

Die Bedeutung von *BAALC* (*brain and acute leukemia, cytoplasmic*) und assoziierter Gene in akuten Leukämien

Dissertation

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

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

vorgelegt von

Sandra Anja Heesch

geboren in Templin

Berlin im Juni 2010

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Februar 2006 bis Dezember 2009 unter der Leitung von Frau Priv. Doz. Dr. med. Claudia Baldus an der Medizinischen Klinik III (Hämatologie und Onkologie) der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin.

1. Gutachterin: Priv. Doz. Dr. Claudia Baldus

2. Gutachter: Prof. Dr. Burghardt Wittig

Tag der Disputation: 11. 11. 2010

Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.
Galileo Galilei, 15.02.1564 - 08.01.1642

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	HÄMATOPOESE	1
1.2	LEUKÄMOGENESE	3
1.3	AKUTE LEUKÄMIEN	6
1.3.1	AKUTE MYELOISCHE LEUKÄMIE	7
1.3.2	AKUTE LYMPHOBLASTISCHE LEUKÄMIE	12
1.3.2.1	Akute T-lymphoblastische Leukämie	13
1.3.2.2	Akute B-lymphoblastische Leukämie	16
1.3.3	BIPHÄNOTYPISCHE AKUTE LEUKÄMIE	18
1.4	THERAPIE DER AKUTEN LEUKÄMIEN	18
1.4.1	ZYTOSTATIKARESISTENZ UND NEUE THERAPEUTISCHE ZIELSTRUKTUREN	19
1.5	DAS GEN <i>BAALC</i>	21
2	<u>FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG</u>	25
3	<u>DARSTELLUNG DER ARBEIT</u>	28
3.1	MANUSKRIFT: “HIGH <i>BAALC</i> EXPRESSION PREDICTS CHEMORESISTANCE IN ADULT B-PRECURSOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA”	29
3.2	MANUSKRIFT: “PROGNOSTIC IMPLICATIONS OF MUTATIONS AND EXPRESSION OF THE <i>WILMS TUMOR 1 (WT1)</i> GENE IN ADULT ACUTE T-LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA”	31
3.3	FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR BEDEUTUNG VON <i>BAALC</i> IN DER HÄMATOPOESE UND LEUKÄMOGENESE	35
3.4	MANUSKRIFT: “ <i>BAALC</i> -ASSOCIATED GENE EXPRESSION PROFILES DEFINE <i>IGFBP7</i> AS A NOVEL MOLECULAR TARGET IN ACUTE LEUKEMIA”	39
4	<u>DISKUSSION</u>	43
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	54
6	<u>SUMMARY</u>	56
7	<u>REFERENZEN</u>	58
8	<u>LEBENS LAUF</u>	68
9	<u>PUBLIKATIONS LISTE</u>	70
9.1	PUBLIKATIONEN	70
9.2	VORTRÄGE UND POSTERPRÄSENTATIONEN	71
10	<u>DANKSAGUNG</u>	73
11	<u>ANHANG – PUBLIKATIONEN</u>	74

1 Einleitung

1.1 Hämatopoese

Als Hämatopoese wird die Entwicklung der Blutzellen aus ihren Vorläufern, den so genannten hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*: HSCs) und den weiter differenzierten Progenitorzellen bezeichnet. HSCs stellen eine sehr kleine Zellpopulation dar. Sie treten nur sehr langsam in den Zellzyklus ein und ruhen überwiegend in der G₀ Phase des Zellzyklus, ein Zustand, den man als Quieszenz bezeichnet. Sie besitzen sowohl die Fähigkeit sich selbst zu erneuern (*self-renewal*) als auch in alle hämatopoetischen Zelllinien zu differenzieren (Pluripotenz). Darüber hinaus sind HSCs in der Lage in nicht-hämatopoetische Zellen, zum Beispiel Muskelzellen zu differenzieren.¹⁻³ Ein weiteres Charakteristikum der HSCs ist die Expression von Effluxpumpen – so genannten *ATP-Binding Cassette* (ABC)-Transportern – und dem damit verbundenen Schutzmechanismus gegenüber diversen zelltoxischen Substanzen.⁴

Während der hämatopoetischen Differenzierung durchlaufen die HSCs unterschiedliche Vorläuferstadien, ausgehend von den Zellen mit pluripotentem Differenzierungspotential bis hin zu unipotenten Vorläufern, die sich nur noch in eine Linie entwickeln können.⁵ Dabei differenzieren HSCs von sehr unreifen Blutstammzellen (*long-term* HSCs: LT-HSCs), die lebenslang zur Rekonstruktion des Blutsystems fähig sind, über reifere multipotente Stammzellen, die noch geringfügig die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen,^{6,7} in oligopotente Progenitorzellen. Im klassischen Modellsystem der Hämatopoese geht man von zwei oligolineären Progenitorzellen aus: den lymphatischen Progenitorzellen (*common lymphoid progenitors*: CLPs), die weiter zu T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen differenzieren⁸ und den myeloischen Progenitorzellen (*common myeloid progenitors*: CMPs), die weiter in die myeloischen/erythrozytären Linien differenzieren (**Abbildung 1**). Neuere Daten weisen jedoch darauf hin, dass neben dem klassischen Modellsystem noch andere Modelle der Hämatopoese denkbar sind. Im myeloisch-basierten Konzept geht man beispielsweise davon aus, dass die Differenzierung zu T- und B-Lymphozyten ebenfalls von myeloischen Progenitorzellen initiiert wird.⁹

Charakterisiert werden HSCs durch die Expression unterschiedlicher Oberflächenantigene (*cluster of differentiation: CD*). So exprimieren humane HSCs die Antigene CD34 und CD90, während sie negativ sind für den Oberflächenmarker CD38. Im Laufe der Differenzierung verändert sich das Antigenprofil der hämatopoetischen Zellen.¹⁰ Während die HSCs mit zunehmendem Reifegrad ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung verlieren, steigt im Gegenzug die Proliferationsrate der entstehenden Progenitorzellen stark an, was zu einer enormen Expansionsfähigkeit der hämatopoetischen Zellen im Knochenmark führt. Die Richtung der Differenzierung von Stamm- und Progenitorzellen hängt von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren [wie zum Beispiel *stem cell factor: SCF*, *fms related tyrosin kinase 3 (FLT3) ligand: FL*, *thrombopoetin: TPO*, *interleukin 3 und 6: IL3 und IL6*] und spezifischen Transkriptionsfaktoren [*CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)*, *alpha*, *PUI*, *homeobox (HOX)*-Gene] ab.⁵

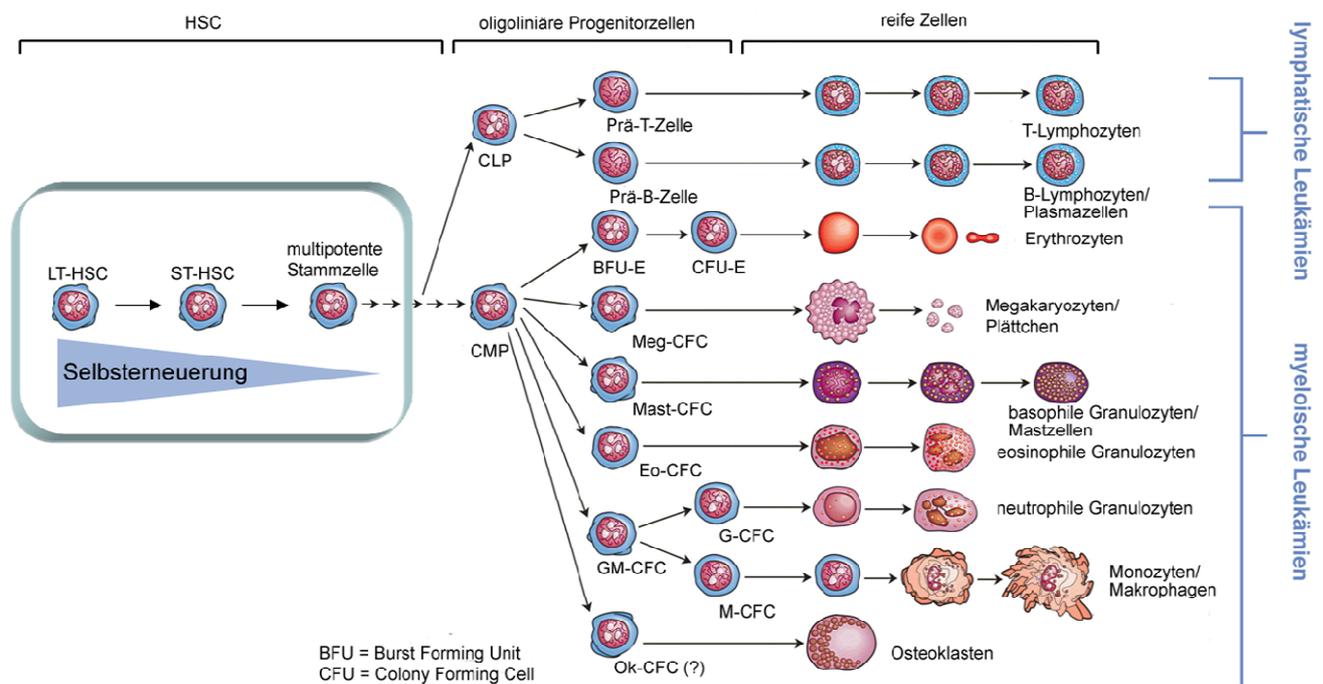


Abbildung 1: Klassisches Modell der Hämatopoese. Die hämatopoetischen Stammzellen sind je nach Subtyp (*long term* LT-HSC; *short term* ST-HSC und multipotente HSC) in der Lage sich viele Male zu teilen bzw. sich selbst zu erneuern. Aus ihnen entstehen oligopotente Progenitorzellen, die dann weiter differenzieren in die beiden Hauptlinien. Dies sind einerseits die myeloische Linie und andererseits die lymphatische Linie. Über verschiedene Zwischenstufen entstehen die diversen reifen Blutzellen. (Abbildung modifiziert nach bloodlines.stemcells.com)

Das Knochenmark stellt dabei den wichtigsten Ort der Hämatopoese dar. In der so genannten Stammzellnische, die sich im Wesentlichen aus Stroma- und Endothelzellen, Osteoblasten und Adipozyten sowie der extrazellulären Matrix zusammensetzt, finden Interaktionen der

HSCs mit zahlreichen Faktoren statt. Diese haben Einfluss auf Selbsterneuerung, Differenzierung, Quieszenz, Proliferation und Apoptose der Stamm- und Progenitorzellen und sind essentiell für die Aufrechterhaltung eines stabilen HSC-Pools und der lebenslangen Stammzellerhaltung.¹¹ Eine Interaktion zwischen Nische und HSCs findet beispielsweise über den *Wnt*- und *Notch*-Pathway statt, die die Proliferation und die Selbsterneuerung der HSCs regulieren.^{12,13} Sowohl für *Osteopontin*, welches in den Osteoblasten exprimiert wird, als auch für den *Angiopoietin-Tie2 (TEK tyrosine kinase, endothelial)*-Pathway wurde eine wesentliche Rolle in der Aufrechterhaltung der Quieszenz der HSCs (u.a. über eine Beeinflussung der Adhäsion von HSCs in der Nische) beschrieben.^{14,15} Die Interaktion des *stromal cell-derived factor1 (SDF1)* mit dem *chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4)* trägt neben anderen Faktoren zur Aufrechterhaltung eines stabilen HSC-Pools bei.¹⁶ Das Parathyroidhormon (PTH) reguliert die HSC-Zahl, indem es Osteoblasten aktiviert und so zu einer Produktion von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren führt.^{13,17}

Neben der osteoblastischen Nische ist eine weitere, die vaskuläre Nische beschrieben mit den Endothelzellen des Vaskularsystems als wesentlichen Bestandteil.¹⁸ Zwischen diesen Nischen wird ein dynamischer Austausch der HSCs vermutet, der zur Regulation der Hämatopoese beiträgt.¹⁹

Nach ihrer Ausreifung passieren die Blutzellen (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten) die Wände der Knochenmarkgefäße und treten in das periphere Blut über, um ihre spezifischen Funktionen zu übernehmen. Hierzu zählen unter anderem Infektabwehr (Leukozyten), Sauerstofftransport (Erythrozyten) und Blutungsstillung (Thrombozyten).

1.2 Leukämogenese

Die Leukämie, eine Erkrankung des hämatopoetischen Systems, wurde 1845 erstmals von Rudolf Virchow beschrieben, der auch den Begriff der „Leukämie“ geprägt (griechisch: λευχαιμία; λευκός, *leukós* - weiß und αἷμα, *haima* - das Blut). Unter Leukämogenese versteht man die Entstehung von Leukämien auf dem Boden von molekulargenetischen Alterationen in hämatopoetischen Vorläuferzellen bzw. deren maligne Transformation, in deren Folge es zu einer unkontrollierten klonalen Expansion und Akkumulation dieser Zellen mit Verdrängung der normalen Hämatopoese kommt.

Die Entwicklung der Leukämie stellt einen mehrstufigen Prozess dar, der seinen Ursprung in der Entstehung der leukämischen Stammzelle hat (*leukemic stem cell*: LSC). Die erste Beschreibung der LSCs stammt aus dem Jahre 1994. LSCs wurden definiert als eine Subpopulation von Leukämiezellen die in der Lage sind in einem Xenograft-Mausmodell eine Leukämie zu initiieren.²⁰

Eine LSC kann zum einen durch akkumulierende Mutationen aus einer HSC hervorgehen oder aber auch aus oligopotenten Progenitorzellen oder linienspezifischen Vorläuferzellen, die durch Mutationen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung wieder erlangt haben (**Abbildung 2**).^{21,22}

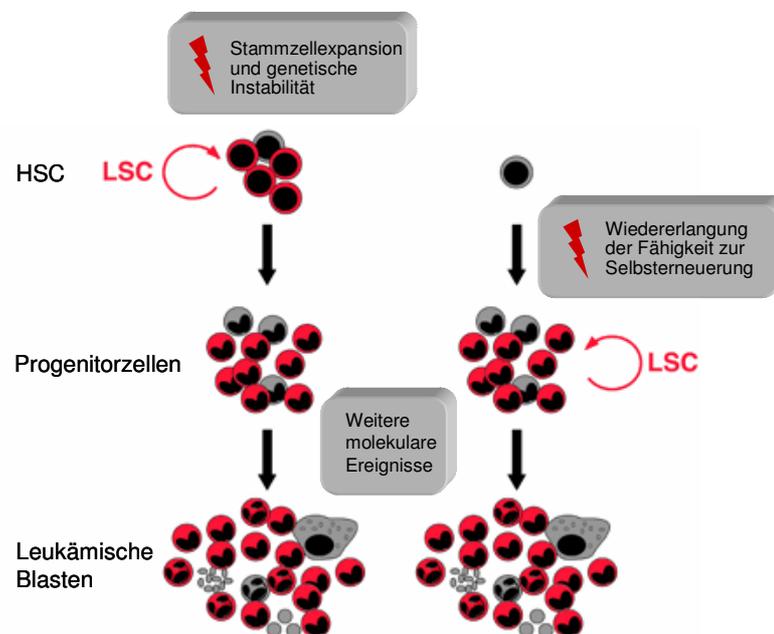


Abbildung 2: *Ursprung der LSC ausgehend von der normalen Hämatopoese.*

Durch leukämogene Veränderungen kommt es zur Stammzellexpansion und genetischer Instabilität der HSC und letztlich zur Transformation in eine LSC. Des Weiteren kann eine LSC aus Progenitorzellen hervorgehen, die durch Mutationen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung wieder erlangt haben. (Abbildung modifiziert nach Passegué *et. al.*)¹⁰

Ausgehend von der LSC erfolgt entsprechend des hierarchischen Modells der Hämatopoese die Entwicklung der leukämischen Blasten, die unreif oder aber zum Teil differenziert sein können. Die LSCs sind, wie die HSCs, gekennzeichnet durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Quieszenz. Sie besitzen wie diese resistenzvermittelnde Effluxmechanismen (Expression von ATP-assoziierten Transportern) und sind unempfindlich gegenüber Apoptose-Stimuli durch Expression anti-apoptotischer Gene wie *Bcl-XL* und *Bcl-*

2.^{23,24} Darüber hinaus exprimieren sie wie die HSCs den Oberflächenmarker CD34, während im Gegensatz dazu CD90 nicht nachweisbar ist.²⁵ Es ist davon auszugehen, dass ähnlich wie bei den HSCs auch für die LSCs die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, Quieszenz und Chemotherapieresistenz an die Interaktion mit ihrer Umgebung – der Stammzellnische – gebunden ist.²⁶ So sind beispielsweise die Mobilisierung und die zielgerichtete Wanderung (*homing*) sowohl der LSCs als auch der HSCs ins Knochenmark abhängig vom *SDF1*-vermittelten *CXCR4*-Pathway.²⁰ LSCs stellen je nach Leukämiesubtyp eine sehr heterogene Zellpopulation dar. Innerhalb einer Leukämie sind sie jedoch eher homogen und unterscheiden sich biologisch von der Vielzahl an leukämischen Blasten. Diese stellen die Hauptmasse der leukämischen Zellen dar, besitzen aber kein Selbsterneuerungspotential.

Bei der Transformation gesunder hämatopoetischer Zellen in Leukämiezellen spielen sowohl chromosomale Translokationen mit der Entstehung leukämogener Fusionsproteine [*AML-ETO*: t(8;21)(q22;q22); *PML-RARA*: t(15;17)(q22;q21); *TEL-AML*: t(12,21)(p13;q22); *BCR-ABL*: t(9;22)(q34;q11.2)] eine Rolle als auch Mutationen verschiedener Gene (*FLT3*, *KIT*, *NPM1*, *PAX5*). Diese stellen spezifische Transkriptionsfaktoren dar oder sind in den zahlreichen Pathways der Differenzierung, Proliferation und *self-renewal* (wie zum Beispiel *Wnt*-Pathway, *Notch*-Pathway) involviert (**Abbildung 3**).

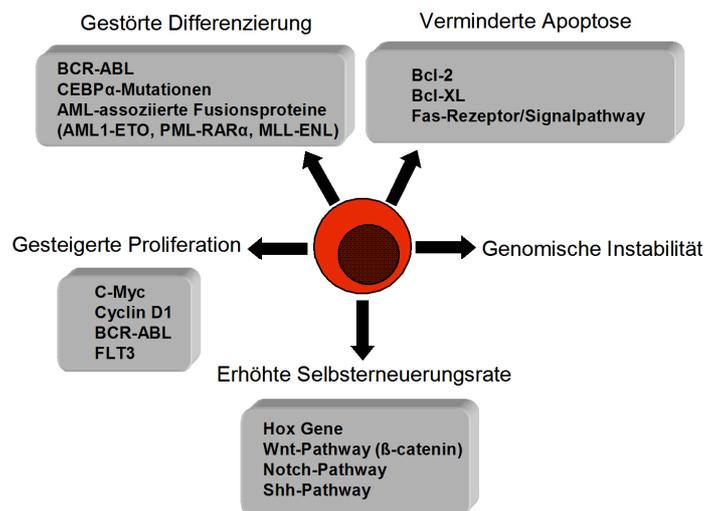


Abbildung 3. Entstehung der Leukämie: Altierte Pathways. Die verschiedenen Leukämieformen sind zwar sehr heterogen in Bezug auf ihren Phänotyp, jedoch teilen sie allgemeine Mechanismen die zur Leukämie-Entstehung führen. Dazu zählen eine gestörte Differenzierung, eine verminderte Apoptoserate, gesteigerte Proliferation, eine erhöhte Selbsterneuerungsrate sowie die genomische Instabilität. Die Abbildung zeigt beispielhaft die fehlregulierten Mechanismen, die in verschiedenen Leukämien gefunden wurden. (Abbildung modifiziert nach Passegué E. *et. al.*)¹⁰

Die einzelnen genetischen Alterationen und die Leukämie-assoziierten Fusionsgene stören zwar empfindlich die Hämatopoese, es sind jedoch weitere Mutationen nötig, um das Vollbild einer Leukämie auszulösen. Ein erstes hypothetisches Modell zur Pathogenese der Leukämie nach Gilliland und Griffin^{27,28} postuliert eine Zwei-Hit-Hypothese, in der chromosomale Rearrangements von relevanten Transkriptionsfaktoren und des so genannten '*transcriptional co-activation complexes*' als Klasse-2-Mutationen bezeichnet werden (zum Beispiel *HOX*-Gene, *C/EBP(α)*, *AML-ETO*, *PML-RARA*). Diese Alterationen von Transkriptionsfaktoren stören die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen, sind aber alleine nicht in der Lage zur Entstehung einer Leukämie zu führen. Dazu sind zusätzlich so genannte Klasse-1-Mutationen erforderlich. Durch eine konstitutive Aktivierung von membranständigen Rezeptoren wie den Tyrosinkinase FLT3 und KIT (*v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*) führen diese Mutationen über nachgeschaltete Regulationsmechanismen zu einer autonomen Proliferation und klonalen Expansion der alterierten Zellen.

Darüber hinaus ist jedoch anzunehmen, dass Protoonkogene, die den programmierten Zelltod in der normalen Hämatopoese regulieren, ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese der Leukämie spielen (**Abbildung 3**).¹⁰

Neben chromosomalen Translokationen und Mutationen einzelner Gene sind aber auch sowohl epigenetische Veränderungen wie DNA-Methylierungen, -Demethylierungen und Histonmodifikationen mit resultierender aberranter Genexpression als auch microRNAs (miRNAs; die als Onkogen aber auch als Tumorsuppressor fungieren können) an der Entstehung einer Leukämie beteiligt.²⁹ Dies macht deutlich, dass das klassische Modell der Zwei-Hit-Hypothese zu erweitern ist. Die Untersuchungen der letzten Jahre zeigen, dass weitaus mehr „Hits“ an der Pathogenese der Leukämie beteiligt sein können (Multi-Hit-Modell).

1.3 Akute Leukämien

Akute Leukämien sind charakterisiert durch klonale Proliferation und Akkumulation maligner, unreifer Zellen der Hämatopoese (Blasten) im Knochenmark (mit Unterdrückung der physiologischen Blutbildung), im Blut und gegebenenfalls auch in anderen Organen. Neben der Einteilung nach dem klinischen Verlauf in „akut“ bzw. „chronisch“ können Leukämien

auch nach dem zugrunde liegenden Zelltyp eingeteilt werden. In Abhängigkeit davon, welche Zelllinie von den genetischen Alterationen betroffen ist, entwickelt sich die akute myeloische Leukämie (AML) oder die akute lymphoblastische Leukämie (ALL).

Symptome und klinisches Bild einer akuten Leukämie werden durch die Unterdrückung der normalen Hämatopoese bestimmt. Initiale Symptome wie Belastungsdyspnoe und Blässe können Ausdruck einer manifesten Anämie sein, eine gesteigerte Blutungsneigung kann auf eine Thrombozytopenie und eine gesteigerte Infektanfälligkeit auf eine Granulozytopenie zurückzuführen sein. Unbehandelt führen akute Leukämien innerhalb weniger Wochen oder Monate zum Tod.

Die Diagnosestellung einer akuten Leukämie erfolgt mit Hilfe der morphologischen Beurteilung des Knochenmarkaspirates und erfordert laut *World Health Organization* (WHO)-Klassifikation einen Blastenanteil von mindestens 20%.³⁰ Eine weitere, spezifische Charakterisierung der akuten Leukämien erfolgt mittels Immunphänotypisierung, Zytogenetik und Molekulargenetik.

1.3.1 Akute myeloische Leukämie

Die AML stellt die häufigste myeloische Neoplasie des Erwachsenenalters dar und macht etwa 80-90% der Fälle an akuten Leukämien des Erwachsenen aus. Sie weist eine Inzidenz von 3-5 Fälle/100.000 Einwohner/Jahr auf und umfasst damit 3% aller bösartigen Erkrankungen. Zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr stellt sie die häufigste tödlich verlaufende Neoplasie dar.

Pathophysiologisch geht die AML auf eine klonale Expansion einer pluripotenten Stammzelle oder einer frühen, unreifen myeloischen Progenitorzelle des Knochenmarks zurück, wobei das Ausmaß der Determinierung auf die erythrozytäre, granulozytär-monozytäre und megakaryozytäre Linie variiert. Gekennzeichnet sind diese durch eine abnormale Proliferationskapazität, verminderte Apoptose und eine Differenzierungsblockierung.

Die Ätiologie der AML ist in der Mehrheit der Fälle unbekannt. Zu den prädisponierenden Faktoren zählen die Verabreichung von Zytostatika bzw. Strahlentherapie und vorangegangene hämatologische Erkrankungen sowie die Exposition gegenüber Benzol und genetische Prädispositionen (Down Syndrom, Bloom Syndrom), die die Entwicklung der

Leukämie begünstigen können. AML, die ohne eine erkennbare hämatologische Vorerkrankung entstehen werden dann als *de novo* AML bezeichnet. AML, die auf dem Boden einer präexistenten Hämatopoese Störung oder einer vorangegangenen Chemo- oder Bestrahlungstherapie entstehen, werden als sekundäre AML (sAML) bezeichnet.

Die Einteilung der AML wurde erstmals 1976 entsprechend der *French-American-British* (FAB)-Klassifikation eingeführt und eine Einteilung in die Subgruppen M0 bis M7 anhand der Morphologie und Zytochemie vorgenommen, die die unterschiedlichen Ausreifungsstörungen widerspiegelt.³¹ Der zunehmenden Identifizierung zugrunde liegender molekularer Veränderungen mit klinischer Relevanz trägt die neue WHO-Klassifikation der AML aus dem Jahre 2008 mit der Integration von morphologisch, klinisch, zytogenetisch und molekulargenetisch relevanten Befunden (**Tabelle 1**) Rechnung.³⁰

Tabelle 1. Auszug aus der WHO-Klassifikation der AML	
AML mit spezifischen zytogenetischen Aberrationen	Fusionsgene
AML mit t(8;21)(q22;q22); AML mit inv(16)(p13.1q22); Akute Promyelozytenleukämie mit t(15;17)(q22;q12); AML mit t(9;11)(p22;q23); AML mit t(6;9)(p23;q34); AML mit inv(3)(q21q26.2); AML mit t(1;22)(p13;q13); AML mit <i>NPM1</i> Mutation (vorläufige Aufnahme in die Klassifikation) AML mit <i>C/EBP(α)</i> Mutation (vorläufige Aufnahme in die Klassifikation)	<i>AML1-ETO</i> <i>CBFB-MYH11</i> <i>PML-RARA</i> <i>MLLT3-MLL</i> <i>DEK-NUP214</i> <i>RPN1-EVI1</i> <i>RBM15-MKL1</i>
AML mit MDS-typischen Veränderungen	
AML mit vorausgegangenem myelodysplastischem Syndrom AML ohne vorausgegangenem myelodysplastischem Syndrom	
Therapieinduzierte AML	
nach Alkylanzien nach Topoisomerase II-Inhibitoren andere Auslöser	
AML nicht weiter klassifiziert (Analog FAB M0-M7)	FAB
AML minimal differenziert	M0
AML ohne Ausreifung	M1
AML mit Ausreifung	M2
Akute myelomonozytäre Leukämie	M4
Akute Monoblastenleukämie	M5
Akute Erythroleukämie	M6
Akute Megakaryoblastenleukämie	M7
Akute Basophilenleukämie	
Akute Panmyelose mit Myelofibrose	

MDS = myelodysplastisches Syndrom

Einige molekulargenetische Mechanismen, die für die Pathogenese der AML von Bedeutung sind, konnten durch die nähere Charakterisierung von einfachen chromosomalen Aberrationen entschlüsselt werden.³² Bei ca. der Hälfte aller AML-Patienten können chromosomale Aberrationen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose nachgewiesen werden und dienen der Risikostratifizierung für die Behandlung der AML (**Tabelle 2**).^{33,34} Zu den häufigen chromosomalen Aberrationen in der AML zählen die Translokationen t(8;21)(q22;q22), t(16;16)(p13.1;q22) bzw. inv(16)(p13.1q22) sowie die t(15;17)(q22;q12). Die Translokation t(8;21) tritt mit einer Inzidenz von 12% bezogen auf alle *de novo* AML auf und die Inversion inv(16) mit einer Inzidenz von 10%. AML mit diesen Translokationen werden zu den so genannten *Core-Binding Faktor (CBF)*-Leukämien gezählt. Beim *CBF* handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor der in der Hämatopoese von großer Relevanz ist. Im Falle der t(8;21) und der inv(16) sind Gene, die für jeweils verschiedene Untereinheiten dieses Transkriptionsfaktors kodieren, Teil der entstehenden Fusionstranskripte. Durch die t(8;21) entsteht das Fusionsgen *AML1-ETO*, wobei *AML1* für die Untereinheit von *CBF α* kodiert, während bei der inv(16) die beta-Untereinheit von *CBF* betroffen ist (*CBF β -MYH11*). Beide Translokationen sind mit einer günstigen Prognose assoziiert. Bei der balancierten Translokation t(15;17), die bei 98% der Promyelozytenleukämien vorliegt, kommt es über die Expression des Fusionspeptids PML-RAR α zu einer Blockade der durch Vitamin A induzierten myeloischen Differenzierung.³⁵ Diese Translokation charakterisiert Patienten mit einer günstigen Prognose,³⁶ da hier eine spezifische, molekular basierte AML-Therapie mit all-trans-Retinsäure (*all-trans-retinoic acid*; ATRA) und Arsentrioxid (As₂O₃) möglich ist und zu einem Gesamtüberleben der Patienten von ca. 80% führt.

Tabelle 2. Zytogenetisch basierte Risikogruppen in der AML		
Zytogenetische Risikogruppe	Chromosomale Aberration	Fusionsgen
günstig	t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13.1q22) / t(16;16)(p13.1;q22) t(15;17)(q22;q12)	<i>AML1-ETO</i> <i>CBFβ-MYH11</i> <i>PML-RARα</i>
intermediär	normaler Karyotyp -Y	
ungünstig	komplexer Karyotyp mit ≥ 3 Veränderungen inv(3)(q21q26) / t(3;3)(q21;q26) -7 <i>MLL(PTD)</i> (11q23)	

Modifiziert nach Mrózek *et. al.*³⁷

Neben den Patienten, die durch chromosomale Aberrationen charakterisiert werden können, weisen ungefähr 45% der AML-Patienten einen normalen Karyotyp (*cytogenetic normal* AML: CN-AML) auf und werden in der intermediären Risikogruppe zusammengeschlossen. Klinisch stellen sie jedoch ein sehr heterogenes Patientenkollektiv mit Langzeitüberlebenden sowie Patienten mit nur einem sehr kurzen rezidivfreien Überleben und Gesamtüberleben dar.³⁸ Verschiedene molekulargenetische Veränderungen werden für die klinische Heterogenität der AML mit normalen Karyotyp verantwortlich gemacht und sind in der **Abbildung 4** zusammengefasst dargestellt.

