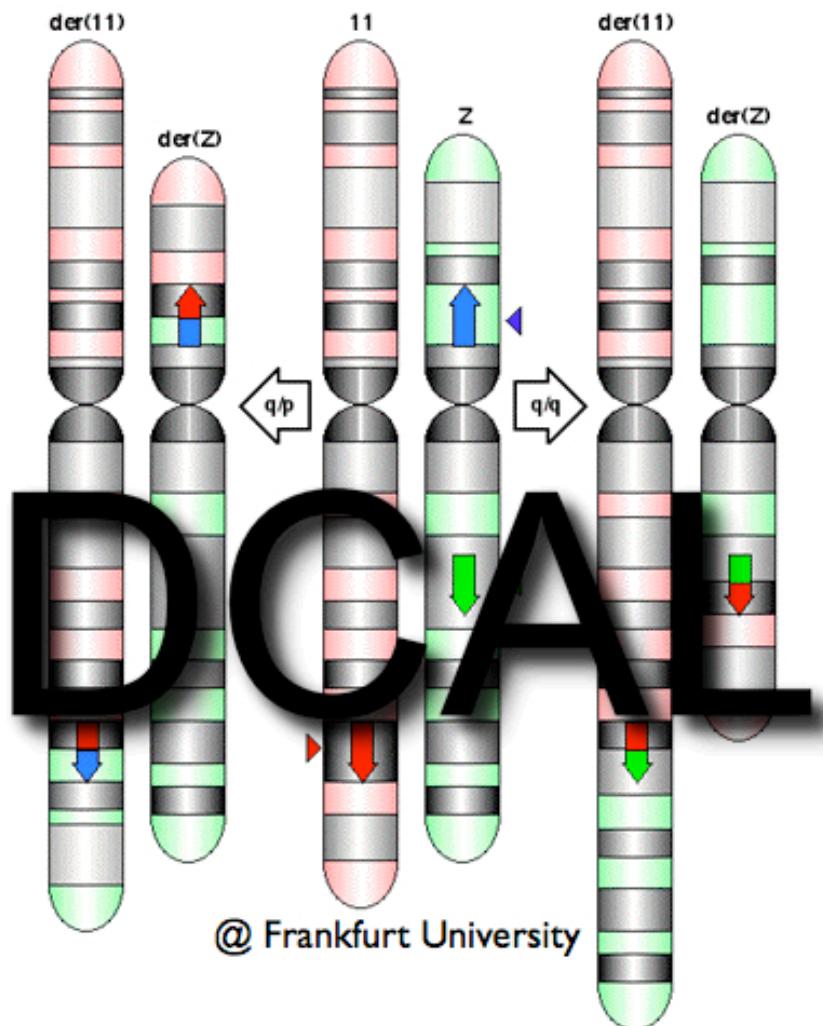


DCAL



BY

Prof. Dr. Rolf Marschalek

Institute Pharmaceutical Biology

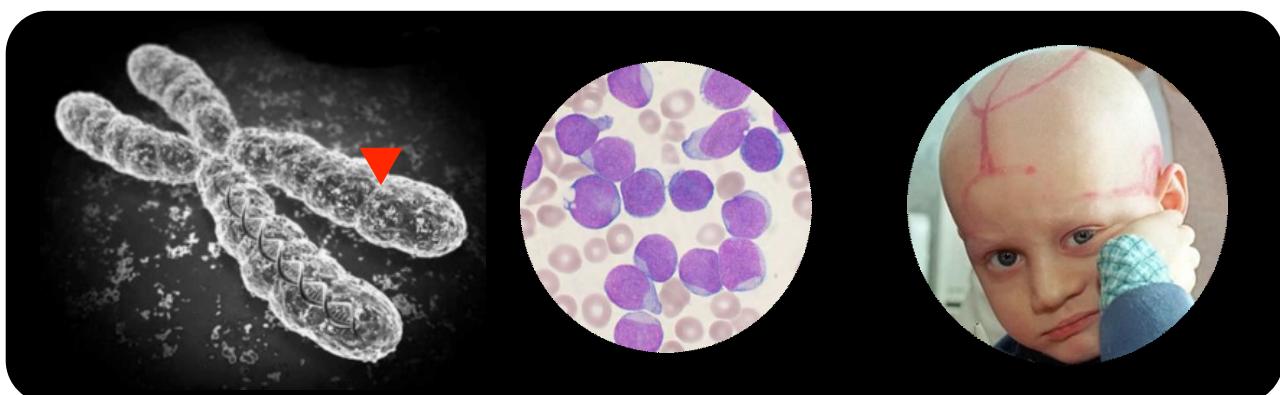


The reason for DCAL ?

Leukemia is a highly malignant disease of the hematopoietic system. The prognosis for the majority of affected patients is quite good because the overall survival rate is in the range of 50-80%, however, there exists some exceptions.

The prognosis of a given leukemia patients depends on the genetic changes that occurred in his leukemia cells. Most leukemias are caused by specific „chromosomal translocations“. These illegitimate recombination events arise by a severe DNA damage situation and the subsequent DNA repair processes; in most of these cases, chromosome parts are exchanged in a reciprocal manner, and result in the creation of so-called „fusion genes“ at the joining sites of the newly generated „derivative chromosomes“. These „fusion genes“ fuse the open reading frames of two unrelated genes which are then translated into oncogenic „fusion proteins“. Such „fusion genes“ and their subsequently translated „fusion proteins“ can be diagnosed in the biosied cells of leukemia patients. Depending on what kind of genetic changes occurred in a given leukemia patient, patients are categorized into specific risk groups that dictate the kind of treatment applied to a patient. Based on our accumulating knowledge, the presence of a specific gene fusion predicts also the outcome of a patient. Therefore, it is quite important and should be mandatory to diagnose precisely the genetic changes that occurred in the tumor cells of each leukemia patient.

A highly specific group of leukemia patients is associated with very poor outcome. This patient group is characterized by recombination events affecting of the MLL gene that is localized at chromosome 11, band q23. This group is clinically classified as high risk acute leukemia patients and requires, due to the very aggressive behavior of the tumor cells, a high amount of chemotherapeutic agents for treatment (about 100-fold more than normally applied). Despite these treatment modalities, the prognosis is still poor (OS = 10-50%). The reason for the high variability in outcome is the fact that more than 100 different MLL rearrangements have been identified in the last 2 decades of which 60% can be found as recurrent events in different leukemia patients. Thus, risk stratification and outcome depend on the translocated sequences that are fused to the MLL gene fragments. Therefore, the precise analysis of the genetic events in the leukemic cells of leukemia patients is on one hand a very important information for the leukemia patients itself, but on the other hand also for the clinician who is treating the leukemia patient. What is also important: most leukemic diseases are associated with the age of patients. In case of MLL rearrangements it is exactly the opposite: it mostly affects newborns and early childhood patients.



Our diagnostic procedure

The basis of our diagnostic work is a method that has been invented by Prof. Marschalek when he moved to the Frankfurt University. This idea has been subsequently tested and optimized, and finally, applied to „practice“. This work has been done by Dr. Claus Meyer and co-workers over several years and is the basis for our success at the DCAL.

