

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Analyse chromosomaler Translokationen und  
potenziell Leukämie-relevanter Mutationen einer  
*mixed phenotype acute leukemia* im Kindesalter (Fallstudie)

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lina Verena Sevenich, geb. Selle  
aus Berlin

Datum der Promotion: 04.03.2022

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung / Abstract</b>	<b>7</b>
4.1	Zusammenfassung	7
4.2	Abstract	8
<b>5</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
5.1	<i>Acute leukemias of ambiguous lineage</i> : seltene Leukämien im Kindes- und Jugendalter	9
5.1.1	Morphologie und Zytochemie	9
5.1.2	Immunphänotyp	9
5.1.3	Genetik	12
5.1.4	Therapie und Prognose	14
5.2	Fallpräsentation einer MPAL und Vorarbeiten	17
5.2.1	Morphologie und Immunphänotyp	17
5.2.2	Therapieverlauf	18
5.2.3	Genetik	20
5.3	Fragestellung und Ziele der Promotionsarbeit	25
<b>6</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>27</b>
6.1	Proben	27
6.1.1	Patientenproben	27
6.1.2	Kontrollproben	27
6.1.3	Xenotransplantate	28
6.2	Geräte	28
6.3	Software	29
6.4	Verbrauchsmaterial und Reagenzien	29
6.4.1	Primer	29
6.4.2	Längen- und Größenstandards	34
6.4.3	Enzyme	34
6.4.4	Kits	34
6.4.5	Chemikalien und Reagenzien	34
6.4.6	Standardlösungen	34
6.4.7	Verbrauchsmaterial	35
6.5	Methoden	35
6.5.1	Präparation für die zytogenetische Diagnostik	35
6.5.2	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	35
6.5.3	DNA-Präparation	40
6.5.4	<i>Whole Genome Amplification</i> (WGA)	40
6.5.5	RNA-Präparation	41
6.5.6	cDNA-Synthese	41
6.5.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
6.5.8	Gelelektrophorese	46
6.5.9	Sequenzierung nach Sanger	46
6.5.10	Microarray-basierte komparative genomische Hybridisierung (aCGH)	47
6.5.11	Quantitative <i>real-time</i> PCR (qPCR)	48
6.5.12	RNA-Microarray-Analysen	51
6.6	Weitergehende Auswertung der Daten	51
6.6.1	Auswertung der Daten aus aCGH	51

## Abkürzungsverzeichnis

6.6.2	Auswertung der Genexpressionsdaten .....	52
<b>7</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>55</b>
7.1	Molekularzytogenetik .....	55
7.1.1	Ersterkrankung (MPAL).....	55
7.1.2	Erstrezidiv.....	63
7.1.3	Zytogenetische Veränderungen im Krankheitsverlauf.....	66
7.2	Bruchpunkte und Fusionsgene .....	70
7.2.1	Bruchpunktanalyse.....	70
7.2.2	<i>long-distance</i> PCR .....	77
7.2.3	Sequenzierung möglicher Fusionsgentranskripte .....	77
7.2.4	<i>TCF3-ZNF384</i> -Expression .....	80
7.3	Signalweganalysen und Kandidatengene .....	81
7.3.1	Sequenzierung der Kandidatengene.....	81
7.3.2	Genexpressionsanalyse .....	82
<b>8</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>89</b>
8.1	<i>TCF3-ZNF384</i> -Fusion .....	89
8.2	Signalweganalysen .....	91
8.2.1	RAS-abhängige Signalwege und deren Veränderungen .....	91
8.2.2	Bedeutung von <i>KRAS</i> -Mutationen in der Leukämogenese.....	95
8.2.3	Unterschiede zwischen <i>KRAS</i> -Mutationen und Wildtyp-Amplifikationen .....	96
8.2.4	Inhibition der RAS-abhängigen Signalwege.....	97
8.2.5	Zellzyklus.....	101
8.2.6	Apoptose .....	103
8.2.7	Weitere potenziell leukämierelevante Gene.....	108
8.3	Chromosomale Instabilität.....	109
8.3.1	<i>TCF3-ZNF384</i> -Fusion .....	110
8.3.2	<i>RAS</i> -Mutationen und genetische Instabilität .....	111
8.3.3	<i>TP53</i> -Mutationen, -Deletionen und chromosomale Instabilität.....	114
8.3.4	<i>Breakage-fusion-bridge</i> Zyklus.....	115
8.4	Zusammenfassung der relevanten Gene und möglicher medikamentöser Ansatzpunkte .....	118
8.5	Möglichkeiten und Einschränkungen der Analytik.....	120
8.5.1	Zytogenetische Analysen .....	120
8.5.2	Einsatz von WGA-Produkt als Template .....	121
8.5.3	Signalweganalysen: aCGH und Microarray-Genexpressionsdaten .....	122
8.6	Kritische Anmerkungen .....	122
<b>9</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>123</b>
9.1	Weitere zytogenetische Analysen .....	123
9.2	Transkriptomsequenzierung und <i>single cell sequencing</i> .....	123
9.3	Western Blot.....	123
9.4	<i>KRAS</i> -Aberrationen bei Leukämien des Kindesalters.....	124
9.5	Medikamentenstudien .....	124
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>124</b>
<b>11</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>133</b>
<b>12</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>134</b>
<b>13</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>135</b>

## 1 Abkürzungsverzeichnis

aCGH	<i>Microarray-based Comparative Genomic Hybridization</i>
ALAL	<i>acute leukemias of ambiguous lineage</i>
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
altNHEJ	alternativer NHEJ-Signalweg
AML	akute myeloische Leukämie
ampKRAS	Wildtyp-Amplifikation von KRAS
AUL	<i>acute undifferentiated leukemias</i>
BACs	<i>bacterial artificial Chromosomes</i>
BAL	<i>biphenotypic acute leukemia</i> , biphänotypische akute Leukämie
BCP	<i>b-cell progenitor</i> , B-Vorläuferzellen
BFBC	<i>breakage-fusion-bridge cycle</i>
BP	Bruchpunkt
CA	centrosomale Amplifikationen
CEP	<i>chromosome enumeration probe</i>
CFS	<i>common fragile sites</i>
CIN	chromosomale Instabilität
CML	chronisch myeloische Leukämie
CNA	<i>copy number aberration</i>
CNV	<i>copy number variation</i>
CR	<i>complete remission</i> , komplette Remission
C <sub>T</sub>	<i>Cycle Threshold</i>
DDR	<i>DNA damage response</i>
DSB	Doppelstrangbrüche
EGIL	<i>European Group of Immunological Classification of Leukemias</i>
ERKi	ERK-Inhibition
FAB	<i>French-American-British Working Group for Leukemia Classification</i>
FISH	Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factors</i>
GF	<i>growth factors</i> , Wachstumsfaktoren
GVHD	<i>graft vs. host disease</i>
HP	humane Plazenta
HR	Homologe Rekombination
HSC	hämatopoetische Stammzellen
ISCN	<i>International System for Human Cytogenetic Nomenclature</i>
KM	Knochenmark
LFS	<i>leukemia-free survival</i>
LSC	myeloische leukämische Stammzellen
LSI	<i>locus specific identifier</i> , Lokus-spezifische Sonden
MEKi	MAPK-Kinase-Inhibitoren
MLAL	<i>mixed lineage acute leukemias</i>
MPAL	<i>mixed phenotype acute leukemias</i>
MPO	Myeloperoxidase
MRD	<i>Minimal Residual Disease</i>
mutKRAS	aktivierende KRAS-Mutationen
NHEJ	<i>nonhomologous end joining</i>
NSG	<i>NOD scid gamma mouse</i>
OS	<i>overall survival</i> , Gesamtüberleben
pAKT	phosphoryliertes AKT
PDAC	Duktale Pankreasadenokarzinome
pEFS	<i>event-free survival probability</i>
pERK	phosphoryliertes ERK
PI3Ki	PI3K-Inhibitoren
Pic	<i>KEGG Pathways in cancer</i>
qPCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
SE	Standardabweichung
SKY	<i>spectral karyotyping</i>
ssDNA	<i>single-stranded DNA</i> , Einzelstrang-DNA
SZT	allogene Stamzelltransplantation
WCP	<i>Whole Chromosome Painting</i>
WGA	<i>Whole Genome Amplification</i>
wtKRAS	Wildtyp-KRAS
ZNF384r+	Positiv für ein ZNF384-Rearrangement

## 2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleich der Klassifikationen & Definitionskriterien nach WHO 2008 /16 und EGIL .....	11
Abbildung 2: Knochenmark-Ausstrichpräparat mit Myeloperoxidase-Positivität der Blasten .....	17
Abbildung 3: Therapieverlauf und Knochenmark (KM)-Diagnostik: .....	19
Abbildung 4 : Heterozygote Deletion des <i>ETV6</i> -Lokus .....	20
Abbildung 5: Karyogramme der Ersterkrankung .....	21
Abbildung 6: Bestätigung t(12;18) und Entdeckung einer Translokation t(12;19) .....	22
Abbildung 7: FISH-Analyse mit <i>TCF3 Break Apart</i> Sonde– Splitting und Amplifikation .....	23
Abbildung 8: aCGH-Profil und potenziell leukämogene Kandidatengene in der Ersterkrankung .....	24
Abbildung 9: Lage der kommerziellen FISH-Sonden und BACs für die Chr. 12, 18 und 19 im aCGH-Profil .....	37
Abbildung 10: Darstellung des $\Delta C_T$ -Wertes .....	48
Abbildung 11: Schematische Übersicht des aCGH-Profiles Chromosomen: 12, 18 und 19 von Ersterkrankung und Rezidiv .....	50
Abbildung 12: <i>Principal component analysis</i> .....	51
Abbildung 13: Translokation t(12;19) in der Ersterkrankung- schematischer Aufbau und Abbildungen .....	55
Abbildung 14: <i>KRAS</i> -Amplifikation .....	56
Abbildung 15: Metaphase mit Koloalisation ohne Amplifikation .....	57
Abbildung 16: Dizentrisches Chromosoms dic(12;18) sowie derivative Chromosomen der(12) und der(18) - schematischer Aufbau und Abbildungen .....	58
Abbildung 17: Subklon mit zusätzlichem der(18) - schematischer Aufbau und Abbildungen .....	59
Abbildung 18: Dizentrisches Chromosoms dic(12;18) mit peripherer Amplifikation und zusätzlichem der(18)- schematischer Aufbau und Abbildungen .....	60
Abbildung 19: Derivatives Chromosom der(12) mit getrennten Amplifikationen und der(18) ohne <i>KRAS</i> -Beteiligung- schematischer Aufbau und Abbildungen .....	60
Abbildung 20: Bildung eines weiteren dizentrischen Chromosoms dic(1;18) .....	61
Abbildung 21: Homozygote Deletion des <i>CDKN2A</i> -Lokus .....	62
Abbildung 22: Potenzielle Vorläuferzelle .....	62
Abbildung 23: Karyogramm des Erstrezidivs .....	63
Abbildung 24: Heterozygote Deletion des Subtelomerbereichs 18p im Erstrezidiv .....	63
Abbildung 25: der(12) im Rezidiv - Schematischer Aufbau und Abbildungen: .....	64
Abbildung 26: Markerchromosom – Schematischer Aufbau und Abbildungen .....	65
Abbildung 27: Translokation t(11;12) – Schematischer Aufbau und Abbildungen .....	65
Abbildung 28: Translokation t(5;6) – Schematischer Aufbau und Abbildung .....	66
Abbildung 29: Zytogenetik – hypothetische Entwicklung und Verwandtschaftsverhältnisse der Klone in den verschiedenen Erkrankungsstadien und in den Engraftment-Zellen .....	68
Abbildung 30: Vergleich der aCGH-Profile von Ersterkrankung und Rezidiv .....	71
Abbildung 31: Vergleich qPCR mit Original-DNA und WGA-Template und Vergleich der Ergebnisse des Versuchsansatzes mit minimalem SE zum Mittelwert aller Replikate .....	73
Abbildung 32: Vergleich von Original-DNA und WGA-Produkt als Template in der qPCR .....	74
Abbildung 33: Ergebnisse der Bruchpunktbestimmung mittels qPCR: .....	75
Abbildung 34: <i>TCF3-ZNF384</i> -Fusionsgen .....	78
Abbildung 35: Expressionsanalyse der <i>TCF3-ZNF384</i> -Fusionsgentranskripte – Darstellung der Ergebnisse aus qPCR: .....	80
Abbildung 36: Zellreihendefinierende Marker nach WHO: Vergleich mRNA-Genexpression und Immunphänotyp .....	83
Abbildung 37: Korrelation von aCGH und Mikroarray-Expressionsdaten .....	83
Abbildung 38: Flussdiagramm Ersterkrankung: Darstellung der einzelnen Auswertungsschritte .....	84
Abbildung 39: Flussdiagramm Erstrezidiv: Darstellung der einzelnen Auswertungsschritte .....	85
Abbildung 40: „GeneCodis“ – Auswertung der CNA-Listen nach KEGG <i>Pathways</i> .....	86
Abbildung 41: „GeneCodis“ – Auswertung der Microarray-Genexpressionsdaten der MPAL nach KEGG <i>Pathways</i> .....	86
Abbildung 42: Translokation t(12;19) und <i>breakage-fusion-bridge</i> Zyklus .....	115
Abbildung 43: Translokation nichthomologer Chromosomen .....	116
Abbildung 44: Missegregation mit Entstehung numerischer Aberrationen .....	117
Abbildung 45: KEGG <i>Pathways in cancer</i> – potenzielle <i>driver</i> Gene in der MPAL und Ansatzpunkte für eine personalisierte Therapie .....	118

### 3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Retrospektiver Vergleich der Daten nach EGIL- mit WHO-Klassifikation 2008 .....	12
Tabelle 2: Zytochemie, Immunphänotyp und Zytogenetik sowie weitere klinische Parameter von Ersterkrankung und Erstrezidiv .....	18
Tabelle 3: Übersicht Proben .....	27
Tabelle 4: Zentrifugen .....	28
Tabelle 5: Mikroskope .....	28
Tabelle 6: Elektrophorese .....	28
Tabelle 7: PCR .....	28
Tabelle 8: Sequenzierung .....	28
Tabelle 9: Sonstige Geräte .....	29
Tabelle 10: Software .....	29
Tabelle 11: Gebrauchsfertige Primer .....	29
Tabelle 12: Primer für Sequenzierung .....	30
Tabelle 13: Primer für qPCR .....	32
Tabelle 14: Zusätzliche Primer für PCR möglicher Fusionsgentranskripte .....	33
Tabelle 15: Längen- und Größenstandards .....	34
Tabelle 16: Enzyme .....	34
Tabelle 17: Kits .....	34
Tabelle 18: Chemikalien und Reagenzien .....	34
Tabelle 19: Standardlösungen .....	34
Tabelle 20: Verbrauchsmaterial .....	35
Tabelle 21: Übersicht über die verwendeten kommerziellen FISH-Sonden .....	36
Tabelle 22: Übersicht über die verwendeten BAC-Sonden .....	36
Tabelle 23: Übersicht der FISH-Sondenkombinationen .....	38
Tabelle 24: Cyclor-Programm zur cDNA-Synthese .....	41
Tabelle 25: Cyclor-Programm konventionelle und Hochtemperatur-PCR .....	43
Tabelle 26: Cyclor-Programm <i>long distance</i> PCR .....	44
Tabelle 27: Verwendete Kontrollprimerpaare für <i>long-distance</i> PCR .....	44
Tabelle 28: Cyclor-Programm Aufreinigung Sequenzierung .....	46
Tabelle 29: Cyclor-Programm Sequenzreaktion .....	46
Tabelle 30: Cyclor-Programm qPCR .....	49
Tabelle 31: Ergebnisse der automatisierten Interphase-FISH Analyse .....	69
Tabelle 32: Darstellung der chromosomalen Bruchpunkte der Chromosomen 12, 18 und 19 .....	72
Tabelle 33: Zusammenfassung der Ergebnisse der Bruchpunktbestimmung .....	76
Tabelle 34: Ergebnisse der Mutationsanalyse der Kandidatengene .....	82
Tabelle 35: Genexpression und CNA in KEGG <i>Pathways in cancer</i> .....	88
Tabelle 36: Genexpression weiterer aberrant exprimierter Gene .....	88

## 4 Zusammenfassung / Abstract

### 4.1 Zusammenfassung

**Einleitung:** Akute *mixed phenotype* Leukämien (MPAL), welche einen kombinierten myeloischen und lymphatisches B-/T-Zell-Phänotyp aufweisen, zeigen mehrheitlich komplexe chromosomale Aberrationen. In dieser Dissertation wird eine MPAL im Kindesalter zum Zeitpunkt der Ersterkrankung und der Folgerezidive mit verschiedenen Methoden detailliert untersucht und umfassend charakterisiert. Die Aufklärung molekularer Mechanismen in Leukämien mit modernen Untersuchungsmethoden eröffnet neue Möglichkeiten der *targeted* Therapie. Insbesondere Analysen der chromosomalen Imbalancen und der Genexpressionsveränderungen können Einblicke in die molekularen Netzwerke und dysregulierten Signaltransduktionswege geben.

