

Diplomarbeit

**Expression eukaryotischer Initiationsfaktoren bei
ALL im Kindes- und Jugendalter**

eingereicht von

Anselm Johannes Schlemmer

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

**Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde
Klinische Abteilung für Pädiatrische Hämato-Onkologie**

unter der Anleitung von

Univ.-Prof Dr. med. univ. Martin Benesch

Graz, 2. August 2022

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 2. August 2022

Anselm Johannes Schlemmer eh

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich all jenen meinen Dank aussprechen, ohne die diese Diplomarbeit nicht möglich gewesen wäre.

An erster Stelle möchte ich besonders Herrn Univ.-Prof. Dr. Martin Benesch danken, welcher mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses Thema zu bearbeiten. Mit viel Geduld und Umsicht führte er mich an das wissenschaftliche Arbeiten heran und gab mir stets das Gefühl, mich jederzeit bei Fragen und Anliegen an ihn wenden zu können. Er brachte mir das Vertrauen entgegen, den Arbeitsprozess selbst zu gestalten, sodass ich mich mit der geforderten Genauigkeit an die Arbeit machen konnte.

Ebenso bin ich Herrn PD Dr. Alexander Deutsch zu besonderem Dank verpflichtet. Ohne seine Unterstützung und wertvollen Ratschläge würde diese Arbeit wohl nicht vorliegen.

Ein großer Dank gilt Frau Andrea Raicht, BSc für die Bearbeitung des Probenmaterials und Durchführung der Analysen im Labor.

Ebenso möchte mich auch für die Unterstützung durch Frau Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ Christine Beham-Schmid sowie das Team des Osteo- und Hämatopathologie Labors für die Bereitstellung des Probenmaterials und dessen Beurteilung bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank dem Team der Klinischen Abteilung für Pädiatrische Hämato-Onkologie Graz, welches stets sehr bemüht war, mich bestmöglich zu unterstützen.

Der größte Dank gilt meiner Familie. Sie hat mich zu jeder Zeit voll und ganz unterstützt, ohne ihre Hilfe wäre ich nie so weit gekommen.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	i
Inhaltsverzeichnis	ii
Abkürzungen	iv
Abbildungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	viii
Zusammenfassung	ix
Abstract	xi
1 Einleitung	1
1.1 Akute lymphoblastische Leukämie	2
1.1.1 Epidemiologie	2
1.1.2 Ätiologie	2
1.1.3 Klinische Manifestation	4
1.1.4 Einteilung der ALL	5
1.1.5 Diagnostik	7
1.1.6 Therapie	9
1.2 Eukaryotische Initiationsfaktoren	11
1.2.1 Initiationsphase der Translation	11
1.2.2 eIF-Subtypen	17
1.2.3 Eingriff in die Proteinsynthese: mTOR-Pathway	20
1.2.4 eIF2 α -Phosphorylierung als Stressreaktion	22
1.2.5 eIF-Expression bei Malignomen	23
2 Wissenschaftlicher Hintergrund und Studienhypothesen	27
3 Patientinnen- und Patientenkollektiv und Methodik	27
3.1 Patientinnen- und Patientenkollektiv, Ein- und Ausschlusskriterien	27
3.2 Methodik	29
3.2.1 Vorbereitung und RNA-Isolation	29
3.2.2 cDNA-Synthese	30
3.2.3 Quantitative real-time PCR	30
3.2.4 Korrelation mit klinischen Parametern	31

3.3	Ethik und Sicherheit	32
3.4	Statistische Analysen	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Charakteristika der Studienkohorte	34
4.2	Auswertung der eIF-Expressionsprofile	36
5	Diskussion	44
	Literaturverzeichnis	47

Abkürzungen

4E-BP	4E-binding protein
A	Adenin
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AUG	Adenin-Uracil-Guanin
BCP	B cell precursor
Bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
CD	Cluster of differentiation
CMMRDS	Constitutional mismatch repair deficiency syndrome
DNA	Deoxyribonucleic acid
dsRNA	Double-stranded RNA
ED	Erstdiagnose
eIF	Eukaryotischer Initiations-Faktor
eRF	Eukaryotic release factor
Et al.	Et alii
FAB-Klassifikation	French-American-British-Klassifikation
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCM-MRD	Flow cytometry-minimal residual disease
G	Guanin
Ggf.	Gegebenenfalls
GAP	GTPase activating protein
GCN2	General control non-derepressible-2
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
Hb	Hämoglobin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HR	High risk
HRI	Heme-regulated inhibitor
IHC	Immunhistochemie
IRES	Internal ribosome entry site
LDH	Laktatdehydrogenase
Met	Methionin

MR	Medium risk
MRD	Minimal residual disease
mRNA	Messenger ribonucleic acid
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
mTORC	Mechanistic target of rapamycin containing complex
ORF	Open reading frame
PABP	Poly(A) binding protein
PAIP1	Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1
PCR	Polymerase chain reaction
PERK	PKR-like ER kinase
PKR	Protein kinase double-stranded RNA (dsRNA)-dependent
Post-TC	Post termination complex
qRT-PCR	Quantitative real-time Polymerase chain reaction
S6K1	S6 kinase 1
TC	Ternary complex eIF2-GTP-Met-tRNA ^{iMet}
tRNA	Transfer ribonucleic acid
U	Uracil
U.a.	Unter anderem
uORF	Upstream open reading frame
Uvm.	Und viele(s) mehr
Vs.	Versus
ZNS	Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Häufigkeiten der Erkrankungsfälle bei Kindern und Jugendlichen (2009-2017), basierend auf 19.254 Patientinnen und Patienten < 18 Jahre. Deutsches Kinderkrebsregister. 2018 (4)	1
Abbildung 2: Immunphänotypische Subgruppen bei akuten Leukämien nach der AIEOP-BFM-Gruppe. Modifiziert nach Dworzak MN, et al. 2016 (16)	7
Abbildung 3: Diagnostisches Vorgehen bei Verdacht auf ALL	8
Abbildung 4: Übersicht Behandlungsplan AIEOP-BFM ALL 2017 bei BCP- und T-ALL. Schrappe M, et al. 2016 (18)	10
Abbildung 5: Ablauf der Translation	12
Abbildung 6: Recycling des Post-Terminations-Komplexes	13
Abbildung 7: Aufbau des 43S-Präinitiations-Komplexes	13
Abbildung 8: Aufbau des 48S-Initiations-Komplexes	14
Abbildung 9: Scanning der mRNA	15
Abbildung 10: Bildung des 80S-Ribosoms: Schritt 1	16
Abbildung 11: Bildung des 80S-Ribosoms: Schritt 2	16
Abbildung 12: Hemmung der Proteinbiosynthese durch eIF2 α -Phosphorylierung	19
Abbildung 13: Regulation von eIF4E durch mTORC1	21
Abbildung 14: Von mTORC1 ausgehende Signalwege mit Beeinflussung der eIF	22
Abbildung 15: Entnahmezeitpunkte der Gewebeproben. Therapieübersicht AIEOP-BFM ALL 2009. Schrappe M, et al. 2015 (65)	28
Abbildung 16: Übersicht zum angewandten analytischen Vorgehen	29
Abbildung 17: CONSORT-Diagramm der eingeschlossenen Patientinnen und Patienten	34
Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurve für das ereignisfreie Überleben der Studienkohorte	34
Abbildung 19: EIF2A-, EIF3L- und EIF4G2-Genexpression: BCP-ALL vs. Normalkontrolle	37
Abbildung 20: EIF1-, EIF2A und EIF3D-Genexpression: ALL-Immunphänotypen vs. Normalkontrolle	38
Abbildung 21: EIF3L-, EIF4G2- und EIF4G3-Genexpression: ALL-Immunphänotypen vs. Normalkontrolle	39

Abbildung 22: Unauffällige mRNA-Expressionsprofile verschiedener ALL- Immunphänotypen _____	40
Abbildung 23: EIF1-, EIF2A- und EIF3J-Genexpression: Vergleich der ALL- Immunphänotypen _____	41
Abbildung 24: EIF3D-Genexpression: Hyperdiploidie _____	42
Abbildung 25: EIF1-Genexpression: Periphere Blastenzahl am Tag 8 (0/ μ L vs. \geq 100/ μ L) _____	42
Abbildung 26: EIF2S1- und EIF3L-Genexpression: Initiale Leukozyten (< 20 G/L vs. \geq 20 G/L); EIF1A- und EIF4E-Genexpression: Initiale Thrombozyten (< 50 G/L vs. \geq 100 G/L) _____	43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verteilung der molekularen Subtypen bei ALL im Kindes- und Jugendalter. Modifiziert nach Pui CH, et al. 2012 (11)	3
Tabelle 2: Häufige chromosomale Translokationen bei ALL im Kindes- und Jugendalter. Modifiziert nach Lanzkowsky P. 2005 (10)	3
Tabelle 3: Morphologische Klassifikation der ALL nach FAB. Modifiziert nach Freund M. 2008 (14)	6
Tabelle 4: Prognostische Faktoren bei ALL im Kindes- und Jugendalter. Modifiziert nach Escherich G, et al. 2016 (17) und Lokeshwar MR, et al. 2016 (7)	9
Tabelle 5: Auswahl maligner Erkrankungen mit auffälliger eIF-Expression. Modifiziert nach Ali MU, et al. 2017 (32), Spilka R, et al. 2013 (43) und Gomes-Duarte A, et al. 2018 (51)	25
Tabelle 6: Primer für die qRT-PCR	31
Tabelle 7: Charakteristika der Studienkohorte	35
Tabelle 8: Behandlung und Therapieansprechen der Studienkohorte	36

Zusammenfassung

Einleitung

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) stellt die häufigste maligne Erkrankung des Kindes- und Jugendalters dar. Ein besseres Verständnis der Erkrankung sowie neue prognostische Marker können dabei helfen, das individuelle Risiko der Betroffenen besser einzuschätzen und eine risikoadaptierte Therapie zu ermöglichen. Die Proteingruppe der eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIF) nimmt eine Schlüsselposition in der Proteinsynthese ein. Die eIF regulieren die Translations-Initiation und sind somit an einem für Zellwachstum und Zellüberleben essenziellen Schritt beteiligt. Nachweislich spielen abweichende Expressionen mehrerer oder einzelner eIF bei der Entstehung von Malignomen eine Rolle. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Expression der eIF bei ALL im Kindes- und Jugendalter zu untersuchen und mögliche klinische Zusammenhänge festzustellen.

Methoden

Die mRNA-Expressionsprofile von 15 eIF wurden im Knochenmark von, an ALL erkrankten Kindern und Jugendlichen mittels quantitativer real-time PCR bestimmt. Weiters wurden die Ergebnisse mit klinischen Parametern aus einer retrospektiven Datenerhebung korreliert. Es wurden kryokonservierte Knochenmarkstanzen untersucht, welche bei ALL-Erstdiagnose entnommen worden waren ($n=91$). Zusätzlich wurde nach Abschluss der Induktionstherapie gewonnenes Knochenmark analysiert ($n=10$). Als Normalkontrolle diente Peripherblut gesunder Probandinnen und Probanden ($n=5$).

Ergebnisse

Der Vergleich von Blasten der BCP-/T-Zellreihe mit der Normalkontrolle ergab eine signifikant reduzierte Expression der mRNA-Level von sechs der 15 untersuchten eIF (eIF1, eIF2A, eIF3d, eIF3l, eIF4G2, eIF4G3). Die ALL-Immunphänotypen variierten untereinander kaum, nur bei drei eIF lagen Unterschiede vor (eIF1, eIF2A, eIF3j). Fälle mit nachgewiesener Hyperdiploidie zeigten eine reduzierte eIF3d-Expression. Außerdem lagen bei einer peripheren Blastenzahl am Tag 8 von $\geq 100/\mu\text{L}$ signifikant gesteigerte eIF1-Level vor. Bei

einem initialen Leukozytenwert von < 20 G/L war eIF3I unter- und eIF2 α überexprimiert.

Schlussfolgerungen

Der Vergleich der Blasten der BCP-/T-Zellreihe mit der Normalkontrolle zeigte – entgegen der aktuellen Literatur – ausschließlich reduzierte Expressionsprofile. Aus diesem Grund sollten die vorliegenden Ergebnisse vorsichtig interpretiert werden. Hyperdiploidie, niedrige periphere Blastenzahl am Tag 8 und initiale Leukozytenwerte < 20 G/L werden generell mit einem günstigeren Krankheitsverlauf assoziiert. Eine Korrelation der Ergebnisse mit dem klinischen Verlauf ist aufgrund der geringen Fallzahl nur eingeschränkt möglich. Zur genaueren Beurteilung der eIF-Expressionsprofile bei ALL im Kindes- und Jugendalter, auch hinsichtlich einer möglichen prognostischen Aussagekraft, sollten weiterführende Untersuchungen folgen.

Abstract

Introduction

Acute lymphoblastic leukaemia (ALL) is the most common malignant disease in children and adolescents. A better understanding of the disease as well as new prognostic markers may help to better assess the individual risk of ALL patients allowing for a better risk-adapted therapy. Eukaryotic initiation factors (eIF) play a key role in protein synthesis. The eIF regulate translation initiation, a step essential for cell growth and survival. Evidence suggests that aberrant expression of multiple or single eIFs plays a role in the development of malignancies. The aim of the present study was to investigate the expression of eIF in childhood and adolescent ALL and to correlate expression with clinical parameters.

Methods

The mRNA expression profiles of 15 eIF were investigated in the bone marrow of children and adolescents with ALL using quantitative real-time PCR. Furthermore, the results were correlated with clinical parameters from a retrospectively analysed clinical cohort. Cryopreserved bone marrow samples collected at the time of initial ALL diagnosis were examined ($n=91$). In addition, bone marrow collected after completion of induction therapy was analysed ($n=10$). Peripheral blood from healthy volunteers served as a normal control ($n=5$).

Results

Comparison of BCP-/T-blasts with the normal control revealed significantly reduced expression of the mRNA levels of six of the 15 eIF examined (eIF1, eIF2A, eIF3d, eIF3l, eIF4G2, eIF4G3). There was little variation among the ALL immunophenotypes, with no differences in 12 of 15 eIF. Cases with proven hyperdiploidy showed reduced eIF3d expression. In addition, significantly increased eIF1 levels were present with a peripheral blast count on day 8 of $\geq 100/\mu\text{L}$. An initial leukocyte count of $< 20 \text{ G/L}$ was associated with decreased eIF3l expression and increased eIF2 α expression.

Conclusion

The comparison of BCP-/T- blasts with the normal control showed - contrary to current literature - only reduced expression profiles. Therefore, the present results must be interpreted cautiously. Hyperdiploidy, low peripheral blast counts on day 8 and initial leukocyte counts < 20 G/L are generally associated with a more favourable disease course. However, due to the small number of cases, the impact of the results with the clinical course is limited. For a more precise assessment of the eIF expression in ALL in childhood and adolescence, also regarding a possible prognostic significance, further studies are needed.

1 Einleitung

Maligne Erkrankungen stellen eine der Haupttodesursachen bei Kindern und Jugendlichen in Industrieländern dar (1). Europaweit liegt die Inzidenz bei ungefähr 145 pro 1.000.000 Kindern und Jugendlichen jährlich, allein 131/1.000.000 pro Jahr unter den 0-14-Jährigen (2). Aufgrund der Seltenheit von Krebserkrankungen mit den daraus resultierenden geringen Fallzahlen und dem meist verfolgten primär kurativen Therapieansatz stellt die Behandlung eine besondere Herausforderung dar. Komplexe Diagnosestellung, intensive multimodale Therapiekonzepte und die Notwendigkeit einer oft lebenslangen Nachsorge und Rehabilitation erfordern die Betreuung an einer auf die pädiatrische Hämato-Onkologie spezialisierten Abteilung (3).

Die größte Gruppe dieser malignen umfasst Leukämien, gefolgt von Tumoren des zentralen Nervensystems und Lymphome (**Abbildung 1**) (4).

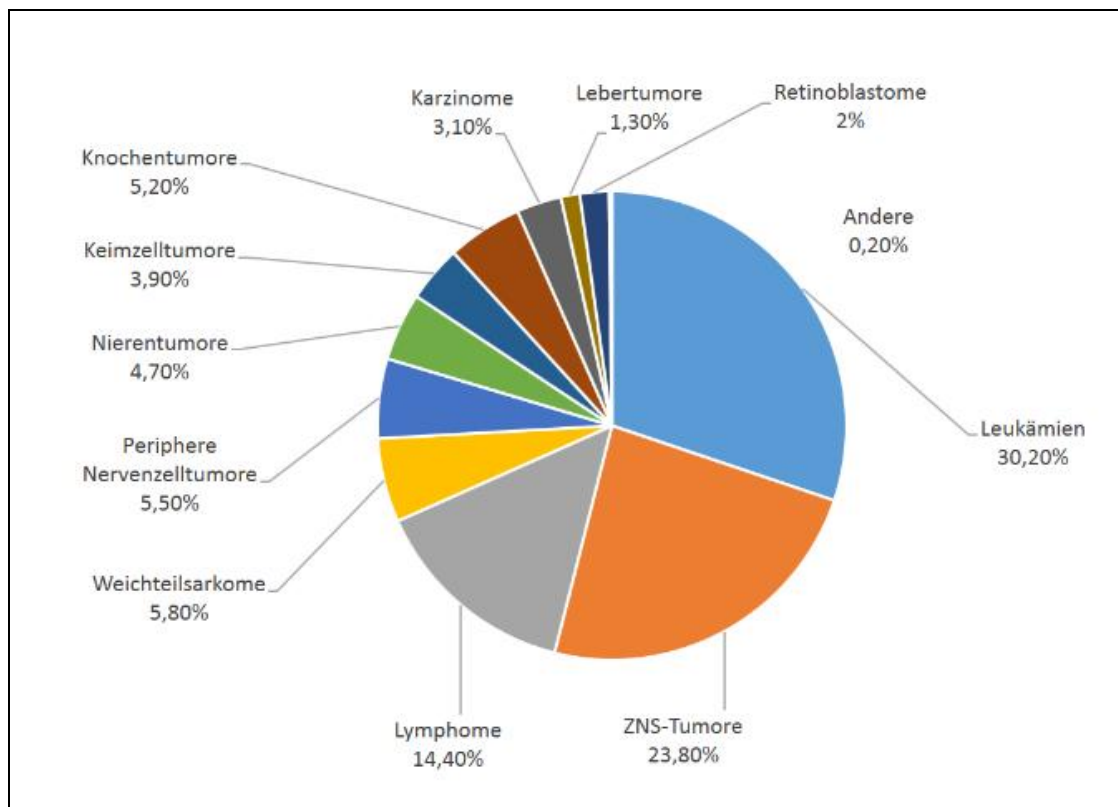


Abbildung 1: Häufigkeiten der Erkrankungsfälle bei Kindern und Jugendlichen (2009-2017), basierend auf 19.254 Patientinnen und Patienten < 18 Jahre. Deutsches Kinderkrebsregister. 2018 (4)

1.1 Akute lymphoblastische Leukämie

Die Gruppe der Leukämien umfasst maligne Erkrankungen des Knochenmarks, welche durch eine überschießende Proliferation hämatologischer Vorläuferzellen charakterisiert sind (5). Diese ungehemmte Vermehrung von malignen Zellen verdrängt die physiologische Hämatopoese (3). Nach dem Verlauf werden akute von chronischen Leukämien unterschieden. Akute Leukämien zeichnen sich durch eine hohe Zellteilungsrate und dadurch bedingt meist eine kurze Anamnese mit rasch progredienten Verlauf aus.

1.1.1 Epidemiologie

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) stellt mit 4,3 Erkrankungen auf 100.000 Kinder unter 15 Jahren die häufigste maligne Erkrankung im Kindes- und Jugendalter dar, was 25% aller Krebsdiagnosen in diesem Alter entspricht (1). Die Inzidenz ist im Alter zwischen zwei und fünf Jahren am höchsten, steigt ab dem 50. Lebensjahr wieder an mit einem weiteren Gipfel um das 80. Lebensjahr (6). Die Prävalenz variiert von Land zu Land (2, 7). Die Erkrankung ist leicht knabenwendig (Verhältnis 1,2:1), im Säuglingsalter sind jedoch häufiger Mädchen betroffen (1, 4).