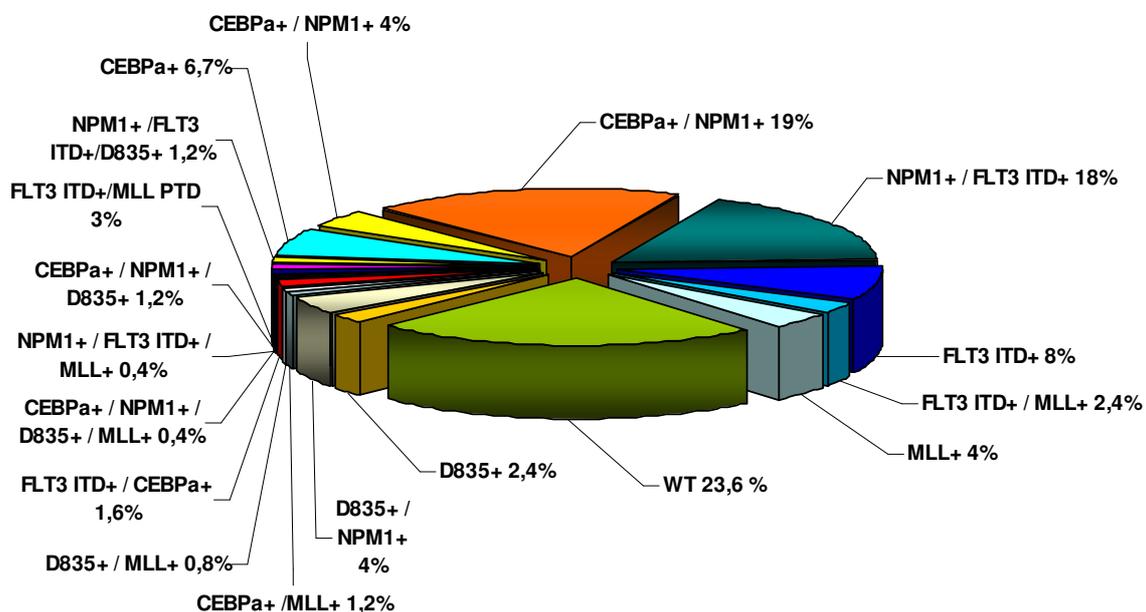


Abbildung 4. *Molekulargenetisch definierte Subgruppeneinteilung der CN-AML.* Im dargestellten Kreisdiagramm erfolgt die Unterteilung der CN-AML in molekulargenetisch charakterisierte Untergruppen basierend auf Mutationsanalysen der Gene *NPM1*, *FLT3* (ITD und D835), *C/EBP(α)*, *MLL*(PTD). WT bezeichnet den Wildtyp, ein + kennzeichnet das Vorhandensein der Mutation. (Abbildung modifiziert nach Döhner *et. al.*)³⁹

Mutationen im *Nucleophosmin*-Gen (*NPM1*), ein Nukleus-Zytoplasma-Transporterprotein, stellen mit ca. 53% den größten Anteil der Aberrationen bei AML-Patienten mit normalem Karyotyp dar und sind bei diesen Patienten mit einer guten Prognose assoziiert. *NPM1*-Mutationen sind häufig mit aktivierenden Mutationen von *FLT3* vergesellschaftet, beeinflussen die *FLT3*-assoziierte schlechte Prognose dieser Patienten (siehe unten) aber nicht.^{40,41} Die *NPM1*-Mutation inhibiert die Funktion des NPM1-Proteins in einem Tumorsuppressor-Pathway⁴², der eine regulatorische Rolle für die Zellproliferation spielt. Ebenfalls mit einer günstigen Prognose sind Mutationen im *C/EBP(α)* Gen assoziiert, die bei

15% der CN-AML-Patienten auftreten.^{43,44} *C/EBP(α)* stellt einen Transkriptionsfaktor dar, der wesentlich an der Differenzierung der myeloischen Vorläuferzellen beteiligt ist.⁴⁵ Der prognostischen Wertigkeit dieser beiden Mutationen wurde durch die vorläufige Aufnahme in die WHO-Klassifikation Rechnung getragen (*Tabelle 1*).

Neben Mutationen von Genen konnte auch für eine aberrante mRNA-Expression von verschiedenen Genen eine prognostische Relevanz gezeigt werden.

Im Folgenden soll auf prognostisch relevante Genalterationen, die im Rahmen dieser Arbeit eine Rolle spielen, näher eingegangen werden.

FLT3 (*fms-related tyrosin kinase 3*): Das *FLT3*-Gen auf Chromosom 13q12 kodiert für eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die in der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Apoptose hämatopoetischer Progenitorzellen involviert ist. Aktivierende *FLT3*-Mutationen sind eine der häufigsten Mutationen bei CN-AML-Patienten (ca. 28-33%). Diese Patienten weisen eine schlechtere Prognose auf als Patienten mit Wildtyp-*FLT3*.⁴⁶⁻⁴⁸ Man unterscheidet bei *FLT3*-Mutationen einerseits die interne Tandemduplikation (ITD) in dem Bereich des Gens der für die juxtamembranäre Domäne (Exon 14 und 15) des Rezeptors kodiert und die häufigste der *FLT3*-Mutationen in der AML darstellt und andererseits die Punktmutation in der Tyrosinkinase-Domäne (TKD). Am häufigsten ist die Asparaginsäure an Position 835 von der Punktmutation betroffen (TKD835). Beide Mutationen führen zu einer ligandenunabhängigen konstitutiven Aktivierung des *FLT3*-Rezeptors und der sich anschließenden Signalkaskade. Diese Aktivierung der Tyrosinkinase bietet einen therapeutischen Ansatzpunkt neuer Substanzen wie den Tyrosinkinase-Inhibitoren Sorafenib (Bayer), PKC412 (Novartis) oder AC220 (Ambit Biosciences Corporation).

WT1 (*Wilms tumor 1*): Das *WT1*-Gen, bestehend aus 10 Exons, ist lokalisiert auf Chromosom 11q13 und kodiert einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der sowohl in der normalen als auch der malignen Hämatopoese involviert ist.⁴⁹ Die Exons 1-6 enthalten die Sequenz einer Prolin-Glutamin-reichen Region, welche die Transkription reguliert. Dagegen kodieren die Exons 7-10 für die vier Zinkfinger der DNA-Bindungsdomäne. Aufgrund zweier alternativer Spleißstellen existieren vier verschiedene Transkriptvarianten des *WT1*-Gens. *WT1* wurde sowohl als Tumorsuppressorgen⁵⁰ als auch als Onkogen^{49,51} beschrieben, dessen Funktion abhängig ist von der Zellart, der Protein-Isoform und der entsprechenden Target-Gene.⁵¹ In der normalen Hämatopoese wird *WT1* ausschließlich in den frühen HSCs und Progenitorzellen exprimiert.⁵²

Mutationen des *WT1*-Gens wurden in ca. 10-15% der CN-AML-Patienten beschrieben und sind mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Mutationen des Exon 7, welche in einer modifizierten DNA-Bindungsfähigkeit des Proteins münden.⁵³⁻⁵⁵ Des Weiteren wurde eine aberrante Expression des Gens bei AML-Patienten gezeigt, die prognostische Bedeutung jedoch kontrovers diskutiert.⁵⁶⁻⁵⁸ Darüber hinaus stellt die erhöhte *WT1*-Expression bei AML-Patienten einen Marker für die minimale Resterkrankung dar (*minimal residual disease*: MRD) und ermöglicht so die Identifizierung von Patienten mit einer erhöhten Rezidiv-Wahrscheinlichkeit.⁵⁹

ERG (*v-ets avian erythroblastosis virus e26 oncogene related gene*): Der ETS Transkriptionsfaktor *ERG* ist an der Regulation der linienspezifischen Differenzierung von hämatopoetischen Progenitorzellen beteiligt. Eine hohe Expression des Gens *ERG* ist sowohl bei AML-Patienten mit komplex-aberrantem Karyotyp als auch mit normalem Karyotyp mit einer ungünstigen Prognose assoziiert.⁶⁰⁻⁶²

BAALC (*brain and acute leukemia, cytoplasmic*): Die prognostische Bedeutung des Gens *BAALC* in der AML wird im Rahmen dieser Arbeit in Abschnitt 1.5 näher erläutert.

1.3.2 Akute lymphoblastische Leukämie

Akute lymphoblastische Leukämien gehen von Zellen der lymphatischen Zellentwicklung aus und können entsprechend ihrer lymphatischen Vorläuferzelle in die B-lymphoblastische (B-ALL) oder T-lymphoblastische (T-ALL) Leukämie unterteilt werden (**Abbildung 5**).

In Deutschland liegt die Gesamtzahl der ALL-Fälle für Erwachsene bei rund 550 pro Jahr (Inzidenz 1,1 Fälle/100.000 Einwohner/Jahr). Die Inzidenz ist beim männlichen Geschlecht höher als beim weiblichen, die Inzidenzgipfel liegen bei Adoleszenten (< 20 Jahre) und bei älteren Patienten (> 75 Jahre). Entsprechend der AML zählen Strahlenexposition, Belastung mit Benzol, Verabreichung von Zytostatika sowie genetische Prädispositionen (Down Syndrom, Bloom Syndrom) zu Risikofaktoren, die die Entwicklung der ALL begünstigen können. In der Mehrheit der Fälle ist die Ätiologie der ALL jedoch unbekannt.

Die Klassifikation der ALL nach morphologischen Subtypen (FAB-Klassifizierung; L1-3)³¹ hat stark an Bedeutung verloren und dient häufig der Abgrenzung zur AML. Unabdingbar zur Klassifizierung der ALL ist hingegen die genaue Immunphänotypisierung (**Abbildung 5**) und die Hinzunahme zytogenetischer bzw. molekulargenetischer Befunde.

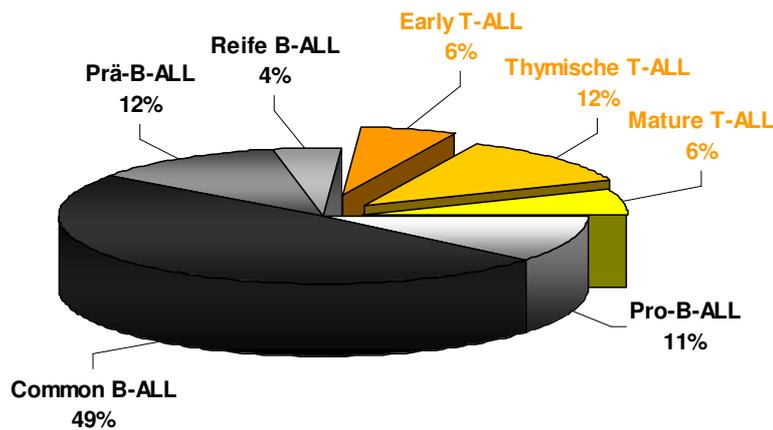


Abbildung 5. Subgruppenunterteilung der akuten lymphoblastischen Leukämie. 24% der gesamten ALL-Fälle sind T-lymphoblastische Leukämien (gelb dargestellt), 76% der ALL-Fälle sind B-lymphoblastische Leukämien (schwarz dargestellt). Beide Leukämien werden entsprechend ihres Reifegrades (Immunphänotypisierung) weiter unterteilt (% Zahlen jeweils bezogen auf alle ALL-Fälle).

1.3.2.1 Akute T-lymphoblastische Leukämie

Die T-ALL stellt eine seltene Form der akuten Leukämie im Erwachsenenalter dar und umfasst ca. 25% der erwachsenen ALL.⁶³ Pathogenetisch ist die T-ALL auf eine klonale Expansion maligner, transformierter T-lymphatischer Vorläuferzellen zurückzuführen, deren Ausreifung auf einer bestimmten Differenzierungsebene blockiert ist. Als Folge des Differenzierungsstopps unterbleibt die Ausreifung in funktionskompetente Lymphozyten.

Im Verlauf ihres physiologischen Ausreifungsprozesses werden bei den T-Lymphozyten die *T-Zell-Rezeptor-Gene (TCR)* rearrangiert, um am Ende die funktionellen *TCR-Gene* *TCRα* (14q11.2), *TCRβ* (7q35), *TCRγ* (7p11) und *TCRδ* (14q11) zu bilden. Pathophysiologisch finden sich Chromosomentranslokationen die den T-Zell-Rezeptor-Genlocus betreffen (**Tabelle 3**).

Tabelle 3. Rekombinationen von TCR-Genen			
TCR	Translokation	Partner	Häufigkeit
<i>TCRα</i>	t(8;14)(q24;q11)	<i>MYC</i>	<1%
<i>TCRβ</i>	t(7;9)(q35;q32)	<i>TAL2</i>	<1%
	t(7;10)(q35;q34)	<i>HOX11</i>	<1%
<i>TCRδ</i>	t(10;14)(q24;q11)	<i>HOX11</i>	1-3%
	t(11;14)(p13;q11)	<i>LOM2</i>	2-3%
	t(11;14)(p15;q11)	<i>LOM1</i>	<1%

Hierdurch werden Regulatorsequenzen des *TCR*-Locus im Bruchpunktbereich des chromosomalen Translokationspartners quantitativ zu stark oder im falschen Gewebekontext zur Expression gebracht. Infolge der Translokation kommt es zu einer aberranten Expression der fusionierten Transkriptionsfaktoren oder zu einer nachfolgenden Onkogenaktivierung. Häufig beteiligte Gene umfassen das Onkogen *MYC*, Gene des *HOXA* Clusters sowie die Gene *HOX11*, *HOX11L2*, *TAL1*, *TAL2*, *LYL1*, *LMO1* und *LMO2*. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass unabhängig von chromosomalen Aberrationen eine aberrante Expression spezifischer Gene (*HOX11*, *TAL1*, *LYL1*, *LMO1*, *LMO2*) eine leukämische Transformation induzieren kann und mit einem Differenzierungsstopp auf jeweils unterschiedlichen Reifungsstufen assoziiert ist.⁶⁴

Des Weiteren konnte als wichtiger Regulator der T-Zell-Differenzierung das *NOTCH1*-Gen identifiziert werden, welches als Fusionsgen an der seltenen Translokation t(7;9) beteiligt ist (**Table 4**).⁶⁵ Auf die *NOTCH1*-Mutation und molekulare Aberrationen, die für diese Arbeit von Relevanz sind, wird am Ende dieses Abschnittes näher eingegangen.

Table 4. Zusammenfassung der zytogenetischen Veränderungen in der T-ALL

Translokationen unter Einbeziehung der <i>TCR</i>-Gene auf Chromosomen 7q34 (<i>TCRβ</i> und <i>TCRγ</i>) und 14q11 (<i>TCRα</i> und <i>TCRδ</i>)	35%	<i>HOX11</i> , <i>HOX11L2</i> , <i>TAL1</i> , <i>TAL2</i> , <i>LYL1</i> , <i>LMO1</i> , <i>LMO2</i> , <i>NOTCH1</i> , <i>cyclin D2</i>
Aberrante Expression	9-30%	<i>SIL-TAL1</i> -Fusion
Translokationen ohne Beteiligung der <i>TCR</i>-Gene	10%	<i>CALM-AF10</i> -Fusion
	4-8%	<i>MLL</i> -Fusionen
	6%	<i>ABL1</i> -Fusionen
	selten	<i>NUP98</i> -Fusionen
Aktivierende Gen-Mutationen	50-60%	<i>NOTCH</i> , <i>FLT3</i> , <i>NRAS</i>

Modifiziert nach Aifantis *et. al.*⁶⁶

Diese genetischen Alterationen tragen wesentlich zum Verständnis der Pathogenese der T-ALL bei. Im Gegensatz zur AML lassen sich für die T-ALL aufgrund von diesen Alterationen (**Table 4**) jedoch nur bedingt Risikogruppen ableiten, die zur Therapieoptimierung im Sinne einer molekulargenetisch-basierten Risikostratifizierung heran gezogen werden können. Grundlage der Risikogruppeneinteilung der T-ALL stellt daher immer noch die Immunphänotypisierung dar, die je nach Antigenprofil die Einteilung in thymische T-ALL (Standardrisiko) bzw. frühe T- oder reife T-ALL (Hochrisiko) ermöglicht (**Table 5**). Das Langzeitüberleben bei Patienten mit T-ALL nach Standardchemotherapiebehandlung liegt allerdings nur bei unbefriedigenden 32-46%.^{63,67} Durch risikoadaptierte Behandlungskonzepte

wie zum Beispiel der Stammzelltransplantation bei Hochrisikopatienten war es in den letzten Jahren jedoch möglich, das Langzeitüberleben dieser Patienten zu verbessern.⁶⁸ Dies unterstreicht die Notwendigkeit, neue prognostisch relevante Marker zu identifizieren, um eine bessere Risikoklassifikation mit optimierten Behandlungskonzepten zu gewährleisten.

Tabelle 5. Einteilung der immunologischen Subgruppen der T-ALL und deren Risikogruppenzuordnung

Immunphänotyp	Oberflächenmarker	Risikogruppe
Frühe T-ALL	cyCD3 ⁺ , CD7 ⁺ , CD2 ⁻ , sCD3 ⁻ , CD1a ⁻	Hochrisiko
Thymische T-ALL	cyCD3 ⁺ , CD7 ⁺ , sCD3 [±] , CD1a ⁺	Standardrisiko
Reifzellige T-ALL	cyCD3 ⁺ , CD7 ⁺ , sCD3 ⁺ , CD1a ⁻ , CD8 [±] , CD4 [±]	Hochrisiko

Einteilung entsprechend der *German Multicenter Acute Lymphoblastic Leukemia Study Group (GMALL)*⁶⁸⁻⁷⁰

s = *surface* = membranständige Expression

cy = *cytoplasmic* = zytoplasmatische Expression

Genetische Alterationen, die im Rahmen dieser Arbeit von Bedeutung sind:

NOTCH1: Die Aktivierung des transmembranären NOTCH1-Rezeptors ist essentiell für die T-Zell-Differenzierung hämatopoetischer Progenitorzellen. Einer ligandenunabhängigen Aktivierung des *Notch*-Pathways wird hingegen eine bedeutende Rolle in der Leukämogenese zugeschrieben. In über 50% der T-ALL-Patienten können aktivierende Mutationen des *NOTCH1*-Gens gefunden werden, welche zu einer autonomen Stimulation der *NOTCH1*-abhängigen Regulationskaskade führen.⁷¹ Zu den am häufigsten von Mutationen betroffenen Regionen des *NOTCH1*-Gens zählen die Heterodimerisations-Domäne (HD), die PEST-Domäne (*polypeptide enriched proline, glutamate, serine and threonine domain*) und die Transaktivierungs-Domäne (TAD). Das Tumorsuppressorgen **FBXW7** (*F-box and WD repeat domain containing 7*) ist an der durch Ubiquitin vermittelten, proteasomalen Degradierung von *NOTCH1* beteiligt und somit an der Unterdrückung des *Notch*-Pathways.^{72,73} Mutationen des *FBXW7*-Gens in der *NOTCH1*-Bindungsstelle führen wiederum zu einer gesteigerten Aktivität des *Notch*-Signalweges. In über 10% der T-ALL-Patienten wurden *FBXW7*-Mutationen identifiziert, die in mehr als der Hälfte der Fälle mit Mutationen des *NOTCH1*-Gens vergesellschaftet waren.⁷⁴ Die prognostische Bedeutung dieser Mutationen wird jedoch kontrovers diskutiert und bedarf größerer prospektiver Studien.⁷⁴⁻⁷⁶

HOX11L2 / HOX11: Die zur Gruppe der Homeobox-Gene gehörenden Gene *HOX11L2* und *HOX11* sind auf Chromosom 5q35 bzw. 10q24 lokalisiert und an zahlreichen zellbiologischen

Entwicklungsprozessen beteiligt. Eine aberrante Expression des Protoonkogens *HOX11L2* in der T-ALL wurde assoziiert mit den Translokationen t(5;14)(q35;q32), t(5;7)(q35;q21) und t(5;14)(q33;q11) und die erhöhte Expression von *HOX11* mit den Translokationen t(10;14)(q24;q11) und t(7;10)(q35;q24). Es konnte aber auch dargestellt werden, dass eine aberrante Expression unabhängig von chromosomalen Aberrationen auftreten kann.⁶⁴ Die Expression von *HOX11L2* ist in der T-ALL mit einer schlechten Prognose der Patienten assoziiert.⁷⁷ Die prognostische Bedeutung von *HOX11* hingegen wird kontrovers diskutiert und weist eher auf eine günstige Beeinflussung des Überlebens der Patienten hin.^{77,78}

ERG: Das bereits bei der AML vorgestellte Gen *ERG* spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle in der frühen T-Zellentwicklung. Hohe Expressionswerte kennzeichnen vor allem die frühen T-lymphatischen Progenitorzellen, während mit dem Einsetzen der T-Zellreifung die *ERG*-Expression abrupt abnimmt.⁷⁹ Entsprechend der prognostischen Bedeutung von *ERG* in der AML kennzeichnet eine Überexpression des Gens auch bei der T-ALL Patienten mit einer ungünstigen Prognose.⁸⁰

BAALC: Die prognostische Bedeutung des Gens *BAALC* in der T-ALL wird im Rahmen dieser Arbeit in Abschnitt 1.5 näher erläutert.

1.3.2.2 Akute B-lymphoblastische Leukämie

Leukämien der lymphatischen B-Zellreihe stellen den größten Anteil der ALL des Erwachsenen dar (76%). Pathogenetisch finden sie ihren Ursprung in malignen, transformierten B-lymphatischen Vorläuferzellen. Je nach Differenzierungsgrad wird die B-ALL als pro-B, common-, prä-B und reifzellige B-ALL klassifiziert (**Abbildung 5**). Die reifzellige B-ALL ist eine Sonderform der ALL und kann als die leukämische Manifestation des Burkitt-Lymphoms betrachtet werden. Im Folgenden wird in dieser Arbeit unter B-ALL die so genannte B-Vorläufer-ALL mit der pro-B-, common- und prä-B-ALL zusammengefasst. Charakteristisch für die B-ALL ist die Expression der B-Zellantigene: CD19, CD79a, CD24 und teilweise CD20 und CD22 auf den leukämischen Blasten.

Die **Tabelle 6** stellt die aktuelle WHO-Klassifikation der B-ALL unter Einbeziehung zytogenetisch relevanter Befunde dar.

Tabelle 6. Auszug aus der WHO-Klassifikation der B-ALL

B-ALL nicht weiter klassifiziert

B-ALL mit spezifischen zytogenetischen Aberrationen

B-ALL mit t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL1*B-ALL mit t(v;11q23); *MLL* RearrangementsB-ALL mit t(12;21)(p13;q22); *TEL-AML1*B-ALL mit t(5;14)(q31;q32); *IL3-IGH*B-ALL mit t(1;19)(q23;p13.3); *TCF3-PBX1*

B-ALL mit hyperdiploiden Karyotyp

B-ALL mit hypodiploiden Karyotyp

Das Philadelphia-Chromosom mit der Translokation t(9;22)(q34;q11) stellt die häufigste Translokation (20-36%) der ALL des Erwachsenenalters dar und entsteht durch die Fusion der Gene *ABL1* (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*) auf dem Chromosom 9 und *BCR*-Gen (*breakpoint cluster region*) auf dem Chromosom 22.^{70,81} Durch das *ABL*-Gen wird eine Tyrosinkinase kodiert, welche eine wichtige Rolle bei der zellulären Wachstumsregulation spielt. Die Funktion von *BCR* ist hingegen unbekannt. Das durch die Translokation entstandene Genprodukt *BCR-ABL* führt unter dem Einfluss von *BCR* zu einer dauerhaften Aktivierung der Tyrosinkinase *ABL*, was eine unkontrollierte Proliferation der Zellen zur Folge hat. Das Vorliegen des *BCR-ABL* Transkriptes ist mit einer sehr ungünstigen Prognose bei Patienten mit B-ALL assoziiert.⁸²

Die zweithäufigste strukturelle Chromosomenveränderung stellt die Translokation t(4;11)(q21;q23) mit dem resultierenden Fusionsgen *MLL-AF4* dar, die ebenfalls mit einer schlechten Prognose assoziiert ist.

Darüber hinaus sind an der Pathogenese der B-ALL Chromosomentranslokationen unter Einbeziehung der Immunglobulin-Rezeptorgene (*IgH* auf Chromosom 14q32, *Igk* auf Chromosom 2p12 und *Igλ* auf Chromosom 22q11) beteiligt, in deren Folge es zu einer aberranten Expression von Transkriptionsfaktoren wie *E2A* kommt bzw. die mit einer nachfolgenden Onkogenaktivierung (*cMYC*) verbunden sind.

Die Molekulargenetik sowie klinische und morphologische Parameter bilden die Grundlage der Risikostratifikation der B-ALL und sind in der **Tabelle 7** zusammengefasst dargestellt. Die Identifizierung molekulargenetischer Veränderungen ermöglicht darüber hinaus die Entwicklung bzw. Verwendung target-spezifischer Medikamente, wie zum Beispiel des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib (Glivec[®], Novartis) bei der *BCR-ABL*-positiven ALL oder des monoklonalen anti-CD20 Antikörpers Rituximab (MabThera[®], Roche) bei der CD20 positiven ALL.

Tabelle 7. Risikostratifikation der B-ALL	
Standardrisiko	B-Vorläufer ALL Komplette Remission nach der Induktion I Leukozytenzahl < 30.000/ μ l Keine molekularen Risikofaktoren
Hochrisiko	B-Vorläufer ALL Leukozytenzahl > 30.000/ μ l Späte komplette Remission <i>MLL-AF4</i>
Höchstrisiko	<i>BCR-ABL</i>

Einteilung entsprechend der *German Multicenter Acute Lymphoblastic Leukemia Study Group (GMALL)*^{69,70}

1.3.3 Biphänotypische akute Leukämie

Biphänotypische akute Leukämien (BAL) stellen eine sehr kleine Subgruppe der akuten Leukämien dar, die keine eindeutige Linienzuordnung besitzen. Die BAL ist entweder gekennzeichnet durch eine homogene Blastenpopulation mit synchroner Expression lymphatischer und myeloischer Antigene oder es lassen sich voneinander unabhängige (*mixed*) lymphoblastische sowie myeloblastische Zellklone nachweisen. Pathophysiologisch geht die BAL von einer unreifen LSC aus, die das Differenzierungspotential für die myeloische als auch lymphatische Reihe besitzt. Darüber hinaus wird die akute undifferenzierte Leukämie (AUL) unterschieden, die keinerlei linienspezifische Differenzierungsantigene zeigt.

1.4 Therapie der akuten Leukämien

Die Therapie der akuten Leukämie wird in mehrere Phasen unterteilt; unterschieden werden die Induktionstherapie mit dem Ziel der Induktion einer kompletten Remission (*complete remission*: CR) und die Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie mit dem Ziel der Aufrechterhaltung der CR. Sowohl in der Induktionstherapie der AML als auch in der Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie finden vor allem Pyrimidinanaloga wie Cytosinarabinosid in Kombination mit einem Anthrazyklin (Doxorubicin, Daunorubicin etc.) Anwendung.

Das therapeutische Konzept der ALL besteht aus einer komplexen Abfolge mehrerer Induktions-, Konsolidations- sowie Re-Induktionszyklen. Wesentliche Bestandteile dieser

Polychemotherapie sind Dexamethason, Vinca-Alkaloide, Anthracyclinderivate, Asparaginase, Methotrexat sowie Pyrimidinanaloga. Neben der rein medikamentösen Leukämietherapie sind die autologe und insbesondere die allogene Stammzelltransplantation ein wesentlicher Bestandteil im therapeutischen Konzept vor allem für jüngere Patienten mit einer Hochrisiko-AML und -ALL.

Entsprechend der Risikogruppeneinteilung auf dem Boden klinischer, zytogenetischer und molekulargenetischer sowie immunzytologischer Befunde lassen sich risikoadaptierte Therapiekonzepte ableiten, die einer Dosiseinsparung für Patienten mit günstiger Prognose nachgehen und intensiviertere Therapieregime (inklusive autologer oder allogener Stammzelltransplantation) für Patienten mit einem hohen Rezidivrisiko vorsehen.

1.4.1 Zytostatikaresistenz und neue therapeutische Zielstrukturen

Die Überlebensraten von erwachsenen Patienten mit AML bzw. ALL sind trotz Optimierung der therapeutischen Konzepte weiterhin unbefriedigend. So beträgt das 5-Jahres-Gesamtüberleben der Patienten mit AML nur 30% bzw. 35% bei Patienten mit ALL. Ursächlich hierfür ist neben verschiedenen Faktoren u.a. die Resistenz der Erkrankungen gegen die primäre Chemotherapie (ca. 10% der Patienten sind primär refraktär) sowie die hohen Rezidivraten (bis zu ca. 50%).

Als ein wesentlicher Grund für die hohen Rezidivraten sowohl bei der AML als auch bei der ALL kann die Existenz der LSCs angeführt werden. Wie bereits im Abschnitt „Leukämogenese“ dargestellt, zeichnen sich diese Zellen durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Quieszenz u.a. durch ihre Interaktion (Adhäsion) mit der Stammzellnische aus.⁸³ Während der Quieszenz ruhen die LSCs in der G₀-Phase des Zellzyklus, es findet keine Replikation statt. Diese stellt aber einen wesentlichen Angriffspunkt für die herkömmlichen zellzyklusabhängigen Zytostatika dar. Die LSCs entziehen sich hierdurch zumindest teilweise dem Zugriff durch konventionelle Chemotherapeutika, sie sind primär resistent.⁸⁴ Ein weiterer Resistenzmechanismus wird durch die gesteigerte Expression von ABC-Transportern wie dem P-Glykoprotein *MDR1* (*multidrug resistance protein 1*) – v.a. auf Stammzellen – vermittelt, welches zytotoxische Substanzen aus der Zelle heraus transportiert.⁸⁵ Diese Charakteristika der LSCs machen die

LSCs und die in der Leukämogenese involvierten Pathways zu interessanten, aber auch wichtigen Zielstrukturen für neue therapeutische Konzepte und Substanzen.

