

Aus dem  
CharitéCentrum 14 für Tumormedizin  
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie  
Campus Benjamin Franklin  
Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. E. Thiel

## **HABILITATIONSSCHRIFT**

Untersuchungen zur Molekulargenetik  
der akuten lymphatischen Leukämie des Erwachsenenalters

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Innere Medizin  
vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin  
von  
Dr. med. Dr. rer. nat. Thomas Burmeister

eingereicht: September 2008  
Dekanin: Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich  
1. Gutachter: Prof. Dr. Hubert Serve  
2. Gutachter: Prof. Dr. Brigitte Schlegelberger

Wir müssen wissen,  
wir werden wissen.

-- DAVID HILBERT 1930

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	<i>BCR-ABL</i> -positive ALL	1
1.2.	<i>MLL</i> -Aberrationen bei ALL	4
1.3	ALL mit <i>TCF3-PBX1</i> -Fusion (Translokation t(1;19)(q23;p13.3))	5
1.4.	ALL mit <i>ETV6-AML1</i> (Translokation t(12;21)(p13;q22))	6
1.5	Die ALL vom Burkitt-Typ bzw. reifzellige B-ALL	7
1.6	T-ALL mit aberranter <i>HOX11</i> - oder <i>HOX11L2</i> -Expression	8
1.7	Aneuploidie bei ALL	8
1.8	Andere Aberrationen von unklarer oder noch nicht abschließend geklärt pathogenetischer oder prognostischer Relevanz	10
<b>2.</b>	<b>Publikationen</b>	<b>12</b>
2.1	Molekulare Heterogenität der Burkitt-ALL ( <i>Leukemia</i> , 2005)	12
2.2	Die neu etablierte Burkitt-Zelllinie BLUE-1 ( <i>Leukemia Research</i> , 2006)	21
2.3	Minimale Resterkrankung bei ALL mit <i>MLL</i> -Aberration. ( <i>Leukemia</i> , 2006)	29
2.4	<i>NUP214-ABL1</i> bei T-ALL ( <i>Blood</i> , 2006)	37
2.5	<i>HOX11</i> und <i>HOX11L2</i> bei T-ALL ( <i>Leukemia</i> , 2008)	42
2.6	Atypische <i>BCR-ABL</i> mRNA-Transkripte bei ALL ( <i>Haematologica</i> , 2007)	50
2.7	Patientenalter und <i>BCR-ABL</i> -Frequenz ( <i>Blood</i> , 2008)	55
2.8	Deltaretroviren bei T-Zell-Neoplasien ( <i>Retrovirology</i> , 2007)	57
<b>3.</b>	<b>Diskussion und Zusammenfassung</b>	<b>65</b>
<b>4.</b>	<b>Literatur</b>	<b>69</b>
<b>5.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>74</b>
<b>6.</b>	<b>Erklärung</b>	<b>75</b>

## 1. Einleitung

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist mit einer Inzidenz von etwa 3,8/100.000 bei Kindern unter 15 Jahren und etwa 1,4/100.000 bei Erwachsenen und Adoleszenten eine seltene Erkrankung. Für Deutschland rechnet man mit etwa 1.130 Neuerkrankungen pro Jahr, wobei etwa 420 Fälle im Alter unter 15 Jahren und etwa 710 Fälle jährlich im Alter  $\geq 15$  Jahren diagnostiziert werden [1, 2]. Von der letztgenannten Gruppe werden etwa 60% im Rahmen der Therapiestudien der GMALL-Studiengruppe (GMALL = *German Multicenter Study Group for Adult ALL*) behandelt [2].

Genetisch ist die ALL eine Erkrankung, die von malignen „Leukämie-Stammzellen“ ausgeht. Diese ALL-Stammzellen konnten bisher nicht präzise charakterisiert werden [3-5]. Eine Vielzahl von rekurrenten genetischen Aberrationen wurde bei ALL-Patienten beschrieben, so dass man davon ausgehen muss, dass die maligne Transformation auf molekularer Ebene auf verschiedene Weise erfolgen kann und sich in einem klinisch ähnlichen Phänotyp äußert. Damit ist die ALL trotz ihrer Seltenheit eine genetisch außerordentlich heterogene Erkrankung.

Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die wichtigsten der heute bekannten genetischen Untergruppen der ALL gegeben.

### 1.1 *BCR-ABL*-positive ALL

Die Chromosomentranslokation  $t(9;22)(q34;q22)$  ist mit 25% die häufigste bisher bekannte klonale genetische Aberration bei der ALL des Erwachsenenalters. Die Translokation wurde zuerst bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML) entdeckt und später auch bei der ALL identifiziert. Die involvierten Genloci konnten Anfang der 1980er Jahre als die Gene *ABL* (genauer: *ABL1*) auf Chromosom 9 und *BCR* auf Chromosom 22 identifiziert werden [6-8]. In der Regel ist die Translokation

reziprok [9, 10] und führt auf molekularer Ebene zur Bildung von zwei Fusionsgenen, *BCR-ABL* auf Chromosom 22 und *ABL-BCR* auf Chromosom 9. Zytogenetisch imponiert die Translokation meist als verkürztes Chromosom 22 („Philadelphia-Chromosom“, [11]), jedoch werden bei ALL und CML in etwa 3% [12, 13] auch komplexere Muster unter Beteiligung anderer Chromosomen gefunden. *ABL* ist eine Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase, die erstmals 1970 als Onkogen im rasch transformierenden *Abelson* Maus-Leukämievirus identifiziert wurde [14]. Das *ABL*-Gen besitzt zwei alternative erste Exons, Ia und Ib. Dadurch sind zwei Isoformen möglich, die sich in ihrem Aminoterminus unterscheiden. Die Isoform mit Exon Ia ist im Zellkern lokalisiert, jene mit Exon Ib wird myristiliert und ist der Zytoplasmamembran assoziiert. Der Verlust des myristilierten Amino-Terminus, wie er bei *BCR-ABL* auftritt, ist mit einer Aktivierung der *ABL*-Kinase verbunden [15].

Die physiologische Funktion von *BCR* ist nicht genau bekannt. Es handelt sich um ein zytosolisches 160 kD-Phosphoprotein mit Serin/Threoninkinase-Aktivität, das nahezu ubiquitär exprimiert wird [16]. Die Häufigkeit einzelner *BCR-ABL*- mRNA-Transkripte bei CML und *BCR-ABL*-positiver ALL ist unterschiedlich: bei CML findet man in über 95% der Fälle sogenannte *major breakpoint (M-bcr)* Transkripte die zur Expression eines 210kD Fusionsproteins führen, während diese bei erwachsenen ALL-Patienten nur etwa 30% der *BCR-ABL*-Positiven ausmachen. Knapp 70% der *BCR-ABL*-Transkripte bei *BCR-ABL*-positiver ALL im Erwachsenenalter sind *minor breakpoint (m-bcr)* Transkripte [17, 18], die in einem kleineren 185kD Fusionsprotein resultieren. Andere, „atypische“ Transkripte finden sich bei etwa 2% der Patienten [19]. Die relative Inzidenz von *BCR-ABL* bei der ALL ist altersabhängig. Bei Kindern und Jugendlichen sind nur etwa 3-5% der ALL-Fälle *BCR-ABL*-positiv. Bei Erwachsenen steigt die relative Inzidenz bis etwa zum 35. Lebensjahr an, um von da an bemerkenswert konstant bei etwa 45% (bezogen auf die B-Vorläufer-ALL) zu

bleiben [18]. Zugleich nimmt im selben Zeitraum der relative Anteil an *M-bcr*-Transkripten zu, ohne dass jedoch der Gesamtanstieg in der Häufigkeit von *BCR-ABL* alleine darauf zurückzuführen wäre. Die Gründe für die unterschiedlichen Transkripthäufigkeiten bei CML und *BCR-ABL*-positiver ALL und für die Altersabhängigkeit von *BCR-ABL* bei der ALL ist bisher nicht bekannt. Es gibt Hinweise dafür, dass die *m-bcr*- und *M-bcr-BCR-ABL*-positiven ALL von unterschiedlichen hämatopoetischen Stammzellen ausgehen [20]. Klinisch besteht zwischen *M-bcr-BCR-ABL*-positiver und *m-bcr-BCR-ABL*-positiver ALL kein Unterschied [17]. Was die prognostische Bedeutung dieser Aberration angeht, galt *BCR-ABL* lange Zeit als der ungünstigste prognostische Faktor bei der ALL überhaupt. In einer groß angelegten retrospektiven Analyse der deutschen GMALL-Studiengruppe aus den 1990er Jahren zeigten *BCR-ABL*-positive ALL-Patienten eine 3-Jahres-Gesamtüberlebensrate von 13% gegenüber 47% bei *BCR-ABL*-Negativen [17]. Allerdings war *BCR-ABL* auch signifikant häufiger mit den bekanntermaßen prognostisch ungünstigen Faktoren hohe Leukozytenzahl und höheres Alter bei Diagnose assoziiert. Dieses Bild hat sich in den letzten Jahren gewandelt. Verantwortlich dafür sind zwei Faktoren: der Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren, insbesondere Imatinib, und die gesteigerte Frequenz an allogenen Stammzelltransplantationen [21-23].

Vereinzelt wurden Fusionsgene gefunden, bei denen *BCR* nicht mit *ABL*, sondern mit anderen Tyrosinkinasen fusioniert war: *BCR-FGFR1* [24], *BCR-PDGFR* [25], *BCR-JAK2* [26]. Die betroffenen Patienten zeigten ein CML-ähnliches Krankheitsbild. Außerdem sind einige Einzelfälle von *ETV6-ABL*-Fusionsgenen beschrieben (Übersichten bei [27, 28]), von denen zwei auch das klinische Bild einer ALL zeigten. Diese Fälle können als „Varianten“ von *BCR-ABL* gelten und zeigen, dass die Funktionen von *BCR* und *ABL* in gewissem Maße durch Gene ähnlicher Funktion

(andere Tyrosinkinasen) ersetzbar sind. Insgesamt handelt es sich dabei aber um ausgesprochene Raritäten.

Vom Immunphänotyp her weisen die *BCR-ABL*-positiven ALL-Patienten ganz überwiegend einen common oder prä B- und selten einen pro-B-Subtyp auf [17, 18]. Bei der T-ALL und reifzelligen B-ALL (slg+) kommt *BCR-ABL* praktisch nicht vor. Einzelne berichtete Fälle von *BCR-ABL*-positiver T-ALL entsprechen möglicherweise T-lymphatischen CML-Blastenkrisen [29]. Die Unterscheidung der M-bcr-*BCR-ABL*-positiven B-Vorläufer ALL von der B-lymphatischen CML-Blastenkrise war bisher ohne Kenntnis der klinischen Anamnese nicht sicher möglich, es sei denn dass CML-typische sekundäre Aberrationen (z. B. Isochromosom 17 i(17q), häufig in Kombination mit Trisomie 8) [30, 31] nachweisbar waren. Neuere Arbeiten beginnen allerdings zunehmend Unterschiede auf molekularer Ebene zwischen *BCR-ABL*-positiver ALL und CML aufzuzeigen. Mullighan und Mitarbeiter fanden bei *BCR-ABL*-positiven ALL-Patienten in der Mehrzahl der Fälle eine Deletion von *IKZF1* (kodierend für den Transkriptionsfaktor *Ikaros*), was zu einer Haploinsuffizienz, zur Expression von dominant-negativen *Ikaros*-Formen oder ganz zum Verlust der *Ikaros*-Expression führte. Bei CML in chronischer Phase war diese Veränderung nicht nachweisbar, jedoch bei CML in lymphatischer Blastenkrise [32].

## **1.2 *MLL*-Aberrationen bei ALL**

Translokationen unter Beteiligung des *MLL*-Gens auf 11q23 finden sich bei etwa 5-10% der akuten Leukämien (ALL und AML). *MLL* ist eine Histon H3 Lys4 (K4)-spezifische Methyltransferase [33, 34]. Das 431kD-*MLL*-Protein ist Bestandteil eines Multi-Protein-Komplexes, der Nukleosomen und freie Histone remodelliert, (de-)acetyliert, und methyliert [34]. Eine große Vielzahl von aktuell etwa 80 verschiedenen Loci, in die *MLL* transloziert wird, ist bekannt [35]. Bei den meisten

Translokationen handelt es sich jedoch um Einzelfall-Beschreibungen oder sehr kleine Serien von Patienten. Die mit Abstand häufigste *MLL*-Translokation bei der Erwachsenen-ALL ist die  $t(4;11)(q21;q23)$  mit Fusionsgen *MLL-AFF1* (*MLL-AF4*), die bei der B-Linien-ALL etwa 85% aller *MLL*-Aberrationen ausmacht. Die zweithäufigste Translokation bei B-Linien-ALL ist die  $t(11;19)(q23;p13)$  mit Fusionsgen *MLL-MLLT1* (*MLL-ENL*) mit knapp 10% der *MLL*-Aberrationen [36, 37]. Andere *MLL*-Aberrationen sind bei der ALL selten. Bei T-Linien-ALL im Erwachsenenalter sind weniger Daten verfügbar, die Prävalenz ist niedriger und hier scheint die  $t(11;19)(q23;p13)$  am häufigsten [38]. Vom Immunphänotyp her zeigen die betroffenen B-Linien-ALL-Patienten in der Regel einen pro B- oder CD10-negativen prä B-Immunphänotyp [39-41]. Das Muster an Translokationspartnern unterscheidet sich deutlich von dem der AML, bei der am häufigsten die  $t(9;11)(p22;q23)$  mit *MLL-AF9*-Fusion gefunden wird [42]. Das Spektrum der *MLL*-Translokationspartner unterscheidet sich ebenfalls deutlich von dem der ALL im Säuglingsalter (< 1 Jahr), wo verhältnismäßig weniger *MLL-AF4* und dafür mehr *MLL-MLLT1* und *MLL-MLLT3* gefunden wurde [43]. In allen Altersgruppen der ALL gelten *MLL*-Aberrationen bei B-Vorläufer-ALL als prognostisch ungünstig. Umstritten ist dabei jedoch, ob die ungünstige Prognose eher auf den unreifen Immunphänotyp zurückzuführen oder unabhängig von diesem ist [39, 44].