1.1.2 Ätiologie

Die Grundlage für die Entstehung einer akuten Leukämie bilden genetische Mutationen der Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems, wobei Umwelteinflüsse und vorbestehende genetische Faktoren zusammenwirken (3). Ionisierende Strahlung gilt als akzeptierte Ursache für die Entstehung einer ALL (6). Die Rolle fehlregulierter Immunantworten auf harmlose Infektionen und Lebensumstände in keimarmer Umgebung werden diskutiert (3). Diverse Prädispositionssyndrome gelten auch als Risikofaktoren, sind jedoch für weniger als 5% aller Fälle an ALL im Kindes- und Jugendalter verantwortlich (3). Dazu zählen Bloom-, Down-, Nijmegen-Breakage-, Li-Fraumeni-Syndrom, Ataxia telangiectasia und Constitutional Mismatch Repair Deficiency Syndrom (CMMRDS) (8, 9). So haben beispielsweise Patientinnen und Patienten mit einem Down-Syndrom (Trisomie 21) ein fünffach erhöhtes Risiko an einer ALL zu erkranken als die Normalbevölkerung (1).

Bereits seit längerem ist bekannt, dass numerische und strukturelle chromosomale Veränderungen eine Rolle spielen. Diese umfassen neben Abweichungen in der Anzahl von Chromosomen, wie Hyperdiploidie (mehr als 50 Chromosomen) und Hypodiploidie (weniger als 44 Chromosomen), diverse Translokationen (19). Einige dieser Aberrationen und die daraus resultierenden Genotypen stehen in direktem Zusammenhang mit dem Outcome der Erkrankung (**Tabelle 1, Tabelle 2**) (10, 11).

Genotyp	Frequenz (%)	Genotyp	Frequenz (%)
Hyperdiploid	25	dic(9;20)	2
ETV6-RUNX1	20	iAMP21	2
BCR-ABL1-like	9	MLL-AFF1	2
TAL1	7	ETP	2
TCF3-PBX1	4	LYL1	1,4
CRLF2	4	Hypodiploid	1
ERG	3	TCF3-HLF	0,5
TLX3	2,3	MLL-ENL	0,3
MYC	2	TLX1	0,3
BCR-ABL1	2	Andere	10,2

Tabelle 1: Verteilung der molekularen Subtypen bei ALL im Kindes- und Jugendalter. Modifiziert nach Pui CH, et al. 2012 (11)

Chromosomale Translokation	Frequenz (%)	Genotyp	Prognose
t(12;21)(p13;q22)	20	ETV6-RUNX1-Fusion	günstig
t(1;19)(q23;p13.3)	5-6	E2A-PBX1-Fusion	ungünstig
t(9;22)(q34;q11)	3-5	BCR-ABL-Fusion	ungünstig
t(4;11)(q21;q23)	2	MLL-AF4-Fusion	ungünstig
t(8;14)(q24;q32.3)	1-2	MYC-IGH-Fusion	günstig
t(11;14)(p13;q11)	1	TTG2-TCRD-Fusion	ungünstig
dic(9;12)(p11-p12;p12)	1	-----	günstig

Tabelle 2: Häufige chromosomale Translokationen bei ALL im Kindes- und Jugendalter. Modifiziert nach Lanzkowsky P. 2005 (10)

1.1.3 Klinische Manifestation

Das klinische Erscheinungsbild einer ALL wird von drei Faktoren bestimmt: dem Ausmaß der Knochenmarkinfiltration, dem extramedullären Organbefall und der systemischen Wirkung, der von den malignen Zellen ausgeschütteten Zytokine (3). Frühsymptome sind oft nur unspezifisch und werden auf harmlose Erkrankungen zurückgeführt. Die Kombination mehrerer dieser Einzelsymptome oder Auffälligkeiten in betroffenen Organsystemen ist meist Anlass für eine entsprechende Abklärung (1).

Aufgrund des Befalls des blutbildenden Knochenmarks können alle drei physiologischen Zellreihen erniedrigt sein. Eine Verdrängung der Erythropoese führt zu den klassischen Symptomen einer Anämie und umfasst neben Blässe, Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Tachykardie, eine reduzierte Leistungsfähigkeit (1). Die aus der Neutropenie resultierende Infektneigung kann sich in Form von Fieber manifestieren, jedoch zu schweren Lokalinfektionen wie Pneumonie und Mastoiditis oder auch zur systemischen Manifestation einer Sepsis führen (3). Blutungen in Form von petechialen Hautblutungen, Hämatomen und Nasenbluten bis zu intrazerebralen Blutungen, Blutungen der Lunge oder gastrointestinaler Organe, sind durch eine Thrombozytopenie bedingt. Bei einem Viertel aller Kinder und Jugendlichen tritt zusätzlich eine schmerzhafte Knochen-, Periost- oder Gelenkinfiltration auf (10). Häufig finden sich querverlaufende metaphysäre Aufhellungsbänder, osteolytische Herde in Spongiosa und/oder Compacta, seltener subperiostale Knochenneubildungen oder osteosklerotische Herde (12). Knochen- und Bewegungsschmerzen können mit einer juvenilen rheumatoiden Arthritis oder in Kombination mit der entsprechenden Infektanamnese mit einer Osteomyelitis verwechselt werden (1). Müdigkeit, allgemeines Krankheitsgefühl, Übelkeit und Fieber werden auch durch die Zytokin-Freisetzung ausgelöst (3). Besonders häufig ist der Befall von retikuloendothelialen Geweben (3). Dies umfasst einerseits die Vergrößerung von Milz und Leber, welche in über zwei Dritteln der Fälle gemeinsam als Hepatosplenomegalie auftritt, die eine Zunahme des Bauchumfangs, Appetitlosigkeit und Obstipation verursachen kann (1). Andererseits können Lymphknoten lokalisiert oder generalisiert vergrößert sein. Dies kann bei thorakalem Befall bis zu einer oberen Einflusstauung und bei abdominellem Befall zu einem mechanischen Ileus führen (10).

Ein geringer Anteil der Kinder und Jugendlichen weist eine Beteiligung des Zentralnervensystems auf. Zeichen hierfür sind Kopfschmerzen, Erbrechen, Papillenödem, Hirnnervenausfälle und Meningismus, was auf eine Infiltration der weichen Hirnhäute bzw. einen erhöhten intrakraniellen Druck zurückgeführt werden kann (3). Seltener liegen fokale neurologische Ausfälle, hypothalamische Symptome, Diabetes insipidus centralis oder ein Brown-Séquard-Syndrom vor (10). Letzteres ist eine halbseitige Querschnittsläsion des Rückenmarks mit spastischer Lähmung und gestörter Tiefensensibilität ipsilateral zur Läsion und herabgesetzter Schmerz- und Temperaturempfindung kontralateral (5). Bei sehr hoher Leukozytenzahl findet sich oft ein Befall des Urogenitaltraktes (1). Hierbei steht meist eine schmerzlose, oft nur einseitige Hodenschwellung im Vordergrund; ein Befall der Ovarien ist eher selten, ebenso wie Priapismus, welcher auf zentralnervöse Prozesse oder eine mechanische Obstruktion durch Blasten in den Corpora cavernosa zurückzuführen ist (10). Ein Befall der Nieren ist oft nur sonografisch nachweisbar (1). Infiltrate von Haut, Lunge, Herz, Orbita, Gingiva oder der Parotis, auch als Mikulicz-Syndrom bezeichnet, treten selten auf (1, 12).

Lebensbedrohliche Komplikationen bei Erstdiagnose umfassen Sepsis, Blutungen und Zellyse-Syndrom. Der Zerfall der malignen Zellen führt zu einem Anstieg von Kalium und Phosphat im Blut, was Herzrhythmusstörungen und Nierenversagen hervorrufen kann (7). Ebenso können Laktatdehydrogenase (LDH) und Harnsäure stark erhöht sein (10). Durch die kontinuierliche Ausschwemmung von Blasten in das periphere Blut erhöht sich der Hämatokrit und damit die Viskosität des Blutes. Dieses, als Leukostase bezeichnete Phänomen, erhöht das Risiko von Herzversagen, akutem Lungenödem sowie Insulten (3). Bei Infiltration des Thymus im Rahmen einer T-ALL und die dadurch resultierende Größenzunahme kann eine Obstruktion der Atemwege auftreten (3).

1.1.4 Einteilung der ALL

Anhand von zytomorphologischen, zytochemischen und immunphänotypischen Kriterien sind zahlreiche Subtypen zu unterscheiden. Als Erkrankung des lymphatischen Systems fällt die ALL in die Kategorie der Non-Hodgkin-Lymphome (13). Lymphome sind Malignome, die vom lymphatischen Gewebe ausgehen (5). Lymphoblastische Lymphome und ALL sind zytomorphologisch sowie

immunologisch ident, die Unterscheidung erfolgt durch das Ausmaß der Knochenmarkinfiltration. So spricht man bei > 25% lymphatischen Blasten im Knochenmark von einer ALL, bei < 25% von einem lymphoblastischen Lymphom Stadium IV (14). Die akute myeloische Leukämie (AML), welche sich von Vorläuferzellen des myeloischen Systems herleitet, kann bereits anhand von Zytologie und Zytochemie differenziert werden (14). Die ALL-Blasten werden nach der FAB-(French-American-British) Klassifikation in L1, L2 und L3 eingeteilt (**Tabelle 3**). Die Unterscheidung in L1- und L2-Subtypen ist nicht mehr klinisch relevant; der L3-Subtyp findet sich bei der Burkitt-Leukämie, welche anders behandelt wird als die T- und BCP (B-cell precursor)-ALL (1, 14).

	L1	L2	L3
Zellgröße	klein	groß, heterogen	groß, homogen
Chromatinstruktur	homogen	heterogen	homogen
Kernform	regelmäßig, gelegentlich Einkerbungen	unregelmäßig, häufig Einkerbungen	regelmäßig, oval bis rund
Nukleolen	keine oder klein/ unverdächtig	einer oder mehrere, oft groß	einer oder mehrere, groß
Zytoplasma-Menge	wenig	unterschiedlich	mäßig vermehrt
Zytoplasma-Basophilie	wenig	unterschiedlich	intensiv
Zytoplasma-Vakuolen	unterschiedlich	unterschiedlich	oft deutlich
Inzidenz	27%	68%	5%

Tabelle 3: Morphologische Klassifikation der ALL nach FAB. Modifiziert nach Freund M. 2008 (14)

Immunologische Verfahren erlauben die Zuordnung der Blasten zur B- oder T-Zellreihe, wobei die BCP-ALL über 80% der ALL im Kindes- und Jugendalter ausmacht (7). Hierbei werden an der Außenseite der Zellmembran oder intrazellulär gelegene Antigene nachgewiesen (15). Diese Cluster of differentiation (CD) ermöglichen eine Unterscheidung zwischen ALL und AML bzw. T- und BCP-ALL (**Abbildung 2**). Nach den Reifungsstadien sind innerhalb der B- und T-Zellreihen zu unterscheiden: pro-B-, C (common)-, prä-B-, mature B-, pro-T-, prä-T-, cortical T- und mature T-ALL. Die C-ALL bildet mit 60-70% den größten Anteil unter den ALL-Immunphänotypen bei Kindern und Jugendlichen, gefolgt von der prä-B-ALL mit einer Häufigkeit von 20% (7). Die reife B-ALL („Burkitt-ALL“) muss

auf Grund von unterschiedlicher Biologie und Therapie von den BCP-ALL unterschieden werden (14).

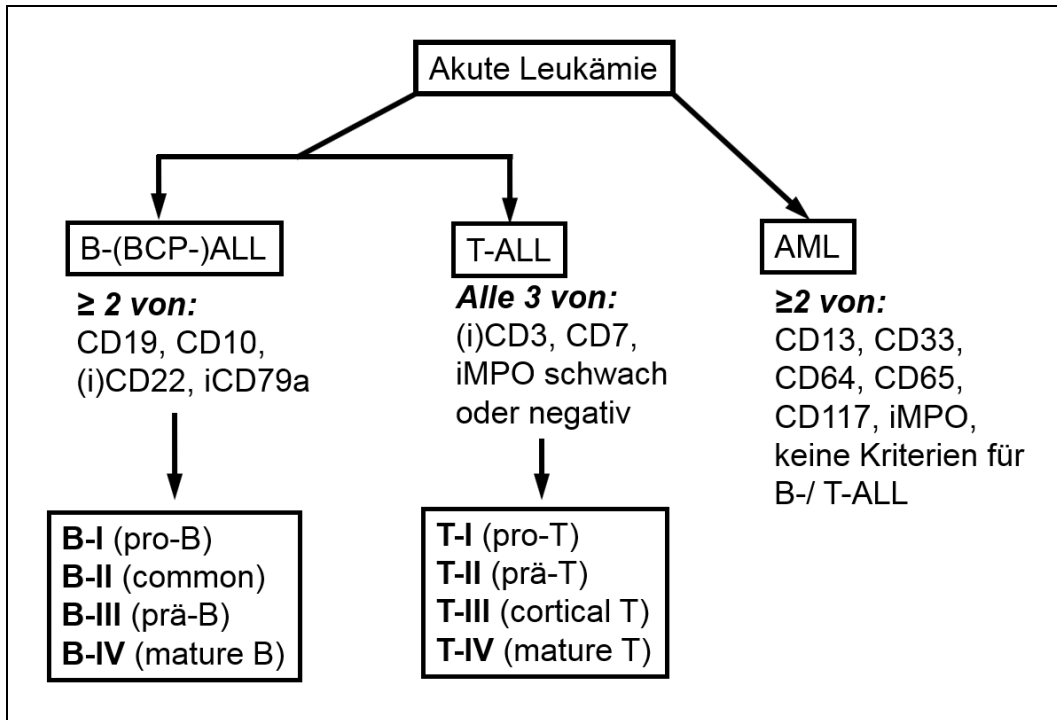


Abbildung 2: Immunphänotypische Subgruppen bei akuten Leukämien nach der AIEOP-BFM-Gruppe. Modifiziert nach Dworzak MN, et al. 2016 (16)

1.1.5 Diagnostik

Bei Verdacht auf eine akute Leukämie ist zuerst das Differentialblutbild und der Blutaussstrich zu beurteilen (3). Die Anzahl der Leukozyten kann erniedrigt (25% der Patientinnen und Patienten), normal (25%) oder erhöht (50%) sein, wobei eine Leukozytose mit einer ungünstigeren Prognose einhergeht (17).

Anämie und Thrombopenie können unterschiedlich stark ausgeprägt sein, oft findet sich sogar eine Panzytopenie. Eine niedrige Hämoglobin-Konzentration spricht eher für eine langsame und eine höhere Konzentration für eine rasche Progredienz (10). Über 90% aller Betroffenen zeigen eine Thrombopenie (1). Die weiterführende Diagnostik umfasst Zytologie, Zytochemie, Immunphänotypisierung (auch als Flowzytometrie oder FACS-Analyse bezeichnet), Zytogenetik, Molekulargenetik der leukämischen Blasten und klinische Diagnostik (Abbildung 3) (17).

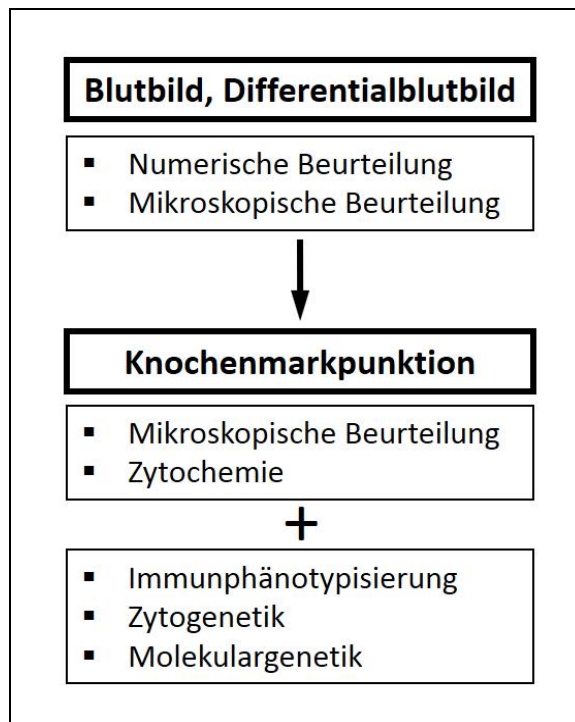


Abbildung 3: Diagnostisches Vorgehen bei Verdacht auf ALL

Knochenmark wird durch Punktion der Spina iliaca posterior superior gewonnen. Eine Biopsie ist nicht unbedingt erforderlich. Ausstriche bzw. die Schnitte der Stanze werden von Hämatologen bzw. Pathologen zuerst morphologisch beurteilt. Die zytochemischen Untersuchungen nutzen zelleigene Enzyme, um farblose Substrate in Farbstoffe zu überführen. Beispiel hierfür ist die Peroxidase-Reaktion. Die Peroxidase ist das Leitenzym der Granulopoese und kommt deshalb beim Nachweis einer myeloischen Leukämie zum Einsatz (14). Die Zytochemie hat inzwischen an Bedeutung verloren, da die Immunphäotypisierung eine rasche Linienzuordnung der leukämischen Blasten erlaubt (14). Die Gewinnung des Liquor cerebrospinalis erfolgt durch eine Lumbalpunktion im Rahmen der initialen Diagnostik. Die zytologische Untersuchung dient zum Ausschluss oder Nachweis eines Befalls des Zentralnervensystems (ZNS). Ein ZNS-Befall bzw. eine Meningeosis leucaemica liegt bei mehr als 5 Zellen/ μL pro Zählkammer und nachweisbaren leukämischen Blasten vor (1). Die initiale Diagnostik umfasst weiters eine Ultraschalluntersuchung von Abdomen, Retroperitoneum, Hoden, Mediastinum und Lymphknoten (17). Ein Thorax-Röntgen erlaubt die Darstellung mediastinaler Lymphknoten (10). Eine ophthalmologische Untersuchung dient dem Ausschluss einer Infiltration der Retina (17).

1.1.6 Therapie

Die Therapie besteht aus einer multimodalen, zytostatischen Chemotherapie mit dem Ziel eine komplette Remission als Grundvoraussetzung für eine Heilung zu erreichen. Diese erfolgt nach internationalen, multizentrischen, akademischen Therapieoptimierungsstudien der BFM-Gruppe (18). Anhand von Immunphänotyp, Molekulargenetik und Kinetik des Ansprechens erfolgt eine risikoadaptierte Behandlung. Das bedeutet, dass Patientinnen und Patienten mit günstigen Prognosekriterien und raschem, gutem Ansprechen auf die erste Therapiephase eine weniger intensive Behandlung bekommen. Zur Einteilung werden drei Risikogruppen definiert: Standardrisiko (SR), mittleres Risiko (MR) und Hochrisiko (HR) (18). Als unverzichtbarer Marker des Ansprechens auf die Therapie hat sich die Minimal residual disease (MRD) etabliert (19). Durch Polymerasekettenreaktion (PCR) und Durchflusszytometrie werden leukämische Blasten im peripheren Blut und Knochenmark regelmäßig quantifiziert (20). Diverse andere Kriterien gelten ebenso als prognostische Faktoren (**Tabelle 4**) (7, 17).

	Prognose	
	ungünstig	günstig
Alter	< 1 oder > 10	1 - 10
Initiale Leukozytenwerte	> 100 G/L	< 20 G/L
Geschlecht	männlich	weiblich
Chromosomenzahl	Hypodiploidie	Hyperdiploidie
Genetik	t(9;22)/ BCR-ABL; t(4;11)/ MLL-AF4	t(12;21)/ ETV6-RUNX1
Ansprechen auf Prednison-Vortherapie	Poor Prednisone Response	Good Prednisone Response
Nachweis der Resterkrankung (Minimal residual disease)	Positiv nach 12 Wochen	Negativ nach 5 Wochen

Tabelle 4: Prognostische Faktoren bei ALL im Kindes- und Jugendalter. Modifiziert nach Escherich G, et al. 2016 (17) und Lokeshwar MR, et al. 2016 (7)

Es werden vier Therapieabschnitte unterschieden, die in Summe ca. 24 Monate dauern (**Abbildung 4**) (1, 18).

