einem anderen (*trans*).

Transkriptionsfaktoren sind *trans*-aktive Kernproteine, die bestimmte *cis*-aktive DNA-Sequenzen erkennen und an sie binden, um dadurch ihre aktivierende oder hemmende Wirkung zu entfalten. *Cis*-aktive Kontrollelemente können Promotor, Enhancer oder Silencer sein. Promotoren liegen bis zu 110 bp strangaufwärts des zugehörigen Gens und initiieren die Transkription. Enhancer sind positive Kontrollelemente, die unabhängig von ihrer Orientierung die von Promotorelementen initiierte Transkription verstärken. Als Silencer werden negative Kontrollelemente bezeichnet.

In Ihrem molekularem Aufbau weisen viele Transkriptionsfaktoren eine modulare Zusammensetzung aus einzelnen Strukturdomänen auf, die gleichzeitig funktionelle Domänen darstellen. Diese Funktionsdomänen sind im wesentlichen eine DNA-Bindungsdomäne, eine Dimerisationsdomäne und eine Transaktivierungsdomäne. Die DNA-Bindung kann durch unterschiedliche Struktur motive vermittelt werden. Im *helix-loop-helix*-Motiv (HLH) sind eine kurze und eine lange α -Helix durch eine flexible Schlaufe miteinander verbunden und vermitteln sowohl die DNA-Bindung als auch die Dimerisierung. Gleiche Wirkung hat der *leukin-zipper*, ein Y-förmiger Dimer aus zwei leukinreichen α -Helices. Das *helix-turn-helix*-Motiv (HTH) entsteht aus zwei α -Helices, die durch eine kurze Aminosäuresequenz voneinander getrennt und gegeneinander verdreht sind. Es vermittelt nur die DNA-Bindung, ebenso wie das *zinc-finger*-Motiv, bei dem vier Aminosäuren ein Zink-Ion derart binden, dass eine Schlaufe entsteht.

Während der Hämatopoese entstehen die verschiedenen reifen Blutzellen aus pluripotenten hämatologischen Stammzellen. Die Entwicklung eines stabilen hämatopoetischen Systems ist ein komplexes Zusammenspiel aus Migration (über das Blut, aus der fetalen Leber kommend), *homing* (im Knochenmark), Differenzierung, Proliferation und Überleben der hämatologischen Stammzellen.²³ Die Regelung dieses Prozesses unterliegt einer Vielzahl von Proteinen und geschieht auf mehreren Ebenen. Transkriptionsfaktoren, welche die zellspezifische Genexpression steuern, spielen hier eine wichtige Rolle. Durch eine Translokation kann auf verschiedene Weise diese Kontrollfunktion verändert werden. Wenig oder gar nicht exprimierte Transkriptionsfaktoren können zum Beispiel unter die Kontrolle von Promotoren zellreihen-spezifischer Gene, wie z. B. eines Immunglobulin-Gens bei B-Zell-Leukämien oder eines T-Zell-Rezeptor-Gens bei T-Zell-Leukämien, geraten und so in ihrer Expression hochreguliert werden. Viel häufiger

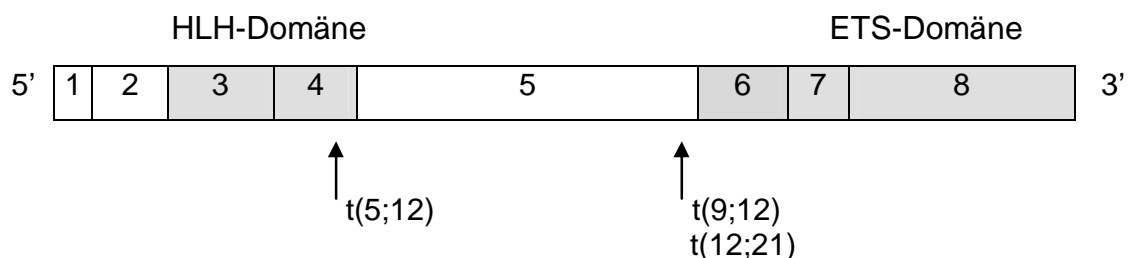
ist allerdings, dass die Bruchpunkte innerhalb der Introns zweier Transkriptionsfaktoren liegen und so ein neues Fusionsprotein mit eigener Funktion entsteht.⁶

