

Aus dem CharitéCentrum 14 – Tumormedizin
Med. Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie
Campus Benjamin Franklin
Direktor: Prof. Dr. med. Antonio Pezzutto

Habilitationsschrift

Molekulare Prognosefaktoren und Zielstrukturen in akuten Leukämien

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Dr. med. Andrea Kühnl

Eingereicht: September 2015

Dekan: Herr Prof. Dr. med. A. Pries

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Lars Bullinger, Ulm
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Arnold Ganser, Hannover

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen	4
1 Einleitung	6
1.1 Akute Leukämien	6
1.2 Genetische Veränderungen mit prognostischer Bedeutung bei akuten Leukämien	7
1.2.1 Genetische Prognosefaktoren in B-Vorläufer ALL	8
1.2.2 Genetische Prognosefaktoren in AML	11
1.3 Zielgerichtete Therapiekonzepte in AML	14
2 Fragestellung und Zielsetzung	16
3 Eigene Arbeiten	17
3.1 Molekulare Prognosefaktoren in der B-Vorläufer ALL	17
3.1.1 Das Gen <i>BAALC</i>	18
3.1.1.1 Hohe <i>BAALC</i> Expression ist mit gesteigerter Chemoresistenz in B-Vorläufer ALL des Erwachsenen assoziiert	19
3.1.2 Der Wnt Signalweg-Mediator LEF1	28
3.1.2.1 Prognostische Bedeutung der <i>LEF1</i> Expression in B-Vorläufer ALL	29
3.2 Prognosefaktoren und potentielle Zielstrukturen für neue Therapien in AML ..	36
3.2.1 CXXC Proteine in AML	36
3.2.1.1 Verminderte Expression des Wnt Signalweg Inhibitors <i>CXXC5</i> ist mit einer besseren Prognose in AML assoziiert	38
3.2.2 IGF Bindungsproteine als prognostische Marker und potentielle Zielstrukturen bei AML	50

3.2.2.1	Hohe Expression von <i>IGFBP2</i> ist mit gesteigerter Chemoresistenz in AML verbunden	51
3.2.2.2	Identifikation von <i>IGFBP7</i> als neuen Marker für potentielle zielgerichtete Therapie bei akuten Leukämien	58
3.2.3	Hitzeschockproteine als Zielstruktur in Leukämien	67
3.2.3.1	Antileukämische Aktivität des Hitzeschockprotein 70 Inhibitors Pifithrin- μ in AML ..	68
4	Diskussion	76
5	Zusammenfassung	84
6	Literatur	86
7	Danksagung	98
8	Erklärung	100

ABKÜRZUNGEN

17-AAG	17-(Allylamino)-17-desmethoxygeldanamycin
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APL	Akute Promyelozytenleukämie
CR	Complete remission (komplette Remission)
DSV	Dishevelled Protein
EFS	Event-free survival (Ereignis-freies Überleben)
ELN	European LeukemiaNet
GMALL	German Multicenter Study Group for Adult ALL (Deutsche Multizentrische Studiengruppe für ALL des Erwachsenen)
HDAC	Histondeacetylase
HSP	Hitzeschockprotein
IC50	Half maximal inhibitory concentration (mittlere inhibitorische Konzentration)
IGF	Insuline-like growth factor
IGFBP	IGF Bindungsprotein
MILE	Microarray Innovations in LEukemia
MRC	Medical Research Council
MRD	Minimal residual disease (Minimale Resterkrankung)
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NK	Normaler Karyotyp
PFT- μ	Pifithrin- μ
RFS	Relapse-free survival (Rezidiv-freies Überleben)
RT-qPCR	Reverse transcription-quantitative real-time polymerase chain reaction
OS	Overall survival (Gesamtüberleben)
SAHA	Suberoylanilide hydroxamic acid
SCT	Stem cell transplant (Stammzelltransplantation)
SNP	Single nucleotide polymorphism (Einzelnukleotidpolymorphismus)

WHO World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
Wnt Wingless-type

1 EINLEITUNG

1.1 Akute Leukämien

Akute Leukämien entstehen durch maligne Entartung unreifer Knochenmarkvorläuferzellen. Es kommt zur ungehemmten Proliferation leukämischer Blasten und zu einer Verdrängung der normalen Hämatopoese. Abhängig davon, ob die leukämischen Blasten Eigenschaften der myeloischen oder lymphatischen Zellreihe besitzen, wird zwischen akuter myeloischer Leukämie (AML) und akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) unterschieden. Die AML ist mit einer Inzidenz von 3-4/100000 pro Jahr und einem medianen Erkrankungsalter von 68 Jahren die häufigere akute Leukämie im Erwachsenenalter.¹ Die ALL zeigt eine bimodale Altersverteilung mit höchster Inzidenz bei Kindern zwischen 1-4 Jahren und einem zweiten Altersgipfel bei über 60 Jahren (Gesamtinzidenz 1.7/100000 pro Jahr).² Symptome akuter Leukämien sind vor allem durch die Hemmung der normalen Hämatopoese bedingt - Luftnot und Abgeschlagenheit durch Anämie, Blutungsneigung durch Thrombozytopenie, sowie eine schwere Abwehrschwäche durch Mangel an neutrophilen Granulozyten.

Zwei Drittel der ALL des Erwachsenen sind der B-Zellreihe zuzuordnen (B-Vorläufer ALL), 25% gehören zur T-Zellreihe (T-ALL). Die weitere Einteilung der ALL erfolgt hauptsächlich durch Immunphänotypisierung anhand des Reifungsgrades der leukämischen Blasten in pro-B ALL, common ALL und prä-B ALL (B-Vorläufer ALL), sowie pro-T ALL, thymische ALL und prä-T ALL (T-ALL). Für die Klassifikation der AML (WHO Klassifikation 2008)³ werden klinische, morphologische und (molekular)genetische Eigenschaften der Leukämie berücksichtigt. Die 4 Hauptgruppen beinhalten AML mit spezifischen zytogenetischen Aberrationen, AML mit multilineärer Dysplasie, therapieinduzierte AML, sowie nicht weiter klassifizierte AML.

Akute Leukämien sind mit intensiven Chemotherapien, die sich in verschiedenen Therapieblöcken (Induktionstherapien, Konsolidierungstherapien) über mehrere Monate erstrecken, potentiell heilbar. Das Rezidivrisiko unterscheidet sich jedoch stark zwischen einzelnen Subgruppen. Bei Hochrisikopatienten wird eine frühe Therapieintensivierung mit allogener Stammzelltransplantation (SCT) in erster Remission empfohlen. Da die allogene SCT mit einer hohen Morbidität und Mortalität assoziiert ist, ist eine präzise Risikoeinschätzung des einzelnen Patienten wesentlich.

Obwohl akute Leukämien initial gut auf Chemotherapie ansprechen, ist das Langzeitüberleben erwachsener Patienten mit unter 50% nach wie vor enttäuschend und besonders infaust bei älteren Patienten mit AML (ca. 10%).⁴⁻⁶ Um die Langzeitprognose zu

verbessern, sind zwei Ansätze entscheidend. Erstens, die Identifikation prognostischer Marker für eine genauere Prognose- und Risikoeinschätzung des individuellen Patienten. Auf diese Weise kann die nötige Therapieintensität und damit die Balance zwischen Effektivität und Toxizität optimiert werden. Zweitens, die Entwicklung neuer zielgerichteter Substanzen, die mit Chemotherapien kombiniert werden können und potentiell die Eradikation chemoresistenter Klone ermöglichen. Zusätzlich müssen Patientengruppen identifiziert werden, die von diesen spezifischen Therapien profitieren.

1.2 Genetische Veränderungen mit prognostischer Bedeutung bei akuten Leukämien

Die Grundlage der Leukämieentstehung sind genetische Schäden in Knochenmarkvorläuferzellen. Durch gleichzeitiges Auftreten von Defekten in Genen die zu einer ungehemmten Proliferation führen und Genen die eine Ausreifung der Zellen verhindern, soll die leukämische Transformation ermöglicht werden.⁷ Neben Signalwegen der Proliferation und Differenzierung, scheinen aber auch die Kapazität der Selbsterneuerung leukämischer Stammzellen und Faktoren des Knochenmarkmikromilieus eine wichtige Rolle zu spielen. Außerdem tragen nicht nur genetische, sondern auch epigenetische Veränderungen zur Aktivierung leukämischer Signalwege bei. Unter Epigenetik werden Mechanismen verstanden, die Einfluss auf die Genexpression nehmen (z.B. DNA Methylierung), ohne dass es zu Veränderungen des genetischen Codes kommt.

Eine Vielzahl rekurrenter genetischer und epigenetischer Alterationen wurde in akuten Leukämien beschrieben. Es wird vermutet, dass nur ein Teil dieser Veränderungen, sogenannte „driver“ Mutationen, essentiell für die Leukämogenese sind, während andere Veränderungen im Zuge der malignen Transformation entstehen, aber vermutlich keine wesentliche pathogenetische Rolle besitzen.⁸ Der Einfluss einer genetischen Alteration auf die Prognose der Leukämie kann Hinweis auf eine funktionelle Rolle in der Entstehung oder Aufrechterhaltung der Erkrankung geben.

Im Folgenden werden genetische Veränderungen von prognostischer Bedeutung in B-Vorläufer ALL und AML dargestellt. Die wichtigste Rolle spielen hierbei chromosomale Veränderungen (wie Deletionen, Translokationen oder Veränderung der Ploidie), die durch zytogenetische Methoden nachgewiesen werden können. Die genetische Charakterisierung wurde jedoch durch neuere molekulargenetische Methoden wesentlich erweitert und zahlreiche Alterationen wie Mikrodeletionen, Punktmutationen oder Änderung der Genexpression wurden identifiziert.

1.2.1 Genetische Prognosefaktoren in B-Vorläufer ALL

Die Prognose erwachsener ALL Patienten ist mit einem Gesamtüberleben (OS) von 20-60% sehr heterogen. Neben klinischen Faktoren wie Patientenalter und Leukozytenzahl bei Diagnose sind vor allem genetische Alterationen für die Prognose ausschlaggebend. Vorkommen und Häufigkeit zytogenetischer Veränderungen unterscheiden sich zwischen Erwachsenen- und pädiatrischer ALL. Rekurrente Alterationen der B-Vorläufer ALL des Erwachsenen sind in Abbildung 1 dargestellt.

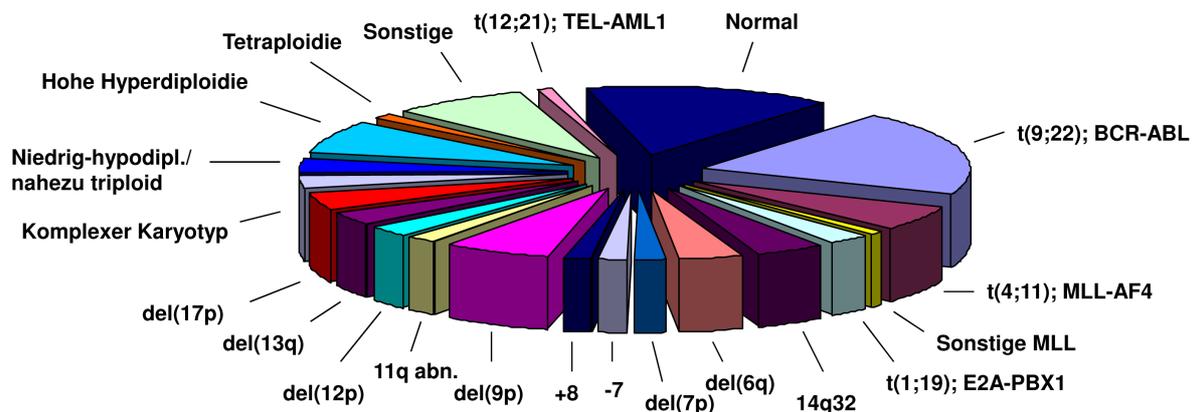


Abbildung 1: Rekurrente zytogenetische Alterationen bei B-Vorläufer ALL des Erwachsenen (nach Armstrong et al.⁹ und Moorman et al.¹⁰)

Die häufigste zytogenetische Veränderung stellt die Translokation *t(9;22)(q34;q11)* mit dem *BCR-ABL* Fusionsgen dar (ca. 20-36% der Fälle).^{4,11} Durch die Fusion mit BCR wird die ABL Tyrosinkinase konstitutiv aktiviert und führt zur ungehemmten Zellproliferation. Die Translokation *t(9;22)/BCR-ABL* sowie die Translokation *t(4;11)(q21;q23)* mit dem *MLL-AF4* Fusionsgen (ca. 5% der Fälle)^{4,10} sind die einzigen Veränderungen, die klar mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet sind und einheitlich für die Risikostratifikation von ALL Patienten herangezogen werden. Die prognostische Bedeutung der Translokation *t(1;19)* und des komplexen Karyotyps ist dagegen nicht eindeutig. Die kontroversen Ergebnisse unterschiedlicher Studien kommen wahrscheinlich durch die niedrige Frequenz dieser Alterationen und einer dementsprechend zu geringen Fallzahl zustande. In einer großen prospektiven Analyse zytogenetischer Daten von 1003 ALL Patienten der Britischen Medical Research Council (MRC) UKALL XII/ECOG E2993 Studien konnte der negative prognostische Wert des komplexen Karyotyps bestätigt werden (Abbildung 2).¹⁰ Darüber hinaus wurden der Karyotyp niedrig-hypodiploid/nahezu triploid und die Translokation *t(8;14)* als Risikomarker verifiziert. Die Karyotypen hohe Hyperdiploidie und *del(9q)* waren mit einer

besseren Prognose assoziiert, was jedoch in der multivariaten Analyse nicht unabhängig signifikant war.

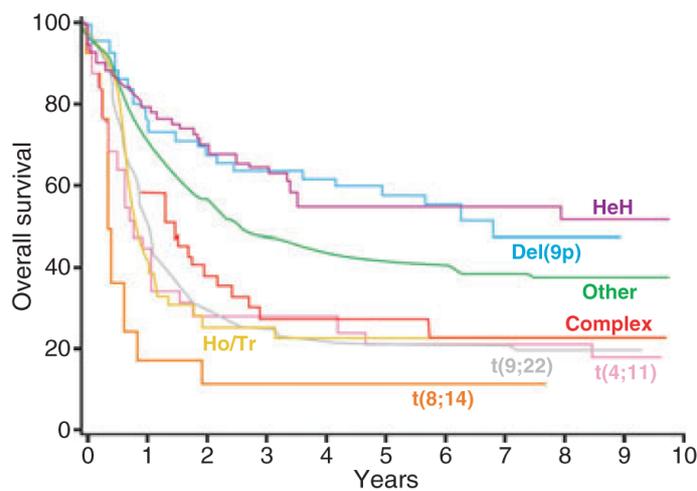


Abbildung 2: Gesamtüberleben von Patienten der MRC UKALL XII/ECOG E2993 Studien nach zytogenetischen Subgruppen¹⁰ (Graphik aus Rowe et al.¹²). HeH: hohe Hyperdiploidie, Ho/Tr: niedrig-hypodiploid/nahezu triploid.

In ca. 15-20% der Fälle liegt ein normaler Karyotyp (NK) vor und genetische Veränderungen können nur mit hochauflösenden molekulargenetischen Methoden nachgewiesen werden. Durch genomweite molekulargenetische Analysen wurden in den letzten Jahren neue genetische Läsionen und potentielle Zielstrukturen für spezifische Therapien identifiziert. Dabei wurden Alterationen der Gene *IKZF1*, *CRLF2* und *CDKN2A/B* als neue molekulare Prognosefaktoren der B-Vorläufer ALL des Erwachsenen etabliert.

Deletionen oder Mutationen von *IKZF1* kommen in ca. 20% aller B-Vorläufer ALL und 80% der *BCR-ABL* positiven ALL Patienten vor.^{13,14} *IKZF1* liegt auf Chromosom 7p12 und kodiert für den Ikaros Transkriptionsfaktor, einem wichtigen Regulator der lymphozytären Differenzierung.¹³ In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass *IKZF1* Alterationen mit einer schlechten Prognose assoziiert sind, sowohl in *BCR-ABL* positiver als auch in *BCR-ABL* negativer ALL.^{15,16}

Auch die Überexpression von *CRLF2*, welches für den Cytokine Receptor-like 2 Factor kodiert, wurde mit einer ungünstigen Prognose vergesellschaftet.^{17,18} *CRLF2* Alterationen kommen nur in ca. 5% der B-Vorläufer ALL Patienten vor, sind jedoch gehäuft bei Down Syndrom-assoziiierter ALL, sowie bei Fällen mit *IKZF1* Alterationen und *JAK1/2* Mutationen zu finden.^{17,19} Präklinische Studien legen nahe, dass *CRLF2* alterierte Leukämien sensitiv auf JAK Inhibitoren sind,²⁰ so dass Patienten mit *CRLF2* Überexpression eventuell von diesen Therapien profitieren könnten.

Deletionen der Tumorsuppressoren *CDKN2A/B* sind in ca. 25% der *BCR-ABL* positiven ALL des Erwachsenen anzutreffen und mit einer höheren Rezidivrate und kürzerem OS assoziiert.²¹ Die Häufigkeit von *CDKN2A/B* Deletionen nimmt im Verlauf der Leukämieprogression zu, was eine pathobiologische Rolle von *CDKN2A/B* in ALL unterstreicht.