1. Induktionstherapie (Protokoll I)
2. Konsolidierungstherapie (Protokoll M)
3. Reintensivierungsphase (Protokoll II oder III)
4. Erhaltungstherapie

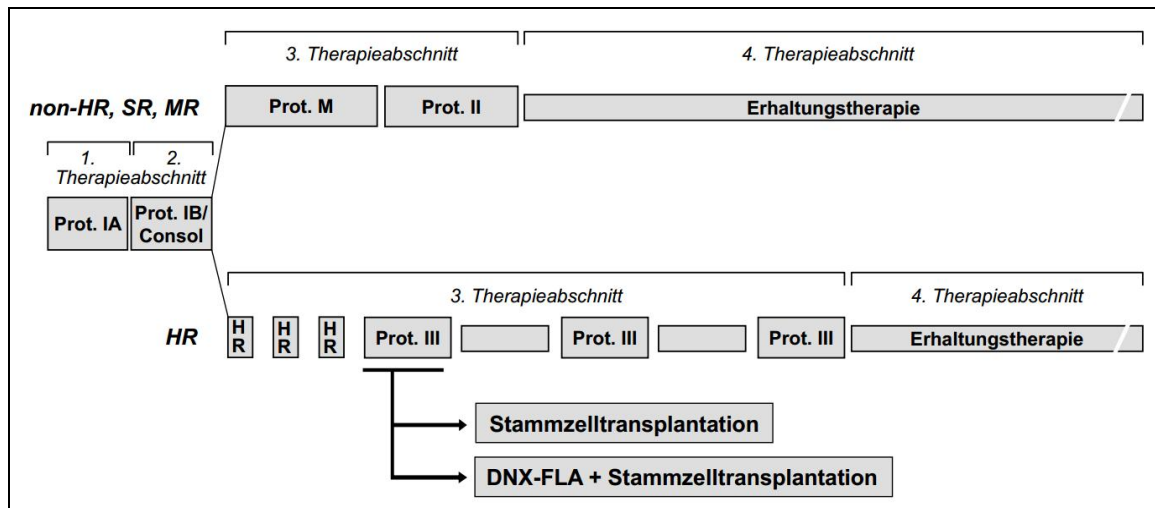


Abbildung 4: Übersicht Behandlungsplan AIEOP-BFM ALL 2017 bei BCP- und T-ALL. Schrappe M, et al. 2016 (18)

Ziel der Induktionstherapie (Protokoll I) ist das rasche und nachhaltige Absenken der Blastenlast und das Erzielen einer Remission. Diese wird zytomorphologisch, immunphänotypisch und PCR-basiert definiert (18). Als wichtigste Marker hierfür gilt die MRD (19, 22). Die ALL-BFM-Studien von 1981 bis 2000 haben gezeigt, dass sich ein rascher Rückgang der leukämischen Blasten durch eine intensive Induktionstherapie positiv auf die Prognose auswirkt (21). Im Protokoll M wird die Remission konsolidiert. Studien in den Achtzigerjahren haben gezeigt, dass die Prognose durch eine zusätzliche Reinduktionstherapie (Protokoll II bzw. III) weiter verbessert werden kann (18). Nach der Reinduktionstherapie folgt die Erhaltungstherapie bis zu einer Gesamttherapiedauer von 2 Jahren. Eine Verkürzung der Dauertherapie führt zu einer Zunahme der Rezidivrate (21). Lediglich bei Patientinnen und Patienten mit erhöhtem Rückfallrisiko ist eine Stammzelltransplantation indiziert (22, 23). Betroffen sind Kinder und Jugendliche mit besonders ungünstigen prognostischen Faktoren (24).

Durch den Einsatz von Chemotherapeutika, welche intrathekal verabreicht werden, kann in der Regel auf eine Schädelbestrahlung verzichtet werden (25). Eine Strahlentherapie bleibt nur Fällen mit einem hohen Risiko für ein ZNS-Rezidiv vorbehalten, wie T-ALL oder HR BCP-ALL (18, 21).

In der ersten Hälfte des vergangenen Jahrhunderts galt die akute Leukämie als Erkrankung mit infauster Prognose (26). Inzwischen kann mit modernen Therapiekonzepten ein leukämiefreies Überleben nach 10 Jahren in bis zu 95% der Fälle erzielt werden (21). Die größte Gruppe der Komplikationen bilden Rezidive (27). Patientinnen und Patienten mit vorausgehender Schädelbestrahlung haben außerdem ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von sekundären Hirntumoren (28).

1.2 Eukaryotische Initiationsfaktoren

Unter Proteinbiosynthese versteht man die Neubildung von Proteinen auf Basis der in der DNA enthaltenen genetischen Information. In deren Rahmen werden Eiweißmoleküle aus Aminosäuren aufgebaut. Sie umfasst Transkription, posttranskriptionale Modifikation, Translation und postranslationale Modifikation. Diese zellulären Prozesse sind sehr komplex und werden auf verschiedenen Ebenen reguliert. Die Gruppe der eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIF) nimmt hierbei eine Schlüsselrolle ein. Namensgebend ist der erste Abschnitt der Translation: die Initiation.

1.2.1 Initiationsphase der Translation

Im Anschluss an die Transkription wird die mRNA (messenger ribonucleic acid) vom Nucleus in das Zytoplasma transportiert, wo die Translation stattfindet. Diese besteht aus drei Phasen (**Abbildung 5**) (29, 30). Während der Initiation (1. Phase) wird das Startcodon ausgelesen, gebunden sowie die ribosomalen Untereinheiten 40S und 60S aneinandergesetzt. In der anschließenden Elongation (2. Phase) fusionieren die einzelnen Aminosäuren zu einer Polypeptidkette. Diese werden hierfür von tRNAs (transfer ribonucleic acid) zum Ribosom (makromolekulare Komplexe in Zellen für die Proteinsynthese) transportiert. Im als Termination bezeichneten Abschnitt (3. Phase) wird das Stopcodon erkannt und die Elongation des Eiweißmoleküls durch das Protein eRF1 (eukaryotic release factor 1) gestoppt. Das fertige Proteinpolymer kann abgespalten und der Ausgangszustand

wiederhergestellt werden. Daraufhin beginnt der Kreislauf erneut. Im endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat folgt die posttranslationale Modifikation, die eine komplexe dreidimensionale Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur des Proteins hervorbringt.

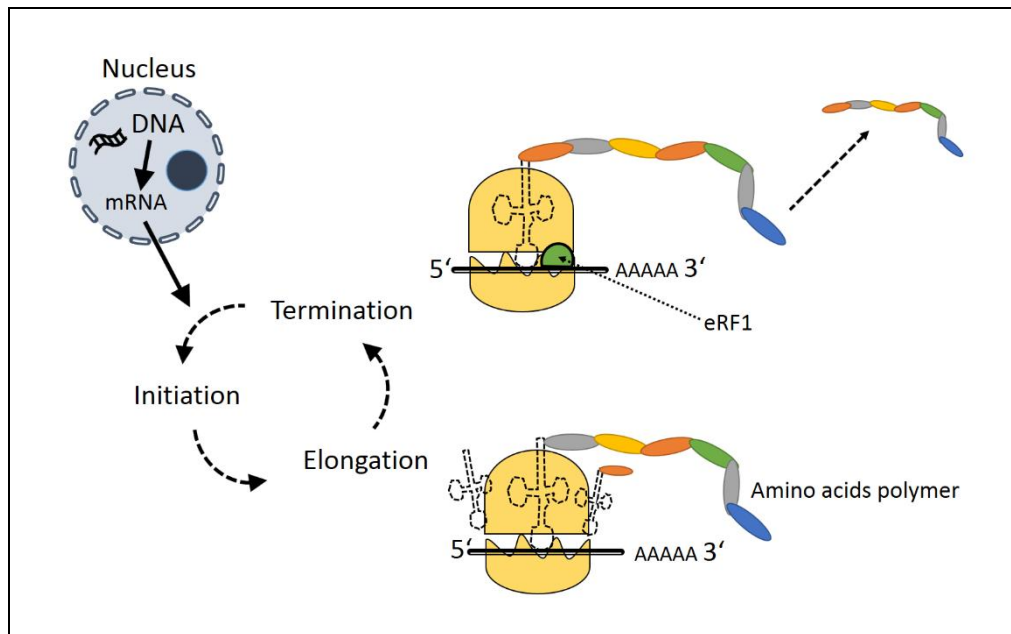


Abbildung 5: Ablauf der Translation

Post-Terminations-Komplex: Recycling

Sobald die Translation abgeschlossen ist, steht das Ribosom für einen weiteren Zyklus zur Verfügung. Das Ribosom und die daran gebundenen Faktoren werden als post-Terminations-Komplex (post-TC) bezeichnet (31). Der post-TC muss aufgespalten sowie tRNA, mRNA und eRF1 entfernt werden, damit ein weiterer Proteinsyntheseyklus beginnen kann (**Abbildung 6**). eIF1, eIF1A und eIF3 separieren die beiden ribosomalen Untereinheiten 40S und 60S (40S-, 60S-Subunit) (32). Dazu binden sie im Intersubunit Cleft an die 40S-Subunit. Außerdem verdrängt eIF1 die tRNA und eIF3 die mRNA (31). Im Intersubunit Cleft befinden sich nebeneinander drei Bindungsstellen: E, P, A. eIF1A lagert sich der A-Stelle und eIF1 der E-Stelle an. Die P-Stelle verbleibt leer, steht jedoch mit eIF1 in Verbindung. eIF6 verhindert, dass sich die gerade getrennten 40S- und 60S-Subunits wiedervereinigen, indem eIF6 an die 60S-Subunit bindet (33).

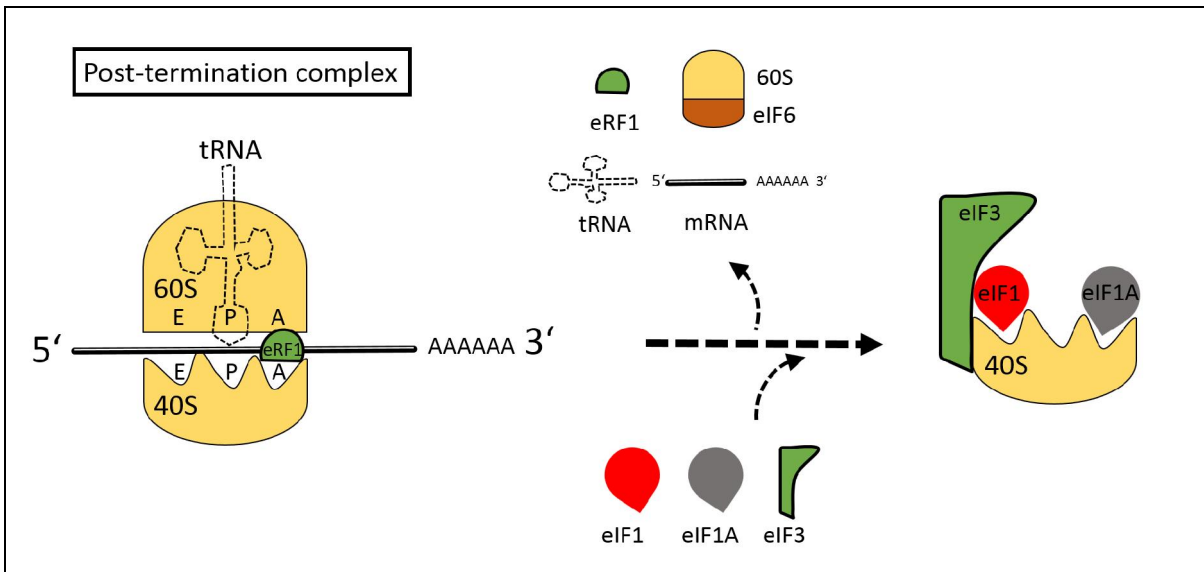


Abbildung 6: Recycling des Post-Terminations-Komplexes

43S-Präinitiations-Komplex: Vorbereitung für das Scanning

Es folgt die Bildung des 43S-Präinitiations-Komplexes durch Bindung des eIF2-GTP-Met-tRNA^{Met}-Komplexes (Ternary Complex) (**Abbildung 7**) (31). Die mit GTP beladene GTPase eIF2 reagiert mit der Initiations-tRNA, welche mit der ersten Aminosäure des entstehenden Proteins beladen ist: Methionin. Bindungsstelle des Ternary Complex ist die freie P-Stelle im Intersubunit Cleft des Ribosoms und liegt somit zwischen eIF1A (A-Stelle) und eIF1 (E-Stelle). eIF5 bindet spezifisch an eIF2 und dient im weiteren Verlauf zur dessen Regulation (31). Ternary Complex, eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5 und 40S-Subunit bilden zusammen den 43S-Präinitiations-Komplex.

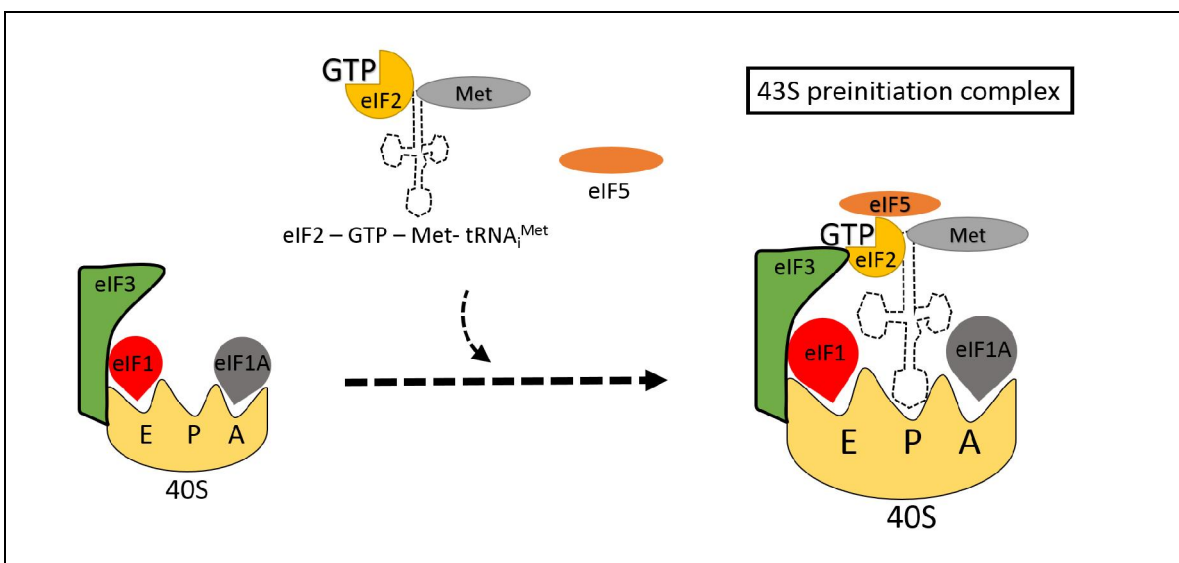


Abbildung 7: Aufbau des 43S-Präinitiations-Komplexes

48S-Initiations-Komplex: Kontakt mit der mRNA

Sobald der 43S-Präinitiations-Komplex für die Aufnahme der mRNA bereit ist, wird der eIF4-Komplex gebunden. Dieser setzt sich zusammen aus eIF4F (eIF4E, eIF4A und eIF4G), eIF4B und eIF4H; die mRNA ist diesem angelagert (31, 32). eIF4H und eIF4B unterstützen eIF4A und stehen mit diesem in Kontakt. mRNA, eIF4-Komplex und 43S-Präinitiations-Komplex werden als 48S-Initiations-Komplex bezeichnet (32).

Gesteuert durch eIF4G, eIF4A und eIF4H zieht die mRNA durch den Intersubunit Cleft des 43S-Präinitiations-Komplexes, dabei wird das 5'-Ende der mRNA von eIF4E fixiert (**Abbildung 8**). Nun passiert die mRNA der Reihe nach eIF1, die Initiations-tRNA und eIF1A.

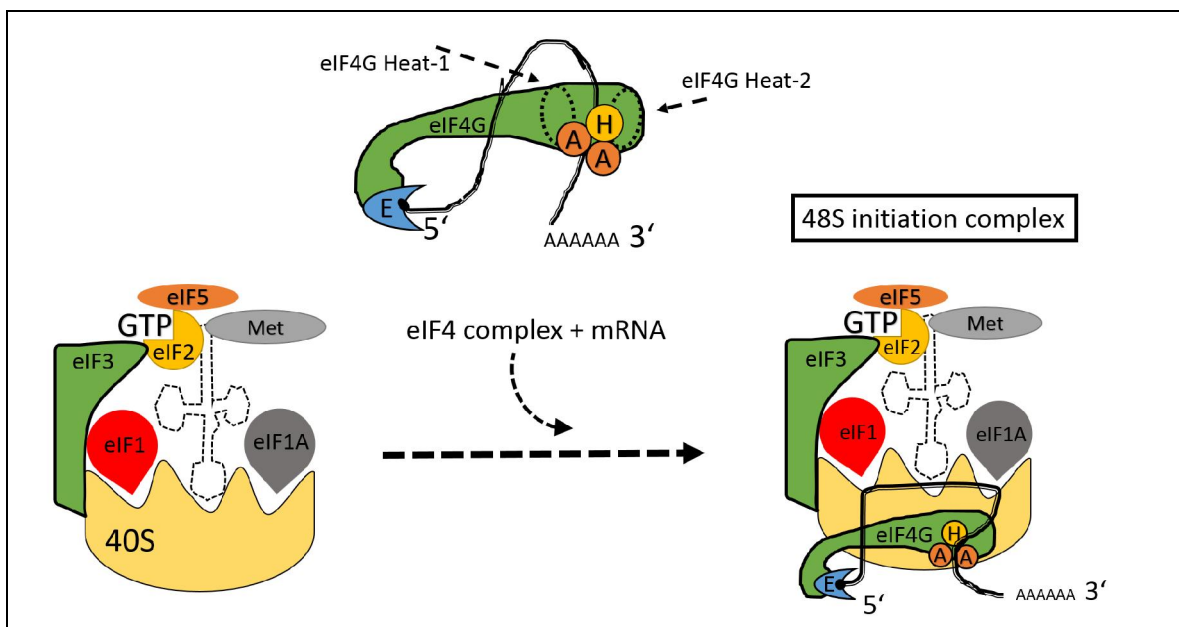


Abbildung 8: Aufbau des 48S-Initiations-Komplexes

mRNA-Startcodon: Scanning und Bindung

Das Scanning der mRNA nach dem Startcodon bzw. dessen Basentriplett AUG (Adenin-Uracil-Guanin) ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Initiation (30). Dieses erfolgt vom 5'- zum 3'-Ende der mRNA. Ziel ist eine stabile Codon-Anticodon-Bindung mit dem Startcodon. eIF1 kontrolliert, dass nur das korrekte AUG Basentriplett gebunden wird bzw. Fehlbindungen aufgelöst werden (31). eIF1A kommt hierbei eine unterstützende Funktion zu.

Damit ein AUG-Basentriplett als Startcodon gebunden werden kann, müssen gewisse Kriterien erfüllt sein (**Abbildung 9**) (31):

- Richtung 3'-Ende der mRNA: nach AUG ein Guanin;
- Richtung 5'-Ende der mRNA: drei Stellen vor AUG, entweder Adenin oder Guanin;
- Mindestens acht Basen Abstand zum 5'-Ende der mRNA vor AUG.

Erfüllt ein AUG-Basentriplett diese Kriterien, wird eIF2 von eIF5 aktiviert. eIF2 ist eine GTPase und dephosphoryliert GTP zu GDP. So kann die Initiations-tRNA eine stabile Codon-Anticodon-Bindung mit der mRNA eingehen. eIF2 und dessen GDP werden partiell abgespalten. Im weiteren Verlauf wird GDP von eIF2B wieder zu GTP phosphoryliert und reaktiviert dadurch eIF2 (32).