1.6 Die Transkriptionsfaktoren TEL und AML1

1.6.1 Transkriptionsfaktor TEL

1.6.1.1 Genstruktur

Das *TEL* (*translocation, ETS, leukemia*)-Gen, auch *ETV6* (*ETS-variant gene 6*) genannt, ist auf Chromosom 12 (12p13) lokalisiert. Es umfaßt insgesamt 240 kb DNA und besteht aus acht Exons sowie einem alternativen Exon 1 (Exon 1b) im Intron 2. In der Promotor-Region von *TEL* befinden sich mehrere Bindungsstellen für SP1 und AP2, aber keine CAAT oder TATA-Box. „TATA-lose“ Promotoren sind typisch für sogenannte „housekeeping genes“ mit ubiquitärer Expression. Ein HLH-Motiv wird von den Exons 3 und 4 kodiert und eine ETS DNA-bindende Domäne von den Exons 6-8. Da der 3'-Bereich des *TEL*-Gens unterschiedliche Polyadenylierungsstellen enthält, entstehen drei verschiedene mRNA-Transkripte mit je 6200, 4300 und 2400 Nukleotiden.²⁴



1 – 8 = Exons

Abbildung 2: Schematische Darstellung der *TEL*-mRNA ; HLH = *helix-loop-helix*

1.6.1.2 Proteinstruktur

Das *TEL*-Protein umfaßt 452 Aminosäuren und gehört zur ETS (*E-twenty-six-specific*)-Familie von Transkriptionsfaktoren. Mit diesen hat *TEL* an seinem Carboxylende eine evolutionär konservierte Domäne, die 85 Aminosäuren große ETS-Domäne, gemeinsam, welche für die Bindung an den entsprechenden *ETS-binding-site* (EBS)-DNA-

Elementen verantwortlich ist (*core*-motif C/AGGAA/T). Wie einige der anderen ETS-Proteine hat TEL aminoterminal noch eine *helix-loop-helix* (HLH)-Domäne, auch „*pointed domain*“ genannt. Diese Domäne vermittelt sowohl die Homodimerisation als auch die Oligomerisation von TEL bzw. von seinen Fusionsproteinen und scheint für die normale Funktion von TEL essentiell zu sein. ETS-Proteine, die diese Domäne ebenfalls besitzen, sind unter anderem ETS-1, ETS-2, FLI-1 und ERG-2.²⁵

Die Translation des *TEL*-Gens wird von zwei verschiedenen Startcodons (ATG) aus initiiert, so dass zwei Isoformen des Proteins entstehen.²⁶ Beide sind nukleäre Phosphoproteine und enthalten die ETS DNA-bindende Domäne sowie die HLH-Domäne. Sie unterscheiden sich in einem 42 Aminosäuren großen Bereich, der eine MAPK (*mitogen activated proteinkinase*) -Konsensusregion enthält.²⁷

1.6.1.3 Veränderungen bei Leukämien

Das *TEL*-Gen wurde 1994 erstmals im Rahmen der Untersuchung einer Translokation t(5;12)(q33;p13) bei einer chronischen myelomonozytären Leukämie (CMML) beschrieben.²⁸ Seitdem wurde gezeigt, dass TEL bei malignen hämatologischen Erkrankungen an verschiedenen Translokationen beteiligt ist. Fusionspartner sind sowohl Transkriptionsfaktoren (AML1, MN1, EVI-1) als auch Proteinkinasen (PDGFR β , ABL, JAK2).

Bei der Translokation t(5;12)(q33;p13) ist das HLH-Motiv von TEL mit der Protein-Tyrosin-Kinase-Domäne des *platelet-derived growth factor receptor- β* (PDGFR β) fusioniert. Ähnlich ist es bei der bei ALL, AML und atypischer CML vorkommenden Translokation t(9;12)(q34;p13), wo die Proteinkinase-Domäne vom Protoonkogen ABL stammt, sowie bei der bei prä-B-ALL vorkommenden t(9;12)(p24;p13) mit der Proteinkinase-Domäne von JAK2.²⁹

Die von der TEL-HLH-Domäne vermittelte Dimerisation führt dann jeweils zu einer von Liganden unabhängigen Aktivierung der Proteinkinasen, was für die transformierenden Eigenschaften der Fusionsproteine essentiell ist.²⁵

Die Translokation t(12;22)(p13;q11) wird bei CML, AML und dem Myelodysplastischen Syndrom (MDS) gefunden. Das hierbei entstehende Fusionsprotein enthält diesmal die ETS-Domäne von TEL, welche mit nahezu dem kompletten MN1-Protein, einem vermeintlichen Transkriptionsfaktor, fusioniert ist.³⁰ Neben diesen Translokationen des Chromosoms 12 werden in 15-20% der ALL auch interstitielle oder terminale Deletionen des *TEL*-Genortes (chromosomale Bande 12p12-p13) gefunden.^{31,32}