**Material und Methoden:** In Ergänzung zur Routinediagnostik wurden molekulare (zyto)genetische Analyseverfahren wie Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), Spectral Karyotyping (SKY), Microarray-basierte komparative genomische Hybridisierung (aCGH), Gensequenzierung, quantitative PCR und genomweite Microarray-Genexpressionsanalysen angewendet, um leukämische Blasten zu den Zeitpunkten der Diagnose der Ersterkrankung und zweier Rezidive zu charakterisieren. Zudem erfolgte zur Expansion der Probenmenge eine *whole genome amplification* sowie das Engraftment im murinen Xenograftmodell.

**Ergebnisse und Diskussion:** Die MPAL zeigt eine ausgeprägte intraleukämische klonale Diversität und genetische Instabilität im Krankheitsverlauf, gemeinsames Merkmal scheint eine *TCF3-ZNF384*-Fusion als potenzielle *founder* Mutation und eine Amplifikation von *KRAS* zu sein. Nach Literaturrecherche ist dies die erste Beschreibung einer Wildtyp-*KRAS* Amplifikation bei Leukämien, welche in der MPAL u.a. auch für die genetische Instabilität ursächlich verantwortlich zu sein scheint. Weitere Aberrationen mit potenzieller Aktivierung des RAS-Signaltransduktionsweges wurden nachgewiesen. Basierend auf den molekulargenetischen Ergebnissen wurde eine *second-line* Therapie mit dem Multikinase-Inhibitor Sorafenib empfohlen, weitere Ansatzpunkte für Inhibitoren des gesamten MAPK-Signalweges werden diskutiert.

Zudem offenbarten die Analysen weitere Kandidatengene: So liegt wahrscheinlich eine Dysregulation des Zellzyklus- (u.a. mit Nachweis einer *CDKN2A*-Deletion) und des

Apoptose-Signalweges (insbesondere bei *BCL2*-Überexpression und Kopienzahlzugewinn im Rezidiv) vor, der Einsatz von MDM2- und BCL2-Inhibitoren zur *targeted therapy* wird diskutiert.

## 4.2 Abstract

**Introduction:** Acute mixed phenotype leukemias (MPAL) expressing a combined myeloid and lymphatic B-/T-cell phenotype, show in their majority complex chromosomal aberrations. In this doctoral thesis, a case of pediatric MPAL was analyzed at initial presentation and at subsequent relapses in detail using multiple techniques. Uncovering molecular mechanisms in leukemia with modern analytical tools opens up new possibilities for targeted therapy. In particular, analyses defining chromosomal imbalances and gene expression changes can provide insights into molecular networks and dysregulated signal transduction pathways.

**Material and Methods:** In addition to routine diagnostics, molecular (cyto)genetic techniques such as fluorescence in situ hybridization (FISH), spectral karyotyping (SKY), microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH), gene sequencing, quantitative PCR (qPCR) and genome-wide oligonucleotide microarray analysis were used to characterize leukemic blasts at the points of initial disease and two relapse stages. To expand the sample sizes, whole genome amplification and engraftment in murine xenograft model was performed.

**Results and Discussion:** Pronounced intra-tumour clonal diversity and genetic instability in the course of disease were found, common traits appear to be a *TCF3-ZNF384* fusion and a *KRAS* amplification. According to literature, this is the first report showing wild-type *KRAS* amplification in a leukemia, which seems to be causally responsible for genetic instability in MPAL. Further aberrations with potential activation of the RAS signal transduction pathway were detected. Based on these results, second-line therapy with the multikinase inhibitor sorafenib was recommended, further targets for inhibitors of the entire MAPK signaling pathway are discussed.

In addition, the analyses revealed further candidate genes: there is probably a dysregulation of the cell cycle (including deletion of *CDKN2A*) and the apoptosis pathway (especially with *BCL2* overexpression and copy number gain in relapse), the use of MDM2- and BCL2-inhibitors for targeted therapy is discussed.

## 5 Einleitung

### 5.1 **Acute leukemias of ambiguous lineage: seltene Leukämien im Kindes- und Jugendalter**

Leukämien sind mit einem Anteil von rund 34% die häufigste onkologische Erkrankung im Kindes- und Jugendalter. Dabei handelt es sich in über 99% um akute Leukämien, welche anhand morphologischer, immunphänotypischer und molekular-zytogenetischer Merkmale in verschiedene Subtypen klassifiziert werden. Hierbei wird grundsätzlich die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) von der akuten myeloischen Leukämie (AML) unterschieden. Davon hat die ALL mit rund 82% den größten Anteil an den Leukämien im Kindesalter, die im Erwachsenenalter häufigere AML liegt dagegen bei nur rund 15% vor. Sehr selten (<1%) tritt bei Kindern die chronisch myeloische Leukämie (CML) auf.<sup>1</sup>

#### 5.1.1 **Morphologie und Zytochemie**

Die Zuordnung von akuten Leukämien nach morphologischen Kriterien erfolgt mittels der *French-American-British Working Group for Leukemia Classification (FAB)*. Hierbei werden u.a. Zellgröße, Zellkerngröße und -form, Zytoplasmaanteil, Basophilie und Granula im Zytoplasma beurteilt. Die akuten Leukämien der myeloischen Zellreihe werden in M<sub>0</sub>-M<sub>7</sub> unterteilt, die akuten Leukämien der lymphatischen Zellreihen in L<sub>1</sub>-L<sub>3</sub>. Zusätzlich erfolgen zytochemische Färbungen u.a. auf Myeloperoxidase (MPO) und Esterase, saure Phosphatase und die PAS-Färbung. In den meisten Fällen gelingt die Zuordnung zum AML-Subtyp bereits anhand der typischen Morphologie und Zytochemie.<sup>1</sup>

#### 5.1.2 **Immunphänotyp**

Eine zuverlässigere und effizientere Zellreihenzuordnung der Leukämiezellen wird durch die Bestimmung von Antigenexpressionsmustern ermöglicht. Mittels Durchflusszytometrie können extra- und intrazelluläre Marker bestimmt werden, deren Expression charakteristisch für lymphatische oder myeloische Zellreihen ist. Darüber hinaus können anhand des Expressionsmusters auch Informationen zum Differenzierungsgrad der Blasten gewonnen werden.<sup>2</sup>

Die durchflusszytometrischen Analysen des leukämischen Immunphänotyps zeigen allerdings auch, dass Blasten Antigene verschiedener Zellreihen koexprimieren können. Je nach dominierendem Antigenexpressionsmuster werden verschiedene Subtypen unterschieden. Die häufigste Gruppe stellen die akuten Leukämien mit einer zusätzlichen schwach ausgeprägten aberranten Antigenkoexpression dar: die ALL mit myeloischer

## Einleitung

Antigenkoexpression und die AML mit lymphatischer Antigenkoexpression. Eine weitere, seltenere Gruppe von Leukämiesubtypen ist durch eine aberrante Expression von myeloischen und lymphatischen Markern charakterisiert, die eine klare Zuordnung zu einer der beiden Reihen nicht mehr ermöglicht. Diese Leukämien werden in der Gruppe der *acute leukemias of ambiguous lineage* (ALAL) zusammengefasst. Hierzu gehören gemäß der WHO-Klassifikation von 2008<sup>3</sup> und 2016<sup>4</sup> (s. Abbildung 1):

- die *mixed phenotype acute leukemias* (MPAL), deren Expressionsmuster Kriterien für zwei oder mehr Zellreihen simultan erfüllen,
- die *acute undifferentiated leukemias* (AUL, Prävalenz <1%), welche keine zellreihendefinierenden Marker aufweisen
- sowie die *other ambiguous lineage leukemias*, welche weder die Kriterien für MPAL noch für AUL erfüllen

Bis zur Veröffentlichung der WHO 2008-Klassifikation erfolgte die Einteilung der ALAL nach den Kriterien der *European Group of Immunological Classification of Leukemias* (EGIL) von 1995.<sup>5</sup> Demnach wurden die MPAL noch als *mixed lineage acute leukemias* (MLAL) bezeichnet und wie folgt unterteilt:

- die biphänotypische akute Leukämie (*biphenotypic acute leukemia*; BAL), bei der die verschiedenen Antigene gemeinsam von einer Zellpopulation exprimiert werden,
- die bilineare akute Leukämie (*bilineal acute leukemia*), bei der zwei zellreihendifferente Blastenpopulationen nebeneinander nachweisbar sind und
- die *lineage switch* Leukämie, bei der vor Erreichen einer Vollremission ein phänotypischer Wechsel der Zellreihenzugehörigkeit beobachtet wird<sup>6</sup>

Gemäß dem EGIL-Score wurden dabei den exprimierten, leukämieassoziierten Antigenen Punktwerte zugeordnet, eine MLAL musste definitionsgemäß einen Punktwert >2 für mindestens zwei verschiedene Zellreihen aufweisen (Abbildung 1).<sup>5,7,8</sup> Auch in der WHO-Klassifikation von 2001 werden die EGIL-Kriterien aufgeführt, in einer Auflage jedoch mit der Fehlangabe eines geforderten Punktwertes von  $\geq 2$ .<sup>9</sup>

Nach Einführung der WHO 2008-Kriterien entfiel die Unterteilung in biphänotypische, bilineale und *lineage switch* Leukämien. Seitdem werden die MPAL anhand bestimmter genetischer Translokationen sowie der Zellreihen-Kombination unterteilt. Außerdem weicht die Bewertung der Antigenexpressionsmuster teilweise von der des EGIL-Scores ab. Weiterhin wurden u.a. Leukämien mit AML-spezifischen Translokationen wie t(8;21), t(15;17) oder inv(16) sowie Therapie-assoziierte Leukämien und Blastenkrisen bei CML

ausgeschlossen.<sup>3</sup> Abbildung 1 zeigt die verschiedenen Klassifikationen mit Definitionskriterien im Vergleich.

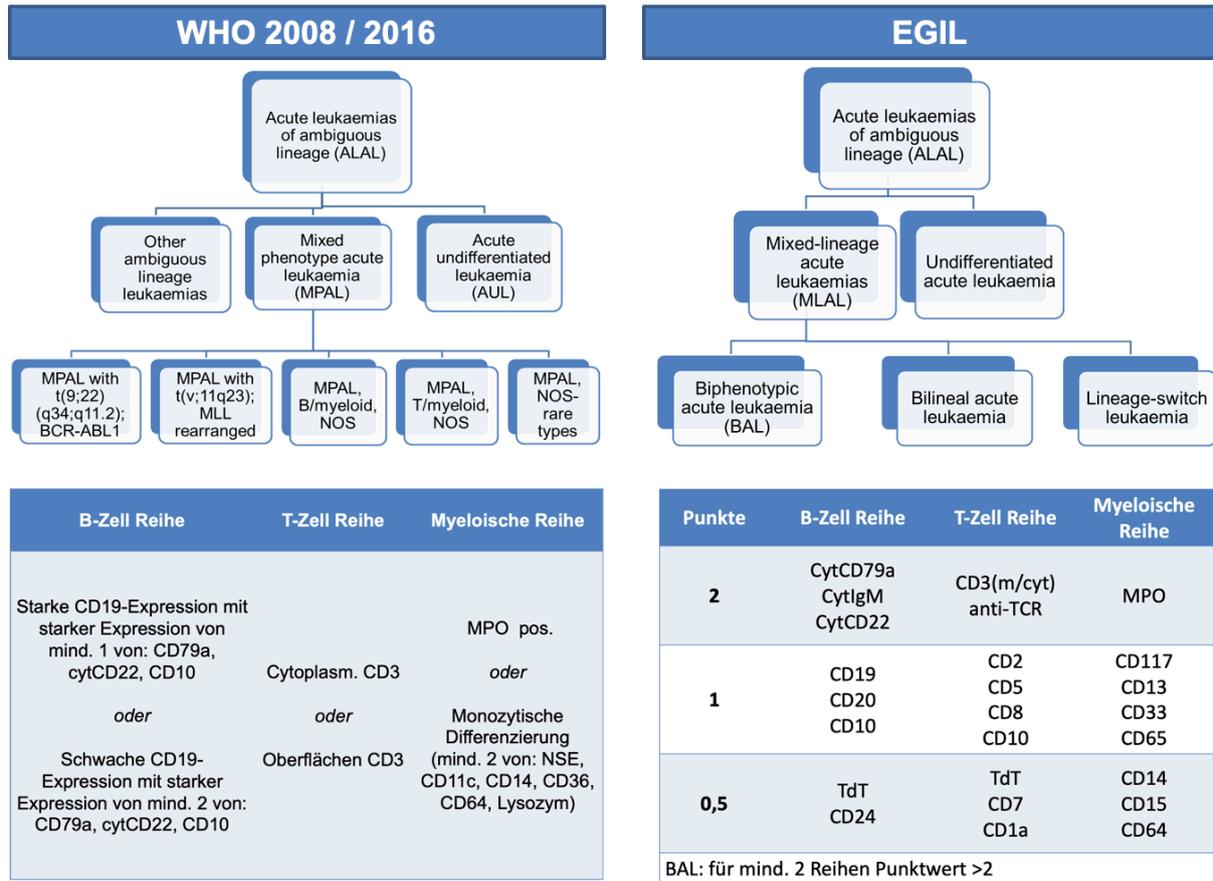


Abbildung 1: Vergleich der Klassifikationen & Definitionskriterien nach WHO 2008<sup>3</sup> / 2016<sup>4</sup> und EGIL<sup>5,7,8</sup>

Die Veränderung der Klassifikationskriterien hat zur Folge, dass Leukämien, welche gemäß EGIL-Score noch als BAL klassifiziert wurden, nun in vielen Fällen abweichend reklassifiziert werden. Jedoch auch umgekehrt werden nun Leukämien zu den MPAL gezählt, die nach EGIL nicht die Kriterien einer BAL erfüllt haben. Weinberg beschreibt in seinem Review verschiedener Studien zu MPAL im Erwachsenen- und Kindesalter eine Reklassifizierung als MPAL nach WHO 2008 in nur 56% aller BAL gemäß EGIL.<sup>9</sup> In einer dieser Studien von Al Seraihy et al. wurden retrospektiv 11 der 24 BAL-Fälle entsprechend WHO 2008-Klassifikation als ALL mit aberranter Expression reklassifiziert und ausgewertet.<sup>9,10</sup> Tabelle 1 zeigt die abweichenden Daten der gleichen Fälle nach den unterschiedlichen Klassifikationskriterien und verdeutlicht die Schwierigkeit von Vergleichen.

chen verschiedener Studien zur Gruppe der ALAL. Aufgrund der Diversität der verwendeten Analysemethoden und Klassifikationskriterien werden in entsprechenden Studien unterschiedliche epidemiologische Werte, wie z.B. für die Prävalenz angegeben. Hinzu kommt innerhalb der WHO-Klassifikation zunächst auch die fehlende Standardisierung der Immunphänotypisierung mit der Angabe von Grenzwerten für die Durchflusszytometrie. Erst 2017 erfolgte die Veröffentlichung einer entsprechenden Leitlinie.<sup>11</sup>

**Tabelle 1: Retrospektiver Vergleich der Daten nach EGIL- mit WHO-Klassifikation 2008 der Studie von Al-Seraihy et al.<sup>10</sup>**

B: B-lymphoblastisch; T: T-lymphoblastisch; My: myeloisch; CR: komplette Remission

	EGIL % (absolut)	WHO 2008 % (absolut)
<b>Prävalenz</b>	3,7 (24/633)	1,7 (11/633)
<b>B / My</b>	58,3 (14/24)	45,5 (5/11)
<b>T / My</b>	29,2 (7/24)	45,5 (5/11)
<b>T / B</b>	8,3 (2/24)	9,0 (1/11)
<b>T / B / My</b>	4,2 (1/24)	-
<b>CR (nach Induktion)</b>	95,8	100
<b>Rezidiv</b>	16,6	0
<b>Gesamtüberleben</b>	75,7	100

In den Studien lagen die Prävalenzwerte für MLAL im Kindesalter bei bis zu 3,7% der akuten Leukämien, für die enger gefassten Kriterien gemäß WHO 2008 ergaben sich retrospektiv Prävalenzen von 1-1,8%.<sup>9,10,12-14</sup> Die bilineare und *lineage-switch* Leukämie sind mit einem Anteil von 6,5% und 8,7% an den MLAL des Kindesalters selten.<sup>13</sup>

Auch die Angaben über die Prävalenz der Kombinationstypen variieren: In zwei Studien von werden die B-lymphoblastisch-myeloischen Leukämien mit rund 58% als die häufigste Form beschrieben, gefolgt von der T-lymphoblastisch-myeloischen Leukämie mit rund 30-35%.<sup>10,13</sup> Im Gegensatz dazu fand eine andere Studie in 57% aller Fälle einen T-lymphoblastischen-myeloischen Immunphänotyp.<sup>12</sup> In allen Studien gleich selten beschrieben (<10%) sind die kombinierten T- und B-Zell-Leukämien und trilineären Leukämien.<sup>10,12,13</sup>

In der WHO-Klassifikation von 2016<sup>4</sup> wurden die Kriterien von 2008 ohne relevante Änderungen übernommen. Jedoch wird nun kritisch auf die unklare klinische Signifikanz von MPO als alleinigem myeloischen Marker hingewiesen, was bereits nach Erscheinen der WHO 2008-Klassifikation Diskussionspunkt vieler Veröffentlichungen war (s. Abschnitt 5.1.4).