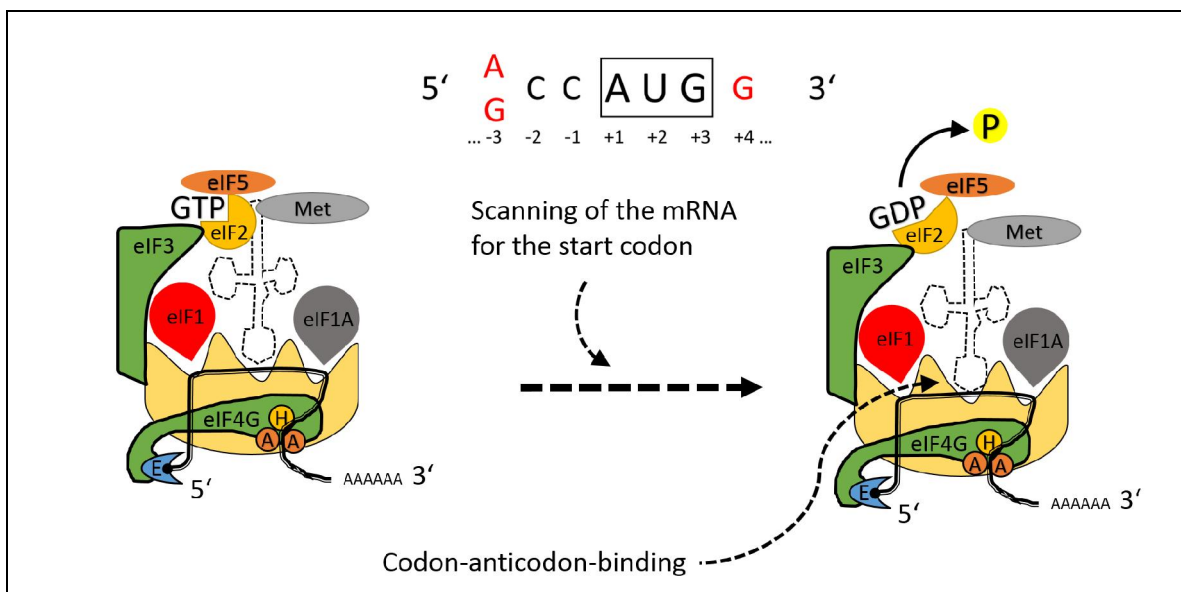


Abbildung 9: Scanning der mRNA

80S-Initiations-Komplex: Abschluss der Initiation

Um mit der Elongation fortfahren zu können, müssen alle nicht mehr benötigten eIF abgespalten und die 60S-Subunit gebunden werden (29). Dieser Prozess setzt sich aus zwei Schritten zusammen (31).

Schritt 1 (**Abbildung 10**): Nach Bindung an das Startcodon werden alle nicht mehr benötigten eIF abgespalten; die 60S-Subunit lagert sich an die 40S-Subunit, tRNA und mRNA an. Hierfür bindet eIF5B im Intersubunit Cleft und löst mit Hilfe von eIF1A die übrigen eIF von deren Bindungsstellen. Der 80S-Initiations-Komplex entsteht.

Schritt 2 (**Abbildung 11**): Sobald nur noch eIF1A und eIF5B im Intersubunit Cleft verbleiben, wandelt eIF5B GTP zu GDP um. Dadurch löst sich eIF5B selbst vom 80S-Komplex. Unterstützt wird eIF5B hierbei von eIF1A, welches sich als letztes abspaltet.

1.2.2 eIF-Subtypen

eIF1

Zu Beginn der Initiation löst eIF1 die vom vorhergegangenen Initiations-Zyklus verbliebene mRNA und tRNA und unterstützt dadurch die Spaltung des 80S-Ribosoms (31). Weiters reguliert eIF1 die Startcodon-Anticodon-Bindung, indem sich eIF1 von der P-Stelle der 40S-Subunit entfernt. Dies wird als Open Configuration bezeichnet. Werden die Kriterien für das Startcodon nicht erfüllt, verbleibt eIF1 in seiner Position (Closed Configuration). Im Falle einer instabilen Codon-Anticodon-Bindung bzw. bei fehlerhaftem Scanning, kann eIF1 diese Bindungen lösen. Somit überwacht eIF1 den physiologischen Ablauf dieser Bindung (32).

eIF1A

Funktionell wirken eIF1A und eIF1 während der Initiation zusammen. eIF1A besteht aus zwei Anteilen: NTT- und CTT-Teil (31). Beide stehen in enger Beziehung zur P-Stelle der 40S-Subunit und regulieren wie eIF1 die Suche nach dem Startcodon und dessen korrekte Bindung. Der NTT-Teil begünstigt die Closed Configuration; eine stabile Codon-Anticodon-Bindung wird verhindert. Der CTT-Teil unterstützt die Open Configuration (31); das Startcodon kann gebunden werden. Während des Scanning-Prozesses wirkt eIF1 an den ersten zwei Basen und eIF1A an der dritten Base des Basentriplets (32).

eIF3-Komplex

eIF3 dient als Gerüst für weitere an der Initiation beteiligte Proteine. Er ist aus zwölf Untereinheiten aufgebaut und ist dadurch der größte eIF (32). Zu Beginn der Initiation reagiert eIF3 mit der 40S-Subunit und blockiert die erneute Vereinigung mit der 60S-Subunit (34). Weiters besteht Kontakt zu eIF1, eIF4B und eIF5. Ebenso verhindert der eIF3-Komplex, dass die mRNA frühzeitig abgespalten wird (31). Resultat wäre der Abbruch des Scanning-Prozesses, was zu einer Unterbrechung des Syntheseprozesses bzw. einem fehlerhaften Protein führen könnte (32).

eIF6

eIF6 bindet an die 60S-Subunit und verhindert eine verfrühte Vereinigung mit der 40S-Subunit (32). Im Gegensatz zu den anderen eIF geht die Funktion jedoch über die Initiation hinaus. eIF6 regt im Nucleus die Biogenese-Prozesse zur Bildung neuer 60S-Subunits an (33). Anders als die übrigen eIF bindet eIF6 nie an die für die Initiation zentrale 40S-Subunit (31). Eine gesteigerte eIF6-Expression konnte bei diversen malignen Erkrankungen nachgewiesen werden bzw. führt eine Reduktion zu einer Abnahme maligner Transformationen in eukaryotischen Zellen (32).

eIF2-GTP-Met-tRNA^{Met}-Komplex

eIF2 gehört zu den GTPasen und dephosphoryliert GTP zu GDP, wodurch Energie für weitere Reaktionen zur Verfügung gestellt wird. Weiters führt eIF2 die erste und mit Methionin beladene tRNA (Met- tRNA^{Met}) an die 40S-Subunit heran und bindet diese an die 40S-Subunit (31). eIF2 besteht aus drei Untereinheiten: eIF2 α , eIF2 β und eIF2 γ . eIF2 γ erfüllt die eigentliche GTPase-Funktion (32). Das GTPase-aktivierende-Protein eIF5 bindet an eIF2 β , wodurch eIF2 γ aktiviert wird. eIF2 α steht sowohl mit eIF2 β als auch eIF2 γ in Kontakt. Liegt eIF2 α phosphoryliert vor, wird die GTPase-Funktion von eIF2 blockiert und der Protein-Syntheseprozess gehemmt (**Abbildung 12**) (34). Ursächlich hierfür ist zellulärer Stress (32). Um diesen Zustand effektiver überwinden zu können, wird die Proteinsynthese unterdrückt und die dafür benötigten Substrate umverteilt. Im Gegensatz dazu kann nicht phosphoryliertes eIF2 α zu einer gesteigerten Syntheseleistung führen (32, 34).

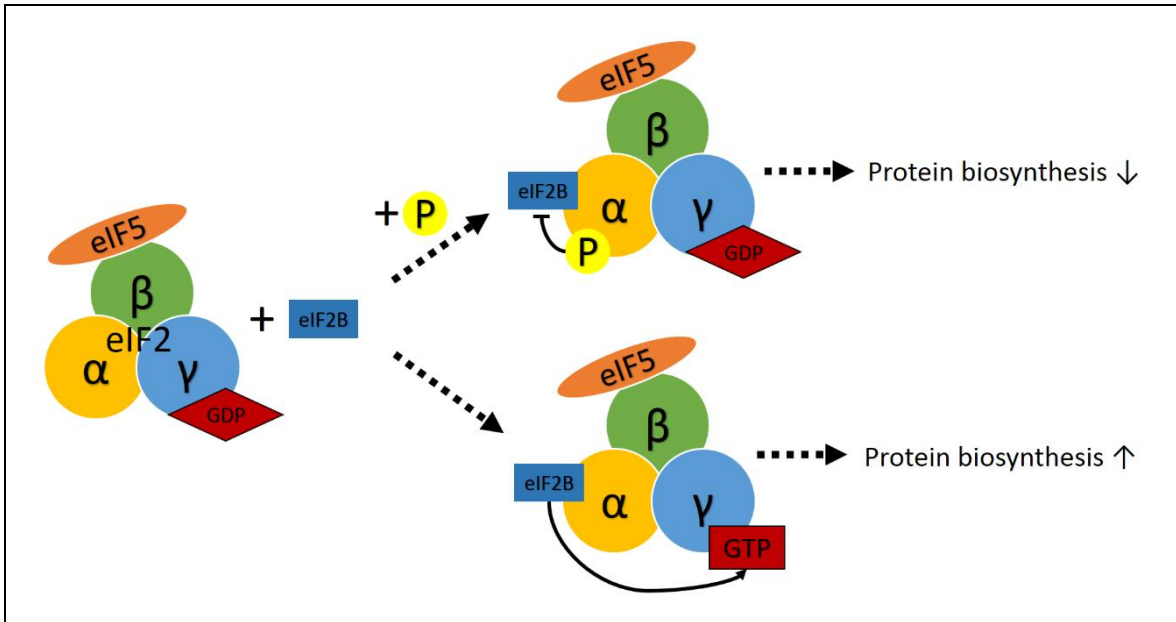


Abbildung 12: Hemmung der Proteinbiosynthese durch eIF2 α -Phosphorylierung

eIF2B

eIF2B phosphoryliert das an eIF2 gebundene GDP zu GTP und reaktiviert somit eIF2 für den nächsten Translationszyklus (32). Hierfür bindet eIF2B an eIF2 α ; liegt eIF2 α phosphoryliert vor, wird eIF2B gehemmt und GDP kann nicht zu GTP umgewandelt werden (**Abbildung 12**) (32). Das Recycling von eIF2 bleibt aus.

eIF4-Komplex

Der eIF4-Komplex besteht aus mehreren Untereinheiten, wobei eIF4A, eIF4E und eIF4G zu eIF4F zusammenfasst werden. eIF4G dient hierbei als Strukturprotein und bildet das Gerüst für die übrigen eIF4-Untereinheiten sowie die mRNA. Außerdem fixiert eIF4G den eIF4-Komplex an der 40S-Subunit (31). eIF4A gehört zu den Helikasen (Enzyme, welche die Basenpaarungen von DNA/RNA auflösen) und bereitet die mRNA für das Scanning vor (31). Stimuliert wird dieses Enzym durch eIF4B und eIF4H, welche sich direkt an eIF4A anlagern. Ob eIF4B und eIF4H für die Initiation notwendig sind, ist nicht abschließend geklärt (32). eIF4E bindet das 5'-Ende der mRNA an den eIF4F-Komplex. In ca. 30% hinsichtlich des Expressionsprofils von eIF untersuchten malignen Erkrankungen lag eine gesteigerte Expression von eIF4E vor (32). Eine vermehrte eIF4G-Aktivität führt nachweislich zu unkontrollierter Translation, Proliferation sowie Hemmung der Apoptose (31).

eIF5

Die Regulation von eIF2 erfolgt durch eIF5 (34). eIF5 selbst gehört zu den GTPase-aktivierenden-Proteinen (GAP; Enzyme, die GTPasen steuern) und bindet an den eIF2 β -Anteil von eIF2 (32). Zusätzlich überwacht eIF5 das Recycling von eIF2-GDP zu eIF2-GTP. Dieses indirekte Eingreifen in Scanning und Bindung des Startcodons macht eIF5 zu einem wichtigen regulatorischen Protein. Zwei Isoformen (Proteinvarianten) für eIF5 sind bekannt: eIF5A1 und eIF5A2 (32). eIF5A1 konnte vermehrt in rasch proliferierenden Geweben nachgewiesen werden (33).

eIF5B

Am Übergang von Initiation zu Elongation fügt eIF5B die ribosomalen Untereinheiten im „Subunit joining process“ zum 80S-Komplex zusammen. Hierfür bindet eIF5B im Intersubunit Cleft. eIF1A unterstützt eIF5B und verlässt zusammen mit eIF5B erst kurz vor oder während der Vereinigung die 40S-Subunit (32). eIF5B zählt wie eIF2 zum Enzymtyp der GTPasen; die Umwandlung von GTP zu GDP dient hierbei der eigenen Abspaltung von der 40S-Subunit (33).

1.2.3 Eingriff in die Proteinsynthese: mTOR-Pathway

Eukaryotische Zellen regulieren über diverse Mechanismen Energiehaushalt und Wachstum bzw. passen sich an das jeweilige Nährstoffangebot an. Der mTOR-Pathway greift in diese zellulären Vorgänge und Signalwege zur Steuerung von Proliferation und Zellwachstum ein (32). Das Akronym mTOR steht für „mechanistic Target of Rapamycin“ (35). Rapamycin gehört zur Gruppe der mTOR-Inhibitoren und wird als anti-proliferatives Medikament im Rahmen von onkologischen, aber auch immunsuppressiven Therapien eingesetzt.

mTOR ist ein Enzym, welches Serin- oder Threoninreste von Proteinen phosphoryliert und diese dadurch aktiviert. Ebenso bildet mTOR die Komplexe mTORC1 und mTORC2 (mTOR Containing Complex) (32). Eine hohe Konzentration von Aminosäuren, Sauerstoff und Wachstumsfaktoren führt dazu, dass mTORC1 den Metabolismus der Zelle auf ein anaboles Niveau hebt (36). Weiters werden Protein- und Lipidsynthese gesteigert, der Zellzyklus beschleunigt sowie Autophagie und Apoptose gehemmt. Diese proliferative und wachstumsfördernde Wirkung des mTOR-Pathways wird jedoch auch mit der

Entstehung von Krebs, Diabetes mellitus Typ 2 und Übergewicht in Verbindung gebracht (35). Die Regulation der eIF durch mTORC1 erfolgt indirekt, indem hemmende Faktoren ausgeschaltet werden (36). eIF4E wird durch 4E-BP1 (4E-binding protein 1) gebunden und kann nicht mit dem 5'-Ende der mRNA reagieren. mTORC1 phosphoryliert 4E-BP1, woraufhin dieses eIF4E für die Initiation freigibt (Abbildung 13).

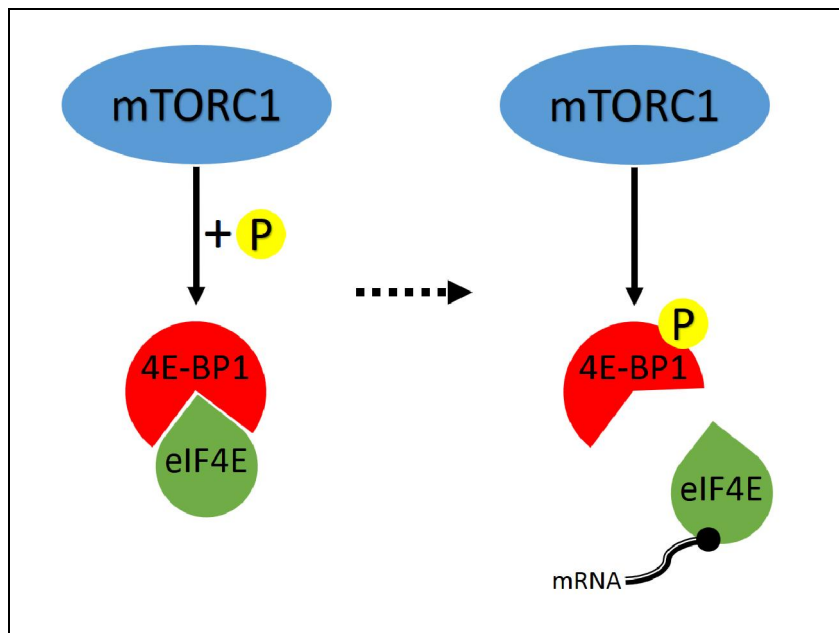


Abbildung 13: Regulation von eIF4E durch mTORC1

Krebszellen profitieren von einer gesteigerten Proteinsynthese. So können die für ihren Bedarf benötigten Proteine rasch und in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt werden. Eine vermehrte Phosphorylierung von 4E-BP1 führt zu einem gesteigerten Angebot an eIF4E. Eine Zunahme der Proteinsyntheseleistung ist die Folge. Die Rolle der 4E-BP1-eIF4E-Achse bei der Entstehung maligner Erkrankungen macht diese zu einem möglichen Ansatzpunkt für antiproliferative Therapien (37). Rapamycin selbst hemmt die Phosphorylierung von 4E-BP1 nur partiell, bei anderen mTOR-Inhibitoren – auch „Rapalogs“ genannt – ist noch wenig über den genauen Wirkmechanismus bekannt (35). Substanzen, welche zu einer deutlichen Reduktion des Zell- und Tumorwachstums führen, konnten bereits in vivo und in vitro erprobt werden (35, 37, 38). Eine weitere Funktion von mTORC1 stellt die Regulation von S6K1 (S6 kinase 1) durch Phosphorylierung dar. Durch die Aktivierung dieses Enzyms kommt es zu einer vermehrten Initiation und Elongation sowie einer Synthesesteigerung der mRNA sowie in weiter Folge einer Zunahme der Proteinsynthese (39). S6K1 stimuliert außerdem eIF4B und

dieses wiederum die Helikase eIF4A (**Abbildung 14**) (34, 35). Die Phosphorylierung von S6K1 bewirkt eine verstärkte Interaktion zwischen eIF3 und PAIP1 (Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1), einem Ko-Aktivator der Initiation (**Abbildung 14**) (40). PAIP1 steht ebenso mit eIF4A in Beziehung. Es wird vermutet, dass eIF3-PAIP1 die eIF4F-mRNA-Bindung sowie jene zwischen eIF4G und PABP (Poly(A) binding protein) stabilisiert (41). PABP befindet sich am Poly-A-Schwanz der mRNA. Eine höhere Stabilität der Bindungen zwischen den beteiligten Proteinen und in weiterer Folge eine effizientere Translations-Initiation sind die Folge.

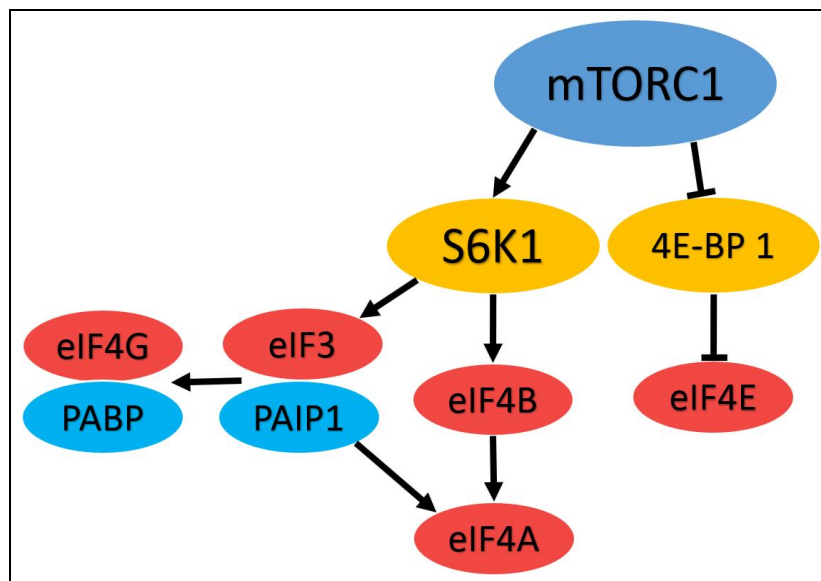


Abbildung 14: Von mTORC1 ausgehende Signalwege mit Beeinflussung der eIF

1.2.4 eIF2 α -Phosphorylierung als Stressreaktion

Vier Kinasen (Phosphatreste übertragende Enzyme) sind in der Lage eIF2 α zu phosphorylieren: PERK (PKR-like ER kinase), PKR (protein kinase double-stranded RNA-dependent), GCN2 (general control non-derepressible-2) und HRI (heme-regulated inhibitor) (42). Jedes dieser vier Enzyme wird bei einer spezifischen Art von zellulärem Stress aktiviert (43). Auslösend hierfür können beispielsweise Hypoxie, freie Radikale, Hitzeschock, schädigende Strahlung, Entzündung, fehlerhafte Proteine oder ein Mangel an für die Zelle überlebenswichtigen Substraten sein (34). Die molekularen Prozesse in Krebszellen sind eng mit zellulärem Stress verbunden (35). Durch die eIF2 α -Phosphorylierung wird die GTPase eIF2B gehemmt (**Abbildung 12**). Als Resultat fällt das Recycling von eIF2 aus und weniger Ternary-Komplexe stehen zur

Verfügung (42). Außerdem erhöht sich die Konzentration an 4E-BP1 und mehr eIF4E wird gebunden (34). Eine Reduktion der Proteinsynthese ist die Folge. Da Krebszellen auf eine gesteigerte Synthese diverser Proteine angewiesen sind, beeinträchtigt eine gesteigerte eIF2 α -Phosphorylierung deren Wachstum (44). Eine Reduktion hingegen fördert nachweislich eine maligne Transformation (45, 46).