The DNA of a leukemic cell bears about 6 billion basepairs in which we need to determine the precise nucleotide sequence of the chromosomal fusion sites. How can this be achieved. Obviously, it reminds us to find a needle in a haystack?

Our diagnostic method is combining modern laboratory technologies with mathematical probability. Briefly, we digest the complete genome of a leukemic cell into smaller pieces (about 750.00 per genome with an average size of 4.000 bp). All these genomic DNA fragments were then converted in DNA circles by self-ligation. We then use specific oligonucleotides, binding exactly to 2 out of these 750.000 DNA circles and perform a PCR reaction to amplify them. Pairs of oligonucleotides can be chosen for those 2 DNA circles where we (1) assume that the recombination event had occurred, and (2) expect to find the novel fusion genes. The products of the PCR reactions are subsequently analyzed via agarose gels, together with a series of internal controls. In case of the presence of a specific chromosomal translocation, additional DNA bands become visible that derive from length-polymorphic DNA circles. These arbitrary DNA amplifiers were then isolated from the gel and sequenced. This procedure allows us to determine precisely the DNA sequence of chromosomal fusion sites. Next, we compare the obtained DNA sequence with the publically available human genome sequence to identify exactly the two genes which are involved in the recombination event of an individual leukemia patient.

We have diagnosed in the past 5 years more than 1.200 leukemia patients that carry MLL-translocations. In all these cases, we have been able to determine the chromosomal fusion sites. Within this group of leukemia patients, we have discovered 30 novel MLL fusion alleles that were yet unknown. So far, about 70 MLL fusions have been characterized at the molecular level. Based on data present in the literature and our own data, we currently estimate the number of MLL fusions to more than 100.



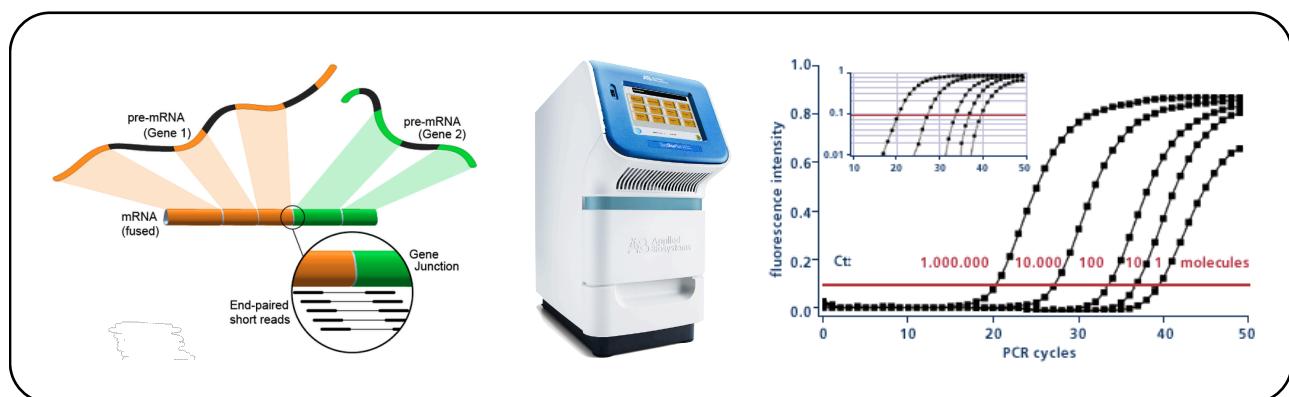
Who is profiting ?

The established fusion gene sequences are unique for each analyzed leukemia patient. Chromosomal fusion sites are single-copy sequences in the tumor cells, and lack in normal somatic cells of the same patient. Therefore, these patient-specific DNA sequences represent „biomarkers“ that can be used to identify and trace „residual tumor“ cells with high specificity during and after treatment. This type of analysis is named „minimal residual disease (MRD) analysis“ and provides important informations about the efficacy of the applied treatment. The biomarkers established at the DCAL for individual leukemia patients are currently being used in prospective studies to evaluate their clinical importance. Preliminary data from such studies suggest that these biomarkers are highly robust and sensitive enough to allow the detection of residual tumor cells with very good quality.

For this purpose of MRD studies, bone marrow biopsies are carried at distinct timepoint during and after therapy. DNA will be isolated from these cells and a small fraction of this isolated DNA is then analyzed with two primers specifically detecting the patient-specific gene fusion. A control reaction is analyzed in parallel to calculate the total amount of tested genomic DNA. A comparison between both reactions allows to compare and calculate the amount of detectable gene fusions by quantitative PCR. This type of technique allows to precisely quantify the number of residual tumor cells present in a patient sample at a certain timepoint during or after therapy. Since tumor cells disappear rapidly during treatment, sensitivity of these diagnostic PCR reactions is quite important. According to the experience of our clinical colleagues, single tumor cells can be robustly identified within 10.000 to 100.000 normal cells.

These read-outs allows to continuously surveil their tumor patients and to monitor a molecular relapse even long before signs of clinical relapse appear. This allows clinicians to react very early on relapses and to initiate additional treatments.

These new possibilities have dramatically improved the treament options for clinicians. At least for those leukemia patients that suffers from MLL translocations, these novel diagnostic techniques are clearly helping to improve the outcome of patients. Since 2009, prospective studies have been initiated all over in Europe. In these studies, biomarkers of the Frankfurt DCAL are used to improve the treatment of these high-risk acute leukemia patients.



How much does it cost ?



In principle, a single analysis for a leukemia patients costs about 180 Euro for material and enzymes. The costs for personnel is not included in this calculation. Since the foundation of the DCAL, we offer this type of service for ethical reasons at a cost-free basis to all clinicians and study centers. This ensures that also colleagues from less rich countries have a fair condition to benefit from our services. On the other hand, the DCAL benefits from the many collaborative publications and the implementation of

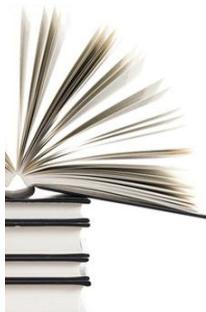
the Frankfurt DCAL as a key unit for modern cancer therapy. So far, we got funding from the Wilhelm-Sander Stiftung (Munich) and the German Cancer Aid (Bonn). Additional support, e.g. by funding the personnel, comes from the Institute of Pharmaceutical Biology.