### 5.1.3 Genetik

Die Gruppe der ALAL fällt durch eine hohe Rate an aberranten Karyotypen auf. So wurden in den Studien allein mit konventionellen zytogenetischen Analysen in rund 70-90% der pädiatrischen Fälle Chromosomenaberrationen beobachtet, 11,5 – 36,4% zeigten dabei komplexe Karyotypen.<sup>10,12,13,15</sup> Den am häufigsten beobachteten chromosomalen

## Einleitung

Translokationen wurde mit der Einführung neuer Untergruppen in der aktuellen Klassifikation der WHO (Abbildung 1) Rechnung getragen. Zu benennen sind die:

- die MPAL mit Translokation  $t(9;22)(q34;q11.2)$ , *BCR-ABL1*-positiv
- die MPAL mit Translokation  $t(v;11q23)$ , positiv für *MLL*-Rekombination<sup>3</sup>

Analog zu der Gruppe der ALL ist die Frequenz der *BCR-ABL1*-positiven ALAL im Kindesalter deutlich niedriger als im Erwachsenenalter (4,4%<sup>13</sup> vs. 25%<sup>16</sup>). Parallel dazu sind Rekombinationen mit Beteiligung des *MLL*-Gens bei MPAL im Kindesalter, vor allem im Säuglingsalter häufiger vorzufinden.<sup>3</sup> So beschreiben Gerr et al.<sup>13</sup> eine *MLL*-Rekombination in 10,9% der ALAL im Kindesalter (gegenüber ca. 5% bei adulten ALAL<sup>16</sup>). Außerdem wurden in dieser Studie unter anderem folgende genetische Veränderungen beschrieben: Die Fusion *ETV6-RUNX1* ( $t(12;21)$ ) wurde in 16% der Fälle am häufigsten beobachtet, gefolgt von einer Trisomie 8 in 13,5%. Die Prävalenz aller oben genannten Translokationen bei der ALAL zeigt jedoch keinen signifikanten Unterschied zur Prävalenz bei ALL oder AML. Beschrieben wurde, dass einige Chromosomen bei der ALAL häufiger von Umlagerungen betroffen sind, wie z.B. die Chromosomen 5, 7 und 12p.<sup>12</sup> Al-Seraihy et al. fanden in ihrer Studie den 14q32-Lokus bei BAL mit 17% am häufigsten beteiligt.<sup>10</sup> In einem Review werden bisher beschriebene zytogenetischen Aberrationen bei ALAL zusammengefasst, alle genannten Translokationen sind jedoch nicht spezifisch für diese Gruppe der Leukämien.<sup>15</sup>

Viele der beschriebenen genetischen Aberrationen lassen sich aufgrund ihrer Komplexität jedoch nicht allein durch eine konventionelle Zytogenetik charakterisieren, und auch die in der Diagnostik etablierte ergänzende Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist durch die Notwendigkeit einer spezifischen Sondenauswahl begrenzt. Zusätzliche Methoden – auf der FISH aufbauende Spezialmethoden und molekulargenetische Analysen – können diese Ergebnisse ergänzen. So untersuchten Tassano et al.<sup>17</sup> einen Fall von MPAL mittels aCGH (*Microarray-based Comparative Genomic Hybridization*) und Multi-color-FISH, sie wiesen komplexe unbalancierte Translokationen mit Beteiligung der Chromosomen 1p, 9p, 13q und 16q nach.

In einer neuen Studie untersuchten Eckstein et al.<sup>18</sup> Proben von 23 erwachsenen und pädiatrischen MPAL-Patienten mittels *whole-exome sequencing* und fokussierten sich auf die Sequenzen 562 krebserrelevanter Gene. In 35% der Fälle konnten sie Mutationen in epigenetisch regulierenden Genen, vor allem im *DNMT3A*, welches eine DNA-Methyl-

transferase kodiert, nachweisen. Außerdem traten häufig Mutationen von Tumorsuppressorgenen wie *TP53* (56%) und Transkriptionsfaktoren wie *NOTCH1* (39%) und aktivierende Mutationen in Genen des *RAS*-Signalwegs (61%) auf. Ein Teil der Mutationen wurde bisher sowohl bei AML wie auch ALL beschrieben, andere sind mit nur ausschließlich einem Typ assoziiert, so dass keine klare lymphatische oder myeloische Abstammung zu erkennen ist, wodurch die These der ALAL als eigene Entität gestützt wird.

Des Weiteren wurden Genexpressionsanalysen zur Charakterisierung der Gruppe der ALAL durchgeführt. In der Studie des *St. Judes Hospitals*<sup>12</sup> wurden klare Abgrenzungen der Expressionssignaturen der MLAL von denen der klassischen ALL und AML in 8 der 13 Fälle beschrieben.

Dem gegenüber stehen die Ergebnisse von microRNA-Analysen. Auf der Basis der Expressionsprofile dieser kurzkettigen Einzelstrang-RNA-Moleküle konnte eine genaue Tumorzellreihenanzuordnung von gemäß WHO 2008 diagnostizierten ALAL zur lymphoiden oder myeloischen Zellreihe erfolgen, wobei die Autoren die Bewertung von MPO als alleinigem myeloischen Marker in der WHO 2008-Klassifikation in Frage stellen.<sup>19</sup>

### 5.1.4 Therapie und Prognose

Für die Behandlung der MPAL bzw. MLAL existiert noch keine einheitliche Therapieempfehlung. In den meisten Therapiestudien erfolgt die Behandlung der Patienten entsprechend dem dominierenden Immunphänotyp der Leukämiezellen. Die Therapieoptimierungsstudie AIEOP-BFM ALL 2017<sup>20</sup> schließt die MPAL mit prädominantem lymphoblastischen Phänotyp in die Studie mit ein. In der Empfehlung der Therapieoptimierungsstudie zur Behandlung von Kindern mit AML, AML-BFM 2004,<sup>6</sup> wird die Therapiestratifizierung der Patienten mit MPAL nach dem Vorliegen von bestimmten chromosomalen Translokationen, der Zytochemie, dem Immunphänotyp und der Morphologie entschieden. Unter Vorgabe eines Behandlungsalgorithmus wird die initiale Behandlung entweder gemäß eines ALL- oder AML-Therapieprotokolls empfohlen. Ein Protokollwechsel ist bei mangelndem Therapieansprechen indiziert bzw. zur Berücksichtigung der zweiten Leukämiekomponente notwendig. Mit diesem Behandlungsregime wurde in der Studie von Gerr et al.<sup>13</sup> eine Remissionsrate von 91,8% erreicht. Eine höhere Wahrscheinlichkeit eines ereignisfreien Überlebens (*probability of event-free survival*, pEFS) hat sich für die Gruppe mit ALL-gerichteter Therapie gezeigt (5y-pEFS 81±6% vs. 41±12% bei AML-gerichteter Therapie). Bei der Betrachtung dieses Ergebnisses ist die Therapiestratifizierung aufgrund der Prädominanz des lymphatischen (Immun-)Phänotyps zu bedenken, welcher

## Einleitung

generell mit besserem *Outcome* im Kindesalter assoziiert ist. Jedoch zeigen auch Studien, die MPAL im Erwachsenenalter einschließen, bessere Remissionsraten bei der Behandlung mit ALL-gerichteten Therapeutika.<sup>21</sup>

Eine ähnliche Therapiestratifizierung wurde in der Studie des *St. Judes Hospitals*<sup>12</sup> durchgeführt, hier konnte bei 80% der initialen Therapieversager mit einer AML-Induktion durch Wechsel auf ein ALL-gerichtetes Induktionsregime eine komplette Remission erreicht werden. Durch die Berücksichtigung von wirksamen Substanzen gegen beide Zellreihen im initialen Therapieprotokoll (*St. Jude Total XIII-B high-risk protocol*) wurde in der Studie von Al-Seraihy (s. Tabelle 1) eine Remissionsrate von 95,8% erreicht.<sup>10</sup>

Der Nutzen einer allogenen Stammzelltransplantation (SZT) für pädiatrische ALAL-Patienten konnte bisher nicht sicher belegt werden. Übereinstimmend fanden 2 Studien kein verbessertes Outcome für die SZT im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie.<sup>10,22</sup> Dennoch wird in einer weiteren Studie bei folgenden Merkmalen die Durchführung einer SZT empfohlen: beim Vorliegen eines Philadelphia-Chromosoms, einer *MLL*-Genrekombination sowie dem Vorliegen einer bilinearen und *lineage-switch* Leukämie.<sup>13</sup> Al-Seraihy et al.<sup>10</sup> empfahlen außerdem die Durchführung einer SZT bei schlechtem frühen Therapieansprechen, also einem Blastenanteil > 5% an Tag 15, bzw. MRD > 1% am Ende der Induktionstherapie. Eine retrospektive Analyse von 95 Patienten aller Altersstufen, die aufgrund einer MPAL eine allogene SZT nach myeloablativer Konditionierung erhielten, zeigte ein vergleichbares Gesamtüberleben (*overall survival*, OS) und *leukemia-free survival* (LFS) zu gematchten ALL- und AML-Gruppen jedoch bei erhöhtem Auftreten akuter *graft-vs.-host* Erkrankung (GVHD) sowie einer Tendenz zu verstärkter chronischer GVHD in der Gruppe der MPAL-Patienten.<sup>23</sup> Diese Studiengruppe empfiehlt die Transplantation aller MPAL-Patienten. Eine weitere Studie beschrieb sogar ein besseres Outcome erwachsener MPAL-Patienten nach SZT im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie, so dass die Transplantation zumindest für Erwachsene dringend empfohlen wird.<sup>24</sup>

Wie bereits in Abschnitt 5.1.2 erwähnt, wurde seit Einführung der neuen Klassifikation ab 2008 vermehrt diskutiert, welche Auswirkungen eine abweichende Reklassifikation auf den Therapieerfolg haben kann und welche klinische Signifikanz MPO als alleiniger myeloischer Marker dabei besitzt: Sowohl Al-Seraihy<sup>10</sup> wie auch eine Studie zu akuten Leukämien im Erwachsenenalter<sup>25</sup> beschreiben ein schlechteres *Outcome* für Patienten mit BAL gemäß EGIL-Kriterien, die nach WHO 2008 nicht mehr als MPAL reklassifiziert wurden und bedenken eine eventuell insuffiziente Therapie für diese Patientengruppe (s.

## Einleitung

auch Tabelle 1). Bei Gerr et al.<sup>26</sup> zeigte sich ein signifikant besseres Outcome MPO-positiver Patienten (pEFS 69±6% vs. 45±10% bei MPO-Negativität).

Eine neue retrospektive Studie stellt die Daten von B-ALL bei Kindern ohne myeloische Koexpression den B-ALL mit MPO-Koexpression im FACS als einzigem myeloischen Marker sowie den MPAL mit mehreren myeloischen Markern gegenüber: Das Ergebnis zeigt ein signifikant erhöhtes Rezidivrisiko sowie verringerte pEFS für die Gruppe mit alleiniger MPO-Koexpression gegenüber den B-ALL bei vergleichbarer Therapie. Hiernach schient die Klassifizierung dieser Gruppe nach WHO 2008 / 2016 als MPAL durchaus sinnvoll und zeigt auch laut Studie biologisch ein ähnliches Verhalten wie die MPAL mit mehreren myeloischen Markern.<sup>27</sup>

Die Einführung genetischer Faktoren in die neue Klassifikation ist sicher auch richtig: Sowohl das Vorliegen eines Philadelphia-Chromosoms (t(9;22)), welches immer eine Therapie mit Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (TKI) zur Folge haben sollte, als auch einer *MLL*-Rekombination scheinen auch bei ALAL mit einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein. Prognostisch günstig ist dagegen das Vorliegen weiterer Aberrationen bei ALAL: Für die Trisomie 8 wurde mit 86±13% eine höhere pEFS beschrieben (vs. 47±8% ohne Trisomie 8). Auch die pEFS von Kindern mit *ETV6-RUNX1*-positiver ALAL lag mit 100% signifikant höher als ohne Fusionsgen (57±6%).<sup>13</sup>

Aufgrund der inhomogenen Verteilung bei Anwendung verschiedener Klassifikations- und Einschlusskriterien lassen die Studien bisher keine allgemeingültige Therapieempfehlung zu. In der neuesten Studie lag die pEFS von Kindern mit MLAL bei 62±5% (5y-pEFS). Die pEFS ist vergleichbar mit denen einer Standard-Risiko (SR)-AML (pEFS 63±4%), jedoch ist die Prognose deutlich schlechter als bei der SR-ALL (pEFS 90±1%). Auch die Rezidivrate liegt mit 21±4% zwischen denen für AML (33±2%) und ALL (16±1%). Jedoch zeigen sich in einzelnen Untergruppen deutliche Abweichungen, aus denen prognostische und Risikofaktoren für die ALAL abgeleitet werden können: Ebenso wie bei ALL und AML ist für die ALAL das Ansprechen auf die Initialtherapie prognostisch von großer Bedeutung. Für Patienten mit *prednisone-good-response* wird eine pEFS von 91±5% (vs. 28±16% pEFS bei *prednisone-poor-response*) beschrieben.<sup>13</sup> Eine weitere Studie gibt für Patienten mit <5% Blasten an Tag 15 eine pEFS von 90,9% an, Patienten mit >5% Blasten zeigten eine pEFS von nur 48%.<sup>10</sup> Die Kontrolle des Therapieansprechens erfolgt über die Bestimmung des Blastenanteils im KM-Ausstrich und der Last der leukämischen Restzellen (*Minimal Residual Disease*, MRD) mittels durchflusszytometrischer Immunphänotypisierung oder quantitativer PCR zu definierten Zeitpunkten der Therapie.

Der Immunphänotyp hat ebenfalls Einfluss auf die Prognose. So lag bei Gerr et al.<sup>13</sup> die pEFS für Kinder mit einer bilinearen bzw. *lineage-switch* Leukämie deutlich unter der bei BAL (pEFS 33±19% und 38±17% zu 67±6%). Die höchste pEFS in dieser Studie hatten Kinder mit BAL mit B-lymphoblastisch-myeloischem Phänotyp (pEFS 74±7% zu 53±10% bei T-lymphoblastisch-myeloischer BAL).

In allen Studien konnte keine prognostische Relevanz für Hyperleukozytose und ZNS-Befall nachgewiesen werden, wahrscheinlich haben Kinder <2 Jahren ein schlechteres Outcome als Kinder >2 Jahren (pEFS 40±15% vs. 65±5%<sup>13</sup>). In einer Studie zu adulten BAL wurde erstmals beschrieben, dass ein komplexer Karyotyp mit einer signifikant reduzierten Überlebensrate einhergeht.<sup>28</sup> Daten, die diese Ergebnisse für pädiatrische Fälle belegen, wurden bisher noch nicht veröffentlicht.

## 5.2 Fallpräsentation einer MPAL und Vorarbeiten

In Vorarbeiten zu dieser Dissertation wurden die komplexen genetischen Veränderungen der Ersterkrankung einer MPAL im Rahmen der leukämischen Routinediagnostik in Grundzügen analysiert. Die Erstdiagnose einer Leukämie wurde 2009 bei einem 6-jährigen Mädchen gestellt, welches durch rezidivierende Bauchschmerzen, Fieberschübe >39 °C, Erbrechen und Durchfall auffiel. Klinisch wurde eine Hepatosplenomegalie diagnostiziert, das Blutbild zeigte eine Leukozytose (22.000 / $\mu$ l), Thrombozytopenie (40.000 / $\mu$ l) und laborchemisch lagen erhöhte Zellzerfallsparmeter vor (Harnsäure 7,1 mg/dl, LDH 3374 U/l). Wegen des Verdachts auf eine Leukämie mit 67% Blasten im Blut wurde eine KM-Punktion durchgeführt.