Bei zellulärem Stress ist es möglich, dass von der klassischen bzw. kanonischen oder 5'-Cap-Dependent Translations-Initiation abgewichen wird (34, 43). Die Zelle kann als Stressreaktion auf eine nicht-kanonische Translations-Initiation zurückgreifen. Dadurch wird auf eine Bindung des 5'-Endes der mRNA (5'-cap-independent) bzw. auf einige eIF, wie eIF4E und eIF4G, verzichtet. Eine wichtige Rolle spielen hierbei uORF (upstream open reading frames) und IRES (internal ribosome entry sites) (47). ORFs sind jener Abschnitt des Transkripts, welcher nach dem Spleißen den Leserahmen für die Proteinsynthese bildet (48). „Upstream“ – also in Richtung des 5'-Endes – hierzu liegen uORF. Diese können knapp an die ORF anschließen oder sich mit ihnen überlappen (49). Während Phasen zellulären Stresses führen durch uORF kodierte Sequenzen zu einer Expressionssteigerung von pro-apoptotischen sowie den Zellzyklus regulierenden Proteinen (34). IRES stellen spezifische RNA-Abschnitte dar, welche dazu dienen, mit ribosomalen Untereinheiten in Kontakt zu treten. Anfangs nur bei viraler RNA beschrieben, ist mittlerweile bekannt, dass diese ebenso bei der Stress-Antwort eukaryotischer Zellen eine Rolle spielen (50). Manche IRES und uORF werden bei Vorliegen von phosphoryliertem eIF2 α aktiviert und sind in der Lage diese autoregulatorischen Mechanismen der eIF zu umgehen (47, 50). Eine Initiation ohne eIF4E und eIF4G wird möglich. So können Proteine synthetisiert werden, welche helfen, die Belastungssituation der Zelle zu überwinden oder bei irreparablen Schäden die Apoptose einzuleiten.

1.2.5 eIF-Expression bei Malignomen

Eine gestörte Regulation der Proteinsynthese spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung maligner Erkrankungen. Bisher konnte für eine Vielzahl an Malignomen auffällige eIF-Expressionsprofile nachgewiesen werden (**Tabelle 5**) (32, 43, 51).

Die Expression der eIF variiert unter den verschiedenen Malignomen (32). Unterschiede im eIF-Expressionsmuster können jedoch auch innerhalb einer Entität auftreten; so weist beispielsweise ein hepatozelluläres Karzinom viraler Genese andere eIF-Expressionsprofile auf als ein nicht viral bedingtes (52). Ebenso kann die eIF-Expression vom Grad der Differenzierung einer Entität abhängig sein. So ist die Expression von eIF2 α bei atypischen Meningeomen signifikant höher als bei benignen; ebenso besteht ein Unterschied zwischen hoch und niedrig differenzierten kolorektalen Karzinomen (53, 54). Der Grad der eIF2 α -Phosphorylierung wurde mit der Differenzierung von Osteosarkomzellen in Verbindung gebracht (45). Bisher wurden vor allem gesteigerte eIF-Expressionen für diverse Malignome beschrieben (32, 55). Ein Beispiel für reduzierte Expressionen stellt das Adenokarzinom des Pankreas dar, welches geringere Expression im Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe aufweist (56).

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Gesamtüberleben und eIF-Expression im Tumorgewebe wurde bei diversen Entitäten beschrieben werden. So geht eine hohe Expression an eIF4G beim Endometriumkarzinom und eine an eIF6 beim Gallenblasenkarzinom mit einer schlechteren Prognose einher (57, 58). Dies gilt ebenso für das diffuse großzellige B-Zell Lymphom, das eine erhöhte Expression von eIF2B aufweist (59). Im Gegensatz dazu ist eine Überexpression von eIF3a beim Harnblasenkarzinom sowie beim oralen Plattenepithelkarzinom mit einer günstigeren Prognose assoziiert (60, 61).

eIF-Subtypen	Expressions- muster	Malignome
eIF1	↑	Non-Hodgkin-Lymphom, hepatozelluläres Karzinom
eIF1A	↑	Melanom, Schilddrüsenkarzinom
eIF2α	↑	Melanom, Meningiom, Osteosarkom, Bronchus-, Schilddrüsenkarzinom, Non-Hodgkin-Lymphom
eIF3-Komplex:		
eIF3a	↑	Osteosarkom, Bronchus-, Cervix-, Magen-, Ösophagus-, Mamma-, kolorektales Karzinom
eIF3b	↑	Bronchus-, Mamma-, Harnblasen-, Prostata-, Ösophaguskarzinom
eIF3c	↑	Seminom, Meningiom, kolorektales Karzinom
eIF3d	↑	Magen-, Gallenblasenkarzinom
eIF3e	↓	Bronchus-, Mamma-, Prostata-, kolorektales Karzinom
eIF3f	↓	Melanom, Osteosarkom, Mamma-, Pankreas-, Ovarial-, Vulva-, kolorektales Karzinom
eIF3g	↑	Osteosarkom
eIF3h	↑	Bronchus-, Prostata-, Mamma-, hepatozelluläres-, kolorektales Karzinom
eIF3i	↑	Melanom, Neuroblastom, Mamma-, hepatozelluläres Karzinom
eIF3m	↑	Kolorektales Karzinom
eIF4-Komplex:		
eIF4A	↑	Hepatozelluläres Karzinom, Melanom
eIF4B	↑	Granulosazelltumor des Ovar, Leukämie, B-Zell-Lymphom
eIF4E	↑	Mamma-, Magen-, Bronchus-, Harnblasen-, Prostata-, Cervix-, Ovarial-, Ösophagus-, kolorektales Karzinom, Non-Hodgkin-Lymphom
eIF4G	↑	Bronchus-, Nasopharynx-, Mamma-, Cervixkarzinom
eIF4H	↑	Ösophagus-, kolorektales Karzinom
eIF5	↑	Ovarialkarzinom
eIF5B	↑	Hepatozelluläres Karzinom
eIF6	↑	Akute myeloische Leukämie, Mesotheliom, Ovarial-, kolorektales Karzinom

Tabelle 5: Auswahl maligner Erkrankungen mit auffälliger eIF-Expression. Modifiziert nach Ali MU, et al. 2017 (32), Spilka R, et al. 2013 (43) und Gomes-Duarte A, et al. 2018 (51)

Krebszellen zeichnen sich durch deregulierte zelluläre Prozesse aus, diese betreffen auch die Translations-Initiation. Mit der Deaktivierung einzelner eIF bzw. dem Knockout von eIF-regulierenden Genen im Mausmodell konnte eine reduzierte Tumorproliferation erreicht werden (32, 62). Proteinkinaseinhibitoren wie die mTOR-Inhibitoren greifen in diese Signalwege ein und führen zu einer Apoptose der Tumorzellen (37). Speziell der eIF4-Komplex als ein geschwindigkeitsbestimmender Faktor der Initiation stellt einen potenziellen therapeutischen Ansatz dar (55, 63, 64).

2 Wissenschaftlicher Hintergrund und Studienhypothesen

Bei einer Vielzahl maligner Erkrankungen finden sich auffällige eIF-Expressionsprofile mit prognostischer Relevanz. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der eIF-Expressionsprofile im Knochenmark von Kindern und Jugendlichen mit ALL und die Korrelation der Ergebnisse mit klinischen Parametern.

Es wurden folgende Studienhypothesen generiert:

- Es liegt bei ALL, ähnlich wie bei anderen malignen Erkrankungen, eine Überexpression einzelner eIF vor.
- Bei verschiedenen Phänotypen, wie T-ALL und BCP-ALL, sind die eIF unterschiedlich stark exprimiert.
- Die Überexpression von eIF besitzt eine sowohl das erkrankungsfreie Überleben als auch das Gesamtüberleben betreffende prognostische Bedeutung.

3 Patientinnen- und Patientenkollektiv und Methodik

3.1 Patientinnen- und Patientenkollektiv, Ein- und Ausschlusskriterien

In die Studie wurden zytologisch bestätigte Fälle von ALL im Kindes- und Jugendalter eingeschlossen, welche an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde Graz in Behandlung waren.

Einschlusskriterien:

- Alter: 0-18 Jahre bei ALL-Erstdiagnose (ED)
- Geschlecht: männlich und weiblich
- Diagnose und Therapie an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde Graz im Zeitraum vom 1. Jänner 1990 bis zum 31. Dezember 2019

- Kryokonservierte Knochenmarkstanzen verfügbar (gelagert im Labor für Hämato- und Osteopathologie des Diagnostik- und Forschungsinstituts für Pathologie der Medizinischen Universität Graz)

Ausschlusskriterien:

- Alter über 18 Jahre bei ALL-Erstdiagnose
- ALL-Erstdiagnose außerhalb der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde Graz
- ALL-Phänotyp einer reifen/mature B-ALL
- Erhaltungstherapie am 31. Dezember 2019 nicht abgeschlossen
- Kein kryokonserviertes Knochenmark verfügbar
- Unvollständigkeit bei der retrospektiven Datenerhebung (keine Information zu Therapieansprechen, initialen Laborwerten oder Genetik vorliegend)

91 Patientinnen und Patienten erfüllten die Inklusionskriterien. Außerdem wurde das Knochenmark von zehn Patientinnen und Patienten analysiert, welches zwischen Abschluss der Induktionstherapie und Beginn des Protokoll M gewonnen worden war (**Abbildung 15**).

Die Kontrollgruppe setzte sich aus dem Peripherblut fünf gesunder, freiwilliger Probandinnen und Probanden zusammen.

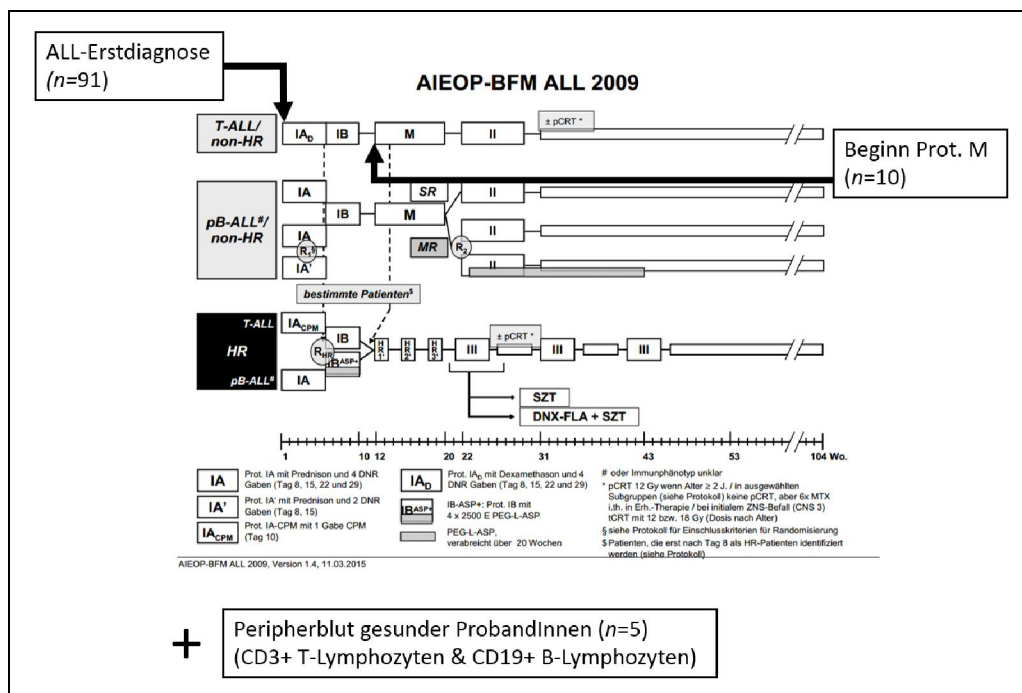


Abbildung 15: Entnahmezeitpunkte der Gewebeproben. Therapieübersicht AIEOP-BFM ALL 2009.

Schrappé M, et al. 2015 (65)

3.2 Methodik

Für die Bestimmung der eIF-Expression auf mRNA-Ebene wurden kryokonservierte Knochenmarkstanzen verwendet (**Abbildung 16**). Die Gewebeproben sowie die in weiterer Folge erhobenen Daten zu den Patientinnen und Patienten wurden pseudonymisiert.

Die Analyse des eIF-Expressionsprofils auf mRNA-Ebene in den Knochenmarkstanzen erfolgte für die Gene EIF1, EIF1A, EIF2A, EIF2B3, EIF2B4, EIF2B5, EIF2S1, EIF3D, EIF3J, EIF3L, EIF4E, EIF4E-BP1, EIF4G2, EIF4G3 und EIF5.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen eIF-Expressionsprofilen und klinischen Parametern zu untersuchen, erfolgte eine retrospektive Datenerhebung.

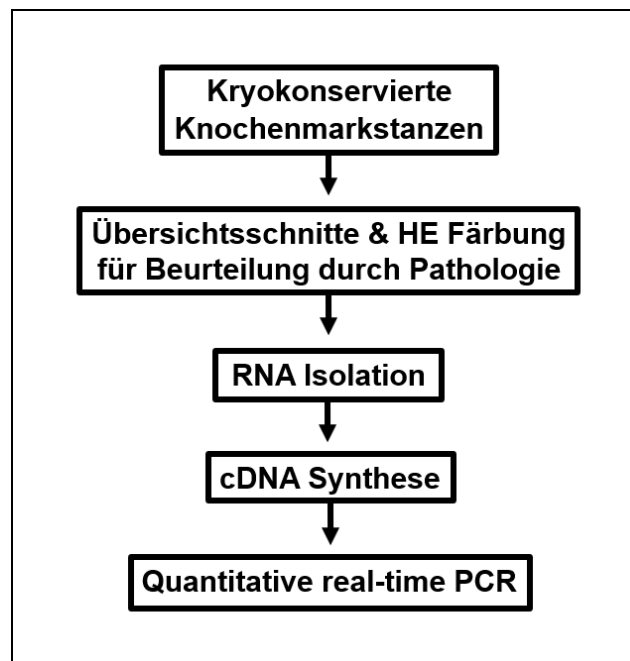


Abbildung 16: Übersicht zum angewandten analytischen Vorgehen

3.2.1 Vorbereitung und RNA-Isolation

Zur Identifikation von Arealen mit hoher Dichte an atypischen (malignen) Lymphoblasten innerhalb der Gewebeproben wurde von jedem Knochenmarkszylinder ein 2-3 µm dicker Schnitt angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Danach erfolgte die Beurteilung der Schnitte sowie die Markierung geeigneter Areale am Diagnostik- und Forschungsinstitut für Pathologie Graz durch eine Fachärztin für Pathologie.

Im Anschluss wurden mindestens zehn weitere Schnitte der im Übersichtsschnitt markierten Areale für die Analysen angefertigt. Das Peripherblut der Normalkontrollen wurde einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen und anschließend CD3⁺ T-Lymphozyten sowie CD19⁺ B-Lymphozyten selektioniert. Für die RNA-Isolation aus kryokonserviertem Material und Peripherblut wurde der miRNeasy Mini Kit (50) 217004 der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Herstelleranweisungen verwendet. Die Lyse der DNA erfolgte mittels DNase I, RNase-free #EN0521 der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). Mit dem Spektrophotometer der Firma DeNovix (Wilmington, Dänemark) wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

3.2.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mittels RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit K1622 100 reactions (Thermo Fisher Scientific) entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

3.2.3 Quantitative real-time PCR

Die quantitative Bestimmung der eIF-Expressionen wurde mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der Messung von Fluoreszenzsignalen während den PCR-Zyklen. Ein dem Reagenz beigefügter Farbstoff bindet an die Ziel-DNA. Mit Zunahme der DNA-Konzentration in jedem PCR-Zyklus erhöht sich die Intensität des gemessenen Farbsignals. Dies wird in einer Kurve dargestellt. Heftet sich der Farbstoff an Bindungen zweier Primer (Primer-Dimere), kann dies die Messung verfälschen. Durch eine gezielte Erhöhung der Temperatur werden die Bindungen im Reagenz rückgängig gemacht, wodurch der Farbstoff erneut freigesetzt wird. Die Messung dieser Abnahme der Fluoreszenz wird als Schmelzkurvenanalyse bezeichnet. DNA und Primer-Dimere weisen hierbei unterschiedliche Schmelzpunkte auf, was eine Unterscheidung ermöglicht. Der CT (Cyclethreshold)-Wert gibt an, ab welchem PCR-Zyklus eine ausreichend DNA-Replikation stattgefunden hat und das Messsignal den Hintergrundwert übersteigt.

Die PCR erfolgte mittels C1000 Touch Thermal Cycler CFX 384 Real-Time System der Firma Bio-Rad Laboratories (Hercules, Kalifornien, USA). Für die qRT-

PCR wurde ein Luna Universal qPCR Master Mix M3003E 2.500 reactions der Firma New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA) verwendet: 2.000 µL Luna Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs), je 8 µL 100 µM Forward sowie Reverse Primer (**Tabelle 6**) und 400 µL Aqua destillata (für 400 Reaktionen). Für den Einzelansatz wurden 6 µL PCR-Mastermix und 4 µL cDNA verwendet. Der erste Zyklus erfolgte mit 95°C für 60 Sekunden, gefolgt von 45 Zyklen mit jeweils 95°C für 15 Sekunden und 60°C für 30 Sekunden.