1.6.2 Transkriptionsfaktor AML1

1.6.2.1 Genstruktur

Das *AML1*-Gen liegt auf Chromosom 21 und umfaßt neun Exons mit insgesamt mehr als 150 kb genomischer DNA. Seine Expression wird über zwei verschiedene Promotoren gesteuert, in deren Bereichen Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1, PU.1, Oct, CRE, Myb und ETS-Proteine liegen.^{32,33,34} Da es außerdem noch zu alternativem Spleißen kommt und wegen der Existenz von unterschiedlichen Polyadenylierungsstellen im Exon 8 entstehen mindestens sieben verschiedene mRNA-Transkripte (siehe Abb. 3).

AML1a und *AML1b* beginnen mit Exon 3, *AML1c* hingegen enthält die Exons 1 und 2, dafür fehlt ihm ein Teil des Exons 3. Insgesamt ist es aminoterminal 32 Aminosäuren länger, was aber wahrscheinlich ohne funktionelle Bedeutung ist.

Aufgrund von alternativem Spleißen endet *AML1a* mit dem Exon 7a, *AML1b* und *AML1c* enthalten statt dessen die Exons 7b und 8, die zusammen für die Transaktivierungsdomäne kodieren.

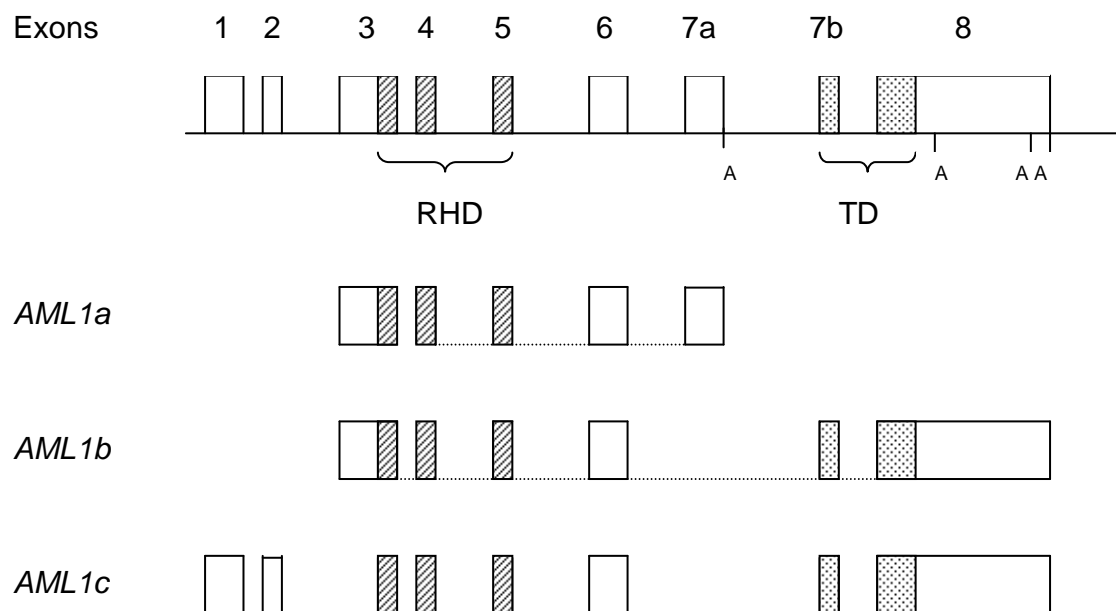


Abbildung 3: Schematische Darstellung der alternativ gespleißten *AML1*-Transkripte

RHD = *runt homology domain*; TD = Transaktivierungsdomäne; A = Polyadenylierungsstelle

1.6.2.2 Proteinstruktur

AML1, auch CBF α 2 oder RUNX1 genannt, gehört zur Familie der CBF (core binding factor) – Transkriptionsfaktoren. Diese sind Heterodimere aus einer α - und einer β -Untereinheit. Die α -Untereinheit ist für die DNA-Bindung zuständig und wird von drei verschiedenen Genen kodiert: *AML1/CBF α 2* auf Chromosom 21q22, *AML2/CBF α 3* auf Chromosom 1p36 und *AML3/CBF α 1* auf Chromosom 6p21.³⁵ Die β -Untereinheit bindet selber nicht an die DNA, bildet aber einen Komplex mit der α -Untereinheit und verstärkt so deren DNA-Affinität. CBF β wird nur von einem Gen auf Chromosom 16 kodiert und ist wie CBF α 1 bei Leukämien ebenfalls häufig verändert.