### **1.3 ALL mit *TCF3-PBX1*-Fusion (Translokation $t(1;19)(q23;p13.3)$ )**

Die Translokation  $t(1;19)(q23;p13.3)$  wurde erstmals zytogenetisch 1984 bei der ALL beschrieben [45]. Sie bildet mit etwa 3-4% aller ALLs die dritthäufigste bisher bekannte Translokation bei Erwachsenen-ALL. Die Inzidenz ist bei Kindern und Adoleszenten mit etwa 5% geringfügig höher als bei Erwachsenen. 1991 konnten die



involvierten Gene in der Arbeitsgruppe von Michael Cleary in Stanford identifiziert werden [46]. Beteiligt sind *TCF3* (*E2A*) auf Chromosom 19 und *PBX1* auf Chromosom 1. *TCF3* codiert für 2 Proteine, *E12* und *E47*, die beide sogenannte *basic helix-loop-helix* (bHLH) Transkriptionsfaktoren sind und eine kritische Rolle bei der B-Zell-Reifung spielen. *PBX1* ist ein Homöobox-Gen, das in praktisch allen Geweben außer dem lymphatischen Gewebe exprimiert wird. Das Fusionsgen *TCF3-PBX1* führt zu einer unphysiologischen Aktivierung von *PBX1* sowie zur *trans*-Aktivierung von zahlreichen Genen und schließlich zum malignen Phänotyp [47].

Bzgl. der prognostischen Bedeutung dieser Aberration gab es in den 1990er Jahren einige kontroverse Diskussionen bei der pädiatrischen ALL. Mittlerweile gilt *E2A-PBX1* dort eindeutig als positiv-prädiktiver Marker für das Gesamtüberleben und die Remissionsdauer [48]. Bei Erwachsenen-ALL sind weit weniger publizierte Daten verfügbar, jedoch scheint diese Aberration nach den bisher publizierten Daten bemerkenswerterweise dort eher einen ungünstigen *impact* zu haben [49, 50]. Allerdings ist *E2A-PBX1* bei Erwachsenen-ALL häufig mit hoher Leukozytenzahl bei Diagnose, einem bekanntermaßen ungünstigen prognostischen Faktor, assoziiert [51, 52].

#### **1.4 ALL mit *ETV6-AML1* (Translokation t(12;21)(p13;q22))**

Die Translokation t(12;21)(p13;q22) wurde erst spät als rekurrente Translokation bei der ALL entdeckt, da sie konventionell-zytogenetisch unsichtbar ist, weil die involvierten Genloci auf beiden Chromosomen sehr weit telomerwärts liegen. Erst 1994 gelang der Nachweis mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung. Die beteiligten Gene sind *ETV6* (*ets variant gene 6*, *TEL*) auf 12q13 und *AML1* (*RUNX1*, *CBFA2*, *core binding factor alpha 2*) auf 21q22, zwei Gene, die schon in anderem Kontext als Translokationspartner bei hämatologischen Neoplasien gut bekannt sind [53, 54].

Schon kurz nach der Entdeckung wurde klar, dass es sich bei der t(12;21) mit etwa 15-25% der Fälle um die häufigste Chromosomentranslokation bei kindlicher und Adoleszenten-ALL handelt. Innerhalb der pädiatrischen ALL zeigt sich eine charakteristische Altersabhängigkeit, wobei die Frequenz bei Säuglingen (< 1 Jahr) 0% beträgt, im Alter von 1-4 Jahren mit etwa 25% am höchsten ist, um dann bis zum Alter von 10-14 Jahren auf etwa 5% abzufallen [55]. Bei Erwachsenen ist die Aberration selten und betrifft nur etwa 1-2% aller Patienten, die praktisch ausnahmslos sehr jung sind (unter 30 Jahre) [56-58]. Bei Kindern und Adoleszenten ist *TEL-AML1* mit einer günstigen Prognose assoziiert [48, 55, 59], bei Erwachsenen ist die prognostische Bedeutung ungeklärt.

### **1.5 Die ALL vom Burkitt-Typ bzw. reifzellige B-ALL**

Das Burkitt-Lymphom ist durch Chromosomentranslokationen, die das *MYC*-Gen auf 8q24 betreffen, gekennzeichnet. Meist liegt eine Translokation in den Immunglobulin-Schwerkettenlocus auf 14q32 vor. Seltener sind Translokationen in den Leichtketten kappa-Locus auf 2p11 (in etwa 15%) oder den Leichtketten-lambda Locus auf 22q11 (in ca. 5%). Gelegentlich tritt ein höhergradiger Knochenmarkbefall durch das BL auf. Übersteigt dieser die Grenze von 20-25%, oder findet eine leukämische Ausschwemmung statt, so spricht man definitionsgemäß von einer ALL vom Burkitt-Typ oder „reifzelligen B-ALL“. Die reifzellige B-ALL ist ein sehr seltenes Krankheitsbild und macht nur etwa 3-5% aller akuten lymphatischen Leukämien bei Kindern und Erwachsenen aus. Die reifzellige B-ALL entspricht biologisch und ätiopathogenetisch eher einem leukämischen *high grade* Lymphom und wird dementsprechend auch nach Chemotherapie-Schemata behandelt, die an *high grade* Lymphome erinnern (sequenzielle Abfolge sich wiederholender Chemotherapieblöcke) [60].

## 1.6 T-ALL mit aberranter *HOX11*- oder *HOX11L2*-Expression

Die immunologisch definierte T-Linien-ALL unterscheidet sich von der B-Linien-ALL insofern, als mit klassischer Zytogenetik sichtbare klonale rekurrente Chromosomentranslokationen in einer deutlich geringeren Frequenz als bei der B-Linien-ALL zu finden sind. Am häufigsten wurden Aberrationen gefunden, die die T-Zell-Rezeptor-Gene (*TCRA* und *TCRD* auf 14p11, *TCRB* auf 7p34, *TCRG* auf 7p14) betreffen. Andere, häufiger involvierte Loci sind 10q24 und 5q35. Die dort befindlichen Gene sind *TLX1* (*HOX11*) und *TLX3* (*HOX11L2*), zwei „verwaiste“ (*orphan*) Homöobox-Gene, die außerhalb der 4 Mammalia-*HOX*-Gencluster liegen. Beide Gene werden vor allem beim thymischen Subtyp der T-ALL aberrant exprimiert gefunden. Die prognostische Bedeutung dieser beiden *HOX*-Gene war einige Jahre umstritten. Inzwischen kann jedoch als gesichert gelten, dass die aberrante Expression von *TLX3* mit einer sehr ungünstigen Prognose assoziiert ist, während die aberrante *TLX1*-Expression eine günstige Prognose impliziert [61].

## 1.7 Aneuploidie bei ALL

Aneuploidie bezeichnet den Hinzugewinn (Hyperdiploidie) oder Verlust (Hypodiploidie) von ganzen Chromosomen, in Form von Tri- oder Tetrasomien bzw. Monosomien oder Bildung von dizentrischen Chromosomen als Folge unbalancierter Translokationen. Etwa 5% der ALL-Patienten weisen einen hypodiploiden [62, 63] und etwa 25% der pädiatrischen und 10-15% der adulten ALLs einen hyperdiploiden Chromosomensatz auf [64, 65]. Seit langem ist bekannt, dass pädiatrische ALL-Patienten mit hyperdiploidem Chromosomensatz eine verhältnismäßig günstige Prognose haben [64, 66]. Als Ursache hierfür wurden eine vermehrte Chemotherapie-Sensibilität mit u.a. verstärkter Akkumulation von Methotrexat-

Metaboliten sowie Empfindlichkeit gegenüber Mercaptopurin und L-Asparaginase beschrieben [67, 68]. Der biologische Hintergrund hierfür ist jedoch bisher unbekannt. Außerdem wurde bei hyperdiploiden ALL-Zellen ein ausgeprägtes proapoptotisches Potential gefunden [69]. Der Hyperdiploidie liegt molekularpathogenetisch am ehesten nicht ein sukzessiver Hinzugewinn von einzelnen Chromosomen, sondern eine Malsegregation bei einer einzigen abnormen Mitose zugrunde [70]. Aus dem Vorhandensein von partiell identisch rearrangierten IgH-Genen bei Patienten mit Tri- oder Tetrasomie 14 kann geschlossen werden, dass diese Ungleichverteilung im Verlauf der frühen B-Zell-Reifung stattfindet [71]. Der Hinzugewinn von Chromosomen erfolgt nicht statistisch zufällig. Am häufigsten sind die Chromosomen 4, 6, 10, 14, 17, 18, 21 und X betroffen, während eine numerische Vermehrung von Chromosomen 1, 2, 3, 7, 13, 15, 16, 19, oder 20 verhältnismäßig selten anzutreffen ist [72]. In der Literatur finden sich uneinheitliche Befunde, was die prognostische Bedeutung einzelner Trisomien angeht. Moorman und Mitarbeiter [72] fanden in einer großangelegten Studie von 700 pädiatrischen Patienten mit hyperdiploidem Karyotyp in der multivariaten Analyse einen positiven Einfluß auf das Gesamtüberleben für den Hinzugewinn der Chromosomen 4 und/oder 18. Andere Autoren beschrieben beispielsweise einen günstigeren klinischen Verlauf bei Patienten mit hoch-hyperdiploidem Chromosomensatz (54-58 Chromosomen) und Trisomie 4, 10 oder 17, während sich Trisomie 5 bei derselben Patientengruppe als ungünstig erwies [64, 73]. Für die ALL im Erwachsenenalter existieren wesentlich weniger Daten, die jedoch auch eine verhältnismäßig günstige Prognose bei Hyperdiploidie aufzeigen [65, 74].

Beim hypodiploiden Karyotyp liegen die Verhältnisse, was die prognostische Bedeutung angeht, gerade umgekehrt. Hypodiploidie ist bei der pädiatrischen ALL seit langem als ungünstiger prognostischer Faktor etabliert [62, 66]. Die Datenlage

bei Erwachsenen ist auch hier wesentlich weniger aussagekräftig, jedoch liegen hier die Verhältnisse ähnlich [65]. Bei der ganz überwiegenden Mehrheit der Patienten finden sich isolierte Monosomien mit 45 Chromosomen, wobei bei pädiatrischen Patienten am häufigsten die Chromosomen 7, 9, 13 oder X/Y betroffen sind [66] und bei Erwachsenen die Chromosomen 2, 3, 4, 7, 13, und 15-17 [75]. Bei Erwachsenen ALL-Patienten mit nahezu triploidem Chromosomensatz liegt eine Duplikation eines hypodiploiden Chromosomensatzes zugrunde und die Prognose entspricht der der hypodiploiden Patienten [75]. Der genaue Grund für die ungünstige Prognose der hypodiploiden ALL-Patienten ist nicht genau bekannt. Möglicherweise liegt der Verlust von Tumor-Suppressorgenen zugrunde [62].

Der aneuploide Chromosomensatz schließt allerdings andere strukturelle Chromosomenveränderungen von prognostischer Relevanz nicht aus. So ist der nahezu triploide oder tetraploide Chromosomensatz bei pädiatrischen ALL-Patienten meist mit der Translokation  $t(12;21)(p13;q22)$  assoziiert [76, 77] und auch andere Fusionsgene von prognostischer Relevanz können bei Hyper- oder Hypodiploidie auftreten [65, 72].