So wird beispielsweise die Wirksamkeit von Antagonisten des *CXCR4*-Pathways in klinischen Studien geprüft.^{86,87} Die resistenzvermittelnde Adhäsion der LSCs an das Stroma der Stammzellnische wird antagonisiert und es kommt zur Mobilisation der LSCs und konsekutiv zu einer höheren Sensitivität der LSCs gegenüber konventionellen Zytostatika. Des Weiteren sind p-Glykoprotein-Inhibitoren der 3. Generation (Zosuquidar[®], CBA Pharma) zur Antagonisierung einer erhöhten *MDR1*-Expression Gegenstand klinischer Studien.⁸⁸

Das zunehmende Verständnis der pathogenetischen Mechanismen der Leukämogenese bietet neben den LSCs weitere bedeutsame Zielstrukturen. Die Modulation des in der Leukämogenese involvierten *Notch*-Pathways mittels γ -Sekretase-Inhibitoren stellt insbesondere für die T-ALL einen interessanten Ansatzpunkt dar, da sich aktivierende *NOTCH1*-Mutationen bei einem Großteil der T-ALL-Patienten nachweisen lassen.⁸⁹

Konstitutiv aktivierte Signaltransduktionskaskaden, die in der Leukämogenese von großer Bedeutung sind, können durch den Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren [Sorafenib, Imatinib, Dasatinib (Britel-Myers Squibs), Nilotinib (Novartis)] moduliert werden und kommen im Rahmen von klinischen Studien zum Einsatz bzw. sind bereits in der Therapie der chronisch myeloischen Leukämie zugelassen und hier der therapeutische Standard.

Des Weiteren können epigenetische Veränderungen wie Hypermethylierung und Histonacetylierung, die zu einer alterierten Genregulation in leukämischen Blasten führen, durch den Einsatz von Methyltransferase-Inhibitoren und Histondeacetylase-Inhibitoren moduliert werden. So wurde 2009 das Medikament Vidaza[®] (5-Azacytidin, Celgene) – mit hypomethylierenden Eigenschaften – zur Behandlung der AML mit einem Blastenanteil von 20-30% zugelassen.

Aber auch die Vakzinierung mittels WT1-Peptiden mit nachfolgender Induktion einer spezifischen T-Zell-Antwort bei AML-Patienten mit erhöhter *WT1*-Expression stellt einen potentiellen immunologischen Ansatzpunkt dar, dessen Wirksamkeit derzeit in klinischen Studien geprüft wird.⁹⁰

Die beispielhaft dargestellten innovativen Ansatzpunkte in der Leukämitherapie machen deutlich, dass die Klärung der mechanistischen Grundlagen der Leukämogenese sowie die Identifizierung neuer Target-Gene sinnvoll und notwendig sind und erfolgreich zur Entwicklung neuer molekularer Therapieoptionen dienen können. Vor dem Hintergrund des

Multi-Hit-Modells der Leukämogenese ist die Identifizierung weiterer Zielstrukturen erforderlich, um möglicherweise durch kombinationstherapeutische Ansätze gezielter gegen die der Erkrankungen zugrunde liegenden Defekte vorzugehen.

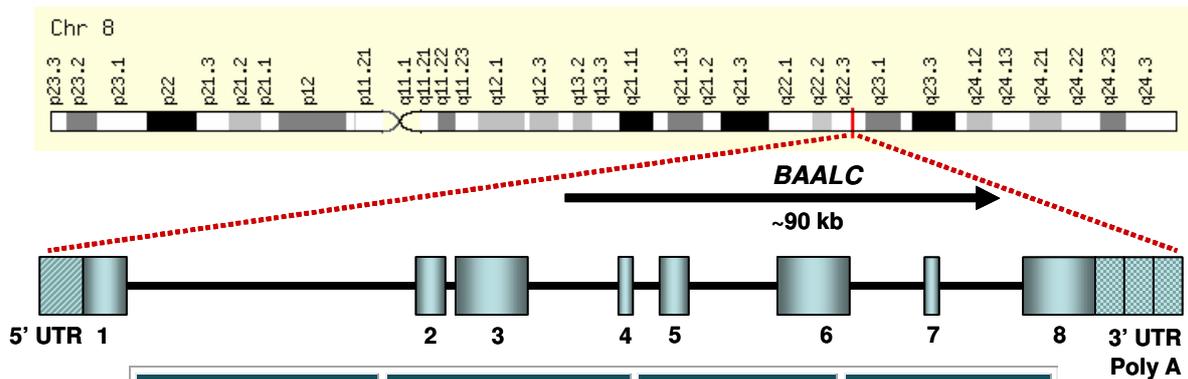
1.5 Das Gen *BAALC*

Auf der Suche nach bisher unbekannt Genen, die bei akuten Leukämien von Bedeutung sind, wurde das Gen *BAALC* mittels repräsentativer Differentialanalyse (*representational difference analysis*: RDA) im Jahre 2001 erstmals identifiziert.⁹¹ Tanner und Kollegen untersuchten hierbei AML-Patienten mit einer Trisomie 8 (AML +8) unter der Hypothese, dass Gene auf dem Chromosom 8 molekulare Aberrationen aufweisen und möglicherweise an der Pathogenese der AML beteiligt sind. Ähnliches wurde bereits für die AML mit Trisomie 11 dargestellt, hier zeigte sich eine Tandemduplikation des *MLL*-Gens auf Chromosom 11.^{92,93} Mittels der RDA-Methode ist es möglich, differentiell exprimierte Sequenzen zwischen zwei Populationen zu detektieren. Dabei stellte die cDNA-Sequenz von AML+8 Patienten die Testprobe (*Tester-DNA*) und die cDNA-Sequenz von CN-AML-Patienten die Vergleichsprobe (*Driver-DNA*) dar. Die substraktive Hybridisierung führt dann zu einer Überrepräsentation der Sequenz, die ausschließlich in der Testprobe aber nicht in der Vergleichsprobe vorhanden ist. Eine anschließende Klonierung der Polymerase Kettenreaktion- (*polymerase chain reaction*: PCR) Produkte und Sequenzierung identifizierte *BAALC* als differenziell exprimierte Sequenz, dessen aberrante Expression in AML-Patienten mit einer Trisomie 8 mittels quantitativer *real time* PCR (qRT-PCR) verifiziert wurde. Darüber hinaus zeigte sich auch eine gesteigerte *BAALC*-Expression in einem Teil der Patienten mit normalen Karyotyp sowie in einer Subgruppe von Patienten mit ALL. Im Gegensatz dazu, wiesen die reiferen chronischen Leukämieformen keine *BAALC*-Expression auf.⁹¹

Lokalisiert ist das Gen *BAALC* auf Chromosom 8q22.3 und besteht aus 8 Exons. Aufgrund alternativer Splicevarianten sind 8 verschiedene *BAALC*-Transkripte (1-5-6-8; 1-6-8; 1-5-6-8; 1-2-6-8; 1-2-5-6-8; 1-2-3-6-8; 1-4-5-6-8; 1-8) in leukämischen Blasten beschrieben worden, zwei davon (1-6-8 und 1-8) werden ebenfalls im Zentralnervensystem exprimiert. Die Translation der *BAALC*-Transkripte lässt 6 verschiedene Protein-Isoformen vermuten (**Abbildung 6**). Transkripte mit dem Exon 2 kodieren das gleiche Protein, da das Exon 2 ein

Stoppcodon beinhaltet. Die **Abbildung 6** zeigt die schematische Darstellung des *BAALC*-Gens sowie die einzelnen Transkriptvarianten und Protein-Isoformen. Alle Isoformen haben lediglich die ersten 53 Aminosäuren gemeinsam und unterscheiden sich in der restlichen kodierenden Sequenz.

A



B

<i>BAALC</i> -Transkripte [Exons]	<i>BAALC</i> -Protein-Isoformen [Exons]	Aminosäuren [Anzahl]	Molekulargewicht [kD]
1-5-6-8	1-5-6-8	180	19
1-6-8	1-6-8	145	15
1-5-6-7-8	1-5-6-7-8	149	15
1-2-6-8	1-2	80	8
1-2-5-6-8			
1-2-3-6-8			
1-4-5-6-8	1-4-5-6-8	73	8
1-8	1-8	54	6

Abbildung 6. Das humane Gen BAALC – genomische Anordnung und Transkripte. (A): Lokalisiert ist *BAALC* auf Chromosom 8q22.3 und besitzt eine Größe von ca. 90 kb. Das Gen besteht aus 8 Exons, dargestellt durch die einzelnen Boxen. Exon 8 enthält 3 Polyadenylierungssignalsequenzen (Poly A) im 3' untranslatierten Bereich (UTR). (B): Die Tabelle stellt die einzelnen Transkriptvarianten und Protein-Isoformen zusammen, sowie die entsprechende Größe der Isoformen.

Das Protein liegt bei Säugetieren hoch konserviert vor. Exprimiert wird *BAALC* in neuroektodermalem Gewebe mit einer hohen Expression im Gehirn und einer geringeren Expression in Nebenniere, Schilddrüse und Milz. Darüber hinaus findet sich eine hohe Expression von *BAALC* in CD34 positiven Progenitorzellen.⁹¹ Die zytoplasmatische Lokalisation des *BAALC*-Proteins in CD34 positiven Zellen konnte mittels immunzytochemischer Färbung gezeigt werden (**Abbildung 7**).

In der normalen Hämatopoese stellt *BAALC* einen molekularen Marker der frühen hämatopoetischen Progenitorzellen einschließlich der myeloischen (CD34⁺/CD33⁺), der

lymphatischen ($CD34^+/CD19^+/CD10^+$ bzw. $CD34^+/CD7^+$) und der erythroiden ($CD34^+/CD71^+/CD45^-$) Zelllinien dar. Die Expression im Rahmen der Hämatopoese ist auf die CD34 positiven Progenitorzellen beschränkt und wird im Verlauf der hämatopoetischen Differenzierung spezifisch herunter reguliert.⁹⁴

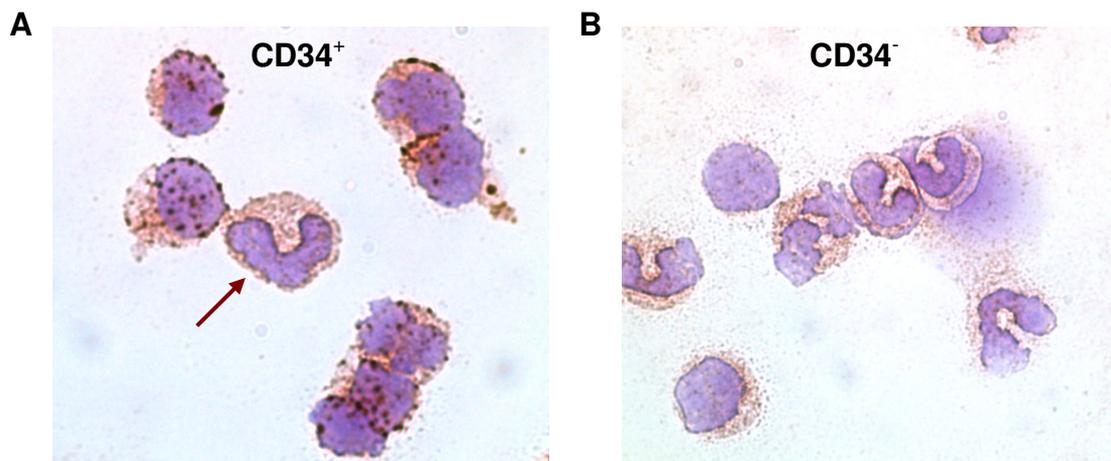


Abbildung 7. *Immunzytochemische Färbung von BAALC in CD34 positiven und CD34 negativen hämatopoetischen Knochenmarkzellen.* (A): CD34 positive Zellen zeigen eine granulär-zytoplasmatische Färbung. Eine reifere myeloblastische Zelle (Pfeil) ist negativ für BAALC. (B): Zellen der CD34 negativen Fraktion zeigen keine Anfärbung. (Modifiziert nach Baldus *et. al.*)⁹⁴

Auf Grund der fehlenden Homologie der Proteinsequenz zu bekannten funktionellen Domänen ist eine Zuordnung der mechanistischen Bedeutung von *BAALC* nicht möglich. Es wird eine Bedeutung von *BAALC* an der Zell-Lokomotion und Zell-Adhäsion⁹¹ vermutet, aber auch eine mögliche Rolle in postsynaptischen Lipid-Rafts durch eine Interaktion von *BAALC* mit der Untereinheit von CaMKII (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*) wird postuliert.⁹⁵ Während die funktionelle Rolle von *BAALC* in der Leukämogenese völlig unbekannt ist, konnte die prognostische Bedeutung einer gesteigerten *BAALC*-Expression in unabhängigen, klinischen Studien belegt werden.

So konnte eine gesteigerte *BAALC*-Expression bei Patienten mit CN-AML und T-ALL mit einem signifikant kürzeren Gesamtüberleben assoziiert werden. Insbesondere korrelierte eine gesteigerte *BAALC*-Expression bei Erstdiagnose dieser Patienten mit einer primären Zytostatikaresistenz.⁹⁶⁻¹⁰⁰ Interessanterweise zeigten AML-Patienten mit hoher *BAALC*-Expression ein Überlebensvorteil für eine konsolidierende allogene Stammzelltransplantation im Vergleich zur alleinigen konsolidierenden Chemotherapie.⁹⁷ Darüber hinaus konnte ein

BAALC-spezifisches Genexpressionsprofil von AML-Patienten erstellt werden. Eine hohe BAALC-Expression war hierbei assoziiert mit der Expression von Stammzellmarkern wie CD34, CD133 und KIT aber auch erhöhter Expression des Multi-Drug-Resistenz-Gens MDR1 und Genen die mit einer schlechten Prognose assoziiert sind wie zum Beispiel das MNI- (*meningioma 1*) Gen.¹⁰⁰

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser klinischen Studien ist in **Tabelle 8** dargestellt.

Tabelle 8. Zusammenfassung der Studienergebnisse bzgl. einer aberranten BAALC-Expression		
	AML	T-ALL
Klinische Studien	AML CALGB (9621 + 19808) AML CALGB (9621) AML SAKK (30/95 + 30/00) AML DSIL ('96)	T-ALL GMALL (05/93 + 06/99)
BAALC-Assoziationen	C/EBP(α) mut FLT3 ITD FLT3 TKD WT NPM1 WT ERG (erhöhte Expression) miRNA-148a (erhöhte Expression)	frühe T-ALL CD34 Positivität Expression myeloischer Marker ERG (erhöhte Expression)
Therapieansprechen/ Zytostatikaresistenz	häufigere Rezidive bei Patienten mit hoher BAALC-Expression sowie geringere CR Rate	häufigere Rezidive bei Patienten mit hoher BAALC-Expression sowie geringere CR Rate
Prognostische Bedeutung	kürzeres Überleben für Patienten mit hoher BAALC-Expression	kürzeres Überleben für Patienten mit hoher BAALC-Expression
Referenzen	96,97,99,100	98

CR = komplette Remission
mut = Mutation
WT = Wildtyp

Als möglicher Regulationsmechanismus einer aberranten BAALC-Expression wurde die Regulation durch microRNAs diskutiert. Insbesondere die miRNA-148a könnte als negativer Regulator der BAALC-Expression fungieren. So zeigten Langer und Mitarbeiter eine negative Korrelation der BAALC-Expression mit der Expression der miRNA-148a in AML-Patienten.¹⁰⁰ Darüber hinaus konnte in Melanomzelllinien gezeigt werden, dass Mutationen (V600E) im BRAF-Gen (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) mit einer erhöhten BAALC-Expression einhergehen.¹⁰¹

2 Fragestellung und Zielsetzung

Akute Leukämien stellen klinisch wie molekulargenetisch sehr heterogene Erkrankungen dar. Basierend auf der Identifizierung zytogenetischer Aberrationen konnten spezifische molekulare Alterationen entschlüsselt und Gene mit pathogenetischer Relevanz identifiziert werden. Unabhängig von den zytogenetischen Veränderungen konnten Mutationen und alterierte Expressionsmuster von Genen ebenfalls der Leukämogenese zugeordnet werden. Dies erlaubte in den letzten Jahren eine Charakterisierung von molekularen Risikogruppen mit verbesserten risikostratifizierten Therapiekonzepten. Dennoch stellt die akute Leukämie eine Erkrankung mit schlechter Prognose im Erwachsenenalter dar. Es ist daher dringend erforderlich weitere molekulare Marker für die nicht weiter charakterisierten Subgruppen der akuten Leukämie zu identifizieren, um so eine bessere risikoadaptierte Behandlung zu ermöglichen. Zum anderen ist es notwendig die funktionellen Mechanismen der Leukämogenese zu klären, um Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer molekularer Therapieansätze (*targeted therapies*) zu liefern.

Auf Grund der besonderen klinischen Relevanz von *BAALC* als molekularer Prognosefaktor bei der CN-AML und der T-ALL war das Ziel dieser Arbeit sowohl die weitergehende prognostische Charakterisierung von *BAALC* und dessen assoziierten Genen als auch die Identifizierung neuer prognostischer Marker in akuten Leukämien. Darüber hinaus sollten vor allem funktionelle Untersuchungen Einblicke in die *BAALC*-assoziierten Pathomechanismen geben und neue Zielstrukturen identifiziert werden.

Vor diesem Hintergrund sollten in der vorliegenden Dissertationsarbeit nachfolgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Prognostische Wertigkeit von *BAALC* in der B-ALL

Sowohl für CN-AML-Patienten als auch für T-ALL-Patienten konnte eine erhöhte *BAALC*-Expression mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert werden. Die prognostische Relevanz von *BAALC* in den zwei unterschiedlichen Leukämieformen deutet auf einen linienunabhängigen Pathomechanismus der Leukämogenese hin. Darauf basierend sollte die prognostische Bedeutung von *BAALC* in einem großen Patientenkollektiv mit B-ALL untersucht werden und mögliche transkriptionelle Veränderungen durch Pathway-Untersuchungen mit Hilfe von Mikroarray-Analysen entschlüsselt werden.

2. Identifizierung neuer prognostischer Marker in der T-ALL und deren Assoziation mit *BAALC*

Im Gegensatz zur AML sind für die Mehrzahl der T-ALL-Patienten keine molekulargenetischen Risikofaktoren bekannt, die eine genauere Einschätzung des Rezidivrisikos der Patienten (insbesondere Patienten mit Standardrisiko-ALL) und so eine risikoadaptierte Behandlung ermöglichen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher molekulargenetische Veränderungen bei T-ALL-Patienten identifiziert werden, um eine bessere Einteilung in Risikogruppen zu gewährleisten, welche zur Therapiestratifizierung dieser Subgruppe herangezogen werden können. Für die große Subgruppe der CN-AML konnte bereits gezeigt werden, dass Mutationen im *WT1*-Gen bei 11% der Patienten auftreten und mit einem schlechten Gesamtüberleben assoziiert sind. Weiterhin zeigten Patienten mit *WT1*-Mutationen eine signifikant höhere *BAALC*-Expression.⁵⁴ Aufgrund der linienübergreifenden Bedeutung von *BAALC* sollte an Hand einer großen Patientenkohorte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, inwiefern Mutationen des *WT1*-Gens auch bei der T-ALL existent sind und möglicherweise mit einer aberranten Expression von *WT1* einhergehen. Darauf aufbauend sollte dann die prognostische Bedeutung des Gens weiter untersucht werden. Insbesondere sollte dabei die Korrelation zur *BAALC*-Expression Aufschluss über mögliche Pathomechanismen geben. Darüber hinaus sollten im Sinne des Multi-Hit-Modells weitere molekulargenetische Risikofaktoren in der T-ALL untersucht werden, die bei der AML bereits beschrieben sind (*FLT3*, *NOTCH1*, *FBXW7*).

3. Funktionelle Bedeutung von *BAALC* in der Hämatopoese und Leukämogenese sowie Pathwayanalysen und Identifikation *BAALC*-assoziierter Gene

Neben der Untersuchung der prognostischen Relevanz von *BAALC* bei der B-ALL und Analysen zur Identifizierung weiterer molekulargenetischer Veränderungen in der T-ALL, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Funktion von *BAALC* in der Hämatopoese und Leukämogenese untersucht werden. Funktionelle *in vitro* Studien sollten Einblicke in die zugrunde liegenden *BAALC*-assozierten Pathomechanismen geben, sowie die Regulationsmechanismen einer aberranten *BAALC*-Expression klären. Hierbei sollten die Auswirkungen einer forcierten Überexpression sowie eines Verlustes (durch *in vitro* Knockdown) von *BAALC* auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von hämatopoetischen Zellen analysiert werden. Die Ergebnisse der klinischen Studien und Genexpressionsstudien legen eine Assoziation zwischen einer gesteigerten *BAALC*-

Expression und einem schlechten Ansprechen bzw. einer Korrelation zwischen *BAALC* und einer Multi-Drug-Resistenz nahe. In der vorliegenden Arbeit sollten daher die molekularen Grundlagen einer *BAALC*-assoziierten Zytostatikaresistenz untersucht werden. Substanzen mit neuen, molekularen Wirkmechanismen sollten zudem *in vitro* auf deren Effektivität und Nutzen zur Überwindung der *BAALC*-vermittelten Zytostatikaresistenz getestet werden. Des Weiteren sollten die Mechanismen der Transkriptionsregulierung von *BAALC* mittels Mutationsanalyse und *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP)-Analyse sowie die posttranskriptionelle Regulierung durch miRNAs untersucht werden.

Darüber hinaus sollten globale Genexpressionsprofile von *in vitro* differenzierten CD34 positiven, selektierten Zellen sowie von CN-AML und T-ALL-Patienten *BAALC*-assoziierte Gene identifizieren, die möglicherweise funktionell an der *BAALC*-assoziierten Zytostatikaresistenz beteiligt sind. Darauf aufbauend sollte die Bedeutung dieser Gene in der Hämatopoese und Leukämogenese *in vitro* untersucht werden.

3 Darstellung der Arbeit

Folgende Publikationen wurden in dieser Arbeit zusammengefasst:

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**; 115(18):3737-3744.

Heesch S, Gökbuget N, Stroux A, Ortiz Sanchez J, Schlee C, Burmeister T, Schwartz S, Blau O, Keilholz U, Busse A, Hoelzer D, Thiel E, Hofmann WK, Baldus CD. Prognostic implications of mutations and expression of the Wilms tumor 1 (WT1) gene in adult acute T-lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **2010**; 95(6):942-949

Heesch S, Schlee C, Neumann M, Stroux A, Kühnl A, Schwartz S, Haferlach T, Gökbuget N, Hoelzer D, Thiel E, Hofmann WK, Baldus CD. *BAALC*-associated gene expression profile define *IGFBP7* as a novel molecular target in acute leukemia. *Leukemia* **2010**; doi: 10.1038/leu.2010.130

Die vollständigen Publikationen sind dieser Arbeit als Anhang beigefügt.

3.1 Manuskript: “High *BAALC* expression predicts chemoresistance in adult B-precursor acute lymphoblastic leukemia”

Durch die Einführung risikostratifizierter Therapieprotokolle in die Behandlung der B-ALL konnte die Rate an kompletten Remissionen auf ca. 93% der Patienten erhöht werden. Dennoch ist das Langzeitüberleben der Patienten mit 27-54% weiterhin unbefriedigend.⁷⁰ Die Identifizierung neuer prädiktiver molekularer Marker ist insbesondere für Patienten der klinisch und biologisch sehr heterogenen Standardrisikogruppe von besonderer Bedeutung, um eine verbesserte Therapiestratifikation zu ermöglichen. Denn obwohl diese Patienten keine klinischen oder molekularen Risikofaktoren aufweisen (u.a. *BCR-ABL*-, *MLL-AF4*-negativ), ist die Prognose dieser Patienten mit einem Langzeitüberleben von nur 40-60% nicht zufrieden stellend.^{67,70} In vorangegangenen Studien konnte bereits die prognostische Bedeutung von *BAALC* sowohl in der CN-AML als auch in der T-ALL gezeigt werden.^{96,98,100} Aufgrund dieser linienunabhängigen prognostischen Relevanz sollte in dieser Arbeit die Expression und die prognostische Wertigkeit von *BAALC* in der B-ALL untersucht werden.

Vor diesem Hintergrund wurden 368 Knochenmarkproben von erwachsenen Patienten mit neu diagnostizierter B-ALL, die im Rahmen der *German Multicenter Acute Lymphoblastic Leukemia Study Group* (GMALL) Studien 06/99 und 07/03 behandelt wurden, analysiert.⁶⁹ Die RNA-Isolation der diagnostischen Knochenmarkaspirate erfolgte mit Hilfe des RNAeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Gesamt-RNA wurde durch eine Reverse Transkriptase Reaktion in cDNA konvertiert und das *BAALC*-Expressionslevel mittels qRT-PCR bestimmt. Die Quantifizierung wurde auf dem Real-Time Cycler Rotor-Gene RG3000 (Corbett Research, Wasserburg, Deutschland) unter Ko-Amplifikation des Housekeeping Gens *glucose-phosphate isomerase* (*GPI*) durchgeführt. Die relative Expression von *BAALC* wurde mittels der *comparative cycle threshold* (Ct) Methode berechnet ($\Delta Ct = GPI - BAALC$) und der relative Expressionswert jeder Probe als $2^{-\Delta Ct}$ ausgedrückt. Für die weitere statistische Auswertung (SPSS Software, Version 17.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und Korrelation der *BAALC*-Expression mit klinischen und molekularen Parametern erfolgte eine Einteilung der Patienten in Terzile (T1-T3) entsprechend den *BAALC*-Expressionswerten. Darüber hinaus wurden globale Genexpressionsstudien durchgeführt und differentiell exprimierte Gene von Patienten mit hoher und niedriger *BAALC*-Expression verglichen. Die

Hybridisierung (HG-U133 Plus 2.0; Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) der Proben erfolgte im Rahmen der *Microarray Innovations in LEukemia* (MILE)-Multizentrumstudie I.¹⁰² Zur Datenanalyse wurde die GeneSpring Software 4.2 (Silicon Genetics, Redwood City, CA, USA) verwendet.

Patienten mit hoher *BAALC*-Expression waren gekennzeichnet durch ein höheres Alter ($P < 0,001$), eine hohe initiale Leukozytenzahl ($P = 0,008$), Expression des Oberflächenmarkers CD34 ($P = 0,001$) sowie Vorhandensein von *BCR-ABL* ($P < 0,001$) und *MLL-AF4* ($P < 0,001$) Rearrangements. Im Vergleich zu Patienten mit geringer *BAALC*-Expression zeigten Patienten mit hoher *BAALC*-Expression ein schlechteres Ansprechen auf die primäre Induktionschemotherapie sowohl in der gesamten Patientenkohorte ($P = 0,002$) als auch in der Gruppe der *BCR-ABL*- und *MLL-AF4*-negativen Patienten ($P = 0,01$). Eine hohe *BAALC*-Expression in der *BCR-ABL*- und *MLL-AF4*-negativen Subgruppe war zudem assoziiert mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben (*overall survival*: OS, 5-Jahres OS: T3: 38% vs T2: 52% vs T1 70%; $P = 0,004$). Hinsichtlich des Gesamtüberlebens erwies sich *BAALC* in der multivariaten Analyse als unabhängiger prognostischer Marker in *BCR-ABL*- und *MLL-AF4*-negativen Patienten ($P = 0,03$). Darüber hinaus zeigte sich für *BCR-ABL*- und *MLL-AF4*-negative Patienten mit hoher *BAALC*-Expression ein besonders großer Überlebensvorteil durch eine allogene Stammzelltransplantation.

In den globalen Genexpressionsstudien der Subgruppe *BCR-ABL*- und *MLL-AF4*-negativer Patienten konnten insgesamt 43 *BAALC*-assoziierte, differentiell exprimierte Gene identifiziert werden. Eine hohe *BAALC*-Expression war sowohl assoziiert mit einer stärkeren Expression von hämatopoetischen Stammzellmarkern wie zum Beispiel *CD34*, *CD99*, *FZD6*, als auch von chemotherapieresistenz-assoziierten Genen (*TSPAN7*, *LYN*). Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass *BAALC* einen neuen molekularen Marker der B-ALL darstellt und eine neue Subgruppe innerhalb der *BCR-ABL*- und *MLL-AF4*-negativen Patienten definiert. Diese Patienten zeigen ein schlechtes Therapieansprechen und Gesamtüberleben und könnten möglicherweise von alternativen Therapiestrategien profitieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Kühnl zur Datengenerierung, Auswertung und Erstellung des Manuskriptes beigetragen. Die Immunphänotypisierung und die molekulargenetischen Analysen (*BCR-ABL* und *MLL-AF4*) der Patientenproben wurde im zentralen GMALL-Referenzlabor der Charité, Berlin durchgeführt.

3.2 Manuskript: “Prognostic implications of mutations and expression of the *Wilms tumor 1 (WT1)* gene in adult acute T-lymphoblastic leukemia”

Für die T-ALL konnten bis jetzt nur wenige molekulargenetische Marker mit prognostischer Relevanz identifiziert werden. Die Langzeitüberlebensraten bei der adulten T-ALL von lediglich 30-40% sind äußerst unbefriedigend.⁶⁷ Auf Grund der klinischen Heterogenität der T-ALL ist jedoch anzunehmen, dass verschiedene spezifische genetische Veränderungen der T-ALL zu Grunde liegen, die darüber hinaus von prognostischer Relevanz sein könnten.