Bezeichnung	Sequenz (Orientierung 5' → 3')	Bezeichnung	Sequenz (Orientierung 5' → 3')
GAPDH-f GAPDH-r	AAGGTCGGAGTCAACGGATTT ACCAGAGTTAAAAGCAGCCCTG	EIF2S1-f EIF2S1-r	TGGTGAATGTCAGATCCATTGC TAGAACGGATACGCCTTCTGG
PPIA-f PPIA-r	GGCAAATGCTGGACCCAACACA TGCTGGTCTTGCCATTCTGGA	EIF3D-f EIF3D-r	CAGCGGAATCGAATGAGATTTGC GTTTGGCACTCTTAGGCAGGA
ACTB-f ACTB-r	CTGGAACGGTGAAGGTGACA AAGGGACTTCTGTAAACAATGCA	EIF3J-f EIF3J-r	TGCCACAATCCCTTGAACA GGCAGCAAGATCCAAGTTCC
HPRT-1-f HPRT-1-r	CATTATGCTGAGGATTTGGAAAGG CTTGAGCACACAGAGGGCTACA	EIF3L-f EIF3L-r	GGAGGAGATTGACTTTCTTCGTT TTGGATTTGTCTACCAGGGAATG
EIF1-f EIF1-r	GAAACGGCAGGAAGACCCTTA CGGATGCTCAATTACAGTACCAT	EIF4E-f EIF4E-r	TGCGGCTGATCTCCAAGTTTG CCCACATAGGCTCAATACCATC
EIF1A-f EIF1A-r	AACAGACGCAGGGGTAAGAAT CCTGAGCATACTCTGACCAT	EIF4E-BP1-f EIF4E-BP1-r	CACCCCGGGAGGTACCAGGATC CGCCCGCCCGCTTATCTTCT
EIF2A-f EIF2A-r	GACCCCAACCATACAAGGTGG TTCTCCATAGTAGGAAGCTCCTG	EIF4G2-f EIF4G2-r	AGGGCAAAACGCTCAGAAATG TCCTGAAGATTGCATCATGTCC
EIF2B3-f EIF2B3-r	GTGGAGGATCTCGGATGACAG GCTCAAGCAGGTTCAATGGGT	EIF4G3-f EIF4G3-r	CCTAGAGCTACCATCCCGAAC GGGCCACTATGACGGTACTG
EIF2B4-f EIF2B4-r	CAGAGAAGTCCAGAATCGGG GTTCCGGCCTTACTCCGACC	EIF5-f EIF5-r	AGCGTGTGACAGCAGTTCTAT CTGTCTTGATTCCATTGCCTTTG
EIF2B5-f EIF2B5-r	TTCTGGTGGCCGATAGCTTC AGCTTCCAGCAACAAAAGACA		

Tabelle 6: Primer für die qRT-PCR

3.2.4 Korrelation mit klinischen Parametern

Um die eIF-Expressionsprofile mit klinischen Daten korrelieren zu können, wurden folgende Daten der Patientinnen und Patienten der Studienkohorte retrospektiv erhoben:

- Geschlecht und Alter bei ALL-Erstdiagnose
- Hauptdiagnose: BCP-ALL, B-ALL, T-ALL, pro-B-ALL, prä-B-ALL, C-ALL, reife/mature B-ALL
- FAB-Klassifikation aus dem Knochenmarkausstrich
- Infiltration des ZNS (inklusive Befall der Retina) bei ALL-Erstdiagnose

- Leukozyten-, Thrombozytenzahl (G/L), Hämoglobinkonzentration (Hb; in g/dL), LDH (in U/L) bei ALL-Erstdiagnose
- Genotyp: Chromosomale Aberrationen und Translokationen, Veränderungen der Chromosomenzahl, Genfusionen (u.a. E2A-PBX1 und MLL-AF4)
- Zum Therapiezeitpunkt gültige Therapieoptimierungsstudie: ALL-BFM 1990, ALL-BFM 1995, ALL-BFM 2000, AIEOP-ALL BFM 2009
- Risikogruppe: HR, IR/MR, SR
- Therapieansprechen: MRD mit Hilfe von FCM (in %) und/oder PCR (in Blasten/ μ L)
- Events: Rezidiv, Tod in Remission, Sekundär malignom
- Remissionsstatus: Bis zum letzten dokumentierten Kontrolltermin in der Ambulanz der Klinischen Abteilung für Pädiatrische Hämato-Onkologie Graz oder im niedergelassenen Bereich

Untersucht wurden auf explorative Weise: Geschlecht (männlich vs. weiblich), Alter (< 6 Jahre vs. \geq 6 Jahre; < 6 Jahre vs. \geq 10 Jahre), FAB-Klassifikation (L1 vs. L2), Leukozyten (< 20 G/L vs. \geq 20 G/L; < 20 G/L vs. \geq 50 G/L), Thrombozyten (< 50 G/L vs. \geq 50 G/L; < 50 G/L vs. \geq 100 G/L), Hämoglobinkonzentration (< 7 g/dL vs. \geq 7 g/dL; < 7 g/dL vs. \geq 12 g/dL), LDH (< 200 G/L vs. \geq 200 G/L; < 200 G/L vs. \geq 1.000 G/L), Genotyp (Hyperdiploidie vs. keine Hyperdiploidie; t(12;21)/ETV6-RUNX1 vs. kein t(12;21)/ETV6-RUNX1), periphere Blastenzahl am Tag 8 (0/ μ L vs. \geq 100/ μ L; < 1.000/ μ L vs. \geq 1.000/ μ L), FCM-MRD an Tag 33 (0 % vs. > 0 %) und Events (Event vs. kein Event).

Die Erhebung erfolgte im medizinisch-pflegerischen Dokumentations- und Kommunikationsnetzwerk (openMEDOCS) der Steiermärkischen Krankenhaushilfsgesellschaft m.b.H. oder anhand ausgedruckter Befunde in Ambulanzkarten und Krankenakten.

3.3 Ethik und Sicherheit

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz genehmigt (EK 31-295 ex 18/19).

3.4 Statistische Analysen

Die Datenauswertung erfolgt mit dem Statistikprogramm IBM SPSS Statistics Version 26.0 der Firma IBM (Armonk, New York, USA). Zum Nachweis einer möglichen Normalverteilung kam der Shapiro-Wilk-Test zur Anwendung. Der t-Test und der Mann-Whitney-U-Test dienten zum Vergleich zweier Gruppen hinsichtlich quantitativer Merkmale. Bei einem p-Wert $<0,05$ wurde die Nullhypothese verworfen. Stetige Werte wurden mittels Mittelwert, Median, Standardabweichung, Minimum und Maximum zusammengefasst. Normalkontrollen und ALL-Gewebeproben wurden auf explorative Weise hinsichtlich der eIF-Expression auf mRNA-Ebene verglichen. Die grafische Darstellung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 9.3.1 der Firma GraphPad Software (San Diego, Kalifornien, USA).

4 Ergebnisse

4.1 Charakteristika der Studienkohorte

Im Beobachtungszeitraum befanden sich 259 Patientinnen und Patienten mit ALL an der Klinischen Abteilung für Pädiatrische Hämato-Onkologie der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde Graz in Behandlung (**Abbildung 17**). Unter Berücksichtigung der obengenannten Ein- und Ausschlusskriterien wurden 91 Patientinnen und Patienten in die Studie aufgenommen (**Tabelle 7, Tabelle 8**).

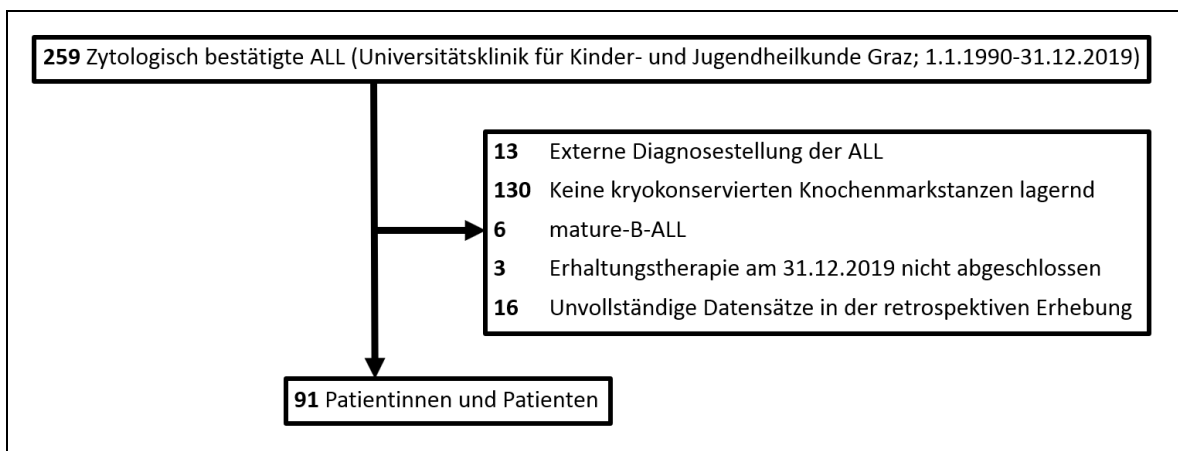


Abbildung 17: CONSORT-Diagramm der eingeschlossenen Patientinnen und Patienten

Das mediane Follow-Up betrug 133 Monate (Spannweite 29-265 Monate). Das ereignisfreie Überleben lag nach zwei Jahren bei 97,8%, nach fünf Jahren bei 93,2% und nach zehn Jahren bei 91,9% (**Abbildung 18**).

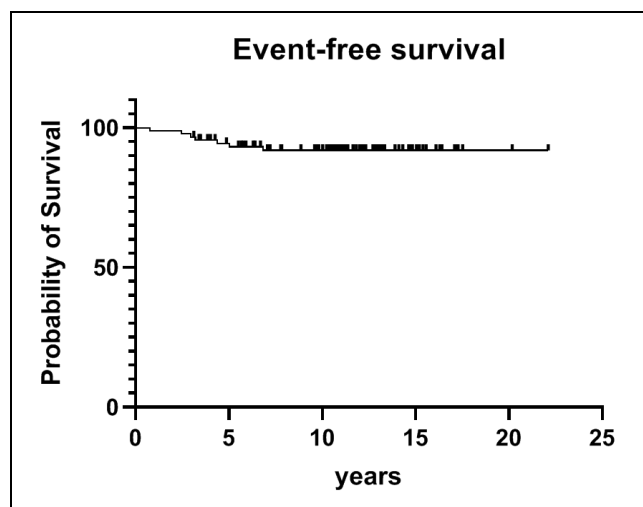


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurve für das ereignisfreie Überleben der Studienkohorte

Merkmal	Absolute Häufigkeit	Prozent
Geschlecht		
Männlich	56	61,5
Weiblich	35	38,5
Alter bei Erstdiagnose		
0. bis vollendetes 5. Lebensjahr	49	53,8
6. bis vollendetes 10. Lebensjahr	25	27,5
11. bis vollendetes 18. Lebensjahr	17	18,7
Immunphänotyp		
pro-B-ALL	10	11,0
C-ALL	48	52,7
prä-B-ALL	23	25,3
T-ALL	8	8,8
Hybrid-ALL	1	1,1
Infant-ALL	1	1,1
FAB-Klassifikation		
L1	67	73,6
L2	23	25,3
Fehlende Information	1	1,1
ZNS-Befall		
ZNS negativ	86	94,5
ZNS positiv	5	5,5
Leukozyten (G/L)		
< 4	17	18,7
4 - 19,9	41	45,0
20 - 49,9	17	18,7
≥ 50	16	17,6
Hb (g/dL)		
< 7	36	39,6
7 - 12,9	47	51,6
≥ 12	8	8,8
Thrombozyten (G/L)		
< 50	43	47,2
50 - 99,9	25	27,5
100 - 199,9	18	19,8
≥ 200	5	5,5
LDH (U/L)		
< 200	5	5,5
200 - 999	65	71,4
≥ 1.000	21	23,1
Genotyp		
t(12;21)/ETV6-RUNX1	14	15,4
t(1;19)/E2A-PBX1	5	5,5
Hyperdiploidie	25	27,5
Hypodiploidie	2	2,2
Andere auffällige Aberrationen	23	25,3
Unauffällig	15	16,4
Fehlende Information	2	2,2

Tabelle 7: Charakteristika der Studienkohorte

Merkmal	Absolute Häufigkeit	Prozent
Therapieprotokolle		
ALL-BFM 1990	14	15,4
ALL-BFM 1995	14	15,4
ALL-BFM 1999	6	6,6
ALL-BFM 2000	46	50,5
AIEOP-BFM ALL 2009	11	12,1
Periphere Blasten an Tag 8 (μL)		
0	13	14,3
> 0 - 99	26	28,6
100 - 999	19	20,9
≥ 1.000	3	3,2
Fehlende Information	30	33,0
FCM-MRD an Tag 33 (%)		
0	59	64,8
> 0	4	4,4
Fehlende Information	28	30,8
Events		
Rezidiv	4	4,4
Tod	1	1,1
Sekundärmalignom	2	2,2
Kein Event	84	92,3

Tabelle 8: Behandlung und Therapieansprechen der Studienkohorte

4.2 Auswertung der eIF-Expressionsprofile

Expressionsprofile bei Blasten der BCP-/T-Zellreihe im Vergleich zu Normalkontrollen

Die eIF-Expressionsprofile von Studienkohorte und Normalkontrolle wurden auf das Vorliegen auffälliger Expressionen untersucht, wobei Blasten der B-Zellreihe (BCP-ALL, pro-B-ALL, C-ALL, prä-B-ALL) mit CD19+ B-Lymphozyten und Blasten der T-Zellreihe (T-ALL) mit CD3+ T-Lymphozyten aus der Normalkontrolle verglichen wurden. Es zeigte sich eine signifikante Downregulation der mRNA-Level von sechs der 15 untersuchten eIF (eIF1, eIF2A, eIF3d, eIF3l, eIF4G2, eIF4G3).

Bei BCP-ALL fand sich im Vergleich zur Normalkontrolle eine reduzierte Expression von eIF2A ($p < 0,0001$), eIF3l ($p < 0,0001$) und eIF4G2 ($p = 0,0097$) (**Abbildung 19**). Ebenso wiesen die BCP-ALL Subtypen (pro-B-ALL, C-ALL, prä-B-ALL) eine signifikante Reduktion der mRNA-Level für eIF2A, eIF3l und eIF4G2 auf (**Abbildungen 20 und 21**). Bei T-ALL zeigte sich gegenüber der

Normalkontrolle eine Downregulation von eIF2A ($p=0,0319$), eIF3d ($p=0,0202$) und eIF3I ($p=0,0004$). Für eIF1 und eIF4G3 lag ebenfalls eine signifikant reduzierte Expression vor, jedoch nur bei einzelnen ALL-Immunchenotypen.

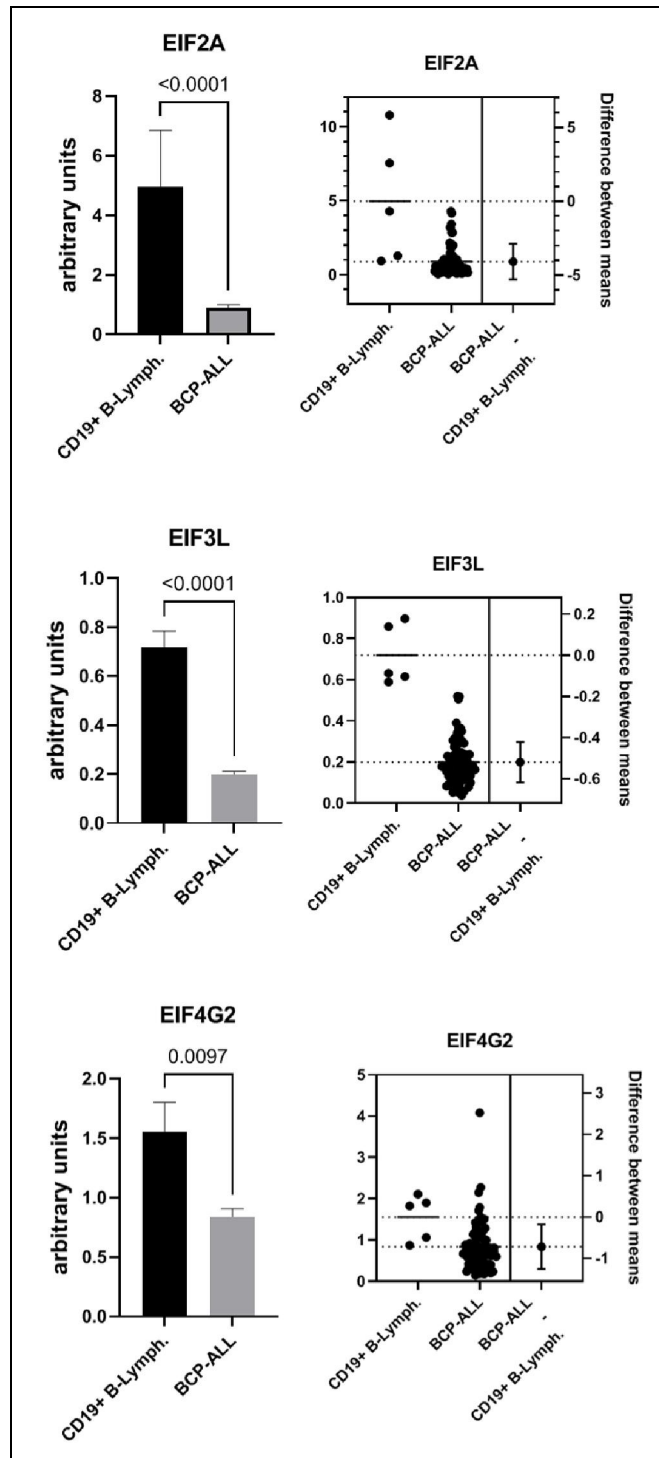


Abbildung 19: EIF2A-, EIF3L- und EIF4G2-Genexpression: BCP-ALL vs. Normalkontrolle

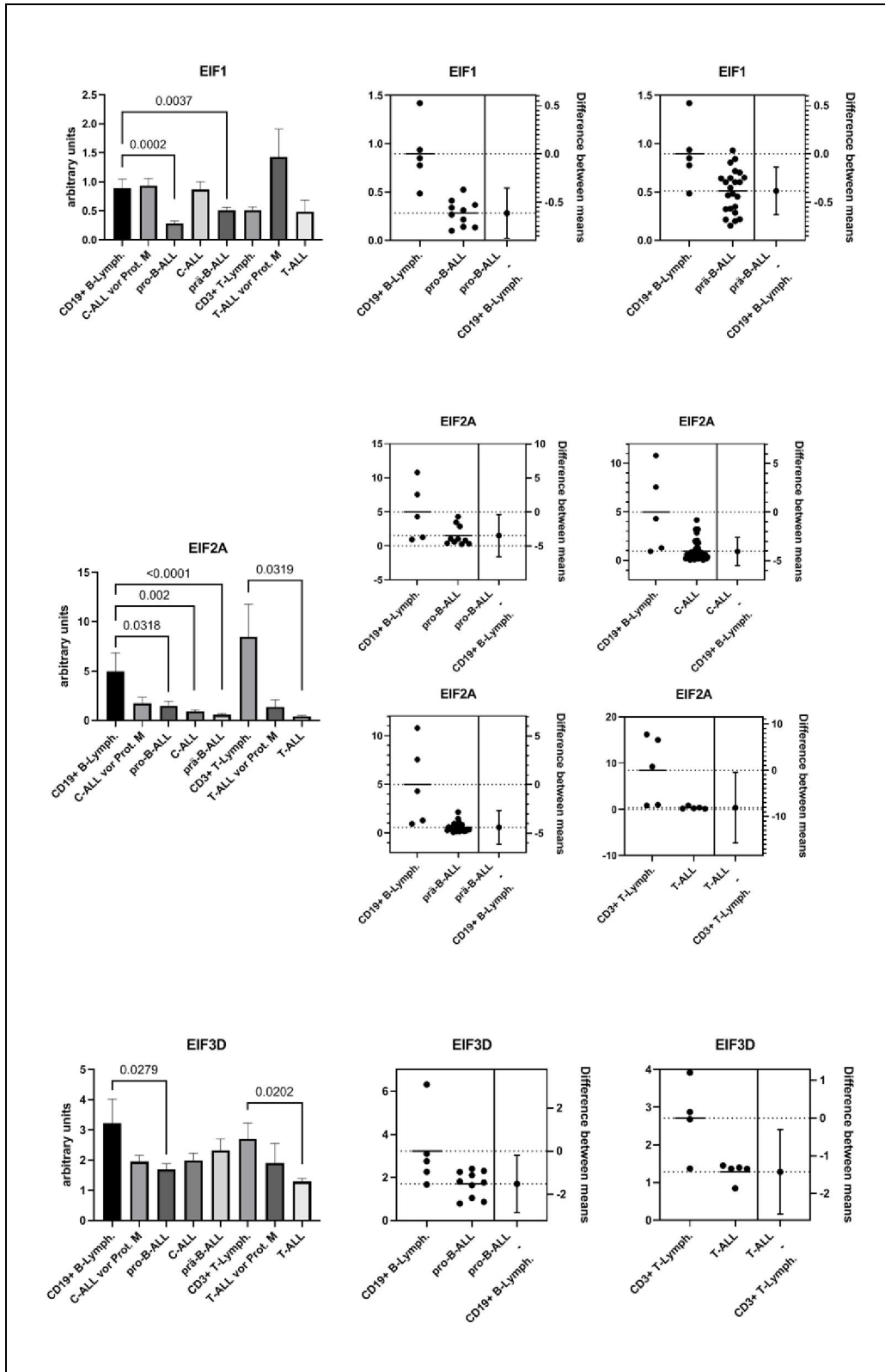


Abbildung 20: EIF1-, EIF2A und EIF3D-Genexpression: ALL-Immunphänotypen vs. Normalkontrolle