### 5.2.1 Morphologie und Immunphänotyp

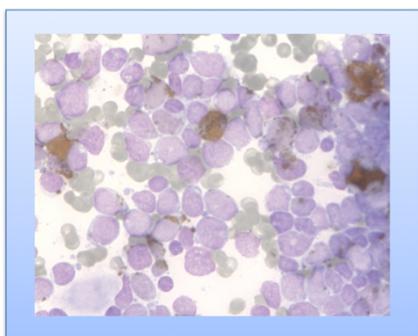


Abbildung 2: Knochenmark-Ausstrichpräparat mit Myeloperoxidase-Positivität der Blasten

Die zytologische Untersuchung des Knochenmark(KM)-Punktats im hämatologischen Labor der Klinik für Pädiatrie m.S. Onkologie und Hämatologie der Charité bestätigte die Diagnose einer AML (FAB M2 ohne Auerstäbchen). Zytochemisch zeigte sich eine MPO-Positivität (s. Abbildung 2). Die Zellkerne wiesen jedoch zusätzlich lymphatische Charakteristika auf. Ein Befall des ZNS wurde ausgeschlossen.

## Einleitung

In der Durchflusszytometrie (Medizinische Hochschule Hannover) wurde die Koexpression von myeloischen und lymphatischen Marker nachgewiesen, die genauen Daten sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

**Tabelle 2: Zytochemie, Immunphänotyp und Zytogenetik sowie weitere klinische Parameter von Ersterkrankung und Erstrezidiv**

	<b>Ersterkrankung</b>	<b>Erstrezidiv</b>
<b>Blasten (im FACS)</b>	69%	75%
<b>Zytochemie</b>	MPO: 50% positiv POX: 50% positiv Esterase: negativ	MPO: negativ
<b>Immunphänotyp</b>	<p style="text-align: center;"><b>Mind. 2 Blastenpopulationen:</b></p> 1) MPO+, cytCD79+, CD19+, CD13+, CD10+, CD20- 2) MPO++, cytCD79-, CD19+, CD13+, CD10+, CD20-	MPO-, CD19+, cytCD79-, CD13, CD10+, CD20-
<b>WHO 2008</b>	<b>Mixed-phenotype acute leukemia (MPAL, B/myeloid, NOS)</b>	<b>Mixed-phenotype acute leukemia (da c-ALL nach lineage switch)</b>
<b>EGIL</b>	Biphänotypische Akute Leukämie (BAL)	Common-ALL
<b>Klonaler IgH-Marker</b>	VH3D3JH3	
<b>Zytogenetik</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- negativ für <i>BCR-ABL</i>, <i>RUNX1-RUNX1T1</i>, <i>ETV6-RUNX1</i></li> <li>- kein Nachweis einer <i>MLL</i>-Translokation</li> <li>- monoallelischer <i>ETV6</i>-Verlust in 27% der Zellen</li> <li>- komplexer Karyotyp</li> </ul>	

Die Ersterkrankung erfüllt sowohl nach EGIL die Kriterien einer BAL als auch nach neuer WHO-Klassifikation die einer MPAL (B/myeloisch, NOS).

Das Erstrezidiv, welches ein Jahr nach der Erstdiagnose auftrat, zeigte hingegen einen veränderten Phänotyp: Bei nun MPO-Negativität wäre die Leukämie allein betrachtet keine MPAL mehr, aufgrund des *lineage-switch* wird die Erkrankung jedoch weiterhin zu MPAL bzw. ALAL gezählt.

### 5.2.2 Therapieverlauf

Aufgrund der dominanten myeloischen Komponente der Ersterkrankung wurde eine Polychemotherapie gemäß dem Studienprotokoll AML-BFM 2004 im Hoch-Risiko-Arm begonnen (s. Abbildung 3). An Tag 15 zeigte sich ein gutes morphologisches Ansprechen auf die Therapie. Bereits bei der Kontrolle vor dem zweiten Therapieblock konnte eine Erstremission im Knochenmark festgestellt werden. Zur Berücksichtigung der lymphatischen Komponente entschloss man sich nach drei AML-gerichteten Therapieblöcken zur

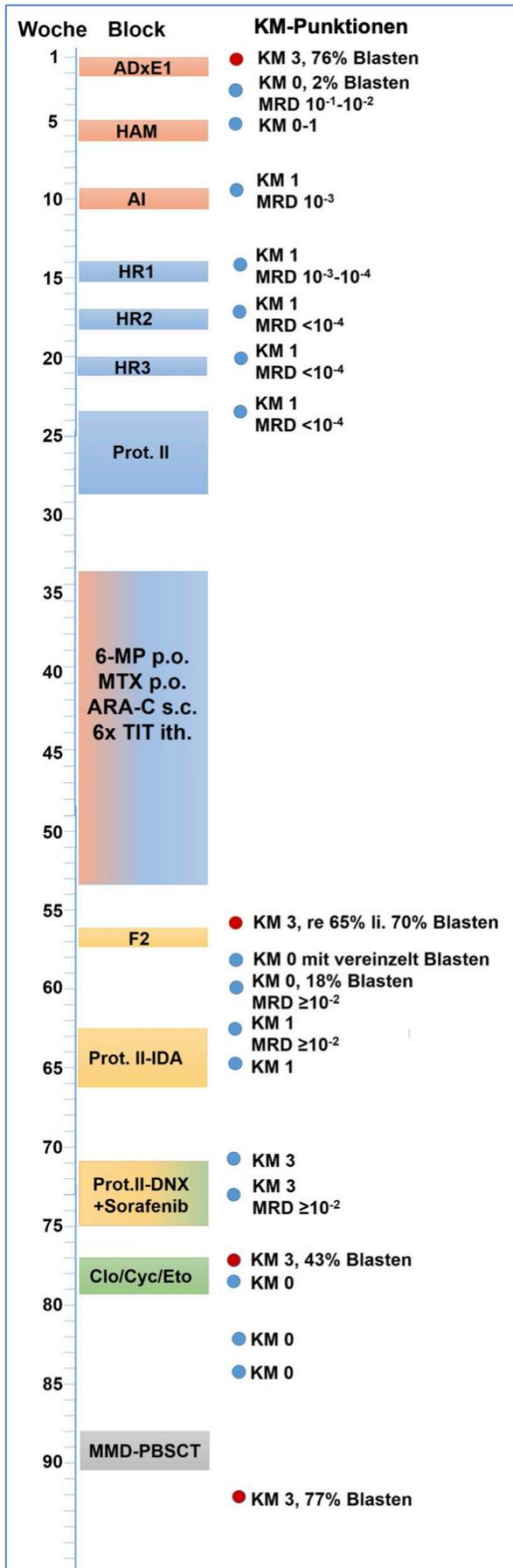


Abbildung 3: Therapieverlauf und Knochenmark (KM)-Diagnostik:

**KM 0:** aplastisches Knochenmark, **KM 1:** Regenerationsmark, **KM 3:** Blastenreiches Mark, **MRD:** *minimal residual disease*, **6-MP:** 6 Mercaptopurin, **MTX:** Methotrexat, **ARA-C:** Cytarabin, **TIT:** Tripletherapie intrathekal, **Clo:** Clofarabin, **Cyc:** Cyclophosphamid, **ETO:** Etoposid, **MMD:** *mis-match donor*, **PBSCT:** periphere Blutstammzell-transplantation, **p.o.:** per os, **s.c.:** subkutan, **ith.:** intrathekal

**Proben:** ● KM-Entnahme, ● in Analysen verwendet.

Farbgebung zeigt Therapieprotokoll der Blöcke an: **rot:** AML-BFM 2004 (Hochrisiko-Blöcke: ADxE1, HAM, AI, Erhaltungstherapie mit ARA-C i.th.), **blau:** ALL-BFM 2000 (Hochrisikoblöcke HR1-3, Protokoll II sowie Erhaltungstherapie mit 6-MP und MTX p.o., TIT ith.), **gelb:** ALL-REZ BFM 2002 (F2, Prot.II-IDA, Prot.II-DNX), **grün:** individualisierte Therapie (Sorafenib, Clo/Cyc/Eto), **grau:** SZT BFM 2007 MMD.

Applikation von 4 Blöcken aus dem Hochrisikozweig des ALL-BFM 2000-Protokolls. Die Therapie wurde von der Patientin weitestgehend komplikationsarm toleriert. Bei anhaltender Remission wurde eine orale Erhaltungstherapie mit Kombination beider Protokollelemente eingeleitet.

Gut ein Jahr nach Erstdiagnose wurden in Routinekontrollen erneut Blasten im peripheren Blut nachgewiesen. In der Knochenmarkpunktion bestätigte sich der Rezidivverdacht. Da nun -wie in Abschnitt 5.2.1 bereits beschrieben- der lymphatische Phänotyp dominierte, wurde eine Rezidivtherapie gemäß ALL-REZ 2002 Protokoll eingeleitet. Bei Remission nach dem F2-Block kam es aufgrund einer Infektion, Lebersynthesestörung sowie schwer einstellbarer Schmerzsymptomatik wiederholt zu Therapieverzögerungen. Nach Abschluss des Protokolls II-IDA wurde erneut ein Blastenanstieg festgestellt. Aufgrund der

zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Ergebnisse des Projektes wurde zusätzlich zu einem

## Einleitung

modifizierten Protokoll II-Daunoxome der Multi-Kinase-Inhibitor Sorafenib verabreicht. Funktion und Auswahl dieses Medikamentes werden in Abschnitt 8.2.4 genauer beschrieben.

Wegen weiterhin bestehender Blastenpersistenz erfolgte anschließend eine Intensivierung der Therapie mit einem Block CCE (Cyclophosphamid, Clofarabin, Etoposid). In anhaltender Aplasie erfolgte schließlich die Verlegung auf die pädiatrische Stammzelltransplantationsstation. Nach Konditionierung gemäß SZT-BFM 2007 erfolgte die allogene Stammzelltransplantation von einem unverwandten *mismatch*-Spender.

Leider zeigte sich an Tag 30 nach SZT ein erneutes Rezidiv, an dem die Patientin kurze Zeit darauf verstarb. Abbildung 3 gibt den gesamten Therapieverlauf mit Angabe der Knochenmarksdiagnostik (Morphologie, PCR-MRD) wieder. Für die MRD-PCR-Diagnostik (*minimal residual disease*, residuelle Leukämiezellen) konnte ein leukämiespezifischer IgH-Marker (klonale Umlagerung der schweren Immunglobulinkette) identifiziert und genutzt werden. Die Analysen erfolgten im abteilungsinternen Referenzlabor (Leitung: PD Dr. rer. medic. Cornelia Eckert).

### 5.2.3 Genetik

Die ersten tumorgenetischen Untersuchungen der Ersterkrankung auf das Vorliegen häufiger rekurrenter Chromosomenaberrationen erfolgten im Referenzlabor des Universitätsklinikums Gießen und Marburg. Dort wurden mittels FISH die Fusionen *BCR-ABL*, *RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO)* und *ETV6-RUNX1* sowie eine *MLL*-Rekombination ausgeschlossen. Jedoch wurde eine monoallelische Deletion des *ETV6*-Genlokus auf dem Chromosom 12(p13) nachgewiesen (s. Abbildung 4).

Die konventionelle Chromosomenanalyse (Karyotypisierung) wie auch die anschließenden molekularzytogenetischen Analysen wurden durch die Abteilung für Tumorzytogenetik des Instituts für Medizinische Genetik und Humangenetik der Charité durchgeführt. Diese Chromosomenanalyse zeigte zunächst einen aberranten Karyotyp mit chromosomalen Translokationen unter Einbeziehung der kurzen Arme eines Chromosoms 12 und eines Chromosoms 18 mit

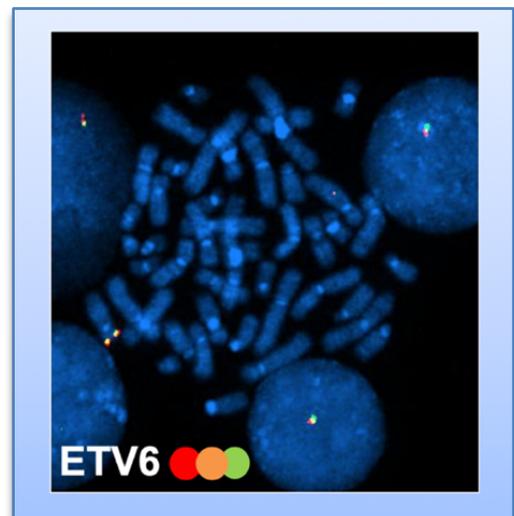
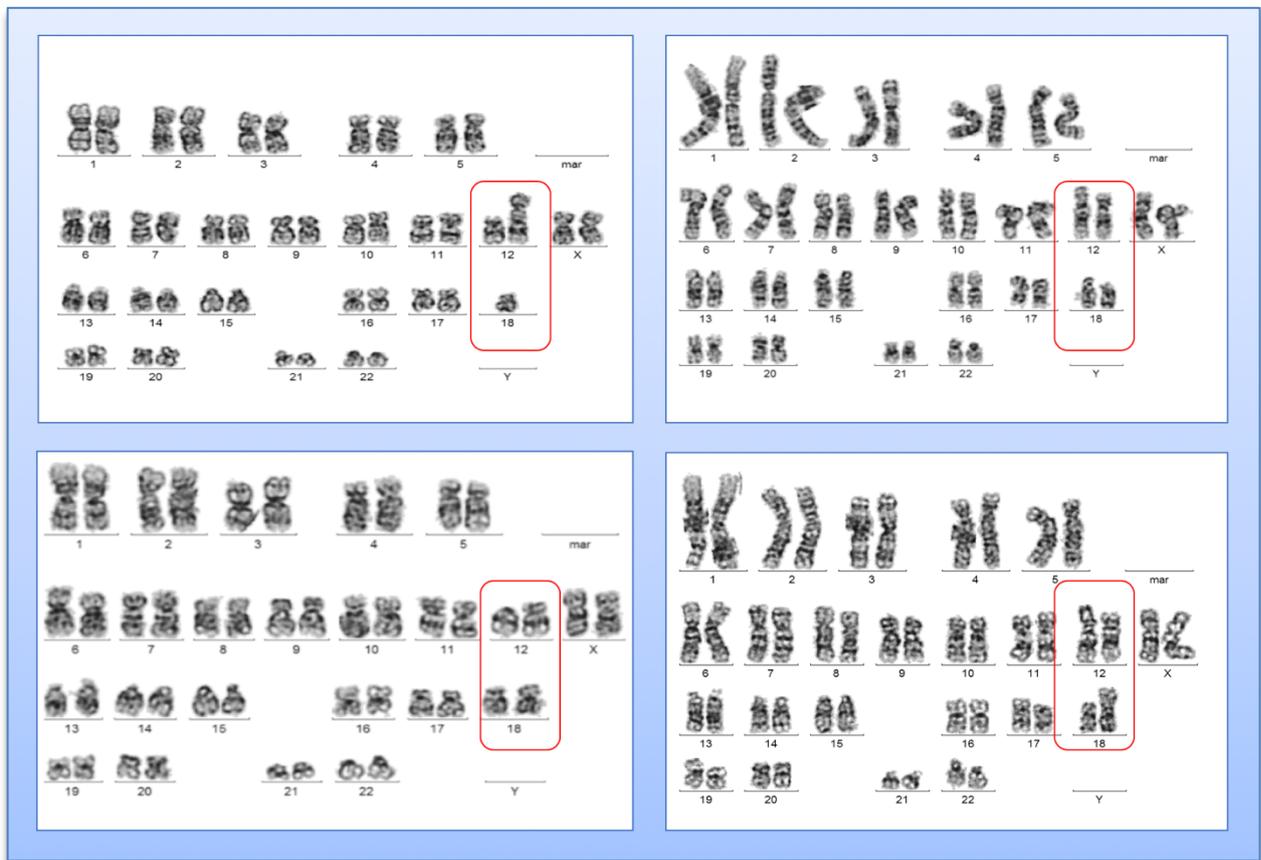


Abbildung 4 : Heterozygote Deletion des *ETV6*-Lokus

Heterozygote *ETV6*-Deletion in 70 von 100 der Interphasekerne und 19 von 25 Metaphasen (*ETV6 (TEL) (12p13) break probe*)

## Einleitung

jeweils unterschiedlich erscheinenden Bruchpunkten in Subklonen, die entsprechenden Karyogramme sind in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5: Karyogramme der Ersterkrankung**

Darstellung der verschiedenen derivativen Chromosomen 12 und 18 (rot markiert)

Um diese Translokationen zu spezifizieren, wurden FISH-Analysen mit *Whole Chromosome Painting* (WCP)-Sonden für die Chromosomen 12 und 18 durchgeführt. Diese bestätigten die Translokation  $t(12;18)$  wie in der Metaphase-FISH in Abbildung 6 A zu erkennen, zusätzlich konnte weiteres Material von Chromosom 12 auf Chromosom 19 erkannt werden. In einer erneuten Begutachtung ließ sich dieses derivative Chromosom 19 -überwiegend kryptisch- auch in den meisten Karyogrammen (s. Abbildung 6 B und C) erkennen. Die Bandenmuster sprachen für das Vorliegen einer Translokation  $t(12;19)$  mit Bruchpunkten jeweils im distalen Bereich der kurzen Arme der Chromosomen und ließ an die Möglichkeit einer *TCF3-ZNF384*-Fusion denken. In einer Zelle (hier nicht dargestellt) wurde diese Translokation als wahrscheinlich einzige Veränderung gesehen, dieses spricht für sie als primäre Veränderung.