1.2.2 Genetische Prognosefaktoren in AML

Zytogenetische Veränderungen haben den stärksten Einfluss auf die Prognose eines AML Patienten. Es werden 3 zytogenetische Risikogruppen unterschieden, wobei die exakte Definition leicht zwischen den verschiedenen Studiengruppen abweicht: günstiges Risiko (20-25% der Patienten), intermediäres Risiko (55-70% der Patienten) und ungünstiges Risiko (10-20% der Patienten). In Tabelle 1 sind die Subgruppen der häufig gebrauchten Risikoeinteilung nach dem Britischen MRC aufgeführt.²² Abbildung 3 zeigt das OS gemäß zytogenetischer Subgruppen von 5876 erwachsenen AML Patienten, die in den MRC AML 10/12/15 Studien behandelt wurden.²³

Tabelle 1: Genetische Risikoeinteilung der AML

Zytogenetische Risikogruppen (nach MRC)		Genetische Risikogruppen (nach ELN)	
Günstig	t(15;17)(q22;q21) t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)	Günstig	t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22) Mut. NPM1 ohne FLT3-ITD (NK) Mut. CEBPA (NK)
Intermediär	Weder als günstig noch ungünstig klassifiziert	Intermediär-I	Mut. NPM1 und FLT3-ITD (NK) Wildtyp NPM1 und FLT3-ITD (NK) Wildtyp NPM1 ohne FLT3-ITD (NK)
		Intermediär-II	Weder als günstig noch ungünstig klassifiziert
Ungünstig	abn(3q) [ohne t(3;5)(q21~25;q31~35)], inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26) add(5q)/del(5q), -5 add(7q)/del(7q), -7 t(11q23) [ohne t(9;11)(p21~22;q23) und t(11;19)(q23;p13)] t(9;22)(q34;q11) abn(17p) Komplexer Karyotyp	Ungünstig	inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26) del(5q), -5 -7 t(11q23) [ohne t(9;11)(p21~22;q23)] t(6;9)(p23;q34) abn(17p) Komplexer Karyotyp

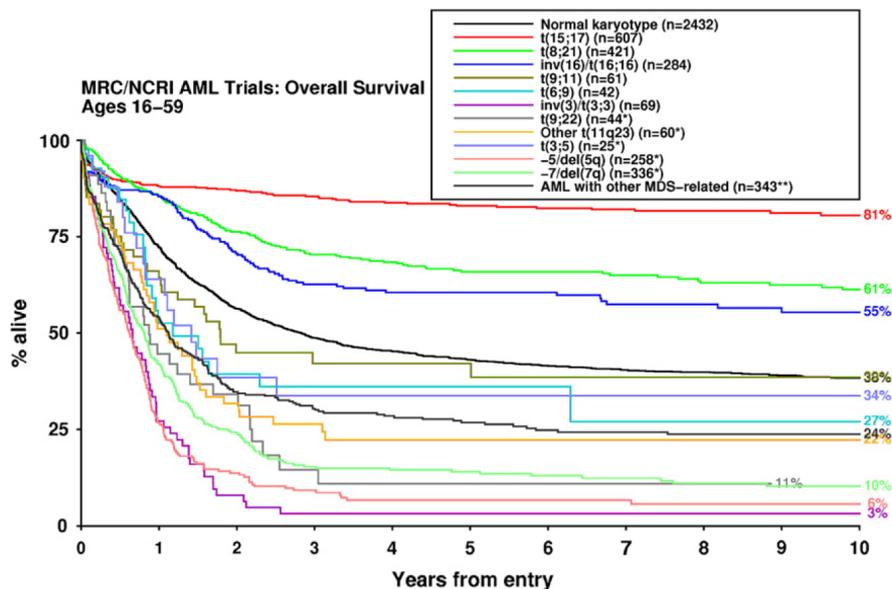


Abbildung 3: Gesamtüberleben von Patienten der MRC AML10/12/15 Studien nach zytogenetischen Subgruppen.²³

Patienten in der günstigen Risikogruppe erreichen mit konventioneller Chemotherapie eine komplette Remission (CR) in über 90% und ein OS von 55-85%, so dass hier eine primäre SCT nicht empfohlen wird.²⁴ In diese Gruppe gehören die akute Promyelozytenleukämie (APL), charakterisiert durch die Translokation t(15;17)(q22;q21), sowie die sogenannten core binding factor Leukämien mit t(8;21)(q22;q22) oder inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22). Aufgrund der spezifischen Pathogenese und Therapie wird die APL jedoch meist gesondert behandelt. Patienten der ungünstigen Risikogruppe haben eine CR Rate von nur 50-60% und ein kurzes OS von 10-20%.^{22,25} Neue Therapiestrategien sind daher für diese Patienten besonders bedeutend.

Etwa 40-45% der Patienten besitzen einen NK und werden der intermediären zytogenetischen Risikogruppe zugeordnet.²⁶ Die Identifikation neuer molekularer Prognosefaktoren in den letzten Jahren hat die Charakterisierung und Prognoseeinschätzung dieser großen, heterogenen Subgruppe deutlich verbessert. Inzwischen können über 90% der AML Fälle zytogenetisch oder molekulargenetisch charakterisiert werden.

Bisher wurden nur 3 dieser neuen molekularen Marker in die klinische Praxis integriert: Mutationen des Gens *NPM1* (Nucleophosmin), die interne Tandemduplikation des Fms-like Tyrosine Kinase 3 Gens (*FLT3-ITD*), sowie Mutationen im Gen *CEBPA* (CCAAT Enhancer Binding Protein alpha). Die unabhängige prognostische Bedeutung dieser Mutationen wurde in verschiedenen Studien bestätigt und daher in die genetische Risikoeinteilung der AML integriert.²⁷ Dabei sind *CEBPA* Mutationen sowie *NPM1* Mutationen ohne gleichzeitige *FLT3-ITD* mit einer günstigen Prognose in NK-AML vergesellschaftet (Abbildung 4).²⁸ Die am

weitesten verbreitete Klassifikation des European LeukemiaNet (ELN) ist in Tabelle 1 aufgeführt.²⁹

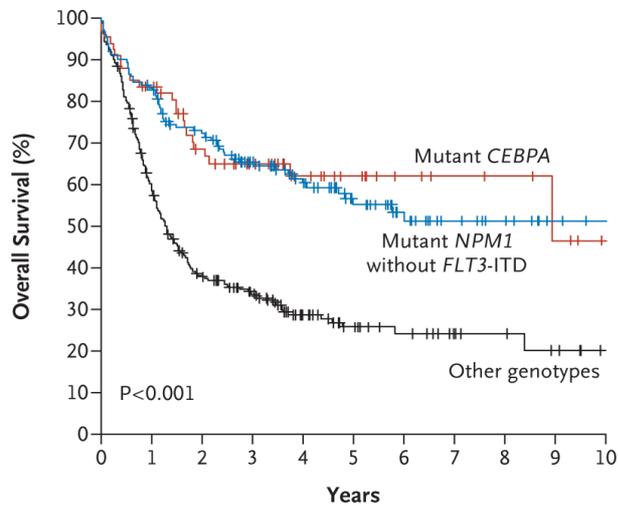


Abbildung 4: Gesamtüberleben von AMLSG Studienpatienten mit NK-AML anhand der *NPM1/FLT3-ITD* und *CEBPA* Genotypen.²⁸

Darüber hinaus wurde die prognostische Relevanz von *RUNX1* Mutationen, der partiellen Tandemduplikation von *MLL* (*MLL-PTD*), sowie einer hohen Expression von *EVI1*, *BAALC*, *ERG*, und *MN1* in mehreren Studien gezeigt.²³ In den letzten Jahren wurden zusätzlich Mutationen in Genen der epigenetischen Regulatoren *TET2*, *IDH1/2*, *DNMT3A* und *ASXL1* nachgewiesen, die vor allem in NK-AML häufig sind. Auch diese Gene scheinen prognostische Bedeutung zu besitzen, was jedoch nicht in allen Studien bestätigt werden konnte.²⁷ Diese Mutationen sind auch in Hinblick auf ihre potentielle Modulierbarkeit mit epigenetischen Therapien interessant.

Wie sich die Vielzahl neuer molekularer Marker in Zukunft sinnvoll in die Risikoklassifikation der B-Vorläufer ALL und AML integrieren lässt, muss in großen prospektiven Studien geprüft werden. Auch wird sich zeigen, welche der prognostischen Marker einen prädiktiven Wert für das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie besitzen.

1.3 Zielgerichtete Therapiekonzepte in AML

Auf Grundlage der genetischen und epigenetischen Veränderungen, die in akuten Leukämien identifiziert wurden, konnten verschiedene spezifische Inhibitoren entwickelt werden. Tabelle 2 zeigt eine Auswahl zielgerichteter Substanzen, die derzeit in präklinischen und klinischen Studien in der AML getestet werden.

Tabelle 2: Auswahl zielgerichteter Therapien in AML

Zielstruktur	Inhibitor	Stadium der Entwicklung
<i>FLT3</i> -ITD	Multikinase Inhibitoren - Sorafenib - Midostaurin - Quizartinib	Phase 2, randomisiert ^{30,31} Phase 3 ³² Phase 2 ³³
<i>c-KIT</i> Mutation	Multikinase Inhibitor Dasatinib	Phase 3 (NCT02013648)
Hedgehog Signalweg	Hedgehog Inhibitor PF-04449913	Phase 2 (NCT01546038)
Proteasom	Proteasominhibitor Bortezomib	Phase 2 ³⁴
HDAC	HDAC Inhibitoren - Valproat - Vorinostat	Phase 2 ³⁵ Phase 2 ³⁶
RAS	Farnesyltransferase Inhibitor Tipifarnib	Phase 1/2 ³⁷⁻³⁹
Aurorakinasen	Aurorakinase A/B Inhibitor AT9283 Aurorakinase B Inhibitor Barasertib	Phase 1 ⁴⁰ Phase 1/2 ^{41,42}
Wnt Signalweg	β -Catenin/CBP Inhibitor PRI-724 β -Catenin Inhibitor CWP232291	Phase 1/2 (NCT01606579) Phase 1 (NCT01398462)
MDM2/TP53	MDM2 Antagonist RG7112	Phase 1/2 ^{43,44}
CXCR4	CXCR4 Antagonist Plerixafor	Phase 1/2 ⁴⁵
HSP90	HSP90 Inhibitoren - 17-AAG - Alveospimycin	Phase 1 ⁴⁶ Phase 1 ⁴⁷
<i>IDH1/2</i> Mutation	Mut. <i>IDH2</i> Inhibitor AG-221 Mut. <i>IDH1</i> Inhibitor AG-120	Phase 1 ⁴⁸ Phase 1 (NCT02074839)
<i>NPM1</i> Mutation	CRM1 Inhibitoren	Präklinische Studien ^{49,50}

Als Zielstruktur dienen dabei spezifische Mutation, z.B. *FLT3*-ITD oder *IDH1/2* Mutationen, aber auch Proteine oder Signalwege, die Subgruppen-übergreifend hochreguliert sind und als wichtig für Überleben und Proliferation leukämischer Blasten gelten [wie Hitzeschockproteine (HSP), Histondeacetylasen (HDAC) oder Proteine des Wingless-type (Wnt) Signalweges]. Für diese Substanzen stellt die Identifikation geeigneter Patienten eine besondere Herausforderung dar.

Die Entwicklung von Tyrosinkinaseinhibitoren für die Therapie der AML ist am weitesten fortgeschritten und der klinische Nutzen eines Tyrosinkinaseinhibitors konnte kürzlich erstmalig belegt werden. In der randomisierten, Plazebo-kontrollierten SORAML Phase 2 Studie wurde gezeigt, dass die Hinzunahme von Sorafenib zur Standard Induktions- und Konsolidierungstherapie bei neu diagnostizierten AML Patienten unter 60 Jahren zu einem signifikant verlängerten Rezidiv-freien Überleben (RFS) und Ereignis-freien Überleben (EFS) führt.³¹ Dieser Effekt war allerdings unabhängig vom Vorliegen einer *FLT3*-ITD und somit auf die Multikinaseaktivität von Sorafenib zurückzuführen. Neuere, selektive *FLT3* Inhibitoren wie Quizartinib scheinen spezifische Aktivität in *FLT3*-ITD positiven Patienten zu besitzen.³³

Die Identifikation prädiktiver Marker für das Ansprechen auf diese vielversprechenden neuen Therapien wird entscheidend sein, um passende Patientengruppen auszuwählen und eine individuelle, maßgeschneiderte Therapie zu ermöglichen.

2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Die Identifikation molekularer Prognosefaktoren bei akuten Leukämien steht im Mittelpunkt dieser Arbeit.

Genetische Marker als Risikofaktoren für Chemoresistenz oder eine hohe Rezidivwahrscheinlichkeit haben eine wichtige Bedeutung bei der initialen Prognoseeinschätzung eines Patienten mit akuter Leukämie. Eine präzise Risikoeinschätzung kann helfen, die Therapie für Hochrisikopatienten früh zu intensivieren und für Niedrigrisikopatienten zu de-eskalieren, um schwere Therapiekomplicationen zu vermeiden. Diese risikoadaptierte Therapiestratifizierung hat zu einer deutlichen Verbesserung der Prognose gewisser Leukämie-Subgruppen geführt. Allerdings gibt es große, heterogene Subgruppen, wie die Standardrisiko B-Vorläufer ALL, die bisher kaum charakterisiert wurden und für die eine bessere Risikoeinschätzung wesentlich ist. Die Standardrisiko ALL steht daher im Fokus des Interesses der Arbeiten zu molekularen Risikomarkern. In den Arbeiten sollte untersucht werden, wie sich neue molekulare Marker in die bestehende Risikostratifizierung der ALL integrieren lassen, um eine verbesserte Prognoseabschätzung zu ermöglichen.

Darüber hinaus stellen molekulare Marker potentielle Zielstrukturen für spezifische Therapieansätze dar, einem weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit. Von besonderem Interesse war hierbei die AML, die häufigste Form der akuten Leukämie bei älteren Erwachsenen. Ältere AML Patienten haben eine extrem schlechte Prognose und kommen häufig für intensive Chemotherapien oder SCT nicht in Frage, so dass hier die Entwicklung zielgerichteter Therapien besonders wichtig ist. Molekulare Marker von prognostischer Relevanz können Aufschluss über die bei Leukämie veränderten Signalwege geben und zum Verständnis der Leukämieentstehung beitragen. Aufgrund der Bedeutung des Wnt- und Insulin-like growth factor (IGF) Signalweges für Überleben und Proliferation leukämischer Blasten, untersuchten wir Gene, die für Regulatorproteine dieser Signalwege kodieren - den Wnt Inhibitor *CXXC5* und IGF Bindungsproteine (*IGFBP*). Durch die potentielle Rolle in der Dysregulation des Wnt- bzw. IGF Signalweges in AML, stellen diese Gene mögliche prädiktive Marker für Wnt- und IGF-gerichtete Therapien dar. Weiterführende Untersuchungen dieser Marker in Hinblick auf ihr spezifisches Genexpressionsmuster, ihr Zusammenspiel mit bekannten leukämischen Signalwegen, sowie deren Wirkung auf die Proliferation von Leukämiezellen sollten Einblick in deren funktionelle Rolle und potentielle Eignung als Zielstruktur gewähren.

3 EIGENE ARBEITEN

3.1 Molekulare Prognosefaktoren in der B-Vorläufer ALL

Trotz intensiver Chemotherapieprotokolle bleibt die Heilungsrate der B-Vorläufer ALL des Erwachsenen mit 20-60% ungenügend und weit hinter den Ergebnissen bei Kindern zurück.^{4,10,51} Die größten Fortschritte bezüglich einer Prognoseverbesserung bei ALL Patienten wurden in den letzten Jahren durch risikoadaptierte Therapiestratifizierung erreicht: Patienten, die bei Diagnose klinische oder molekulare Risikofaktoren aufweisen, werden primär intensiver behandelt als Patienten mit niedrigem Risiko. Etablierte Risikofaktoren sind hierbei eine hohe Leukozytenzahl bei Diagnose, der Immunphänotyp der pro-B ALL, das Ansprechen auf Induktionstherapie, sowie die beiden (molekular)genetischen Alterationen $t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL$ und $t(4;11)(q21;q23)/MLL-AF4$. Durch die hohe Rezidivwahrscheinlichkeit bei Vorliegen eines oder mehrerer dieser Risikofaktoren ist eine primäre allogene SCT gerechtfertigt. Mit der Entwicklung von Tyrosinkinaseinhibitoren wurde es zudem möglich, Hochrisiko ALL Patienten mit *BCR-ABL* gezielt zu behandeln. Hierdurch wird das Therapieansprechen der *BCR-ABL*-positiven ALL deutlich erhöht⁵²⁻⁵⁴ und das Langzeitüberleben von 20% auf 40% verbessert.⁵⁴

Patienten die keinen klinischen oder genetischen Risikofaktor aufweisen werden der Standardrisikogruppe zugeordnet, wobei sich die exakte Definition zwischen verschiedenen Studiengruppen unterscheidet. In der Deutschen ALL Studiengruppe GMALL wird Standardrisiko wie folgt definiert: *BCR-ABL*- und *MLL-AF4*-negative Patienten mit CR nach erster Induktionstherapie und initialer Leukozytenzahl unter $\leq 30/nl$. Standardrisiko ALL bildet eine große, heterogene Subgruppe der ALL, für die noch kein verlässlicher molekularer Prognosemarker identifiziert wurde, der eine spezifische Therapieanpassung erlaubt.