Das AML1-Protein enthält zwei funktionelle Domänen. Wie alle CBF α -Proteine besitzt es die 128 Aminosäuren umfassende hochkonservierte *runt-homology-domain* (RHD). Diese weist große Ähnlichkeiten mit dem *runt*-Gen der *Drosophila melanogaster* auf, welches als Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle in der Embryogenese spielt.

1.6.2.3 AML1-Veränderungen bei Leukämien

AML1 gehört zu den sehr häufig veränderten Genen bei Leukämien im Kindesalter. Es wurde erstmals bei der Klonierung des Bruchpunktes einer Translokation t(8;21) beschrieben.³⁶

Andere bekannte *AML1* verändernde Translokationen sind die t(8;21)(q22;q22) und die t(3;21)(q26;q22). Die hier entstehenden Fusionsproteine enthalten jeweils die *runt-homology-domain* von *AML1* und können somit die *AML1* DNA-Zielsequenzen binden sowie mit CBF β interagieren. Die carboxyterminal gelegene Transaktivierungsdomäne von *AML1* ist aber immer durch fremde Sequenzen ersetzt. Für die Leukämogenese bedeutsam ist wahrscheinlich die Fähigkeit all dieser chimären Proteine, die Transkriptionsaktivität des normalen *AML1/CBF β* -Komplexes zu hemmen.

Die Translokation t(8;21) kommt vor allem bei der akuten myeloischen Leukämie Typ M2 (AML-M2) vor. Fusionspartner ist das ebenfalls für einen Transkriptionsfaktor kodierende Gen *ETO*, das menschliche Homolog des *Drosophila*-Gens „nervy“. *ETO* ist Mitglied einer kleinen Genfamilie mit zwei weiteren Mitgliedern: *MTGR1* und *MTGR16*. *MTGR16* bildet bei der seltenen t(16;21)(q24;q22) auch selber ein Fusionsprotein mit *AML1*.

Bei der Translokation t(3;21) ist *AML1* entweder mit *EAP*, mit *EVI1* oder mit *MDS1*, drei eng benachbarten Genen auf Chromosom 3, fusioniert. Diese Translokation kommt vor allem bei chronisch myeloischen Leukämien in Blastenkrise, bei myelodysplastischen

Syndromen und bei therapieassoziierten Leukämien, welche meist akute myeloische Leukämien sind, vor.

Indirekt betroffen ist AML1 durch Veränderungen des CBF β -Gens. Dieses ist bei der inv(16) und der t(16;16), die bei akuten myeloischen Leukämien vorkommen, mit Teilen des *smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC)* – Gens fusioniert. Das Fusionsprotein enthält den aminoterminalen Bereich von CBF β inklusive der AML1-Interaktions-Domäne, gebunden an den carboxyterminalen Bereich von MYH11. CBF β -MYH11 hat die Fähigkeit mit AML1 zu interagieren und seine transformierenden Eigenschaften resultieren zum Teil aus einer direkten Hemmung der von AML1 gesteuerten transkriptionellen Aktivierung.⁶³