The financial situation of the Frankfurt DCAL (until 15. March 2011):

| Personel | Costs | Sum |
|---|----------|-----------|
| Dr. Claus Meyer (Head of Unit) | 60,000 € | |
| Dr. Eric Kowarz (Post-doc) | 60,000 € | |
| Julia Hofmann (Techn. Assist.) | 40,000 € | 160,000 € |
| Support by the German Cancer Aid eV | | |
| Dr. Eric Kowarz (Post-doc) | 60,000 € | |
| Requested funding * | | |
| | | 100,000 € |
| Amount of Analysis per year | Costs | Sum |
| 300 patients | 180 € | 54,000 € |
| Support by the German Cancer Aid eV | | |
| Supply money | 15,000 € | |
| Requested funding * | | |
| | | 39,000 € |
| Total amount of requested funding per year * | | |
| | | 139,000 € |

* currently paid by the Goethe-University / Institute of Pharmaceutical Biology

Our success



Success in science has always been measured by scientific output. This output is listed below. In addition, we are proud of the identification of 30 novel cancer fusion genes which represents about 40% of all yet known MLL gene fusions that have been identified over the last 2 decades in many different labs around the world. Moreover, we have identified a novel gene fusion in a Lynch syndrome family, and a novel gene fusion in polycytic astrocytomas. The scientific output of the DCAL also summarizes the successful collaboration with many colleagues around the world.

2005

Meyer C, Schneider B, Reichel M, Angermüller S, Strehl S, Schnittger S, Schoch C, Jansen, MJC, van Dongen JJ, Pieters R, Haas OA, Dingermann T, Klingebiel T, Marschalek R (2005). A new diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 449-454.

Teuffel O, Betts DR, Thali M, Eberle D, Meyer C, Schneider B, Marschalek R, Trakhtenbrot L, Amariglio N, Niggli FK, Schäfer BW (2005). Clonal expansion of a new MLL rearrangement in the absence of leukemia. *Blood* **105**, 4151-4152.

2006

Burmeister T, Marschalek R, Schneider B, Meyer C, Gökbüget N, Schwartz S, Hoelzer D, Thiel E (2006). Monitoring minimal residual disease by quantification of genomic chromosomal breakpoint sequences in acute leukemias with MLL aberrations. *Leukemia* **20**, 451-457.

Meyer C, Schneider B, Jakob S, Strehl S, Schnittger S, Schoch C, Jansen MWJC, van Dongen JJM, den Boer ML, Pieters R, Ennas MG, Angelucci E, Koehl U, Greil J, Griesinger F, zur Stadt U, Eckert C, Szczepanski T, Niggli FK, Schäfer BW, Kempski H, Brady HJM, Trka J, Lo Nigro L, Biondi A, Delabesse E, Macintyre E, Stanulla M, Schrappe M, Haas OA, Burmeister T, Dingermann T, Klingebiel T, Marschalek R (2006). The MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* **20**, 777-784.

Burjanivova T, Madzo J, Muzikova K, Meyer C, Schneider B, Votava F, Marschalek R, Stary J, Trka J, Zuna J (2006). Prenatal origin of childhood AML occurs less frequently than in childhood ALL. *BMC Cancer* **6**, 100.

Attarbaschi A, Mann G, König M, Steiner M, Strehl S, Schneider B, Schreiberhuber A, Borkhardt A, Marschalek R, Pickl W, Lion T, Gadner H, Haas OA, Dworzak M; on behalf of the Austrian Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) Cooperative Study Group (2006). MLL-involving translocations predominantly occur in CD10-/CDw65+/CD15+ childhood pro-B and pre-B acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Clin Cancer Res* **12**, 2988-2994.

Meyer C, Kowarz E, Schneider B, Oehm C, Klingebiel T, Dingermann T, Marschalek R (2006). Genomic DNA of leukemia patients: target for clinical diagnosis of MLL rearrangements. *Biotechnol J* **1**, 656-663.

Strehl S, Koenig M, Meyer C, Schneider B, Harbott J, Jäger U, von Bergh A, Loncarevic I, Jarosova M, Schmidt H, Moore SDP, Marschalek R, Haas OA (2006). Molecular dissection of t(11;17) in acute myeloid leukemia reveals a variety of gene fusions with heterogeneous fusion transcripts and multiple splice variants. *Genes Chrom Cancer* **45**, 1041-11049.

2007

Meyer C, Burmeister T, Strehl, Zach O, Schneider B, Haas OA, Klingebiel T, Dingermann T, Marschalek R (2007). Spliced MLL fusions: a novel mechanism to generate functional chimaeric MLL•MLLT1 transcripts in t(11;19)(q23;p13.3) leukaemia. *Leukemia* **21**, 588-590.

Jansen MWJC, Corral L, van der Velden VHJ, Panzer-Grümayer R, Schrappe M, Schrauder A, Marschalek R, Meyer C, den Boer ML, Hop WJC, Basso G, Biondi A, Pieters R, van Dongen JJM (2007). Immunobiological diversity in infant acute lymphoblastic leukemia is related to the occurrence and type of MLL gene rearrangement. *Leukemia* **21**, 633-641.

Kowarz E, Burmeister T, Nigro LL, Jansen MWJC, Delabesse E, Klingebiel T, Dingermann T, Meyer C, Marschalek R (2007). Complex MLL rearrangements in MLL•AF4+/AF4•MLL- leukemia patients conceal the presence of reciprocal MLL fusion genes. *Leukemia* **21**, 1232-1238.

Zuna J, Cavé H, Eckert E, Szczepanski T, Meyer C, Mejstrikova E, Fronkova E, Muzikova K, Clappier E, Mendelova D, Boutard P, Schrauder A, Sterba J, Marschalek R, van Dongen JJM, Hrusak O, Stary J, Jan Trka J (2007). Childhood Secondary ALL after ALL Treatment. *Leukemia* **21**:1431-1435.

Choi WT, Folsom MR, Azim MF, Meyer C, Kowarz E, Marschalek R, Timchenko NA, Naeem RC, Lee DA (2007). CEBP-beta suppression by interuption of CUGBP1 resulting from a complex rearrangement of MLL. *Cancer Genet Cytogenet* **177**, 108-114.

2008

Metzler M, Staeger MS, Harder L, Mendelova D, Zuna J, Frankova E, Meyer C, Flohr T, Bednarova D, Harbott J, Langer T, Gesk S, Trka J, Siebert R, Marschalek R, Niemeyer C, Rascher W (2008). Inv(11)(q21q23) Fuses MLL to the NOTCH Co-Activator Mastermind-Like 2 in Secondary T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leukemia* **22**, 1807-1811.

Soler G, Radford I, Meyer C, Marschalek R, Brouzes C, Ghez D, Romana S, Berger R (2008). MLL insertion with MLL-MLLT3 gene fusion in acute leukemia: case report and review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet* **183**, 53-59.

Burmeister T, Meyer C, Thiel G, Reinhardt R, Thiel E, Marschalek R (2008). A *MLL-KIAA0284* fusion gene in a patient with secondary acute myeloid leukemia and t(11;14)(q23;q32). *Blood Cells Mol Dis* **41**, 210-214.

Marschalek R (2008). Etoposide-treatment and MLL rearrangements. *Eur J Haematol* **81**, 481-482.

2009

Zuna J, Burjanivova T, Mejstrikova E, Zemanova Z, Muzikova K, Meyer C, Horsley SW, Kearney K, Colman S, Ptozskova H, Marschalek R, Hrusak O, Stary J, Greaves M, Trka J (2009). Covert pre-leukaemia driven by MLL gene fusion. *Gene Chrom Cancer* **48**, 98-107.