Für die große Subgruppe der CN-AML konnte bereits gezeigt werden, dass Mutationen im *WT1*-Gen bei 10-15% der Patienten auftreten und mit einem schlechten Gesamtüberleben assoziiert sind.⁵³⁻⁵⁵ Weiterhin zeigten Patienten mit *WT1*-Mutationen eine signifikant höhere *BAALC*-Expression.⁵⁴ Die prognostische Bedeutung der *WT1*-Expression wurde hingegen in verschiedenen Studien kontrovers diskutiert.⁵⁶⁻⁵⁸ Die Bedeutung von *WT1* als stammzell-assoziiertes Gen sowie die Assoziation mit *BAALC* legen nahe, dass *WT1* auch bei anderen akuten Leukämien von Bedeutung sein könnte.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob Mutationen und eine aberrante Expression des *WT1*-Gens in der T-ALL identifiziert werden können und inwiefern diese eine prognostische Rolle spielen. Darüber hinaus sollte die Korrelation zur *BAALC*-Expression Aufschluss über mögliche Interaktionen und damit verbundene Pathomechanismen geben. Entsprechend der Multi-Hit-Hypothese der Leukämogenese, wurden *WT1*-Alterationen im Kontext anderer genetischer Veränderungen untersucht. Insgesamt wurden 252 Patienten mit neu diagnostizierter T-ALL (GMALL Studien 06/99 und 07/03)⁶⁹ hinsichtlich des Mutationsstatus und des Expressionslevels des *WT1*-Gens analysiert. Des Weiteren wurden Mutationsanalysen der Gene *NOTCH1*, *FBXW7* und *FLT3* durchgeführt und die mRNA-Expression von *HOX11*, *HOX11L2*, *BAALC* und *ERG* quantitativ gemessen. Die Isolation genomischer DNA und RNA aus diagnostischen Knochenmarkaspiraten erfolgte mittels TRIzol[®] Reagenz (Invitrogen[™], Karlsruhe, Deutschland).

Entsprechend der Literatur sind *WT1*-Mutationen in der AML hauptsächlich im Exon 7 und 9 der DNA-Bindungsdomäne beschrieben, daher beschränkte sich die Mutationsanalyse in der vorliegenden Arbeit auf diese Regionen.^{54,55} Zur Amplifikation des gesamten Exon 7 und 9 mittels PCR unter Verwendung des Enzyms *Taq* Polymerase (Ampli[™]Taq Gold; Applied Biosystems Foster City, CA, USA) wurden intronspannende Primer verwendet. Die PCR-

Produkte wurden hinsichtlich der Größe des Amplikons kontrolliert und anschließend aufgereinigt (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Martin Meixner am Institut für Genetik der Humboldt-Universität zu Berlin unter Verwendung der entsprechenden Sequenzierprimer durchgeführt. Die Analyse der Sequenzen erfolgte mittels Vector NTI[®] Software (Invitrogen[™], Karlsruhe, Deutschland) unter Abgleich der Referenzsequenz (NM_024426). Mutationen wurden durch Klonierung des PCR-Produktes in den pCR2.1- TOPO Vector (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen[™], Karlsruhe, Deutschland) und anschließender Transformation in kompetente *E.coli* (Stamm: F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*araleu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*) verifiziert. Die nachfolgende Kultivierung der Bakterien erfolgte unter Blau-Weiß-Selektion (X-Gal/ β -Galactosidase) mit anschließender Sequenzierung von bis zu 14 unabhängigen Klonen. Exemplarisch ist in der **Abbildung 8** die Sequenzanalyse eines T-ALL-Patienten dargestellt.

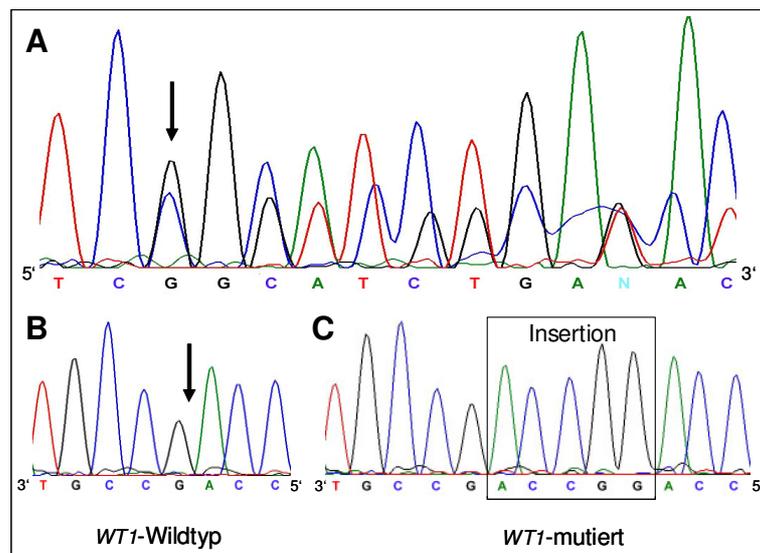


Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der Mutationsanalyse eines T-ALL-Patienten. (A) Identifizierung der Mutation durch Direktsequenzierung des Exon 7. Der Pfeil kennzeichnet den Beginn der Mutation, die Position 1350 des *WT1*-Gens. Durch Klonierung des PCR-Produktes in den pCR2.1- TOPO Vector wurden die Mutationen bestätigt. (B) zeigt die Sequenz des *WT1*-Wildtyps (C) zeigt die *WT1*-Mutation, eine Insertion von 5 Basenpaaren. Diese Mutation führt zur Leserasterverschiebung und Entstehung eines Stoppcodons.

Die Quantifizierung der mRNA-Expression des *WT1*-Gens erfolgte durch qRT-PCR. Hierbei wurden die Primer so gewählt, dass alle Isoformen des Gens amplifiziert werden konnten. Die relative Expression von *WT1* wurde mittels der Ct-Methode berechnet bei Ko-Amplifikation des Housekeeping Gens *beta-glucuronidase* (*GUS*) (Δ Ct = *GUS* – *WT1*) und der relative

Expressionswert jeder Probe als $2^{\Delta\Delta Ct}$ ausgedrückt. Eine weitere molekulare Charakterisierung der Patientenproben erfolgte durch Mutationsanalysen der Gene *NOTCH1* und *FBXW7* durch Direktsequenzierung der am häufigsten mutierten Regionen (*NOTCH1*: HD-Domäne, PEST-Domäne und TAD-Domäne; *FBXW7*: Exon 8 und 9) sowie des *FLT3*-Gens (ITD und TKD835) unter Verwendung des *FLT3*-Mutationsassays (*InVivoScribe* Technologies, San Diego, USA). Die Expression von *HOX11*, *HOX11L2*, *BAALC* und *ERG* wurde anhand qRT-PCR zusätzlich in allen Patientenproben bestimmt. Eine statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels SPSS Software, Version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

WT1-Mutationen konnten in insgesamt 20 (8%) der untersuchten 238 T-ALL-Patienten identifiziert werden. Dabei wiesen alle 20 Patienten eine Mutation des Exon 7 auf, 2 Patienten zeigten zusätzlich eine Mutation im Exon 9. Es handelte sich hierbei vorwiegend um heterozygote Mutationen, die im Rahmen dieser Arbeit erstmalig beschrieben wurden. Die Positionen der Mutationen entsprachen denen der AML. Die Mutationen im Exon 7 waren Leserasterverschiebungen bzw. *Nonsense*-Mutationen, welche zur Entstehung eines Stoppcodons führen und daher zu einem Abbruch der Proteinsynthese. Bei den Mutationen im Exon 9 handelte es sich dagegen um *Missense*-Mutationen und damit lediglich einen Aminosäureaustausch. Patienten mit *WT1*-Mutationen zeigten einen unreifen Immunphänotyp (45% der *WT1*-mutierten Patienten zeigten eine unreife T-ALL im Vergleich zu 25% der nicht mutierten Patienten; $P = 0,07$) und eine erhöhte Expression des Oberflächenmarkers CD34 ($P = 0,02$). Darüber hinaus ließ sich bei diesen Patienten häufiger eine aberrante Ko-Expression des myeloischen Markers CD13 ($P = 0,03$) nachweisen. Des Weiteren zeigten Patienten mit *WT1*-Mutation eine aberrante Expression von *HOX11L2* ($P < 0,001$) und eine signifikant höhere *WT1*-mRNA-Expression ($P < 0,001$) im Vergleich zu *WT1*-Wildtyp-Patienten. Eine signifikante Korrelation des *WT1*-Mutationsstatus und der Expression der molekularen Risikofaktoren *ERG*, *BAALC* und *HOX11* konnte allerdings nicht gezeigt werden. Die Frequenz von *FLT3*-Mutationen war bei Patienten mit vorliegender *WT1*-Mutation höher als bei Patienten mit dem *WT1*-Wildtypgen, wohingegen sich kein Unterschied in der Mutationsfrequenz der Gene *NOTCH1* und *FBXW7* fand. Hinsichtlich der Remissionsrate, des rezidivfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen T-ALL-Patienten mit *WT1*-Mutationen und *WT1*-Wildtyp zeigen. Bei der Subgruppenanalyse der thymischen T-ALL (Standardrisiko) rezidierten allerdings 80%

(4/5) der *WT1*-mutierten Patienten im Vergleich zu nur 28% (25/89) der Patienten mit *WT1*-Wildtyp ($P = 0,01$).

Zur weiteren statistischen Auswertung der generierten *WT1*-mRNA-Expressionsdaten erfolgte eine Einteilung entsprechend der *WT1*-Expressionswerte in drei Expressionsgruppen [fehlende *WT1*-Expression, mittlere *WT1*-Expression (\triangleq physiologischer Expression) und hohe *WT1*-Expression]. T-ALL-Patienten mit einer aberranten *WT1*-Expression, d.h. mit einer hohen Expression oder fehlender Expression, zeigten eine höhere Rezidivrate und ein schlechteres Überleben im Vergleich zu Patienten, die eine intermediäre *WT1*-Expression aufwiesen ($P = 0,001$). Interessanterweise zeigten Patienten der Hochrisikogruppe (fehlende oder erhöhte *WT1*-Expression), die eine konsolidierende Stammzelltransplantation erhalten hatten, eine bessere 4-Jahresüberlebensrate (62%) als die Patienten, die ausschließlich mit einer rein chemotherapie-basierten Konsolidierung behandelt worden waren (36%). Auch in der multivariaten Analyse war eine aberrante *WT1*-Expression ein signifikanter, unabhängiger Prognosemarker hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens ($P = 0,009$). Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass *WT1*-Mutationen in der T-ALL mit einer ähnlichen Häufigkeit und in gleichen Regionen gefunden wurden wie bei der AML, jedoch sind diese von geringerer prognostischer Wertigkeit als bei der AML. Im Gegensatz dazu konnte erstmalig eine aberrante *WT1*-Expression als ein signifikanter Prognosemarker hinsichtlich eines schlechteren Gesamtüberlebens in der T-ALL identifiziert werden.

Die vorliegende Arbeit umfasste die Planung und Durchführung der Mutations- (*WT1*, *NOTCH*, *FBXW7*) und Expressionsanalysen (*WT1*, *BAALC*, *ERG*). *HOX11*- und *HOX11L2*-Expressionsdaten wurden in Kooperationsarbeit mit Herrn Dr. Thomas Burmeister generiert. Die *FLT3*-Mutationsanalysen erfolgten in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Olga Blau. Sämtliche Patientenproben wurden durch das zentrale GMALL-Referenzlabor der Charité, Berlin immunphänotypisiert. Statistische Auswertungen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dipl.-Math. Andrea Stroux durchgeführt. Alle Auswertungen bezüglich dieses Manuskriptes waren eigenständige Arbeiten sowie dessen Erstellung und Korrektur.

3.3 Funktionelle Untersuchungen zur Bedeutung von *BAALC* in der Hämatopoese und Leukämogenese

In vorangegangenen Studien und im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit konnte sowohl die prognostische Bedeutung von *BAALC* als auch eine *BAALC*-assoziierte Chemotherapieresistenz in akuten Leukämien unabhängig von der Linienzugehörigkeit (myeloisch, T- oder B- lymphoblastisch) dargelegt werden. Neben der Identifizierung von neuen molekularen Markern ist die Offenlegung der involvierten Pathomechanismen von besonderer Bedeutung, um zum Verständnis der Leukämogenese beizutragen und um neue therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren. Weitere Studien im Rahmen dieser Dissertationsarbeit sollten daher die funktionelle Rolle von *BAALC* in der Hämatopoese und Leukämogenese klären und Regulationsmechanismen einer aberranten *BAALC*-Expression offen legen.

Durch Genexpressionsanalysen konnte unter anderem die aberrante Expression von *BAALC* in verschiedenen hämatologischen Erkrankungen im Vergleich zu gesunden Personen dargelegt werden (*Abbildung 9*).

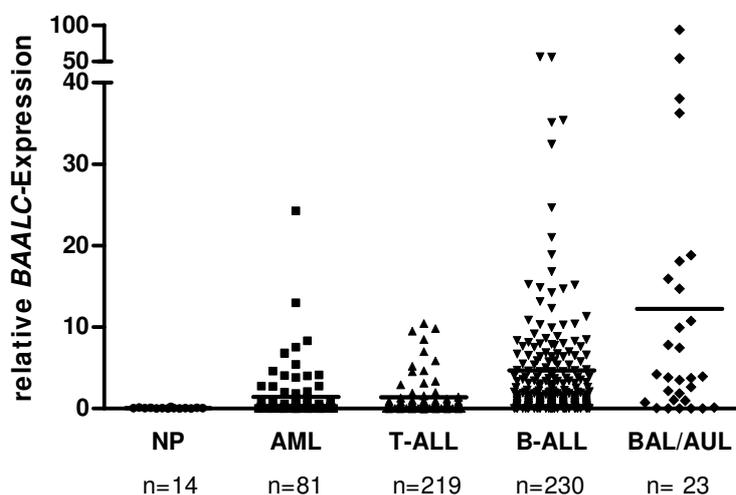


Abbildung 9. *BAALC-Expression in verschiedenen hämatologischen Erkrankungen.* *BAALC*-Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR bestimmt unter Ko-Amplifikation des Housekeeping Gens *GPI* und mittels der Ct-Methode berechnet ($\Delta\text{Ct} = \text{GPI} - \text{BAALC}$), der relative Expressionswert jeder Probe wurde als $2^{\Delta\text{Ct}}$ ausgedrückt. Gegenüber Normalpersonen (NP) zeigen akute Leukämien eine sehr heterogene *BAALC*-Expression.

Untersuchungen von SNPs in einer vorangegangenen Studie konnten eine Assoziation zwischen einer spezifischen Allelfrequenz und einer Prädisposition für das Auftreten einer AML zeigen; in dieser Hinsicht wurde dem SNP rs2256164 in der *BAALC*-Promotorregion

eine prädiktive Wertigkeit zugeschrieben.¹⁰³ Die Bedeutung des *BAALC* SNP rs2256164 wurde daher in dieser Arbeit in einer größeren Kohorte von AML Patienten (n = 73) sowie Normalpersonen (n = 38) mittels Pyrosequenzierung (PyroMark Q96 ID System und PyroMark Gold Q96 reagents kit, Biotage, Uppsala, Schweden) untersucht und in Bezug zur *BAALC*-Expression gesetzt. Ein Einfluss der Allelfrequenz auf das Expressionsverhalten von *BAALC* konnte jedoch nicht gezeigt werden, ebenso wenig wie eine Assoziation des SNPs mit klinischen oder molekularen Parametern. Dem SNP rs2256164 in der *BAALC*-Promotorregion konnte somit weder eine prognostische noch eine regulatorische Bedeutung zugeschrieben werden.

Des Weiteren konnten Untersuchungen an Melanomzelllinien einen möglichen Zusammenhang zwischen dem *BRAF*-Signaltransduktionsweg und *BAALC* aufzeigen: die *BRAF*-Mutation V600E war mit einer signifikant gesteigerten *BAALC*-Expression in Melanomzelllinien assoziiert.¹⁰¹ Hinweise auf die *BRAF*-Mutation V600E in akuten Leukämien ergab eine Arbeit von Gustafsson und Kollegen.¹⁰⁴ So konnte gezeigt werden, dass diese Mutation in 67% (in 2 von 3 Fällen) der kindlichen T-ALL vorkommt. Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit Mutationsanalysen des *BRAF*-Gens an einer großen Kohorte von adulten T-ALL-Patienten (n = 63) mit erhöhter *BAALC*-Expression durchgeführt. Mutationen im *BRAF*-Gen konnten jedoch nicht identifiziert werden und somit ein Zusammenhang mit der *BAALC*-Expression nicht hergestellt werden. *BRAF*-Mutationen in der adulten T-ALL sind folglich nicht verantwortlich für eine gesteigerte *BAALC*-Expression in akuten Leukämien.

Einen weiteren möglichen Mechanismus einer aberranten *BAALC*-Expression stellt die Regulation durch miRNAs dar. Mittels verschiedener Datenbanken (mirBase <http://microrna.sanger.ac.uk> und Human microRNA targets <http://www.microrna.org>), welche eine mögliche Bindungsaffinität einer miRNA in der 3'-UTR der *BAALC*-mRNA-Sequenz prädiktieren, wurde die miRNA-148a identifiziert. Diese wurde bereits mit der *BAALC*-Expression in AML-Patienten assoziiert.¹⁰⁰ Eine *in vitro* Überexpression der miRNA-148a (Pre-miRTM miRNA precursor molecules; Applied Biosystems/Ambion, Darmstadt, Deutschland) in myeloblastischen Zelllinien konnte jedoch keinen Einfluss auf das Expressionsverhalten von *BAALC* zeigen.

In Überexpressionsstudien und Knockdown-Versuchen wurde die funktionelle Bedeutung von *BAALC* näher untersucht. Überexpressionsstudien umfassten die Klonierung der *BAALC* cDNA-Sequenz gekoppelt mit einer *GFP*-kodierenden Sequenz (*green fluorescence protein*,

als Kontrolle der Transfektionseffizienz) in den *murine stem cell virus* (MSCV)-Vektor. Eine stabile Integration und Expression dieser Konstrukte in den Zielzellen konnte mittels retroviraler Infektion und nachfolgender Selektion unter Puromycin bzw. mittels FACS-Sortings (*fluorescence activated cell sorting*) erzielt werden. Die so generierte *BAALC*-überexprimierende myeloische Zelllinie HL60 (HL60-MSCV-*BAALC*) und die lymphoblastische Zelllinie Jurkat (Jurkat-MSCV-*BAALC*) wurden anschließend auf ihr Proliferationsverhalten im Vergleich zu den Kontrollzelllinien (HL60-MSCV-*GFP* und Jurkat-MSCV-*GFP*) unter Verwendung von BrdU- (BD Pharmingen™ BrdU Flow Kit, Heidelberg, Deutschland) und WST-1-Assays (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), sowie durch Zellzyklusanalysen (ModFitLT™ Software) analysiert. Ein Einfluss einer forcierten *BAALC*-Expression auf das Proliferationsverhalten konnte nicht gezeigt werden. Vergleichbare Ergebnisse wurden in Folgeexperimenten gewonnen.

Die *BAALC*-Überexpression ergab jedoch Hinweise auf einen möglichen Resistenzmechanismus. In Apoptoseassays (PE Annexin V Apoptosis Detection Kit PE und Active Caspase-3 Apoptosis Kit, BD Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland) zeigten *BAALC*-überexprimierende Zelllinien tendenziell ein geringeres Ansprechen gegenüber den herkömmlichen Zytostatika wie Cytosinarabinosid, Etoposid und Daunorubicin. Hingegen zeigte sich eine ähnliche Empfindlichkeit gegenüber neuen Substanzen wie u. a. Tyrosinkinase-Inhibitoren [Dasatinib, Nilotinib, Sorafenib, ZK304709 (Bayer Schering Pharma)]. Eine *BAALC*-assoziierte Zytostatikaresistenz *in vitro* konnte in Folgeversuchen unter Verwendung von weiteren Zelllinienmodellsystemen jedoch nicht bestätigt werden. Darüber hinaus zeigten vergleichende Genexpressionsanalysen (*BAALC*-überexprimierende Zellen vs Kontrollzelllinien) keine Unterschiede im spezifischen Expressionsmuster von zytostatikaresistenz-assoziierten Genen (RT²Profiler™ PCR Array: Human Cancer Drug Resistance and Metabolism; SABiosciences, Frederick, USA).

Knockdown-Versuche sollten des Weiteren die Funktion von *BAALC* in der Hämatopoese und Leukämogenese klären. Dieser Fragestellung wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl durch den transienten Knockdown von *BAALC* mittels verschiedener siRNA-Systeme [Dharmacon: ON-TARGETplusSMARTpool; Ambion: Silencer® siRNA Cocktail Kit (RNase III)] als auch mittels stabilem Knockdown durch Klonierung einer *BAALC*-spezifischen miRNA (BLOCK-iT Pol II miRNAi Expression Vector Kit, Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland) in ein Lentivirales System mittels Gateway® Technologie (BLOCK-iT Lentiviral Pol II miRNAi Expression System, Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland)

nachgegangen. Knockdown-Versuche mittels siRNA führten zwar zur Suppression der mRNA-Expression um bis zu 80%, jedoch zeigten nachfolgende Untersuchungen des Proliferations- und Apoptoseverhaltens keine Auswirkung der *BAALC*-Suppression auf Leukämiezelllinien.

Durch Transfektion (Nucleofector System, Lonza Köln AG, Köln, Deutschland) primärer CD34 positiver Progenitorzellen wurde untersucht, inwieweit *BAALC* Einfluss auf das Differenzierungsverhalten hämatopoetischer Zellen hat. Hierzu wurden zunächst mononukleäre Zellen aus Knochenmarkaspiraten von gesunden Spendern gewonnen. CD34 positive Zellen wurden anschließend durch immunmagnetische Anreicherung isoliert (MACS CD34 Isolations-Kit, MACS Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) und mit siBAALC bzw. der Kontroll-siRNA (siGFP) transfiziert. Hierbei konnte ein Knockdown der *BAALC*-mRNA um bis zu 60% erreicht werden. In Kolonie-Assays (*colony forming units*, CFU-Assay) wurde anschließend analysiert, inwieweit eine induzierte Suppression von *BAALC* das Koloniewachstum von hämatopoetischen Progenitorzellen beeinflusst. Hierzu wurden die transfizierten Zellen in Methylcellulose (Methocult, StemCell Technologies, Köln, Deutschland; supplementiert mit entsprechenden Zytokinen) ausgesät und über 14 Tage kultiviert. In wiederholten CFU-Experimenten zeigte sich jedoch kein eindeutiger Effekt, so dass davon ausgegangen werden muss, dass *BAALC* keinen direkten Einfluss auf das Differenzierungsverhalten von hämatopoetischen Progenitorzellen hat.

Zur Untersuchung des Einflusses von *BAALC* auf die globale Genexpression in hämatopoetischen Zellen und zur Charakterisierung von *BAALC*-assoziierten Pathways wurden Expressionsprofile von *BAALC* defizienten CD34 positiven Zellen (= siBAALC; *BAALC*-Knockdown) mit der Kontrolle (= siGFP, *BAALC*-naive) und von unmanipulierten CD34 positiven Zellen erstellt und anschließend ein Vergleich der Genexpressionsprofile vorgenommen. Die Hybridisierung der Zellen erfolgte auf den Affymetrix-U133 plus 2.0 Chip (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) und die Auswertung mittels GeneSpring Software (Silicon Genetics, Redwood City, CA, USA). Differentiell exprimierte Gene konnten jedoch nicht identifiziert werden. Basierend auf diesen Ergebnissen scheint es wahrscheinlich, dass *BAALC* keinen aktiven Expressionsmodulator darstellt.

Zusammenfassend wird deutlich, dass *BAALC* keine aktive, funktionelle Rolle in der Hämatopoese und Leukämogenese zugeschrieben werden konnte und *BAALC* vor diesem Hintergrund am ehesten einen passiven *bystander* mit jedoch relevanter prognostischer Signifikanz in akuten Leukämien darstellt.

3.4 Manuskript: “*BAALC*-associated gene expression profiles define *IGFBP7* as a novel molecular target in acute leukemia”

Funktionelle Studien im Rahmen dieser Promotionsarbeit (Daten nicht publiziert, auf die Methoden und die Ergebnisse wurde in Abschnitt 3.3 kurz eingegangen) konnten *BAALC* keine aktive Funktion zuordnen. Daher ist anzunehmen, dass *BAALC* einen Surrogatmarker darstellt und andere ko-regulierte Signalwege für die Chemoresistenz verantwortlich sind.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden zunächst Genexpressionsprofile untersucht und *BAALC*-assoziierte Gensignaturen von T-ALL- und AML-Patientenproben charakterisiert sowie Gene identifiziert, die während der normalen hämatopoetischen Differenzierung einen *BAALC*-ähnlichen Expressionsverlauf zeigten (*Abbildung 10*). Hierzu wurden zunächst aus Rohdaten der MILE-Multizentrumsstudie-I *BAALC*-assoziierte Genexpressionsprofile von 86 T-ALL-Proben erstellt.¹⁰² Alle Mikroarrays (HG-U133 Plus 2.0; Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) erfüllten die MIAME Standards (*Minimal Information to Annotate a Microarray Experiment*)¹⁰⁵ und die Auswertung der Mikroarraydaten erfolgte unter Verwendung der GeneSpring Software 4.2 (Silicon Genetics, Redwood City, CA, USA). Zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene erfolgte die Einteilung der T-ALL-Proben auf dem Boden der *BAALC*-Expression (ermittelt aus dem Median der 2 *BAALC* repräsentierenden *probe sets*: 218899_s_at und 222780_s_at) in Quartile (Q1-Q4) mit einer niedrigen Expression in den Quartilen Q1-Q3 (low *BAALC* Gruppe) und der höchsten Expression in Q4 (high *BAALC* Gruppe). Insgesamt konnten 56 Gene identifiziert werden, die eine 3-fach gesteigerte Expression in der high *BAALC* Gruppe gegenüber den *BAALC* niedrig exprimierenden Proben der Gruppe Q1-Q3 aufwiesen ($P \leq 0,05$). Aus kürzlich publizierten Daten¹⁰⁶ zur *in vitro* Differenzierung von normalen CD34 positiven Zellen konnten 239 Gene identifiziert werden, die während der normalen hämatopoetischen Differenzierung einen *BAALC*-ähnlichen Expressionsverlauf zeigten (Korrelationskoeffizient $\leq 0,95$). Diese Genliste und die *BAALC*-assoziierten Gene in der T-ALL wurden anschließend mit der *BAALC*-Gensignatur von CN-AML-Proben¹⁰⁰ (149 differentiell exprimierte Gene mit mind. 1.3-facher Überexpression in der high *BAALC* Gruppe) abgeglichen.

Der Abgleich dieser *BAALC*-assoziierten Gensignaturen führte zur Identifizierung von 5 Genen und einem *open reading frame* (*BAALC*, *CD34*, *CD133*, *NPR3*, *IGFBP7* und *C5orf23*), die ein *BAALC*-ähnliches Expressionsmuster in allen drei Entitäten aufwiesen.

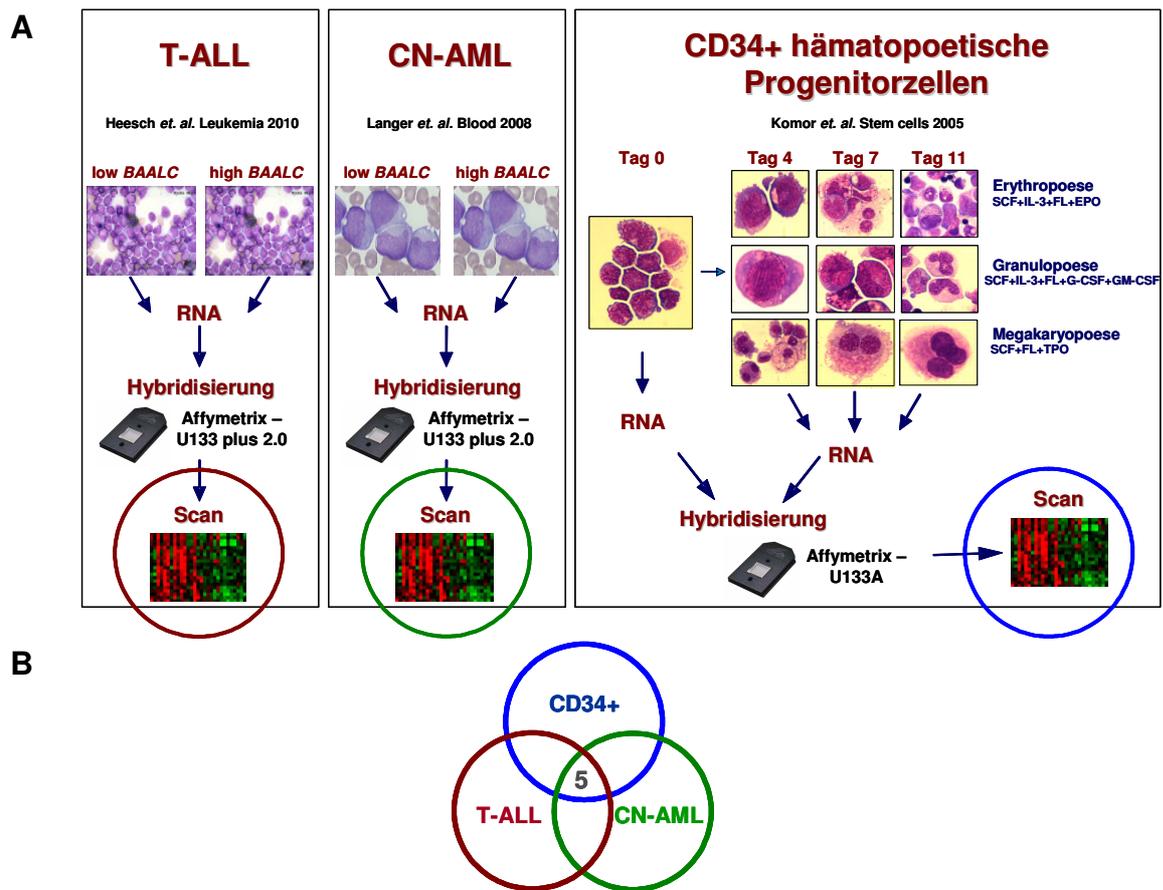


Abbildung 10: Algorithmus zur Analyse der BAALC-assoziierten Genexpression in T-ALL (n=86), CN-AML (n=50) und von in vitro differenzierten CD34 positiven Zellen. (A) BAALC-assoziierte Genexpressionsprofile wurden von 86 T-ALL-Patienten, 50 CN-AML-Patienten¹⁰⁰ und CD34 positiven Progenitorzellen¹⁰⁶ erstellt. Sowohl für die T-ALL als auch die CN-AML wurde eine Liste mit differentiell exprimierten Genen erstellt, die hoch exprimiert waren bei Patienten mit hoher BAALC-Expression. Für die normale Hämatopoese wurde eine Liste von Genen generiert die einen Expressionsverlauf wie BAALC zeigten, also eine Abnahme der Expression im Zuge der Differenzierung. (B) Die 3 BAALC-assoziierten Genexpressionsprofile wurden abgeglichen und 5 Gene identifiziert, die in allen 3 Entitäten signifikant mit BAALC assoziiert waren.