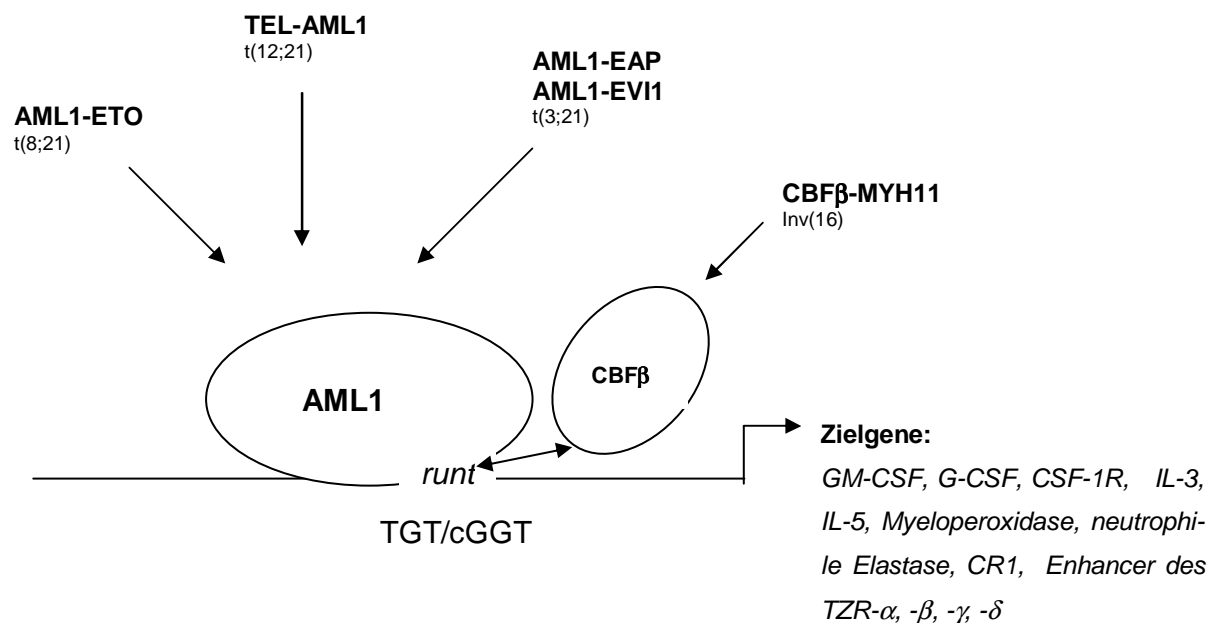


Abbildung 4: Beeinflussung der Zielgene von AML1 durch leukämieassoziierte Veränderungen des Transkriptionsfaktorkomplexes AML1-CBF β

1.7 Translokation t(12;21)

1.7.1 Fusionsgen *TEL-AML1*

Die Translokation t(12;21) verbindet das *TEL*-Gen auf Chromosom 12 mit dem *AML1*-Gen auf Chromosom 21. Der Bruchpunkt im *TEL*-Gen liegt im Intron 5, so dass das *TEL-AML1*-Fusionstranskript die ersten fünf Exons von *TEL* enthält.³⁷ Im *AML1*-Gen gibt es zwei verschiedene Bruchpunkte, entweder im Intron 1 oder im Intron 2.³⁸ Die hierbei entstehenden Fusionstranskripte unterscheiden sich um das 39 bp große Exon 2 von *AML1*. In fast 90% der Fälle liegt der Bruchpunkt im Intron 1. Trotzdem exprimieren die meisten Zellen mit geringerer Intensität aber auch das kürzere Transkript, das dann durch alternatives Spleißen entsteht.^{39,40} Die Expression des *TEL-AML1*-Fusionsgens wird über den *TEL*-Promotor gesteuert.

Während das *TEL-AML1*-Fusionsgen bei allen Patienten mit einer Translokation t(12;21) gefunden wird, kann nur bei ca. 45% der Patienten in geringem Ausmaß auch das reziproke *AML1-TEL*-Fusionstranskript nachgewiesen werden.⁴¹

1.7.2 Proteinstruktur

Im *TEL-AML1*-Fusionsprotein sind die ersten 333 Aminosäuren von *TEL* mit nahezu dem kompletten *AML1* fusioniert. Es enthält somit die HLH-Domäne von *TEL*, nicht aber dessen carboxyterminal gelegene DNA-bindende ETS-Domäne. Das *AML1*-Protein enthält zwei funktionelle Domänen, die *runt-homology-domain* und die Transaktivierungsdomäne. In von Patienten isolierten *TEL-AML1*-Fusionstranskripten sind diese jeweils beide enthalten. Da das *AML1*-Gen aber in Spleißvarianten mit und ohne der carboxyterminal gelegenen Transaktivierungsdomäne exprimiert wird, ist theoretisch denkbar, dass auch vom Fusionsgen verschiedene Transkripte mit unterschiedlicher Funktion gebildet werden.

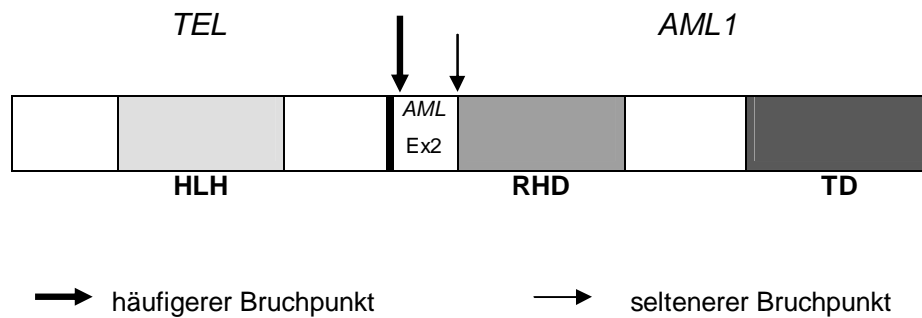


Abbildung 5: Schematische Darstellung der *TEL-AML1*-mRNA

HLH: *helix-loop-helix*-Domäne; RHD: *runt-homology-domain*; TD: Transaktivierungsdomäne