De Braekeleer E, Meyer C, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris M-J, Marschalek R, Férec C, De Braekeleer M (2009). A complex 1;19;11 translocation involving the MLL gene in a patient with congenital acute monoblastic leukemia identified by molecular and cytogenetic techniques. *Ann Hematol* **88**, 795-797.

Burmeister T, Meyer C, Schwartz S, Hofmann J, Molkentin M, Hubert D, Schneider B, Raff T, Reinhardt R, Gökbüget N, Hoelzer D, Thiel E, Marschalek R (2009). The *MLL* recombinome of adult acute lymphoblastic leukemia – results from the GMALL study group. *Blood* **113**, 4011-4015.

Meyer C, Brieger A, Plotz G, Weber N, Passmann S, Dingermann T, Zeuzem S, Trojan J, Marschalek R (2009). An Interstitial Deletion at 3p21.3 Results in the Genetic Fusion of MLH1 and ITGA9 in a Lynch Syndrome Family. *Clin Cancer Res* **15**, 762-769.

Van der Velden VH, Corral L, Valsecchi MG, Jansen MW, De Lorenzo P, Cazzaniga G, Panzer-Grümayer ER, Schrappe M, Schrauder A, Meyer C, Marschalek R, Nigro LL, Metzler M, Basso G, Mann G, Den Boer ML, Biondi A, Pieters R, Van Dongen JJM (2009). Prognostic significance of minimal residual disease in infants with acute lymphoblastic leukemia treated within the Interfant-99 protocol. *Leukemia* **23**, 1073-1079.

De Braekeleer E, Lanotto JC, Douet-Guilbert N, Meyer C, Le Bris MJ, Marschalek R, Berthou C, Férec C, De Braekeleer M (2009). A second case of secondary acute myeloblastic leukemia associated with the MLL-KIAA0284 fusion gene. *Blood Cells Mol Dis* **42**, 292-293.

Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, Renneville A, Zuna J, Trka J, Ben Abdelali R, Macintyre E, De Braekeleer E, De Braekeleer M, Delabesse E, Pombo de Oliveira M, Cavé H, Clappier E, van Dongen JJM, Balgobind BV, van den Heuvel-Eibrink MM, Beverloo HB, Panzer-Grümayer R, Teigler-Schlegel A, Harbott J, Kjeldsen E, Schnittger S, Koehl U, Gruhn B, Heidenreich O, Chan LC, Yip SF, Krzywinski M, Eckert C, Möricke A, Schrappe M, Alonso CN, Schäfer BW, Krauter J, Lee DA, zur Stadt U, Te Kronnie G, Sutton R, Izraeli S, Trakhtenbrot L, Lo Nigro L, Tsaur G, Fechina L, Szczepanski T, Strehl S, Ilencikova D, Molkentin M, Burmeister T, Dingermann T, Klingebiel T, Marschalek R (2009). New insights into the *MLL* recombinome of acute leukemias. *Leukemia* **23**, 1490-1499.

Meyer C, Marschalek R (2009). LDI-PCR: Identification of known and unknown gene fusions of the human *MLL* gene (book chapter). *Methods Mol Biol* **538**: 71-83.

Derwich K, Sedek L, Meyer C, Pieczonka A, Dawidowska M, Gaworczyk A, Wachowiak J, Konatkowska B, Witt M, Marschalek R, Szczepanski T (2009). Infant acute bilineal leukemia. *Leuk Res* **33**, 1005-1008.

Krauter J, Wagner K, Schäfer I, Marschalek R, Meyer C, Heil G, Schaich M, Ehninger G, Niederwieser D, Krahl R, Büchner T, Sauerland C, Schlegelberger B, Döhner K, Döhner H, Schlenk R, Ganser A (2009). Prognostic factors in adult patients up to 60 years with AML and translocations of chromosome band 11q23:

D I A G N O S T I C C E N T E R
of Acute Leukemia

Individual patient data based meta-analysis of the German AML-Intergroup. *J Clin Oncology* **27**, 3000-3006.

Balgobind BV, Zwaan CM, Meyer C, Marschalek R, van Galen JF, van Drunen E, Pieters R, Beverloo HB, van den Heuvel-Eibrink M (2009). NRIP3: A novel translocation partner of MLL detected in a pediatric AML with complex chromosome 11 rearrangements. *Haematologica* **94**, 1033.

De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Meyer C, Marschalek R, Férec C, De Braekeleer M (2009). FLNA, a new partner gene fused to MLL in a patient with acute myelomonoblastic leukemia. *Br J Haematol* **146**, 693-695.

Park TS, Lee S-G, Song J, Lee K-A, Kim J, Choi TL, Marschalek R, Meyer C (2009). CASP8AP2: A novel partner gene of MLL rearrangement with t(6;11)(q15;q23) in acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* **195**, 94-95.

Röhrs S, Dirks WG, Meyer C, Marschalek R, Scherr M, Slany R, Wallace A, Drexler HG, Quentmeier H (2009). Hypomethylation and expression of *BEX2*, *IGSF4* and *TIMP3* indicative of MLL translocations in Acute Myeloid Leukemia. *Mol Cancer* **8**, 86.

2010

Lee SG, Park TS, Wonc SC, Song J, Lee KA, Choi JR, Marschalek R, Meyer C (2010). Three-way translocation involving MLL, MLLT1, and new third partner, NRXN1 in a patient with acute lymphoblastic leukemia with t(2;19;11)(p12;p13.3;q23). *Cancer Genet Cytogenet* **197**, 32-38.

De Braekeleer E, Meyer C, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Berthou C, Arnaud B, Marschalek R, Férec C, De Braekeleer M (2010). Complex and cryptic chromosomal rearrangements involving the MLL gene in acute leukemia: a study of 7 patients. *Blood Cell Mol Disease* **44**, 268-274.

Marschalek R (2010). Mixed lineage leukemias: roles in human malignancies and potential therapy. *FEBS J* **277**, 1822-1831.

Coser V, Meyer C, Basegio R, Menezes J, Marschalek R, Pombo-de-Oliveira MS (2010). Nebulette is the second member of the Nebulin family fused to the MLL gene in infant leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* **198**, 151-154.

Hutter C, Attarbaschi, Fischer S, Meyer C, Dworzak M, König M, Marschalek R, Mann G, Haas OA, Panzer-Grümayer ER (2010). Acute monocytic leukaemia originating from MLL-MLLT3-positive pre-B cells. *Br J Haematol* **150**, 621-623.

De Braekeleer E, Meyer C, Le Bris MJ, Douet-Guilbert N, Basinko A, Morel F, Berthou C, Marschalek R, Férec C, De Braekeleer M (2010). Identification of an MLL-MLLT4 fusion gene resulting from a t(6;11)(q27;q23) presenting as a del(11q) in a child with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* **51**, 1570-1573.