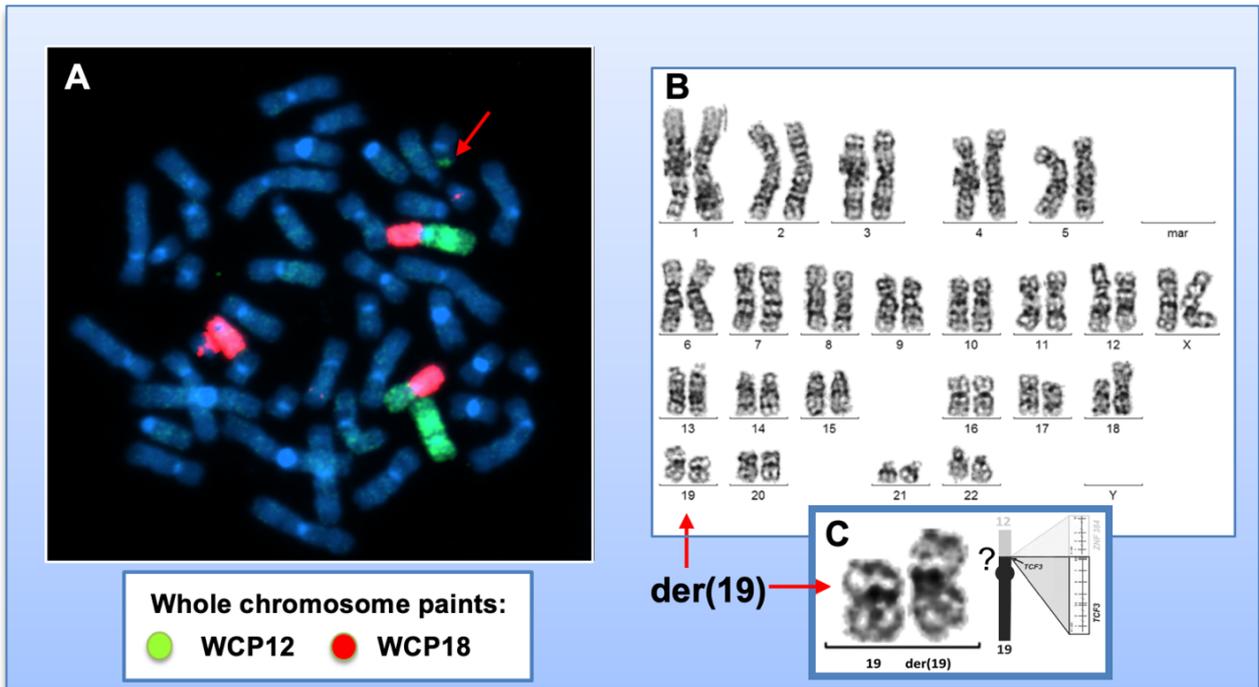


Abbildung 6: Bestätigung  $t(12;18)$  und Entdeckung einer Translokation  $t(12;19)$

[A] Metaphase der Ersterkrankung mit **WCP12** und **WCP18**, roter Pfeil markiert grünes Signal auf Chromosom 19  
 [B] Karyogramm mit erkennbaren  $der(19)$  [C] Vergrößerung der Chromosomen 19 mit schematischer Darstellung einer möglichen Translokation  $t(12;19)$

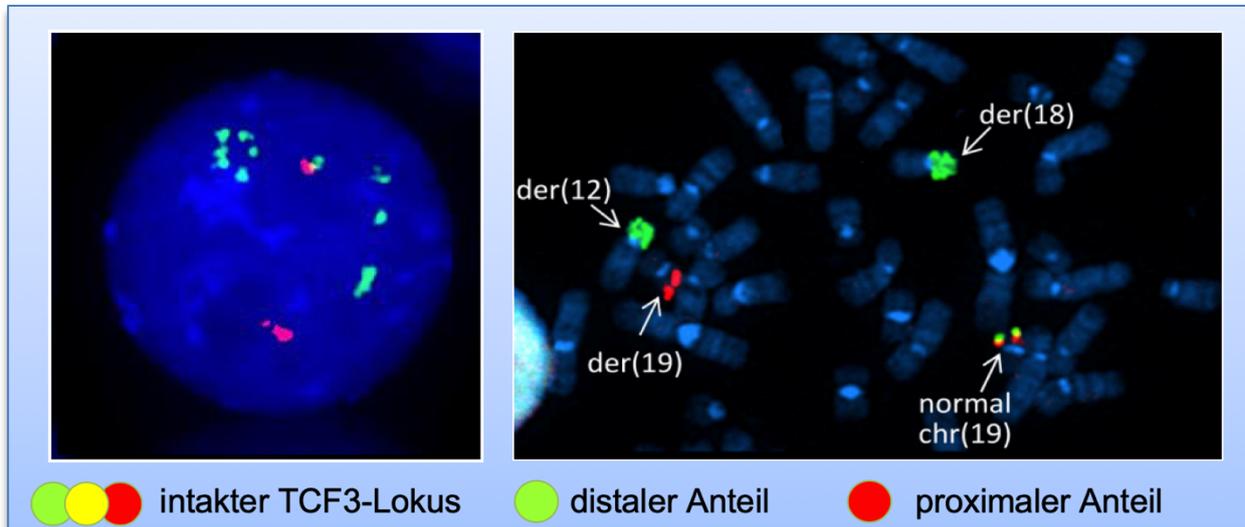
Zum Diagnosezeitpunkt wurde in der Literatur eine solche *TCF3-ZNF384*-Fusion erst einmalig beschrieben: 2008 bei einem 5-jährigen Jungen mit einer akuten *lineage switch* (lymphatische zu myeloischer) Leukämie, in welcher sich zusätzlich eine Kolokalisation von *TCF3* mit *NOL1* sowie Aberrationen weiterer Chromosomen zeigten. Der Patient verstarb nach Stammzelltransplantation.<sup>29</sup>

*TCF3* auf Chromosom 19p13.3 kodiert für den humanen Transkriptionsfaktor 3 und ist häufiger Translokationspartner in ALL. So lässt sich  $t(1;19)(q23;p13)$  mit Bildung einer *TCF3-PBX1*-Fusion in ca. 5% aller ALL nachweisen, weitere Translokationspartner sind *HLF* bei  $t(17;19)(q22;p13)$  sowie *FB1* bei  $inv(19)(p13q13)$ .<sup>29,30</sup>

*ZNF384* auf Chromosom 12p13 kodiert für das Zink Finger Protein 384. 2016 und 2017 wurden zwei Studien veröffentlicht, die die Frequenz von *ZNF384*-Translokationen bei B-Vorläuferzell-Leukämien (*B-cell progenitor, BCP*) im Kindesalter mit von ca. 2,9% bzw. 4,1% angeben. Übereinstimmend berichten sie von einer überwiegend myeloischen Koexpression im Immunphänotyp von CD13 und/oder CD33 bei gleichzeitig negativer oder schwacher CD10-Expression. Häufigster Translokationspartner war *TCF3* in 1,7% bzw. 2,4% Fällen der BCP-Leukämien – davon einer bei einer MPO-positiven Leukämie und somit MPAL. Weitere beschriebene Fusionspartner waren *EWSR1* ( $t(12;22)$ ), *EP300*

## Einleitung

(t(12;22)), *TAF15* (t(12;17)), *CREBBP* (t(12;16)) und *ARID1B* (t(6;12)). Während die Patienten sich zum Endpunkt einer Studie in anhaltender Remission befanden, beschrieb die andere eine signifikant schlechtere Steroidresponse und Einstufung in höhere Risikogruppen für die *TCF3-ZNF384*-positiven Patienten sowie eine Tendenz zu verringertem 5y-EFS und OS.<sup>31,32</sup>



**Abbildung 7: FISH-Analyse mit *TCF3* Break Apart Sonde – Splitting und Amplifikation *TCF3***

Links: Interphase, rechts: Metaphase mit den derivativen Chromosomen 12, 18 und 19, Färbung mit *TCF3* Break Apart Sonde der Firma DAKO

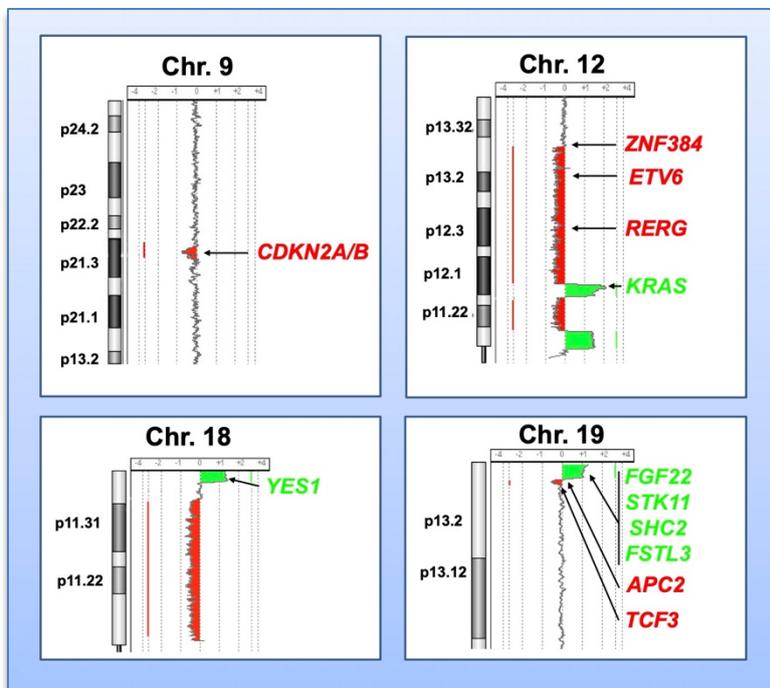
In den Proben der MPAL wurde durch Hybridisierung von Sonden für den *TCF3*-Lokus die Translokation des distalen Anteils des *TCF3*-Lokus auf Chromosom 12 nachgewiesen (s. Abbildung 7). Zusätzlich zeigte die Färbung auch Amplifikationen des distalen Sondenanteils auf den Chromosomen 12 und 18 und gab erste Hinweise auf das Vorliegen chromosomaler Imbalancen.

Mittels aCGH (durchgeführt durch das Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik der Charité, AG Array-CGH, s. Abschnitt 6.5.10) wurde das Vorliegen solcher Imbalancen bestätigt und präzisiert; weitere bisher nicht bekannte Aberrationen wurden gezeigt. Zur Eingrenzung, inwiefern die nachgewiesenen chromosomalen Imbalancen in einem Zusammenhang mit der Tumorgenese stehen könnten, wurden die aCGH-Daten durch Dr. Dr. T. Heiden (AG Seeger) hinsichtlich aller von Imbalancen betroffenen Gene ausgewertet. Zunächst wurde die Liste der Gene mit *Copy Number Aberrations* (CNA) unter Verwendung des Programms „GeneCodis 2.0“<sup>33,34</sup> analysiert, welches Genlisten verschiedenen Signalwegen gemäß KEGG<sup>35–37</sup> und weiteren biologischen Funktionen zuordnet. Hier zeigte sich eine signifikante Anreicherung mehrerer Gene mit Kopienzahländerungen, deren Proteinprodukte in den *KEGG Pathways in cancer* (Pic)<sup>35–37</sup> aufgeführt sind und an einer Tumorentstehung beteiligt sein können. Ergänzt wurden diese

## Einleitung

Gene durch den Abgleich der CNA mit einer Liste potenziell krebserrelevanter Gene aus folgenden (teilweise aktuell nicht mehr zugänglichen) Quellen:

- <http://www.genome.jp/kegg/disease/cancer.html>
- <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census/>
- [http://waldman.ucsf.edu/GENES/a\\_genes.html](http://waldman.ucsf.edu/GENES/a_genes.html)
- <http://122.165.25.137/bioinfo/cancerdb/>
- <http://host13.bioinfo3.ifom-ieo-campus.it/ncg/>
- <http://nesg.org:9090/HCPIN/download/AllPathwayProteins.txt>
- <http://www.netpath.org/browse>
- <http://atlasgeneticsoncology.org//Forms/cytoentities1.html>



**Abbildung 8: aCGH-Profil und potenziell leukämogene Kandidatengene in der Ersterkrankung**

Auschnitte der aCGH-Profile der von Imbalancen betroffenen Abschnitte der Chromosomen 9, 12, 18 und 19. Die 13 ausgewählten Kandidatengene sind mit ihrer Lage vermerkt. **Rot:** Verlust, **grün:** Zugewinn

Als Kandidatengene mit potenziell leukämogener Rolle in der Erkrankung wurden 13 Gene herausgesucht, welche in Abbildung 8 im jeweiligen aCGH-Profil dargestellt werden. Diese Analyse wurde später wie in Abschnitt 6.6 beschrieben ausgeweitet.

Auffällig war hierbei der Zugewinn von *KRAS* (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) im Bereich des am stärksten amplifizierten Peaks des aCGH-Profiles auf Chromosom 12p12.1). Das *KRAS*-Gen kodiert für ein Protein der RAS-

Familie, welche aktivierend u. a. auf Proliferation wirken. Somatische Mutationen der *RAS*-Gene führen zu sogenannten RASopathien mit kardialen Defekten, Wachstumsstörung, fazialen Dysmorphien, kognitiven Defiziten sowie Malignomprädisposition.<sup>38</sup>

Viel häufiger sind jedoch Mutationen in Malignomen, so sind in 30% der menschlichen onkologischen Erkrankungen *RAS*-Mutationen nachweisbar. Das onkogene Potential von *RAS*-Mutationen wurde in diversen Studien belegt. Aktivierende *KRAS*-Mutationen

(mut*KRAS*), am häufigsten *single-point* Mutationen in den Codons 12,13,61, treten meist bei soliden Malignomen auf, so sind sie bei Karzinomen des Pankreas (Prävalenz 90%) und des Kolons (50%) beschrieben.<sup>39</sup>

Deutlich seltener werden *KRAS*-Amplifikationen beobachtet: Am häufigsten treten diese bei Ösophagus-Karzinomen (17%), Magenkarzinomen (CIN+) (13%) und Ovarial-Karzinomen (10%) auf und sind dort mit einer erhöhten Metastasierungsrate sowie schlechtem OS assoziiert.<sup>40</sup>

Auch bei Leukämien sind *RAS*-Mutationen bekannt: So treten Punktmutationen von *KRAS* in ca. 14% der ALL im Kindesalter auf und sind häufig mit erhöhter Chemotherapieresistenz, frühem und meist ZNS-positivem Rezidiv sowie reduziertem OS assoziiert. Insbesondere sind sie bei ALL mit B-Phänotyp, einer t(4;11) oder *BCR-ABL*-Translokation sowie Leukämien mit aberranter Chromosomenzahl (hypo- und hyperdiploid) nachzuweisen. ALL mit mut*KRAS* werden überproportional der Hochrisikogruppe zugeordnet, jedoch lässt sich aus dem Vorliegen bisher keine prognostische Signifikanz ableiten. Rezidierte ALL weisen sogar in rund 44% aktivierende Mutationen des *RAS*-Signalweges auf.<sup>41–45</sup>

Auch in AML werden regelmäßig *RAS*-Mutationen in 18,5-21% der Fälle beobachtet, hier sind sie mit einem M4/M5-Phänotyp und spätem Rezidiv assoziiert.<sup>46,47</sup> Für die Gruppe der MPAL wurden *missense*-Mutationen für *KRAS*, *NRAS* und *PTPN11* nachgewiesen.<sup>48</sup> Auch in der Studie zu *ZNF384*-Translokationen werden vermehrt aktivierende Mutationen von Genen der *RAS*-Familie beschrieben.<sup>32</sup> Jedoch finden sich in der Literatur bisher keine Angaben zu Wildtyp-*KRAS*-Amplifikationen bei Leukämien, so dass dieser Befund in der hier untersuchten MPAL ein Novum darstellen würde.

Aufgrund dieser komplex erscheinenden Chromosomenaberrationen wurden in Zusammenarbeit der AG Seeger aus der Klinik für Pädiatrie m.S. Onkologie und Hämatologie der Charité in mit dem Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik der Charité genauere tumorgenetische Analysen der MPAL initiiert, die Inhalt der vorliegenden Arbeit sind.