### **1.8 Andere Aberrationen von unklarer oder noch nicht abschließend gekläarter pathogenetischer oder prognostischer Relevanz**

Eine große Vielzahl von „Biomarkern“ wurde hinsichtlich der prognostischen Bedeutung bei der ALL untersucht. Letztlich fehlen aber bei vielen dieser Veränderungen noch bestätigende Untersuchungen bzw. Daten aus prospektiven Studien um den Stellenwert dieser Veränderungen eindeutig einordnen zu können. Bei der T-ALL findet man in 5-30% ein *SIL-TAL1*-Fusionstranskript, dem eine interstitielle ca. 70kB Deletion zwischen den Genen *SIL* (oder *STIL*) und *TAL1* auf 1p32 zugrunde liegt. Durch die Deletion gerät *TAL1* unter die Kontrolle des *SIL*-

Promotors. *SIL-TAL1* alleine ist jedoch im transgenen Tiermodell nicht hinreichend, um Leukämien zu induzieren [78]. Seltener liegen Translokationen von *TAL1* in die T-Zellrezeptor-Loci vor. Eine Schlüsselrolle scheinen in vielen Fällen von T-ALL aktivierende Mutationen in den *NOTCH*-Genen, vor allem *NOTCH1*, zu spielen [79, 80]. Diese Mutationen finden sich in etwa 35-55% der T-ALL-Fälle [79, 80]. Die Aktivierung des *NOTCH*-Signalweges ist unter physiologischen Bedingungen entscheidend für die  $\alpha\beta$ TCR-T-Zell-Ausreifung im Thymus [81]. Die beiden *Lim-domain-only*-Proteine *LMO1* und *LMO2* spielen bei einer Subgruppe der T-ALL-Patienten eine onkogene Rolle [82]. Dass die dauerhafte *LMO2*-Überexpression zur Leukämieentwicklung beitragen kann, wurde in einem unbeabsichtigten gentherapeutischen *in vivo* Experiment gezeigt [83]. Die Dysregulation von *LMO1* und *LMO2* kommt meist durch Translokationen in die T-Zell-Rezeptor-Loci zustande, die wiederum wahrscheinlich die Folge einer illegitimen V(D)J-Rekombination sind [84]. Sowohl für die B-Linien- als auch die T-Linien-ALL von Interesse sind die Gene *BAALC* und *ERG*, deren Expression von prognostischer Relevanz gefunden wurde [85]. Auch für die Expression verschiedener *multi-drug-resistance*-Proteine [86, 87] bzw. für Polymorphismen in den entsprechenden Genen wurde eine prognostische Bedeutung beschrieben, wobei diese Befunde umstritten sind [88].

## 2. Publikationen

### Publikation 1:

Burmeister T, Schwartz S, Horst HA, Rieder H, Gökbuget N, Hoelzer D, Thiel E. Molecular heterogeneity of adult Burkitt-type leukemia/lymphoma as revealed by PCR and cytogenetics: correlation with morphologic, immunologic and clinical features. *Leukemia* 2005;19:1391-8

### Einführung:

Die reifzellige B-ALL gilt als leukämische Manifestation des Burkitt-Lymphoms. Mittels Immunzytologie und Zytomorphologie ergeben sich jedoch nicht selten Schwierigkeiten bei der differenzialdiagnostischen Abgrenzung zu anderen reifzelligen B-Non-Hodgkin-Lymphomen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine PCR-Methode zum Nachweis der Translokation t(8;14)(q24;q32) mit *MYC*-IgH-Fusion für den klinischen Einsatz entwickelt. Eine große Zahl von Proben von Patienten mit reifzelliger B-ALL wurde damit untersucht. Dabei zeigte sich ein charakteristisches Muster von *MYC*-IgH-Fusionen, unter anderem auch zwei Fälle von Translokation von *MYC* in die für IgE kodierenden konstanten Region des IgH-Locus, die im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben sind. Korrelationen mit dem Immunphänotyp, der Zytomorphologie und der Zytogenetik zeigten eine relative Heterogenität dieser Patientengruppe. Nur in einem Teil der Fälle waren alle Befunde voll kongruent und atypische Morphologien (keine FAB-L3-Morphologie) sowie atypische Immunphänotypen (TdT+, CD10-) waren vereinzelt zu beobachten. Epstein-Barr-Virus war nur in einer Minderheit der Fälle nachweisbar.

Die *long distance* PCR für t(8;14) erscheint damit als Methode, die wertvolle Zusatzinformationen zur Differenzialdiagnostik liefern kann.

## Publikation 2:

Burmeister T, MacLeod RAF, Reinhardt R, Mansmann V, Loddenkemper C, Marinets O, Drexler H, Thiel E, Blau IW. A novel sporadic Burkitt lymphoma cell line (BLUE-1) with a unique t(6;20)(q15;q11.2) rearrangement. *Leukemia Research* 2006;30:1417-23

### Einführung:

Die meisten Zelllinien von Burkitt-Lymphomen wurden von pädiatrischen Patienten mit der endemischen Form des Burkitt-Lymphoms gewonnen. Es existieren wenige Zelllinien von erwachsenen Patienten mit sporadischen Burkitt-Lymphom. In dieser Publikation wird die Etablierung einer solchen EBV-negativen Zelllinie (BLUE-1) beschrieben. Die Zelllinie entstammt einem histologisch diagnostizierten Burkitt-Lymphom, zeigt jedoch auch Abweichungen vom typischen Immunphänotyp, die zum Teil durch die Therapie bedingt (Verlust von CD20 nach Rituximab-Therapie) und zum Teil wahrscheinlich Zellkultur-Artefakte (Abnahme der Expression von sCD22 und sIg lambda) sind. IgH und MYC sind Kopf-an-Kopf (*head-to-head*) fusioniert und der Chromosomenbruchpunkt liegt 1,25 kB 5' von MYC Exon 1 und in der IgH *joining* Region womit eine fehlerhafte VDJ-Rekombination als molekularer Pathomechanismus anzunehmen ist.



### **Publikation 3:**

Burmeister T, Marschalek R, Schneider B, Meyer C, Gökbuget N, Schwartz S, Hoelzer D, Thiel E. Monitoring minimal residual disease by quantification of genomic chromosomal breakpoint sequences in acute leukemias with *MLL* aberrations. *Leukemia* 2006;20:451-7

#### Einführung:

In dieser Publikation wird die Etablierung und Testung einer neuartigen Methode zur Messung der minimalen Resterkrankung (MRD = *minimal residual disease*) bei Patienten mit *MLL*-Aberration beschrieben. Die minimale Resterkrankung, d.h. das Ausmaß an Rest-Leukämie nach Chemotherapie gilt als wichtigster prognostischer Faktor bei der pädiatrischen und adulten ALL. Herkömmliche Methoden beruhen auf der Quantifizierung des mRNA-Fusionstranskriptes. Dies bringt jedoch einige Nachteile mit sich, wie in der vorliegenden Publikation ausgeführt wird. In dieser Arbeit wurden die individuellen Chromosomenbruch-Sequenzen als klonspezifische Marker verwendet. Es wird gezeigt, wie sich anhand dieser Sequenzen ein robustes und hochsensitives Nachweissystem konstruieren lässt, das auch gegenüber dem MRD-Nachweis mittels klonal rearrangierter Immungene Vorteile aufweist (stabiler Marker, der nicht durch mögliche weitere IgH-Rearrangements gefährdet ist, keine Oligoklonalität bei Erstdiagnose wie häufig bei inkomplett rearrangierten IgH-Genen).

#### **Publikation 4:**

Burmeister T, Gökbuget N, Reinhardt R, Rieder H, Hoelzer D, Schwartz S. *NUP214-ABL1* in adult T-ALL: the GMALL study group experience. *Blood* 2006;108:3556-9

#### Einführung:

Bei vielen soliden Tumorerkrankungen findet man episomale Amplifikationen von Onkogenen (*double minutes*) [89]. Bei der ALL sind solche Episomen bisher kaum gefunden worden. Eine interessante Ausnahme bildet das Fusionsgen *NUP214-ABL1*, bei dem *NUP214*, ein Gen, das für ein Protein des Kernporen-Komplexes kodiert, mit der Tyrosinkinase *ABL1* fusioniert ist [90]. In einem kleinen Prozentsatz der Fälle von T-ALL ist dieses Episom nachweisbar. Die vorliegende Arbeit ging der Frage nach, welche der theoretisch möglichen *NUP214-ABL*-Transkripte experimentell gefunden werden, wie häufig diese auftreten und wie sich diese mittels PCR nachweisen lassen. Außerdem wurde die prognostische Bedeutung dieses Fusionsgens untersucht. Dabei zeigte sich, dass nur ganz bestimmte Transkripte zu finden waren. Die Prognose der *NUP214-ABL1*-positiven Patienten unterschied sich nicht signifikant von der des Gesamtkollektivs der T-ALL-Patienten.

## Publikation 5:

Baak U, Gökbuget N, Orawa H, Schwartz S, Hoelzer D, Thiel E, Burmeister T, for the GMALL 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 (GMALL). *Leukemia*. 2008;22:1154–60

### Einführung:

Etwa 25% aller ALL-Fälle im Erwachsenenalter zeigen immunologisch eine T-Zell-Differenzierung. Die vorliegende Arbeit untersuchte die prognostische Bedeutung der aberranten Expression zweiter Homöobox-Gene, *TLX1 (HOX11)* und *TLX3 (HOX11L2)* bei der T-ALL. Etwa 20% der untersuchten Patienten zeigten eine hohe, 20% eine niedrige und 60% keine *HOX11*-Expression. 10% der Patienten zeigten eine *HOX11L2*-Expression. Während das initiale Therapieansprechen in allen genetischen Subgruppen etwa gleich war, zeigte sich eine deutlich erhöhte Rezidivrate bei den *HOX11L2*-positiven gegenüber den *HOX11L2*-negativen Patienten (*relapse free survival* RFS 23% vs. 60%,  $p=0,028$ , univariate Analyse). In der multivariaten Analyse zeigte sich ein signifikant geringeres Gesamtüberleben der *HOX11L2*-positiven im Vergleich zu den *HOX11L2*-negativen Patienten. Die hohe *HOX11*-Expression war in der multivariaten Analyse statistisch signifikant mit einem verbessertem krankheitsfreien Überleben (RFS) assoziiert, bei der Analyse des Gesamtüberlebens ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Anhand dieser Daten kann eine neue Hochrisiko-Untergruppe (die *HOX11L2*-Positiven) innerhalb der thymischen T-ALL-Patienten definiert werden. Patienten mit diesem genetischen Profil sollten aufgrund ihrer ungünstigen Prognose einer intensivierten Behandlung zugeführt werden.

## Publikation 6:

Burmeister T, Schwartz S, Taubald A, Jost E, Lipp T, Schneller F, Diedrich H, Thomssen H, Mey UJM, Eucker J, Rieder H, Gökbuget N, Hoelzer D, Thiel E. Atypical *BCR-ABL* mRNA transcripts in adult acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2007;92:1699-1702

### Einführung:

Bei der CML werden in mehr als 95% der Fälle die sogenannten *major breakpoint*-mRNA-Transkripte (e13a2, e14a2) gefunden. Sie entstehen durch Chromosomenbrüche in den Introns 13 oder 14 des *BCR*-Gens und in *ABL* Intron 1. Bei *BCR-ABL*-positiver ALL machen die *major breakpoint*-Transkripte nur etwa 30% aus, während ca. 70% der Fälle das *minor breakpoint* Transkript e1a2 aufweisen (zur Altersabhängigkeit siehe Publikation 7). Bei diesem Transkript liegt der Chromosomenbruchpunkt in *BCR* Intron 1 und *ABL* Intron 1. Daneben gibt es aber auch noch sogenannte „atypische“ Transkripte, die durch Chromosomenbrüche außerhalb der genannten Regionen entstehen. Diese atypischen Transkripte sind auch von theoretischem Interesse, da sich das klinische Krankheitsbild der betroffenen Patienten zum Teil von den „typischen“ Fällen unterscheidet, was Rückschlüsse auf die molekulare Pathogenese erlaubt. Ziel der vorliegenden Arbeit, war es, die Prävalenz dieser atypischen Transkripte bei der ALL des Erwachsenenalters zu ermitteln und außerdem die klinische Charakterisierung der betroffenen Patienten. Die Gesamtprävalenz wurde auf annähernd 2% der *BCR-ABL*-Positiven bestimmt. Patienten mit atypischen Transkripten zeigten klinisch ein Ansprechen auf Imatinib-Therapie. Das häufigste gefundene atypische Transkript war e1a3.

### **Publikation 7:**

Burmeister T, Schwartz S, Bartram CR, Gökbuget N, Hoelzer D, Thiel E. Patient's age and *BCR-ABL* frequency in adult B-precursor ALL: a retrospective analysis from the GMALL study group. *Blood*. 2008;112:918-919

#### Einführung:

In diesem kurzen Beitrag (*letter to the editor*) wird auf einen interessanten Aspekt von *BCR-ABL* bei der ALL eingegangen. Die Frequenz von *BCR-ABL* ist bei der ALL im Kindesalter niedrig, nimmt aber mit steigendem Alter zu. Frühere Arbeiten gingen einfach von einer stetigen Zunahme der relativen Inzidenz mit zunehmendem Alter aus. Die vorliegende Analyse einer sehr großen Zahl von erwachsenen ALL-Patienten zeigt jedoch ein komplexeres Bild: die Zunahme ist nur etwa bis zum Alter von 35 Jahren zu beobachten und danach bleibt die relative Häufigkeit bemerkenswert konstant bei etwa 45% (bezogen auf die B-Vorläufer-ALL). Im gleichen Zeitraum ändern sich auch die relativen Häufigkeiten der beobachteten Transkripte mit relativer Zunahme der Transkripte vom M-bcr-Typ. Die allgemeine Zunahme der Häufigkeit ist dabei jedoch nicht nur auf die Zunahme der M-bcr-Transkripte zurückzuführen, da die Häufigkeit der m-bcr-Transkripte im entsprechenden Zeitraum ebenfalls zunimmt.