Zuna J, Zaliova M, Muzikova K, Meyer C, Lizcova L, Zemanova Z, Votava F, Marschalek R, Stary J, Trka J (2010). Acute leukaemias with TEL/ABL fusion define a novel subgroup with poor prognosis and prenatal origin. *Genes Chrom Cancer* **9**, 873-884.

Alonso CN, Gallego MS, Rossi JG, Mansini AP, Rubio PL, Meyer C, Marschalek R, Felice MS. BTBD18: a novel MLL partner gene in an infant with acute lymphoblastic leukemia and inv(11)(q13;q23). *Leuk Res* **34**, e294-296.

Balgobind BV, Zwaan CM, Reinhardt D, Arentsen-Peters TJCM, Hollink IHIM, de Haas V, Kaspers GJL, de Bont ESJM, Baruchel A, Stary J, Meyer C, Marschalek R, Creutzig U, Pieters R, Van den Heuvel-Eibrink MM (2010). High BRE expression in pediatric MLL-rearranged AML is associated with favorable outcome. *Leukemia* **24**, 2048-2055.

Cerveira N, Meyer C Santos J, Torres L, Lisboa S, Pinheiro M, Bizarro S, Correia C, Norton L, Marschalek R, Teixeira MR (2010). A Novel spliced fusion of MLL with CT45A2 in a pediatric biphenotypic acute leukemia. *BMC Cancer* **10**, 518.

Kim MJ, Choa SY, Kima MH, Leeb JJ, So Young Kanga SY, Choc EH, Huhd J, Yoone HJ, Parka TS, Leea WI, Marschalek R, Meyer C (2010). FISH-negative cryptic PML-RARA rearrangement detected by long distance-polymerase chain reaction and sequencing analyses: A case study and review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet* **203**, 278-283.

Bielorai B, Meyer C, Trakhtenbrot L, Izraeli S, Marschalek R, Toren A. Therapy-related acute myeloid leukemia with translocation (2;11)(q37;q23) after treatment for osteosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* **203**, 288-291.

2011

Coenen EA, Zwaan CM, Meyer C, Marschalek R, Pieters R, Beverloo HB and van den Heuvel-Eibrink MM (2010). KIAA1524: a novel MLL translocation partner in AML. *Leuk Res* **35**, 133-115.

Marschalek R (2011). Mechanisms of leukemogenesis by MLL fusion proteins. *Br J Haematol* **152**, 141-154.

D I A G N O S T I C C E N T E R
of Acute Leukemia

Kuipers JE, Coenen EA, Balgobind BV, Stary J, Baruchel A, de Haas V, de Bont ES, Reinhardt D, Kaspers GJ, Cloos J, Danen-van Oorschot AA, den Boer ML, Marschalek R, Meyer C, Pieters R, Zwaan CM, van den Heuvel-Eibrink MM (2011). High IGSF4 expression in pediatric AML M5 with t(9;11). *Blood* **117**, 928-935.

Zaliova M, Meyer C, Cario G, Marschalek R, Stary J, Zuna J, Trka R (2011). TEL/AML1-positive patients lacking TEL exon 5 resemble canonical TEL/AML1 cases. *Pediatric Blood Cancer* **56**, 217-225.

Kuster L, Kaindl U, Fuka G, Krapf G, Inthal A, Mann G, Kauer M, Rainer J, Kofler R, Hall A, Metzler M, Meyer C, Harbott J, Marschalek R, Strehl S, Haas OA, Panzer-Grümayer R (2011). ETV6/RUNX1-positive relapses evolve from an ancestral clone and frequently acquire deletions of genes implicated in glucocorticoid signaling. *Blood* **117**, 2658-2667.

Balgobind BV, van den Heuvel-Eibrink MM, Menezes RX, Reinhardt D, Hollink IHIM, Peters STJCM, van Wering ER, Kaspers GJL, Cloos J, de Bont ESJM, Cayuela JM, Baruchel A, Meyer C, Marschalek R, Trka J, Stary J, Beverloo HB, Pieters R, Zwaan CM, den Boer ML (2011). Evaluation of gene expression signatures predictive for cytogenetic and molecular subtypes of pediatric acute myeloid leukemia. *Haematologica* **96**, 221-230.

Emerenciano M, Meyer C, de Meis E, Dobbin JA, Marschalek R, Pombo-de-Oliveira MS (2011). Prenatal origin of the NUP98-HOXD13 gene fusion in a case of infant acute myeloid leukemia. *Leukemia* accepted.

Cin H, Meyer C, Witt H, Remke M, Janzarik W, Van Anh TN, Olbrich H, von Deimling A, Kulozik AE, Marschalek R, Witt O, Omran H, Lichter P, Korshunov A, Pfister S (2011). Oncogenic FAM131B-BRAF Fusion Resulting from 7q34 Deletion Comprises an Alternative Mechanism of MAPK Pathway Activation in Pilocytic Astrocytoma. *Acta Neuropathologica* accepted.

Our collaborators

Argentina

Alonso - Servicio de Hemato-Oncologia, Hospital Nacional de Pediatría Garrahan, Ciudad de Buenos Aires

Australia

Sutton - Children's Cancer Institute Australia, Sydney Children's Hospital, Sydney

Austria

Attarbaschi / Strehl / Panzer-Grümayer - CCRI, Children's Cancer Research Institute, Vienna

Belarus

Kustanovich - Laboratory of Molecular Biology, Belarussian Research Center for Pediatric Oncology and Hematology, Minsk

Belgium

Van Roy - Centre for Medical Genetics, Ghent University Hospital, Ghent

Brazil

Pombo-de-Oliveira - Pediatric Haemato-Oncology, National Cancer Institute, Rio de Janeiro

China

Chan - Department of Pathology, The University of Hong Kong, Queen Mary Hospital, Pokfulam, Hong Kong

Czech Republic

Zuna / Trka - Department of Pediatric Hematology/Oncology, Charles University Prague, Prague

Denmark

Kjeldsen - Cancercytogenetics Laboratory, Aarhus University Hospital, Aarhus

Madsen - Tissue Typing Lab, Rigshospitalet, Copenhagen

France

Macintyre / Ben Abdelali - Biological Hematology, AP-HP and INSERM EMIU210, Paris

Reneville / Preudhomme - Dept. of Hematology, Calmette Hospital CHU, Lille

Clappier - INSERM U462, Institut Universitaire d'Hématologie, Centre Hayem, Hopital Saint Louis, Paris

Delabesse - Laboratoire d'Hematologie, INSERM, Toulouse

De Braekeleer, Laboratoire de Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Brest

Tondeur - Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Saint-Eloi, Montpellier

Lippert, Laboratoire Hematopoeze Leucémique et Cibles Thérapeutiques, INSERM U876, Université de Bordeaux 2, Bordeaux

Germany

Stanulla / Schrappe / Krauter - Pediatric Hematology/Oncology, MHH Hannover and Kiel

Greil - Department of Pediatric Hematology and Oncology, University Children's Hospital, Heidelberg