### 5.3 Fragestellung und Ziele der Promotionsarbeit

Die MPAL stellen eine seltene, heterogene Entität der akuten Leukämien im Kindesalter dar, deren Genese weitgehend ungeklärt ist. Das initiale Ziel der Promotionsarbeit war, aufbauend auf den umfangreichen Vorarbeiten, die gefundenen komplexen genetischen Veränderungen einer MPAL genauer zu charakterisieren und deren mögliche Bedeutung

## Einleitung

in der Leukämogenese auch in Hinblick auf das Zusammenwirken verschiedener betroffener Signalwege zu diskutieren. Ein weiteres Ziel sollte sein, die zugrunde liegenden (molekular-)zytogenetischen Untersuchungen mit Genexpressionsanalysen zu ergänzen, um letztlich die Wahl von gezielt wirkenden Medikamenten zu ermöglichen.

Aufgrund des rasch rezidivierenden Verlaufs der Erkrankung noch während der Dissertation wurden die Analysen auch auf Leukämiezellproben der jeweiligen Rezidivzeitpunkte ausgeweitet. Anhand der gewonnenen Ergebnisse soll die Entwicklung der Erkrankung in Bezug auf genetische (In-)Stabilität betrachtet werden. Zusätzlich bietet die Vielfalt der eingesetzten Verfahren die Möglichkeit des Vergleiches in Hinblick auf tumor-genetische Analysen als Basis zur individuellen Therapieplanung bei refraktären Tumorerkrankungen.

In dieser Promotionsarbeit sollen im Speziellen die folgenden Ziele verfolgt, bearbeitet und beantwortet werden:

- detaillierte zytogenetische Analyse der Chromosomenaberrationen in den primären MPAL-Blasten zum Diagnosezeitpunkt der jeweiligen Erkrankungsstadien
- Darstellung der zytogenetischen Veränderungen im Krankheitsverlauf zum Zeitpunkt der Ersterkrankung und der Folgerezidive
- Korrelation zwischen genetischen Veränderungen in primären leukämischen Blasten und Blasten nach Engraftment (Passagierung) im murinen Xenograft zu den entsprechenden Krankheitsstadien
- Identifizierung chromosomaler Bruchpunkte mittels aCGH und quantitativer PCR sowie Sequenzierung möglicher Fusionsgene mittels *long-distance* PCR
- Sequenzierung möglicher Fusionstranskripte sowie Analyse der Expression der identifizierten *TCF3-ZNF384*-Fusion
- Analyse eventueller funktionsverändernder Mutationen in Kandidatengenomen durch Sequenzierung
- Identifizierung dysregulierter Signalwege mittels genomweiter aCGH- und Genexpressions-Analysen
- Diskussion potentiell leukämogener Veränderungen und möglicher Ansatzpunkte für eine individualisierte Therapie
- Diskussion potenzieller Mechanismen der genetischen Instabilität
- Vergleich der angewandten Analysemethoden hinsichtlich Effizienz, Ergebnisqualität und Limitationen

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Proben

#### 6.1.1 Patientenproben

In die Analysen wurden Leukämiezellen von Knochenmarkproben aller MPAL-Erkrankungsstadien, d.h. der Ersterkrankung, des Erst- und Zweitrezidivs jeweils zum Diagnosezeitpunkt sowie des Erstrezidivs nach Sorafenib-Behandlung einbezogen (Entnahmezeitpunkte und Blastenanteil s. Abbildung 3). Die Knochenmarkentnahmen wurden im Rahmen der Diagnostik in der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie der Charité, Campus Virchow-Klinikum durchgeführt. Eine schriftliche Einwilligungserklärung der Sorgeberechtigten zur genetischen Diagnostik lag vor. Aus den Knochenmarkspunktaten wurden folgende Präparate gewonnen:

1. Ausstrich Knochenmarkpunktat
2. Metaphase-Präparate aus kultivierten Leukämiezellen
3. DNA
4. RNA bzw. daraus synthetisierte cDNA
5. Kryoasservierte Zellen
6. In NSG (*NOD scid gamma*)-Mäusen xenotransplantierte Blasten (s. Abschnitt 6.1.3)

Tabelle 3 zeigt die untersuchten Proben, ihre Entnahmezeitpunkte und die jeweils für die Analysen verwendeten Präparate (s. auch Abbildung 3):

**Tabelle 3: Übersicht Proben**

Probe	Entnahmezeitpunkt	Genutzte Präparate
MPAL	Diagnose Ersterkrankung	1, 2, 3, 4, 5, 6*
REZ	Diagnose Erstrezidiv	1, 2, 3, 5, 6*
REZ_SFB	Erstrezidiv nach Behandlung mit Sorafenib	1, 2
2_REZ	Rezidiv nach HSCT	1, 2, 5, 6*
* immer separat mit NSG bezeichnet wenn verwendet		

#### 6.1.2 Kontrollproben

Als genomische Kontroll-DNA für die molekulargenetischen Analysen wurde die aus Blutzellen eines gesunden, männlichen Probanden isolierte DNA genutzt. Zur Etablierung von qPCR-Methoden wurde zusätzlich die DNA aus Blutzellen einer gesunden Frau verwendet.

Als Kontrollprobe auf Transkriptebene wurde RNA aus humaner Plazenta (HP) in cDNA umgeschrieben. Zusätzlich wurde die cDNA einer HeLa-Zelllinie abstammend von einem

Zervixkarzinom genutzt. Als Vergleichskontrolle für die Transkriptomsequenzierung wurde RNA aus Remissionsmark der Ersterkrankung der Patientin isoliert.

### 6.1.3 Xenotransplantate

Um Probenmaterial für weitere Analysen zur Verfügung zu haben, wurden die in flüssigem Stickstoff konservierten Zellen (Ersterkrankung, Erst- und Zweitrezidiv) in NSG-Mäusen herangezüchtet. Das Engraftment erfolgte in einer Zusammenarbeit mit dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch (EPO Berlin-Buch GmbH, Dr. I. Fichtner, M. Keil) nach den dort etablierten Methoden.<sup>49</sup> Der Anteil von leukämischen Zellen in den gewonnenen Präparaten wurde in der AG Seeger durchflusszytometrisch mit einem HLA-DR Antikörper (Miltenyi Biotec, FF 130-095-298) bestimmt.

## 6.2 Geräte

Tabelle 4: Zentrifugen

Gerät	Hersteller
Centrifuge 5417 R	Eppendorf
Centrifuge 5810 R	Eppendorf
Labofuge 400	Heraeus
Spectrafuge Mini Centrifuge	Labnet

Tabelle 5: Mikroskope

Gerät	Hersteller
Axioskop-Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss
inkl. <i>Chilled</i> CCD-Kamera	Hamamatsu Photonics
Axioskop-Mikroskop	Zeiss
inkl. <i>Chilled</i> CCD-Kamera	Hamamatsu Photonics
Axioskop Fluoreszenz Mikroskop	Zeiss
inkl. FFT-Interferometer und CCD-Kamera	Applied Spectral Imaging (ASI)
Axiovert	Zeiss

Tabelle 6: Elektrophorese

Gerät	Hersteller
CU5 Kamera	Polaroid
Electrophoresis Power Supply PS 3003	Gibco/BRL
Geltray Elektrophoresekammer	Renner
UV-Transilluminator	UVP

Tabelle 7: PCR

Gerät	Hersteller
7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Mastercycler	Eppendorf
Mastercycler Gradient	Eppendorf
StepOnePlusReal-Time PCR System	Applied Biosystems

Tabelle 8: Sequenzierung

Gerät	Hersteller
3730 DNA Analyzer	Applied Biosystems

Tabelle 9: Sonstige Geräte

Gerät	Hersteller
-------	------------

Abzüge	Kottermann
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf
Incubator B15	Heraeus
Magnetrührer IKA-Combimag RCH	Jahnke & Kunkel
Mikrowelle	Bosch
Nano-Photometer	Implen
Pipetten	Gilson / Eppendorf
Schütteltisch IKA-Vibrax-VXR	Jahnke & Kunkel
Thermo-Shaker TS-100	lab4you
Timer	Roth
Vortex-Schüttler	VWR international
Waage Type1413	Sartorius
Wärmeplatte	Medax
Wasserbäder	GFL

## 6.3 Software

Tabelle 10: Software

Software	Version	Hersteller
7500 SDS System Software	1.2.3.	Applied Biosystems
Case Data Manager	6.0.0.16	ASI
Clone Manager Suite	6	Sci-Ed Software
GenASIs HiSKY		Applied Spectral Imaging (ASI)
Genomic Workbench Standard Edition	5.0.14	Applied Biosystems
Ikaros	5.1	MetaSystems
ISIS	4.4.28	MetaSystems
Primer 3	0.4.0	<a href="http://frodo.wi.mit.edu/">http://frodo.wi.mit.edu/</a>
Sequence Scanner	1.0	Agilent
StepOne Software	2.1	Applied Biosystems

## 6.4 Verbrauchsmaterial und Reagenzien

### 6.4.1 Primer

Tabelle 11: Gebrauchsfertige Primer

Produkt	Hersteller	Katalog-Nr.
Random Primers 500 µg/ml	Promega	C1181

Die zur Anwendung bei PCR, qPCR und Sequenzierung designten Primer wurden von den Firmen TIB MOLBIOL, Eurofins MWG Operon und Invitrogen bezogen. Eine Auflistung der verwendeten Primer und ihrer Sequenzen befindet sich in den Tabellen 12-14.

Die als Referenz verwendeten Primerpaare „MCPH1“ (8p23.1), „DMD Exon 39“ (Xp21.1) für genomische DNA sowie „TPX2“ (20q11.2) und „HPRT1“ (Xq26.2-.3) für cDNA sowie die Primer zur Sequenzierung von *KRAS* wurden freundlicherweise vom Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik (Dr. M. Trimborn, B. Jonske de Condor) zur Verfügung gestellt. Für die *cold-start* PCR von *KRAS* Exon 2 wurden die im Paper von Zuo et al. angegebenen Primersequenzen genutzt.<sup>50</sup>

Material und Methoden

Tabelle 12: Primer für Sequenzierung

Gen	Loc.	#ENSG	Exon***	Methode	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')	Länge (bp)
<b>APC2</b>	19p13.3	ENSG00000115266	2-4	DMSO	CTTAGGTCAGGGGCCGTCT	GCGAATTAGAGGGCAGAGC	789
			5&6	DMSO	GCCATGTTGCCTGTTAACCT	CCGCCATAATATCTGCACT	548
			7&8	DMSO	GGTCATCCCAGGGAGAGG	GCTCTGAGCCTCCTGACTCC	338
			9	DMSO	TCATCTGTCCCCCAGGTG	GAGGTCCTAGTCGCCCATC	600
			10	Standard	AGAGAGGCTGGGAAAGGAAG	CCAGGGAGTCTGTCCCTCTC	386
			11	Standard	GGGCAAGGGAGTGAGGTG	GGCTGGGATGAGTTGGAA	300
			12&13	Standard	CCGGTAGTGGTCAGGATCAG	CTTGATTTCTCCCAAGTCG	597
			14	PT/DMSO	CCAACTTCACTGAATGTGAGC	ACAGGCTTTCTCCATGTTGG	607
			15 <sup>P</sup> (cr)	DMSO	GCAAGGAGGCAGAGAAGGA	GGGAGGAGTCACTGTCACTC	813
<b>CDKN2A</b>	9p21.3	ENSG00000147889	I1E2	DMSO	GTGGTATGCTTTGGGAAGTATAATG	GAAACTGGAAGCAAATGTAGGG	699
			I1E3	Standard	GATCTTGAGACACGGCTTTTGATA	GAAGCCATTGCGAGAACTTTAT	788
			I3E1	DMSO	CCAGCACCGGAGGAAGAAAG	GAATTGGAGGCTAAGTAGTC	638
<b>CDKN2B</b>	9p21.3	ENSG00000147883	1	DMSO	CTCCTTTTCTCCCAATTCA	ACATCGGCGATCTAGGTTCC	205
			2	Standard	GACTGAGGACAAAGTGGAGGA	GGTTAAGAAGAAAGCAATCTAGGC	596
<b>ETV6</b>	12p13.2	ENSG00000139083	2	Standard	AGAGTTTTGTTATATAGCCCCAAGG	GGTGTGAAAGATTCCAAAGCAG	483
			3	Standard	ACTCAGAGTTGAACATAAGGGCTC	CTGTAAACACTTCCTCTTCTCCCT	497
			4	Standard	GCTCTGACCTTTTGAGTTTCAAGT	TGAGCTTCAGGGAACCAAGAT	486
			5	a Standard	CAGTGAAAAAGACACTGCTATTCTG	ATTAGGGATTUTAGCTTCATCCAAG	857
			5	b Standard	AATCACCGGCCTTCTCCT	CAGAGACCATGATGTGGTTCA	400
			6	Standard	GTCAAAGGTCACACAACAGGAC	GCCCAGCAAGGAATAAACTAAA	471
			7	Standard	GATTAGCAGGTAGCTTCCCAAAC	TACCTGGTATCCAGTTTGTAGCAAT	389
			8 (cr)	Standard	CCCTGGAGCACCTTAGACAA	CCGGGTCAGTATTCTGTTT	595
<b>FGF22</b>	19p13.3	ENSG00000070388	1	FT/Betain	GTCTCCCTCCAGGTCTCTGC	AGCCTTCGCTTTAACAGTGC	789
			2	DMSO oder Betain	GGGTCTCCTGGTATCTGTCG	CAGTCCACGGTGTAGAGTCG	305
			3	DMSO oder Betain	CTTCTACGTGGCCATGAACC	GCAGGGGGAAGAACAAGC	388
<b>FSTL3</b>	19p13.3	ENSG00000070404	2	Standard	TCCGTGCGTAACTACTCAG	TGCAGCCTCCTACATACCC	413
			4&5	PT/DMSO	GGTGCTTGTGTCTCCTACC	AATCCGGGCTCTAAGGAGTG	612
<b>KRAS</b>	12p12.1	ENSG0000013370	1	PT/DMSO&Betain	GGAACGCATCGATAGCTCTG	GGGACCCCTAATTCATTCAC	352
			2*	Standard	TTAAAAGGTACTGGTGGAGTATTTG	AACCCAAGGTACATTTTCAGATAAC	353
			2 <sup>P</sup>	Cold-start PCR **	TATAAACTTGTGGTAGTTGG	ATTGTTGGATCATATTCGT	98
			3*	Standard	TCTTTGGAGCAGGAACAATG	TGCATGGCATTAGCAAAGAC	400
			4*	Standard	AGAAGGAAGGAAAATTTGGTG	AGAAGCAATGCCCTCTCAAG	455
			5a*	Standard	GCACATGGCTTTCCAGTAA	TTTAAAAGACATCTGCTTTCTGC	248
			5b*	Standard	TTCAGTTGCCTGAAGAGAAACA	AGTCTGCATGGAGCAGGAAA	248
<b>RERG</b>	12p12.3	ENSG00000134533	1	DMSO	AGCACGTTAAAGACCCAAGC	CAAGAGGACCGACTCAGA	473
			2	Standard	AGTGAATGGTGGCTGGCATA	ACTACTCACCTGCCCAATCC	355
			3	Standard	GTGTGGAGCATTTCGCTTTC	CTAGCCTCATAGAGGGCTTCTTTG	295
			4	Standard	GGAATACTTCTCCCATGCCATTT	ACAAGCCTGTTAGAGGCTCTG	549
			5	Standard	GGCATTACTGTCAGCATTACC	CCCAGACATTTCTCAGAATC	601