## **Publikation 8:**

Burmeister T, Schwartz S, Hummel M, Hoelzer D, Thiel E. No genetic evidence for involvement of Deltaretroviruses in adult patients with precursor and mature T-cell neoplasms. *Retrovirology* 2007;4:11

### Einführung:

Retroviren sind im Tierreich ätiologisch an der Entstehung einer Vielzahl von Malignomen beteiligt. Beim Menschen ist bisher nur ein onkogenes Retrovirus bekannt (HTLV-1, der Status von HTLV-2 ist nicht ganz klar). In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob evtl. noch weitere bisher nicht entdeckte Retroviren der Deltaretrovirus-Gattung bei menschlichen T-Zell-Malignomen zu finden sind. Dazu wurden Sequenzvergleiche (*alignments*) aller publizierten Deltaretrovirus-Isolate (humane T-Zell-lymphotrope Retroviren Typ 1 und 2, simiane T-Zell-lymphotrope Retroviren Typ 1, 2, 3 und bovine Leukoseviren) durchgeführt. Damit konnten Virusgenom-Abschnitte charakterisiert werden, die interspezies-hochkonserviert sind und sich für die Konstruktion einer pan-Deltaretrovirus-PCR eignen. Diese pan-Deltaretrovirus-PCR wurde anhand von Zelllinien, die mit Deltaretroviren infiziert waren, optimiert und es wurde eine größere Zahl von Patientenproben von Patienten mit T-Zell-Neoplasien (u. a. auch 50 T-Linien-ALLs verschiedener Reifungsstufen) untersucht. Dabei ergab sich kein Nachweis von Deltaretroviren, insbesondere auch kein Nachweis von HTLV-1 oder HTLV-2, was eine Beteiligung von Deltaretroviren an der Pathogenese der entsprechenden Krankheitsentitäten unwahrscheinlich macht.

Research

Open Access

## No genetic evidence for involvement of Deltaretroviruses in adult patients with precursor and mature T-cell neoplasms

Thomas Burmeister\*<sup>1</sup>, Stefan Schwartz<sup>1</sup>, Michael Hummel<sup>2</sup>, Dieter Hoelzer<sup>3</sup> and Eckhard Thiel<sup>1</sup>

Address: <sup>1</sup>Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Medizinische Klinik III, Hindenburgdamm 30, 12200 Berlin, Germany, <sup>2</sup>Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Institut für Pathologie, Hindenburgdamm 30, 12200 Berlin, Germany and <sup>3</sup>Johann Wolfgang Goethe-Universität, Medizinische Klinik III, Theodor Stern-Kai 7, 60590 Frankfurt/Main, Germany

Email: Thomas Burmeister\* - [thomas.burmeister@charite.de](mailto:thomas.burmeister@charite.de); Stefan Schwartz - [stefan.schwartz@charite.de](mailto:stefan.schwartz@charite.de); Michael Hummel - [michael.hummel@charite.de](mailto:michael.hummel@charite.de); Dieter Hoelzer - [hoelzer@em.uni-frankfurt.de](mailto:hoelzer@em.uni-frankfurt.de); Eckhard Thiel - [haema.cbf@charite.de](mailto:haema.cbf@charite.de)

\* Corresponding author

Published: 7 February 2007

Received: 20 September 2006

*Retrovirology* 2007, 4:11 doi:10.1186/1742-4690-4-11

Accepted: 7 February 2007

This article is available from: <http://www.retrovirology.com/content/4/1/11>

© 2007 Burmeister et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

**Background:** The Deltaretrovirus genus comprises viruses that infect humans (HTLV), various simian species (STLV) and cattle (BLV). HTLV-I is the main causative agent in adult T-cell leukemia in endemic areas and some of the simian T-cell lymphotropic viruses have been implicated in the induction of malignant lymphomas in their hosts. BLV causes enzootic bovine leukosis in infected cattle or sheep. During the past few years several new Deltaretrovirus isolates have been described in various primate species. Two new HTLV-like viruses in humans have recently been identified and provisionally termed HTLV-III and HTLV-IV. In order to identify a broad spectrum of Deltaretroviruses by a single PCR approach we have established a novel consensus PCR based on nucleotide sequence data obtained from 42 complete virus isolates (HTLV-I/-II, STLV-I/-II/-III, BLV). The primer sequences were based on highly interspecies-conserved virus genome regions. We used this PCR to detect Deltaretroviruses in samples from adult patients with a variety of rare T-cell neoplasms in Germany.

**Results:** The sensitivity of the consensus PCR was at least between  $10^{-2}$  and  $10^{-3}$  with 100% specificity as demonstrated by serial dilutions of cell lines infected with either HTLV-I, HTLV-II or BLV. Fifty acute T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL) samples and 33 samples from patients with various rare mature T-cell neoplasms (T-PLL, Sézary syndrome and other T-NHL) were subsequently investigated. There were no cases with HTLV-I, HTLV-II or any other Deltaretroviruses.

**Conclusion:** The results rule out a significant involvement of HTLV-I or HTLV-II in these disease entities and show that other related Deltaretroviruses are not likely to be involved. The newly established Deltaretrovirus PCR may be a useful tool for identifying new Deltaretroviruses.

### Background

Retroviruses are the main etiologic agents in a variety of malignant diseases in animals [1]. Bovine leukemia virus

(BLV) was the first Deltaretrovirus to be discovered in 1969 by electron microscopy [2], but it was not until 1985 that the first complete nucleotide sequence of an isolate

**Table 1: Accession number of the 42 virus isolates used in the nucleotide sequence alignments.**

Virus	EMBL/Genbank/DDBJ accession number
HTLV-I	[EMBL:AY563954] (Brazilian isolate), [EMBL:AY563953] (Brazilian isolate), [GenBank:NC_001436], [EMBL:AF259264] (isolate WHP from China), [EMBL:AF139170] (from an HTLV-I/III seroindeterminate patient), [EMBL:J02029] (Japanese ATL isolate), [EMBL:AF033817], [EMBL:L03561], [EMBL:D13784] (Caribbean isolate), [EMBL:L02534] (Melanesian isolate), [EMBL:U19949] (isolate from an ATL patient), [EMBL:AF042071] (isolate from Germany), [EMBL:L36905] (from a patient with post-transfusion spastic paraparesis)
HTLV-II	[GenBank:NC_001488], [EMBL:AF326584] (Brazilian isolate), [EMBL:AF326583] (Brazilian isolate, strain RP329), [EMBL:AF412314] (with HIV coinfection), [EMBL:AF139382] (Brazilian isolate), [EMBL:AF074965] (isolate from a Guahibo Indian from Venezuela), [EMBL:M10060], [EMBL:L11456] (Guyami Indian isolate), [EMBL:Y14365] (Congolese Bambute Efe Pygmy isolate), [EMBL:X89270] (Italian isolate), [EMBL:L20734], [EMBL:Y13051] (African isolate, subtype b)
STLV-I	[GenBank:NC_000858] (from a naturally infected tanzalus monkey from Central Africa), [EMBL:AY590142] (in <i>Macaca arctoides</i> ), [EMBL:Z46900] (from Celebes macaques), [EMBL:AF074966] (isolate Tan90 from Central African Republic)
STLV-II	[GenBank:NC_001815], [EMBL:Y14570] (STLV-PP from <i>Pan paniscus</i> ), [EMBL:U90557] (from <i>Pan paniscus</i> )
STLV-III	[EMBL:AF517775] (from <i>Papio hamadryas papio</i> from Senegal), [GenBank:NC_003323] (from red-capped mangabeys ( <i>Cercocebus torquatus</i> ) from Cameroon), [EMBL:AY217650] (from <i>Theropithecus gelada</i> ), [EMBL:AY222339] (from a red-capped mangabey – <i>Cercocebus torquatus torquatus</i> – from Nigeria), [EMBL:Y07616] (STLV-PH969 from a <i>Hamadryas</i> baboon)
BLV	[GenBank:NC_001414], [EMBL:AF257515] (from a Holstein cow from Argentina), [EMBL:K02120] (Japanese isolate), [EMBL:AF033818], [EMBL:D00647] (Australian isolate)

was reported [3]. Since the discovery of HTLV-I [4] and HTLV-II [5] and their closely related simian counterparts STLV-I [6] and STLV-II [7] several Deltaretrovirus isolates have been described in various non-human primate species. In 1994, a third simian Deltaretrovirus, later designated as STLV-III, was identified in a *Hamadryas* Baboon (*Papio Hamadryas*) [8-10]. Until recently no human counterparts of STLV-III were known, but in 2005 two independent research groups described human isolates that showed high homology to STLV-III and were considered to be HTLV-III isolates [11,12]. Moreover, a fourth Deltaretrovirus was identified in a single human individual from the Rain Forest in Cameroon. It did not show sufficient homology to be classified as primate T-cell lymphotropic virus (PTLV) type I, II or III and was thus considered to be a species representative of a hitherto unknown putative PTLV-IV virus group [12].

HTLV-I and STLV-I are etiologically linked to the induction of certain T-cell lymphomas/leukemias in their hosts [13,14]. The oncogenic action of the virus is mediated by

the viral *tax* and *rex* genes that act as transcription factors, thereby promoting cell growth and malignant transformation. However, the etiology of many human malignant T-cell and T-/NK-cell disorders is still not well understood. On the other hand a great deal of knowledge has been gained in the last years on the molecular biology of Deltaretroviruses, since a large number of new isolates have been described. To investigate the possible involvement of Deltaretroviruses in various human T-cell neoplasms, we have constructed a novel Deltaretrovirus consensus PCR based on nucleotide sequence alignments of all 42 complete Deltaretrovirus isolates published to date. Highly conserved virus genome regions were identified that allowed the construction of a generic PCR, capable of detecting all known Deltaretroviruses.

**Results**

A total of 42 complete Deltaretrovirus isolates could be retrieved from the EMBL/Genbank/DDBJ nucleotide sequence database (Table 1). These included 13 HTLV-I, 12 HTLV-II, 4 STLV-I, 3 STLV-II, 5 STLV-III, and 5 BLV iso-

**Table 2: Patient and disease characteristics.**

Disease entity (N)		N	Median age (range) [years]
Precursor T-cell (50)	Early T-cell lymphoblastic	11	34 (17–63)
	Cortical (thymic) T-cell lymphoblastic	31	
	Mature T-cell lymphoblastic	8	
Mature T-cell (31)	T-prolymphocytic	16	65 (48–83)
	Sézary syndrome and Mycosis fungoides	5	
	Ki- I large T-cell lymphoma	3	
	Intestinal T-cell lymphoma	1	
	Other (unspecified) peripheral T-NHL	6	
NK cell disorders (2)	LGL leukemia	2	29 and 78



M10060	CAATTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCTGA	GCGCCTCCAG	GCC
NC_001488	CAATTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCTGA	GCGCCTCCAG	GCC
AF412314	CAATTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCTGA	GCGCCTCCAG	GCC
AF139382	CAATTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCTGA	GCGCCTCCAG	GCC
AF326584	CAATTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCTGA	GCGCCTCCAG	GCC
AF326583	CAATTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCTGA	GCGCCTCCAG	GCC
L20734	CAAGTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCTGA	GCGCCTCCAG	GCC
Y13051	CAAGTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCTGA	GCGCCTCCAG	GCC
L11456	CAAGTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCTGA	GCGCCTCCAG	GCC
X89270	CAAGTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCTGA	GCGCCTCCAG	GCC
AF074965	CAAGTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCTGA	GCGCCTCCAG	GCC
Y14365	CAAGTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCTGA	GCGCCTCCAG	GCC
Y14570	CAAGTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCTGA	GCGCCTCCAG	GCC
NC001815	CAAGTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCTGA	GCGCCTCCAG	GCC
U90557	CAAGTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCTGA	GCGCCTCCAG	GCC
Y07616	CAGTTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCGGA	ACGCTCCAG	GCC
AY217650	CAGTTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCGGA	ACGCTCCAG	GCC
AF517775	CAGTTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCGGA	ACGCTCCAG	GCT
AY222339	CAGTTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCGGA	ACGCTCCAG	GCC
NC_003323	CAGTTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCGGA	ACGCTCCAG	GCC
L36905	CAGTTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCGGA	ACGCTCCAG	GCC
AF139170	CAGTTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCGGA	ACGCTCCAG	GCC
AF042071	CAGTTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCGGA	ACGCTCCAG	GCC
L03561	CAGTTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCGGA	ACGCTCCAG	GCC
AF259264	CAGTTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCGGA	ACGCTCCAG	GCC
AY563953	CAGTTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCGGA	ACGCTCCAG	GCC
AY563954	CAGTTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCGGA	ACGCTCCAG	GCC
U19949	CAGTTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCGGA	ACGCTCCAG	GCC
J02029	CAGTTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCGGA	ACGCTCCAG	GCC
D13748	CAGTTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCGGA	ACGCTCCAG	GCC
AF033817	CAGTTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCGGA	ACGCTCCAG	GCC
NC_001436	CAGTTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCGGA	ACGCTCCAG	GCC
AF074966	CAGTTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCGGA	ACGCTCCAG	GCC
NC_000858	CAGTTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCGGA	ACGCTCCAG	GCC
L02534	CAGTTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCGGA	ACGCTCCAG	GCC
Z46900	CAGTTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCGGA	ACGCTCCAG	GCC
AY590142	CAGTTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACCTGA	ACGCTCCAG	GCC
AF033818	CAATTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACTAGA	ACGCTCCAG	GCC
NC_001414	CAATTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACTAGA	ACGCTCCAG	GCC
K02120	CAATTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACTAGA	ACGCTCCAG	GCC
D00647	CAATTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACTAGA	ACGCTCCAG	GCC
AF257515	CAATTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACTAGA	ACGCTCCAG	GCC
consensus	CARKTGGGGG	CTCGTCCGGG	...TTAAACTAGA	ACGCTCCAG	GCC
			AATTGGRHCT	YCGGAGGTC	CGG