Eine vielversprechende Methode, die Prognoseeinschätzung im Verlauf der Therapie für den einzelnen Patienten zu verbessern und Rezidive frühzeitig zu erkennen, stellt die Analyse der Minimalen Resterkrankung (MRD) dar.^{55,56} MRD Diagnostik basiert auf dem Nachweis spezifischer genetischer Veränderungen der Leukämiezellen, hauptsächlich durch Translokationen entstandene Fusionsgene oder klonale Rearrangements der Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Gene. Damit lassen sich mit hoher Sensitivität residuelle leukämische Blasten im Untersuchungsmaterial quantifizieren (üblicherweise 1 Blast unter 100000 nicht maligner Zellen). Es konnte gezeigt werden, dass Standardrisikopatienten mit hohem MRD Niveau zu verschiedenen Zeitpunkten während der ersten Monate der Therapie ein sehr hohes Rezidivrisiko haben.⁵⁵ Bei der Mehrzahl der Standardrisikopatienten kann das Rezidivrisiko jedoch mittels MRD bisher nicht abgeschätzt werden. Ein weiterer Nachteil der

MRD Diagnostik besteht darin, dass das erhöhte Risiko nicht bereits bei Diagnose festgestellt wird, sondern erst bei bereits manifester Therapieresistenz. Die Identifikation prognostischer Marker zum Zeitpunkt der Diagnose würde ermöglichen, die Therapie von Beginn an risikoadaptiert zu modifizieren und könnte Ausgangspunkt für die Entwicklung zielgerichteter Therapien für diese Patienten sein.

In den folgenden Arbeiten wurden zwei Kandidatengene, *BAALC* und *LEF1*, als prognostische Marker in B-Vorläufer ALL untersucht. Der Fokus lag hierbei auf der Standardrisiko ALL, sowie auf *BCR-ABL*- und *MLL-AF4*-negativen Patienten, die noch nicht durch einen molekularen Hochrisikomarker charakterisiert sind und keine spezifische Therapie erhalten.

3.1.1 Das Gen *BAALC*

Das Gen *BAALC* (*Brain And Acute Leukemia, Cytoplasmic*) auf Chromosom 8q22.3 wird in unreifen Knochenmarkvorläuferzellen und in verschiedenen Subgruppen der akuten Leukämien hoch exprimiert.^{57,58} Eine hohe Expression von *BAALC* wurde sowohl in NK-AML als auch in der T-ALL des Erwachsenen mit einem unreifen Leukämie-Phänotypen assoziiert.⁵⁸⁻⁶⁰ Es wird vermutet, dass *BAALC* durch Blockade der Zelldifferenzierung zur Leukämieentstehung beiträgt.⁶¹ In NK-AML^{59,62} und T-ALL⁶⁰ konnte gezeigt werden, dass die hohe Expression von *BAALC* mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet ist. Die Expression von *BAALC* in B-Linien ALL war bisher nicht untersucht worden.

Durch die linien-übergreifende prognostische Bedeutung von *BAALC* in akuten Leukämien vermuteten wir, dass *BAALC* auch in B-Vorläufer ALL von prognostischer Relevanz sein würde. Nachfolgend wurde die unabhängige prognostische Signifikanz der gesteigerten *BAALC* Expression in B-Vorläufer ALL gezeigt.

3.1.1.1 Hohe *BAALC* Expression ist mit gesteigerter Chemoresistenz in B-Vorläufer ALL des Erwachsenen assoziiert

Kühnl A, Gökbuget N, Stroux A, Burmeister T, Neumann M, Heesch S, Haferlach T, Hoelzer D, Hofmann WK, Thiel E, Baldus CD. High *BAALC* expression predicts chemoresistance in adult B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010 May 6; 115(18):3737-4.

Ziel der Studie war, die prognostische Relevanz der gesteigerten *BAALC* Expression bei B-Vorläufer ALL des Erwachsenen zu untersuchen. *BAALC* mRNA Expression wurde mittels quantitativer real-time RT-PCR (RT-qPCR) in 368 diagnostischen Knochenmarkproben von ALL Patienten zwischen 18 und 60 Jahren, die in den GMALL 06/99 und 07/03 multizentrischen Studien behandelt worden waren, untersucht. Zusätzlich wurde die globale Genexpression *BCR-ABL/MLL-AF4*-negativer Patienten in Abhängigkeit der *BAALC* Expression analysiert (Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 Genchips; 51 diagnostische Knochenmarkproben aus der multizentrischen MILE Studie⁶³). Für die statistische Auswertung wurden Patienten anhand der *BAALC* mRNA Expressionswerte in Terzilen eingeteilt. Die mediane Beobachtungszeit betrug 44 Monate. Patienten mit höherer *BAALC* Expression wiesen eine höhere Rate an primärer Therapieresistenz auf, sowohl innerhalb der Gesamtkohorte ($P=0.004$), als auch innerhalb der *BCR-ABL*- und *MLL-AF4*-negativen Patienten ($P=0.009$). In der multivariaten Analyse unter Einschluss der bekannten klinischen und molekularen Risikofaktoren (Leukozytenzahl, Patientenalter, CD20 Expression, *BCR-ABL*, *MLL-AF4*, Immunphänotyp), war eine höhere *BAALC* Expression unabhängig prädiktiv für primäres Therapieversagen. In *BCR-ABL*- und *MLL-AF4*-negativen Patienten war eine höhere *BAALC* Expression mit kürzerem OS assoziiert (5-Jahres OS: oberste Terzile: 38%, mittlere Terzile: 52%, untere Terzile: 70%; $P=0.004$). In der multivariaten Analyse waren höhere *BAALC* Expression ($P=0.03$), hohe Leukozytenzahl ($P<0.001$) und höheres Patientenalter ($P<0.001$) unabhängige prognostische Faktoren für ein schlechteres OS. In der Genexpressionsanalyse war eine gesteigerte *BAALC* Expression mit der differentiellen Expression von 43 Genen assoziiert, wobei verschiedene Stammzell-Gene (*CD34*, *CD99*) und Chemoresistenz-Gene (*TSPAN7*, *LYN*) hoch exprimiert waren. Zusammenfassend konnte *BAALC* als neuer molekularer Prognosefaktor in der B-Vorläufer ALL identifiziert werden, welcher mit primärer Therapieresistenz verbunden ist. Die Bestimmung der *BAALC* Expression in ALL Patienten könnte zu einer besseren Risikostratifikation von bisher molekular nicht charakterisierten ALL Patienten beitragen.

Publikation I

Kühnl A. High *BAALC* expression predicts chemoresistance in adult B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010 May 6; 115(18):3737-4.

<https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-241943>

3.1.2 Der Wnt Signalweg-Mediator LEF1

LEF1 (Lymphoid Enhancer Factor 1) gehört zur Familie der LEF/T-cell factor (TCF) Transkriptionsfaktoren und ist ein Schlüsselprotein im kanonischen Wnt Signalweg.⁶⁴ Aktivierung des Wnt Signalweges führt zu einer Anreicherung von β -Catenin, welches im Zellkern einen Komplex mit LEF/TCF Proteinen formt und die Transkription verschiedener Zielgene aktiviert. Wnt Aktivierung fördert das Wachstum und Überleben von Leukämiezellen *in vitro*⁶⁵⁻⁶⁷ und scheint für die Leukämieentstehung eine wichtige Rolle zu spielen.^{65,68-71} *LEF1* wird in verschiedenen Lymphomen⁷²⁻⁷⁴ und akuten Leukämien^{70,75} hoch exprimiert. *In vitro* Experimente konnten zeigen, dass LEF1 das Überleben von Lymphom- und Leukämiezellen fördert^{65,73,74}. Darüber hinaus führt eine hohe Expression von *LEF1* im Mausmodell zur Entwicklung B-lymphoblastischer sowie myeloischer Leukämien.⁷⁵ In pädiatrischer T-ALL wurden zudem inaktivierende *LEF1* Mutationen identifiziert, die mit einer Tendenz zu einer besseren Langzeitprognose vergesellschaftet waren.⁷⁶ Die Expression und prognostische Bedeutung von *LEF1* in B-Linien ALL des Erwachsenen war bisher nicht untersucht worden.

Aufgrund der Bedeutung von *LEF1* für die Aktivierung des Wnt Signalweges und der potentiellen Rolle in der Leukämogenese, stellten wir die Hypothese auf, dass eine gesteigerte *LEF1* Expression auch in B-Vorläufer ALL vorkommt und Einfluss auf die Prognose besitzt. Die unabhängige prognostische Relevanz einer hohen *LEF1* Expression bei B-Vorläufer ALL wurde in der nachfolgenden Arbeit gezeigt.

3.1.2.1 Prognostische Bedeutung der *LEF1* Expression in B-Vorläufer ALL

Kühnl A, Gökbuget N, Kaiser M, Schlee C, Stroux A, Burmeister T, Mochmann LH, Hoelzer D, Hofmann WK, Thiel E, Baldus CD. Overexpression of *LEF1* predicts unfavourable outcome in adult patients with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011 Dec 8;118(24):6362-7.

Diese Studie untersuchte die prognostische Bedeutung der Expression von *LEF1* in B-Vorläufer ALL. *LEF1* nimmt eine Schlüsselrolle in der Aktivierung des Wnt Signalweges ein. Die Expression von *LEF1* wurde in 282 konsekutive Knochenmarkproben von Erwachsenen mit neu diagnostizierter ALL, die in den multizentrischen Studien GMALL 06/99 und GMALL 07/03 behandelt wurden, mittels RT-qPCR analysiert. Zusätzlich wurden 40 Patienten mit vorhandener genomischer DNA auf Mutationen in den Exonen 2 und 3 des *LEF1* Gens untersucht. Patienten der 25% oberen *LEF1* Messwerte wurden mit den übrigen 75% der Fälle verglichen. Beide Gruppen unterschieden sich nicht in CR Rate und Häufigkeit primärer Therapieresistenzen. Jedoch wiesen Patienten mit hoher *LEF1* Expression eine höhere Rezidivrate auf (74% vs. 49%; $P=0.03$). Dies spiegelte sich in einem signifikant schlechteren RFS für Patienten mit hoher *LEF1* Expression wider [5-Jahres RFS 27% vs. 47% ($P=0.05$) in der Gesamtkohorte und 36% vs. 57% ($P=0.02$) in der Standardrisikogruppe ($n=91$)]. Der Unterschied im OS zwischen beiden Gruppen war nicht statistisch signifikant, jedoch konnte eine Interaktion zwischen *LEF1* Expression und Patientenalter festgestellt werden. Danach war der Einfluss von *LEF1* auf das OS besonders hoch in Standardrisikopatienten über 35 Jahren. In dieser Gruppe war eine hohe *LEF1* Expression der einzige unabhängige prognostische Faktor für ein schlechteres OS in der multivariaten Analyse (Hazard Ratio 2.7; $P=0.02$). In der Mutationsanalyse fanden sich mit Ausnahme eines missense Asp85Asn Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) in 2 Patienten keine weiteren Mutationen. Im Gegensatz zur T-ALL scheinen *LEF1* Mutationen somit eine geringe Rolle für die unterschiedliche Höhe der *LEF1* Expression bei B-Vorläufer ALL zu spielen. Diese Studie zeigt die prognostische Bedeutung der *LEF1* Expression für Therapieresidive bei B-Vorläufer ALL einschließlich der Standardrisikogruppe und bekräftigt eine mögliche Rolle des Wnt Signalweges in der Pathogenese der ALL. Standardrisikopatienten mit hoher *LEF1* Expression könnten von einer Therapie mit Wnt Inhibitoren profitieren.

Publikation II

Kühnl A. Overexpression of LEF1 predicts unfavourable outcome in adult patients with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2011 Dec 8;118(24):6362-7.

<https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-350850>

3.2 Prognosefaktoren und potentielle Zielstrukturen für neue Therapien in AML

Aufgrund der schlechten Langzeitprognose von Patienten mit AML wird vermehrt versucht, zielgerichtete Substanzen mit konventionellen Chemotherapien zu kombinieren, um Ansprechraten zu verbessern und Rezidive zu vermindern. Die Entwicklung zielgerichteter Therapien erfolgt dabei in verschiedenen Schritten: 1. Identifikation eines für die Leukämogenese wichtigen Proteins/Signalweges, 2. Entwicklung eines pharmakologischen Inhibitors gegen dieses Protein/Signalweg, 3. Untersuchung der *in vitro* und *in vivo* anti-leukämischen Aktivität des Inhibitors, 4. Untersuchung des Inhibitors in klinischen Studien, 5. Identifikation prädiktiver Marker und damit geeigneter Patientengruppen für den klinischen Einsatz.

Die folgenden Studien zum Wnt Inhibitor CXXC5 und Regulatorproteinen des IGF Signalweges hatten zum Ziel, neue molekulare Prognosefaktoren und mögliche Zielstrukturen zu identifizieren, die darüber hinaus potentielle prädiktive Marker für das Ansprechen auf Wnt- bzw. IGF Inhibitoren darstellen. In einer weiteren Arbeit haben wir die *in vitro* anti-leukämische Aktivität eines neuen HSP70 Inhibitors untersucht.

3.2.1 CXXC Proteine in AML

Proteine der CXXC Familie, die durch eine CXXC Zinkfinger-Domäne charakterisiert sind, wurden vielfach mit Krebsentwicklung assoziiert. Die meisten der 12 bekannten CXXC Proteine haben eine Funktion in der epigenetischen Regulation, wie die DNA Methyltransferase DNMT1, die Histonmethyltransferasen MLL und MLL2, die Methylcytosindioxygenase TET1, sowie die Histondemethylasen KDM2A und KDM2B. MLL spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression der AML und ALL.⁷⁷ Aber auch MLL2,^{78,79} DNMT1,⁸⁰⁻⁸² TET1^{82,83} und CXXC4⁸⁴ wurden in neueren Untersuchungen mit der Leukämogenese in Zusammenhang gebracht.

CXXC5 wurde als Tumorsuppressor-Gen in soliden Tumoren identifiziert.⁸⁵ Außerdem wurde gezeigt, dass CXXC5 im Normalgewebe den kanonischen Wnt Signalweg hemmt,^{86,87} dessen Aktivierung in der Pathogenese der AML eine Rolle spielt.^{65,70,71} CXXC5 scheint zudem eine Funktion bei der Reifung hämatopoetischer Zellen zu besitzen, da das Protein während der Zytokin-vermittelten Differenzierung von Knochenmarkvorläuferzellen, aber auch während der all-trans Retinsäure-induzierten Differenzierung von APL Zellen hochreguliert wird.⁸⁸ Das Gen CXXC5 liegt auf Chromosom 5q31.2 in einer Region, die bei AML gehäuft deletiert ist, was eine funktionelle Bedeutung für die AML nahe legt.

Durch die Rolle von CXXC Proteinen in der Tumorentstehung und der möglichen Interaktion von CXXC5 mit dem Wnt Signalweg stellt CXXC5 ein interessantes Kandidatengen in AML dar. Die prognostische Bedeutung der CXXC5 Expression in AML, mögliche Regulationsmechanismen von CXXC5, sowie dessen Interaktion mit dem Wnt Signalweg wurden in der folgenden Arbeit untersucht.

3.2.1.1 Verminderte Expression des Wnt Signalweg Inhibitors CXXC5 ist mit einer besseren Prognose in AML assoziiert

Kühnl A, Valk PJ, Sanders MA, Ivey A, Hills RK, Mills KI, Gale RE, Kaiser MF, Dillon R, Joannides M, Gilkes A, Haferlach T, Schnittger S, Duprez E, Linch DC, Delwel R, Löwenberg B, Baldus CD, Solomon E, Burnett AK, Grimwade D. Down-regulation of the Wnt inhibitor CXXC5 predicts a better prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2015 May 7; 125(19):2985-94.

Um die prognostische und funktionelle Rolle von CXXC5 in der AML näher zu untersuchen, wurde die Expression von CXXC5 aus Microarray-Daten 529 diagnostischer Knochenmarkproben von AML Patienten der multizentrischen HOVON/SAKK Studien bestimmt.⁸⁹ In 231 Patienten wurde die Expression zusätzlich mittels RT-qPCR untersucht. 84 AML Proben standen zudem für Mutationsanalysen und 46 Proben für Methylierungsanalysen der CXXC5 Promotor-Region zur Verfügung. Ein CXXC5-assoziiertes Genexpressionsprofil wurde von Daten von 351 Patienten mit NK-AML aus der MILE Studie gewonnen.⁶³ Wir konnten zeigen, dass die CXXC5 Expression in spezifischen genetischen Subgruppen der AML (AML mit *MLL* Rearrangements, Translokation t(8;21) und del(5q)) im Vergleich zu normalen Knochenmarkvorläuferzellen herunterreguliert ist. Es fand sich eine signifikante Korrelation zwischen CXXC5 Expression und der Expression von *MN1*, *WT1*, *ERG*, *GATA2*, *MLL*, *DNMT3B* und *RUNX1*, Genen, denen eine Rolle bei der Pathogenese der AML zugeschrieben wird. Interessanterweise konnten wir auch eine Herunterregulation der CXXC5 Expression in Patienten mit inaktivierenden *GATA2* Mutationen zeigen. Die Überexpression von *GATA2* in 293T Zellen führte zu gesteigerter Expression von CXXC5, was eine funktionelle Interaktion beider Gene untermauert. Die Daten lassen vermuten, dass CXXC5 mit verschiedenen leukämischen Signalwegen interagiert und in spezifischen AML Subgruppen inhibiert ist. Die Analyse der CXXC5 Promotor-Region zeigte, dass der Grad der Methylierung in einem umschriebenen Bereich des Promotors negativ mit der Höhe der CXXC5 mRNA Expression korreliert war. Die Demethylierung dieser Region in U937 und NB4 Zelllinien mittels Decitabine führte zu einer Hochregulation von CXXC5. Die Ergebnisse legen nahe, dass CXXC5 durch Promotor-Methylierung inaktiviert werden kann. CXXC5 Mutationen als Mechanismus der Geninaktivierung wurden hingegen nicht gefunden. In weiteren funktionellen Analysen konnten wir nachweisen, dass CXXC5 den kanonischen Wnt Signalweg hemmt. Die Überexpression von CXXC5 in K562 und KG1a Zellen führte zur verminderten Hochregulation von β -Catenin und den Wnt Zielgenen *AXIN2* und *SURVIVIN* nach Wnt Stimulation, sowie einer verminderten Wnt Aktivität im Wnt Reporterassay. CXXC5 Expression führte außerdem zu verminderter Proliferation verschiedener AML Zelllinien nach

Wnt Aktivierung. Wir konnten ferner zeigen, dass CXXC5 in die p53-abhängigen Effekte nach DNA Schädigung involviert ist. Insgesamt lassen die funktionellen Analysen eine Tumorsuppressor-Funktion vermuten. Interessanterweise war eine niedrige CXXC5 Expression mit einer besseren Prognose in AML vergesellschaftet. Patienten mit einer CXXC5 Expression unterhalb des Medians der Expressionswerte hatten eine niedrigere Rezidivrate (45% vs. 59%; $P=0.007$) und ein besseres OS und EFS [OS: 46% vs. 28% ($P<0.001$) und EFS: 36% vs. 21% ($P<0.001$)]. Dies war unabhängig von bekannten genetischen und molekularen Risikofaktoren der AML (zytogenetische Risikogruppen, *FLT3*-ITD, sowie Mutationen von *NPM1*, *CEBPA*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *WT1*). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass CXXC5 in AML als Wnt Inhibitor fungiert und einen potentiellen Tumorsuppressor darstellt. Inaktivierung von CXXC5 ist mit verschiedenen genetischen Subgruppen und leukämischen Signalwegen assoziiert und charakterisiert eine Patientengruppe mit besserer Prognose, die besonders geeignet für den Einsatz von Wnt Inhibitoren sein könnte.