Koehl - Pediatric Hematology and Oncology, University Frankfurt

D I A G N O S T I C C E N T E R

of Acute Leukemia

Harbott, Teigler-Schlegel - Children's University Hospital, Department of Pediatric Hematology and Oncology, Giessen

zur Stadt - Department of Pediatric Hematology and Oncology, Eppendorf, Hamburg

Eckert - Department of Pediatric Oncology and Hematology, Charite - Virchow Campus, Berlin

Schnittger / Schoch - Laboratory for Leukemia Diagnostics, University Hospital Grosshadern, Munich

Griesinger - Department of Pediatric Hematology, Göttingen

Burmeister - Charite - Benjamin Franklin Campus, Med. Klinik III, Berlin

Gruhn - Department of Pediatrics, University of Jena, Jena

Lichter - Molecular Genetics of Pediatric Brain Tumors, DKFZ, Heidelberg

Suttorp - Department of Pediatric Hematology, Oncology and Hemostaseology, Children's Hospital, University Hospital Carl Gustav Carus, Dresden

Drexler, Quentmeier - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ), Braunschweig

Zeuzem - Department of Internal Medicine I, Goethe-University Frankfurt, Frankfurt/Main

Israel

Izraeli / Trakhtenbrot - Department of Pediatric Hemato-Oncology, The Chaim Sheba Medical Center, Tel Hashomer

Italy

Lo Nigro - Center of Pediatric Hematology Oncology, University of Catania, Catania

TeKronnie - Department of Paediatrics, Oncohematology, University of Padua, Padua

Biondi - M. Tettamanti Research Center, University of Milano-Bicocca, Monza

Ennas - Department of Cytomorphology, University of Cagliari, Cagliari

Angelucci - Hematology and Oncology Hospital "A. Businco", Cagliari

Japan

Kunihiko - Department of Pediatrics, Tohoku University School of Medicine, Sendai

Korea

Park - Department of Laboratory Medicine, Kyung Hee University College of Medicine, Seoul

Choi - Department of Laboratory Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul

Oh - Department of Laboratory Medicine, Inje University College of Medicine, Busan

Poland

Szczepanski - Department of Pediatric Hematology and Oncology, Silesian Academy of Medicine, Zabrze

Portugal

Cerveira, Teixeira - Department of Genetics and Research Center, Portuguese Oncology Institute, Porto

Gameiro - Laboratorio de Hemato-Oncologia, Seccao de Biologia Molecular, Instituto Portugues de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, Lisboa

Slovakia

Ilencikova - National Cancer Hospital, Department of Clinical Genetics, Bratislava

Spain

Acquadro - Molecular Cytogenetic Group, Spanish National Cancer Centre - CNIO, Madrid

Switzerland

Niggli / Schaefer - University Children's Hospital, Department of Oncology, Zurich

The Netherlands

den Boer / Pieters / Balgobind / van den Heuvel-Eibrink - Pediatric Oncology/Hematology, Sophia Children's Hospital, Rotterdam

van Dongen - Department of Immunology, Erasmus MC, Rotterdam

Russian Federation

Tsaur / Fechina - Pediatric Oncology and Hematology Centre, Regional Children Hospital, Ekaterinburg

United Kingdom

Kempinski / Brady - Molecular Hematology and Cancer Biology, ICH, University College London, London

Heidenreich - Newcastle University, Northern Institute for Cancer Research, Newcastle upon Tyne

Hancock - Molecular Oncology, Southmead Hospital, Bristol

USA

Lee - Dept. of Pediatrics Hematology, Baylor College of Medicine, Children's Cancer Center and Hematology Service, Houston

Kutok, Harvard Medical School, Brigham and Women's Hospital, Boston

Map of involved countries



Who we are...

Inst. Pharm. Biologie



Prof. Dr. Theo
Dingermann



Prof. Dr. Rolf
Marschalek



Dr. Claus
Meyer

Kinderklinik



Prof. Dr. Thomas
Klingebiel

Universitätsprofessor
10.07.1948
Pharmazeut
Promotion '80
Habilitation '87
DPhG Präsident '00-'04
Editor PharmuZ
Direktor DCAL
u.v.m.

Universitätsprofessor
23.12.1960
Biologie
Promotion '89
Habilitation '99
Direktor des Instituts
Direktor ZAFES
Direktor DCAL

Leiter DCAL
30.07.1968
Chemieingenieur
Promotion '04
u.v.m.

Universitätsprofessor
18.08.1953
Mediziner
Promotion '81
Facharzt für Pädiatrie '88
Habilitation '92
Direktor Kinderklinik
Direktor DCAL
u.v.m.

Further informations can be retrieved from our website
<http://web.uni-frankfurt.de/fb14/dcald/>

DCAL in the regional press 2006



Kurz & bündig

Leukämie-Diagnose in Frankfurt



Abb. Archiv

Wissenschaftler des Frankfurter Zentrums für Molekulare MLL-Diagnostik haben eine Methode entwickelt, mit der alle bekannten und unbekannten Translokationen des MLL (mixed lineage leukemia)-Gens identifiziert und charakterisiert werden können (Meyer C et al. Proc Natl Acad Sci 2005; 102: 449–54). Die bereits als Patent eingereichte Methode ist Grundlage für einen Patienten-spezifischen Nachweistest, mit dessen Hilfe eine einzelne Tumorzelle unter 100.000 bis 1.000.000 normalen Blutzellen nachgewiesen werden kann; Stichworte: minimal residual disease monitoring. Wegen der extremen Leistungsfähigkeit dieser Technik werden in Zukunft neben Diagnostikzentren aus den Niederlanden, Österreich und Deutschland, die bereits seit einiger Zeit ihre Proben in Frankfurt analysieren lassen, weitere Diagnostik-Zentren aus England, Frankreich, Italien und

**Ein falscher Fuffziger darunter?
Die Suche nach chromosomalnen
Translokationen ist wichtig bei
Hochrisiko-Leukämien.**

Tschechien ihre Proben zur Feincharakterisierung nach Frankfurt schicken. Damit führt das von der Wilhelm-Sander-Stiftung, München, geförderte Referenzzentrum die Diagnostik für alle betroffenen Patienten in ganz Europa durch.

Das Zentrum für Molekulare MLL-Diagnostik, das vor einem Jahr auf Initiative von Theo Dingermann und Rolf Marschalek, Institut für Pharmazeutische Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, sowie Thomas Klingebiel, Zentrum der Kinderheilkunde II des Universitätsklinikums Frankfurt, gegründet wurde, hat sich in kürzester Zeit zu einem international anerkannten Referenzzentrum für die Diag-

nostik so genannter Hochrisiko-Leukämien entwickelt. Dazu zählen alle Leukämien, die durch spezifische genetische Veränderungen – so genannte chromosomale Translokationen des MLL-Gens – hervorgerufen werden, wie die Akute Lymphoblastische Leukämie (ALL) und die Akute Myeloische Leukämie (AML).