Darunter stellen *CD34* und *Prominin1 (CD133)* zwei Stammzellmarker dar und untermauern die Bedeutung von *BAALC* als stammzellnahes Gen.⁹⁴ Auf Grund bereits beschriebener Interaktionen von *insulin like growth factor binding* Proteinen (IGFBPs) in verschiedenen Krebserkrankungen und Leukämien sowie der Bedeutung der *insulin like growth factors* (IGFs) für die Tumorentstehung war das Gen *IGFBP7 (insulin like growth factor binding protein 7)* von besonderem Interesse für eine weitergehende Analyse.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹

Das IGF-System umfasst das Insulin, das IGF-1 und IGF-2, deren Rezeptoren sowie die IGF-bindenden Proteine als auch die IGFBP-Proteasen. Die IGF-bindenden Proteine transportieren die IGFs und modulieren somit deren Verfügbarkeit und Aktivität und beeinflussen dann in verschiedenster Weise das Wachstum und den Metabolismus der Zellen. *IGFBP7* ist lokalisiert auf Chromosom 4q12-13 und kodiert für ein sezerniertes 31kD Protein, das im

Vergleich zu den anderen IGF-BPs Insulin mit hoher und IGF-1 und IGF-2 mit niedriger Affinität bindet. Zudem weist *IGFBP7* eine IGF-unabhängige, intrinsische Aktivität auf.¹¹⁰ In zahlreichen Studien wurde *IGFBP7* als Tumorsuppressor beschrieben, involviert in Apoptose und Seneszenzregulation.¹¹¹⁻¹¹³ Die prognostische Relevanz wird jedoch kontrovers diskutiert.¹¹⁴⁻¹¹⁶ Die Bedeutung von *IGFBP7* in akuten Leukämien ist bisher nicht erforscht.

Um Einblicke in die Rolle von *IGFBP7* in akuten Leukämien zu erhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit 611 Patienten mit unterschiedlichen hämatologischen Erkrankungen [AML, T-ALL, B-ALL, BAL/AUL und Myelodysplastisches Syndrom (MDS)] sowie gesunde Spender auf ihre *IGFBP7*- und *BAALC*-Expression hin untersucht. Die RNA-Isolation erfolgte mittels TRIzol[®] Reagenz und die mRNA-Quantifizierung mittels qRT-PCR entsprechend der Δ Ct Methode. Hier zeigten sich gegenüber Normalpersonen signifikant gesteigerte Expressionswerte bei Patienten mit AML ($P < 0,001$) und BAL/AUL ($P = 0,03$). Nach Etablierung eines *IGFBP7* spezifischen ELISA-Assays (Human IGF-BP7 "Super-X" Pre-Coated ELISA Kit; Antigenix, New York, USA) erfolgte exemplarisch die *IGFBP7*-Protein Bestimmung an 47 Serumproben aus dem peripheren Blut von AML-Patienten und bestätigte, entsprechend der mRNA-Expression, eine signifikante Erhöhung der *IGFBP7*-Serumproteinkonzentration ($P < 0,001$; Daten nicht publiziert) im Vergleich zu Normalpersonen. Zudem zeigte eine Subgruppe der Patienten mit T-ALL, B-ALL und MDS eine aberrante mRNA-Expression. Darüber hinaus konnte die in den arraybasierten Genexpressionsanalysen gefundene Korrelation der *IGFBP7*- und *BAALC*-Expression in den qRT-PCR-Untersuchungen in verschiedenen Entitäten (T-ALL, B-ALL, BAL/AUL und MDS) bestätigt werden.

In einer weiterführenden Analyse an 219 T-ALL-Patienten war eine hohe *IGFBP7*-Expression mit einer erhöhten Expression von CD34 und einem unreifen Phänotyp der T-ALL assoziiert. Des Weiteren zeigten Patienten mit einer hohen *IGFBP7*-Expression ein schlechteres Ansprechen auf die primäre Induktionschemotherapie ($P = 0,03$) sowie ein schlechteres Gesamtüberleben ($P = 0,03$).

In folgenden Experimenten sollte untersucht werden, inwiefern *IGFBP7* eine direkte funktionelle Rolle in akuten Leukämien zugeschrieben werden kann. Hierzu wurde die myeloische Zelllinie KG1a und die T-lymphoblastische Zelllinie Jurkat mit rekombinantem, humanem *IGFBP7*-Protein (rh*IGFBP7*; PreproTech GmbH, Hamburg, Deutschland) behandelt. Proliferationsanalysen mittels WST-1 Reagenz (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) zeigten eine signifikante dosis- und zeitabhängige

Proliferationshemmung der Leukämiezelllinien. Über die Bestimmung des inkorporierten Thymidinanalogons Bromdesoxyuridin (BrdU; Cell Proliferation ELISA; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) während der DNA-Synthesephase (S-Phase) ließ sich eine 26%ige Reduktion der S-Phase nach rhIGFBP7-Behandlung nachweisen ($P < 0,001$). Dabei konnte die verringerte Proliferationsrate nicht auf eine Apoptoseinduktion durch rhIGFBP7 zurückgeführt werden, welche mittels des PE Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD PharmingenTM, Heidelberg, Deutschland) durchflußzytometrisch bestimmt wurde. Des Weiteren konnte eine seneszenz-assoziierte Proliferationshemmung durch rhIGFBP7 ausgeschlossen werden. Nach Behandlung mit rhIGFBP7 zeigten die Leukämiezellen keine Erhöhung der seneszenz-assoziierten β -Galactosidaseaktivität im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen. Darüber hinaus wurden Untersuchungen zum Regulationsmechanismus der *IGFBP7*-mRNA-Expression durchgeführt. Diese ließen einen positiven Feedback-Mechanismus vermuten. So führte die Behandlung von Leukämiezelllinien mit rhIGFBP-Protein zur Erhöhung der mRNA-Expression des Gens.

Vor dem Hintergrund der oben dargestellten Ergebnisse bleibt zusammenfassend festzuhalten, dass *IGFBP7* als *BAALC*-assoziiertes Gen identifiziert werden konnte und möglicherweise eine bisher unbekannte, funktionelle Bedeutung bei akuten Leukämien besitzt.

Die vorliegende Arbeit umfasste die gesamte Planung des Projektes, Durchführung aller Laborarbeiten, die Auswertung der generierten Daten, die Erstellung und Korrektur des Manuskripts, zugehöriger Tabellen und Abbildungen.

4 Diskussion

Die Situation hinsichtlich des Gesamtüberlebens ist bei der Mehrheit der Patienten mit akuten Leukämien im Erwachsenenalter weiterhin unbefriedigend. Neben der Aufklärung pathophysiologischer Vorgänge zum besseren Verständnis der Erkrankungen kommt der Identifizierung neuer molekulargenetischer Marker eine wesentliche Rolle zu. Diese Erkenntnisse dienen einer präziseren Prognoseabschätzung sowie der Entwicklung neuer zielgerichteter therapeutischer Substanzen (zum Beispiel *small molecule drugs*) und stratifizierter Therapiekonzepte.¹¹⁷⁻¹²¹ Hinsichtlich der pathophysiologischen Vorgänge in der Leukämogenese konnten, neben zytogenetischen Veränderungen, vor allem Genmutationen mit aktivierten Signaltransduktionskaskaden charakterisiert werden, die darüber hinaus auch als prognostische Marker dienen und als Prädiktoren für das Therapieansprechen vor allem auf neue molekulare Therapieoptionen^{122,123} herangezogen werden können.

Als eine weitere Ursache für die Alteration des Proliferations- und Differenzierungsverhaltens von Leukämiezellen spielt die Dysregulation der mRNA-Expression von spezifischen Genen eine große Rolle. Darüber hinaus können aberrante Genexpressionsmuster auch als Prognosemarker heran gezogen werden. So konnte einer gesteigerten *BAALC*-Expression eine prognostische Wertigkeit bei Patienten mit CM-AML und T-ALL zugewiesen werden. Insbesondere korrelierte eine gesteigerte *BAALC*-Expression bei Erstdiagnose mit einer primären Zytostatikaresistenz.^{43,96,98,100}

Mit dem Ziel sowohl zugrunde liegende Mechanismen der Leukämogenese aufzuklären als auch neue Prognosemarker in bisher unzureichend charakterisierten Subgruppen der akuten Leukämie zu identifizieren, wurde in der vorliegenden Dissertationsschrift die Bedeutung von *BAALC* und dessen assoziierter Gene in der akuten Leukämie untersucht.

Zum einen konnte in dieser Arbeit erstmalig das Gen *BAALC* als neuer molekularer Marker auch bei Patienten mit akuter B-ALL identifiziert werden. Bei dieser Untersuchung war insbesondere die Subgruppe der molekular nicht weiter charakterisierten *BCR-ABL*- und *MLL-AF4*-negativen B-ALL von Interesse, da gerade für diese Patienten der Standardrisikogruppe eine verbesserte prognostische Charakterisierung erforderlich ist, um eine bessere Anpassung risikostratifizierter Therapiekonzepte zu ermöglichen. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass, ähnlich der CN-AML und T-ALL, eine aberrant gesteigerte *BAALC*-Expression bei Erstdiagnose mit einem schlechten Therapieansprechen

und einem schlechteren Überleben einhergeht und mit einem unreifen Leukämie-Phänotyp assoziiert ist. Dadurch konnte unsere Hypothese bekräftigt werden, dass *BAALC* als Progenitorzellmarker einen stammzellnahen, therapieresistenten Leukämiesubtyp charakterisiert. In Übereinstimmung mit Untersuchungen bei der AML⁹⁷ zeigte sich auch für die B-ALL-Patienten (*BCR-ABL*- und *MLL-AF4*-negative Subgruppe) mit hoher *BAALC*-Expression, die einer konsolidierenden allogenen Stammzelltransplantation zugeführt wurden, ein Überlebensvorteil im Vergleich zu Patienten, die eine alleinige konsolidierende Chemotherapie erhalten hatten. Im Gegensatz dazu zeigte sich für Patienten mit geringer *BAALC*-Expression kein Überlebensvorteil durch eine konsolidierende allogene Stammzelltransplantation im Vergleich zur reinen Chemotherapie. Vor dem Hintergrund, dass eine hohe *BAALC*-Expression mit frühen Stammzellmarkern und dem Vorliegen einer Zytostatikaresistenz assoziiert ist, erscheint es möglich, dass der Nutzen einer allogenen Stammzelltransplantation für diese Patientengruppe auf einem immunologischen Mechanismus beruht, der gegen die LSCs im Sinne eines *graft-versus-leukemia*- (GvL) Effektes gerichtet sein könnte. (Unter GvL-Effekt, was mit „Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt“ übersetzt werden kann, versteht man die T-Zell-vermittelte Immunreaktion des Spenderknochenmarks gegen noch persistierende Leukämie(stamm)zellen des Empfängers.) Diese Hypothese muss jedoch Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Im Rahmen der Arbeit wurde eine Grundlage geschaffen auf dem Boden der *BAALC*-Expression möglicherweise neue risikostratifizierte Therapiekonzepte zu entwickeln. Für Patienten mit hoher *BAALC*-Expression sollte der Stellenwert einer allogenen Stammzelltransplantation im Sinne einer Therapieintensivierung geprüft werden. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass es sich hierbei um eine retrospektive Untersuchung handelt. Die Ergebnisse müssen zum einen an einem unanhängigen Patientenkollektiv bestätigt werden. Zum anderen ist eine standardisierte Messmethode (qRT-PCR) zur prospektiven Untersuchung von einzelnen Patientenproben notwendig, um eine Vergleichbarkeit von Ergebnissen in verschiedenen Laboren zu gewährleisten. Des Weiteren konnten in dieser Arbeit Gene identifiziert werden, die eine *BAALC*-assoziierte Zytostatikaresistenz in der B-ALL untermauern. In Konkordanz mit der CN-AML und T-ALL bedarf es jedoch einer Klärung der genaueren mechanistischen Grundlagen der *BAALC*-assoziierten Chemotherapieresistenz. Herauszuheben bleibt, dass die prognostische Relevanz von *BAALC* und dessen Assoziation mit einem unreifen, chemotherapieresistenten Phänotyp in den

unterschiedlichen Leukämieformen (CN-AML, T-ALL und B-ALL) auf einen linienunabhängigen Pathomechanismus der Leukämogenese hinweist.

Die von Paschka und Mitarbeitern⁵⁴ beschriebene Assoziation zwischen *WT1*-Mutationen und einer aberrant erhöhten *BAALC*-Expression in CN-AML-Patienten sowie die Stammzellassoziation des *WT1*-Gens ließen die Annahme zu, dass *WT1*, ähnlich wie *BAALC*, eine linienunabhängige prognostische Bedeutung besitzt.

Um ein mögliches Netzwerk von prognostischen Faktoren zu identifizieren, wurde die Rolle von *WT1* in Abhängigkeit von der *BAALC*-Expression in einer großen Kohorte von T-ALL-Patienten untersucht. Hierbei konnten *WT1*-Mutationen des Exons 7 und 9 für insgesamt 8% der T-ALL-Patienten identifiziert werden. Die Mutationsfrequenz und die Lokalisation der einzelnen Mutationen waren dabei entsprechend der AML.^{54,55} Die Funktion von *WT1* als Tumorsuppressor wird durch die Mutationen im Bereich der DNA-Bindedomäne (Exon 7-10) des Gens beeinträchtigt, indem dessen DNA-Bindungs- und Proteininteraktionsfähigkeit verändert wird.¹²⁴ In deren Folge kommt es zur Unterdrückung der nach geschalteten Targets in mutierten Leukämiezellen. Der Nachweis von *WT1*-Mutationen sowohl in der AML als auch T-ALL und dessen Assoziation mit einem unreifen Phänotyp der Leukämie weisen auf eine genetische Veränderung in frühen Progenitorzellen hin. Des Weiteren konnten in 70% der T-ALL-Patienten mit *WT1*-Mutationen zusätzliche Mutationen in den Genen *NOTCH1*, *FBXW7* oder *FLT3* identifiziert werden. Dies unterstützt das Konzept der Multi-Hit-Hypothese insofern, als dass neben dem Defekt des *WT1*-Gens auch weitere genetische Hits zur Entstehung einer Leukämie notwendig sind. Im Gegensatz zu Beobachtungen in der AML war das Vorhandensein von *WT1*-Mutationen nicht signifikant prädiktiv für eine primäre Therapieresistenz bei Patienten mit T-ALL. Allerdings zeigten die Patienten mit T-ALL und Nachweis von *WT1*-Mutationen eine höhere Rezidivrate als *WT1*-Wildtyp T-ALL-Patienten. Darüber hinaus zeigten Standardrisikopatienten mit einer thymischen T-ALL und Nachweis von *WT1*-Mutationen ein schlechteres rezidivfreies Überleben als die Patienten ohne *WT1*-Mutationen. Jedoch bleibt anzumerken, dass sich auf Grund der geringen Anzahl mutierter T-ALL-Fälle die Aussage zur prognostischen Wertigkeit der *WT1*-Mutation begrenzt ist. So wurde kürzlich eine Studie veröffentlicht, die keine prognostische Wertigkeit von *WT1*-Mutationen in der T-ALL zeigen konnte.¹²⁵ Eine signifikante Korrelation zwischen *WT1*-Mutationen und *BAALC*-Expression ließ sich im Gegensatz zur CN-AML für die T-ALL nicht zeigen. Eine direkte, linienübergreifende Assoziation zwischen *BAALC* und *WT1* scheint

somit eher unwahrscheinlich. Beide Gene kennzeichnen jedoch einen unreifen Leukämiephänotyp mit Stammzellcharakter.

Gegenstand dieser Arbeit war weiterhin die quantitative Bestimmung der *WT1*-Expression in 223 T-ALL-Patienten. Interessanterweise stellte die aberrante *WT1*-Expression im Gegensatz zu den *WT1*-Mutationen einen signifikanten, unabhängigen ungünstigen Prognosemarker hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens dar. Darüber hinaus zeigten Patienten mit aberranter *WT1*-Expression einen Überlebensvorteil durch eine konsolidierende allogene Stammzelltransplantation im Vergleich zur alleinigen konsolidierenden Chemotherapie. Diese Daten lassen eine Rolle von *WT1* in der Pathogenese der T-ALL vermuten. Insbesondere die quantitative Bestimmung der *WT1*-Expression stellt eine Basis für verbesserte risikostratifizierte Therapiekonzepte unter Einbeziehung der allogenen Stammzelltransplantation dar. Unumgänglich ist jedoch die Verifizierung dieser Daten im Rahmen prospektiver Studien.

Des Weiteren lässt diese Arbeit vermuten, dass die pathologischen Veränderungen des *WT1*-Gens ein stammzellnahes Ereignis sind. Dies zeigt sich sowohl in dem linienübergreifenden Auftreten von Mutationen als auch in der Assoziation mit Stammzellmarkern. So wurde bereits beschrieben, dass aberrant hohe *WT1*-Expressionslevel in LSCs zu finden sind. Dies macht das WT1-Protein zu einem interessanten immunologischen Target, um LSCs anzugreifen.¹²⁶

Neben der Identifizierung prognostisch relevanter Gene (wie zum Beispiel *BAALC* und *WT1*) standen deren molekulare Pathomechanismen im Vordergrund dieser Arbeit. In Untersuchungen zur Klärung der Regulationsmechanismen einer aberranten *BAALC*-Expression konnte im Rahmen dieser Arbeit die von Langer und Kollegen¹⁰⁰ postulierte Rolle der miRNA-148a nicht bestätigt werden. Jedoch bleibt anzumerken, dass eine mögliche Regulation durch die miRNA-148a auf Proteinebene aufgrund fehlender *BAALC*-Antikörper nicht untersucht werden konnte. Der SNP (rs2256164) in der *BAALC*-Promotorregion konnte ebenso wenig für die aberrante Expression in akuten Leukämien verantwortlich gemacht werden wie Mutationen im *BRAF*-Gen¹⁰¹ (Heesch, nicht publizierte Daten). Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen umfassten Methylierungsanalysen im Promotorbereich von *BAALC* als auch Mutationsanalysen in der kodierenden Sequenz. Diese konnten ebenso wenig den funktionellen Mechanismus einer aberranten *BAALC*-Expression klären (persönliche Kommunikation C. Baldus). Nachdem *in vivo* Untersuchungen (*BAALC*-Überexpression in murinen Knochenmarkzellen und anschließende Transplantation der Zellen in subletal

bestrahlte Mäuse; persönliche Kommunikation C. Baldus) nicht wegweisend waren, sollte in weiterführenden funktionellen *in vitro* Analysen die Rolle von *BAALC* in der Hämatopoese und Leukämogenese untersucht werden. Diese Versuche umfassten vor allem *in vitro* Knockdown- (siRNA, miRNA, shRNA) und Überexpressionsstudien (MSCV-IRES-*BAALC*) mit nachfolgender Untersuchung des Proliferations- und Differenzierungsverhalten verschiedener Zelllinienmodellsysteme und CD34 positiven Progenitorzellen. Darüber hinaus wurde der Einfluss einer aberranten *BAALC*-Expression auf eine Zytostatikaresistenz und deren Überwindung mit neueren Wirkstoffen (Dasatinib, Nilotinib, Sorafenib) untersucht. Eine aktive Funktion der aberrant gesteigerten *BAALC*-Expression, die für die *BAALC*-assoziierte Chemotherapieresistenz verantwortlich gemacht werden kann, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass *BAALC* lediglich einen Surrogatmarker in akuten Leukämien darstellt und andere, *BAALC*-ko-regulierte Signalwege für die Chemotherapieresistenz verantwortlich sind. Durch globale, mikroarray-basierte Genexpressionsanalysen war es möglich *BAALC*-assoziierte Kandidatengene (*CD34*, *CD133*, *NPR3* und *IGFBP7*) zu identifizieren. Die linienübergreifende Genexpressionssignatur konnte zum einen den Stammzellcharakter von *BAALC* unterstreichen (*CD34* und *CD133* sind beschriebene Marker der hämatopoetischen Progenitorzellen¹²⁷⁻¹²⁹) und zum anderen *IGFBP7* als ein interessantes Kandidatengen identifizieren, dessen Bedeutung für die Hämatopoese und Leukämogenese bisher nicht untersucht wurde. Die Assoziation von *IGFBP7* mit *CD133* und *CD34* in normalen CD34 positiven Progenitorzellen sowie dessen Herunterregulation im Laufe der Differenzierung lässt eine Rolle sowohl in der frühen Hämatopoese als auch in der Leukämogenese vermuten. In der vorliegenden Dissertationsarbeit konnte erstmals *IGFBP7* eine Bedeutung in akuten Leukämien zugeschrieben werden. Eine quantitative Bestimmung der *IGFBP7*- und *BAALC*-mRNA-Expression sowohl in Patienten mit verschiedenen hämatologischen Erkrankungen als auch in Normalpersonen konnte die signifikante Korrelation dieser beiden Gene bestätigen und eine heterogene Expression von *IGFBP7* in akuten Leukämien im Vergleich zu Normalpersonen darlegen. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte mRNA-Expression in akuten Leukämien auch mit einer Erhöhung der Serumkonzentration des Proteins einhergeht. Die Assoziation erhöhter *IGFBP7*-mRNA-Expression mit einem schlechteren Ansprechen auf die Induktionschemotherapie und einem schlechten Gesamtüberleben bei T-ALL-Patienten unterstreicht die Bedeutung dieses Gens. In funktionellen Analysen konnte zudem gezeigt werden, dass rhIGFBP7 die Proliferation von Leukämiezelllinien inhibiert. Diese Inhibition der Proliferation ohne nachweisbare Erhöhung

der Apoptose- und Seneszenzrate der Zellen könnte möglicherweise zu einer geringeren Sensitivität der Zellen auf die zellzyklusaktiven Zytostatika führen und somit zur Chemotherapieresistenz beitragen. Zur Bestätigung dieser Hypothese sind jedoch weiterführende Studien notwendig. Der genaue Mechanismus bleibt ebenfalls zu klären. Verschiedene Studien beschreiben eine Regulation des MAP-Kinase-Pathways und des PI3K/AKT-Pathways durch *IGFBP7*.^{112,130-132} So führt eine akute Aktivierung des MAP-Kinase-Pathways zur Zellproliferation, eine permanente Aktivierung wurde allerdings mit einer Proliferationshemmung und einer beeinträchtigten Differenzierung assoziiert.^{133,134} Es bleibt festzuhalten, dass mittels Genexpressionsanalysen *IGFBP7* als *BAALC*-assoziiertes Target-Gen identifiziert werden konnte, welches einen therapieresistenten Leukämiesubtyp charakterisiert. Auf Grund der signifikanten Korrelation zwischen *BAALC*- und *IGFBP7*-Expressionswerten besitzt die Bestimmung der *IGFBP7*-Expression jedoch keinen zusätzlichen unabhängigen prognostischen Stellenwert, vielmehr ist die aktive funktionelle Rolle von *IGFBP7* auf das Wachstumsverhalten von Leukämiezellen hervorzuheben. *IGFBP7* stellt daher ein neues interessantes Target für eine therapeutische Modulation dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde deutlich, dass *BAALC*, *IGFBP7* und *WT1* Stammzeleigenschaften zugeschrieben werden können. Die Expression dieser Gene in HSCs bzw. deren Assoziation mit Stammzellmarkern sowie die fehlende bzw. geringe Expression in reifen hämatopoetischen Zellen lässt eine Rolle dieser Gene in der frühen Hämatopoese vermuten. Darüber hinaus deutet die aberrante Expression in leukämischen Blasten auf eine Rolle in der Leukämogenese hin.

LSCs sind, ähnlich wie die HSCs, gekennzeichnet durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung. 1994 konnte erstmals gezeigt werden, dass diese LSCs nur einen sehr kleinen Anteil der leukämischen Blasten ausmachen und zudem die Fähigkeit besitzen in immundefizienten Mäusen Leukämien auszulösen.^{20,21} Obwohl die LSCs die Fähigkeit der Selbsterneuerung besitzen, befinden sie sich hauptsächlich in der G₀ Phase des Zellzyklus. LSCs sind aufgrund der geringen Proliferationsrate kaum empfindlich gegenüber zellzyklusspezifischen Reagenzien, was – durch Persistenz dieser Zellen – möglicherweise ursächlich für Rezidive und Resistenzen gegenüber den herkömmlichen Zytostatika ist.^{84,135} Einen weiteren resistenzvermittelnden Mechanismus stellt die Expression von ABC-Transportern auf LSCs dar. Vor diesem Hintergrund stellen LSCs einen interessanten therapeutischen Angriffspunkt dar und die Identifikation von Genen und Pathways, die charakteristisch für den LSC-Status sind, könnte in der Entwicklung spezifischer und zielgerichteter Substanzen münden.

Die Daten dieser Dissertationsarbeit zeigen, dass eine aberrante *BAALC*-Expression möglicherweise diesen Stammzellcharakter beschreibt. Eine gesteigerte Expression des Gens geht linienunabhängig einher mit einer schlechten Prognose, Chemotherapieresistenz und der Assoziation mit Stammzellmarkern (zum Beispiel CD34, CD133, CD99). Dies konnte unabhängig voneinander in den einzelnen Arbeiten sowohl mittels qRT-PCR als auch durch Mikroarray-Analysen bestätigt werden.

Darüber hinaus konnte *IGFBP7* als *BAALC*-assoziiertes Gen identifiziert werden. Erstmals konnte gezeigt werden, dass *IGFBP7* ebenfalls einen stammzellnahen, chemotherapieresistenten Leukämiesubtyp beschreibt. Die Assoziation von *IGFBP7* mit Stammzellmarkern (CD34 und CD133) und die gesteigerte Expression des Gens in der BAL bzw. AUL unterstreichen den Stammzellcharakter von *IGFBP7*. Die Beobachtung, dass rhIGFBP7 zu einer Proliferationshemmung in Leukämiezelllinien geführt hat, erlaubt die Hypothese, dass IGFBP7 eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Quieszenz in LSCs spielt.

Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit eine hohe *IGFBP7*-Expression mit einer hohen Expression des ABC-Transporters *ABCA1* (*ATP-binding cassette, sub-family A, member 1*) assoziiert werden, ein weiteres Stammzellcharakteristikum (T-ALL Mikroarraydaten; Heesch, nicht publizierte Daten). Eine erhöhte Expression des *ABCA1*-Transporters wurde in CD34⁺/CD38⁻ hämatopoetischen Zellen beschrieben, die im Laufe der Differenzierung abnimmt und mit einer Zytostatikaresistenz assoziiert ist.^{136,137} Der *ABCA1*-Transporter stellt eine Cholesterol-Effluxpumpe dar und es konnte gezeigt werden, dass neben der Expression der *MDR1*-Effluxpumpe auch Störungen im Cholesterol-Pathway von Leukämiezellen protektiv auf diese wirken. Die Exposition sowohl von primären AML-Zellen als auch Leukämiezelllinien gegenüber Chemotherapeutika führte zu einem akuten Anstieg des Cholesterols, was mit einer verminderten Empfindlichkeit der Zellen gegenüber den verwendeten Zytostatika (Daunorubicin und Cytosinarabinosid) verbunden war.¹³⁸ Inwiefern die erhöhten intrazellulären Cholesterollevel selber die Zellen vor der Wirkung der Zytostatika schützen, ist nicht eindeutig geklärt. Möglich wäre auch, dass es über die cholesterolvermittelte Rekrutierung von ABC-Transportern zu einem gesteigerten Efflux der Zytostatika kommt. Therapeutisch denkbar wäre der Einsatz von Statinen zur Hemmung der intrazellulären Cholesterolbildung bei bestimmten Patienten als „*Chemosensitizer*“.

Anhand der vorgestellten Daten lässt sich ein *BAALC*- und *IGFBP7*-assoziiertes hypothetisches Modell der Leukämogenese entwickeln, das seinen Ursprung in der hämatopoetischen Stammzelle findet. Die pathogenetische Veränderung einer frühen HSC

führt zur Entwicklung der LSC, die gekennzeichnet ist durch eine hohe *BAALC*- und *IGFBP7*-Expression. Auf Grund von pathogenetischen Veränderungen kommt es zu einer persistierenden Expression dieser Gene und damit aberranten Differenzierung (**Abbildung 11**). Es bleibt jedoch festzuhalten, dass es sich hierbei um ein hypothetisches Modell handelt, welches Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein wird.

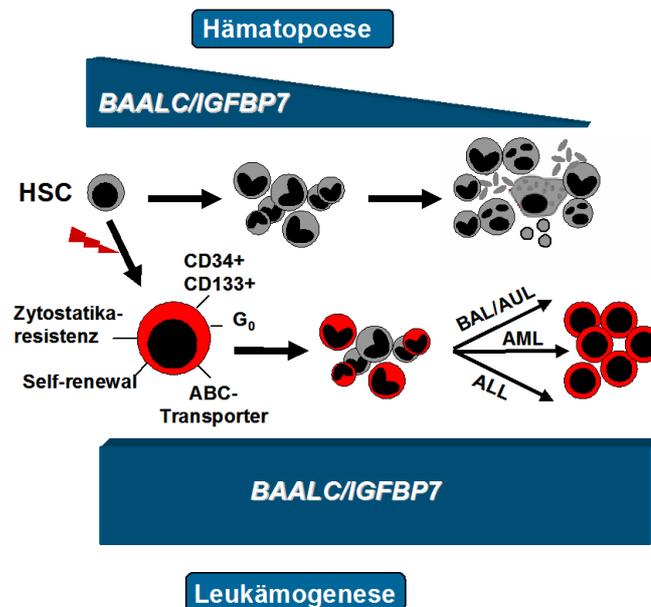


Abbildung 11. *Hypothetisches Modell der Leukämogenese unter Einfluss von BAALC und IGFBP7.* Im Verlauf der normalen Hämatopoese nimmt die Expression von *BAALC* und *IGFBP7* kontinuierlich ab. Im Modell der *BAALC*- und *IGFBP7*-assoziierten Leukämogenese führen sehr frühe, stammzellnahe Ereignisse zur Transformation der HSC in die LSC. Diese ist gekennzeichnet durch eine hohe persistierende *BAALC*- und *IGFBP7*-Expression, CD34/CD133-Positivität, Expression von ABC-Transportern und Zytostatikaresistenz. Ausgehend von dieser LSC entwickelt sich eine BAL/AUL, AML oder ALL in Abhängigkeit von weiteren transformierenden Hits.