Publikation III

Kühnl A. Down-regulation of the Wnt inhibitor CXXC5 predicts a better prognosis in acute myeloid leukemia. Blood. 2015 May 7; 125(19):2985-94.

<https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-613703>

3.2.2 IGF Bindungsproteine als prognostische Marker und potentielle Zielstrukturen bei AML

Der IGF Signalweg spielt für eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie Wachstum, Differenzierung und Apoptose eine wichtige Rolle, sowohl im normalen Gewebe, als auch in Tumoren.⁹⁰ In der AML wurde gezeigt, dass die beiden Liganden IGF-I und IGF-II das Wachstum von leukämischen Blasten stimulieren⁹¹ und die Proliferation durch den Einsatz von IGF Inhibitoren entsprechend gehemmt wird.⁹²⁻⁹⁴ IGF aktiviert verschiedene nachgeschaltete zelluläre Signalwege, darunter die PI3K/AKT/mTOR und RAS/RAF/MEK/ERK Netzwerke.⁹⁵ Die Bioverfügbarkeit von IGF-I und IGF-II wird durch 7 regulierende Bindungsproteine (IGFBP1-7) gesteuert. Zusätzlich zur regulierenden Funktion wird eine von IGF-I und IGF-II unabhängige direkte Funktion auf das Zellwachstum vermutet.⁹⁵ In Glioblastomzellen wurde beispielsweise eine direkte Aktivierung des EGFR/STAT3 Signalweges durch IGFBP2 gezeigt.⁹⁶

Die prognostische und funktionelle Bedeutung von *IGFBP2* und *IGFBP7* wurde nachfolgend untersucht. *IGFBP2* wird in verschiedenen Tumoren, einschließlich der akuten Leukämien hoch exprimiert⁹⁷⁻⁹⁹ und wurde mit Tumorentstehung und Therapieresistenz in Zusammenhang gebracht.^{97,100} In pädiatrischen akuten Leukämien wurde eine hohe *IGFBP2* Expression mit einer ungünstigen Prognose assoziiert.^{99,101,102} Aufgrund der prognostischen Bedeutung bei pädiatrischer Leukämie haben wir einen ähnlichen Einfluss auf die Prognose der AML des Erwachsenen vermutet und in der nachfolgenden Arbeit bestätigt.

Für *IGFBP7* wurde eine Tumorsuppressor-Funktion in verschiedenen Tumoren nahe gelegt,¹⁰³⁻¹⁰⁵ die Bedeutung in hämatologischen Neoplasien jedoch kaum untersucht. In einer Analyse bereits publizierter Genexpressionsdaten von Patienten mit NK-AML,⁶² T-ALL⁶³ sowie normaler Knochenmarkvorläuferzellen,¹⁰⁶ wurde *IGFBP7* als eines von 4 Genen identifiziert, welches in allen 3 Expressionsprofilen mit einer hohen *BAALC* Expression korreliert war (Heesch *et al.* 2010). Wir stellten daher die Hypothese auf, dass *IGFBP7* bei der *BAALC*-vermittelten Therapieresistenz in akuten Leukämien eine Rolle spielt.

3.2.2.1 Hohe Expression von *IGFBP2* ist mit gesteigerter Chemoresistenz in AML verbunden

Kühnl A, Kaiser M, Neumann M, Fransecky L, Heesch S, Radmacher M, Marcucci G, Bloomfield CD, Hofmann WK, Thiel E, Baldus CD. High expression of *IGFBP2* is associated with chemoresistance in adult acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2011 Dec;35(12):1585-90.

Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob *IGFBP2* auch in der AML des Erwachsenen eine prognostische Rolle spielt und eine potentielle Zielstruktur für neue Therapien darstellt. Die *IGFBP2* Expression wurde in 99 Knochenmarkproben von Patienten mit neu diagnostizierter AML, die zwischen 2003 und 2010 an der Charité Campus Benjamin Franklin mit Standard Cytarabin- und Anthrazyklin-haltiger Induktionstherapie behandelt worden waren, mit RT-qPCR untersucht. Microarray-Daten einer unabhängigen Kohorte von 61 NK-AML Patienten aus der CALGB 9621 Studie standen zur Analyse eines *IGFBP2*-assoziierten Genexpressionsprofils zur Verfügung (Affymetrix U133 plus 2.0 GeneChips).⁶² Die Expression von *IGFBP2* war im Knochenmark und Serum von AML Patienten signifikant höher verglichen mit Normalpersonen. AML Patienten der obersten *IGFBP2* Quartile (die oberen 25% der Messwerte) wurden mit den übrigen Patienten verglichen. Hohe *IGFBP2* Expression war mit primärer Therapieresistenz assoziiert (65% vs. 32%; P=0.02) und stellte einen unabhängigen prädiktiven Faktor für Therapieresistenz in der multivariaten Analyse dar [Odds Ratio 3.6; P=0.02]. Das Genexpressionsprofil in AML mit hoher *IGFBP2* Expression wies eine Hochregulation von Genen auf, die in anderen molekularen Hochrisikogruppen hoch exprimiert werden, wie in AML mit *FLT3*-ITD (*MEIS1*, *HOXB3*, *WT1*) oder *MLL* Rearrangements (*HOXA9*, *MYB*, *MEIS1*). Unter den niedrig exprimierten Genen in Patienten mit hoher *IGFBP2* Expression fanden sich potentielle Tumorsuppressor-Gene (*CEBPD*, *G0S2*, *KLF4*, *KLF11*) und das Wachstumsregulations-Gen *GADD45B*. Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass *IGFBP2* in AML überexprimiert wird und eine hohe Expression mit Therapieresistenz assoziiert ist. Dies spiegelt sich in einer resistenten, aggressiven Genexpressions-Signatur in AML mit hoher *IGFBP2* Expression wider. *IGFBP2* stellt somit eine vielversprechende Zielstruktur für spezifische Therapieansätze dar. Patienten mit hoher *IGFBP2* Expression sollten sowohl als Kandidaten für IGF-gerichtete Therapien als auch für Inhibitoren nachgeschalteter Signalwege in Erwägung gezogen werden.

Publikation IV

Kühnl A. High expression of IGFBP2 is associated with chemoresistance in adult acute myeloid leukemia. Leuk Res. 2011 Dec;35(12):1585-90.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2011.08.006>

3.2.2.2 Identifikation von IGFBP7 als neuen Marker für potentielle zielgerichtete Therapie bei akuten Leukämien

Heesch S, Schlee C, Neumann M, Stroux A, **Kuehnl A**, Schwartz S, Haferlach T, Goekbuget N, Hoelzer D, Thiel E, Hofmann WK, Baldus CD. BAALC-associated gene expression profiles define IGFBP7 as a novel molecular target in acute leukemia. *Leukemia*. 2010 Aug;24(8):1429-36.

In einer Analyse BAALC-assoziiierter Genexpressionsprofile von NK-AML, T-ALL und normalen Knochenmarkvorläuferzellen wurde *IGFBP7* als neues Kandidatengen identifiziert, das linienübergreifend mit *BAALC* ko-aktiviert ist. Um die Rolle von *IGFBP7* in akuten Leukämien näher zu untersuchen, wurde die *IGFBP7* mRNA Expression mittels RT-qPCR in 597 Patientenproben (230 B-Vorläufer ALL, 219 T-ALL, 81 AML, 23 undifferenzierte Leukämien und 44 Fälle mit myelodysplastischem Syndrom), sowie in 14 Knochenmarkproben von Normalpersonen untersucht. ALL Proben stammten von Patienten der GMALL 06/99 und 07/03 Studien mit einer medianen Beobachtungszeit von 35.8 Monaten. Patienten mit AML und undifferenzierter Leukämie zeigten eine im Vergleich zu Normalpersonen höhere *IGFBP7* Expression ($P \leq 0.001$ und $P = 0.02$). Die mediane *IGFBP7* Expression war in ALL nicht signifikant erhöht, jedoch zeigte sich in T-ALL eine breitere Varianz der Expression im Vergleich zu Kontrollen. Eine hohe *IGFBP7* Expression in T-ALL war mit hoher Expression des Stammzellmarkers CD34 und des myeloischen Markers CD33 assoziiert. Patienten mit hoher *IGFBP7* Expression (die oberen 25% der Messwerte im Vergleich zu den restlichen 75%) hatten häufiger eine primär refraktäre Erkrankung (11% vs. 3%; $P = 0.03$). Das OS war in Patienten mit hoher *IGFBP7* Expression signifikant verkürzt (4-Jahres OS 42% vs. 55%; $P = 0.03$). Der Effekt von rekombinantem IGFBP7 Protein auf die Proliferation der leukämischen Zelllinien KG1a (AML) und Jurkat (T-ALL) wurden mittels Trypanblaufärbung und WST1 Assay über 7 Tage untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass IGFBP7 Zellwachstum und Viabilität in beiden Zelllinien signifikant hemmt, was mit Zellzyklusarrest vergesellschaftet war. Ein Effekt auf Apoptose und Seneszenz der Zellen konnte nicht nachgewiesen werden. Die verminderte Proliferation bei gleichzeitig nicht gesteigerter Apoptose und Seneszenz könnte zu Chemoresistenz beitragen. Zusammenfassend wurde gezeigt, dass *IGFBP7* in verschiedenen leukämischen Subgruppen aberrant exprimiert wird. Eine gesteigerte IGFBP7 Expression ist in T-ALL mit Therapieresistenz verbunden, was durch den Einfluss von IGFBP7 auf die leukämische Zellproliferation herbeigeführt werden könnte. IGFBP7 stellt daher eine interessante Zielstruktur dar, um die Chemosensitivität akuter Leukämien zu verbessern. Patienten mit hoher *IGFBP7* Expression könnten von einer Therapie mit IGF Inhibitoren besonders profitieren.

Publikation V

Heesch S. BAALC-associated gene expression profiles define IGFBP7 as a novel molecular target in acute leukemia. Leukemia. 2010 Aug;24(8):1429-36.

<http://dx.doi.org/10.1038/leu.2010.130>

3.2.3 Hitzeschockproteine als Zielstruktur in Leukämien

Die Expression von HSP ist in einer Vielzahl von Krebsarten, einschließlich der AML erhöht.¹⁰⁷ Eine hohe Expression von HSP90 in AML wurde mit Therapieresistenz und einer schlechten Prognose assoziiert.^{108,109} HSP90 stabilisiert unter zellulären Stressbedingungen verschiedene Onkogene, die für die Leukämieentstehung wichtig sind, wie KIT, JAK oder AKT. Die anti-leukämische Wirksamkeit verschiedener HSP90 Inhibitoren wurde in Zellkulturversuchen nachgewiesen.^{110,111} In einer Phase 1 Studie des HSP90 Inhibitors Alvespimycin wurde in 3 AML Patienten eine CR beobachtet.⁴⁷ Weitere Phase 1/2 Studien werden derzeit durchgeführt.

Nach HSP90 wurde auch HSP70, ein weiteres hoch exprimiertes HSP, als potentielle Zielstruktur bei Leukämien identifiziert. Wie HSP90 wird HSP70 durch zellulären Stress induziert und schützt die Zelle vor Apoptose, indem es Proteinkomplexe stabilisiert und die intrazelluläre Anhäufung beschädigter oder falsch gefalteter Proteine verhindert.¹¹² Eine hohe Expression von HSP70 wurde in verschiedenen Karzinomen^{113,114} und in der AML^{109,115,116} mit schlechterer Prognose assoziiert. *In vitro* und *in vivo* Experimente legen eine Funktion von HSP70 als Onkogen¹¹⁷⁻¹¹⁹ und eine Rolle in der Entwicklung von Chemoresistenz nahe.^{120,121,122} Auch in leukämischen Blasten wurde eine funktionelle Bedeutung von HSP70 für Proliferation, Zellzykluskontrolle und Apoptose,^{123,124} sowie Therapieresistenz nachgewiesen.^{125,126} Daher stellt HSP70 eine vielversprechende Zielstruktur für anti-leukämische Therapie dar. Die Synthese selektiver HSP70 Inhibitoren ist im Vergleich zu HSP90 Inhibition jedoch schwierig und nur wenige Inhibitoren wurden bisher beschrieben.¹²⁷ Leu *et al.* entdeckten das Molekül Pifithrin- μ (PFT- μ) als spezifischen Inhibitor von HSP70.¹²⁸ Wir haben in dieser Arbeit erstmalig die *in vitro* anti-leukämische Aktivität von PFT- μ nachgewiesen.

3.2.3.1 Antileukämische Aktivität des Hitzeschockprotein 70 Inhibitors Pifithrin- μ in AML

Kaiser M*, Kühnl A*, Reins J, Fischer S, Ortiz-Tanchez J, Schlee C, Mochmann LH, Heesch S, Benlasfer O, Hofmann WK, Thiel E, Baldus CD. Antileukemic activity of the HSP70 inhibitor pifithrin- μ in acute leukemia. *Blood Cancer J.* 2011 Jul;1(7):e28. doi: 10.1038/bcj.2011.28

*gleichwertige Kontribution

In dieser Arbeit wurde die *in vitro* Aktivität des HSP70 Inhibitors PFT- μ in ALL und AML Zelllinien, sowie in 12 primären AML Patientenproben getestet. Hierfür wurden die humanen Zelllinien KG-1a (AML), NALM-6 (B-Vorläufer ALL), TOM-1 (*BCR-ABL*-positive B-Vorläufer ALL), Jurkat und BE-13 (T-ALL), sowie K562 (Blastenkrise einer chronischen myeloischen Leukämie) verwendet. Zusätzlich wurde eine Cytarabin-resistente K562 Linie getestet. Es konnte gezeigt werden, dass PFT- μ die Zellviabilität im WST1 Assay in sämtlichen Zelllinien, einschließlich der Cytarabin-resistenten Zelllinie, im mikromolaren Bereich hemmt (IC50 Werte von 2.5 bis 12.7 μ M). Auch alle getesteten AML Patientenzellen wurden im Wachstum gehemmt, wobei der hierfür benötigte mediane IC50 Wert von 8.9 μ M vergleichbar mit dem der Zelllinien war. Um die Toxizität von PFT- μ in normalen Zellen zu überprüfen, wurden Knochenmark-Stromazellen von 4 AML Patienten, sowie mononukleäre Zellen (n=6) und CD34-selektierte Zellen (n=5) aus dem peripheren Blut gesunder Probanden untersucht. In einer Stromazell-Probe wurde der IC50 mit 100 μ M PFT- μ nicht erreicht. Die verbliebenen 3 Proben wiesen einen medianen IC50 Wert von 37.7 μ M (36.3-44.1) auf. Der mediane IC50 Wert gesunder mononukleärer Zellen lag bei 17.6 μ M (10.4-42.3), der von CD34+ Zellen bei 15.1 μ M (8.0-20.0). Diese Ergebnisse zeigen eine im Vergleich mit leukämischen Blasten höhere Resistenz normaler hämatopoetischer Zellen und Stromazellen gegenüber PFT- μ . Die Hemmung der Zellviabilität durch PFT- μ war von einer dosis-abhängigen erhöhten Apoptoserate und Zellzyklusarrest begleitet. In NALM-6 Zellen wurden außerdem intrazelluläre Proteine mittels Durchflusszytometrie gemessen und beobachtet, dass PFT- μ die Konzentrationen von AKT und ERK1/2 reduziert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass PFT- μ den zytotoxischen Effekt von Cytarabin, Sorafenib, 17-AAG und SAHA verstärkt. Der synergistische Effekt mit dem HSP90 Inhibitor 17-AAG und dem HDAC Inhibitor SAHA war dabei besonders ausgeprägt. Wir konnten zeigen, dass 17-AAG und SAHA zu einer Hochregulation von HSP70 führen, was die Synergie mit PFT- μ erklären könnte. Zusammenfassend haben wir erstmalig den anti-leukämischen Effekt des HSP70 Inhibitors PFT- μ demonstriert, sowohl als Monosubstanz als auch in Kombination mit anderen Substanzen der Leukämietherapie.