### Material und Methoden

<b>SHC2</b>	19p13.3	ENSG00000129946	2	DMSO	ACCAGGGACAGAGGAAAGG	CGGCGTGTTCTTTCCATC	431
			3&4	DMSO	CTGGGAAAGAGGGTGGTAG	GCTCGTCTTTCTGGATAAAC	758
			5-7	DMSO	CTGTGGTCCTGGTCCATCTG	CCTCTGGCTGAGCCATATTC	745
			8	DMSO	CCGGTGATGTCCTGGTTCTG	GAAAGAAGAGCTGGAGGTAG	570
			9	Standard	TAAGTCTCCAGCCATCTAAG	AATCTCAGCAGAGTGTTAGG	317
			10	Standard	TACCACAGGGAGACCAGAG	AGACCAGGGAATCCCGTAG	382
			11	DMSO	GAACCCGTTTCTCCAGCTC	AGCTGGTCAAAGGCAACATC	593
			12	DMSO	CCAGAACGCCAATATCCTAC	TCTGGAATTCGACAGAGATG	371
			1	Standard	AAGGGAAGTCGGAACACAAG	TCCAGCTCAGGGTGTTAAGA	489
			2	DMSO	GAGGTACGCCACTTCCACAG	CAAGGAGACGGGAAGAGGAG	284
			3	DMSO	AGCCAGAAGTGGTCTGAG	AAACTTGGGCCTTCATGTC	596
			<b>STK11</b>	19p13.3	ENSG00000118046	4&5	DMSO
6	DMSO	ACTAGTGGAAAGGTGGTGAAG				CTCCACTCAGTCCTCTCAAT	415
7	DMSO	TTAGGAGCGTCCAGGTATC				AACAGGACACTGCCCAGAG	352
8	Standard	TCTGTCAAGCTTGGAGTC				AGGGCAGAAGCTGTCCCTTG	489
2	Standard	AGTTGGAGAATGAAGCGATTGG				TTATGTTCCCGGTGCCTACAG	791
3	Standard	GGGTGACAGAGTGAGACTTTG				CAACCAGCTCAGTGGTTCT	522
4	Standard	GGAGCAGAAGTATGCAATTGTG				GGCAGGGAATGAGGATAATCAG	639
5	Standard	AAACCTATCCCAGTCCATTC				CCCTTATCTCATCCCAATCAC	326
<b>YES1</b>	18p11.32	ENSG00000176105	6	Standard	TCCTGGAAATCAACGAGGTA	TACCTGTTCCCTCCCTTTAGA	589
			7-8	Standard	CCTCAACCTCCCAAAGTG	GTGTCAGGTTTCTTCTATCC	895
			9	Standard	GGTGGAGGAGTATTCATTTT	GAATGAGACGCTGTCTCTAA	293
			10	Standard	CCTCGGCCTCCCAAATTAATG	ATCAGAAAGCCACAGCAGTACA	579
			11	Standard	GACACTGATGACTACAGTAGAG	GCCACAGTAAAGGGAAGGAG	393
			12	Standard	ATCTTGCCACCATTCCTCAGTAAC	GTGCAACCATATCTGGGATTC	710
			Exon II	Standard	TCTGGGTGGTGAGTACATTG	TGAGTCCGTCACCTACTAGC	350
			<p>*Diese Primer wurden vom Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik (B. Jonske de Condor) zur Verfügung gestellt.  **Primer wie im Paper von Zuo et al. zur cold-start PCR beschrieben [32].  *** Die Exonangaben beziehen sich immer auf die Transkriptvariante mit den meisten Exons, bei Isoformen ohne Beteiligung aller Exons wird die Isoform angegeben</p> <p><b>a/b</b>: Zusätzliches inneres Primerpaar bei zu langer Produktlänge, <b>Standard</b>: PCR-Ansatz mit Firetaq. cr: Sequenzierung der coding region, <b>DMSO</b>: Ansatz mit 5% DMSO, <b>A</b>: Abschnitt bei Unterteilung der Sequenz, <b>PT</b>: PCR-Ansatz mit Platin Taq, <b>Betain</b>: Ansatz mit Betain, <b>I x Ex</b>: Isoform x Exon x"</p>				

## Material und Methoden

Tabelle 13: Primer für qPCR

Gen	Locus	#ENSG	Exon	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')	Länge (bp)
<b>ADCYAP1</b>	18p11.32	ENSG00000141433	Exon 1	AGACACCAACGCCAGACG	AGGAGAGCTGCCAGGTAGG	97
			Exon 4	ATTTCGGTCTATGCCTGAGTC	GCGAAGAAAGGCACTAAAGC	111
<b>BCAT1</b>	12p12.1	ENSG00000060982	Exon 5	GCTTCAGTGAGGATCATT	TGAATATGGGACCCATTCT	150
			Exon 6	AGCCCAGTGGGACCTTATTT	TTCCACCTTTCCAGGCTCTT	91
<b>c12orf53</b>	12p13.31	ENSG00000139200	Exon 4	CACCCCAATCAGGTGTGG	CTTCCTCCTCCAGCTTACC	113
<b>c19orf24</b>	19p13.3	ENSG00000228300	Exon 2	AAGTCTTCGGAGGGATGACC	GGGTGGAAGTGAGTCTGAGG	124
<b>CDH19</b>	18q22.1	ENSG00000071991	Exon 1	AAAGCACAAGCGTCTGTAAC	GTTGGACACATAAGGAAGAG	109
<b>DDX11</b>	12p11.21	ENSG00000013573	Exon 27	CCCTGCTCCCTATCCTGT	CTTGGCATAATTGCTGGTGTT	150
<b>FBXO15</b>	18q22.3	ENSG00000141665	Exon 1	AGACATAACAACGTGGACTAC	AGATAAAGGACCAGGTTGAC	106
			Exon 1	CTCTTGGCCGCTGTAGTCC	GTCATGCTGCTTCATGTTCC	121
<b>ITPR2</b>	12p12.1	ENSG00000123104	Exon 34	CATCAGCCAGTTTTTATTCAGC	TCAGCCAAAGTTCTGATACAGG	113
			Exon 39	GTCTGCTGGATAAAGAAGGT	CTCCTTCAAGCAAGGCAATG	114
			Exon 40	CGAATGAAGGCTGCTCAGAA	GTGGACCAGATGTCATCAAT	109
			Exon 41	AAAGGGCAATTAACAGAAGC	TTACTTCTCTGCGGATTTT	139
			Exon 42	CTGTGAGACCCTTCAGTTTC	CCCTGGCAATACTCAGTCAA	138
			Exon 56	GATTGGTTTCCTCGGATGC	TGGTCGATTCCAATTCTCC	100
<b>KC6</b>	18q12.3	k.A.	Exon 1	GCCTCCTGGTGTTATTAAG	TCTGTCAGAGCCACTGGAAA	103
<b>LPIN2</b>	18p11.31	ENSG00000101577	Exon 7	TCGGGTAATTCCCAGTGAGG	TTGGGTCGCTCATCTGTGTA	125
<b>MC2R</b>	18p11.21	ENSG00000185231	Exon 1	GACTCCATGATCTCGATTTCC	CCGTCATGATGTGGTGGTAG	112
<b>METTL4</b>	18p11.32	ENSG00000101574	Exon 1	TGGCCGTCTCTACGAAGACT	GCCATGTTGCTGTACGGAAA	129
			Exon 2	GTTGTCAGCTGGGTGTTAC	GAGGACACAGAATCCATTTG	147
			Exon 3	TCCCCTGTAATTGATCTACC	GGTATTCCATAGCATCCAATTC	81
			Exon 4	TTGATCCAGGAAGGTCTCAA	TGCAGGCGTCAAGTGGTAAA	97
			Exon 9	TGGCAAACACTGGTTTGCTTTC	CCAGGCACAATAGATTACACA	92
<b>MIDN</b>	19p13.3	ENSG00000167470	Exon 8	TCCGTCTGTCTCCTTTCACC	CTCCGTCTCCTTCACTCTCC	108
<b>PIK3C3</b>	18q12.3	ENSG00000078142	Exon 1	GGGCTCAGCTGGTTCATT	CATCGCACCGTCTGCAA	80
<b>SMCHD1</b>	18p11.32	ENSG00000101596	Exon 10	GTTGAAGGAGATGGTGTAGTG	GCATGGATCATCAGGGTAAG	84
			Exon 5	AAACCTGCTGTTGCAGTGAT	AGTCACCTTGCCTTGTGAAT	103
<b>SYT10</b>	12p11.1	ENSG00000110975	Exon 1	TTAGAGGTACGGGAAGAGGA	TCTGGCACAGACTGTTCACT	112
			Exon 4	GTCGTTGTCAGCTTTTGTGG	GCACTTCAAATGCTCTGTGG	134
<b>TCF3</b>	19p13.3	ENSG00000071564	Promotorregion	CCTCACCACGAATGGCTAGG	CATGACGCAAGCGAGTAAGG	111
			Intron 1-2	AAAGTGCGGTTTTCGTAGTCC	CCCTCTTTGTCTGCCAACTG	132
			Exon 2 No1	TGTTTCTCCCTGTCCATCTG	GGTCACTGAGCTCCTTGTCTG	134
			Exon 2 No2	CAGTTCGGAGGTTTCAGGTAG	CCCGCACACTGTCTTCAA	87
			Intron 2-3	GGCCACTGAGGTCTGTCAAA	AAATACCAGCATGGCCCTTC	120
			Exon 3	CAGTTCGGAGGTTTCAGGTAG	CCCGCACACTGTCTTCAA	87
			Intron 3-4 No1	TTTCTCTGTCCGTGCGATTG	TAAAGCAGAACGCGGAGGTG	80
Intron 3-4 No2	CCAGGATTGTGGGCTTGTGT	CACCAGCCAAGGAACGGATT	93			

### Material und Methoden

			Intron 3-4 A1	AGGCTTAAGACAGTCTTCTC	AGGGAACCCAACATGGAACA	84
			Intron 3-4 A2	TCCTGGTCTTTCATCTTCTC	TCCTCCCACCTTGTATTTCC	98
			Intron 3-4 A3	CCCGTGTCCACCAATAGTTT	AGACTGTCCAAGTGCCTTCA	111
			Intron 3-4 A4	CCTCCCGTTTGCTCAGTTG	ACCTCTGGGTCTCAGTTTG	110
			Exon 8	TCTCCTCCAGGGTGTAGGG	CTCACCGAGGATGGAAGACC	128
			Exon 11	CATCTGCATCCTCCTTCTCC	CATACCCAGGAGGCTGTCC	98
			Exon 12	CACCTCTTTCACCCACAGG	CACCGAGGCCAGTGCCTT	81
			Exon 13	TCCCCGGATCACTCAAGC	CCCAAACCCTCACAGACC	91
			Exon 17	CGAGATCAAGCGGGAGGA	GGGCCTTCAGCTCCTTCTT	86
<b>TSPAN11</b>	12p11.21	ENSG00000110900	Exon 8	GCCACCCTCCTTTACATGTCA	GACACGCTTCACTCCTAGCC	128
			Exon 2	AAGTTCAGGAGCCCTGGAAA	AACCAGAAAAGCCATTAACC	94
			Exon 2 No1	CCAGACTGACTGCTGACAAA	TTCTCCTGCCGTCTTATTC	145
			Exon 2 No2	AAGTTCAGGAGCCCTGGAAA	AACCAGAAAAGCCATTAACC	94
			Intron 2-3 No1	GCAGTAAACCTCCCTTCTAT	AAATGCTGGCAGGCTGAAA	94
			Intron 2-3 A1	CCTGGATCAAGCCATAACAT	GCACAGAGTCCAACAGTAAA	138
			Intron 2-3 A2	AGGTAGTCTACCGTTGTTCA	TGGGAAGGAGCAATCACATC	115
			Intron 2-3 A3	AGTTTCTGTGCCAGCCTAC	GGCTGCTACTCTGAGCAAAG	135
			Intron 2-3 A4	TTGGAAACCTGGGTACTAC	CAATCCCACCAAGGTCTAAG	131
			Exon 3	GGAGACCAGGAACCTTTCAG	AAGGCCAGAAGTACGGGTTAG	140
			Intron 3-4	CTCTCCAAGTCTCAGTAGTA	CCAGGCAGAAACACTAGATA	108
			Exon 4	GCCCTCAGGCATCAGTATGG	CAGCAGTCATCAGTCCTGTA	122
			Exon 4-5	CGTCCGTTACCCAGAATATC	ATTGACTCCCTTCTCTTCTC	102
<b>ZNF519</b>	18p11.21	ENSG00000175322	Exon 1	TTTACCAGAGCAAGGCATAC	TGTCCTTCACCTTCACCTATAC	123

**Tabelle 14: Zusätzliche Primer für PCR möglicher Fusionsgentranskripte**

Primer	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')
TCF3 E2_cDNA	TGGCCCCAGGAGAATGAA	CTGAAGTCCAGGAGGTCAC
TCF3 E2-3 R	Kombinierbar mit TCF3 E2_cDNA	TTCCCGTTGGTGACAGG
BCAT E5 Fusionsgen F	GGGTCCCATATTCAACATC	/

## 6.4.2 Längen- und Größenstandards

Tabelle 15: Längen- und Größenstandards

Produkt	Hersteller	Katalog-Nr.
<b>100 bp DNA Ladder (1 µg/µl)</b>	Invitrogen	15628-050
<i>1kb Plus DNA Ladder (1 µg/µl)</i>	Invitrogen	10787-018

## 6.4.3 Enzyme

Tabelle 16: Enzyme

Produkt	Hersteller	Katalog-Nr.
Antarctic Phosphatase 5000 U/µl	Biolabs	M0289L
Exonuclease 1 20.000 U/µl	Biolabs	M0293L

## 6.4.4 Kits

Tabelle 17: Kits

Produkt	Hersteller	Katalog-Nr.
illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit	Cytiva (GE Healthcare)	25-6600-30
Expand Long Template PCR System	Roche Applied Science	11681834001
Platinum Taq DNA Polymerase	Invitrogen	10966-034
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega	M368B
HOT FIREPol DNA Polymerase	Solis BioDyne	01-02-00500
5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX)	Solis BioDyne	08-24-00020
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems	4368577
Sky Paint Kit DNA Human	Applied Spectral Imaging	FPRPR0029
Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems	4337457

## 6.4.5 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 18: Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Hersteller	Katalog-Nr.
100 mM dNTP Set	Invitrogen	10297-018
Agarose	Invitrogen	AM9046
<i>Betain 5M PCR Reagent</i>	Sigma-Aldrich	B0300-1VL
Biocoll (Dichte 1,077 g/ml, isoton)	Biochrom	L 113/5
<i>DMSO (Dimethyl sulfoxide PCR Reagent)</i>	Sigma-Aldrich	D9170-1VL
Magnesiumchlorid (1M)	Invitrogen	AM9530G
<i>Nuclease-Free Water</i>	Promega	P1195
PBS	Biochrom	L 1825
RLT Lysepuffer	Quiagen	79216
RPMI 1640 Flüssig- und Pulvermedium	Biochrom	T 121-01
<i>Water PCR Reagent</i>	Sigma-Aldrich	W1754-1VL

Die in dieser Tabelle nicht aufgeführten, zur üblichen Laborausstattung gehörenden Chemikalien und Reagenzien wurden in p.A. Qualität von den Herstellern Merck, J.T.Baker und Sigma bezogen.

## 6.4.6 Standardlösungen

Tabelle 19: Standardlösungen

Lösung	Zusammensetzung
10x TBE-Puffer:	108 g Tris HCl (900 mM), 55 g Borsäure (900 mM), 9,3 g Na <sub>2</sub> EDTA-H <sub>2</sub> O ad. 1000 ml Aqua dest
Dye	20 g Saccharose, 0,125 g Bromphenolblau, ad 50 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest,steril</sub>

## 6.4.7 Verbrauchsmaterial

Tabelle 20: Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller	Katalog-Nr.
96-Well Plate Base (with Heat-Seal)	Applied Biosystems	4334875
Deckgläschen	Menzel	BB015015A1
Laborhandschuhe	Charité Berlin	k.A.
MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems	4346906
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems	N8010560
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems	4311971
<i>Microplate 96, PCR clean</i>	Eppendorf	0030 601.203
Objektträger	Menzel	AG00000112E
Pipettenspitzen (epT.I.P.S. Reloads, PCR-clean) -verschiedene Größen-	Eppendorf	0030 073.746 / 762 / 800
Polaroid Land Packfilme Typ 667	Polaroid	POMQ5-120616
<i>Safe-Lock Gefäße, PCR-clean</i> -verschiedene Größen-	Eppendorf	0030 123.301 / 328 / 344

## 6.5 Methoden

### 6.5.1 Präparation für die zytogenetische Diagnostik

Zur Durchführung der zytogenetischen Diagnostik wurden im Allgemeinen aus kultivierten Zellen (24h unstimuliert) angefertigte Präparate verwendet, in Einzelfällen auch Ausstrichpräparate. Die Herstellung dieser Präparate wurde vom Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik nach Standardmethodik durchgeführt.<sup>51</sup>

### 6.5.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die FISH ist eine molekularzytogenetische Methode, bei der anhand fluoreszenzmarkierter Sonden, welche den zu untersuchenden DNA-Abschnitten komplementär entsprechen, gezielte Analysen auf Chromosomenaberrationen möglich sind. In der Tumorzytogenetik wird sie häufig zur Analyse von Translokationen, Deletionen und numerischer Aberrationen eingesetzt.

Die FISH-Analysen der Ersterkrankung und der Rezidive wurden im Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik der Charité durchgeführt. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation erfolgte ein Teil der Mikroskopie sowie die genaue Auswertung und Darstellung der Ergebnisse. Für die Untersuchung wurden folgende Sondentypen verwendet:

- Lokus-spezifische Sonden (*locus specific identifier*, LSI), mit denen spezifische Zielsequenzen markiert werden können. Subtelomer-Sonden sind komplementär zu chromosomalen Regionen, die bis zu 300 kB vom Telomer entfernt sind. Eine weitere Sonderform stellen Break-Apart-Sonden dar. Sie werden vor allem bei Genen eingesetzt, für die mehrere Translokationspartner bekannt sind, und sind ein

## Material und Methoden

Mix aus farblich unterschiedlich markierten Sonden für distale und proximale Regionen des Translokationsbruchpunktes. Eine Translokation oder ein anderes Rearrangement des Gens wird durch ein Signalsplitting erkennbar.

- *Whole Chromosome Painting* (WCP), mit diesen Sonden können komplette Chromosomen angefärbt werden.
- CEP-Sonden (*chromosome enumeration probe*), diese färben meist die Zentromerregionen eines Chromosoms an.