Die LSC stellt ein interessantes Target für neue therapeutische Optionen dar. Von besonderem Interesse ist hierbei die Resistenz- und Quieszenz-vermittelnde Interaktion der LSC mit der Knochenmarknische. Umso wichtiger scheint es in diesem Zusammenhang die Bedeutung von *IGFBP7* und *BAALC* in der Stammzellnische zu untersuchen.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass das PTH, ein wichtiges Hormon der Stammzellnische welches über den PTH-Rezeptor in Osteoblasten die Wachstumsfaktorproduktion steuert und so zur Erhaltung des Stammzellpools beiträgt¹³, die Expression von *BAALC* und von *IGFBP7* *in vitro* in osteoblastischen Zellen reguliert.^{139,140}

Darüber hinaus konnte sowohl eine erhöhte *BAALC*- als auch *IGFBP7*-Expression mit einer erhöhten Expression von *Angiopoietin-1* (*ANG1*) assoziiert werden (T-ALL Mikroarraydaten,

Heesch *et. al.* 2010 und Heesch, Daten nicht publiziert). Der *Angiopoietin-Tie2*-Signalweg trägt zur Quieszenz der Stammzelle in der Nische entscheidend bei und bewirkt eine Adhäsion der HSC in der Knochenmarknische.¹⁵ Diese adhäsive Funktion wird unterstrichen durch Arbeiten zur IGFBP7-Funktion, welches auch als *TAF* (*tumor derived adhesions factor*) bezeichnet wird und mit einer verstärkten Zelladhäsion in soliden Tumoren assoziiert ist.¹⁴¹ Diese Daten lassen die Vermutung zu, dass *BAALC* und *IGFBP7* die Adhäsion der HSC in der Nische fördern. Vorausgesetzt das gleiche Modell gilt auch für die LSC, dann könnte die Adhäsion der LSC an die Nische sie möglicherweise vor zytotoxischen Agenzien schützen und somit die hohen Rezidivraten vermitteln. Eine mögliche Bedeutung von IGFBP7 in der Stammzellnische wird weiterhin unterstrichen durch die aberrante Expression von *IGFBP7* in Knochenmark-Stromazellen. In kultivierten Stromazellen aus Knochenmarkaspiraten von Leukämie-Patienten und von Normalpersonen konnten bis zu 100fach erhöhte mRNA- und Protein-Konzentrationen (im Kulturmedium) gemessen werden im Vergleich zu Vollknochenmarkzellen bzw. im Serum (Heesch, nicht publizierte Daten). Die Stromazellen als Bestandteil der Nische könnten somit, über einen parakrinen Sekretionsmodus, an der Expressionsregulation von *IGFBP7* in der normalen Hämatopoese und der Leukämogenese im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus beteiligt sein. So konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von rhIGFBP7 *in vitro* zu einer Erhöhung der *IGFBP7*-mRNA-Expression in Leukämiezelllinien führt (Heesch *et. al.* 2010).

Eine mögliche Bedeutung von *BAALC* in der Nische machen auch Daten deutlich, die eine erhöhte Expression von *Osteopontin* (*OPN*) durch eine *BAALC*-Überexpression in osteoblastischen Zellen belegen.¹³⁹ *Osteopontin* ist ein weiteres wichtiges Gen der Stammzellnische, welches eine Rolle in der Adhäsion und folglich der Quieszenz der Stammzelle spielt.¹⁴ Auch die bereits postulierte Funktion von *BAALC* in Lipid Rafts könnte dessen Funktion in der Stammzellnische untermauern. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass Lipid Rafts möglicherweise eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des *self-renewal* in embryonalen Stammzellen haben.¹⁴² Aufgrund der dargestellten Zusammenhänge lässt sich ein hypothetisches Modell der Knochenmarknische unter Berücksichtigung von *BAALC* und *IGFBP7* entwickeln (**Abbildung 12**).

Die postulierte Rolle von *IGFBP7* und *BAALC* in der Stammzellnische und die damit verbundene mögliche Zytostatikaresistenz sowie dessen Assoziation mit wichtigen Modulatoren der Nische wie PTH, *ANG1* und *OPN* muss in nachfolgenden Untersuchungen geklärt werden.

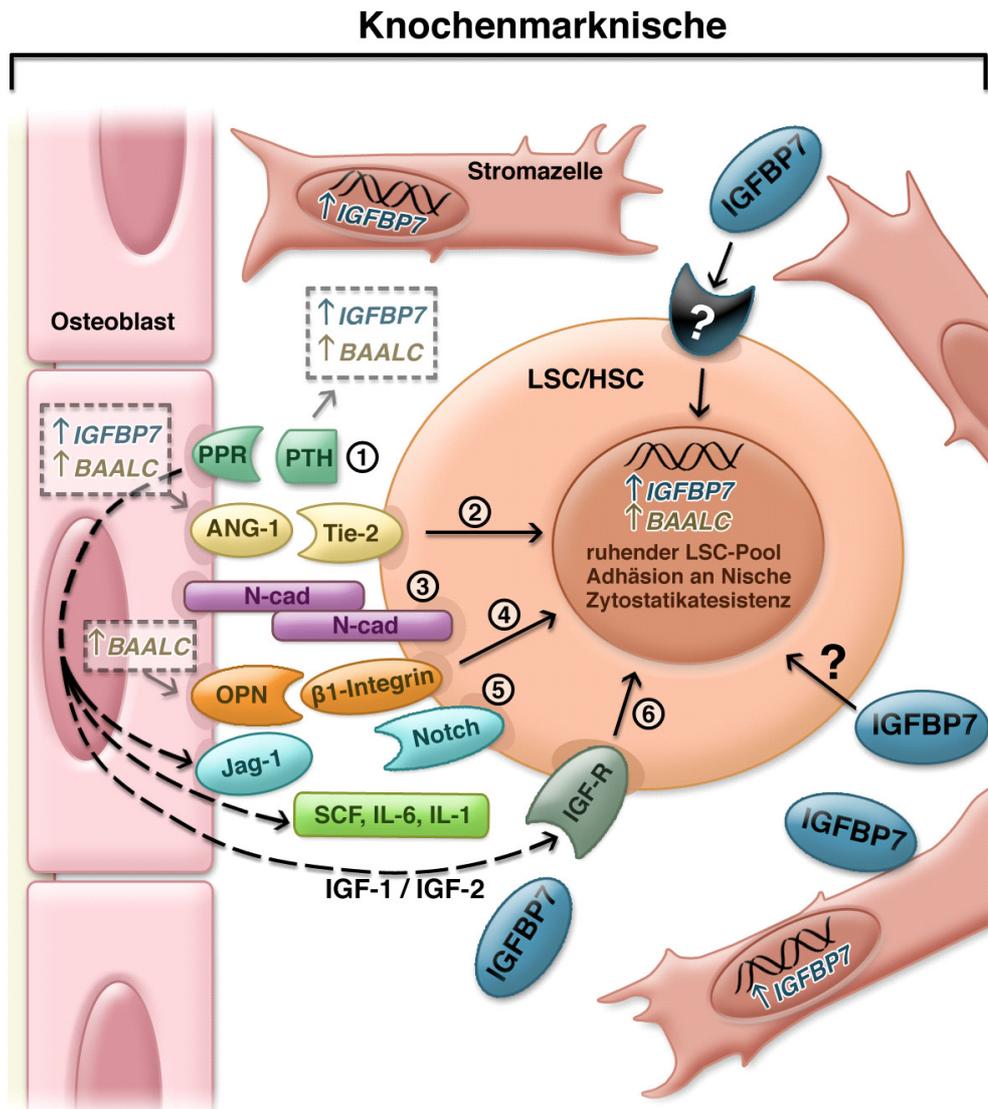


Abbildung 12. Hypothetisches Modell der Knochenmarksnische unter Einfluss von BAALC und IGFBP7.

Die starke Expression von *IGFBP7* in Stromazellen und die damit verbundene Proteinsekretion bewirkt eine hohe Konzentration von *IGFBP7* in der Nische. Über einen positiven Rückkopplungsmechanismus könnte dieses die hohe Expression von *IGFBP7* in der HSC/LSC regulieren. Ein Einfluss von *IGFBP7* auf die HSC/LSC durch Bindung an *IGF-1* und *IGF-2* ist ebenfalls denkbar. Andererseits wurde auch eine *IGF*-unabhängige intrinsische Aktivität für *IGFBP7* beschrieben. Des Weiteren haben *IGFBP7* und *BAALC* möglicherweise Einfluss auf die Adhäsion der Stammzelle in der Nische. So geht eine erhöhte Expression von *IGFBP7* und *BAALC* einher mit einer hohen Expression von *ANG1* welches über den *Tie-2*-Pathway die Adhäsion in der Nische reguliert. Das *PTH* spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des Stammzellpools und reguliert möglicherweise die *BAALC*- und *IGFBP7*-Expression.

- ① *PTH*: Regulation der HSC-Zahl durch Aktivierung der Osteoblasten und nachfolgender Produktion von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren^{13,17}
- ② *Angiopoietin-Tie2*-Pathway: Aufrechterhaltung des ruhenden Stammzellpools, Verhinderung der Proliferation (Beeinflussung der Adhäsion von HSCs in der Nische)¹⁵
- ③ *N-cadherin* (*N-cad*): Adhäsionsfaktor, der direkte Zell-Zell-Verbindung zwischen den Nischenzellen und HSCs vermittelt¹⁴³
- ④ *Osteopontin / β 1-Integrin*: Aufrechterhaltung der Quieszenz (Beeinflussung der Adhäsion von HSCs in der Nische)⁵
- ⑤ *Jag1-Notch*-Pathway: Regulation der Proliferation und der Selbsterneuerung der HSCs^{13,144}
- ⑥ *IGF*-Rezeptor (*IGF-R*): Vermittlung der Funktion der durch *PTH* induzierten Wachstumsfaktoren (*IGF-1*, *IGF-2*); Überlebensregulation der HSCs¹⁴⁵

In der vorliegenden Arbeit wurden in vielfacher Hinsicht sowohl interessante Veränderungen identifiziert, um akute Leukämien molekular besser zu klassifizieren und um prädiktive Aussagen zum Therapieerfolg treffen zu können als auch neue Angriffspunkte für innovative molekulare Therapieoptionen dargestellt.

5 Zusammenfassung

Akute Leukämien stellen klinisch und molekulargenetisch sehr heterogene Erkrankungen dar. In den vergangenen Jahren konnte durch die Identifizierung molekulargenetischer Veränderungen eine Zuordnung in spezifische Risikogruppen vorgenommen und somit eine Therapieoptimierung erzielt werden. Molekulare Marker erlauben zudem Einblicke in die der Leukämogenese zugrunde liegenden pathogenetischen Mechanismen und bilden potentielle Angriffspunkte für die Entwicklung von neuen zielgerichteten Substanzen. Vor diesem Hintergrund wurde sowohl die prognostische Bedeutung als auch die biologische Funktion von *BAALC* und dessen assoziierten Genen in der vorliegenden Arbeit untersucht. Für *BAALC* wurde eine prognostische Bedeutung bereits für die CN-AML und T-ALL beschrieben, die einen therapieresistenten Leukämiesubtyp charakterisiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die prognostische Wertigkeit von *BAALC* in der B-ALL dargestellt werden und somit eine linienunabhängige pathophysiologische Bedeutung des Gens postuliert werden. Darüber hinaus wurde einer Identifizierung von Prognosemarkern in der T-ALL nachgegangen. In vorangegangenen Studien konnte eine prognostische Wertigkeit von *WT1*-Mutationen bei AML-Patienten gezeigt werden, die mit einer hohen *BAALC*-Expression assoziiert waren. Aufgrund der linienübergreifenden prognostischen Bedeutung von *BAALC* wurde die Rolle von *WT1* in der T-ALL untersucht. *WT1*-Mutationen wurden in 8% der T-ALL-Patienten identifiziert, zeigten jedoch eine geringere prognostische Wertigkeit als bei der AML. Im Gegensatz dazu konnte eine aberrante *WT1*-Expression mit einem schlechten Gesamtüberleben der Patienten assoziiert werden. Die Bestimmung der *BAALC*-Expression in der B-ALL sowie der *WT1*-Expression in der T-ALL stellt insbesondere für schlecht charakterisierte Subgruppen einen interessanten Ansatzpunkt zur Risikostratifizierung dar. Neben der Bestimmung der prognostischen Bedeutung von *BAALC* und assoziierter Gene wurden deren pathophysiologische Mechanismen untersucht. Funktionelle Analysen konnten einer aberranten *BAALC*-Expression jedoch keine aktive Rolle in der Hämatopoese und Leukämogenese zuweisen. Daher ist anzunehmen, dass *BAALC* einen Surrogatmarker darstellt und andere ko-regulierte Gene für die Chemotherapieresistenz verantwortlich sind. Hier konnte *IGFBP7* als interessantes Target-Gen identifiziert werden. Ähnlich wie *BAALC* konnte eine erhöhte Expression von *IGFBP7* mit einem ungünstigen primären Therapieansprechen und einem verkürzten Überleben assoziiert werden. Im Gegensatz zu *BAALC* konnten funktionelle Analysen *IGFBP7* eine aktive Rolle in akuten Leukämien

zuschreiben. So konnte für IGFBP7 eine Hemmung der Zellproliferation, insbesondere der S-Phase, gezeigt werden. Diese Hemmung der Proliferation könnte zu einer geringeren Sensitivität der Zellen gegenüber zellzyklusaktiven Zytostatika führen. Darüber hinaus konnte eine hohe Expression von *BAALC* und *IGFBP7* mit Stammzeleigenschaften assoziiert werden. Vor diesem Hintergrund wurde ein Modell entwickelt, welches eine mögliche Rolle von *BAALC* und *IGFBP7* in der Interaktion zwischen der HSC bzw. LSC und der Stammzellnische beschreibt. Die Identifizierung von *IGFBP7* als eine neue molekulare Zielstruktur könnte zur Klärung der zugrunde liegenden Regulationsmechanismen der *BAALC*-assoziierten Chemotherapieresistenz beitragen und für mögliche neue therapeutische Konzepte herangezogen werden.

6 Summary

Acute leukemias are a heterogeneous group of malignancies with varying clinical, morphological, immunological, and molecular characteristics. Over the past decades identification of molecular abnormalities allowed the assignment of patients into specific risk groups, which contributed to optimized leukemia treatment. In addition to the prognostic value of the molecular risk factors, characterization of these abnormalities provided insights into the pathomechanisms of acute leukemias. In this context, the prognostic and biological role of *BAALC* and related genes was evaluated. *BAALC* is a known prognostic marker in CN-AML and T-ALL. Aberrantly high *BAALC* expression in adult acute leukemia patients has been associated with chemotherapy resistance. In the first study, we provided evidence of the prognostic value of *BAALC* in B-precursor ALL, supporting a lineage independent role of *BAALC* in leukemogenesis. In order to define a molecularly-based treatment stratification in T-ALL, the role of prognostic markers were investigated in this entity. In recent studies, *WT1* mutations were of prognostic significance in AML patients and interestingly, mutations were associated with high expression of *BAALC*. As *BAALC* was shown to share prognostic significance in AML and T-ALL, we reasoned that *WT1* mutations might also be of prognostic significance in T-ALL. *WT1* gene mutations were identified in similar frequency as previously shown in AML but of less prognostic significance in T-ALL. However, aberrant *WT1* expression was of independent prognostic significance associated with inferior outcome, thus suggesting a role of *WT1* in T-ALL. Determination of *WT1* and *BAALC* expression might in the future facilitate treatment stratification for molecularly undefined subgroups of T-ALL and adult B-precursor ALL, respectively. In order to gain insights into the biological function of prognostic markers, we focused on the role of *BAALC* in hematopoiesis and leukemogenesis. However, functional analyses did not provide a molecular role of *BAALC* on drug resistance, proliferation and differentiation. Consequently, we concluded that *BAALC* is rather a surrogate marker for treatment failure in acute leukemia and co-regulated genes might contribute to the molecular basis of drug resistance. Hence, we identified *IGFBP7* as a new candidate gene involved in acute leukemia. Similar to *BAALC*, elevated *IGFBP7* expression was associated with a lower response rate to induction therapy and an inferior overall survival in T-ALL patients. However, in contrast to *BAALC*, *IGFBP7* may have a functional role in leukemogenesis and might contribute to the molecular mechanisms of drug resistance. In particular we showed that *IGFBP7* suppressed proliferation, suggesting that *IGFBP7* might

promote resistance to cell cycle specific cytotoxic agents via a decrease in replicative activity in these cells. Moreover, high expression of *BAALC* and *IGFBP7* in acute leukemias was associated with stem cell features. In this context, a model was developed based on experimental data, suggesting a role for *BAALC* and *IGFBP7* in the interaction of the HSC and LSC within the bone marrow niche.

Identification of *IGFBP7* as new candidate gene involved in leukemia might help to gain further insights into the mechanism of *BAALC*-associated chemotherapyresistance and may result in the design of new targeted therapies.

7 Referenzen

1. Keller,G., Lacaud,G. & Robertson,S. Development of the hematopoietic system in the mouse. *Exp. Hematol.* **27**, 777-787 (1999).
2. Fuchs,E. & Segre,J.A. Stem cells: a new lease on life. *Cell* **100**, 143-155 (2000).
3. Weissman,I.L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* **100**, 157-168 (2000).
4. Chaudhary,P.M. & Roninson,I.B. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* **66**, 85-94 (1991).
5. Reya,T., Morrison,S.J., Clarke,M.F. & Weissman,I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-111 (2001).
6. Morrison,S.J. & Weissman,I.L. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*. **1**, 661-673 (1994).
7. Morrison,S.J., Wandycz,A.M., Hemmati,H.D., Wright,D.E. & Weissman,I.L. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* **124**, 1929-1939 (1997).
8. Kondo,M., Weissman,I.L. & Akashi,K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**, 661-672 (1997).
9. Kawamoto,H., Wada,H. & Katsura,Y. A revised scheme for developmental pathways of hematopoietic cells: the myeloid-based model. *Int. Immunol.* **22**, 65-70 (2010).
10. Passegue,E., Jamieson,C.H., Ailles,L.E. & Weissman,I.L. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100 Suppl 1**, 11842-11849 (2003).
11. Scadden,D.T. The stem cell niche in health and leukemic disease. *Best. Pract. Res Clin Haematol.* **20**, 19-27 (2007).
12. Reya,T. *et al.* A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423**, 409-414 (2003).
13. Calvi,L.M. *et al.* Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**, 841-846 (2003).
14. Nilsson,S.K. *et al.* Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* **106**, 1232-1239 (2005).
15. Arai,F. *et al.* Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* **118**, 149-161 (2004).

16. Sugiyama,T., Kohara,H., Noda,M. & Nagasawa,T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. **25**, 977-988 (2006).
17. Ballen,K. Targeting the stem cell niche: squeezing blood from bones. *Bone Marrow Transplant*. **39**, 655-660 (2007).
18. Kiel,M.J. *et al.* SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* **121**, 1109-1121 (2005).
19. Iwasaki,H. & Suda,T. Cancer stem cells and their niche. *Cancer Sci*. **100**, 1166-1172 (2009).
20. Lapidot,T. *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**, 645-648 (1994).
21. Bonnet,D. & Dick,J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med* **3**, 730-737 (1997).
22. Somervaille,T.C. & Cleary,M.L. Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* **10**, 257-268 (2006).
23. Dean,M., Fojo,T. & Bates,S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat. Rev Cancer* **5**, 275-284 (2005).
24. Konopleva,M. *et al.* The anti-apoptotic genes Bcl-X(L) and Bcl-2 are over-expressed and contribute to chemoresistance of non-proliferating leukaemic CD34+ cells. *Br. J Haematol*. **118**, 521-534 (2002).
25. Lane,S.W. & Gilliland,D.G. Leukemia stem cells. *Semin. Cancer Biol.* (2009).
26. Lane,S.W., Scadden,D.T. & Gilliland,D.G. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood* **114**, 1150-1157 (2009).
27. Gilliland,D.G. Hematologic malignancies. *Curr. Opin. Hematol.* **8**, 189-191 (2001).
28. Gilliland,D.G. & Griffin,J.D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* **100**, 1532-1542 (2002).
29. Chen,J., Odenike,O. & Rowley,J.D. Leukaemogenesis: more than mutant genes. *Nat. Rev Cancer* **10**, 23-36 (2010).
30. Vardiman,J.W. *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* **114**, 937-951 (2009).
31. Bennett,J.M. *et al.* Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br. J Haematol*. **33**, 451-458 (1976).
32. Look,A.T. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* **278**, 1059-1064 (1997).

33. Byrd, J.C. *et al.* Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* **100**, 4325-4336 (2002).
34. Mrozek, K., Heinonen, K. & Bloomfield, C.D. Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia. *Best. Pract. Res Clin Haematol.* **14**, 19-47 (2001).
35. Lowenberg, B., Downing, J.R. & Burnett, A. Acute myeloid leukemia. *N. Engl. J Med* **341**, 1051-1062 (1999).
36. Sanz, M.A. *et al.* Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid and anthracycline monochemotherapy: a multicenter study by the PETHEMA group. *Blood* **103**, 1237-1243 (2004).
37. Mrozek, K., Baldus, C.D. & Bloomfield, C.D. *Clinical Malignant Hematology*. Sekeres, Kalaycio & Bolwell (eds.), pp. 9-23 (Mc Graw Hill, 2007).
38. Bloomfield, C.D. *et al.* Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res* **58**, 4173-4179 (1998).
39. Dohner, K. *et al.* Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* **106**, 3740-3746 (2005).
40. Schnittger, S. *et al.* Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* **106**, 3733-3739 (2005).
41. Thiede, C. *et al.* Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* **107**, 4011-4020 (2006).
42. Falini, B. *et al.* Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N. Engl. J Med* **352**, 254-266 (2005).
43. Bienz, M. *et al.* Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin Cancer Res* **11**, 1416-1424 (2005).
44. Boissel, N. *et al.* Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood* **106**, 3618-3620 (2005).
45. Pabst, T. *et al.* Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat. Genet.* **27**, 263-270 (2001).
46. Whitman, S.P. *et al.* Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res* **61**, 7233-7239 (2001).

47. Frohling,S. *et al.* Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* **100**, 4372-4380 (2002).
48. Thiede,C. *et al.* Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* **99**, 4326-4335 (2002).
49. Ariyaratana,S. & Loeb,D.M. The role of the Wilms tumour gene (WT1) in normal and malignant haematopoiesis. *Expert. Rev Mol. Med* **9**, 1-17 (2007).
50. Haber,D.A. *et al.* An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor. *Cell* **61**, 1257-1269 (1990).
51. Yang,L., Han,Y., Suarez,S.F. & Minden,M.D. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia* **21**, 868-876 (2007).
52. Baird,P.N. & Simmons,P.J. Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hemopoiesis. *Exp. Hematol.* **25**, 312-320 (1997).
53. Summers,K. *et al.* Wilms' tumour 1 mutations are associated with FLT3-ITD and failure of standard induction chemotherapy in patients with normal karyotype AML. *Leukemia* **21**, 550-551 (2007).
54. Paschka,P. *et al.* Wilms' tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol* **26**, 4595-4602 (2008).
55. Virappane,P. *et al.* Mutation of the Wilms' tumor 1 gene is a poor prognostic factor associated with chemotherapy resistance in normal karyotype acute myeloid leukemia: the United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *J Clin Oncol* **26**, 5429-5435 (2008).
56. Schmid,D. *et al.* Prognostic significance of WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* **11**, 639-643 (1997).
57. Barragan,E. *et al.* Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Haematologica* **89**, 926-933 (2004).
58. Bergmann,L. *et al.* High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood* **90**, 1217-1225 (1997).
59. Sakamoto,Y. *et al.* WT1 mRNA level in peripheral blood is a sensitive biomarker for monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Tohoku J Exp. Med* **219**, 169-176 (2009).
60. Baldus,C.D. *et al.* Acute myeloid leukemia with complex karyotypes and abnormal chromosome 21: Amplification discloses overexpression of APP, ETS2, and ERG genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 3915-3920 (2004).

61. Marcucci,G. *et al.* Overexpression of the ETS-related gene, ERG, predicts a worse outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* **23**, 9234-9242 (2005).
62. Marcucci,G. *et al.* High expression levels of the ETS-related gene, ERG, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* **25**, 3337-3343 (2007).
63. Hoelzer,D. *et al.* Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 162-192 (2002).
64. Ferrando,A.A. *et al.* Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* **1**, 75-87 (2002).
65. Ellisen,L.W. *et al.* TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* **66**, 649-661 (1991).
66. Aifantis,I., Raetz,E. & Buonamici,S. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat. Rev Immunol.* **8**, 380-390 (2008).
67. Thomas,X. *et al.* Outcome of treatment in adults with acute lymphoblastic leukemia: analysis of the LALA-94 trial. *J Clin Oncol* **22**, 4075-4086 (2004).
68. Goekbuget,N. *et al.* Improved Outcome in Adult T-ALL by Risk Adapted Treatment Strategies. *ASH Annual Meeting Abstracts* **104**, 682 (2004).
69. Gokbuget,N. *et al.* Risk/MRD adapted GMALL trials in adult ALL. *Ann Hematol.* **83 Suppl 1**, S129-S131 (2004).
70. Gokbuget,N. & Hoelzer,D. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. *Semin. Hematol.* **46**, 64-75 (2009).
71. Weng,A.P. *et al.* Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* **306**, 269-271 (2004).
72. Oberg,C. *et al.* The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. *J Biol. Chem.* **276**, 35847-35853 (2001).
73. Nakayama,K.I. & Nakayama,K. Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 323-333 (2005).
74. Baldus,C.D. *et al.* Prognostic implications of NOTCH1 and FBXW7 mutations in adult acute T-lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **94**, 1383-1390 (2009).
75. Zhu,Y.M. *et al.* NOTCH1 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia: prognostic significance and implication in multifactorial leukemogenesis. *Clin Cancer Res* **12**, 3043-3049 (2006).

76. Mansour, M.R. *et al.* Prognostic implications of NOTCH1 and FBXW7 mutations in adults with T-cell acute lymphoblastic leukemia treated on the MRC UKALLXII/ECOG E2993 protocol. *J Clin Oncol* **27**, 4352-4356 (2009).
77. Baak, U. *et al.* Thymic adult T-cell acute lymphoblastic leukemia stratified in standard- and high-risk group by aberrant HOX11L2 expression: experience of the German multicenter ALL study group. *Leukemia* **22**, 1154-1160 (2008).
78. Ferrando, A.A. *et al.* Prognostic importance of TLX1 (HOX11) oncogene expression in adults with T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* **363**, 535-536 (2004).
79. Anderson, M.K., Hernandez-Hoyos, G., Diamond, R.A. & Rothenberg, E.V. Precise developmental regulation of Ets family transcription factors during specification and commitment to the T cell lineage. *Development* **126**, 3131-3148 (1999).
80. Baldus, C.D. *et al.* High Expression of the ETS Transcription Factor ERG Predicts Adverse Outcome in Acute T-Lymphoblastic Leukemia in Adults. *J Clin Oncol* **24**, 4714-4720 (2006).
81. Burmeister, T. *et al.* Patients' age and BCR-ABL frequency in adult B-precursor ALL: a retrospective analysis from the GMALL study group. *Blood* **112**, 918-919 (2008).
82. Geissner, B. *et al.* Leading prognostic relevance of the BCR-ABL translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: a prospective study of the German Multicenter Trial Group and confirmed polymerase chain reaction analysis. *Blood* **99**, 1536-1543 (2002).
83. Ho, A.D. & Wagner, W. Bone marrow niche and leukemia. *Ernst. Schering. Found. Symp. Proc.* 125-139 (2006).
84. Ravandi, F. & Estrov, Z. Eradication of Leukemia Stem Cells as a New Goal of Therapy in Leukemia. *Clinical Cancer Research* **12**, 340-344 (2006).
85. Jonge-Peeters, S.D., Kuipers, F., de Vries, E.G. & Vellenga, E. ABC transporter expression in hematopoietic stem cells and the role in AML drug resistance. *Crit Rev Oncol Hematol.* **62**, 214-226 (2007).
86. Zeng, Z. *et al.* Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML. *Blood* **113**, 6215-6224 (2009).
87. Nervi, B. *et al.* Chemosensitization of acute myeloid leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. *Blood* **113**, 6206-6214 (2009).
88. Mahadevan, D. & List, A.F. Targeting the multidrug resistance-1 transporter in AML: molecular regulation and therapeutic strategies. *Blood* **104**, 1940-1951 (2004).
89. Shih, I. & Wang, T.L. Notch signaling, gamma-secretase inhibitors, and cancer therapy. *Cancer Res* **67**, 1879-1882 (2007).

90. Keilholz,U. *et al.* A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood* **113**, 6541-6548 (2009).
91. Tanner,S.M. *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* **98**, 13901-13906 (2001).
92. Caligiuri,M.A. *et al.* Partial tandem duplication of ALL1 as a recurrent molecular defect in acute myeloid leukemia with trisomy 11. *Cancer Res* **56**, 1418-1425 (1996).
93. Schichman,S.A. *et al.* ALL-1 partial duplication in acute leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 6236-6239 (1994).
94. Baldus,C.D. *et al.* BAALC, a novel marker of human hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.* **31**, 1051-1056 (2003).
95. Wang,X. *et al.* BAALC 1-6-8 protein is targeted to postsynaptic lipid rafts by its N-terminal myristoylation and palmitoylation, and interacts with alpha, but not beta, subunit of Ca/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurochem.* **92**, 647-659 (2005).
96. Baldus,C.D. *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* **102**, 1613-1618 (2003).
97. Baldus,C.D. *et al.* BAALC expression and FLT3 internal tandem duplication mutations in acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: prognostic implications. *J Clin Oncol* **24**, 790-797 (2006).
98. Baldus,C.D. *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* **25**, 3739-3745 (2007).
99. Bienz,M. *et al.* Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin Cancer Res* **11**, 1416-1424 (2005).
100. Langer,C. *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* **111**, 5371-5379 (2008).
101. Schrama,D. *et al.* BRAFV600E mutations in malignant melanoma are associated with increased expressions of BAALC. *J Carcinog.* **7**, 1 (2008).
102. Haferlach,T. *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* **28**, 2529-2537 (2010).
103. Walgren,R. *et al.* Identification of Polymorphisms Associated with Susceptibility to Therapy-Related MDS and AML. *ASH Annual Meeting Abstracts* **110**, 15 (2007).