**Figure 1**

PCR primer regions with consensus primers. The accession numbers of the different isolates are given on the left. The first region corresponds to the proline tRNA binding site; the start of the *pol* ORF is underlined in the second region (site of ribosomal frameshift).

lates. A common feature of the Deltaretrovirus genus is the use of proline tRNA as a primer for the complementary minus-strand DNA synthesis. tRNA genes are highly conserved between different species [15]. Alignment of the collected sequences showed a very high degree of conservation of this functionally important region. Additionally, a second highly conserved region was identified approximately 1.8 kb 3' of the tRNA binding site (Fig. 1). The *pol* ORF of HTLV-I/-II/BLV is expressed by using two ribosomal -1 frame shifts, and the second frame shift with the transcription start site of the *pol* ORF lies within this region [1]. The high degree of conservation of this region is thus understandable. A phylogenetic tree constructed from the aligned region illustrates the genetic relationships (Fig. 2). No other genomic regions with a similarly high degree of conservation were identified (see Additional File 1). Degenerate primers complementary to these regions were constructed (Fig. 1). The degeneracy of the primers was moderate (4-fold for (+) and 12-fold for (-)). The PCR was tested using serial dilutions of Deltaretrovirus-infected cell line DNA in human leukocyte DNA under various conditions (Fig. 3). Retrovirus-infected cell

lines frequently harbor more than one copy of the virus, although often some of these copies are defective. When calculating PCR sensitivity this factor has to be taken into account. The HTLV-I/HTLV-II/BLV copy number has been determined in various cell lines which revealed copy numbers between 1 and 17 per cell [16-18]. We thus assumed a sensitivity of  $10^{-2} - 10^{-3}$  for our PCR. This sensitivity appeared highly sufficient for our purpose. The PCR produced a faint 657 bp sideband when testing human DNA or cell line DNA diluted in human DNA (Fig. 3). Cloning and sequencing of the 657 bp product (EMBL nucleotide sequence database Acc No [EMBL:AM422011]) and a successive BLAST search revealed that it originated from amplification of a sequence on chromosome 3 (Acc No [EMBL:AC114481], Ncl 81342-80686) and 11 (Acc No [EMBL:AP000785], Ncl 74948-75403) by primer *delta-F*.

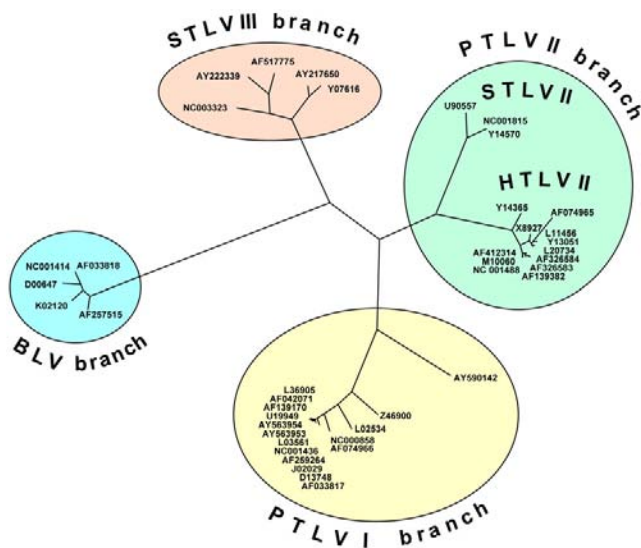
It should be noted that the PCR sensitivity could be further increased to  $10^{-3} - 10^{-4}$  (while retaining specificity) by lowering the annealing temperature to 60°C and increasing the number of PCR cycles but at the expense of a stronger 657 bp sideband.

A total of 83 samples were obtained from patients with various rare mature T-cell (N = 31) and precursor T-cell neoplasms (N = 50) and from 2 patients with NK-cell disorders. All samples had been thoroughly characterized immunologically and genetically and contained a high percentage (>= 50%) of malignant cells (Table 2). All samples were fresh (i.e. unfixed) tumor material, and the DNA quality was ensured by various control PCRs.

None of the investigated samples yielded a PCR product indicative of the presence of a Deltaretrovirus. The parallel investigation of positive controls led to the expected results.

**Discussion**

While the etiological involvement of HTLV-I in endemic adult T-cell leukemia/lymphoma is beyond dispute there have been repeated controversies whether this virus might also play a role in other T-cell neoplasms such as T-lymphocytic leukemia [19], Sézary syndrome or Mycosis fungoides [20-22]. The situation is further complicated by the fact that the classification of T-NHLs has been evolving and changing over the years as new disease entities are recognized and refined diagnostic criteria are established [23,24]. Thus the results of older studies may not always be fully transferable to today's situation. Some investigators have also suggested that a truncated HTLV-I may play a role in certain T-NHLs [19,25]. On the other hand HTLV-II has not been convincingly linked to any specific malignant T-cell disorder. The simian Deltaretroviruses are implicated in lymphomatous diseases in various simian hosts (reviewed in [1]). The newly discovered HTLV-



**Figure 2**  
Phylogenetic tree based on the nucleotide sequence alignment of the amplified region. The recently described HTLV-III and HTLV-IV isolates are not included since no complete isolates have been published yet. The tree is not intended to set up a phylogeny but to illustrate the genetic relationships between the isolates.

III and HTLV-IV isolates have not yet been fully characterized, and their distribution or possible involvement in human disease is unknown.

A few previous investigations performed on precursor T-cell neoplasms in Germany were mainly based on HTLV-I serology [26] which may not be as reliable as nucleic acid-based techniques [27]. Germany has a low HTLV-I seroprevalence, but virus isolates without linkage to endemic areas have occasionally been reported [28].

The causes of most malignant T-cell disorders are only partially understood. Numerous recurrent genetic aberrations have been described [29] but a clear and detailed model of disease development still does not exist. Oncogenic viruses such as Epstein-Barr virus or HTLV-I are well established causative factors in various human T-cell lymphomas and leukemias [29]. It appears possible that yet undetected Deltaretroviruses may play a role in human T-cell malignancies.

We developed a consensus PCR for detecting Deltaretroviruses based on highly conserved genomic sequences of all published complete Deltaretrovirus isolates. Since this PCR is based on highly interspecies conserved sequence motifs it may also be capable of detecting related but hitherto unknown Deltaretroviruses. However, despite high sensitivity and specificity of our PCR approach, no Del-

taetrovirus-positive cases were found in our series of samples.

## Conclusion

The results rule out a role of known Deltaretroviruses in the disease entities under investigation here. The involvement of a hitherto undetected Deltaretrovirus is not completely excluded but rendered more unlikely. Truncated proviruses that have lost their 5'-region with the tRNA binding site may also escape detection by our PCR system. Despite these negative results, our newly established consensus PCR may be a useful tool in the search for and characterization of new Deltaretroviruses in primates and other mammals.

## Methods

### Cell lines

The following cell lines were used: *BL3.1* (infected with BLV, a bovine lymphoma cell line, [30]), *MJ [G11]* (infected with HTLV-I, derived from a human cutaneous T-cell lymphoma, [31]) and *Mo T* (infected with HTLV-II, derived from a patient with hairy cell leukemia, [32]). All cell lines were obtained from the ATCC (Acc No CRL-2306, TIB-8294, and TIB-8066, respectively). Cell culture was done according to the recommendations of the supplier. DNA isolated from the cell lines was used to prepare serial dilution rows.

### DNA isolation

DNA was isolated from sample material or cell lines using the *PureGene* kit (Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf/Germany) and dissolved in Tris/EDTA buffer at a concentration of 60 ng/ $\mu$ l.

### Preparation of cell line dilution series

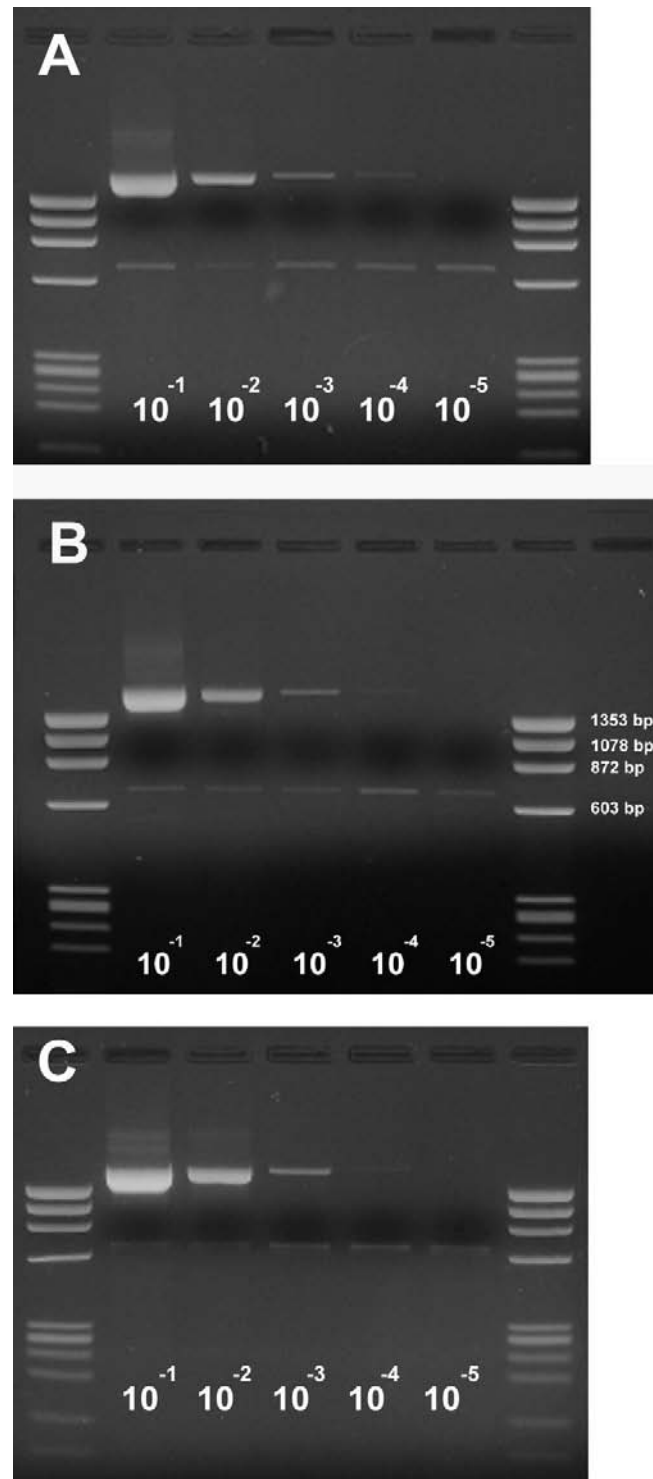
Serial dilutions of cell line DNA in DNA from buffy coats of blood donors were prepared as recently described [33].

### Patient samples

All samples were obtained for diagnostic purposes, and we retrospectively investigated archived material. The patients had given their consent for scientific investigations. The T-precursor samples were obtained within the German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GMALL). Our study complied with the Helsinki Declaration.

### PCR method

The HotStarTaq kit (QIAGEN, Hilden/Germany) was used with 200 ng sample DNA, 400 nM of each PCR primer *delta-F* 5'-CARKTGGGGGCTCGTCCGGGAT-3' and *delta-R* 5'-GGCCTGGAGGCGYTCHRGTTTAA-3', buffer conditions and polymerase mix as recommended by the supplier. The primers were optimized derivatives of those previously published [34] and HPLC-purified. The follow-



### Figure 3

Deltaretrovirus PCR tested in serial dilutions of cell lines. Cell line DNA was diluted in genomic DNA from healthy individuals. **A:** cell line *Mo T* (HTLV-II-infected), **B:** cell line *Mj* (HTLV-I-infected), **C:** cell line *BL3.1* (BLV-infected). First and last lane in every gel:  $\phi$ X174/*Hae* III size standard (QIAGEN, Hilden/Germany). No cell line harboring STLV-III, HTLV-III or HTLV-IV is currently available. All cell lines yield a PCR product of approximately 1.8 kb. A small sideband at 657 bp is visible which could serve as an internal control for DNA integrity.

ing cyler program was used on a GeneAmp 2400 Cyler (PerkinElmer): 94°C for 15 minutes, 40 cycles (94°C for 20 seconds, 62°C for 20 seconds, 72°C for 90 seconds), 4°C.