Weitere Informationen erhalten Sie über Prof. Dr. Rolf Marschalek, Institut für Pharmazeutische Biologie am Biozentrum der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt, Marie-Curie-Str. 9, 60439 Frankfurt am Main, Telefon: (069) 798-29647, E-Mail: Rolf.Marschalek@em.uni-frankfurt.de.

ro

Diagnostic tool for the identification of *MLL* rearrangements including unknown partner genes

Claus Meyer*, Bjoern Schneider*, Martin Reichel†‡, Sieglinde Angermueller‡, Sabine Strehl§, Susanne Schnittger‡, Claudia Schöch‡, Mieke W. J. C. Jansen‡, Jacques J. van Dongen‡, Rob Pieters**, Oskar A. Haas§, Theo Dingermann‡, Thomas Klingebiel†‡, and Rolf Marschalek**‡

*Institute of Pharmaceutical Biology/Center for Drug Research, Development and Safety (ZAFES), BioCenter, University of Frankfurt, D-6039 Frankfurt/Main, Germany; †Chair of Genetics, University of Erlangen-Nürnberg, 91054 Erlangen, Germany; ‡Kinderkrebsforschungsinstitut St. Anna Kinderhospital, A-1090 Vienna, Austria; §Laboratory for Leukemia Diagnostics, Department of Internal Medicine III, University Hospital Grosshadern, Ludwig-Maximilians-University, 81377 Munich, Germany; ¶Department of Immunology, Erasmus MC, Sophia Children's Hospital, 3000 CB Rotterdam, The Netherlands; **Department of Paediatric Oncology/Haematology, Erasmus MC, University Medical Center Rotterdam, 3000 CA Rotterdam, The Netherlands; and ¶Department of Pediatric Hematology, Children's Hospital III, D-60590 Frankfurt, Germany

Edited by Janet D. Rowley, University of Chicago Medical Center, Chicago, IL, and approved November 30, 2004 (received for review September 21, 2004)



DCAL in the regional press 2010

Verhängnisvolles Durcheinander im Erbgut

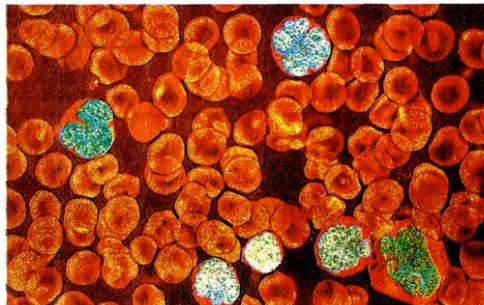
FAZ 05.01.2010

In Frankfurt erforschen Wissenschaftler eine besonders gefährliche Art von Leukämie / Diagnosezentrum besteht seit fünf Jahren

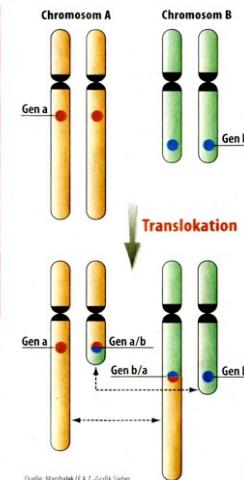
FRANKFURT. Manche Professoren impfen auf ihren Internetseiten mit langen Listen der Fachgebiete, auf denen sie sich betätigen. Rolf Marschalek hingegen nennt unter dem Stichwort „Forschungsinteressen“ nur eines: Diagnostik, Mechanismen und Therapie von akuten Hochrisiko-Leukämien. „Seit 18 Jahren arbeite ich schon an dem Thema, und ich habe bei null angefangen“, sagt der Direktor des Instituts für Pharmazeutische Biologie an der Goethe-Universität. Marschaleks mit Beharrlichkeit verbundene Selbstbeschränkung hat sich offenbar gelohnt. Wie er sagt, ist in Frankfurt nicht nur ein europaweit einzigartiges Diagnosezentrum für bestimmte, besonders gefährliche Blutkrebsarten entstanden. Die Wissenschaftler dort suchen auch erfolgreich nach weiteren Tumorgenen und entwickeln Ideen für neue Therapien.

Die Leukämieform, die Marschalek studiert, ist selten, aber für jene Patienten, die sie trifft, oft verhängnisvoll. Sie entsteht durch einen Schaden im sogenannten MLL-Gen, der im Lebenszyklus einer Zelle spontan auftreten kann. Hierbei tauscht das Chromosom, auf dem diese Erbanlage ihren Platz hat, ein Stück mit einem anderen Chromosom. Da die Bruchstelle im MLL-Gen liegt, wird ein Teil davon ebenfalls auf das fremde Chromosom übertragen. An die Stelle des fehlenden MLL-Stücks gelangt ein Fragment eines anderen Gens – Fachleute sprechen von einer Translokation (siehe Grafik). Sie verändert nicht nur den Aufbau des MLL-Gens, sondern auch den des Proteins, das nach dem Bauplan hergestellt wird, der auf diesem Abschnitt des DNS-Strangs gespeichert ist. Das mutierte Eiweiß programmiert die Zelle um, so dass sie sich fortan ständig teilt. Die Folge ist Krebs.

Oft tritt die MLL-Leukämie bei Säuglingen auf. In Deutschland werden jedes



Böses Blut: Bei Leukämie entarten weiße Blutkörperchen (Foto). Ursache ist oft eine Translokation, ein Austausch von Chromosomenstücken (Grafik).



Jahre gibt es das Diagnosezentrum nun, jährlich erhalten 300 bis 400 Patienten von dort Auskunft über ihre Krankheit. „Damit sind wir ausgelastet“, sagt der Professor. Geld verlange man für die Analysen nicht.

Schließlich dient die Arbeit der Diagnostiker auch gleichzeitig der Grundlagenforschung. Die intensive Beschäftigung mit dem MLL-Gen und dem Protein, das in ihm codiert ist, hat Aussichten auf neue Behandlungs-Ansätze eröffnet: Damit das MLL-Eiweiß – das normale wie das kranke – seine Funktion erfüllen kann, muss es von einem Enzym namens Tasapse in zwei Teile geschnitten werden, die sich dann wieder neu zusammenlagern. Eine Therapie könnte Marschalek zufolge darin bestehen, entweder die Tasapse zu blockieren oder das Zusammenfügen der geschnittenen MLL-Stücke zu verhindern. Darunter hätten zwar auch gesunde Zellen zu leiden, doch würde ihnen eine solche Vergiftung weniger zusetzen als den schnellwachsenden Tumorzellen – das ist das gleiche Prinzip, nach dem auch andere Arten der Chemotherapie funktionieren.