104. Gustafsson,B. *et al.* Mutations in the BRAF and N-ras genes in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* **19**, 310-312 (2005).
105. Brazma,A. *et al.* Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat. Genet.* **29**, 365-371 (2001).
106. Komor,M. *et al.* Transcriptional profiling of human hematopoiesis during in vitro lineage-specific differentiation. *Stem Cells* **23**, 1154-1169 (2005).
107. Vorwerk,P. *et al.* CTGF (IGFBP-rP2) is specifically expressed in malignant lymphoblasts of patients with acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Br. J Cancer* **83**, 756-760 (2000).
108. Dawczynski,K., Kauf,E. & Zintl,F. Changes of serum growth factors (IGF-I,-II and IGFBP-2,-3) prior to and after stem cell transplantation in children with acute leukemia. *Bone Marrow Transplant.* **32**, 411-415 (2003).
109. Dawczynski,K. *et al.* Expression of components of the IGF axis in childhood acute myelogenous leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* **50**, 24-28 (2008).
110. Oh,Y. IGFBPs and neoplastic models. New concepts for roles of IGFBPs in regulation of cancer cell growth. *Endocrine* **7**, 111-113 (1997).
111. Mutaguchi,K. *et al.* Restoration of insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 has a tumor-suppressive activity through induction of apoptosis in human prostate cancer. *Cancer Res* **63**, 7717-7723 (2003).
112. Wajapeyee,N., Serra,R.W., Zhu,X., Mahalingam,M. & Green,M.R. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* **132**, 363-374 (2008).
113. Sprenger,C.C., Damon,S.E., Hwa,V., Rosenfeld,R.G. & Plymate,S.R. Insulin-like Growth Factor Binding Protein-related Protein 1 (IGFBP-rP1) Is a Potential Tumor Suppressor Protein for Prostate Cancer. *Cancer Res* **59**, 2370-2375 (1999).
114. Adachi,Y. *et al.* Expression of angiomodulin (tumor-derived adhesion factor/mac25) in invading tumor cells correlates with poor prognosis in human colorectal cancer. *Int. J Cancer* **95**, 216-222 (2001).
115. Ruan,W.J. *et al.* IGFBP7 plays a potential tumor suppressor role against colorectal carcinogenesis with its expression associated with DNA hypomethylation of exon 1. *J. Zhejiang. Univ Sci. B* **7**, 929-932 (2006).
116. Burger,A.M. *et al.* Down-regulation of T1A12/mac25, a novel insulin-like growth factor binding protein related gene, is associated with disease progression in breast carcinomas. *Oncogene* **16**, 2459-2467 (1998).
117. Gilliland,D.G. Targeted therapies in myeloid leukemias. *Ann Hematol.* **83 Suppl 1**, S75-S76 (2004).

118. Baldus,C.D., Mrozek,K., Marcucci,G. & Bloomfield,C.D. Clinical outcome of de novo acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review. *Br. J Haematol.* **137**, 387-400 (2007).
119. Mrozek,K., Radmacher,M.D., Bloomfield,C.D. & Marcucci,G. Molecular signatures in acute myeloid leukemia. *Curr. Opin. Hematol.* **16**, 64-69 (2009).
120. Mrozek,K., Harper,D.P. & Aplan,P.D. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Hematol. Oncol Clin North Am.* **23**, 991-1010, v (2009).
121. Schlenk,R.F. & Dohner,K. Impact of new prognostic markers in treatment decisions in acute myeloid leukemia. *Curr. Opin. Hematol.* **16**, 98-104 (2009).
122. Stone,R.M. *et al.* Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood* **105**, 54-60 (2005).
123. Schlenk,R.F. *et al.* Gene mutations and response to treatment with all-trans retinoic acid in elderly patients with acute myeloid leukemia. Results from the AMLSG Trial AML HD98B. *Haematologica* **94**, 54-60 (2009).
124. Little,M. & Wells,C. A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum. Mutat.* **9**, 209-225 (1997).
125. Tosello,V. *et al.* WT1 mutations in T-ALL. *Blood* **114**, 1038-1045 (2009).
126. Hosen,N. *et al.* The Wilms' tumor gene WT1-GFP knock-in mouse reveals the dynamic regulation of WT1 expression in normal and leukemic hematopoiesis. *Leukemia* **21**, 1783-1791 (2007).
127. Civin,C.I. *et al.* Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis. *J Clin Oncol* **14**, 2224-2233 (1996).
128. Yin,A.H. *et al.* AC133, a Novel Marker for Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Blood* **90**, 5002-5012 (1997).
129. Miraglia,S. *et al.* A Novel Five-Transmembrane Hematopoietic Stem Cell Antigen: Isolation, Characterization, and Molecular Cloning. *Blood* **90**, 5013-5021 (1997).
130. Jiang,W., Xiang,C., Cazacu,S., Brodie,C. & Mikkelsen,T. Insulin-like growth factor binding protein 7 mediates glioma cell growth and migration. *Neoplasia.* **10**, 1335-1342 (2008).
131. Haugk,K.L., Wilson,H.M., Swisshelm,K. & Quinn,L.S. Insulin-Like Growth Factor (IGF)-Binding Protein-Related Protein-1: An Autocrine/Paracrine Factor That Inhibits Skeletal Myoblast Differentiation but Permits Proliferation in Response to IGF. *Endocrinology* **141**, 100-110 (2000).
132. Plymate,S.R. *et al.* Increased manganese superoxide dismutase (SOD-2) is part of the mechanism for prostate tumor suppression by Mac25/insulin-like growth factor binding-protein-related protein-1. *Oncogene* **22**, 1024-1034 (2003).

133. Birkenkamp,K.U. *et al.* A dual function for p38 MAP kinase in hematopoietic cells: involvement in apoptosis and cell activation. *Leukemia* **13**, 1037-1045 (1999).
134. Bost,F. *et al.* Retinoic acid activation of the ERK pathway is required for embryonic stem cell commitment into the adipocyte lineage. *Biochem. J* **361**, 621-627 (2002).
135. Misaghian,N. *et al.* Targeting the leukemic stem cell: the Holy Grail of leukemia therapy. *Leukemia* **23**, 25-42 (2009).
136. Peeters,S.D. *et al.* Selective expression of cholesterol metabolism genes in normal CD34+CD38- cells with a heterogeneous expression pattern in AML cells. *Exp. Hematol.* **34**, 622-630 (2006).
137. Styczynski,J. *et al.* Predictive value of multidrug resistance proteins and cellular drug resistance in childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol* **133**, 875-893 (2007).
138. Li,H.Y., Appelbaum,F.R., Willman,C.L., Zager,R.A. & Banker,D.E. Cholesterol-modulating agents kill acute myeloid leukemia cells and sensitize them to therapeutics by blocking adaptive cholesterol responses. *Blood* **101**, 3628-3634 (2003).
139. Robinson,J.A. *et al.* Identification of a PTH regulated gene selectively induced in vivo during PTH-mediated bone formation. *J Cell Biochem.* **98**, 1203-1220 (2006).
140. Pereira,R.C. & Canalis,E. Parathyroid hormone increases mac25/insulin-like growth factor-binding protein-related protein-1 expression in cultured osteoblasts. *Endocrinology* **140**, 1998-2003 (1999).
141. Akaogi,K. *et al.* Cell adhesion activity of a 30-kDa major secreted protein from human bladder carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **198**, 1046-1053 (1994).
142. Lee,M.Y., Ryu,J.M., Lee,S.H., Park,J.H. & Han,H.J. Lipid rafts play an important role for maintenance of embryonic stem cell self-renewal. *J. Lipid Res.* jlr (2010).
143. Suda,T., Arai,F. & Hirao,A. Hematopoietic stem cells and their niche. *Trends Immunol.* **26**, 426-433 (2005).
144. Artavanis-Tsakonas,S., Rand,M.D. & Lake,R.J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-776 (1999).
145. Garrett,R.W. & Emerson,S.G. The role of parathyroid hormone and insulin-like growth factors in hematopoietic niches: physiology and pharmacology. *Mol. Cell Endocrinol* **288**, 6-10 (2008).

8 Lebenslauf

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

9 Publikationsliste

9.1 Publikationen

Sonnemann J, Kumar KS, **Heesch S**, Müller C, Hartwig C, Maaß M, Bader P, and Beck JF. Histone deacetylase inhibitors induce cell death and enhance the susceptibility to ionizing radiation, etoposide, and TRAIL in medulloblastoma cells. *Int J Oncol*. 2006 28:755-766.

Bohne A, Schlee C, Thibaut J, **Heesch S**, Thiel E, Hofmann WK, Baldus CD. Epigenetic control of differential expression of specific *ERG* isoforms in acute myeloid and T-lymphoblastic leukemia. *Leukemia research*. 2009;6:817-822.

Heesch S, Goekbuget N, Stroux A, Ortiz Sanchez J, Schlee C, Burmeister T, Schwartz S, Blau O, Keilholz U, Busse A, Hoelzer D, Thiel E, Hofmann WK, Baldus CD. Prognostic implications of mutations and expression of the *Wilms tumor 1* (WT1) gene in adult acute T-lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2010; 95(6):942-949.

Kuehnl A, Goekbuget 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; 115(18):3737-3744.

Heesch S, Schlee C, Neumann M, Stroux A, Kühnl A, Schwartz S, Haferlach T, Gökbuget 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; doi: 10.1038/leu.2010.130.

Heesch S*, Bartram I*, Neumann M, Reins J, Mossner M, Schlee C, Stroux A, Haferlach T, Gökbuget N, Hoelzer D, Hofmann WK, Thiel E, Baldus CD. Abberant expression of *IGFBP7* in acute leukemia is regulated by DNA methylation. *Cancer Science* 2010; doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01760.

Publikationen in Bearbeitung:

Neumann M, **Heesch S**, Gökbuget N, Schwartz S, Schlee C, Benlasfer O, Thibaut J, Burmeister T, Haferlach T, Hoelzer D, Hofmann WK, Thiel E, Baldus CD. Molecular and Clinical Characterization of Early T-Cell Precursor Leukemia as a High-Risk Subgroup in Adult T-ALL.

9.2 Vorträge und Posterpräsentationen

Baldus CD, Schlee C, Thibaut J, **Heesch S**, Bohne A, Thiel E, Hofmann WK. Differential Expression of ERG Isoforms in Acute Myeloid and T-Lymphoblastic Leukemia Is Regulated by DNA-Methylation. *Blood* 2007;111:2126 (Posterpräsentation ASH 2007, Atlanta, USA)

Heesch S, Goekbuget N, Stroux A, Ortiz Sanchez J, Schlee C, Burmeister T, Schwartz S, Blau O, Keilholz U, Busse A, Hoelzer D, Thiel E, Hofmann WK, Baldus CD. *Wilms tumor 1* gene mutations in adult acute T-lymphoblastic leukemia. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2008; 112(11):2516. (Posterpräsentation ASH 2008, San Francisco, USA)

Heesch S, Goekbuget N, Stroux A, Ortiz Sanchez J, Schlee C, Burmeister T, Schwartz S, Blau O, Keilholz U, Busse A, Hoelzer D, Thiel E, Hofmann WK, Baldus CD. Prognostic implications of the *Wilms tumor 1* (WT1) gene mRNA expression in adult acute T-lymphoblastic leukemia. (Vortragspräsentation EHA 2009, Berlin)

Heesch S, Schlee C, Neumann M, Stroux A, Kühnl A, Schwartz S, Haferlach T, Gökbuget N, Hoelzer D, Thiel E, Hofmann WK, Baldus CD. *BAALC* associated gene expression signature pinpoints to a role in T-ALL (Vortragspräsentation DGHO Jahrestagung 2009, Mannheim)

Kühnl A, Gökbuget N, Stroux A, Burmeister T, Neumann M, **Heesch S**, Haferlach T, Hoelzer D, Hofmann WK, Thiel E, Baldus CD. Prognostic significance of *BAALC* expression in adult B-precursor acute lymphoblastic leukemia. (Vortragspräsentation DGHO Jahrestagung 2009, Mannheim).

Heesch S, Schlee C, Neumann M, Stroux A, Kühnl A, Schwartz S, Haferlach T, Gökbuget N, Hoelzer D, Thiel E, Hofmann WK, Baldus CD. Gene expression profiling identifies *IGFBP7* as a *BAALC* co-expressed gene with a functional role in acute leukemia. ASH Annual Meeting Abstracts 2009; 114(22):2629. (Posterpräsentation ASH 2009, New Orleans, USA)

Kühnl A, Gökbuget N, Stroux A, Burmeister T, Neumann M, **Heesch S**, Haferlach T, Hoelzer D, Hofmann WK, Thiel E, Baldus CD. Overexpression of *BAALC* indicates drug resistance and predicts inferior survival in adult B-precursor acute lymphoblastic leukemia. ASH Annual Meeting Abstracts 2009; 114(22):1581. (Posterpräsentation ASH 2009, New Orleans, USA)

Nolte F, Neumann M, Benlasfer O, **Heesch S**, Thiel E, Platzbecker U, Hofmann WK. Consequent Iron Chelation Therapy in Patients with Low Risk Myelodysplastic Syndrome Leads to up-Regulation of *CXCL12*, *JAK2* and *HSF2*: Possible Link Between Iron Chelation and Improvement of Erythropoiesis. ASH Annual Meeting Abstracts 2009; 114(22):2787 (Posterpräsentation ASH 2009, New Orleans, USA)

Neumann M, **Heesch S**, Gökbuget N, Hoelzer D, Haferlach T, Hofmann WK, Thiel E, Baldus CD. Early T-cell Precursor-ALL in adult T-ALL. ASH Annual Meeting Abstracts 2009; 114(22):911. (Vortragspräsentation ASH 2009, New Orleans, USA)

Heesch S, Bartram I, Neumann M, Reins J, Mossner M, Schlee C, Stroux A, Haferlach A, Hofmann WK, Thiel E, Baldus CD. Methylation analysis and gene expression profiling of *IGFBP7* reveal insights into its role in acute leukemia. (Vortragspräsentation DGHO Jahrestagung 2010, Berlin)

Kühnl A, Kaiser M, **Heesch S**, Thiel E, Baldus CD. High expression of *IGFBP2* in adult acute myeloid leukemia and association with drug resistance. (Vortragspräsentation DGHO Jahrestagung 2010, Berlin)

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst ganz besonders bei Frau PD Dr. Claudia Baldus für die Betreuung und die außergewöhnliche Unterstützung meiner Arbeit bedanken. Durch ihre ständige Diskussionsbereitschaft und wertvollen Anregungen hat sie diese Arbeit maßgeblich gelenkt. Auch in Zeiten eigener maximaler Arbeitsbelastung war sie immer Ansprechpartner sowohl für fachliche als auch persönliche Fragen.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Wittig für seine Bereitschaft als Gutachter für diese Arbeit zur Verfügung zu stehen sowie für die freundlichen Ratschläge zur Erstellung der Arbeit.

Einen besonderen Dank möchte ich auch Herrn Prof. Hofmann aussprechen, der diese Arbeit durch viele Hilfestellungen und eine stete Diskussionsbereitschaft begleitet und unterstützt hat.

Der gesamten AG Baldus/Hofmann danke ich zutiefst für das außergewöhnliche nette und freundschaftliche Umfeld und die vielen schönen gemeinsame Stunden. Insbesondere danke ich Dr. rer. nat. Arend Diescher für die geduldige Einweisung in die molekularbiologischen Arbeiten und ein immer „offenes Ohr“. Cornelia Schlee bin ich dankbar für die tatkräftige Unterstützung und für die wunderbare Zusammenarbeit. Ein Dank an Isabelle Bartram für die Lösung so mancher Computerprobleme. Dr. med. Andrea Kühnl, Ebru Coskun, Liliana Mochmann und Jutta Ortiz Sanchez danke ich für jegliche Unterstützung. Jana Reins, Dr. med. Martin Neumann und Max Mossner bin ich dankbar für die „häuserübergreifende“ Kooperation und die ständige Hilfsbereitschaft!

Herrn Dr. rer. nat. Detlef Glaß und den Mädels der Prenz'l Apotheke danke ich für die jahrelange Unterstützung und die schöne Zusammenarbeit, die es mir ermöglichte auch während meiner wissenschaftlichen Arbeit immer noch praktisch pharmazeutisch tätig zu sein.

Ein Dank an meine Freunde für die unermüdliche Unterstützung, die mir oft bewusst oder unbewusst an vielen Stellen geholfen hat.

Ganz besonders möchte ich Florian danken für sein Verständnis, die unendliche Unterstützung und für seine Geduld, die am Ende alles ermöglichte - besonders die schönen und unvergesslichen Momente meiner Promotionszeit.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und meiner Schwester meine tiefste Dankbarkeit aussprechen. Sie haben mich in all den Jahren mit Liebe, Verständnis und tatkräftiger Unterstützung begleitet. Ihrer beständigen Ermutigung verdanke ich viel Kraft. Diese Arbeit möchte ich Ihnen widmen.

11 Anhang – Publikationen

Manuskript: “High *BAALC* expression predicts chemoresistance in adult B-precursor acute lymphoblastic leukemia”

Kühnl A, Gökbuget N, Stroux A, Burmeister T, Neumann M, **Heesch S**, Haferlach T, Hoelzer D, Hofmann WK, Thiel E, Baldus CD. *Blood* **2010**; 115(18):3737-3744.

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

Das Manuskript ist in der Online-Version nicht enthalten.

Manuskript: “Prognostic implications of mutations and expression of the *Wilms tumor 1 (WT1)* gene in adult acute T-lymphoblastic leukemia”

Heesch S, Gökbuget N, Stroux A, Ortiz T Sanchez J, Schlee C, Burmeister T, Schwartz S, Blau O, Keilholz U, Busse A, Hoelzer D, Thiel E, Hofmann WK, Baldus CD. *Haematologica* **2010**; 95(6):942-949

<http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2009.016386>

Manuskript: “*BAALC*-associated gene expression profiles define *IGFBP7* as a novel molecular target in acute leukemia”

Heesch S, Schlee C, Neumann M, Stroux A, Kühnl A, Schwartz S, Haferlach T, Gökbuget N, Hoelzer D, Thiel E, Hofmann WK, Baldus CD. *Leukemia* **2010**; doi: 10.1038/leu.2010.130

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

Das Manuskript ist in der Online-Version nicht enthalten.

Prognostic implications of mutations and expression of the Wilms tumor 1 (*WT1*) gene in adult acute T-lymphoblastic leukemia

Sandra Heesch,¹ Nicola Goekbuget,² Andrea Stroux,³ Jutta Ortiz Sanchez,¹ Cornelia Schlee,¹ Thomas Burmeister,¹ Stefan Schwartz,¹ Olga Blau,¹ Ulrich Keilholz,² Antonia Busse,¹ Dieter Hoelzer,² Eckhard Thiel,¹ Wolf-Karsten Hofmann,⁴ and Claudia D. Baldus¹

¹Charité, University Hospital Berlin, Campus Benjamin Franklin, Department of Hematology and Oncology, Berlin, Germany; ²University Frankfurt am Main, Department of Hematology and Oncology, Frankfurt/Main, Germany; ³Charité, University Hospital Berlin, Campus Benjamin Franklin, Department of Biostatistics and Clinical Epidemiology, Berlin, Germany, and ⁴University Mannheim, Department of Hematology and Oncology, Mannheim, Germany

ABSTRACT

Background

The role of the *Wilms tumor 1* gene (*WT1*) in acute leukemias has been underscored by mutations found in acute myeloid leukemia identifying patients with inferior survival. Furthermore, aberrant expression of *WT1* in acute myeloid leukemia was associated with an increased risk of relapse. No larger studies have performed a combined approach including *WT1* mutation and expression analyses in acute T-lymphoblastic leukemia.

Design and Methods

We analyzed the *WT1* mutations and the expression status in a total of 252 consecutive adult patients with newly diagnosed T-lymphoblastic leukemia, who were registered on the GMALL 06/99 and 07/03 protocols and had sufficient material available. The GMALL protocols included intensive chemotherapy as well as stem cell transplantation according to a risk-based model with indication for stem cell transplantation in first complete remission for early and mature T-lymphoblastic leukemia patients; patients with thymic T-lymphoblastic leukemia were allocated to a standard risk group and treated with intensive chemotherapy.

Results

Twenty of the 238 patients analyzed had *WT1* mutations (*WT1mut*) in exon 7. *WT1mut* cases were characterized by immature features such as an early immunophenotype and higher *WT1* expression. In thymic T-lymphoblastic leukemia, *WT1mut* patients had an inferior relapse-free survival compared to *WT1* wild-type patients. T-lymphoblastic leukemia patients with aberrant *WT1* expression (high or negative) showed a higher relapse rate and an inferior outcome compared to patients with intermediate *WT1* expression. In the standard risk group of thymic T-lymphoblastic leukemia, aberrant *WT1* expression was predictive for an inferior relapse-free survival as compared to patients with intermediate expression. In multivariate analysis, *WT1* expression was of independent prognostic significance for relapse-free survival.

Conclusions

WT1 mutations were associated with an inferior relapse-free survival in standard risk thymic T-lymphoblastic leukemia patients. Moreover, altered expression associated with inferior outcome also suggests a role of *WT1* in T-lymphoblastic leukemia and the potential use of molecularly-based treatment stratification to improve outcome.

Key words: adult acute T-lymphoblastic leukemia, *WT1*, gene expression, mutations.

Citation: Heesch S, Goekbuget N, Stroux A, Ortiz Sanchez J, Schlee C, Burmeister T, Schwartz S, Blau O, Keilholz U, Busse A, Hoelzer D, Thiel E, Hofmann W-K, and Baldus CD. Prognostic implications of mutations and expression of the Wilms tumor 1 (*WT1*) gene in adult acute T-lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2010;95:942-949. doi:10.3324/haematol.2009.016386

©2010 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper.

Acknowledgments: we thank Liliana Mochmann for critical reading of the manuscript.

Funding: supported by a grant from the Deutsche Krebshilfe (Max-Eder Nachwuchsförderung) to CD Baldus.

Manuscript received on August 31, 2009. Revised version arrived on November 1, 2009. Manuscript accepted on November 27, 2009.

Correspondence: Claudia D Baldus, Charité, University Hospital Berlin, Campus Benjamin Franklin, Department of Hematology and Oncology, Hindenburgdamm 30 12203 Berlin, Germany. E-mail: claudia.baldus@charite.de

The online version of this article has a Supplementary Appendix.

Introduction

The Wilms tumor 1 gene, *WT1*, encodes a transcription factor involved in normal and malignant hematopoiesis.¹ *WT1* was first recognized as a tumor suppressor when congenital malformation syndromes with predisposition to childhood kidney cancer were linked to *WT1* germline mutations.² In acute leukemia, *WT1* mutations have been reported in 10% of patients with acute myeloid leukemia (AML). However, mutations were also observed in selected cases of acute T-lymphoblastic leukemia (T-ALL), as well as undifferentiated/biphenotypic leukemia.³ The mutations reported included frame shift mutations in exon 7, resulting in a truncated protein lacking the major DNA binding portion of the *WT1* protein.⁴ Most importantly, in intermediate risk AML with normal cytogenetics, *WT1* mutations identified patients with an inferior outcome.^{5,6}

Apart from *WT1* mutations, overexpression of *WT1* was found in AML patients and to a lower extent in acute lymphoblastic leukemia (ALL).⁷ There are conflicting studies regarding the prognostic impact of *WT1* expression levels in newly diagnosed AML. Some studies have associated high *WT1* expression levels in pre-treatment leukemic samples with an inferior outcome, whereas other studies could not demonstrate the prognostic significance of *WT1* expression levels in AML patients.⁸⁻¹⁰ Only a few studies have so far evaluated the prognostic relevance of *WT1* expression in ALL and have suggested an association between high expression and an inferior outcome.^{11,12}

In normal hematopoiesis, expression of *WT1* is mainly restricted to the progenitor compartment, whereas mature hematopoietic cells lack *WT1* expression. Enforced expression of *WT1* in CD34 positive hematopoietic precursors has been shown to induce growth arrest.^{13,14} The ability of *WT1* to repress or activate gene transcription is dependent on *WT1* levels, isoforms, cell type, and interaction of *WT1* with other proteins.¹⁵ Moreover, the complexity of its role in hematopoiesis may be explained by its differentiation dependent function, as it was shown that *WT1* maintains primitive stem cells in a quiescence state, while it promotes differentiation of more mature progenitors.¹⁶

So far, studies have mainly focused on AML and underscored the role of *WT1* by exploring its aberrant expression and mutational status. Interestingly *WT1* mutations were predominantly observed in immature AML subtypes, in biphenotypic acute leukemias, and overexpression of *WT1* was correlated with a more undifferentiated phenotype. In a recent study by Tosello *et al.* mutations in the *WT1* gene were found in a subset of adult as well as pediatric T-ALL patients.¹⁷ Together these findings suggest that altered *WT1* function might also be implicated in other leukemic subgroups and reflect transformation of a primitive hematopoietic cell of origin with retained multilineage potential.³

We had previously shown that AML and T-ALL share molecular markers with prognostic significance that are indicative of an immature leukemic subtype.¹⁸ Thus, we have examined the prognostic implications of *WT1* mutations and expression levels in a large cohort of adult T-ALL within the German Multicenter ALL (GMALL) study group. As multiple genetic hits cooperate in different cellular pathways and are required for leukemic transformation,^{19,20} *WT1* alterations were analyzed in the context of other genetic alterations.

Design and Methods

Patients and treatment

We studied a total of 252 consecutive adult patients with newly diagnosed T-ALL who were registered on the GMALL 06/99 and 07/03 protocols and had sufficient material available.^{21,22} The GMALL protocols included intensive chemotherapy as well as stem cell transplantation according to a risk-based model with indication for stem cell transplantation in first complete remission for early and mature T-ALL patients; patients with thymic T-ALL were allocated to a standard risk group and treated with intensive chemotherapy. All patients gave written informed consent to participate in the study according to the Declaration of Helsinki. The study was approved by the ethics board of the Goethe University Frankfurt/Main, Germany.

Molecular characterization

Pre-treatment bone marrow (BM) samples were centrally collected, enriched for the blast fraction by density-gradient centrifugation, and stored in liquid nitrogen. Immunophenotyping of fresh samples was centrally performed by flow cytometry in the GMALL reference laboratory at the Charité, Berlin, Germany. Immunophenotyping was carried out as previously described.²³ CD1a positive, cortical (III) stage T-ALL was referred as thymic T-ALL in the GMALL study group.

From pre-treatment bone marrow samples (n=252) sufficient genomic DNA (n=238) and RNA (n=223) were isolated using the Trizol reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Specimens of the 238 patients were studied for *WT1* mutations in exons 7 and 9 by DNA sequencing of amplified PCR products.⁵ Mutations were confirmed by cloning the specific PCR products and sequencing up to 14 independent clones. Mutations in the *NOTCH1* and the *FBXW7* genes were determined by direct sequencing of PCR-amplified products.^{24,25} *FLT3* mutations [internal tandem duplications (ITD) and mutations in the tyrosine kinase domain (TKD835)] were analyzed using the *FLT3* mutation assay (*InVivoScribe* Technologies, San Diego, USA). The mRNA expression of *HOX11*, *HOX11L2*, *BAALC*, and *ERG* were determined by real-time RT-PCR.¹⁸ Expression analysis of *WT1* was performed in 223 samples by a comparative real-time RT-PCR assay using primers WT1F CAGGCCAGGATGTTTCCTAA and WT1R AATGAGTGGTTGGGGAACGT with a *WT1*-probe 5'FAM-CCGCTATTCGCAATCAGGGTTACA-TAMRA. Multiplex PCR was performed with *beta-glucuronidase* (*GUS*) as a housekeeping gene in duplicates.²⁶ PCR conditions were as follows: initial denaturation with 95°C for 10 min, annealing at 60°C and extension at 72°C. *GUS* and *WT1* were coamplified using 2 µL cDNA, 1x master mix (IQ Mix, BioRad, Munich, Germany). All reactions were carried out using the Rotor Gene Real-time PCR 3000 Machine (Corbett Research, Qiagen, Germany). The comparative cycle threshold (*C_T*) method was used to determine the relative expression levels of *WT1*, and the cycle number difference ($\Delta C_{T} = GUS - WT1$) was calculated using the mean of ΔC_{T} from the two replicates, that is $\mu(\Delta C_{T})$, and expressed as $2^{-\mu(\Delta C_{T})}$. In all samples, amplification of *GUS* reached the threshold within 30 cycles. For samples without detectable *WT1* amplification within 60 cycles, *WT1* expression values were set at 0. A calibrator (cDNA from the cell line KG1a) included in each run was used for standardization between runs. Positive and negative controls were included in all assays.

Statistical analyses

Comparisons of baseline clinical variables across groups were made using the χ^2 Fisher's exact test for categorical data; the non-parametric Mann-Whitney *U* test was applied for quantitative variables. A *P* value ≤ 0.05 (two-sided) was considered to indicate a significant difference. Clinical follow-up data were available from 215 T-ALL patients with a median follow-up time of 20.5 months (range:

0.5 to 81.2 months). Complete remission was assessed after completion of induction chemotherapy. Overall survival and relapse-free survival were calculated using the Kaplan-Meier method and the log-rank test was used to compare differences between survival curves. Overall survival was measured from the protocol on-study date until the date of death of any cause. Relapse-free survival was measured from time of complete remission date until the date of relapse.¹⁸ For outcome analyses patients were censored at the time of stem cell transplantation.

Three *WT1* expression groups were defined as follows: after categorizing *WT1* expression levels into quintiles, a logistic regression analysis with relapse as the dependent and *WT1* grouping as the independent variable was performed. In this model, T-ALL patients with the highest quintile (*WT1* high, n=45; median expression: 0.04, range: 0.01-0.4) and patients with no detectable *WT1* expression (*WT1* negative, n=97) differentiated substantially with respect to relapse (i. e. the differences in regression coefficients had the magnitude of about two standard errors) compared to the remaining patients with intermediate *WT1* expression levels (*WT1* intermediate, n=81; median expression: 0.0001, range: 2×10^{-9} to 10^{-3}). The follow-up time and censoring was equivalent between the three expression groups.