#### Nucleotide sequence alignments

All available complete nucleotide sequences from Delta-retrovirus isolates were collected from the EMBL/Genbank/DDBJ database (Table 1), converted into FASTA file format, and aligned using the ClustalX software [35].

#### Phylogenetic analysis

The PHYLIP program package [36], version 3.65 for MacOS X, with the program modules *dnacomp* and *drawgram* was used with the default parameters to construct a phylogenetic tree from the aligned sequences.

#### Immunophenotyping

Immunophenotyping by FACS analysis was done essentially by standard methods described elsewhere [37].

#### Abbreviations

HTLV human T-cell lymphotropic virus

STLV simian T-cell lymphotropic virus

BLV bovine leukemia virus

PTLV primate T-cell lymphotropic virus

PCR polymerase chain reaction

PLL prolymphocytic leukemia

NHL Non Hodgkin lymphoma

ALL acute lymphoblastic leukemia

#### Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

TB designed and performed the laboratory work, particularly the PCR, did the alignments and phylogenetic analysis and wrote the paper. SS and ET performed immunophenotyping of samples. MH characterized specific samples by analysis of T-cell receptor clonality. DH is chairman of the German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GMALL) which provided the T-ALL samples. All authors have read and approved the manuscript.

#### Additional material

##### Additional File 1

contains an alignment of the 42 retrovirus sequences from Table 1 (the genome region between primer delta-F and delta-R).

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1742-4690-4-11-S1.pdf>]

#### Acknowledgements

The authors are grateful to Mara Molkenkin, Barbara Komischke and Rita Lippoldt for their skillful technical assistance. They are indebted to Prof. Harald Stein (Head of the Dept. of Pathology, Charité Campus Benjamin Franklin) for giving them access to lymphoma DNA samples. TB and SS were supported by the Deutsche Krebshilfe (German Cancer Aid, grant 10-1988-Bu1). TB is also supported by the Berliner Krebsgesellschaft (Berlin Cancer Society). Dr. J. Weirowski critically read the manuscript.

#### References

- Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, (Eds): *Retroviruses* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.
- Miller JM, Miller LD, Olson C, Gillette KG: **Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma.** *J Natl Cancer Inst* 1969, **43**:1297-1305.
- Sagata N, Yasunaga T, Tsuzuku-Kawamura J, Ohishi K, Ogawa Y, Ikawa Y: **Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, **82**:677-681.
- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Reitz MS, Kalyanaraman VS, Gallo RC: **Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sézary T-cell leukaemia.** *Nature* 1981, **294**:268-271.
- Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC: **A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia.** *Science* 1982, **218**:571-573.
- Miyoshi I, Yoshimoto S, Fujishita M, Taguchi H, Kubonishi I, Niiya K, Minezawa M: **Natural adult T-cell leukemia virus infection in Japanese monkeys.** *Lancet* 1982, **2**:658.
- Chen YAM, Jang YJ, Kanki PJ, Yu QC, Wang JJ, Montali RJ, Samuel KP, Papas TS: **Isolation and characterization of simian T-cell leukemia virus type II from new world monkeys.** *J Virol* 1994, **68**:1149-1157.
- Goubau P, Van Brussel M, Vandamme A-M, Liu HF, Desmyter J: **A primate T-lymphotropic virus, PTLV-L, different from human T-lymphotropic viruses types I and II, in a wild-caught baboon.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, **91**:2848-2852.
- Van Brussel M, Goubau P, Rousseau R, Desmyter J, Vandamme AM: **The genomic structure of a new simian T-lymphotropic virus, STLV-ph969, differs from that of human T-lymphotropic virus types I and II.** *J Gen Virol* 1996, **77**:347-358.
- Van Brussel M, Salemi M, Liu MH-F, Gabriels J, Goubau P, Desmyter J, Vandamme AM: **The simian T-lymphotropic virus STLV-PPI664 from Pan paniscus is distinctly related to HTLV-II but differs in genomic organization.** *Virology* 1999, **243**:366-379.
- Calattini S, Chevalier SA, Duprez R, Bassot S, Froment A, Mahieux R, Gessain A: **Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-III) in Central Africa.** *Retrovirology* 2005, **2**:30.
- Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, Garcia AD, Shanmugam V, Tamoufe U, Torimiro JN, Prosser AT, Lebreton M, Mpoudi-Ngole E, McCutchan FE, Birx DL, Folks TM, Burke DS, Switzer WM: **Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:7994-7999.
- Gallo RC: **The discovery of the first human retrovirus: HTLV-I and HTLV-II.** *Retrovirology* 2005, **2**:17.



14. Allan JS, Leland M, Broussard S, Mone J, Hubbard G: **Simian T-cell lymphotropic Viruses (STLVs) and lymphomas in African nonhuman primates.** *Cancer Invest* 2001, **19**:383-395.
15. Sprinzl M, Horn C, Brown M, Ioudovitch A, Steinberg S: **Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes.** *Nucleic Acids Res* 1998, **26**:148-153.
16. Albrecht B, Collins ND, Newbound GC, Ratner L, Lairmore MD: **Quantification of human T-cell lymphotropic virus type I proviral load by quantitative competitive polymerase chain reaction.** *J Virol Methods* 1998, **75**:123-140.
17. Murphy EL, Lee TH, Chafets D, Nass CC, Wang B, Loughlin K, Smith D, HTLV Outcomes Study Investigators: **Higher human T lymphotropic virus (HTLV) provirus load is associated with HTLV-I versus HTLV-II, with HTLV-II subtype A versus B, and with male sex and a history of blood transfusion.** *J Infect Dis* 2004, **190**:504-10.
18. Van den Broeke A, Cleuter Y, Beskorwayne T, Kerkhofs P, Szyal M, Bagnis C, Burny A, Griebel P: **CD154 costimulated ovine primary B cells, a cell culture system that supports productive infection by bovine leukemia virus.** *J Virol* 2001, **75**:1095-103.
19. Kojima K, Sawada T, Ikezoe T, Matsuo Y, Kobayashi H, Yano T, Sugimoto T, Imoto S, Nakagawa T, Matsui T, Yasukawa M, Hara M, Taguchi H: **Defective human T-lymphotropic virus type I provirus in T-cell prolymphocytic leukaemia.** *Br J Haematol* 1999, **105**:376-381.
20. Zucker-Franklin D, Pancake BA, Marmor M, Legler PM: **Reexamination of human T cell lymphotropic virus (HTLV-I/II) prevalence.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94**:6403-6407.
21. Shohat M, Hodak E, Hannig H, Bodemer W, David M, Shohat B: **Evidence for the cofactor role of human T-cell lymphotropic virus type I in mycosis fungoides and Sézary syndrome.** *Br J Dermatol* 1999, **141**:44-49.
22. Sakamoto FH, Colleoni GW, Teixeira SP, Yamamoto M, Michalany NS, Almeida FA, Chiba AK, Petri V, Fernandes MA, Pombo-de-Oliveira MS: **Cutaneous T-cell lymphoma with HTLV-I infection: clinical overlap with adult T-cell leukemia/lymphoma.** *Int J Dermatol* 2006, **45**:447-449.
23. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, (Eds): *Pathology and genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* Lyon: IARC Press; 2001.
24. Herling M, Khoury JD, Washington LT, Duvic M, Keating MJ, Jones D: **A systematic approach to diagnosis of mature T-cell leukemias reveals heterogeneity among WHO categories.** *Blood* 2004, **104**:328-335.
25. Morozov VA, Syrtsev AV, Ellerbrok H, Nikolaeva EV, Bavykin AS, Pauli G: **Mycosis fungoides in European Russia: no antibodies to human T cell leukemia virus type I structural proteins, but virus-like sequences in blood and saliva.** *Intervirology* 2005, **48**:362-371.
26. Dölken G, Bross KJ, Chosa T, Schneider J, Bayer H, Hunsmann G: **No evidence for HTLV infection among leukaemia patients in Germany.** *Lancet* 1983, **2**:1495.
27. Miyoshi I, Hatakeyama N, Murakami K, Sawada T, Takimoto Y: **Sézary syndrome in an HTLV-I-seronegative, genome-positive Japanese.** *Am J Hematol* 1998, **57**:184-185.
28. Ellerbrok H, Fleischer C, Salemi M, Reinhardt P, Ludwig WD, Vandamme AM, Pauli G: **Sequence analysis of the first HTLV-I infection in Germany without relations to endemic areas.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998, **14**:1199-1203.
29. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW: *Pathology and Genetics: Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* Lyon: IARC Press; 2001.
30. Harms JS, Splitter GA: **Impairment of MHC class I transcription in a mutant bovine B cell line.** *Immunogenetics* 1992, **35**:1-8.
31. Popovic M, Sarin PS, Robert-Gurroff M, Kalyanaraman VS, Mann D, Minowada J, Gallo RC: **Isolation and transmission of human retrovirus (human t-cell leukemia virus).** *Science* 1983, **219**:856-859.
32. Saxon A, Stevens RH, Quan SG, Golde DW: **Immunologic characterization of hairy cell leukemias in continuous culture.** *J Immunol* 1978, **120**:777-782.
33. Burmeister T, Marschalek R, Schneider B, Meyer C, Gökbuget N, Schwartz S, Hoelzer D, Thiel E: **Monitoring minimal residual disease by quantification of genomic chromosomal breakpoint sequences in acute leukemias with MLL aberrations.** *Leukemia* 2006, **20**:451-457.
34. Burmeister T, Schwartz S, Thiel E: **A PCR primer system for detecting oncoretroviruses based on conserved DNA sequence motifs in animal retroviruses and its application to human leukaemias and lymphomas.** *J Gen Virol* 2001, **82**:2205-2213.
35. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG: **The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.** *Nucleic Acids Research* 1997, **24**:4876-4882.
36. Felsenstein J: *Inferring Phylogenies* Sunderland (Massachusetts): Sinauer Associates; 2004.
37. Burmeister T, Gökbuget N, Reinhardt R, Rieder H, Hoelzer D, Schwartz S: **NUP214-ABL1 in adult T-ALL: the GMALL study group experience.** *Blood* 2006, **108**:3556-3559.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:  
[http://www.biomedcentral.com/info/publishing\\_adv.asp](http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp)



### 3. Diskussion und Zusammenfassung

Die eingangs betonte genetische Heterogenität der ALL des Erwachsenenalters wird an den dargestellten Publikationen deutlich. Die ALL vom Burkitt-Typ weist wie auch das Burkitt-Lymphom häufig Aberrationen des *MYC*-Genlocus auf 8q24 auf [91]. *MYC*-Ig-Translokationen sind allerdings weder 100% spezifisch für das Burkitt-Lymphom, noch können sie in allen Fällen von histopathologisch-immunologisch verifizierten Burkitt-Lymphomen nachgewiesen werden [92]. Eine ganz analoges Bild zeigt sich bei der Analyse der Burkitt-ALL (Publikation 1, [93]). Die häufigste Translokation ist die „typische“ *MYC*-IgH-Fusion (t(8;14)(q24;q32)), die mittels *long distance* PCR nachgewiesen werden kann. Wie hier gezeigt ist diese diagnostische Methode zwar aufwändig, aber sehr zuverlässig und sensitiv. Es lassen sich dadurch auch molekulare Details erfassen. So wird u. a. deutlich, dass die Burkitt-ALL sowohl Translokationen in die *joining*-Region als auch in die *switch*-Regionen aufweist. Die ersteren sind dabei durch fehlerhafte VDJ-Rekombination entstanden, die letzteren durch Fehler beim Isotypenwechsel (*isotype switch*). Die Feststellung der REAL- und WHO-Klassifikation der hämatopoetischen Neoplasien, dass beim sporadischen Burkitt-Lymphom nur Translokationen in die *switch*-Regionen stattfinden [94, 95], ist nicht korrekt. Das zeigt sich beispielhaft auch an der Zelllinie *BLUE-1*, die aus einem sporadischen Burkitt-Lymphom mit höhergradigem Knochenmarkbefall gewonnen wurde (Publikation 2) [96].

Bei der B-Vorläufer-ALL weisen etwa 45% der prä- und common-ALLs im Erwachsenenalter eine *BCR-ABL*-Fusion auf, während nur etwa 4% der pro-B-ALL-Patienten *BCR-ABL*-positiv sind. Die Prävalenz bei pädiatrischen ALL-Patienten ist sehr viel geringer als bei erwachsenen Patienten. Die genauere Untersuchung der Altersabhängigkeit zeigt einen Anstieg der relativen Häufigkeit bis etwa zum 35. Lebensjahr. Danach bleibt die relative Häufigkeit bemerkenswert konstant bei ca.

45% der B-Vorläufer-ALLs (Publikation 7) [18]. Die relative Häufigkeit der *major breakpoint*-Transkripte nimmt im gleichen Zeitraum überproportional zu. Die Ursachen dieser Altersabhängigkeit sind bisher unbekannt. Neben den häufigen *minor* und *major breakpoint* Transkripten finden sich auch eine Reihe atypischen Transkripten, die durch Chromosomenbrüche außerhalb der typischen Regionen in *ABL* und *BCR* zustande kommen. Diese atypischen Transkripte sind auch von theoretischem Interesse, da sich anhand des klinischen Phänotyps Rückschlüsse auf die leukämogene Wirkung der verschiedenen *BCR-ABL*-Proteine, die sich in ihrem *BCR*-Anteil unterscheiden, ziehen lassen. Für die Erwachsenen-ALL wurde die Prävalenz dieser Transkripte im Rahmen dieser Arbeit auf etwa 2% bestimmt (Publikation 6) [19]. Dabei fand sich ganz überwiegend das e1a3-Transkript. Patienten mit atypischen Transkripten scheinen gut auf Imatinib-Behandlung anzusprechen [19].