Marschalek weiß, dass es angesichts der geringen Zahl von MLL-Leukämiefällen schwierig werden dürfte, die Pharmaindustrie zur Entwicklung eines Medikaments zu bewegen. Doch es bestünde die Chance, Kinderleben zu retten, und überdies würden von den bei solchen Studien gewonnenen Erkenntnissen womöglich nicht nur Blutkrebspatienten profitieren: Das Tasapse-Enzym könnte nach Marschaleks Worten auch bei der Entstehung von anderen Tumortypen eine Rolle spielen. Nicht zuletzt deshalb will der 49 Jahre alte Wissenschaftler seine Forschungen mit bewährter Hartnäckigkeit fortfsetzen: „Ich werde es sicher noch schaffen, ein Therapeutikum zu finden, bevor ich in Pension gehe.“

SASCHA ZOSKE

DCAL in the regional press 2010

Konzentration aufs Ziel

Genetische Veränderungen setzen bei der Leukämie das Verhältnis von Rot und Weiß außer Kraft

Blut steht für Leben – und für den Tod. Das ist in der Medizin nicht anders als in der Mythologie. Vor wenigen Jahrzehnten war die Diagnose Blutkrebs noch ein sicheres Todesurteil. Heute werden viele Leukämiekranken geheilt. An der Goethe-Universität setzt ein Schwerpunkt für Lymphom- und Leukämieforschung deutschlandweit Akzente bei Forschung und Diagnostik.

von Rolf Marschalek und Hubert Serve

■ Blick ins Blutgefäß. Zu sehen sind die roten Blutkörperchen (rot), die weißen Blutkörperchen (weiß) und die Blutplättchen (gelb). Die roten Blutkörperchen sorgen für den Gasaustausch, die weißen für die Immunabwehr und die Plättchen für die Blutgerinnung. Im gesunden Blut ist das Verhältnis der einzelnen Typen sorgfältig aufeinander abgestimmt.

Berlin 1845: In einem Sektionssaal der Charité legt der junge Assistenzarzt Rudolf Virchow den Blutausstrich eines kürzlich verstorbenen Patienten unter das Mikroskop: »Außer sehr wenigen rothen Blutkörperchen bestand der ungleich größere Theil aus denselben farblosen oder weißen Körpern, die auch in normalem Blut vorkommen«, bemerkte er. Auffallend war, dass das Verhältnis zwischen den weißen und roten Blutkörperchen sich umgekehrt hatte, »indem die farblosen die Regel, die farbigen eine Art von Ausnahme zu bilden schienen«. In seiner ersten Veröffentlichung über »weißes Blut« beschrieb der 24-Jährige, der heute als Begründer der modernen Pathologie gilt, erstmals eine Leukämie (eine chronische myeloische Form). Etwa 30 Jahre später gelang es Paul Ehrlich, das Übermaß an weißen Blutkörperchen (Leukozyten) durch spezielle Färbemethoden sichtbar zu machen.

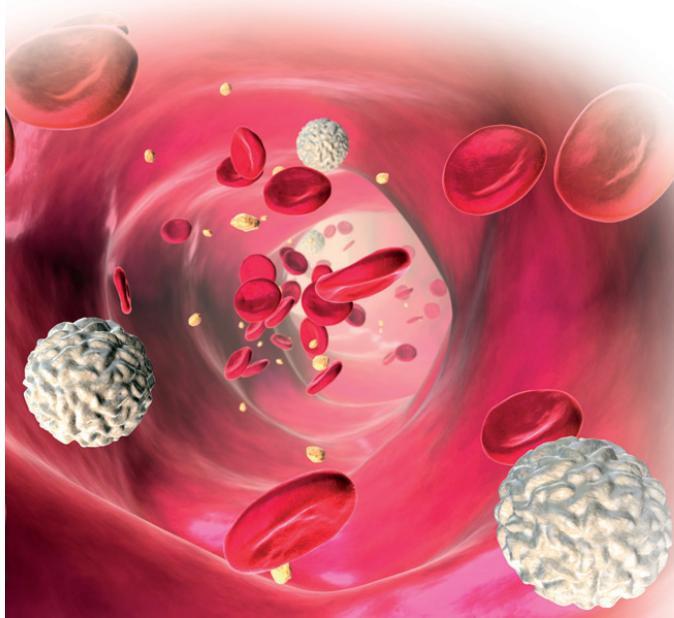
Auch heute kann der erste Hinweis auf eine akute Leukämie durch einen Blutausstrich ausgelöst werden. Für einen präziseren Befund muss allerdings eine Probe aus dem Knochenmark entnommen werden, weil die Krankheit dort beginnt. Die Vorläuferzellen der Leukozyten vermehren sich im Knochenmark auf unkontrollierte Weise. Im weiteren Verlauf der Krankheit werden diese unreifen Zellen, die sogenannten »leukämischen Blasten«, oft ins Blut ausgeschwemmt. Viel entscheidender ist allerdings, dass die leukämischen

Blasten die normale Blutbildung im Knochenmark verdrängen. Die Patienten leiden an Blutarmut, sind blass und abgeschlagen und neigen zu Blutungen, weil ihnen die Blutplättchen für die Blutgerinnung fehlen. Sie sind auch anfälliger für Infektionen, weil sie nicht genügend gesunde Leukozyten für die Keimabwehr haben.■

Leukämien werden nach ihrem Verlauf in akute und chronische Formen eingeteilt. Die besonders aggressive Akute Lymphatische Leukämie (ALL) tritt vor allem bei Säuglingen und Kleinkindern auf. Von den Ein- bis Vierjährigen erkranken jedes Jahr sieben bis acht pro 100 000 Einwohner neu daran. Bei den Erwachsenen tritt die ALL vor allem bei den unter 20-Jährigen und den über 75-Jährigen auf. In Deutschland gibt es insgesamt 700 Neuerkrankungen pro Jahr. An der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) erkranken hingegen in Deutschland etwa 3000 Menschen pro Jahr.■ Sie kommt vor allem in den letzten Lebensjahrzehnten vor. Zwar schwanken die Heilungsraten je nach Alter des Patienten und molekularem Typ der Leukämie beträchtlich, trotzdem haben einige Formen – etwa die bei älteren Patienten auftretende AML – trotz intensivster Therapie nach wie vor schlechte Heilungschancen. Deshalb versuchen wir die molekularen Krankheitsmechanismen verschiedener Leukämien zu verstehen, um daraus neue Angriffspunkte für die Diagnostik und Therapie abzuleiten.

Leukämie – eine Krankheit der Gene

Viele Krebskrankungen entstehen durch spezifische, genetische Veränderungen. Bei einigen Tumortypen konnte bereits die zeitliche Abfolge dieser Mutationsereignisse nachvollzogen werden. Man geht davon aus, dass rund 20 Ereignisse notwendig sind, um aus einer normalen Zelle eine Tumorzelle zu machen. Die Mutationen bewirken vor allem zweierlei. Sie sorgen entweder dafür, dass ein Gen nicht mehr in der gewohnten Weise abgelesen wird, oder sie behindern die Weiterleitung wichtiger Signale, so dass die Kommunikation innerhalb oder außerhalb der Zelle ins Stocken gerät. Das Spektrum der krebsauslösenden Mutationen kann vom Verlust oder Austausch einzelner Basen bis hin zum Verlust oder Austausch ganzer Chromosomenabschnitte reichen. Ein bevorzugter Mutationsmechanismus bei den Leukämien ist die »balanzierte chromosomale Translokation«. Bei dieser Mu-



Forschung Frankfurt 1/2010