Publikation VI

Kaiser & Kühnl. Antileukemic activity of the HSP70 inhibitor pifithrin- μ in acute leukemia. Blood Cancer J. 2011 Jul;1(7):e28.

<http://dx.doi.org/10.1038/bcj.2011.28>

4 DISKUSSION

Die Identifikation neuer prognostischer Marker ist von besonderer Bedeutung für Patienten mit Standardrisiko B-Vorläufer ALL, die nicht Träger der bekannten molekularen Risikofaktoren *BCR-ABL* und *MLL-AF4* sind. Eine genauere molekulare Charakterisierung und Prognoseeinschätzung dieser Patienten könnte helfen, durch frühe Therapiemodifikation die Heilungsrate dieser heterogenen Subgruppe zu verbessern.

In dieser Arbeit konnte die unabhängige prognostische Signifikanz der hohen *BAALC* und *LEF1* Expression sowohl für die Gesamtkohorte der B-Vorläufer ALL, als auch für *BCR-ABL*- und *MLL-AF4*-negative Patienten gezeigt werden. *BCR-ABL*- und *MLL-AF4*-negative Patienten im obersten Drittel der *BAALC* Messwerte zeigten eine 15-fach erhöhte Rate an primärer Therapieresistenz und ein sehr kurzes 5-Jahres OS von 38%. Diese Ergebnisse demonstrieren die linienübergreifende prognostische Bedeutung von *BAALC*, nicht nur in der myeloischen und T-Zell Leukämie, sondern auch in der B-Zell Reihe. Standardrisikopatienten mit hoher *LEF1* Expression (oberste 25% der Messwerte) zeigten ein 2,5-fach kürzeres RFS im Vergleich zu Patienten mit niedriger Expression. Der Einfluss der hohen *LEF1* Expression auf das OS war altersabhängig und besonders ausgeprägt in Standardrisikopatienten über 35 Jahren mit einem 5-Jahres OS von nur 27%.

Die Ergebnisse legen nahe, dass die Bestimmung der *BAALC* und *LEF1* Expression bei Diagnosestellung die risikoadaptierte Therapiestratifikation in Standardrisiko- bzw. *BCR-ABL*- und *MLL-AF4*-negativer ALL verbessern könnte. Das optimale Management dieser Patienten, insbesondere die Indikation für eine allogene SCT, ist nach wie vor unklar.^{129,130} Eine mögliche Strategie ist, die Therapieintensivierung von Standardrisikopatienten am MRD Verlauf zu orientieren.^{55,56} Eine Kombination aus prospektiver MRD Bestimmung und prä-therapeutischen Risikomarkern zum Zeitpunkt der Diagnose wäre jedoch optimal, um eine sehr genaue und frühzeitige individuelle Prognoseeinschätzung zu ermöglichen. MRD Daten der in dieser Arbeit untersuchten ALL Patienten lagen zum Zeitpunkt der Analysen noch nicht vor. Die prognostische Bedeutung der *BAALC* und *LEF1* Expression wurde daher nur mit etablierten diagnostischen Prognosefaktoren verglichen. In künftigen Arbeiten sollte untersucht werden, wie sich die neuen Marker *BAALC* und *LEF1* in die MRD-gestützte Therapiestratifizierung integrieren lassen.

Ein primäres Therapieversagen oder sehr frühe Krankheitsrezidive deuten auf primäre Chemoresistenz der Leukämie hin. Die Optimierung der Induktionstherapie zur besseren Eradikation chemoresistenter Klone stellt eine große Herausforderung dar. Für eine

Intensivierung myelosuppressiver Substanzen besteht wenig Spielraum, da dies die Therapie-assoziierte Mortalität erhöhen und die Tolerabilität nachfolgender Therapien deutlich einschränken würde. Ein vielversprechender Ansatz, Therapieresistenzen zu vermeiden, liegt in der Hinzunahme zielgerichteter Substanzen zur Standard-Chemotherapie. Die Bestimmung von Resistenzmarkern wie *BAALC* könnte helfen, Patienten früh zu identifizieren, die von einer intensiveren Induktionstherapie oder der Hinzunahme neuer Substanzen profitieren könnten.

Die Genexpressionsanalyse in Patienten mit hoher *BAALC* Expression zeigte eine differenzielle Überexpression von *LYN* und *TSPAN7*, Gene, die mit Therapieresistenz in myeloischen Leukämien in Zusammenhang gebracht wurden.^{131,132} Die *BAALC*-assoziierte Chemoresistenz in B-Vorläufer ALL könnte über die aberrante Expression dieser Gene vermittelt werden. Aktivierung der *LYN* Kinase scheint eine wichtige Rolle für die Proliferation leukämischer Blasten zu spielen¹³³ und wurde als bedeutender Signalweg in AML mit *FLT3*-ITD identifiziert.^{134,135} *LYN* ist durch Src Kinaseinhibitoren pharmakologisch hemmbar und stellt daher eine interessante Zielstruktur für Leukämiepatienten mit hoher *BAALC* Expression dar.¹³⁶ Unter den differenziell herunterregulierten Genen in ALL mit hoher *BAALC* Expression waren *RGS2*, welches auch in *FLT3*-ITD AML supprimiert ist,¹³⁷ sowie das Zell-Zyklus-Regulator- und Tumorsuppressor-Gen *CDKN1C/p57^{Kip2}*. *CDKN1C/p57^{Kip2}* ist in ALL aberrant methyliert und die Inaktivierung des Gens ist mit einer schlechten Prognose in *BCR-ABL*-negativer ALL assoziiert.¹³⁸ Die *BAALC*-assoziierte Genexpression deutet somit auf einen hoch proliferativen und resistenten ALL Subtypen der B-Vorläufer ALL hin, welcher Ähnlichkeiten mit anderen aggressiven Leukämie-Subtypen wie der *FLT3*-ITD AML aufweist.

Patienten mit hoher *LEF1* Expression zeigten keine erhöhte Rate an primär refraktären Erkrankungen, jedoch eine hohe Rate an Frührezidiven. Da der Wnt Signalweg für die Selbsterneuerungskapazität leukämischer Stammzellen wichtig ist,^{71,139,140} könnte das frühe Auftreten von Krankheitsrezidiven in Patienten mit hoher *LEF1* Expression einen Überlebensvorteil leukämischer Stammzellen durch *LEF1* widerspiegeln. Die Inhibition des *LEF1*/β-Catenin Komplexes durch neue Therapien könnte somit das Überleben residueller leukämischer Stammzellen im Knochenmark unterbinden.^{141,142}

Die Höhe der *LEF1* Expression war invers assoziiert mit der Expression myeloischer Marker auf leukämischen Blasten. Dies unterstreicht die Tatsache, dass *LEF1* vor allem in der Biologie lymphatischer Zellen eine wichtige Rolle spielt. In pro-B Zellen stimuliert das Protein die Proliferation und den Wiedereintritt in den Zellzyklus.^{143,144} Die *LEF1* Expression zeigte keine Assoziation mit molekulargenetischen Subgruppen der ALL und scheint somit weder

von *BCR-ABL* noch von *MLL-AF4* aktiviert zu werden. Eine Induktion von LEF1 durch *AML1-ETO* und *FLT3-ITD* wurde in AML beobachtet.^{65,145}

Da inaktivierende *LEF1* Mutationen in pädiatrischer T-ALL beschrieben wurden,⁷⁶ untersuchten wir die 2 Hotspot-Regionen in Exon 2 und 3 des *LEF1* Gens in 40 Patienten mit B-Vorläufer ALL. In 2 Patienten wurde ein missense SNP (rs61752607) gefunden, welcher auch in 1 von 44 T-ALL Patienten detektiert worden war.⁷⁶ Die klinische Relevanz dieses SNPs bleibt aufgrund der geringen Patientenzahlen unklar. Andere SNPs oder Mutationen wurden nicht gefunden. Die Häufigkeit von *LEF1* Mutationen in der Studie von Gutierrez *et al.* lag bei 7% (3/44). Durch Array CGH konnten in weiteren 11% der Fälle fokale Mikrodeletionen der kodierenden Sequenz von *LEF1* nachgewiesen werden.⁷⁶ In pädiatrischer B-Vorläufer ALL wurden *LEF1* Mikrodeletionen hingegen nur in 1,6% der Fälle detektiert.¹⁴⁶ Die Ergebnisse unserer Arbeit unterstreichen, dass genomische Läsionen von *LEF1* bei B-Vorläufer ALL im Gegensatz zur T-ALL eine untergeordnete Rolle spielen.

Einen weiteren Schwerpunkt der Arbeit stellte die Identifikation molekularer Prognosefaktoren und Zielstrukturen für spezifische Therapien in AML dar. Die Entwicklung neuer zielgerichteter Substanzen und die Identifikation von Patientengruppen, die für spezifische Therapien in Frage kommen, könnten dazu beitragen, die schlechte Langzeitprognose von AML Patienten zu verbessern.

In dieser Arbeit wurde das 5q31 Gen *CXXC5* als neuer Prognosemarker und potentiell Tumorsuppressor-Gen charakterisiert. Wir haben gezeigt, dass *CXXC5* im Rahmen von Promotormethylierung, *GATA2* Mutationen, sowie chromosomalen Veränderungen wie t(8;21), *MLL* Rearrangements und del(5q) supprimiert wird. Die Herunterregulation von *CXXC5* könnte über eine Entthemmung des Wnt Signalweges zur Leukämieentstehung beitragen. Patienten mit niedriger *CXXC5* Expression könnten daher von Wnt-gerichteten Therapien profitieren. Interessanterweise gibt es Hinweise, dass Wnt Inhibition besonders effektiv in leukämischen Zellen mit del(5q) ist.¹⁴⁷ Darüber hinaus stellt *CXXC5* selbst ein vielversprechendes Zielmolekül für neue Therapien dar.

Der inhibitorische Effekt von *CXXC5* auf den Wnt Signalweg in Leukämiezellen wurde in dieser Arbeit erstmalig nachgewiesen. Im Gegensatz zu vorherigen Arbeiten in Normalgewebe wurden jedoch keine Hinweise auf eine Interaktion von *CXXC5* mit Dishevelled Proteinen (DSV) als Mechanismus der Wnt Inhibition gefunden.^{86,87} Allerdings zeigte die Studie von Kim *et al.*, dass nicht die Interaktion mit DSV, sondern die *CXXC* Domäne des Proteins maßgeblich für die *CXXC5*-vermittelte Wnt Inhibition ist.⁸⁶ Die

genaue Interaktion von CXXC5 mit dem Wnt Signalweg in Leukämiezellen sollte in künftigen Arbeiten untersucht werden. In einer Genexpressionsanalyse Wnt-stimulierter Leukämie-Zelllinien konnten wir zeigen, dass die Wnt Inhibitoren *HBP1* und *AXIN1* durch die Höhe der CXXC5 Expression moduliert werden und somit den inhibierenden Effekt auf den Wnt Signalweg vermitteln könnten.

Es bleibt außerdem unklar, warum eine niedrige CXXC5 Expression mit aktivierender Funktion auf den Wnt Signalweg mit einer besseren Prognose in AML vergesellschaftet ist. In kleinen, heterogenen AML Patientenkohorten war eine hohe β -Catenin Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert worden.¹⁴⁸ In unserer Arbeit zeigten Patienten mit niedriger CXXC5 Expression ein signifikant längeres EFS und OS, unabhängig von bekannten genetischen und klinischen Risikofaktoren. Dies bestätigt Ergebnisse von Astori *et al.*, die Hinweise für eine günstige Prognose der niedrigen CXXC5 Expression bei der univariaten Analyse zweier AML Datensätze fanden.¹⁴⁹ Für die bessere Prognose von Patienten mit niedriger CXXC5 Expression könnten Wnt-unabhängige Funktionen von CXXC5, wie die kürzlich beschriebene gesteigerte Chemosensitivität verantwortlich sein.^{149,150}

CXXC5 Mutationen als möglicher Mechanismus der Geninaktivierung wurden in dieser Arbeit nicht nachgewiesen. Dies bestätigt Ergebnisse vorangegangener Arbeiten.¹⁵¹ In der Studie von Murati *et al.* wurde eine CXXC5 Mikrodeletion in einem einzelnen Patienten mit NK-AML gefunden.¹⁵² Außerdem ist CXXC5 im Rahmen der del(5q) in den meisten Fällen deletiert. Insgesamt scheinen somatische Mutationen oder Deletionen von CXXC5 jedoch selten zu sein und können die breite Varianz der CXXC5 Expression in AML nicht erklären. Transkriptionelle Aktivierung durch Faktoren wie GATA2 und WT1, sowie epigenetische Mechanismen scheinen eine größere Bedeutung für die Regulation der CXXC5 Expression zu besitzen. Interessanterweise konnten wir eine Suppression von CXXC5 durch Promotormethylierung nur in einem umschriebenen Bereich des sogenannten CpG Shores feststellen, nicht jedoch in anderen Regionen des Promotors. Dies könnte erklären, warum in der Arbeit von Treppendahl *et al.*, welche eine einzige Region knapp 20kB upstream im CXXC5 Promotor untersuchte, keine Hypermethylierung gefunden wurde.¹⁵¹ Die genauen Mechanismen der Regulation von CXXC5, sowie dessen Rolle in der normalen und leukämischen Zellbiologie sollte in künftigen Studien untersucht werden. Entgegen der bisherigen Annahme, dass CXXC5 nur an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist, deuten neuere Arbeiten darauf hin, dass CXXC5 DNA bindet und sowohl als transkriptioneller Aktivator als auch als Repressor fungieren kann.¹⁵³ Zusätzlich wurde kürzlich gezeigt, dass das paraloge Protein CXXC4 unmethylierte, CpG-reiche DNA bindet und mit TET2

interagiert.⁸⁴ Eine ähnliche Funktion wurde auch für *CXXC5* postuliert. *TET2* und andere epigenetische Regulatorgene sind in AML häufig mutiert, v.a. in NK-AML. Eine Assoziation von *TET2* Mutationen mit dem Methylierungsstatus des *CXXC5* Promotors oder der Höhe der *CXXC5* Expression wurde in dieser Arbeit nicht gefunden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem erstmalig die prognostische Relevanz der IGF-regulierenden Gene *IGFBP2* und *IGFBP7* in akuten Leukämien des Erwachsenen nachgewiesen. Die Expression von *IGFBP2* und *IGFBP7* war in AML im Vergleich zu Normalpersonen hochreguliert. Die Höhe der *IGFBP7* Expression korrelierte linienübergreifend mit der Expression von *BAALC* und könnte an der *BAALC*-vermittelten Chemoresistenz beteiligt sein. Die Expression von *IGFBP2* war in AML mit Chemoresistenz und einer niedrigeren CR Rate assoziiert. *IGFBP2* stellt eine interessante potentielle Zielstruktur für spezifische Therapien dar. Es wird angenommen, dass *IGFBP2* einen Speicher an IGF Liganden im Knochenmarkmilieu bereitstellt und so einen Wachstumsvorteil für leukämische Blasten bedingt.⁹⁸ *IGFBP2* scheint sowohl Proliferation als auch Migration der Blasten zu begünstigen.¹⁵⁴ Die genaue Rolle von *IGFBP2* in der Leukämiebiologie ist jedoch nach wie vor unklar und sollte in künftigen Studien untersucht werden.

Die aberrante Aktivierung der Wnt- und IGF Signalwege in AML sind nicht auf eine einzige Genmutation zurückzuführen, sondern vielmehr Folge verschiedener genetischer oder epigenetischer Mechanismen. Daher existieren keine prädiktiven Marker für das Ansprechen auf Wnt- oder IGF Inhibitoren und es ist unklar, welche Patientengruppen von solchen Therapien profitieren könnten. Ein besseres Verständnis der Interaktion verschiedener Leukämiesignalwege und der Faktoren, die an der aberranten Aktivierung beteiligt sind, ist daher entscheidend. Die Identifikation der Wnt- und IGF-Regulatoren *CXXC5* und *IGFBP2* als neue Prognosefaktoren in AML lässt eine Rolle dieser Gene bei der aberranten Signalwegsaktivierung vermuten. Patienten mit gesteigerter *CXXC5* bzw. *IGFBP2* Expression könnten geeignete Kandidaten für Wnt/IGF-gerichtete Therapien sein. In Rhabdomyosarkomzellen wurde gezeigt, dass rekombinantes *IGFBP2* Protein die anti-Tumor-Aktivität des IGF-Rezeptor-Antikörpers R1507 steigert.¹⁵⁵ Ob sich *CXXC5* und *IGFBP2/7* selbst als Zielstrukturen eignen, muss geprüft werden wenn Inhibitoren dieser Proteine zur Verfügung stehen.