Zwei der hier vorgestellten Arbeiten beschäftigen sich mit der T-ALL. Zum einen wurde ein neuartiges Fusionsgen bei der T-ALL untersucht (Publikation 4) [97]. Dieses Fusionsgen *NUP214-ABL1* kommt durch Fusion der etwa 400 kB entfernt auf dem langen Arm von Chromosom 9 (9q34) liegenden Gene *ABL1* und *NUP214* zustande [90]. *NUP214* ist Bestandteil des Kernporen-Komplexes, und auch schon vom *DEK-CAN*-Fusionsgen (Translokation t(6;9), *CAN* = *NUP214*) bei der akuten myeloischen Leukämie bekannt [98]. *ABL1* ist die bei der B-Vorläufer-ALL an der *BCR-ABL*-Fusion beteiligte Tyrosinkinase. Außergewöhnlich bei dieser Fusion ist die Art und Weise wie sie zustande kommt: nicht durch eine interstitielle Deletion (alle bekannten *ABL1*-Fusionsgene zeigen eine Konservierung des Aminoterminus von *ABL1*, *NUP214* liegt aber 3'wärts von *ABL1*), sondern durch eine episomale Fusion. Durch episomale Amplifikation und ungleiche Zellteilung kommt es zu einer Amplifikation des Fusionsgens so dass die Episomen z. T. in hoher Kopienzahl in

den Zellen vorliegen. *NUP214-ABL1* ist auch von therapeutischen Interesse, da sich die Tyrosinkinase-Aktivität mit Imatinib hemmen lässt [90]. Die *NUP214-ABL1*-positive Zelllinie *ALL-SIL* zeigte sich empfindlich gegenüber Imatinib-Behandlung [90]. Allerdings haben *NUP214-ABL1*-positive Zellen neben der Entwicklung von somatischen Resistenz-verleihenden Mutationen noch eine andere Möglichkeit resistent gegen spezifische Tyrosinkinase-Inhibitoren zu werden, nämlich den Weg der episomalen Überamplifikation. Daher erscheint es fraglich, ob Tyrosinkinase-Inhibitoren eine ähnliche Effektivität entfalten könnten, wie bei *BCR-ABL*. Klinische Untersuchungen hierzu gibt es, abgesehen von Einzelfallberichten [99] allerdings bisher nicht. Die transformierende Aktivität von *NUP214-ABL1* ist deutlich schwächer als die von *BCR-ABL*, hängt vom Kontext der Kernporen ab [100] und T-ALL-Patienten mit oder ohne *NUP214-ABL1*-Fusionsgen haben keine wesentlich unterschiedliche Prognose [97].

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass sich bei einem Subset von T-ALL-Patienten eine aberrante Expression der beiden *orphan HOX*-Gene *HOX11* und *HOX11L2* findet. Diese Gene wurden erstmals im Kontext der Translokationen t(5q35) und t(10q24) bei der T-ALL entdeckt [101, 102]. Ganz überwiegend finden sich diese Veränderungen bei der thymischen T-ALL, einem immunologischen Subtyp, der mit einer günstigen Prognose assoziiert ist (Publikation 5, [61]). Die hier vorgestellte Analyse einer großen Zahl von T-ALL-Patienten zeigt, dass die aberrante Expression von *HOX11L2* mit einem signifikant ungünstigeren Gesamtüberleben und einer ungünstigeren Remissionsdauer assoziiert ist.

Die Frage, ob Viren eine Rolle bei der Entstehung der ALL spielen könnten, liegt mittlerweile etwas abseits des wissenschaftlichen *mainstream* Interesses. In Japan und anderen HTLV-1-Endemiegebieten wird bekanntermaßen ein Großteil der T-Zell-Leukämien durch das Retrovirus HTLV-1, das den Deltaretroviren zugerechnet wird,



verursacht [103, 104]. In den letzten Jahren sind eine ganze Reihe von neuen Deltaretroviren bei Affen im tropischen Regenwald entdeckt worden. Besonders interessante Ergebnisse lieferte eine Untersuchung aus dem Jahr 2005 bei Buschwildjägern in Kamerun [105], bei denen Virus-Sequenzen gefunden wurden, die offensichtlich zwei neuen Deltaretroviren, HTLV-3 und HTLV-4, zuzurechnen waren [106]. Mittlerweile ist die Charakterisierung eines ersten HTLV-3-Isolates geglückt [107]. Über die Verbreitung dieser Viren in menschlichen Populationen oder deren mögliche Beteiligung an menschlichen Erkrankungen ist bisher so gut wie nichts bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein pan-Deltaretrovirus-Nachweissystem konstruiert und auf eine größere Zahl von Patientenproben mit T-Zell-Neoplasien angewandt (Publikation 8, [108]). Dabei ergab sich kein Nachweis von Deltaretroviren, was eine Beteiligung von HTLV-1,-2,-3,-4, oder verwandter Deltaretroviren an der Pathogenese sehr unwahrscheinlich macht.

## 4. Literatur

1. Spix C, Eletr D, Blettner M, Kaatsch P. Temporal trends in the incidence rate of childhood cancer in Germany 1987-2004. *Int J Cancer*. 2008;122:1859-1867.
2. Dugas M, Messerer D, Hasford J et al. German multicenter study group for adult ALL (GMALL): recruitment in comparison to ALL incidence and its impact on study results. *Ann Hematol*. 2003;82:83-87.
3. Jordan CT. The leukemic stem cell. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007;20:13-18.
4. Buzzeo MP, Scott EW, Cogle CR. The hunt for cancer-initiating cells: a history stemming from leukemia. *Leukemia*. 2007;21:1619-1627.
5. Cox CV, Evely RS, Oakhill A, Pamphilon DH, Goulden NJ, Blair A. Characterization of acute lymphoblastic leukemia progenitor cells. *Blood*. 2004;104:2919-2925.
6. de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G et al. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 1982;300:765-767.
7. Heisterkamp N, Stephenson JR, Groffen J et al. Localization of the c-ab1 oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 1983;306:239-242.
8. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*. 1984;36:93-99.
9. Melo JV, Gordon DE, Cross NC, Goldman JM. The ABL-BCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1993;81:158-165.
10. Melo JV, Gordon DE, Tuszynski A, Dhut S, Young BD, Goldman JM. Expression of the ABL-BCR fusion gene in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1993;81:2488-2491.
11. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst*. 1960;25:85-109.
12. Rieder H, Ludwig WD, Gassmann W et al. Prognostic significance of additional chromosome abnormalities in adult patients with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 1996;95:678-691.
13. Babicka L, Zemanova Z, Pavlistova L et al. Complex chromosomal rearrangements in patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006;168:22-29.
14. Abelson HT, Rabstein LS. Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Res*. 1970;30:2213-2222.
15. Hantschel O, Nagar B, Guettler S et al. A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl. *Cell*. 2003;112:845-857.
16. Collins S, Coleman H, Groudine M. Expression of bcr and bcr-abl fusion transcripts in normal and leukemic cells. *Mol Cell Biol*. 1987;7:2870-2876.
17. Gleissner B, Gökbuget N, Bartram CR 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*. 2002;99:1536-1543.
18. Burmeister T, Schwartz S, Bartram CR, Gökbuget N, Hoelzer D, Thiel E. Patients' age and BCR-ABL frequency in adult B-precursor ALL: a retrospective analysis from the GMALL study group. *Blood*. 2008;112:918-919.
19. Burmeister T, Schwartz S, Taubald A et al. Atypical BCR-ABL mRNA transcripts in adult acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2007;92:1699-1702.
20. Castor A, Nilsson L, Astrand-Grundstrom I et al. Distinct patterns of hematopoietic stem cell involvement in acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med*. 2005;11:630-637.
21. Wassmann B, Pfeifer H, Gökbuget N et al. Alternating versus concurrent schedules of imatinib and chemotherapy as front-line therapy for Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL). *Blood*. 2006;108:1469-1477.
22. de Labarthe A, Rousselot P, Huguët-Rigal F et al. Imatinib combined with induction or consolidation chemotherapy in patients with de novo Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: results of the GRAAPH-2003 study. *Blood*. 2007;109:1408-1413.
23. Yanada M, Takeuchi J, Sugiura I et al. High complete remission rate and promising outcome by combination of imatinib and chemotherapy for newly diagnosed BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia: a phase II study by the Japan Adult Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*. 2006;24:460-466.
24. Demiroglu A, Steer EJ, Heath C et al. The t(8;22) in chronic myeloid leukemia fuses BCR to FGFR1: transforming activity and specific inhibition of FGFR1 fusion proteins. *Blood*.

- 2001;98:3778-3783.
25. Safley AM, Sebastian S, Collins TS et al. Molecular and cytogenetic characterization of a novel translocation t(4;22) involving the breakpoint cluster region and platelet-derived growth factor receptor-alpha genes in a patient with atypical chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004;40:44-50.
  26. Griesinger F, Hennig H, Hillmer F et al. A BCR-JAK2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11.2) translocation in a patient with a clinically typical chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;44:329-333.
  27. Keung YK, Beaty M, Steward W, Jackle B, Pettnati M. Chronic myelocytic leukemia with eosinophilia, t(9;12)(q34;p13), and ETV6-ABL gene rearrangement: case report and review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet*. 2002;138:139-142.
  28. Bauml J, Szuhai K, Falkenburg JH, van Schie ML, Ottmann OG, Nijmeijer BA. Establishment and cytogenetic characterization of a human acute lymphoblastic leukemia cell line (ALL-VG) with ETV6/ABL1 rearrangement. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008;185:37-42.
  29. Raanani P, Trakhtenbrot L, Rechavi G et al. Philadelphia-chromosome-positive T-lymphoblastic leukemia: acute leukemia or chronic myelogenous leukemia blastic crisis. *Acta Haematol*. 2005;113:181-189.
  30. Barbouti A, Stankiewicz P, Nusbaum C et al. The breakpoint region of the most common isochromosome, i(17q), in human neoplasia is characterized by a complex genomic architecture with large, palindromic, low-copy repeats. *Am J Hum Genet*. 2004;74:1-10.
  31. Fioretos T, Strombeck B, Sandberg T et al. Isochromosome 17q in blast crisis of chronic myeloid leukemia and in other hematologic malignancies is the result of clustered breakpoints in 17p11 and is not associated with coding TP53 mutations. *Blood*. 1999;94:225-232.
  32. Mullighan CG, Miller CB, Radtke I et al. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature*. 2008;453:110-114.
  33. Milne TA, Briggs SD, Brock HW et al. MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell*. 2002;10:1107-1117.
  34. Nakamura T, Mori T, Tada S et al. ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell*. 2002;10:1119-1128.
  35. Meyer C, Schneider B, Jakob S et al. The MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia*. 2006;20:777-784.
  36. Elia L, Mancini M, Moleti L et al. A multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction strategy for the diagnostic molecular screening of chimeric genes: a clinical evaluation on 170 patients with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2003;88:275-279.
  37. Burmeister T, Marschalek R, Schneider B et al. Monitoring minimal residual disease by quantification of genomic chromosomal breakpoint sequences in acute leukemias with MLL aberrations. *Leukemia*. 2006;20:451-457.
  38. Moorman AV, Richards S, Harrison CJ. Involvement of the MLL gene in T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;100(6):2273-2274.
  39. Ludwig WD, Rieder H, Bartram CR et al. Immunophenotypic and genotypic features, clinical characteristics, and treatment outcome of adult pro-B acute lymphoblastic leukemia: results of the German multicenter trials GMALL 03/87 and 04/89. *Blood*. 1998;92:1898-1909.
  40. Gleissner B, Goekbuget N, Rieder H et al. CD10- pre-B acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a distinct high-risk subgroup of adult ALL associated with a high frequency of MLL aberrations: results of the German Multicenter Trials for Adult ALL (GMALL). *Blood*. 2005;106:4054-4056.
  41. Attarbaschi A, Mann G, Konig M et al. Mixed lineage leukemia-rearranged childhood pro-B and CD10-negative pre-B acute lymphoblastic leukemia constitute a distinct clinical entity. *Clin Cancer Res*. 2006;12:2988-2994.
  42. Schoch C, Schnittger S, Klaus M, Kern W, Hiddemann W, Haferlach T. AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood*. 2003;102:2395-2402.
  43. Jansen MW, Corral L, van der Velden VH et al. Immunobiological diversity in infant acute lymphoblastic leukemia is related to the occurrence and type of MLL gene rearrangement. *Leukemia*. 2007;21:633-641.
  44. Cimino G, Elia L, Mancini M et al. Clinico-biologic features and treatment outcome of adult pro-B-ALL patients enrolled in the GIMEMA 0496 study: absence of the ALL1/AF4 and of the BCR/ABL fusion genes correlates with a significantly better clinical outcome. *Blood*. 2003;102:2014-2020.
  45. Carroll AJ, Crist WM, Parmley RT, Roper M, Cooper MD, Finley WH. Pre-B cell leukemia associated with chromosome translocation 1;19. *Blood*. 1984;63:721-724.