In order to identify independent prognostic factors and effect modifiers (i. e. interactions between different factors), Cox's proportional hazards models were constructed. The following covariates were included into the full model: *BAALC* expression (low versus high), *ERG* expression (low versus high), white blood count (WBC as continuous), age (< 35 versus > 35 years), immunophenotype (thymic versus early/mature). The impact of effect modifiers was verified by the inclusion of interaction terms into the multiple Cox's regression analyses. Stepwise forward and backward selections were performed. All calculations were performed using the SPSS software, version 17 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Table 1. Clinical and molecular characteristics of T-ALL patients with respect to the *WT1* mutation status.

		<i>WT1</i> WT (n=218)	<i>WT1</i> MUT (n=20)	P Value
WBC ($\times 10^9/L$)	median	39.7	35.3	0.94
	range	0.8-853	1-666	
Age (years)	median	33	28	0.09
	range	16-70	15-63	
Early T-ALL	n	55	9	
	%	25	45	
Thymic T-ALL	n	125	7	0.10
	%	57	35	
Mature T-ALL	n	38	4	
	%	17	20	
CD34 expression (%)	mean	20	37	0.02
	range	0-97	0-95	
CD13 expression (%)	mean	13	26	0.03
	range	0-93	0-97	
<i>WT1</i> expression	n	191	18	<0.001
	median	0	0.052	
	range	0-0.148	0-0.395	
<i>HOX11L2</i> expression	positive/total	13/178	8/17	<0.001
	%	7	47	

Results

WT1 mutations in adult T-ALL

WT1 mutations (*WT1mut*) were detectable in 20 (8%) of the 238 T-ALL patients. Mutations in exon 7 (*WT1mut7*) were identified in all 20, with 2 patients having coexisting mutations in exon 9 (*WT1mut9*). *WT1mut7* were frameshift or nonsense mutations predicted to result in a truncated *WT1* protein, whereas *WT1mut9* were missense mutations leading to single amino-acid substitutions (Online Supplementary Table S1). *WT1* wild-type amplicons were present in the majority of samples; thus it is likely that mutations were heterozygous, though the presence of residual normal cells or subpopulations of leukemic cell clones without *WT1* mutations cannot be excluded. We focused on *WT1* exons 7 and 9 as these regions have previously been recognized as mutational hot spots in AML. However, we cannot exclude that mutations in other regions also exist.^{4,17}

Association of *WT1* mutations with clinical and molecular characteristics

There was no significant difference between *WT1mut* and *WT1* wild-type (*WT1wt*) patients with respect to clinical parameters at diagnosis such as WBC, age, sex, medi-

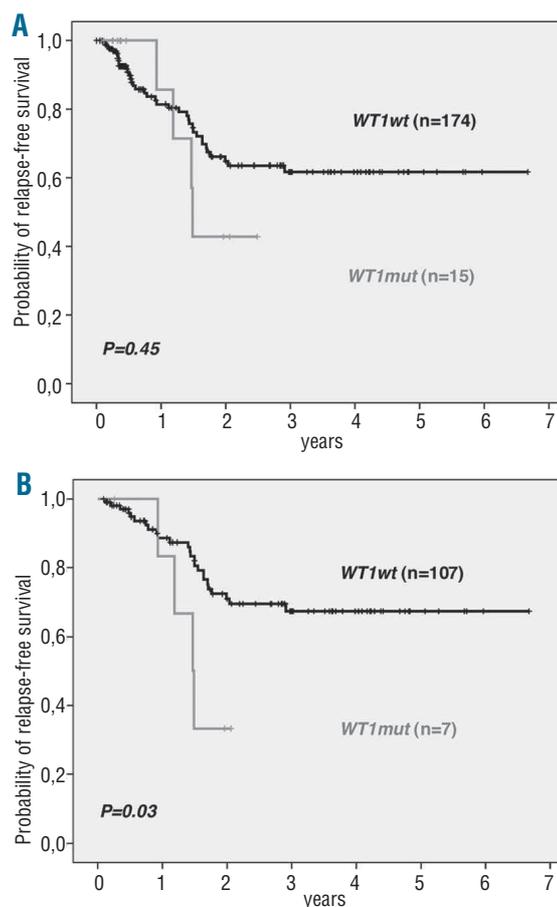


Figure 1. Relapse-free survival of adult T-ALL patients with respect to the *WT1* mutation status. (A) Overall T-ALL cohort. (B) Thymic T-ALL subgroup.

astinal mass, CNS involvement (Table 1; *data not shown*). *WT1mut* cases were characterized by immature features such as an early immunophenotype (45% of *WT1mut* showed an early T-ALL as compared to only 25% of *WT1wt*; $P=0.07$). *WT1mut* cases also showed higher CD34 levels as determined by flow cytometry (mean CD34 expression: *WT1mut*: 37% vs. *WT1wt*: 20%; $P=0.02$), and more frequently co-expressed the myeloid marker CD13 ($P=0.03$; Table 1). Moreover, *WT1mut* cases showed a higher frequency of aberrant *HOX11L2* expression (47% of *WT1mut* vs. 7% of *WT1wt* expressed *HOX11L2*; $P<0.001$) and *WT1mut* cases had significantly higher *WT1* mRNA expression levels as compared to *WT1wt* cases ($P<0.001$). Expression of both mutated and wild-type *WT1* transcripts were verified by PCR using mutation specific primers in 2 representative cases (*data not shown*). There was no significant correlation between the *WT1* mutation status and expression of the previously characterized molecular risk markers *ERG*, *BAALC*, and *HOX11*.

The presence of coexisting gene mutations was further investigated. Similar to the mutation frequencies observed in *WT1wt* patients, *WT1mut* cases showed gene mutations in *NOTCH1* (10/20, 50% of cases) and *FBXW7* (2/20, 10% of cases). In addition, cases were also analyzed for *FLT3*

mutations, given a high frequency of *FLT3* ITD mutations observed in *WT1mut* AML.^{4,6} Though *FLT3* mutations are a rare event in T-ALL (found in up to only 3%),^{27,28} in *WT1mut* cases, we identified one T-ALL patient with co-existence of an *FLT3* ITD (1/20) and 3 patients with *FLT3* TKD mutations (3/20). Thus 20% of *WT1mut* T-ALL harbored simultaneous *FLT3* mutations (Online Supplementary Figure S1). In contrast, only one *WT1wt* patient showed a *FLT3* ITD (1/108 *WT1wt* cases) and 2 *WT1wt* patients had an *FLT3* TKD mutation (2/101 *WT1wt* cases).

WT1 mutations and outcome

No differences were observed in the complete remission rates between mutated and wild-type *WT1* patients. We found no significant difference in the relapse-free survival between the *WT1mut* and *WT1wt* patients in the overall cohort (Figure 1A). However, within the standard risk group of thymic T-ALL, the small subgroup of *WT1mut* showed an inferior relapse-free survival as compared to *WT1wt* thymic patients ($P=0.03$; Figure 1B).

WT1 mRNA expression in adult T-ALL

Expression levels of *WT1* were analyzed in 223 patients. Three expression groups including *WT1* negative ($n=97$),

Table 2. Molecular characteristics and outcome with respect to *WT1* expression.

		<i>WT1</i> negative (n=97)	<i>WT1</i> intermediate (n=81)	<i>WT1</i> high (n=45)	P Value
WT1 genotype	mutated/total	1/94	4/74	13/41	<0.001
	%	1	5	29	
Early T-ALL	n	22	17	25	overall: 0.001 early vs. others: 0.07
	%	23	21	56	
Thymic T-ALL	n	56	52	14	
	%	58	64	31	
Mature T-ALL	n	19	12	6	
	%	20	12	13	
CD34 expression (%)	mean	21	22	29	0.30
	range	0-97	0-93	0-95	
CD13 expression (%)	mean	13	10	25	0.05
	range	0-87	0-87	0-97	
<i>ERG</i> expression group	high/total	48/77	39/76	14/39	0.03
	%	62	51	36	
<i>BAALC</i> expression group	high/total	14/71	16/70	18/40	0.01
	%	20	23	45	
<i>HOX11L2</i> expression	positive/total	3/76	5/66	14/43	<0.001
	%	4	8	33	
complete remission	n. of pts/total	70/77	71/73	41/44	0.24
	%	91	93	93	
relapse [†]	n. of pts/total	16/46	11/53	12/18	0.002
	%	35	21	67	
overall group					
relapse-free survival					
n. of pts		70	70	41	0.001
% relapse-free at 4 years		57.0	77.2	25.8	
SE		8.3	6.3	12.5	
thymic subgroup					
relapse-free survival					
n. of pts		44	51	13	0.003
% relapse-free at 4 years		59.6	83.9	30.8	
SE		8.8	6.2	14.7	

[†]Patients receiving stem cell transplantation in first complete remission and patients who were taken off protocol were not assessed for the relapse rate. SE: standard error.

WT1 intermediate (n=81), and *WT1* high (n=45) were defined as outlined above (see *Statistical analyses*). These groups did not differ with respect to clinical parameters at diagnosis (including age, WBC, CNS involvement, mediastinal mass; *data not shown*). Patients with high *WT1* expression were characterized by immature features such as an early immunophenotype, high *BAALC* expression levels, and aberrant expression of *CD13* and *HOX11L2*. *WT1* negative and *WT1* intermediate cases had predominantly a thymic phenotype (Table 2). A strong correlation was observed between the *WT1* expression and mutation status: *WT1* mutations were predominantly found in the *WT1* high group (13/41; 29% were *WT1mut*) compared to only 1/94 (1% of *WT1* negative and 4/74 (5%) of *WT1* intermediate cases harboring *WT1* mutations ($P<0.001$). No differences were seen in the frequencies of *NOTCH1* or *FBXW7* gene mutations across the *WT1* expression groups (*data not shown*).

Complete remission rates were similar between patients of the different *WT1* expression groups. However, T-ALL patients with negative or high *WT1* expression relapsed more frequently (35% and 67%, respectively) compared to patients with intermediate *WT1* expression (21%; overall $P=0.002$; Table 2). In the overall cohort, T-ALL patients with high expression showed an inferior outcome with only 25.8% of patients remaining relapse-free at four years as compared to 57.0% of *WT1* negative and 77.2% of *WT1* intermediate patients (overall $P=0.001$; Table 2, Figure 2A). Moreover, in the multivariate analysis (Table 3), *WT1* expression was of independent prognostic significance ($P=0.009$). For T-ALL patients with high *WT1* expression a Hazard Ratio of 4.0 and for patients lacking *WT1* expression a Hazard Ratio of 1.6 were observed.

Prognostic relevance of *WT1* mRNA expression in adult T-ALL subgroups

We next investigated the prognostic impact of *WT1* expression in the standard risk group of thymic T-ALL. An unfavorable outcome was observed for patients with *WT1* high (relapse-free at four years: 30.8%) or negative expression (relapse-free at four years: 59.6%) as compared to thymic T-ALL with intermediate *WT1* expression (relapse-free at four years: 83.9%; overall $P=0.003$; Table 2; Figure 2B).

Moreover, when patients with negative or high *WT1* expression were combined to a *WT1* high-risk group and compared to the favorable group of patients with intermediate *WT1* expression (*WT1* low-risk group), thymic T-ALL patients within the *WT1* high-risk group showed an

inferior overall survival ($P=0.037$; Figure 3A).

In the GMALL protocols, early and mature T-ALLs are defined high risk and allocated to allogeneic stem cell transplantation in first complete remission. For these patients, *WT1* expression was no longer of prognostic relevance as a similar outcome for *WT1* low-risk and *WT1* high-risk patients was observed ($P=0.74$; Figure 3B).

Discussion

We present a study investigating genotype and expression alterations of *WT1* in a large cohort of adult T-ALL. Overall, *WT1* mutations were found in 8% of T-ALL patients at initial diagnosis and associated with a more immature T-ALL subtype; *WT1* mutated patients showed a higher relapse rate. In addition, altered *WT1* expression was of independent prognostic significance with negative or high *WT1* expression levels predicting inferior outcome.

WT1 mutations have previously been reported in about

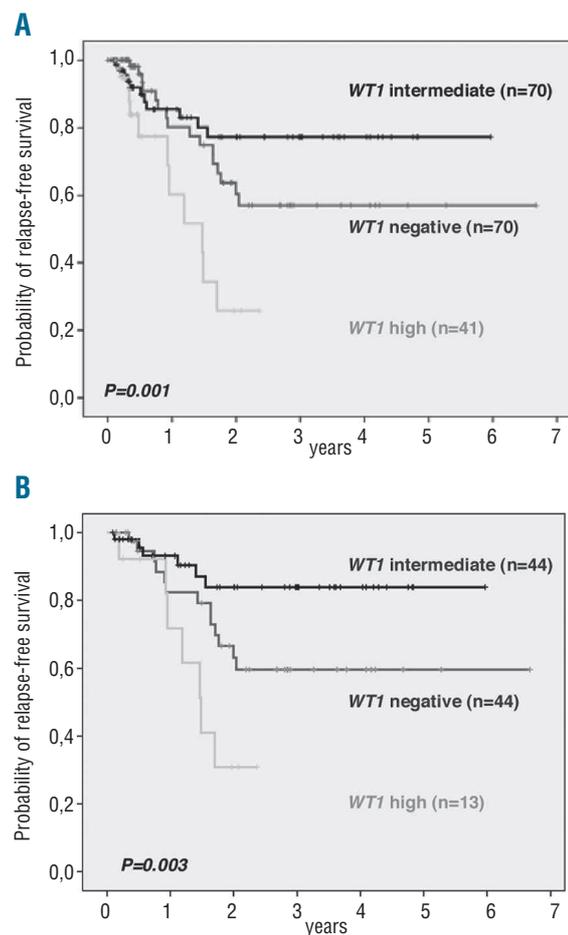


Figure 2. Relapse-free survival of adult T-ALL patients with respect to *WT1* expression. (A) Overall T-ALL cohort. (B) Thymic T-ALL subgroup. The overall P values are given. Comparisons between the separate *WT1* expression groups were as follows: 2A: *WT1* intermediate versus *WT1* negative: $P=0.26$; *WT1* intermediate versus *WT1* high: $P=0.003$; *WT1* negative versus *WT1* high: $P=0.002$. 2B: *WT1* intermediate versus *WT1* negative: $P=0.055$; *WT1* intermediate versus *WT1* high: $P=0.054$; *WT1* negative versus *WT1* high: $P=0.001$.

Table 3. Multivariate analysis for relapse-free-survival.

Endpoint	Variables in the final model	HR	CI	P Value
RFS	Immunophenotype			0.01
	early vs. thymic	3.81	1.25-11.62	0.02
	mature vs. thymic	3.36	1.23-9.15	0.02
RFS	<i>WT1</i> expression			0.009
	negative vs. intermediate	1.57	0.71-3.5	0.27
	high vs. intermediate	4.01	1.62-9.91	0.003

RFS, relapse-free survival; HR, hazard ratio; CI, confidence interval. Variables considered for model inclusion: *WT1* expression, age, WBC, ERG expression, *BAALC* expression, immunophenotype.

10% of AML patients with normal cytogenetics and were of adverse prognostic significance predicting inferior overall survival, relapse-free survival, as well as response to induction therapy.^{3,6} Interestingly, *WT1* mutations were associated with high expression of the progenitor markers *ERG* and *BAALC*, which have been shown to share prognostic significance in AML and T-ALL.^{5,18} We, therefore, reasoned that *WT1* mutations might also be of prognostic relevance in T-ALL. Frequency and localization were very similar to the reports in AML. *WT1* mutations in exon 7 are expected to result in a truncated WT1 protein that acts in a dominant negative manner by impaired DNA binding and abolished protein interaction abilities.² Thus, WT1 may function as a tumor suppressor not only contributing to myeloid but may also be implicated in T-cell leukemogenesis as the repression of downstream targets is likely impaired in mutated *WT1* leukemic cells. Moreover, the coexistence of gene mutations, 70% (14/20) of T-ALL patients with *WT1* mutations revealed additional mutations in *NOTCH1*, *FBXW7*, or *FLT3*, suggests that loss of WT1 function may act in cooperation with other genetic hits likely affecting differentiation and proliferation.

Whereas *WT1* mutations were not predictive for pri-

mary chemotherapy resistance in our T-ALL cohort, in contrast to the observation in AML,⁶ *WT1* mutated patients showed a higher relapse rate compared to *WT1wt* T-ALL patients and within the standard risk group of thymic T-ALL, *WT1mut* patients had an adverse relapse-free survival. These outcome analyses suggesting an adverse effect of *WT1* mutations in T-ALL remain limited due to the small number of *WT1* mutated cases. Interestingly, in a recent study by Tosello *et al.* *WT1* mutations were found in a similar frequency of adult T-ALL patients (11.7%); however no significant prognostic impact was observed in the overall T-ALL cohort.¹⁷

In addition to mutational events, alterations of *WT1* expression (both under- and overexpression) have been described in various malignancies. In acute leukemia, *WT1* expression levels have mainly been studied in AML with inconsistent results with respect to their prognostic impact at initial diagnosis.^{15,29} Studies investigating *WT1* expression as marker of minimal residual disease have shown more consistency with rising *WT1* expression predicting relapse.^{30,31} However, the prognostic impact of *WT1* expression has not yet been determined in a larger cohort of adult T-ALL. T-ALL patients with high *WT1* expression levels displayed a specific molecular signature as shown by an immature phenotype, aberrant CD13 expression, and positivity for *BAALC* and *HOX11L2* (both markers associated with inferior outcome).^{18,31} As it was shown that enforced expression of *WT1* in thymocytes blocked intrathymic differentiation, high expression of *WT1* in T-ALL blasts may reflect the cellular origin of progenitors (e.g. early thymocyte progenitor) that physiologically express *WT1* at high levels.^{13,2,33} Importantly, *WT1* expression remained of prognostic significance independently of the other factors including the immunophenotype.³⁴ Similar to data in pediatric ALL by Boublikova *et al.*, we also observed that in addition to patients with high *WT1* expression, patients with no *WT1* expression showed an inferior outcome compared to patients with intermediate expression levels.¹¹ In particular, in the standard risk group of thymic T-ALL intermediate *WT1* expression was associated with a relapse-free survival of over 80% at four years, whereas *WT1* negative and *WT1* high expressers did significantly worse (59.6% and 30.8%, respectively).

The identification of *WT1* mutations acting in a dominant negative fashion as well as the ability of *WT1* to induce growth inhibition and suppress tumorigenicity in mice has supported its role as tumor suppressor.^{14,15} We propose that in addition to its mutational inactivation, lack of *WT1* expression may act in a similar manner in T-ALL. So far combined expression and mutation analyses of *WT1* have not yet been performed, but gene expression analyses identified a subgroup of AML patients with very low *WT1* expression and indicated that *WT1* is specifically deregulated in subgroups of leukemia.³⁵ In fact, the *WT1* negative expression group rarely showed *WT1* mutations (only one T-ALL patient lacking *WT1* expression harbored a *WT1* mutation) suggesting that lack of mRNA might be sufficient for a pathophysiological impact and would not require additional mutational inactivation. Thus, lack of physiological *WT1* function resulting in altered regulation of downstream targets might be implicated in leukemogenesis and may confer chemotherapy resistance similar to mutational inactivation of *WT1*.

On the other hand, an oncogenic role has also been sug-

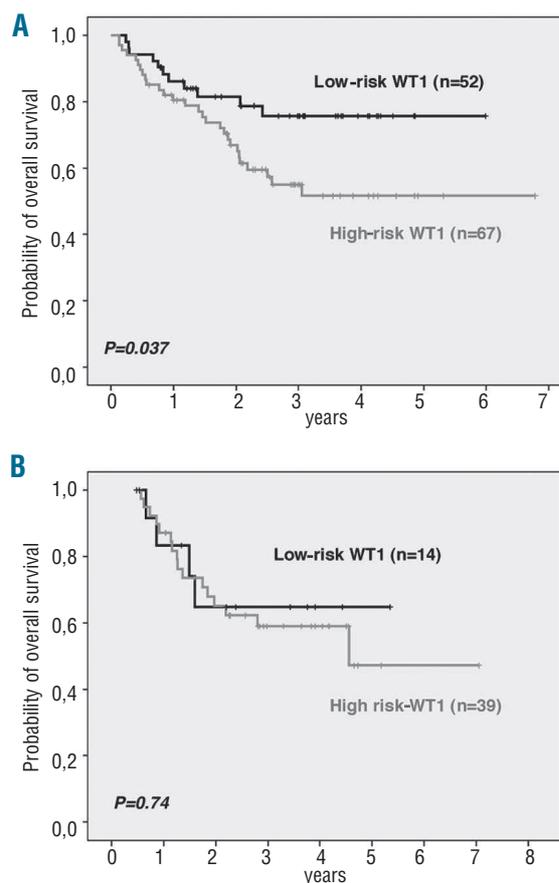


Figure 3. Overall-survival with respect to *WT1* expression in T-ALL subgroups. (A) *WT1* expression risk groups in thymic T-ALL. (B) *WT1* expression risk groups in early/mature T-ALL (including only patients undergoing allogeneic stem cell transplantation as assigned by the protocol).

gested by *WT1* overexpression where enforced expression of *WT1* in murine hematopoietic progenitors resulted in expansion of undifferentiated cells and the addition of a second genetic hit blocking differentiation-induced leukemic transformation.³⁶ In leukemia, high levels of *WT1* expression may promote proliferation and protect cells from apoptosis as it was shown that *WT1* overexpression is associated with chemotherapy resistance *in vitro* due to repression of the proapoptotic gene *BAK* and induction of *BCL2*.^{37,38} In T-ALL, these findings can be recapitulated as leukemic blasts with high level *WT1* expression displaying an immature phenotype and patients with *WT1* high expression showing a higher relapse rate and an inferior survival. The observation that *WT1* mutated cases show frequent overexpression of *WT1* (expression of the *WT1* wild type as well as mutated allele) might be a result of its negative auto-regulation, which is impaired by the mutations affecting the DNA binding domain.³⁹

In summary, these data suggest that the transcriptional control of *WT1* resembles Janus-like characteristics with abilities in repression as well as activation of different

downstream pathways. Thus altered *WT1* function, either by mutational inactivation or lack of mRNA expression, as well as aberrant overexpression might contribute in different ways. Though the precise alterations of *WT1* downstream pathways in these scenarios will have to be explored in T-ALL, the prognostic implications already ask for validation. Until further studies confirm these findings, immunophenotyping remains at this point the most established factor used for risk adapted treatment stratification.

Authorship and Disclosures

SH conducted the study, performed the laboratory work and wrote the manuscript. NG and DH provided the clinical data and critically reviewed the manuscript. AS participated in the statistical analysis. CS, TB, SS, OB, UK, AB provided molecular data. ET and WKH co-ordinated the research. CDB was the principal investigator, wrote the manuscript, and takes primary responsibility for the paper.

The authors reported no potential conflicts of interest.

References

- Ariyaratana S, Loeb DM. The role of the Wilms tumour gene (WT1) in normal and malignant haematopoiesis. *Expert Rev Mol Med*. 2007;9(14):1-17.
- Little M, Wells C. A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum Mutat*. 1997; 9(3):209-25.
- King-Underwood L, Pritchard-Jones K. Wilms' tumor (WT1) gene mutations occur mainly in acute myeloid leukemia and may confer drug resistance. *Blood*. 1998;91(8): 2961-8.
- Summers K, Stevens J, Kakkas I, Smith M, Smith LL, Macdougall F, et al. Wilms' tumour 1 mutations are associated with FLT3-ITD and failure of standard induction chemotherapy in patients with normal karyotype AML. *Leukemia*. 2007;21(3): 550-1.
- Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Whitman SP, Mrózek K, Maharry K, et al. Wilms' tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol*. 2008;26(28):4595-602.
- Virappane P, Gale R, Hills R, Kakkas I, Summers K, Stevens J, et al. Mutation of the Wilms' Tumor 1 gene is a poor prognostic factor associated with chemotherapy resistance in normal karyotype acute myeloid leukemia: The United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *J Clin Oncol*. 2008;26(33):5429-35.
- Menssen HD, Renkl HJ, Rodeck U, Maurer J, Notter M, Schwartz S, et al. Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia*. 1995; 9(6):1060-7.
- Schmid D, Heinze G, Linnerth B, Tisljar K, Kusec R, Geissler K, et al. Prognostic significance of WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1997;11(5):639-43.
- Barragán E, Cervera J, Bolufer P, Ballester S, Martín G, Fernández P, et al. Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2004; 89(8):926-33.
- Bergmann L, Miething C, Maurer U, Brieger J, Karakas T, Weidmann E, Hoelzer D. High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood*. 1997;90(3):1217-25.
- Boublikova L, Kalinova M, Ryan J, Quinn F, O'Marcaigh A, Smith O, et al. Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: a wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring. *Leukemia*. 2006;20(2):254-63.
- Chiusa L, Francia di Celle P, Campisi P, Ceretto C, Marmont F, Pich A. Prognostic value of quantitative analysis of WT1 gene transcripts in adult acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2006;91(2):270-1.
- Baird PN, Simmons PJ. Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hematopoiesis. *Exp Hematol*. 1997;25(4):312-20.
- Svedberg H, Richter J, Gullberg U. Forced expression of the Wilms tumor 1 (WT1) gene inhibits proliferation of human hematopoietic CD34(+) progenitor cells. *Leukemia*. 2001;15(12):1914-22.
- Yang L, Han Y, Suarez Saiz F, Minden MD. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia*. 2007;21(5):868-76.
- Ellisen LW, Carlesso N, Cheng T, Scadden DT, Haber DA. The Wilms tumor suppressor WT1 directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *EMBO J*. 2001;20(8): 1897-909.
- Tosello V, Mansour MR, Barnes K, Paganin M, Sulis ML, Jenkinson S, et al. WT1 mutations in T-ALL. *Blood*. 2009;114(5):1038-45.
- Baldus CD, Martus P, Burmeister T, Schwartz S, Gökbuget N, Bloomfield CD, et al. Low ERG and BAALC expression identifies a new subgroup of adult acute T-lymphoblastic leukemia with a highly favorable outcome. *J Clin Oncol*. 2007; 25(24):3739-45.
- Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA. The molecular basis of leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004:80-97.
- Van Vlierberghe P, Homminga I, Zuurbier L, Gladdines-Buijs J, van Wering ER, Horstmann M, et al. Cooperative genetic defects in TLX3 rearranged pediatric T-ALL. *Leukemia*. 2008;22(4):762-70.
- Brüggemann M, Raff T, Flohr T, Gökbuget N, Nakao M, Droese J, et al. German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2006;107(3):1116-23.
- Schwartz S, Rieder H, Schläger B, Burmeister T, Fischer L, Thiel E. Expression of the human homologue of rat NG2 in adult acute lymphoblastic leukemia: close association with MLL rearrangement and a CD10(-)/CD24(-)/CD65(+)/CD15(+) B-cell phenotype. *Leukemia* 2003;17(8):1589-95.
- Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995;9(10): 1783-6.
- Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP 4th, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2004;306(5694):269-71.
- Nowak D, Mossner M, Baldus CD, Hopfer

- O, Thiel E, Hofmann WK. Mutation analysis of hCDC4 in AML cells identifies a new intronic polymorphism. *Int J Med Sci.* 2006;3(4):148-51.
26. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia.* 2003;17(12):2474-86.
 27. Paietta E, Ferrando AA, Neuberger D, Bennett JM, Racevskis J, Lazarus H, Dewald G, Rowe JM, Wiernik PH, Tallman MS, Look AT. Activating FLT3 mutations in CD117/KIT(+) T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Blood.* 2004;104(2):558-60.
 28. Van Vlierberghe P, Meijerink JP, Stam RW, van der Smissen W, van Wering ER, Beverloo HB, Pieters R. Activating FLT3 mutations in CD4+/CD8- pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Blood.* 2005;106(13):4414-5.
 29. Lapillonne H, Renneville A, Auvrignon A, Flamant C, Blaise A, Perot C, et al. High WT1 expression after induction therapy predicts high risk of relapse and death in pediatric acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2006;24(10):1507-15.
 30. Weisser M, Kern W, Rauhut S, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Schnittger S. Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2005;19(8):1416-23.
 31. Baak U, Gökbuget N, Orawa H, Schwartz S, Hoelzer D, Thiel E, Burmeister T; German Multicenter ALL Study Group. Thymic adult T-cell acute lymphoblastic leukemia stratified in standard- and high-risk group by aberrant HOX11L2 expression: experience of the German multicenter ALL study group. *Leukemia.* 2008;22(6):1154-60.
 32. Hosen N, Sonoda Y, Oji Y, Kimura T, Minamiguchi H, Tamaki H, et al. Very low frequencies of human normal CD34+ haematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumour gene WT1 at levels similar to those in leukaemia cells. *Br J Haematol.* 2002;116(2):409-20.
 33. Li H, Oka Y, Tsuboi A, Yamagami T, Miyazaki T, Yusa S, et al. The Ick promoter-driven expression of the Wilms tumor gene WT1 blocks intrathymic differentiation of T-lineage cells. *Int J Hematol.* 2003;77(5):463-70.
 34. Thiel E, Kranz BR, Raghavachar A, Bartram CR, Löffler H, Messerer D, et al. Prethymic phenotype and genotype of pre-T (CD7+ER-) cell leukemia and its clinical significance within adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1989;73(5):1247-58.
 35. Valk PJ, Verhaak RG, Beijnen MA, Erpelinck CA, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Boer JM, et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2004;350(16):1617-28.
 36. Nishida S, Hosen N, Shirakata T, Kanato K, Yanagihara M, Nakatsuka S, et al. AML1-ETO rapidly induces acute myeloblastic leukemia in cooperation with the Wilms tumor gene, WT1. *Blood.* 2006;107(8):3303-12.
 37. Ito K, Oji Y, Tatsumi N, Shimizu S, Kanai Y, Nakazawa T, et al. Antiapoptotic function of 17AA(+)/WT1 (Wilms' tumor gene) isoforms on the intrinsic apoptosis pathway. *Oncogene.* 2006;25(30):4217-29.
 38. Mayo MW, Wang CY, Drouin SS, Madrid LV, Marshall AF, Reed JC, Weissman BE, Baldwin AS. WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene. *EMBO J.* 1999;18(14):3990-4003.
 39. Rupperecht HD, Drummond IA, Madden SL, Rauscher FJ 3rd, Sukhatme VP. The Wilms' tumor suppressor gene WT1 is negatively autoregulated. *J Biol Chem.* 1994;269(8):6198-206.