Wir konnten in dieser Arbeit erstmalig die *in vitro* anti-leukämische Aktivität des neuen HSP70 Inhibitors PFT- μ nachweisen. PFT- μ war sowohl in verschiedenen AML Zelllinien, einschließlich einer Cytarabin-resistenten Zelllinie, als auch in T- und B-Linien ALL hoch effektiv. Zusätzlich wurde die potente anti-leukämische Aktivität in primären AML

Patientenproben gezeigt. Der mediane IC50 Wert von Knochenmark-Stromazellen war ca. 4-fach höher verglichen mit dem leukämischer Blasten, wobei in einer Stromazell-Probe eine 50%-ige Inhibition der Viabilität selbst mit 100 µM PFT-µ nicht erreicht wurde. Auch normale mononukleäre Zellen und CD34+ Zellen zeigten eine höhere Resistenz gegenüber PFT-µ. Dies lässt eine limitierte Aktivität von PFT-µ gegenüber normalen Knochenmarkzellen und damit eine akzeptable hämatologische Toxizität vermuten. Auch in der Studie von Leu *et al.* wurde eine selektive Aktivität von PFT-µ gegenüber soliden Tumorzellen gezeigt.¹²⁸

PFT-µ führte zu einem Abfall der intrazellulären Konzentration von AKT und ERK1/2 in leukämischen Zelllinien. Es ist bekannt, dass HSP70 AKT bindet und stabilisiert. In einer Arbeit an Brustkrebs-Zelllinien wurde gezeigt, dass der zytotoxische Effekt einer HSP70 Inhibition besonders ausgeprägt in Zellen mit AKT Dysregulation ist.¹⁵⁶ Die aberrante Aktivierung des PI3K/PTEN/AKT/mTOR und RAF/MEK/ERK1/2 Signalweges ist für das Überleben leukämischer Zellen bedeutend.¹⁵⁷ Eine Degradation von AKT und ERK1/2 durch PFT-µ könnte daher zum Proliferations-hemmenden und Apoptose-fördernden Effekt der Substanz beitragen. Interessanterweise waren die phosphorylierten Proteinformen p-AKT und p-ERK1/2, die vor allem durch HSP90 stabilisiert werden, durch PFT-µ nicht verändert. Die Kombination von PFT-µ mit einem HSP90 Inhibitor stellt daher eine interessante Möglichkeit dar, durch das gleichzeitige Angreifen der unphosphorylierten und phosphorylierten Kinaseformen einen synergistischen Effekt zu erzielen. Tatsächlich konnten wir im Rahmen dieser Arbeit einen synergistischen Effekt von PFT-µ in Kombination mit dem HSP90 Inhibitor 17-AAG, aber auch mit dem Multikinaseinhibitor Sorafenib und dem HDAC Inhibitor SAHA zeigen. Für Sorafenib ist als erster Tyrosinkinaseinhibitor ein Überlebensvorteil in AML nachgewiesen worden,³¹ so dass die Substanz nun in Phase 3 Studien untersucht wird. Eine Überexpression von HSP70 wurde als Resistenzmechanismus gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren beschrieben,¹²⁸ so dass eine Kombination von Sorafenib und PFT-µ besonders attraktiv erscheint. Insgesamt konnten wir im Rahmen dieser Arbeit die Eignung von HSP70 als Zielstruktur in akuten Leukämien bestätigen. Auf der Grundlage unserer Ergebnisse sollte PFT-µ in weiterführenden Studien in AML untersucht werden.

Die Identifikation molekularer Prognosefaktoren stand im Fokus dieser Arbeit. Wir konnten sowohl in der ALL als auch in der AML neue prognostische Marker identifizieren. Die neuen prognostischen Marker *BAALC1* und *LEF1* könnten zur molekularen Therapiestratifikation der B-Vorläufer ALL beitragen (s. Abbildung 5). Die Marker *CXXC5* und *IGFBP2/7* sind sowohl aus prognostischer Sicht, als auch als potentielle Zielstrukturen und prädiktive Marker in AML interessant (s. Abbildung 6).

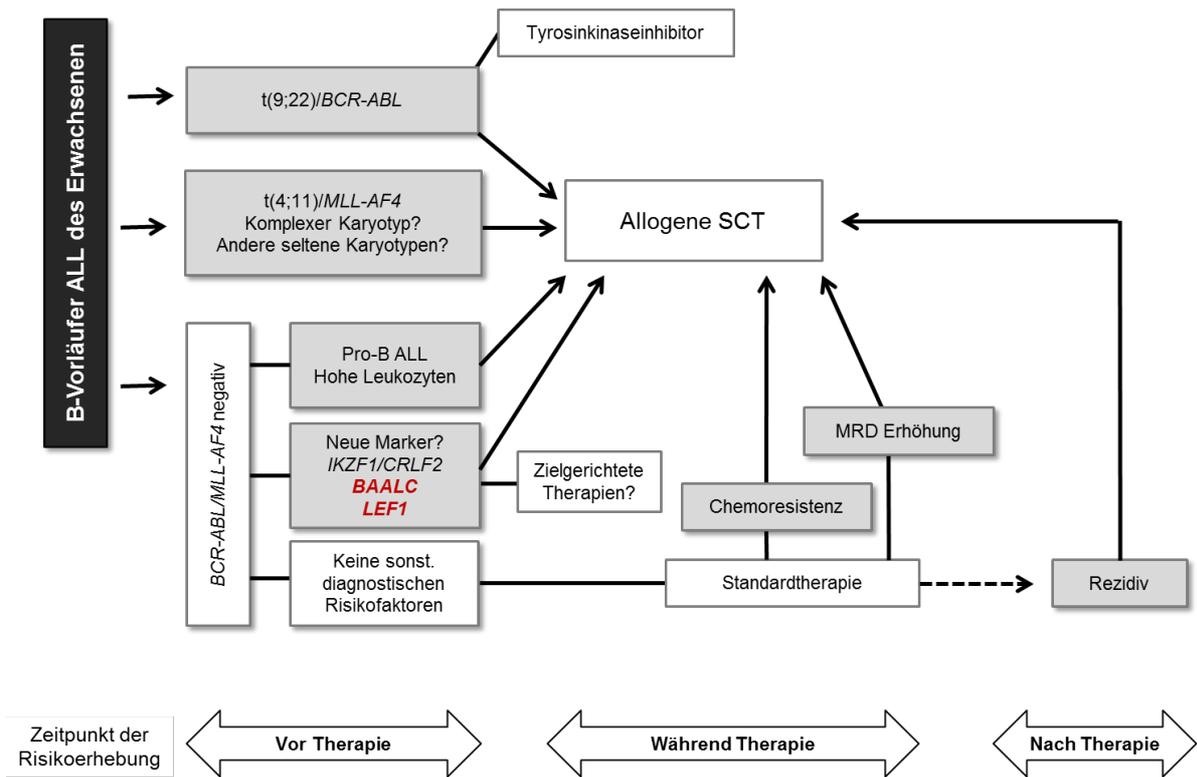


Abbildung 5: Potentielle Bedeutung der neuen prognostischen Marker *BAALC* und *LEF1* in B-Vorläufer ALL.

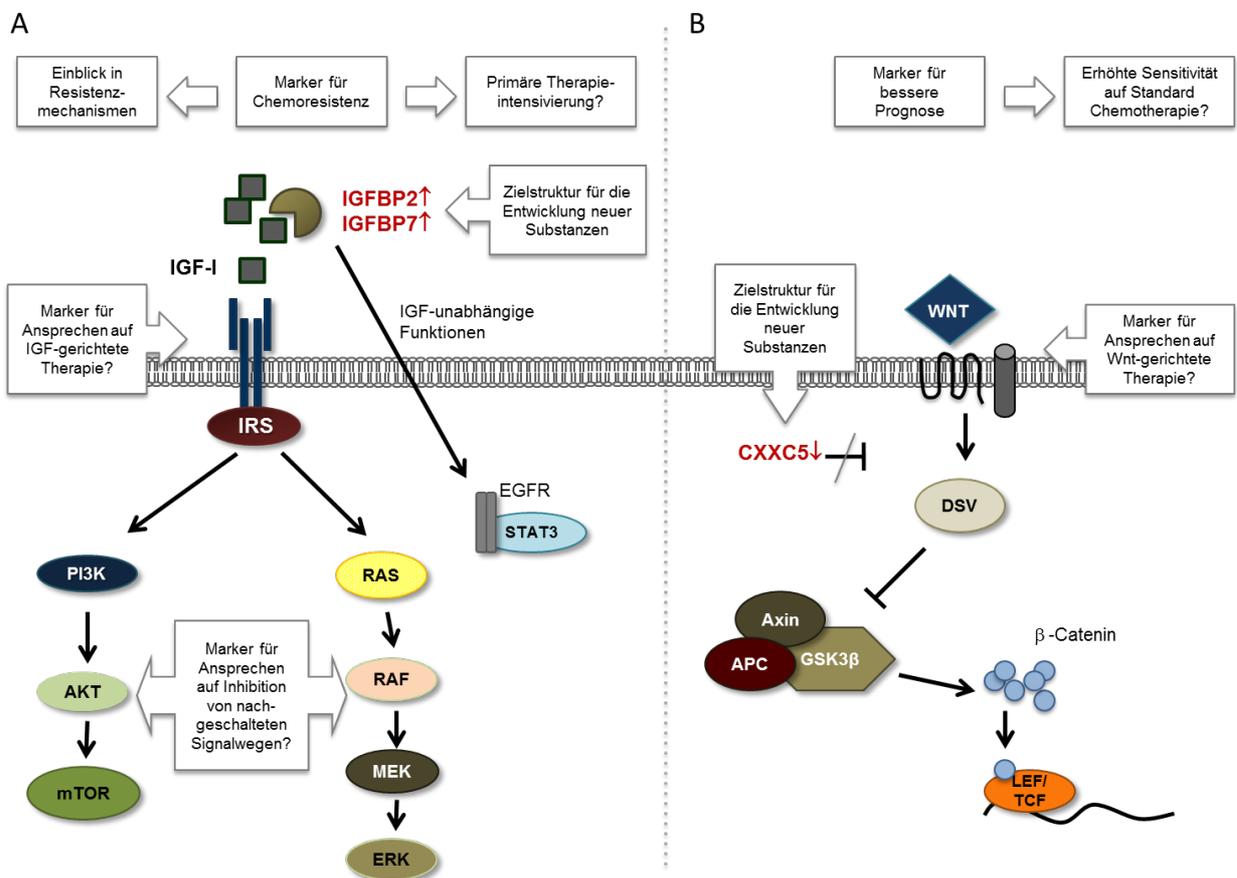


Abbildung 6: Potentielle Bedeutung der neuen prognostischen Marker *IGFBP2/7* (A) und *CXXC5* (B).

Die neuen Marker müssen im Rahmen künftiger Studien in unabhängigen Patientenkohorten validiert werden. Mit Ausnahme von *CXXC5* wurde die prognostische Signifikanz der Marker nur in jeweils einer Patientenpopulation untersucht. Darüber hinaus ist entscheidend, die prognostische Bedeutung der einzelnen Marker prospektiv zu validieren, da es sich bei den hier vorliegenden Arbeiten um retrospektive Studien handelt. Hierbei ist besonders kritisch, einen geeigneten Grenzwert für die einzelnen Expressionsmarker zu finden und zu validieren.¹⁵⁸ Erst wenn die Methode zur Bestimmung eines neuen Risikomarkers standardisiert ist, kann dieser für eine Risikostratifizierung von Patienten herangezogen werden. Aufgrund der Schwierigkeit, einen spezifischen Grenzwert für prognostische Expressionsmarker zu definieren, sind standardisierte Assays bisher nur für einzelne Marker wie *WT1*, *BAALC* und *EVI1* etabliert.^{158,159} Der Einsatz solcher Assays ist momentan auf klinische Studien beschränkt. Für eine breite Anwendung in der diagnostischen Praxis scheinen spezifischere, leichter zu standardisierende Marker wie Punktmutationen, geeigneter zu sein.

In Anbetracht der steigenden Zahl neuer molekularer Marker wird es außerdem wichtig sein, in künftigen Studien die unabhängige Signifikanz der verschiedenen Marker gegeneinander zu untersuchen. Durch Integration verschiedener Risikomarker (somatische Mutationen, deregulierte Genexpression, epigenetische Veränderungen) mit Hilfe bioinformatischer Methoden können pathobiologische Subgruppen und übergeordnete Signalwege identifiziert werden, um ein robustes molekulares Risikomodell für akute Leukämien zu erstellen.

In Bezug auf zielgerichtete Therapien bleibt abzuwarten, ob die hier identifizierten Marker prädiktiv für das Ansprechen auf spezifische Therapien sein werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der risikoadaptierten Therapiestrategie bei akuten Leukämien ist, Patienten die eine primäre Therapieintensivierung benötigen, früh zu identifizieren und gleichzeitig eine primäre allogene SCT in Patienten mit niedrigem Risiko zu vermeiden. *BCR-ABL* und *MLL-AF4* stellen wichtige molekulare Risikofaktoren in B-Vorläufer ALL dar, welche die Notwendigkeit einer frühen Therapieintensivierung anzeigen. Darüber hinaus existieren bisher keine verlässlichen diagnostischen molekularen Marker in B-Vorläufer ALL, die für eine Therapiestratifizierung herangezogen werden können.

- Die hohe Expression der Gene *BAALC* und *LEF1* stellen neue ungünstige Prognosefaktoren für die B-Vorläufer ALL dar. Die Bestimmung der *BAALC* und *LEF1* Expression könnte helfen, *BCR-ABL*- und *MLL-AF4* negative Patienten zu identifizieren, die von einer frühen Therapieintensivierung profitieren.

Die Langzeitprognose der AML ist besonders für ältere Patienten sehr schlecht und der Ausbau zielgerichteter Therapiekonzepte zur Verbesserung der Krankheitskontrolle entscheidend. Die Identifikation prognostisch und funktionell relevanter Gene/Signalwege bildet die Grundlage für die Entwicklung neuer Substanzen und für die Charakterisierung prädiktiver Marker für spezifische Therapien.

- Das 5q31 Gen *CXXC5* stellt einen potentiellen Tumorsuppressor in AML dar, der in verschiedenen AML Subgruppen herunterreguliert ist. *CXXC5* inhibiert den Wnt Signalweg in AML und interagiert mit der p53-vermittelten Zellreaktion auf DNA Schädigung.
- *CXXC5* stellt eine vielversprechende neue Zielstruktur für spezifische Therapien dar. Gleichzeitig könnte eine niedrige *CXXC5* Expression Patienten identifizieren, die für eine Therapie mit Wnt Inhibitoren geeignet sind.
- Die niedrige *CXXC5* Expression ist mit einer günstigen Prognose in AML assoziiert, unabhängig von anderen zytogenetischen und molekularen Risikofaktoren.
- *IGFBP2* wird in AML aberrant exprimiert und stellt einen unabhängigen Marker für Therapieresistenz dar.
- *IGFBP7* wird in AML überexprimiert und ist linienübergreifend mit der Expression von *BAALC* assoziiert. *IGFBP7* könnte an der *BAALC*-vermittelten Chemoresistenz in akuten Leukämien beteiligt sein.
- Der HSP70 Inhibitor PFT- μ zeigt hohe anti-leukämische Aktivität in AML und synergistische Effekte in Kombination mit HDAC-, HSP90- und Multikinaseinhibition.

Diese Ergebnisse bestätigen die Eignung von HSP70 als Zielmolekül in AML und legen eine Weiterentwicklung von PFT- μ für die Therapie der AML nahe.

Die Identifikation neuer effektiver anti-leukämischer Therapien und eine möglichst genaue Risikoeinschätzung und Subgruppencharakterisierung der Patienten ist ein wichtiger Schritt zur individualisierten Leukämie-Therapie und hat Potential, die nach wie vor schlechte Prognose erwachsener Patienten mit ALL und AML zu verbessern.

6 LITERATUR

1. Deschler B, Lubbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*. 2006;107(9):2099-2107. Prepublished on 2006/10/05 as DOI 10.1002/cncr.22233.
2. Dores GM, Devesa SS, Curtis RE, Linet MS, Morton LM. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. *Blood*. 2012;119(1):34-43. Prepublished on 2011/11/17 as DOI 10.1182/blood-2011-04-347872.
3. Swerdlow S.H. CE, Harris N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition. 2008;Lyon: IARC.
4. Gökbuget N, Hoelzer D. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*. 2009;46(1):64-75.
5. Burnett A, Wetzler M, Lowenberg B. Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2011;29(5):487-494. Prepublished on 2011/01/12 as DOI 10.1200/JCO.2010.30.1820.
6. Burnett AK, Milligan D, Goldstone A, et al. The impact of dose escalation and resistance modulation in older patients with acute myeloid leukaemia and high risk myelodysplastic syndrome: the results of the LRF AML14 trial. *Br J Haematol*. 2009;145(3):318-332. Prepublished on 2009/03/18 as DOI 10.1111/j.1365-2141.2009.07604.x.
7. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002;100(5):1532-1542. Prepublished on 2002/08/15 as DOI 10.1182/blood-2002-02-0492.
8. Grove CS, Vassiliou GS. Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer? *Dis Model Mech*. 2014;7(8):941-951. Prepublished on 2014/07/25 as DOI 10.1242/dmm.015974.
9. Armstrong SA, Look AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2005;23(26):6306-6315. Prepublished on 2005/09/13 as DOI 10.1200/JCO.2005.05.047.
10. Moorman AV, Harrison CJ, Buck GA, et al. Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood*. 2007;109(8):3189-3197.
11. Burmeister T, Schwartz S, Bartram CR, Gokbuget N, Hoelzer D, Thiel E. Patients' age and BCR-ABL frequency in adult B-precursor ALL: a retrospective analysis from the GMALL study group. *Blood*. 2008;112(3):918-919.
12. Rowe JM. Prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2010;150(4):389-405. Prepublished on 2010/06/25 as DOI 10.1111/j.1365-2141.2010.08246.x.
13. Iacobucci I, Storlazzi CT, Cilloni D, et al. Identification and molecular characterization of recurrent genomic deletions on 7p12 in the IKZF1 gene in a large cohort of BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia patients: on behalf of Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto Acute Leukemia Working Party (GIMEMA AL WP). *Blood*. 2009;114(10):2159-2167.

14. Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, et al. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature*. 2008;453(7191):110-114.
15. Martinelli G, Iacobucci I, Storlazzi CT, et al. IKZF1 (Ikaros) deletions in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia are associated with short disease-free survival and high rate of cumulative incidence of relapse: a GIMEMA AL WP report. *J Clin Oncol*. 2009;27(31):5202-5207.
16. Mullighan CG, Su X, Zhang J, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2009;360(5):470-480.
17. Harvey RC, Mullighan CG, Chen IM, et al. Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010;115(26):5312-5321. Prepublished on 2010/02/09 as DOI 10.1182/blood-2009-09-245944.
18. Moorman AV, Schwab C, Ensor HM, et al. IGH@ translocations, CRLF2 deregulation, and microdeletions in adolescents and adults with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2012;30(25):3100-3108. Prepublished on 2012/08/02 as DOI 10.1200/JCO.2011.40.3907.
19. Mullighan CG, Collins-Underwood JR, Phillips LA, et al. Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2009;41(11):1243-1246. Prepublished on 2009/10/20 as DOI 10.1038/ng.469.
20. Maude SL, Tasian SK, Vincent T, et al. Targeting JAK1/2 and mTOR in murine xenograft models of Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2012;120(17):3510-3518. Prepublished on 2012/09/08 as DOI 10.1182/blood-2012-03-415448.
21. Iacobucci I, Ferrari A, Lonetti A, et al. CDKN2A/B alterations impair prognosis in adult BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia patients. *Clin Cancer Res*. 2011;17(23):7413-7423. Prepublished on 2011/12/03 as DOI 10.1158/1078-0432.CCR-11-1227.
22. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010;116(3):354-365.
23. Smith ML, Hills RK, Grimwade D. Independent prognostic variables in acute myeloid leukaemia. *Blood Rev*. 2011;25(1):39-51. Prepublished on 2010/11/17 as DOI 10.1016/j.blre.2010.10.002.
24. Paschka P, Dohner K. Core-binding factor acute myeloid leukemia: can we improve on HiDAC consolidation? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:209-219. Prepublished on 2013/12/10 as DOI 10.1182/asheducation-2013.1.209.
25. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood*. 2000;96(13):4075-4083. Prepublished on 2000/12/09 as DOI.
26. Grimwade D, Mrozek K. Diagnostic and prognostic value of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2011;25(6):1135-1161, vii. Prepublished on 2011/11/19 as DOI 10.1016/j.hoc.2011.09.018.

27. Kuhn A, Grimwade D. Molecular markers in acute myeloid leukaemia. *Int J Hematol.* 2012;96(2):153-163. Prepublished on 2012/07/14 as DOI 10.1007/s12185-012-1123-9.
28. Schlenk RF, Dohner K, Krauter J, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2008;358(18):1909-1918. Prepublished on 2008/05/03 as DOI 10.1056/NEJMoa074306.
29. Dohner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2010;115(3):453-474.
30. Serve H, Krug U, Wagner R, et al. Sorafenib in combination with intensive chemotherapy in elderly patients with acute myeloid leukemia: results from a randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol.* 2013;31(25):3110-3118. Prepublished on 2013/07/31 as DOI 10.1200/JCO.2012.46.4990.
31. Röllig C, Müller-Tidow C, Hüttmann A. Sorafenib Versus Placebo in Addition to Standard Therapy in Younger Patients with Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia: Results from 267 Patients Treated in the Randomized Placebo-Controlled SAL-Soramf Trial [abstract]. *Blood.* 2014;124(21):Abstract 6.
32. Stone RM, Dohner H, Ehninger G. CALGB 10603 (RATIFY): A randomized phase III study of induction (daunorubicin/cytarabine) and consolidation (high-dose cytarabine) chemotherapy combined with midostaurin or placebo in treatment-naive patients with FLT3 mutated AML [abstract]. *JCO.* 2011;29:TPS199.
33. Levis M, Perl A, Dombret H. Final Results of a Phase 2 Open-Label, Monotherapy Efficacy and Safety Study of Quizartinib (AC220) in Patients with FLT3-ITD Positive or Negative Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia After Second-Line Chemotherapy or Hematopoietic Stem Cell Transplantation [abstract]. *Blood.* 2012;120(21):Abstract 673.
34. Attar EC, Johnson JL, Amrein PC, et al. Bortezomib added to daunorubicin and cytarabine during induction therapy and to intermediate-dose cytarabine for consolidation in patients with previously untreated acute myeloid leukemia age 60 to 75 years: CALGB (Alliance) study 10502. *J Clin Oncol.* 2013;31(7):923-929. Prepublished on 2012/11/07 as DOI 10.1200/JCO.2012.45.2177.
35. Fredly H, Ersvaer E, Kittang AO, Tsykunova G, Gjertsen BT, Bruserud O. The combination of valproic acid, all-trans retinoic acid and low-dose cytarabine as disease-stabilizing treatment in acute myeloid leukemia. *Clin Epigenetics.* 2013;5(1):13. Prepublished on 2013/08/07 as DOI 10.1186/1868-7083-5-13.
36. Garcia-Manero G, Tambaro FP, Bekele NB, et al. Phase II trial of vorinostat with idarubicin and cytarabine for patients with newly diagnosed acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol.* 2012;30(18):2204-2210. Prepublished on 2012/05/16 as DOI 10.1200/JCO.2011.38.3265.
37. Lancet JE, Gojo I, Gotlib J, et al. A phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in poor-risk and elderly patients with previously untreated acute myelogenous leukemia. *Blood.* 2007;109(4):1387-1394. Prepublished on 2006/11/04 as DOI 10.1182/blood-2006-04-014357.
38. Brandwein JM, Leber BF, Howson-Jan K, et al. A phase I study of tipifarnib combined with conventional induction and consolidation therapy for previously untreated patients with acute myeloid leukemia aged 60 years and over. *Leukemia.* 2009;23(4):631-634. Prepublished on 2008/12/19 as DOI 10.1038/leu.2008.341.

39. Jabbour E, Kantarjian H, Ravandi F, et al. A phase 1-2 study of a farnesyltransferase inhibitor, tipifarnib, combined with idarubicin and cytarabine for patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome. *Cancer*. 2011;117(6):1236-1244. Prepublished on 2010/10/21 as DOI 10.1002/cncr.25575.
40. Foran J, Ravandi F, Wierda W, et al. A phase I and pharmacodynamic study of AT9283, a small-molecule inhibitor of aurora kinases in patients with relapsed/refractory leukemia or myelofibrosis. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2014;14(3):223-230. Prepublished on 2013/12/21 as DOI 10.1016/j.clml.2013.11.001.
41. Lowenberg B, Muus P, Ossenkoppele G, et al. Phase 1/2 study to assess the safety, efficacy, and pharmacokinetics of barasertib (AZD1152) in patients with advanced acute myeloid leukemia. *Blood*. 2011;118(23):6030-6036. Prepublished on 2011/10/07 as DOI 10.1182/blood-2011-07-366930.
42. Kantarjian HM, Martinelli G, Jabbour EJ, et al. Stage I of a phase 2 study assessing the efficacy, safety, and tolerability of barasertib (AZD1152) versus low-dose cytosine arabinoside in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2013;119(14):2611-2619. Prepublished on 2013/04/23 as DOI 10.1002/cncr.28113.
43. Andreeff M, Kelly K, Yee K. Results of the Phase 1 Trial of RG7112, a Small-Molecule MDM2 Antagonist, in Acute Leukemia [abstract]. *Blood*. 2012;120(21):Abstract 675.
44. Yee K, Martinelli G, Assouline S. Phase 1b Study Of The MDM2 Antagonist RG7112 In Combination With 2 Doses/Schedules Of Cytarabine [abstract]. *Blood*. 2013;122(21):Abstract 498.
45. Uy GL, Rettig MP, Motabi IH, et al. A phase 1/2 study of chemosensitization with the CXCR4 antagonist plerixafor in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012;119(17):3917-3924. Prepublished on 2012/02/07 as DOI 10.1182/blood-2011-10-383406.
46. Walker AR, Klisovic R, Johnston JS, et al. Pharmacokinetics and dose escalation of the heat shock protein inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in combination with bortezomib in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(9):1996-2002. Prepublished on 2012/12/22 as DOI 10.3109/10428194.2012.760733.
47. Lancet JE, Gojo I, Burton M, et al. Phase I study of the heat shock protein 90 inhibitor alvespimycin (KOS-1022, 17-DMAG) administered intravenously twice weekly to patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010;24(4):699-705.
48. Stein E, Tallman M, Pollyea D. Clinical safety and activity in a phase I trial of AG-221, a first in class, potent inhibitor of the IDH2-mutant protein, in patients with IDH2 mutant positive advanced hematologic malignancies. *AACR annual meeting*. 2014:Abstract CT103.
49. Rettig MP, Holt M, Prior J, et al. Inhibition Of Nuclear Transport Modulator Xpo1/CRM1 For The Treatment Of Acute Myeloid Leukemia (AML) [abstract]. *Blood*. 2013;122(21):Abstract 237.
50. Fiskus W, Baluscu R, Peth K. Co-treatment with NPM1 antagonist and FLT3 inhibitor or pan-histone deacetylase inhibitor exerts superior efficacy against cultured and primary human AML cells co-expressing mutant NPM1 and FLT3-ITD *AACR 104th annual meeting*. 2013:Abstract 2034.
51. Rowe JM, Buck G, Burnett AK, et al. Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood*. 2005;106(12):3760-3767.

52. Thomas DA, Faderl S, Cortes J, et al. Treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia with hyper-CVAD and imatinib mesylate. *Blood*. 2004;103(12):4396-4407. Prepublished on 2003/10/11 as DOI 10.1182/blood-2003-08-2958.
53. de Labarthe A, Rousselot P, Huguet-Rigal F, et al. Imatinib combined with induction or consolidation chemotherapy in patients with de novo Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: results of the GRAAPH-2003 study. *Blood*. 2007;109(4):1408-1413.
54. Fielding AK, Rowe JM, Buck G, et al. UKALLXII/ECOG2993: addition of imatinib to a standard treatment regimen enhances long-term outcomes in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014;123(6):843-850. Prepublished on 2013/11/28 as DOI 10.1182/blood-2013-09-529008.
55. Brüggemann M, Raff T, Flohr T, et al. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2006;107(3):1116-1123.
56. Raff T, Gökbüget N, Lüschen S, et al. Molecular relapse in adult standard-risk ALL patients detected by prospective MRD monitoring during and after maintenance treatment: data from the GMALL 06/99 and 07/03 trials. *Blood*. 2007;109(3):910-915.
57. Tanner SM, Austin JL, Leone G, et al. BAALC, the human member of a novel mammalian neuroectoderm gene lineage, is implicated in hematopoiesis and acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(24):13901-13906.
58. Baldus CD, Tanner SM, Kusewitt DF, et al. BAALC, a novel marker of human hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*. 2003;31(11):1051-1056.
59. Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS, et al. BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood*. 2003;102(5):1613-1618.
60. Baldus CD, Martus P, Burmeister T, et al. Low ERG and BAALC expression identifies a new subgroup of adult acute T-lymphoblastic leukemia with a highly favorable outcome. *J Clin Oncol*. 2007;25(24):3739-3745.
61. Heuser M, Berg T, Kuchenbauer F, et al. Functional role of BAALC in leukemogenesis. *Leukemia*. 2012;26(3):532-536. Prepublished on 2011/08/27 as DOI 10.1038/leu.2011.228.
62. Langer C, Radmacher MD, Ruppert AS, et al. High BAALC expression associates with other molecular prognostic markers, poor outcome, and a distinct gene-expression signature in cytogenetically normal patients younger than 60 years with acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B (CALGB) study. *Blood*. 2008;111(11):5371-5379.
63. Haferlach T, Kohlmann A, Wiczorek L, et al. Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia: report from the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*. 2010;28(15):2529-2537. Prepublished on 2010/04/22 as DOI 10.1200/JCO.2009.23.4732.
64. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006;127(3):469-480.
65. Müller-Tidow C, Steffen B, Cauvet T, et al. Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells. *Mol Cell Biol*. 2004;24(7):2890-2904.

66. Khan NI, Bradstock KF, Bendall LJ. Activation of Wnt/beta-catenin pathway mediates growth and survival in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2007;138(3):338-348.
67. Lu D, Zhao Y, Tawatao R, et al. Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(9):3118-3123.
68. Van Den Berg DJ, Sharma AK, Bruno E, Hoffman R. Role of members of the Wnt gene family in human hematopoiesis. *Blood*. 1998;92(9):3189-3202.
69. Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med*. 2004;351(7):657-667.
70. Simon M, Grandage VL, Linch DC, Khwaja A. Constitutive activation of the Wnt/beta-catenin signalling pathway in acute myeloid leukaemia. *Oncogene*. 2005;24(14):2410-2420.
71. Wang Y, Krivtsov AV, Sinha AU, et al. The Wnt/beta-catenin pathway is required for the development of leukemia stem cells in AML. *Science*. 2010;327(5973):1650-1653.
72. Gelebart P, Anand M, Armanious H, et al. Constitutive activation of the Wnt canonical pathway in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2008;112(13):5171-5179.
73. Spaulding C, Reschly EJ, Zagort DE, et al. Notch1 co-opts lymphoid enhancer factor 1 for survival of murine T-cell lymphomas. *Blood*. 2007;110(7):2650-2658.
74. Gutierrez A, Jr., Tschumper RC, Wu X, et al. LEF-1 is a prosurvival factor in chronic lymphocytic leukemia and is expressed in the preleukemic state of monoclonal B-cell lymphocytosis. *Blood*. 2010;116(16):2975-2983.
75. Petropoulos K, Arseni N, Schessl C, et al. A novel role for Lef-1, a central transcription mediator of Wnt signaling, in leukemogenesis. *J Exp Med*. 2008;205(3):515-522.
76. Gutierrez A, Sanda T, Ma W, et al. Inactivation of LEF1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010;115(14):2845-2851.
77. Ayton PM, Cleary ML. Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene*. 2001;20(40):5695-5707. Prepublished on 2001/10/19 as DOI 10.1038/sj.onc.1204639.
78. Neumann M, Heesch S, Schlee C, et al. Whole-exome sequencing in adult ETP-ALL reveals a high rate of DNMT3A mutations. *Blood*. 2013;121(23):4749-4752. Prepublished on 2013/04/23 as DOI 10.1182/blood-2012-11-465138.
79. Mar BG, Bullinger LB, McLean KM, et al. Mutations in epigenetic regulators including SETD2 are gained during relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun*. 2014;5:3469. Prepublished on 2014/03/26 as DOI 10.1038/ncomms4469.
80. Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, et al. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 2001;97(5):1172-1179. Prepublished on 2001/02/27 as DOI.
81. Trowbridge JJ, Sinha AU, Zhu N, Li M, Armstrong SA, Orkin SH. Haploinsufficiency of Dnmt1 impairs leukemia stem cell function through derepression of bivalent chromatin domains. *Genes Dev*. 2012;26(4):344-349. Prepublished on 2012/02/22 as DOI 10.1101/gad.184341.111.

82. Dolnik A, Engelmann JC, Scharfenberger-Schmeer M, et al. Commonly altered genomic regions in acute myeloid leukemia are enriched for somatic mutations involved in chromatin-remodeling and splicing. *Blood*. 2012. Prepublished on 2012/09/15 as DOI 10.1182/blood-2011-12-401471.
83. Lorsbach RB, Moore J, Mathew S, Raimondi SC, Mukatira ST, Downing JR. TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23). *Leukemia*. 2003;17(3):637-641. Prepublished on 2003/03/21 as DOI 10.1038/sj.leu.2402834.
84. Ko M, An J, Bandukwala HS, et al. Modulation of TET2 expression and 5-methylcytosine oxidation by the CXXC domain protein IDAX. *Nature*. 2013;497(7447):122-126. Prepublished on 2013/04/09 as DOI 10.1038/nature12052.
85. Zhang M, Wang R, Wang Y, et al. The CXXC finger 5 protein is required for DNA damage-induced p53 activation. *Sci China C Life Sci*. 2009;52(6):528-538. Prepublished on 2009/06/27 as DOI 10.1007/s11427-009-0083-7.
86. Kim MS, Yoon SK, Bollig F, et al. A novel Wilms tumor 1 (WT1) target gene negatively regulates the WNT signaling pathway. *J Biol Chem*. 2010;285(19):14585-14593. Prepublished on 2010/03/12 as DOI 10.1074/jbc.M109.094334.
87. Andersson T, Sodersten E, Duckworth JK, et al. CXXC5 is a novel BMP4-regulated modulator of Wnt signaling in neural stem cells. *J Biol Chem*. 2009;284(6):3672-3681. Prepublished on 2008/11/13 as DOI 10.1074/jbc.M808119200.
88. Pendino F, Nguyen E, Jonassen I, et al. Functional involvement of RINF, retinoid-inducible nuclear factor (CXXC5), in normal and tumoral human myelopoiesis. *Blood*. 2009;113(14):3172-3181. Prepublished on 2009/02/03 as DOI 10.1182/blood-2008-07-170035.
89. Valk PJ, Verhaak RG, Beijnen MA, et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004;350(16):1617-1628. Prepublished on 2004/04/16 as DOI 10.1056/NEJMoa040465.
90. LeRoith D, Roberts CT, Jr. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett*. 2003;195(2):127-137.
91. Shimon I, Shpilberg O. The insulin-like growth factor system in regulation of normal and malignant hematopoiesis. *Leuk Res*. 1995;19(4):233-240.
92. Doepfner KT, Spertini O, Arcaro A. Autocrine insulin-like growth factor-I signaling promotes growth and survival of human acute myeloid leukemia cells via the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Leukemia*. 2007;21(9):1921-1930.
93. Baier TG, Jenne EW, Blum W, Schonberg D, Hartmann KK. Influence of antibodies against IGF-I, insulin or their receptors on proliferation of human acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Leuk Res*. 1992;16(8):807-814.
94. Chapuis N, Tamburini J, Cornillet-Lefebvre P, et al. Autocrine IGF-1/IGF-1R signaling is responsible for constitutive PI3K/Akt activation in acute myeloid leukemia: therapeutic value of neutralizing anti-IGF-1R antibody. *Haematologica*. 2009;95(3):415-423.
95. Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(7):505-518.