46. Hunger SP, Galili N, Carroll AJ, Crist WM, Link MP, Cleary ML. The t(1;19)(q23;p13) results in consistent fusion of E2A and PBX1 coding sequences in acute lymphoblastic leukemias. *Blood*. 1991;77:687-693.
47. Kamps MP. E2A-Pbx1 induces growth, blocks differentiation, and interacts with other homeodomain proteins regulating normal differentiation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1997;220:25-43.
48. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008;371:1030-1043.
49. Vey N, Thomas X, Picard C et al. Allogeneic stem cell transplantation improves the outcome of adults with t(1;19)/E2A-PBX1 and t(4;11)/MLL-AF4 positive B-cell acute lymphoblastic leukemia: results of the prospective multicenter LALA-94 study. *Leukemia*. 2006;20:2155-2161.
50. Piccaluga PP, Malagola M, Rondoni M et al. Poor outcome of adult acute lymphoblastic leukemia patients carrying the (1;19)(q23;p13) translocation. *Leuk Lymphoma*. 2006;47:469-472.
51. Burmeister T, N G, Schwartz S, Hoelzer D, Thiel E. Outcome of Adult ALL Patients with Fusion Transcript E2A-PBX1: Results from the GMALL Therapy Trials 5/93 and 6/99. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2005;108: 1888.
52. Foa R, Vitale A, Mancini M et al. E2A-PBX1 fusion in adult acute lymphoblastic leukaemia: biological and clinical features. *Br J Haematol*. 2003;120:484-487.
53. Yamagata T, Maki K, Mitani K. Runx1/AML1 in normal and abnormal hematopoiesis. *Int J Hematol*. 2005;82:1-8.
54. Bohlander SK. ETV6: a versatile player in leukemogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2005;15:162-174.
55. Borkhardt A, Cazzaniga G, Viehmann S et al. Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica and the Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. *Blood*. 1997;90:571-577.
56. Aguiar RC, Sohal J, van Rhee F et al. TEL-AML1 fusion in acute lymphoblastic leukaemia of adults. M.R.C. Adult Leukaemia Working Party. *Br J Haematol*. 1996;95:673-677.
57. Raynaud S, Mauvieux L, Cayuela JM et al. TEL/AML1 fusion gene is a rare event in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1996;10:1529-1530.
58. Hoshino K, Asou N, Suzushima H et al. TEL/AML1 fusion gene resulting from a cryptic t(12;21) is uncommon in adult patients with B-cell lineage ALL and CML lymphoblastic transformation. *Int J Hematol*. 1997;66:213-218.
59. Shurtleff SA, Buijs A, Behm FG et al. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia*. 1995;9:1985-1989.
60. Hoelzer D, Ludwig WD, Thiel E et al. Improved outcome in adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1996;87:495-508.
61. Baak U, Gökbüget N, Orawa H 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*. 2008;22:1154-1160.
62. Pui CH, Williams DL, Raimondi SC et al. Hypodiploidy is associated with a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1987;70:247-253.
63. Harrison CJ, Moorman AV, Broadfield ZJ et al. Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2004;125:552-559.
64. Sutcliffe MJ, Shuster JJ, Sather HN et al. High concordance from independent studies by the Children's Cancer Group (CCG) and Pediatric Oncology Group (POG) associating favorable prognosis with combined trisomies 4, 10, and 17 in children with NCI Standard-Risk B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: a Children's Oncology Group (COG) initiative. *Leukemia*. 2005;19:734-740.
65. Moorman AV, Harrison CJ, Buck GA et al. Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood*. 2007;109:3189-3197.
66. Nachman JB, Heerema NA, Sather H et al. Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2007;110:1112-1115.
67. Whitehead VM, Vuchich MJ, Lauer SJ et al. Accumulation of high levels of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts from children with hyperdiploid (greater than 50 chromosomes) B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Blood*. 1992;80:1316-1323.
68. Kaspers GJ, Smets LA, Pieters R, Van Zantwijk CH, Van Wering ER, Veerman AJ. Favorable

- prognosis of hyperdiploid common acute lymphoblastic leukemia may be explained by sensitivity to antimetabolites and other drugs: results of an in vitro study. *Blood*. 1995;85:751-756.
69. Ito C, Kumagai M, Manabe A et al. Hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia with 51 to 65 chromosomes: a distinct biological entity with a marked propensity to undergo apoptosis. *Blood*. 1999;93:315-320.
  70. Paulsson K, Morse H, Fioretos T, Behrendtz M, Strombeck B, Johansson B. Evidence for a single-step mechanism in the origin of hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;44:113-122.
  71. Panzer-Grumayer ER, Fasching K, Panzer S et al. Nondisjunction of chromosomes leading to hyperdiploid childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia is an early event during leukemogenesis. *Blood*. 2002;100:347-349.
  72. Moorman AV, Richards SM, Martineau M et al. Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2003;102:2756-2762.
  73. Heerema NA, Sather HN, SENSEL MG et al. Prognostic impact of trisomies of chromosomes 10, 17, and 5 among children with acute lymphoblastic leukemia and high hyperdiploidy (> 50 chromosomes). *J Clin Oncol*. 2000;18:1876-1887.
  74. Mancini M, Scappaticci D, Cimino G et al. A comprehensive genetic classification of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of the GIMEMA 0496 protocol. *Blood*. 2005;105:3434-3441.
  75. Charrin C, Thomas X, Ffrench M et al. A report from the LALA-94 and LALA-SA groups on hypodiploidy with 30 to 39 chromosomes and near-triploidy: 2 possible expressions of a sole entity conferring poor prognosis in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood*. 2004;104:2444-2451.
  76. Attarbaschi A, Mann G, Konig M et al. Near-tetraploidy in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia is a highly specific feature of ETV6/RUNX1-positive leukemic cases. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006;45:608-611.
  77. Raimondi SC, Zhou Y, Shurtleff SA, Rubnitz JE, Pui CH, Behm FG. Near-triploidy and near-tetraploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia: association with B-lineage blast cells carrying the ETV6-RUNX1 fusion, T-lineage immunophenotype, and favorable outcome. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006;169:50-57.
  78. Aifantis I, Raetz E, Buonamici S. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:380-390.
  79. Weng AP, Ferrando AA, Lee W et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2004;306:269-271.
  80. Zhu YM, Zhao WL, Fu JF et al. NOTCH1 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia: prognostic significance and implication in multifactorial leukemogenesis. *Clin Cancer Res*. 2006;12:3043-3049.
  81. Grabher C, von Boehmer H, Look AT. Notch 1 activation in the molecular pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:347-359.
  82. Ferrando AA, Look AT. Gene expression profiling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*. 2003;40:274-280.
  83. Nam CH, Rabbitts TH. The role of LMO2 in development and in T cell leukemia after chromosomal translocation or retroviral insertion. *Mol Ther*. 2006;13:15-25.
  84. Dik WA, Nadel B, Przybylski GK et al. Different chromosomal breakpoints impact the level of LMO2 expression in T-ALL. *Blood*. 2007;110:388-392.
  85. Baldus CD, Martus P, Burmeister T et al. Low ERG and BAALC expression identifies a new subgroup of adult acute T-lymphoblastic leukemia with a highly favorable outcome. *J Clin Oncol*. 2007;25:3739-3745.
  86. Tafuri A, Gregorj C, Petrucci MT et al. MDR1 protein expression is an independent predictor of complete remission in newly diagnosed adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002;100:974-981.
  87. Huh HJ, Park CJ, Jang S et al. Prognostic significance of multidrug resistance gene 1 (MDR1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) mRNA expression in acute leukemia. *J Korean Med Sci*. 2006;21:253-258.
  88. Swerts K, De Moerloose B, Dhooge C, Laureys G, Benoit Y, Philippe J. Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer*. 2006;42:295-309.
  89. Hahn PJ. Molecular biology of double-minute chromosomes. *BioEssays*. 1993;15:477-484.
  90. Graux C, Cools J, Melotte C et al. Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2004;36:1084-1089.
  91. Boxer LM, Dang CV. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene*.

- 2001;20:5595-5610.
92. Hummel M, Bentink S, Berger H et al. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med.* 2006;354:2419-2430.
  93. Burmeister T, Schwartz S, Horst HA et al. Molecular heterogeneity of sporadic adult Burkitt-type leukemia/lymphoma as revealed by PCR and cytogenetics: correlation with morphology, immunology and clinical features. *Leukemia.* 2005;19:1391-1398.
  94. Harris NL, Jaffe ES, Stein H et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood.* 1994;84:1361-1392.
  95. Diebold J, Jaffe ES, Raffael M, Warnke RA. Burkitt lymphoma. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. *Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* Lyon: IARC Press; 2001. p. 181-185.
  96. Burmeister T, Macleod RA, Reinhardt R et al. A novel sporadic Burkitt lymphoma cell line (BLUE-1) with a unique t(6;20)(q15;q11.2) rearrangement. *Leuk Res.* 2006;30:1417-1423.
  97. Burmeister T, Gökbuget N, Reinhardt R, Rieder H, Hoelzer D, Schwartz S. NUP214-ABL1 in adult T-ALL: the GMALL study group experience. *Blood.* 2006;108:3556-3559.
  98. von Lindern M, Fornerod M, Soekarman N et al. Translocation t(6;9) in acute non-lymphocytic leukaemia results in the formation of a DEK-CAN fusion gene. *Baillieres Clin Haematol.* 1992;5:857-879.
  99. Stergianou K, Fox C, Russell NH. Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-ALL--implications for treatment. *Leukemia* 2005;19(9):1680-1681.
  100. De Keersmaecker K, Rocnik JL, Bernad R et al. Kinase activation and transformation by NUP214-ABL1 is dependent on the context of the nuclear pore. *Mol Cell.* 2008;31:134-142.
  101. Bernard OA, Busson-LeConiat M, Ballerini P et al. A new recurrent and specific cryptic translocation, t(5;14)(q35;q32), is associated with expression of the Hox11L2 gene in T acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2001;15:1495-1504.
  102. Hatano M, Roberts CW, Minden M, Crist WM, Korsmeyer SJ. Deregulation of a homeobox gene, HOX11, by the t(10;14) in T cell leukemia. *Science.* 1991;253:79-82.
  103. Takatsuki K. Discovery of adult T-cell leukemia. *Retrovirology.* 2005;2:16.
  104. Gallo RC. The discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology.* 2005;2:17.
  105. Wolfe ND, Heneine W, Carr JK et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:7994-7999.
  106. Mahieux R, Gessain A. The human HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses: New members of the HTLV family. *Pathol Biol (Paris).* 2008
  107. Calattini S, Chevalier SA, Duprez R et al. Human T-cell lymphotropic virus type 3: complete nucleotide sequence and characterization of the human tax3 protein. *J Virol.* 2006;80:9876-9888.
  108. Burmeister T, Schwartz S, Hummel M, Hoelzer D, Thiel E. No genetic evidence for involvement of Deltaretroviruses in adult patients with precursor and mature T-cell neoplasms. *Retrovirology.* 2007;4:11.

## 5. Danksagung

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Arbeiten hätten ohne Unterstützung vieler Personen und Institutionen nicht zustande kommen können. Ihnen sei an dieser Stelle Dank ausgesprochen.

Den Mitarbeitern des Molekulargenetischen Labors, darunter ganz besonders Frau Mara Molkentin, bin ich für ihre gute und zuverlässige Arbeit zu großen Dank verpflichtet.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich den Förderorganisationen der Wissenschaft, die mir die Finanzierung meiner Forschungsprojekte ermöglicht haben, namentlich der Deutschen Krebshilfe, der Deutschen José Carreras Leukämienstiftung, der Berliner Krebsgesellschaft, der Alfred und Angelika Gutermuth-Stiftung, der Charité Forschungsförderung und dem BMBF. Ohne diese Förderung hätte der Großteil der hier vorgestellten und weiterer Arbeiten nicht durchgeführt werden können.

Ich danke meinen wissenschaftlichen Kooperationspartnern, insbesondere Prof. Dr. Rolf Marschalek (Stellv. Direktor des Instituts für Pharmazeutische Biologie der Universität Frankfurt/Main), seinem Mitarbeiter Dr. Claus Meyer (Frankfurt) und Dr. Richard Reinhardt (Max Planck-Institut für Molekulare Genetik Berlin-Dahlem) für die jahrelange gute und stets freundschaftliche Zusammenarbeit.

Dem Leiter der Deutschen Therapiestudiengruppe für die akute lymphatische Leukämie des Erwachsenenalters (GMALL), Herrn Prof. Dr. Dieter Hoelzer (Frankfurt) danke ich für das in mich gesetzte Vertrauen sowie für das freundliche Wohlwollen, das er meinen Arbeiten entgegengebracht hat.

Last but not least danke ich sehr allen hier ungenannten Freunden und Familienangehörigen, insbesondere meinen Eltern, die mir meine Ausbildung ermöglicht haben, für Unterstützung, Rat und Hilfe.

## 6. Erklärung

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

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, im September 2008

.....

T. Burmeister