1.7.3 *TEL-AML1* in klinischen Untersuchungen

Die Translokation $t(12;21)$ wird fast ausschließlich bei B-Vorläuferzell ALL gefunden und geht meist mit einer initialen Leukozytenzahl unter $50000/\mu\text{l}$, einem guten Therapieansprechen und einem Alter von 1-10 Jahren einher; Faktoren, die mit einer guten Prognose assoziiert sind.⁴²

Mit zytogenetischen Methoden wird die kryptische Translokation $t(12;21)$ nur in ca. 0,05% der ALL entdeckt.⁴³ Molekulargenetische Untersuchungen haben aber gezeigt, dass die tatsächliche Häufigkeit bei B-Vorläuferzell ALL-Ersterkrankungen bei durchschnittlich 25% liegt. Die *TEL-AML1*-Fusion zählt somit zu den häufigsten genetischen Veränderungen bei ALL im Kindesalter.⁴⁴ Auch bei erwachsenen ALL-Patienten kann sie in einem geringen Prozentsatz (1,5-3,4%) nachgewiesen werden.^{41,43} Bei Kindern mit einer konstitutiven Trisomie 21 und ALL hat die $t(12;21)$ eine niedrigere Inzidenz als bei Kindern ohne Trisomie 21. Eine erworbene Trisomie 21 in Leukämiezellen ist allerdings eine häufige sekundäre Aberration bei *TEL-AML1* positiven Leukämien. Die Verdoppelung kann sowohl das normale Chromosom 21 als auch das $\text{der}(21)t(12;21)$ betreffen.⁴⁵

Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Translokation $t(12;21)$ bei ALL-Ersterkrankungen mit einer guten Prognose assoziiert zu sein scheint und nur wenige Kinder ein Rezidiv erleiden. Publierte Untersuchungsergebnisse beschreiben eine Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens für vier Jahre von 90-100%.^{41,46} Diese prognostische Bedeutung wird aber durch neuere Studien in Frage gestellt, die bei Rezidiven einen ähnlich hohen Anteil an *TEL-AML1* positiven ALL wie bei Ersterkrankun-

gen beobachtet haben.⁴⁷ Die mittlere Remissionsdauer war allerdings ein Jahr länger als bei *TEL-AML1* negativen ALL und das Rezidiv trat selten früher als zwei Jahre nach der Erstdiagnose auf. Dies könnte bedeuten, dass das Auftreten eines Rezidivs nur verzögert, jedoch nicht aufgehoben ist. Studien mit zu kurzen Beobachtungszeiten würden dann viele Rezidive von *TEL-AML1* positiven ALL gar nicht erfassen, was ein Grund für die unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse sein könnte. Eine weitere Erklärung für die Diskrepanz hinsichtlich der Häufigkeit von *TEL-AML1* positiven ALL-Rezidiven sind mitunter die kleinen Fallzahlen und das retrospektive Studiendesign der meisten Untersuchungen. Auch die verschiedenen Behandlungsprotokolle der einzelnen Zentren, das heißt die Intensität und die genaue Zusammensetzung der verabreichten Chemotherapie, könnten ein Grund für die Unterschiede sein.^{48,49} So scheint das Vorhandensein der t(12;21) mit einer relativ höheren Sensitivität für Asparaginase korreliert zu sein.⁵⁰ Allerdings sind die meisten Therapieprotokolle soweit erprobt, dass dies nicht die einzige Erklärung sein kann.

Ford et al. stellen zum Beispiel die Hypothese auf, dass ein präleukämischer Klon mit einer t(12;21) die Chemotherapie überlebt und dann aufgrund einer zweiten, unabhängigen Transformation wiederum zur Entstehung einer Leukämie führt.⁵¹

Insgesamt ist der genaue Einfluß des *TEL-AML1*-Fusionsproteins auf die Leukämogenese, ebenso wie seine prognostische Bedeutung noch nicht ganz klar, wird aber in vielen prospektiven Studien untersucht.