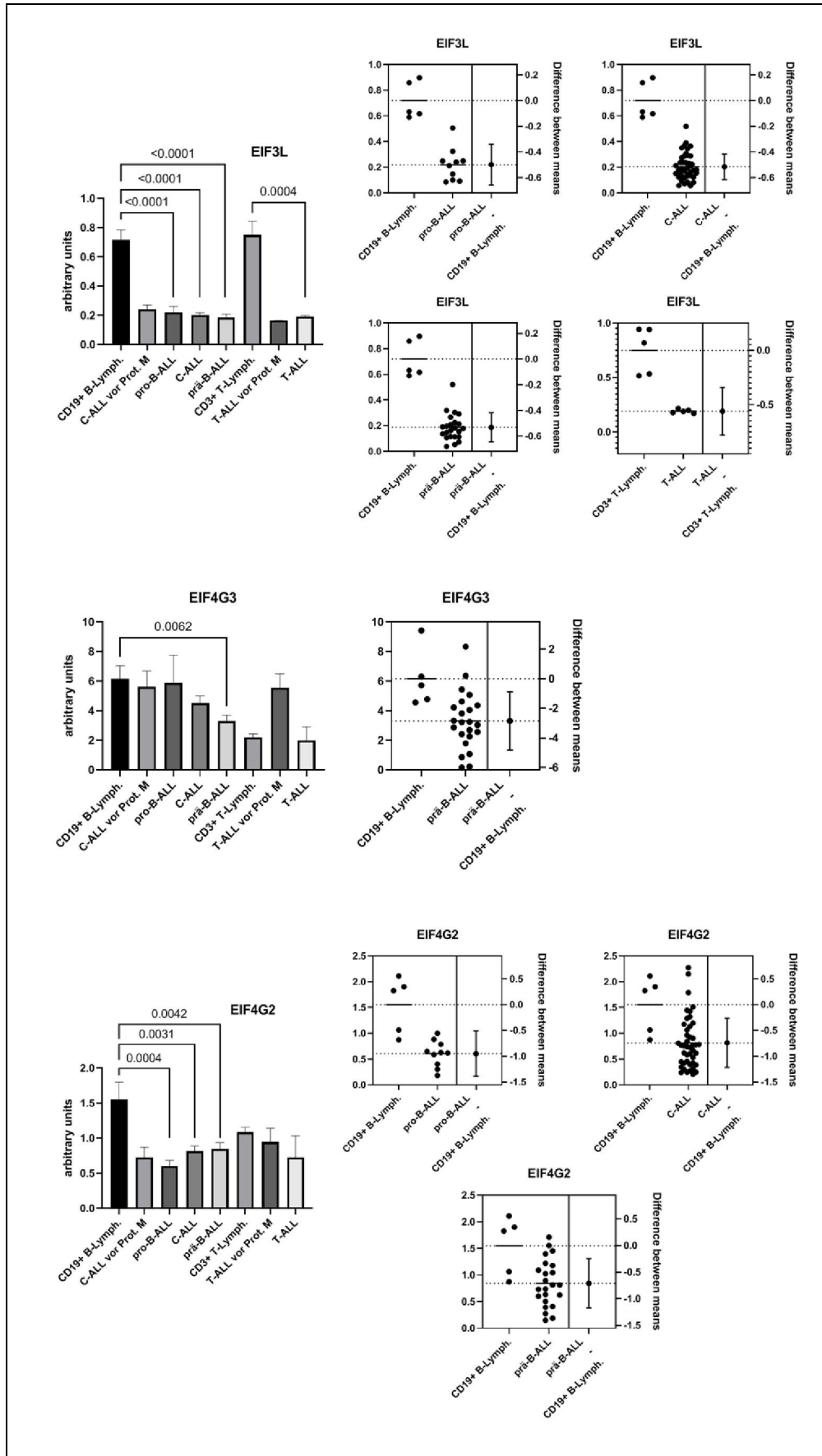


Abbildung 21: EIF3L-, EIF4G2- und EIF4G3-Genexpression: ALL-Immunphänotypen vs. Normalkontrolle

eIF-Expressionsprofile verschiedener ALL-Immunphänotypen

Weiters wurden die eIF-Expressionsprofile verschiedener ALL-Immunphänotypen untersucht. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Level bei zwölf der 15 untersuchten eIF (eIF1A, eIF2B3, eIF2B4, eIF2B5, eIF2 α , eIF3d, eIF3l, eIF4E, eIF4E-BP1, eIF4G2, eIF4G3 und eIF5) (**Abbildung 22**).

Signifikante Abweichungen der Expressionsprofile lagen bei eIF1, eIF2A und eIF3j (**Abbildung 23**) vor. Besonders auffällig war eine eIF1-Downregulation bei pro-B-ALL verglichen mit C-ALL ($p=0,0007$) und prä-B-ALL ($p=0,0049$).

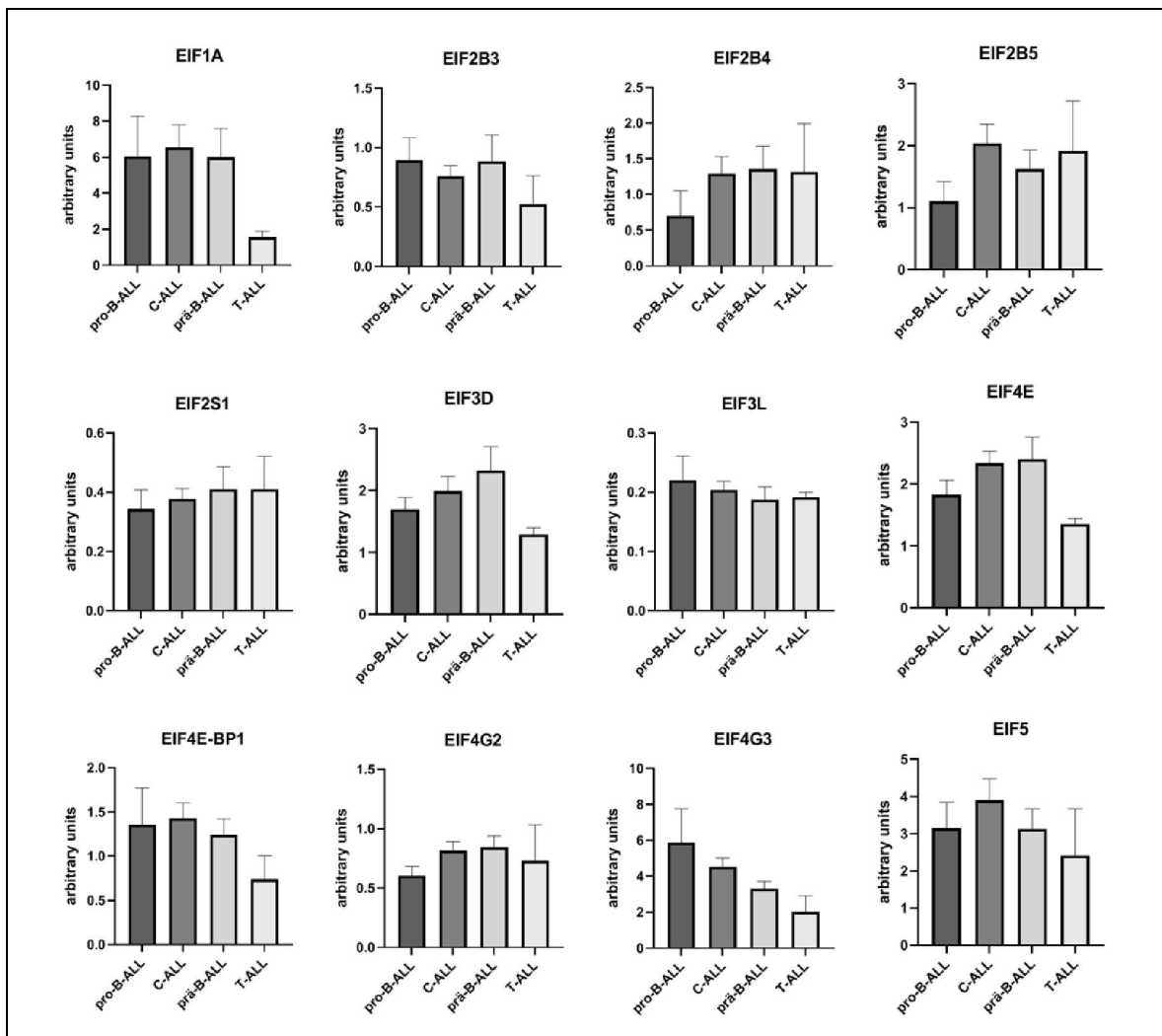


Abbildung 22: Unauffällige mRNA-Expressionsprofile verschiedener ALL-Immunphänotypen

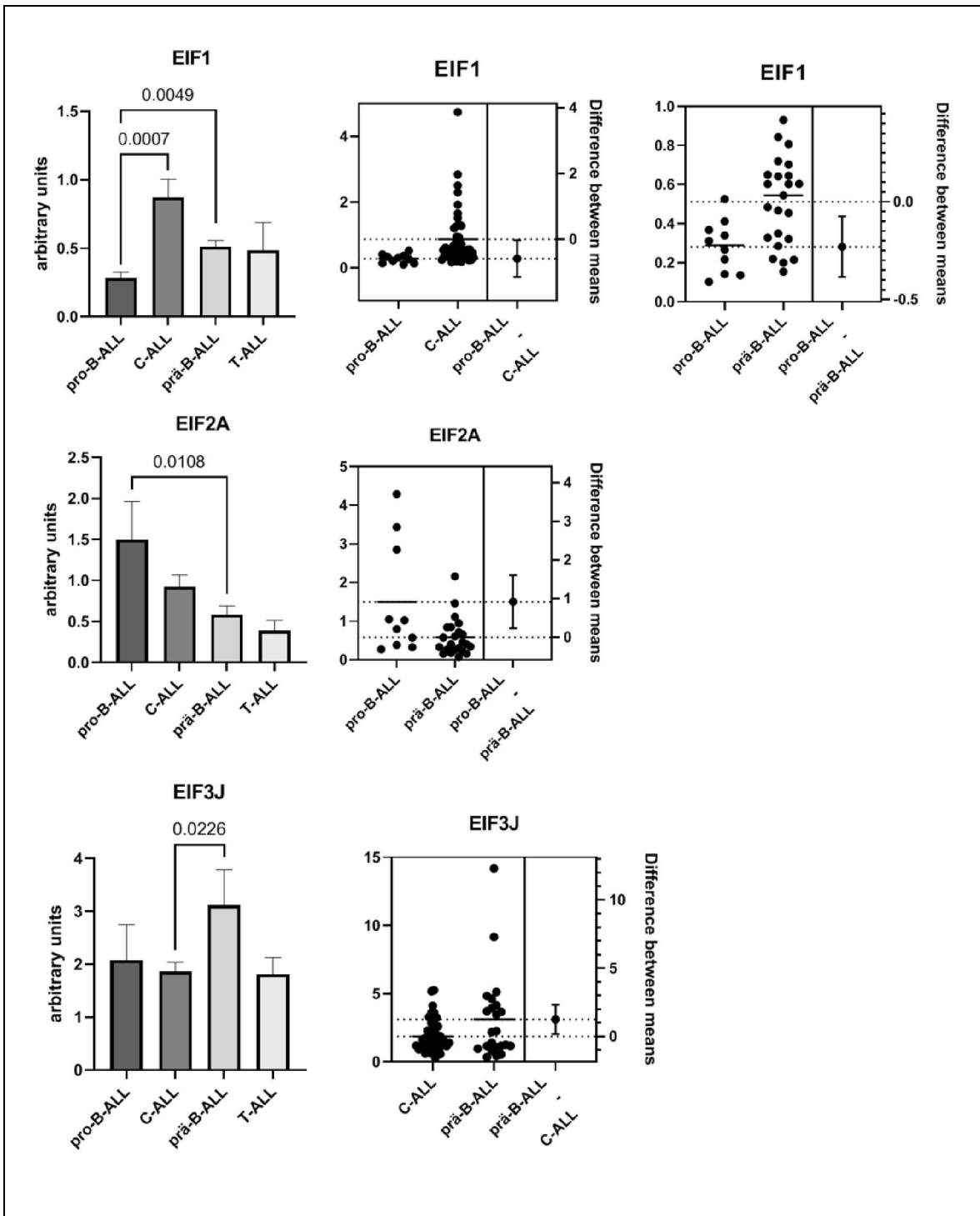


Abbildung 23: EIF1-, EIF2A- und EIF3J-Genexpression: Vergleich der ALL-Immunphänotypen

Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern

Die eIF-Expressionsprofile wurden in weiterer Folge mit klinisch-pathologischen Parametern aus der retrospektiven Datenerhebung verglichen. Hyperdiploide ALL zeigte im Vergleich zu Fällen mit normalem Karyotyp eine Downregulation von eIF3d ($p=0,0104$) (**Abbildung 24**). Bei einer peripheren Blastenzahl am Tag 8

(0/ μ L vs. ≥ 100 / μ L) fand sich bei ≥ 100 / μ L eine Upregulation von eIF1 ($p=0,0378$) (Abbildung 25). Bei einer initialen Leukozytenzahl von ≥ 20 G/L war die Expression von eIF3I erhöht, ($p=0,0059$) und eIF2 α reduziert ($p=0,0177$) (Abbildung 26). Bei niedrigen Thrombozyten (< 50 G/L) zeigte sich eine Downregulation von eIF1A ($p=0,0207$) und eIF4E ($p=0,0314$).

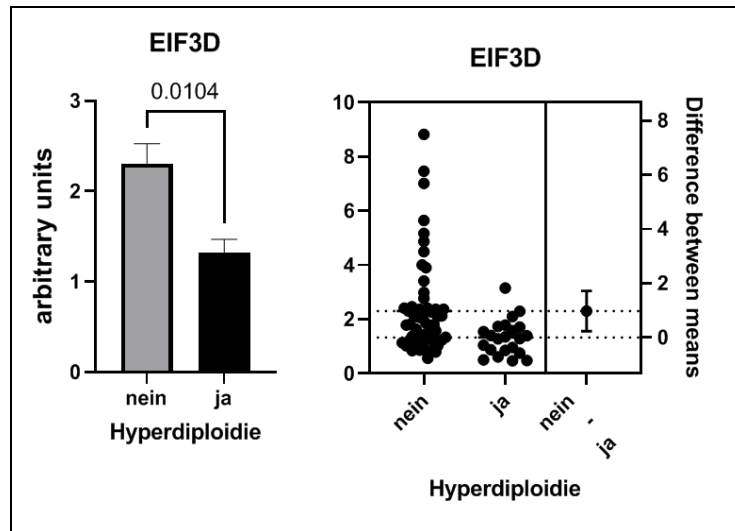


Abbildung 24: EIF3D-Genexpression: Hyperdiploidie

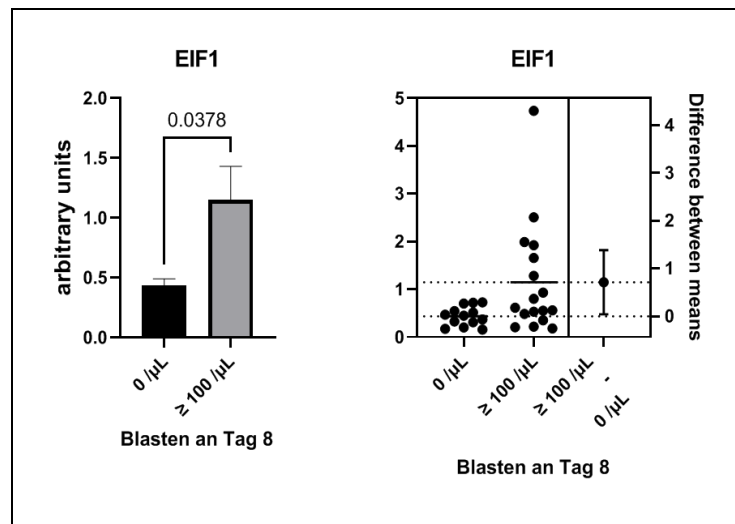


Abbildung 25: EIF1-Genexpression: Periphere Blastenzahl am Tag 8 (0/ μ L vs. ≥ 100 / μ L)

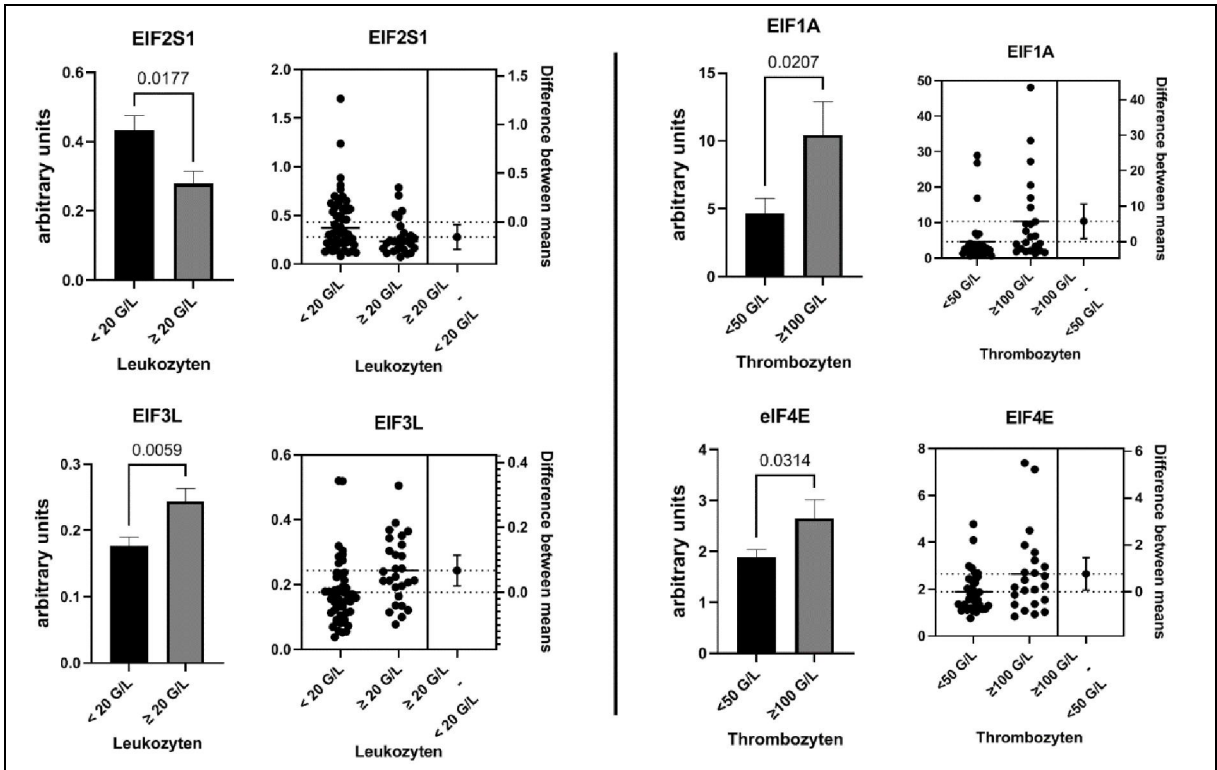


Abbildung 26: EIF2S1- und EIF3L-Genexpression: Initiale Leukozyten ($< 20\text{ G/L}$ vs. $\geq 20\text{ G/L}$); EIF1A- und EIF4E-Genexpression: Initiale Thrombozyten ($< 50\text{ G/L}$ vs. $\geq 100\text{ G/L}$)

5 Diskussion

Die Translations-Initiation stellt einen komplexen Prozess innerhalb der Proteinsynthese eukaryotischer Zellen dar und wird durch die heterogene Proteingruppe der eIF gesteuert. Jeder eIF interagiert in einem komplexen Netzwerk mit einer Vielzahl an Proteinen und Signalwegen. Maligne Erkrankungen zeichnen sich durch eine unkontrollierte Proliferation aus. Die Grundlage hierfür bilden Dysregulationen zellulärer Prozesse – u.a. auch der Proteinsynthese. Für viele Krebserkrankungen konnten bereits auffällige eIF-Expressionsprofile mit hoher Variabilität zwischen einzelnen Entitäten nachgewiesen werden.

Unsere Forschungsgruppe konnte bisher zeigen, dass bei Harnblasenkarzinomen eine eIF3a-Upregulation besteht und diese die Prognose bei Low-Grade-Tumoren positiv beeinflusst (60). Außerdem lag ein reduziertes Overall-Survival bei Low-Grade-Gliomen mit gesteigerter eIF3I-Expression sowie Glioblastomen mit eIF4H-Upregulation vor (66). Weiters konnte bei Neuroblastomen eine eIF4A1-Upregulation nachgewiesen werden (67). Die vorliegende Arbeit untersuchte erstmals die Expression von 15 eIF auf mRNA-Ebene bei ALL im Kindes- und Jugendalter.