96. Chua CY, Liu Y, Granberg KJ, et al. IGFBP2 potentiates nuclear EGFR-STAT3 signaling. *Oncogene*. 2015. Prepublished on 2015/04/22 as DOI 10.1038/onc.2015.131.
97. Hoeflich A, Reisinger R, Lahm H, et al. Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: protector or promoter? *Cancer Res*. 2001;61(24):8601-8610.
98. Wex H, Vorwerk P, Mohnike K, et al. Elevated serum levels of IGFBP-2 found in children suffering from acute leukaemia is accompanied by the occurrence of IGFBP-2 mRNA in the tumour clone. *Br J Cancer*. 1998;78(4):515-520.
99. Dawczynski K, Steinbach D, Wittig S, Pfaffendorf N, Kauf E, Zintl F. Expression of components of the IGF axis in childhood acute myelogenous leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;50(1):24-28.
100. Bubendorf L, Kolmer M, Kononen J, et al. Hormone therapy failure in human prostate cancer: analysis by complementary DNA and tissue microarrays. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(20):1758-1764.
101. Hattori H, Matsuzaki A, Suminoe A, Koga Y, Tashiro K, Hara T. Identification of novel genes with prognostic value in childhood leukemia using cDNA microarray and quantitative RT-PCR. *Pediatr Hematol Oncol*. 2006;23(2):115-127.
102. Vorwerk P, Mohnike K, Wex H, et al. Insulin-like growth factor binding protein-2 at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia and the prediction of relapse risk. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(5):3022-3027.
103. Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell*. 2008;132(3):363-374. Prepublished on 2008/02/13 as DOI 10.1016/j.cell.2007.12.032.
104. Lin J, Lai M, Huang Q, Ruan W, Ma Y, Cui J. Reactivation of IGFBP7 by DNA demethylation inhibits human colon cancer cell growth in vitro. *Cancer Biol Ther*. 2008;7(12):1896-1900. Prepublished on 2008/11/05 as DOI.
105. Benatar T, Yang W, Amemiya Y, et al. IGFBP7 reduces breast tumor growth by induction of senescence and apoptosis pathways. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;133(2):563-573. Prepublished on 2011/10/15 as DOI 10.1007/s10549-011-1816-4.
106. Komor M, Guller S, Baldus CD, et al. Transcriptional profiling of human hematopoiesis during in vitro lineage-specific differentiation. *Stem Cells*. 2005;23(8):1154-1169.
107. Yufu Y, Nishimura J, Nawata H. High constitutive expression of heat shock protein 90 alpha in human acute leukemia cells. *Leuk Res*. 1992;16(6-7):597-605.
108. Flandrin P, Guyotat D, Duval A, et al. Significance of heat-shock protein (HSP) 90 expression in acute myeloid leukemia cells. *Cell Stress Chaperones*. 2008;13(3):357-364. Prepublished on 2008/04/04 as DOI 10.1007/s12192-008-0035-3.
109. Thomas X, Campos L, Mounier C, et al. Expression of heat-shock proteins is associated with major adverse prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2005;29(9):1049-1058.
110. Guo F, Rocha K, Bali P, et al. Abrogation of heat shock protein 70 induction as a strategy to increase antileukemia activity of heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-demethoxy geldanamycin. *Cancer Res*. 2005;65(22):10536-10544.

111. Al Shaer L, Walsby E, Gilkes A, et al. Heat shock protein 90 inhibition is cytotoxic to primary AML cells expressing mutant FLT3 and results in altered downstream signalling. *Br J Haematol.* 2008;141(4):483-493. Prepublished on 2008/04/01 as DOI 10.1111/j.1365-2141.2008.07053.x.
112. Mosser DD, Morimoto RI. Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene.* 2004;23(16):2907-2918.
113. Conroy SE, Latchman DS. Do heat shock proteins have a role in breast cancer? *Br J Cancer.* 1996;74(5):717-721.
114. Nanbu K, Konishi I, Mandai M, et al. Prognostic significance of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in endometrial carcinomas. *Cancer Detect Prev.* 1998;22(6):549-555.
115. Steiner K, Graf M, Hecht K, et al. High HSP70-membrane expression on leukemic cells from patients with acute myeloid leukemia is associated with a worse prognosis. *Leukemia.* 2006;20(11):2076-2079.
116. Yeh CH, Tseng R, Hannah A, et al. Clinical correlation of circulating heat shock protein 70 in acute leukemia. *Leuk Res.* 2010;34(5):605-609.
117. Volloch VZ, Sherman MY. Oncogenic potential of Hsp72. *Oncogene.* 1999;18(24):3648-3651.
118. Jaattela M. Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. *Int J Cancer.* 1995;60(5):689-693.
119. Seo JS, Park YM, Kim JI, et al. T cell lymphoma in transgenic mice expressing the human Hsp70 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;218(2):582-587.
120. Jaattela M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *Embo J.* 1998;17(21):6124-6134.
121. Schmitt E, Maingret L, Puig PE, et al. Heat shock protein 70 neutralization exerts potent antitumor effects in animal models of colon cancer and melanoma. *Cancer Res.* 2006;66(8):4191-4197.
122. Davenport EL, Zeisig A, Aronson LI, et al. Targeting heat shock protein 72 enhances Hsp90 inhibitor-induced apoptosis in myeloma. *Leukemia.* 2010;24(10):1804-1807.
123. Kwak HJ, Jun CD, Pae HO, et al. The role of inducible 70-kDa heat shock protein in cell cycle control, differentiation, and apoptotic cell death of the human myeloid leukemic HL-60 cells. *Cell Immunol.* 1998;187(1):1-12.
124. Creagh EM, Carmody RJ, Cotter TG. Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and -independent apoptosis in Jurkat T cells. *Exp Cell Res.* 2000;257(1):58-66.
125. Guo F, Sigua C, Bali P, et al. Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood.* 2005;105(3):1246-1255.
126. Pocaly M, Lagarde V, Etienne G, et al. Overexpression of the heat-shock protein 70 is associated to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2007;21(1):93-101.
127. Williamson DS, Borgognoni J, Clay A, et al. Novel adenosine-derived inhibitors of 70 kDa heat shock protein, discovered through structure-based design. *J Med Chem.* 2009;52(6):1510-1513.

128. Leu JI, Pimkina J, Frank A, Murphy ME, George DL. A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70. *Mol Cell*. 2009;36(1):15-27.
129. Speziali C, Paulson K, Seftel M. Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. *Curr Hematol Malig Rep*. 2016. Prepublished on 2016/03/18 as DOI 10.1007/s11899-016-0317-2.
130. Goldstone AH, Richards SM, Lazarus HM, et al. In adults with standard-risk acute lymphoblastic leukemia, the greatest benefit is achieved from a matched sibling allogeneic transplantation in first complete remission, and an autologous transplantation is less effective than conventional consolidation/maintenance chemotherapy in all patients: final results of the International ALL Trial (MRC UKALL XII/ECOG E2993). *Blood*. 2008;111(4):1827-1833.
131. Gioia R, Leroy C, Drullion C, et al. Quantitative phosphoproteomics revealed interplay between Syk and Lyn in the resistance to nilotinib in chronic myeloid leukemia cells. *Blood*. 2011;118(8):2211-2221. Prepublished on 2011/07/07 as DOI 10.1182/blood-2010-10-313692.
132. Heuser M, Wingen LU, Steinemann D, et al. Gene-expression profiles and their association with drug resistance in adult acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2005;90(11):1484-1492.
133. Dos Santos C, Demur C, Bardet V, Prade-Houdellier N, Payrastre B, Recher C. A critical role for Lyn in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111(4):2269-2279.
134. Hu Y, Liu Y, Pelletier S, et al. Requirement of Src kinases Lyn, Hck and Fgr for BCR-ABL1-induced B-lymphoblastic leukemia but not chronic myeloid leukemia. *Nat Genet*. 2004;36(5):453-461.
135. Okamoto M, Hayakawa F, Miyata Y, et al. Lyn is an important component of the signal transduction pathway specific to FLT3/ITD and can be a therapeutic target in the treatment of AML with FLT3/ITD. *Leukemia*. 2007;21(3):403-410.
136. Steinbach A, Clark SM, Clemmons AB. Bosutinib: a novel src/abl kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Adv Pract Oncol*. 2013;4(6):451-455. Prepublished on 2014/07/18 as DOI.
137. Schwable J, Choudhary C, Thiede C, et al. RGS2 is an important target gene of Flt3-ITD mutations in AML and functions in myeloid differentiation and leukemic transformation. *Blood*. 2005;105(5):2107-2114.
138. Shen L, Toyota M, Kondo Y, et al. Aberrant DNA methylation of p57KIP2 identifies a cell-cycle regulatory pathway with prognostic impact in adult acute lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003;101(10):4131-4136.
139. Yeung J, Esposito MT, Gandillet A, et al. beta-Catenin mediates the establishment and drug resistance of MLL leukemic stem cells. *Cancer Cell*;18(6):606-618.
140. Zhao C, Blum J, Chen A, et al. Loss of beta-catenin impairs the renewal of normal and CML stem cells in vivo. *Cancer Cell*. 2007;12(6):528-541.
141. Gehrke I, Gandhirajan RK, Kreuzer KA. Targeting the WNT/beta-catenin/TCF/LEF1 axis in solid and haematological cancers: Multiplicity of therapeutic options. *Eur J Cancer*. 2009;45(16):2759-2767.
142. Fiskus W, Sharma S, Saha S, et al. Pre-clinical efficacy of combined therapy with novel beta-catenin antagonist BC2059 and histone deacetylase inhibitor against AML cells. *Leukemia*. 2015;29(6):1267-1278. Prepublished on 2014/12/09 as DOI 10.1038/leu.2014.340.

143. Reya T, O'Riordan M, Okamura R, et al. Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity*. 2000;13(1):15-24.
144. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005;434(7035):843-850.
145. Tickenbrock L, Schwable J, Wiedehage M, et al. Flt3 tandem duplication mutations cooperate with Wnt signaling in leukemic signal transduction. *Blood*. 2005;105(9):3699-3706.
146. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2007;446(7137):758-764.
147. Seba A. WQ, Ming M., Qian Z. Growth Inhibition of a Myeloid Leukemia Cell Line with 5q Deletion by Beta-Catenin Inhibition. *ASH (ASH annual meeting abstracts)*. 2012.
148. Ysebaert L, Chicanne G, Demur C, et al. Expression of beta-catenin by acute myeloid leukemia cells predicts enhanced clonogenic capacities and poor prognosis. *Leukemia*. 2006;20(7):1211-1216. Prepublished on 2006/05/12 as DOI 10.1038/sj.leu.2404239.
149. Astori A, Fredly H, Aloysius TA, et al. CXXC5 (retinoid-inducible nuclear factor, RINF) is a potential therapeutic target in high-risk human acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2013;4(9):1438-1448. Prepublished on 2013/08/31 as DOI.
150. Bruserud O, Reikvam H, Fredly H, et al. Expression of the potential therapeutic target CXXC5 in primary acute myeloid leukemia cells - high expression is associated with adverse prognosis as well as altered intracellular signaling and transcriptional regulation. *Oncotarget*. 2014. Prepublished on 2015/01/22 as DOI.
151. Treppendahl M, Mollgard L, Hellstrom-Lindberg E, Cloos P, Gronbaek K. Downregulation but lack of promoter hypermethylation or somatic mutations of the potential tumor suppressor CXXC5 in MDS and AML with deletion 5q. *Eur J Haematol*. 2012. Prepublished on 2012/11/30 as DOI 10.1111/ejh.12045.
152. Murati A, Gervais C, Carbuca N, et al. Genome profiling of acute myelomonocytic leukemia: alteration of the MYB locus in MYST3-linked cases. *Leukemia*. 2009;23(1):85-94. Prepublished on 2008/09/27 as DOI 10.1038/leu.2008.257.
153. Aras S, Pak O, Sommer N, et al. Oxygen-dependent expression of cytochrome c oxidase subunit 4-2 gene expression is mediated by transcription factors RBPJ, CXXC5 and CHCHD2. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(4):2255-2266. Prepublished on 2013/01/11 as DOI 10.1093/nar/gks1454.
154. Chen X, Zheng J, Zou Y, Song C, Hu X, Zhang CC. IGF binding protein 2 is a cell-autonomous factor supporting survival and migration of acute leukemia cells. *J Hematol Oncol*. 2013;6(1):72. Prepublished on 2013/11/07 as DOI 10.1186/1756-8722-6-72.
155. Kang Z, Yu Y, Zhu YJ, et al. Downregulation of IGFBP2 is associated with resistance to IGF1R therapy in rhabdomyosarcoma. *Oncogene*. 2014;33(50):5697-5705. Prepublished on 2013/12/03 as DOI 10.1038/onc.2013.509.
156. Koren J, 3rd, Jinwal UK, Jin Y, et al. Facilitating Akt clearance via manipulation of Hsp70 activity and levels. *J Biol Chem*. 2010;285(4):2498-2505.
157. Steelman LS, Abrams SL, Whelan J, et al. Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. *Leukemia*. 2008;22(4):686-707.

158. Brand J, van Vliet MH, de Best L, et al. A standardized microarray assay for the independent gene expression markers in AML: EVI1 and BAALC. *Exp Hematol Oncol*. 2013;2(1):7. Prepublished on 2013/03/19 as DOI 10.1186/2162-3619-2-7.

159. Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *J Clin Oncol*. 2009;27(31):5195-5201. Prepublished on 2009/09/16 as DOI 10.1200/JCO.2009.22.4865.

7 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Dr. h.c. Eckhard Thiel und Prof. Dr. Antonio Pezzutto. Prof. Thiel hat mir den Wechsel vom Charité Campus Mitte an seine Klinik ermöglicht und damit die Grundlage für einen Forschungsschwerpunkt im Bereich akuter Leukämien geschaffen. In meinem klinischen und wissenschaftlichen Werdegang hat er mich nachhaltig gefördert. Als neuer Klinikdirektor hat mich Prof. Pezzutto von Beginn an großzügig dabei unterstützt, die wissenschaftliche Tätigkeit an der Charité fortzuführen und damit die Voraussetzung für die Fertigstellung dieser Arbeit geschaffen.

Mein außerordentlicher Dank geht an Prof. Dr. Claudia Baldus, die mich nach meinem Wechsel an den Campus Benjamin Franklin voller Enthusiasmus in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mich kontinuierlich und in großem Maße unterstützt und gefördert hat. Mit ihrer exzellenten klinischen und wissenschaftlichen Arbeitsweise, ihrem außergewöhnlichen Engagement für Patienten und Mitarbeiter, den anregenden wissenschaftlichen Diskussionen und ihrer humorvollen und integren Persönlichkeit war sie mir stets ein Vorbild und hat meinen beruflichen Werdegang wie kein anderer geprägt. Mit ausgesprochener Geduld und Motivation hat sie mir wesentliche Aspekte des klinischen und wissenschaftlichen Arbeitens vermittelt. Sie hat mich für das Gebiet der akuten Leukämien begeistert und war maßgeblich an der Verwirklichung meines Auslandsstipendiums beteiligt. Auf Ihre freundschaftliche, großzügige Unterstützung und wertvollen Anregungen war auch jenseits des Ärmelkanals immer Verlass, wofür ich sehr dankbar bin.

Prof. David Grimwade und Prof. Ellen Solomon verdanke ich zwei persönlich und wissenschaftlich anregende Jahre in ihrem Labor im King`s College London. Hier habe ich wichtige Einblicke in wissenschaftliche Fragestellungen, sowie Durchführung und Organisation translationaler Forschungsprojekte gewonnen. Beide haben mich von Beginn an großzügig unterstützt und Bedingungen geschaffen, die mir das selbstständige wissenschaftliche Arbeiten ermöglicht haben. Die exzellenten Rahmenbedingungen für medizinische Forschung im King`s College London und nicht zuletzt die positive und kollegiale angelsächsische Arbeitsweise haben mich sehr beeindruckt.

Mein besonderer Dank geht auch an die herausragenden Kollegen und Kooperationspartner, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre: Prof. Dr. Wolf-Karsten Hofmann, Prof. Dr. Dieter Hoelzer, Dr. Nicola Gökbuget, Dr. Torsten Haferlach, Dr. Peter Valk, Mathijs Sanders, Dr. Ken Mills, Adam Ivey, Richard Dillon, Dr. Thomas Burmeister, Dr. Martin Neumann, Dr. Lars Fransecky, Andrea Stroux, Dr. Sandra Heesch, Liliana Mochmann, Jutta Ortiz Tanchez, Cornelia Schlee, Ebru Coskun, Eva von der Heide, Dr. Jana Reins und Ouidad Benlasfer.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern, für die einzigartige und uneingeschränkte Unterstützung bedanken. Ohne deren unermüdlichen Einsatz, vor allem bei der Kinderbetreuung, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

8 ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,

- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.

- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Berlin, 03.09.2015

Andrea Kühnl