Der Vergleich der Expressionsprofile von Blasten der BCP-/T-Zellreihe mit der Normalkontrolle zeigte eine signifikante verminderte Expression der mRNA-Level von sechs der 15 untersuchten eIF (eIF1, eIF2A, eIF3d, eIF3I, eIF4G2, eIF4G3). Im Gegensatz dazu werden in der Literatur bei malignen Erkrankungen in erster Linie erhöhte Expressionsprofile bei eIF beschrieben. So fanden sich gesteigerte Expressionen für die eIF-Subtypen eIF1, eIF1A, eIF2 α , eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3d, eIF3g, eIF3h, eIF3i, eIF3m, eIF4A, eIF4B, eIF4E, eIF4F, eIF4G, eIF4H, eIF5, eIF5B und eIF6 (32, 43, 51). eIF3e und eIF3f – zwei Untereinheiten des eIF3-Komplexes – lagen meist vermindert vor, eine tumorsuppressive Wirkung der beiden Subtypen wird diskutiert (51, 68). Unterluggauer et al. beschrieben beim diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom eine deutlich erhöhte Expression von zwölf eIF (59). Besonders auffällig waren in unserer Untersuchung die reduzierten Expressionen von eIF2A, eIF3I sowie eIF4G2. Da der Vergleich von Blasten der BCP-/T-Zellreihe mit der Normalkontrolle in der vorliegenden Arbeit – entgegen der aktuellen Literatur – ausschließlich eine verminderte Expression ergab, müssen diese Ergebnisse vorsichtig interpretiert werden.

Über die genaue Aufgabe von eIF2A ist wenig bekannt. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Funktion von eIF2A weniger in der kanonischen Translations-Initiation liegt, sondern mehr in einer nicht-kanonischen Initiation. So soll eIF2A die Translation in Situationen zellulären Stresses unterstützen (69, 70). Vor diesem Hintergrund könnte eine eIF2A-Upregulation die Proliferation von Krebszellen begünstigen. Auch die Rolle von eIF3I im Rahmen der Translations-Initiation ist nicht abschließend geklärt (43). Als Teil des Strukturproteins eIF3 interagiert eIF3I mit den Untereinheiten eIF3a, eIF3c, eIF3e und eIF3k (51). Eine auffällige Expression von eIF3I bei malignen Erkrankungen wurde bisher nicht beschrieben. Von einer Interaktion mit dem Gelbfieber-Virus und einer damit verbundenen Zunahme der Virus-Replikationsrate wird ausgegangen (71). eIF4G3 ist eine Untereinheit des Strukturproteins eIF4G, welches das Gerüst für die übrigen eIF4-Untereinheiten und die mRNA bildet. Eine gesteigerte eIF4G-Expression führt nachweislich zu einer unkontrollierten Translation und Proliferation sowie Hemmung der Apoptose (31). Für Bronchus-, Nasopharynx-, Mamma- und Cervixkarzinome wurden eIF4G-Upregulationen beschrieben (32). Die Expressionsprofile der verschiedenen ALL-Immunphänotypen variierten kaum. Es lagen keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Level bei zwölf der 15 untersuchten eIF vor. Abweichungen der Expressionsprofile zeigten sich bei eIF1, eIF2A und eIF3j, bei keinem ALL-Immunphänotyp fand sich ein charakteristisches eIF-Expressionsprofil.

Bei einzelnen eIF waren Expression mit klinisch-pathologischen Parameter assoziiert. So lagen bei ALL mit nachgewiesener Hyperdiploidie reduzierte eIF3d-Expressionen vor. Eine erhöhte Expression von eIF3d – ebenso eine Untereinheit des Gerüstproteins eIF3 – konnte bereits bei Magen- und Gallenblasenkarzinomen nachgewiesen werden (51). Eine eIF3d-Downregulation resultiert nach Zhang F et al. u.a. in einer Proliferationshemmung und Induktion der Apoptose (72). Ob eine reduzierte eIF3d-Expression, ähnlich dem Vorliegen einer Hyperdiploidie, mit einem günstigeren Krankheitsverlauf bei ALL korreliert, bleibt offen. Außerdem zeigte sich eine signifikant gesteigerte eIF1-Expression bei einer peripheren Blastenzahl am Tag 8 von $\geq 100/\mu\text{L}$. Eine erhöhte periphere Blastenzahl am Tag 8 der Therapie wird mit einem ungünstigeren Verlauf assoziiert, hierbei wird jedoch erst ab $\geq 1.000/\mu\text{L}$ von einer „Poor Prednisone Response“ und somit einem schlechten Ansprechen auf die Prednison-

Vorthherapie gesprochen (73). Für das anaplastische großzellige Lymphom und das hepatozelluläre Karzinom wurde eine erhöhte Expression von eIF1 beschrieben (43, 74). Bei einem initialen Leukozytenwert von < 20 G/L war die Expression von eIF3I vermindert und von eIF2 α erhöht. Initiale Leukozytenwerte von < 20 G/L korrelieren mit einem günstigeren Krankheitsverlauf (17). Bei Osteosarkom, Bronchus-, Schilddrüsenkarzinom und Non-Hodgkin-Lymphom konnte eine eIF2 α -Upregulation nachgewiesen werden (32, 75). Liegt eIF2 α jedoch in phosphoryliertem Zustand vor, kann dadurch die kanonische Translations-Initiation gehemmt werden (44). Somit hätte eine gesteigerte Expression an phosphoryliertem eIF2 α einen negativen Effekt auf die Proliferation von Krebszellen.

In Bezug auf die limitierenden Faktoren der Studie, ist besonders die nicht ideale Kontrollgruppe hervorzuheben. Da keine Knochenmarkstanzen gesunder Kinder und Jugendlicher bzw. gesunde B-/T-Lymphozyten-Vorläuferzellen verfügbar waren, wurden reife B-/T-Lymphozyten verwendet. Dies stellt die plausibelste Erklärung für die von der Literatur abweichenden Ergebnisse im Vergleich von Blasten der BCP-/T-Zellreihe mit der Normalkontrolle dar. Dementsprechend sind weitere Analysen mit B-/T-Vorläuferzellen als Kontrollgruppe indiziert. Als Kontrolle könnte nicht-konserviertes Material von ALL-Patientinnen und -Patienten in Remission dienen. Im Rahmen einer Verlaufskontrolle würde routinemäßig Knochenmark entnommen und untersucht werden. Aus nicht weiter benötigtem Material könnten nicht-neoplastische B-/T-Lymphozyten-Vorläuferzellen extrahiert werden. Außerdem sollten die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen mittels Immunhistochemie validiert werden.

Als weitere Limitation ist die geringe Fallzahl zu nennen, weshalb eine Korrelation der Ergebnisse mit dem klinischen Verlauf nur eingeschränkt möglich ist. Weiters bildet die Studienkohorte ein sehr heterogenes Kollektiv und stammt aus einem langen Beobachtungszeitraum. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bei ALL im Kindes- und Jugendalter auffällige eIF-Expressionsprofile auf mRNA-Ebene vorliegen. Um diese Ergebnisse auch hinsichtlich einer möglichen prognostischen Aussagekraft einzuordnen, sollten weiterführende Untersuchungen folgen.

Literaturverzeichnis

1. Niemeyer C, Eggert A (Hrsg.). Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Berlin: Springer; 2018: 164-7.
2. ACCIS: Automated Childhood Cancer Information System - Cancer Incidence and Survival Tables. <http://accis.iarc.fr/>. Accessed: 19.03.2020. ACCIS: Automated Childhood Cancer Information System. 2003. [Available at: <http://accis.iarc.fr/results/2003/index.php>].
3. Mitchell C, Hall G, Clarke R. Acute leukaemia in children: Diagnosis and management. *BMJ* 2009; 338: 1491-5.
4. Deutsches Kinderkrebsregister. Jahresbericht 2018. <https://www.kinderkrebsregister.de/>. Accessed: 19.03.2020. Deutsches Kinderkrebsregister. 2018. [Available at: <https://www.kinderkrebsregister.de/dkkr/ergebnisse/jahresberichte.html>].
5. Psychrembel. Klinisches Wörterbuch. Berlin: de Gruyter; 1998: 915-6.
6. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2008; 371: 1030-43.
7. Lokeshwar MR, Shah NK, Agarwal BR, et al. Textbook of Pediatric Hematology and Hemato-Oncology. New Dehli: Jaypee Brothers Medical Publishers; 2016: 395-407.
8. McReynolds LJ, Savage SA. Pediatric leukemia susceptibility disorders: manifestations and management. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2017; 2017: 242-50.
9. Bhojwani D, Yang JJ, Pui CH. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am* 2015; 62: 47-60.
10. Lanzkowsky P. Manual of Pediatric Hematology and Oncology. Burlington: Elsevier; 2005: 415-35

11. Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, Relling MV. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there?. *Blood* 2012; 120: 1165-74.
12. Schmid F. Handbuch der Kinderheilkunde. Tumoren im Kindesalter. Berlin: Springer; 1972: 78-101.
13. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405.
14. Freund M. Praktikum der mikroskopischen Hämatologie. München: Elsevier; 2008: 95-100.
15. Lewis SM, Bain BJ, Bates I. Dacie and Lewis Practical Haematology. London: Churchill Livingstone; 2001: 101-14.
16. Dworzak MN, Buldini B, Gaipa G, et al. AIEOP-BFM consensus guidelines 2016 for flow cytometric immunophenotyping of Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2018; 94: 82-93.
17. Escherich G, Schrappe M, Creutzig U. Leitlinie Akute lymphoblastische Leukämie - ALL - im Kindesalter. Register Nr. 025/014. <https://www.awmf.org/>. Accessed: 18.03.2020. Leitlinien AWMF. 2016. [Available at: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/025-014.html>]
18. Schrappe M. Studienkonzept AIEOP-BFM ALL 2017 Studie. <http://www.uni-kiel.de/all-studie/>. Accessed: 23.03.2020. ALL-BFM Studienzentrale. 2016. [Available at: http://www.uni-kiel.de/all-studie/?page_id=386]
19. Bartram CR, Schrauder A, Kohler R, Schrappe M. Acute lymphoblastic leukemia in children: treatment planning via minimal residual disease assessment. *Dtsch Arztebl Int* 2012; 109: 652-8.
20. Gaipa G, Cazzaniga G, Valsecchi MG, et al. Time point-dependent concordance of flow cytometry and real-time quantitative polymerase chain

reaction for minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2012; 97: 1582-93.

21. Moricke A, Zimmermann M, Reiter A, et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia* 2010; 24: 265-84.
22. Attarbaschi A, Mann G, Panzer-Grumayer R, et al. Minimal residual disease values discriminate between low and high relapse risk in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and an intrachromosomal amplification of chromosome 21: the Austrian and German acute lymphoblastic leukemia Berlin-Frankfurt-Munster (ALL-BFM) trials. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3046-50.
23. Schrauder A, von Stackelberg A, Schrappe M, et al. Allogeneic hematopoietic SCT in children with ALL: current concepts of ongoing prospective SCT trials. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: 71-74.
24. Peters C, Schrauder A, Schrappe M, et al. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in children with acute lymphoblastic leukaemia: the BFM/IBFM/EBMT concepts. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35 Suppl 1: 9.
25. Schrappe M, Reiter A, Henze G, et al. Prevention of CNS recurrence in childhood ALL: results with reduced radiotherapy combined with CNS-directed chemotherapy in four consecutive ALL-BFM trials. *Klin Padiatr* 1998; 210: 192-9.
26. Fasold H. *Kinderheilkunde*. Wollenbüttel: Wolfenbüttler; 1948: 113-4.
27. Moricke A, Reiter A, Zimmermann M, et al. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood* 2008; 111: 4477-89.
28. Loning L, Zimmermann M, Reiter A, et al. Secondary neoplasms subsequent to Berlin-Frankfurt-Munster therapy of acute lymphoblastic leukemia in

- childhood: significantly lower risk without cranial radiotherapy. *Blood* 2000; 95: 2770-5.
29. Alberts B, Bray D, Hopkin K, et al. *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. Weinheim: Wiley-VCH; 2012: 247-83.
 30. Horn F. *Biochemie des Menschen*. Stuttgart: Thieme; 2015: 314-33.
 31. Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 113-27.
 32. Ali MU, Ur Rahman MS, Jia Z, Jiang C. Eukaryotic translation initiation factors and cancer. *Tumour Biol* 2017; 39: 1010428317709805.
 33. Klinge S, Voigts-Hoffmann F, Leibundgut M, Arpagaus S, Ban N. Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6. *Science* 2011; 334: 941-8.
 34. Sharma DK, Bressler K, Patel H, Balasingam N, Thakor N. Role of Eukaryotic Initiation Factors during Cellular Stress and Cancer Progression. *J Nucleic Acids* 2016; 2016: 8235121.
 35. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012; 149: 274-93.
 36. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* 2009; 122: 3589-94.
 37. Barrett D, Brown VI, Grupp SA, Teachey DT. Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling axis in children with hematologic malignancies. *Paediatr Drugs* 2012; 14: 299-316.
 38. Chapuis N, Tamburini J, Green AS, et al. Perspectives on inhibiting mTOR as a future treatment strategy for hematological malignancies. *Leukemia* 2010; 24: 1686-99.

39. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 307-18.
40. Martineau Y, Derry MC, Wang X, et al. Poly(A)-binding protein-interacting protein 1 binds to eukaryotic translation initiation factor 3 to stimulate translation. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 6658-67.
41. Imataka H, Gradi A, Sonenberg N. A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J* 1998; 17: 7480-9.
42. Donnelly N, Gorman AM, Gupta S, Samali A. The eIF2alpha kinases: their structures and functions. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70: 3493-511.
43. Spilka R, Ernst C, Mehta AK, Haybaeck J. Eukaryotic translation initiation factors in cancer development and progression. *Cancer Lett* 2013; 340: 9-21.
44. Kumar KU, Srivastava SP, Kaufman RJ. Double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) is negatively regulated by 60S ribosomal subunit protein L18. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 1116-25.
45. Donze O, Jagus R, Koromilas AE, Hershey JW, Sonenberg N. Abrogation of translation initiation factor eIF-2 phosphorylation causes malignant transformation of NIH 3T3 cells. *EMBO J* 1995; 14: 3828-34.
46. Saito A, Ochiai K, Kondo S, et al. Endoplasmic reticulum stress response mediated by the PERK-eIF2(alpha)-ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2. *J Biol Chem* 2011; 286: 4809-18.
47. Komar AA, Hatzoglou M. Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell Cycle* 2011; 10: 229-40.
48. Graw J. *Genetik*. Berlin Heidelberg: Springer Spektrum; 2015: 64-87.
49. Ingolia NT. Ribosome profiling: new views of translation, from single codons to genome scale. *Nat Rev Genet* 2014; 15: 205-13.

50. Chen HH, Tarn WY. uORF-mediated translational control: recently elucidated mechanisms and implications in cancer. *RNA Biol* 2019; 16: 1327-38.
51. Gomes-Duarte A, Lacerda R, Menezes J, Romao L. eIF3: a factor for human health and disease. *RNA Biol* 2018; 15: 26-34.
52. Golob-Schwarzl N, Krassnig S, Toeglhofer AM, et al. New liver cancer biomarkers: PI3K/AKT/mTOR pathway members and eukaryotic translation initiation factors. *Eur J Cancer* 2017; 83: 56-70.
53. Tejada S, Lobo MV, Garcia-Villanueva M, et al. Eukaryotic initiation factors (eIF) 2alpha and 4E expression, localization, and phosphorylation in brain tumors. *J Histochem Cytochem* 2009; 57: 503-12.
54. Golob-Schwarzl N, Schweiger C, Koller C, et al. Separation of low and high grade colon and rectum carcinoma by eukaryotic translation initiation factors 1, 5 and 6. *Oncotarget* 2017; 8: 101224-43.
55. Hsieh AC, Ruggiero D. Targeting eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 4914-20.
56. Golob-Schwarzl N, Puchas P, Gogg-Kamerer M, Weichert W, Goppert B, Haybaeck J. New Pancreatic Cancer Biomarkers eIF1, eIF2D, eIF3C and eIF6 Play a Major Role in Translational Control in Ductal Adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2020; 40: 3109-18.
57. Smolle MA, Czapiewski P, Lapinska-Szumczyk S, et al. The Prognostic Significance of Eukaryotic Translation Initiation Factors (eIFs) in Endometrial Cancer. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 10.3390/ijms20246169.
58. Golob-Schwarzl N, Wodlej C, Kleinegger F, et al. Eukaryotic translation initiation factor 6 overexpression plays a major role in the translational control of gallbladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2019; 145: 2699-711.
59. Unterluggauer JJ, Prochazka K, Tomazic PV, et al. Expression profile of translation initiation factor eIF2B5 in diffuse large B-cell lymphoma and its correlation to clinical outcome. *Blood Cancer J* 2018; 8: 79-5.

60. Spilka R, Ernst C, Bergler H, et al. eIF3a is over-expressed in urinary bladder cancer and influences its phenotype independent of translation initiation. *Cell Oncol (Dordr)* 2014; 37: 253-67.
61. Spilka R, Laimer K, Bachmann F, et al. Overexpression of eIF3a in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity and Its Putative Relation to Chemotherapy Response. *J Oncol* 2012; 2012: 901956.
62. Gantenbein N, Bernhart E, Anders I, et al. Influence of eukaryotic translation initiation factor 6 on non-small cell lung cancer development and progression. *Eur J Cancer* 2018; 101: 165-80.
63. Pelletier J, Graff J, Ruggero D, Sonenberg N. Targeting the eIF4F translation initiation complex: a critical nexus for cancer development. *Cancer Res* 2015; 75: 250-63.
64. Hao P, Yu J, Ward R, et al. Eukaryotic translation initiation factors as promising targets in cancer therapy. *Cell Commun Signal* 2020; 18: 175-9.
65. Schrappe M. Studienkonzept AIEOP-BFM ALL 2009 Studie. <http://www.uni-kiel.de/all-studie/>. Accessed: 23.03.2020. ALL-BFM Studienzentrale. 2015. [Available at: <https://www.all-studie.uni-kiel.de/downloads/studie-2009/>]
66. Krassnig S, Wohlrab C, Golob-Schwarzl N, et al. A Profound Basic Characterization of eIFs in Gliomas: Identifying eIF3I and 4H as Potential Novel Target Candidates in Glioma Therapy. *Cancers (Basel)* 2021; 13: 10.3390/cancers13061482.
67. Skofler C, Kleinegger F, Krassnig S, et al. Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A1: A Potential Novel Target in Neuroblastoma. *Cells* 2021; 10: 10.3390/cells10020301.
68. Wen F, Zhou R, Shen A, Choi A, Uribe D, Shi J. The tumor suppressive role of eIF3f and its function in translation inhibition and rRNA degradation. *PLoS One* 2012; 7: e34194.

- 69.** Komar AA, Merrick WC. A Retrospective on eIF2A-and Not the Alpha Subunit of eIF2. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 10.3390/ijms21062054.
- 70.** Kwon OS, An S, Kim E, et al. An mRNA-specific tRNAi carrier eIF2A plays a pivotal role in cell proliferation under stress conditions: stress-resistant translation of c-Src mRNA is mediated by eIF2A. *Nucleic Acids Res* 2017; 45: 296-310.
- 71.** Morais AT, Terzian AC, Duarte DV, et al. The eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L protein interacts with Flavivirus NS5 and may modulate yellow fever virus replication. *Virology* 2013; 10: 205.
- 72.** Zhang F, Xiang S, Cao Y, et al. EIF3D promotes gallbladder cancer development by stabilizing GRK2 kinase and activating PI3K-AKT signaling pathway. *Cell Death Dis* 2017; 8: e2868.
- 73.** Moricke A, Lauten M, Beier R, et al. Prediction of outcome by early response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Klin Padiatr* 2013; 225 Suppl 1: 50.
- 74.** Rush J, Moritz A, Lee KA, et al. Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 94-101.
- 75.** Rosenwald IB, Koifman L, Savas L, Chen JJ, Woda BA, Kadin ME. Expression of the translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 α is frequently increased in neoplastic cells of Hodgkin lymphoma. *Hum Pathol* 2008; 39: 910-6.