**Tabelle 21: Übersicht über die verwendeten kommerziellen FISH-Sonden**

Sonde	Region	Farbe	Hersteller	Kat.-Nr.
CEP 12 (D12Z3) SpectrumGreen Probe	12p11.1-q11	SG	Abbott	06J37-012
CEP 18 (D18Z1) SpectrumOrange Probe	18p11.1-q11.1	SO	Abbott	05J08-018
ETV6 (TEL) (12p13) Break Probe	12p13	SG / SO	Kreatech	KBI-10403
LSI TCF3/PBX1 Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe	19p13.3 / 1q23	SG / SO	Abbott	01N24-020
TCF3 FISH DNA Probe, Split Signal	19p13	SG / SO	DAKO	Y5402
Vysis CDKN2A / CEP 9 FISH Probe Kit	9p21 / 9p11-q11	SO / SG	Abbott	04N61-020
Vysis LSI IGH/BCL2 Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe	14q32 / 18q21	SG / SO	Abbott	08L60-020
Vysis IGH/CCND1 DF FISH Probe Kit	14q32 / 11q13	SG / SO	Abbott	08L58-020
Vysis LSI MLL Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe	11q23	SG / SO	Abbott	08L57-020
XCP 11 Green	WCP 11	SG	MetaSystems	D-03NN-NNN-FI
XCP 12 Green	WCP 12	SG	MetaSystems	D-0312-050-FI
XCP 12 Orange	WCP 12	SO	MetaSystems	D-0312-050-OR
XCP 18 Orange	WCP 18	SO	MetaSystems	D-0318-050-OR
<b>SG: spectrum green, SO: spectrum orange, WCP: whole chromosome painting</b>				

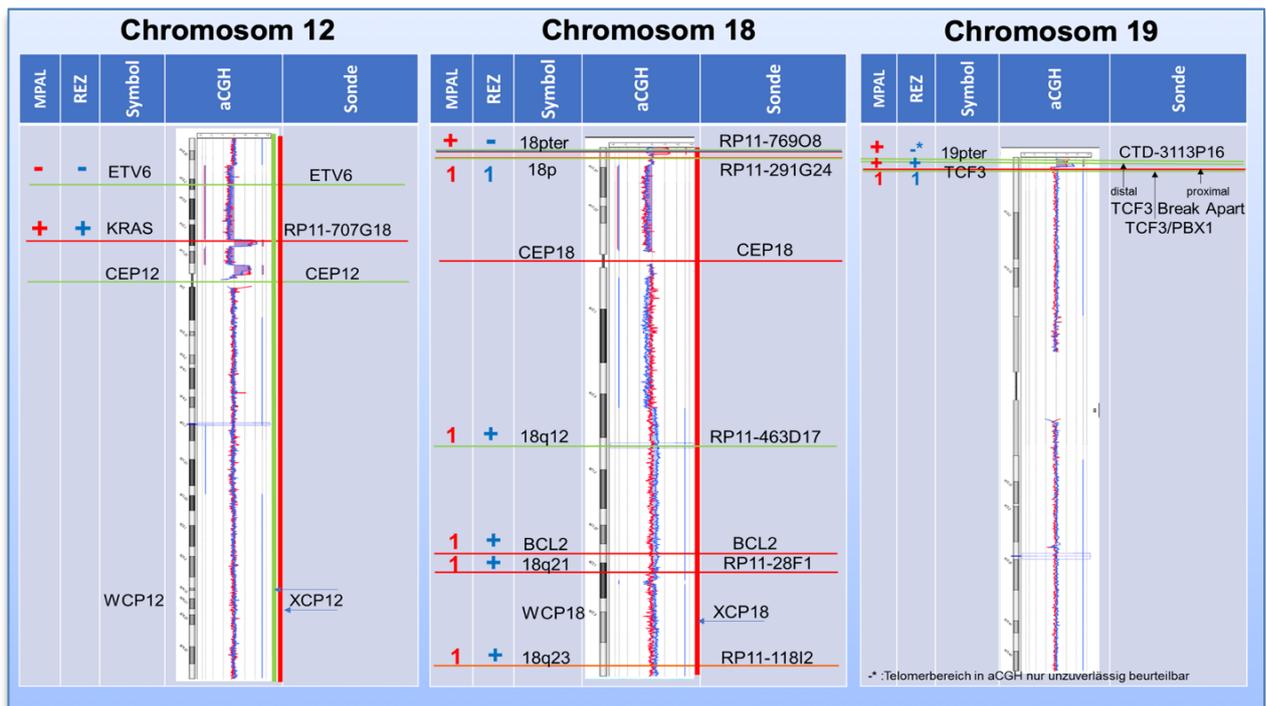
Ein Teil der verwendeten Sonden wurde gebrauchsfertig vom Hersteller bezogen (s. Tabelle 21), für spezifische Zielsequenzen wurden weitere Sonden vom Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik hergestellt (s. Tabelle 22).

**Tabelle 22: Übersicht über die verwendeten BAC-Sonden**

BAC	Region	Position (hg 19 assembly)	Farbe
CTD-3113P16	19p13.3	19:233193-376646	SG
RP11-118I2	18q23	18:75484858-75635184	SG+SO→orange
RP11-28F1	18q21.33	18:60923187-61024757	SO
RP11-291G24	18p11.32	18:1615963-1744182	SG / SG+SO→orange
RP11-460N10	12p11.1	12:33282254-33441226	SA
RP11-463D17	18q12.3	18:42971366-43152274	SG
RP11-707G18	12p12.1	12:25381582-25555586	SO
RP11-769O8	18p11.32	18:725026-798605	SG / SO / SA
<b>SG: spectrum green, SO: spectrum orange, SA: spectrum aqua</b>			

Dazu wurden BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*), künstliche Chromosomen aus *E. coli*, verwendet, welche größere Abschnitte des humanen Genoms (~200 kb) enthalten

und zur Klonierung spezifischer Sequenzen genutzt werden können.<sup>52</sup> Mithilfe der Nick-Translation wurden von Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Genetik und Humangenetik die ausgewählten Zielsequenzen mit Fluoreszenzfarbstoffen gelabelt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben der Hersteller und nach den im Institut üblichen Standardprotokollen.<sup>53</sup> Anhand der Hybridisierung auf Metaphasen können die Zielsequenzen auf den Chromosomen lokalisiert und quantifiziert werden und so Aufschluss über Translokationen, Amplifikationen und Deletionen geben. FISH-Diagnostik kann auch auf Interphasekernen durchgeführt werden. Vorteil hiervon ist die deutlich höhere Anzahl an auswertbaren Kernen mit entsprechend erhöhter quantitativer Aussagekraft für Deletionen und Amplifikationen, jedoch kann hierbei keine Aussage über den chromosomalen Kontext im Karyogramm gemacht werden. Die Angaben der Regionen und Positionen in den Tabellen basieren auf ENSEMBL (Release 68, GrCh37/hg19). In Abbildung 9 werden die Sonden und die im Folgenden verwendeten Abkürzungen in ihrer Lage auf den Chromosomen 12, 18 und 19 dargestellt und dem aCGH-Profil zugeordnet.



**Abbildung 9:** Lage der kommerziellen FISH-Sonden und BACs für die Chromosomen 12, 18 und 19 im aCGH-Profil

Die jeweils ersten beiden Spalten geben die zu erwartende Kopienzahländerung laut aCGH-Profil für Ersterkrankung (MPAL) und Erstrezidiv (REZ) an: + Zugewinn, - Deletion, 1 normale Kopienzahl. Symbol: im Folgenden verwendete Abkürzung für die Sonde (Sondenname gemäß Tabelle 18 und Tabelle 19). Die horizontalen farbigen Linien kennzeichnen die Sondenposition und –farbe. Die dicken vertikalen Linien zeigen die eingesetzten WCP an. Im Bereich von 19pter liegen verschiedene grüne Sonden nahe beieinander, dieses resultiert aus der Verwendung verschiedener Translokationssonden sowie einer gezielten BAC-Sonde.

6.5.2.1 Sondenkombinationen und Auswertung

Basierend auf den Ergebnissen der konventionellen Karyotypisierung und aCGH wurden Sonden ausgewählt, mit denen die Aberrationen in verschiedenen Klonen genauer dargestellt werden können. Alle für die FISH-Analysen verwendeten Sondenkombinationen sind in Tabelle 23 dargestellt.

Die Auswertung erfolgte unter Verwendung des Axioskop-Fluoreszenz-Mikroskops mit chilled CCD-Kamera und der Software von ASI. In die Auswertung wurden Zellen mit folgenden Kriterien einbezogen:

- keine Überlagerung von zwei Kernen und komplette Darstellung der Metaphasechromosomen bzw. des Kernes bei Interphase-FISH
- die verschiedenfarbigen Sonden sowie die DAPI-Gegenfärbung (blau) sind klar zu erkennen und heben sich von Backgroundsignalen eindeutig ab

Die gefundenen Aberrationen wurden gemäß ISCN (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2013*)<sup>54</sup> beschrieben.

Tabelle 23: Übersicht der FISH-Sondenkombinationen

Probe	Sondenkombination	Zellen
MPAL	RP11-769O8 + XCP18	M
	CTD-3113P16 + RP11-707G18 + RP11-769O8	M
	CTD-3113P16 + RP11-460N10	M / I
	XCP12 + XCP18	M
	CEP12 + CEP18 + RP11-769O8	M
	RP11-291G24 + RP11-707G18 + RP11-460N10	M
	CTD3113P16 + RP11-769O8	M / I
	TCF3 - Split Signal Probe	M / I
	TCF3 / PBX1 Dual Color Probe	M
	TCF3 / PBX1 Dual Color Probe + RP11-460N10	M
	ETV6	M
	CDKN2A / CEP 9 FISH Probe	I
Erstrezidiv	CTD-3113P16 + RP11-707G18 + RP11-769O8	M
	XCP12 + XCP18 + ETV6	M
	CEP12 + CEP18 + RP11-769O8	M
	XCP11 + XCP12 + MLL	M
	TCF3 - Split Signal Probe	M
	RP11-463D17 + RP11-28F1 + (RP11-118I2)	M
	RP11-463D17 + RP11-28F1 + (RP11-291G24)	M
	CDKN2A / CEP 9 Probe	M
	IGH / CCND1 FISH Probe	M / I
	IGH / BCL2 Dual Color Probe	M
RP11-291G24 + RP11-707G18 + RP11-460N10	I	
Zweitrezidiv	IGH / BCL2 Dual Color Probe + RP11-769O8	I
	CDKN2A / CEP 9 FISH Probe + RP11-769O8	I
	RP11-707G18 + RP11-769O8	I

M: auf Metaphasen hybridisiert  
I: auf Interphasen hybridisiert  
(RP11...): nachträgliche Hybridisierung mit SO+SG→ in Aufnahme orange

### 6.5.2.2 Automatisierte Interphase-FISH-Analyse

Parallel wurden weitere FISH-Analysen an Interphasekernen durch das Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik gemeinsam mit der AG Seeger durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit, jedoch wurden die Ergebnisse dieser Untersuchungen in die Auswertungen der im Rahmen der Dissertation gewonnenen Ergebnisse miteinbezogen. Durch die Hybridisierung von Sonden auf Interphasekernen können quantitative Aussagen über die Verteilung von Amplifikationen und Deletionen in den Leukämiezellen gemacht werden. Aufgrund der hohen Anzahl auswertbarer Interphasekerne können die Ergebnisse auch besser statistisch ausgewertet werden.

Für die Analysen wurde das MetaSystems „Metafer-MetaCyte“ Scanningsystem verwendet. Dieses lässt durch die Aufnahme in mehreren Fokusebenen die Darstellung und Auswertung der Kerne als *Overlay*-Bild zu, die Signale werden automatisch durch die Software nach eingestellten Kriterien ausgewertet und anschließend manuell geprüft. Für die Fallstudie wurden die Ersterkrankung und das Erstrezidiv vor und nach Sorafenib-Behandlung mit Sonden für die aberranten Bereiche auf 12p, 18p und 19p untersucht. Die Auswertung der Signalverteilung erfolgte tabellarisch und graphisch.

### 6.5.2.3 Spectral Karyotyping (SKY)

SKY ist eine FISH-Methode, die eine exakte Zuordnung aller Chromosomen einer Metaphase und den Nachweis struktureller Umbauten zwischen den Chromosomen ermöglicht, indem jedem Chromosom eine bestimmte Farbe zugeordnet wird. Dies wird erreicht durch die unterschiedliche Kombination von 5 Fluorochromen, durch die jedes Chromosom ein charakteristisches Emissionsspektrum erhält. Die Karyotypanalyse erfolgt auf der Basis einer interferometrischen Spektralanalyse. Eine Übertragung der Spektren in gut unterscheidbare Pseudofarben erleichtert die Zuordnung zu den Chromosomen. So können durch diese Methode zusätzliche strukturelle Chromosomenaberrationen visualisiert werden, die in der konventionellen Karyotypisierung aufgrund des Umbaus kleiner und/ oder strukturell ähnlicher Chromosomenabschnitte nicht nachweisbar waren und die aufgrund eines fehlenden Hinweises auf eine Beteiligung dieser chromosomalen Regionen mittels FISH nicht gezielt untersucht wurden.<sup>55</sup>

Die Herstellung und Aufnahme der SKY-Präparate wurden im Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik durchgeführt. Dazu wurde das „Sky Paint Kit DNA Human“

verwendet, die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Für die Aufnahmen wurde das Axioskop Fluoreszenz Mikroskop mit FFT-Interferometer und CCD-Kamera verwendet. Zur Auswertung in Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die GenASIs „HiSKY“-Software verwendet, folgende Kriterien wurden für die Auswertung vorausgesetzt:

- gleichmäßige Hybridisierung
- Darstellung der kompletten Metaphase
- Abgrenzbarkeit der einzelnen Chromosomen
- wenig Überlagerungen

In die Analysen wurden Proben aller drei Erkrankungsstadien der Patientin, sowohl primäre Blasten als auch Zellen aus dem Engraftment, einbezogen. Die Auswertung der SKY-Analysen erfolgte zur Beschreibung der klonalen Veränderungen im Krankheitsverlauf.

### **6.5.3 DNA-Präparation**

Die Isolierung der genomischen DNA aus den Knochenmarkpunktaten (Ersterkrankung und Rezidiv) wurde im Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik nach etablierten Standardprotokollen durchgeführt.

### **6.5.4 Whole Genome Amplification (WGA)**

Zur Sicherstellung einer für die geplanten Analysen ausreichenden DNA-Menge wurde eine *Whole Genome Amplification (WGA)* mit dem „illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit“ durchgeführt. Hierbei können geringe Mengen genomischer DNA anhand isothermer Amplifikation vervielfältigt werden. Die dazu verwendete phi29-DNA-Polymerase zeichnet sich durch eine hohe Syntheserate (~25-50 Nukleotide/Sekunde) und eine geringe Fehlerrate ( $3 \times 10^{-6}$ ) aus.<sup>56</sup>

Die WGA wurde nach dem Protokoll des Herstellers (Cytiva, zuvor GE Healthcare, <https://cdn.cytivalifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=147189>) durchgeführt, als Template wurde jeweils 1 µl der Proben-DNA mit einer Konzentration von ~50 ng/µl eingesetzt. Parallel wurde die Reaktion mit Kontroll-DNA (45 µg) und H<sub>2</sub>O als Template durchgeführt. Die gewonnenen Produkte wurden in verschiedenen Verdünnungen (unverdünnt, 1:10, 1:20, 1:40) mittels PCR (s. Abschnitt 6.5.7, Primer: KRAS Exon 5a, ETV6 Exon 8) überprüft. Aufgrund der Ergebnisse wurde in den weiteren Analysen mit einer 1:20 Verdünnung des GenomiPhi-Produktes gearbeitet.

Um die Anwendung des WGA-Produktes in der qPCR zu überprüfen, wurde eine Versuchsreihe mit männlicher und weiblicher Original-DNA und deren WGA-Produkten durchgeführt. Als Referenz wurden Primerpaare für *MCPH1* und *KRAS* (autosomal) und zur Darstellung einer Deletion für *DMD Exon 39* (X-chromosomal) verwendet.

### 6.5.5 RNA-Präparation

Zur Durchführung der Genexpressionsanalyse wurde aus Proben der Ersterkrankung RNA gewonnen. Die Isolierung der RNA sowie die Aufreinigung erfolgten im Labor für Funktionelle Genomforschung der Charité (Dr. U. Ungethüm).

Zur Vorbereitung der RNA-Präparation wurden die aufgetauten kryoasservierten Knochenmarkszellen gewaschen und per Ficoll-Trennung nach dem Protokoll des Herstellers (Biocoll von Biochrom) aufgereinigt.

### 6.5.6 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mittels reverser Transkription der zur Genexpressionsanalyse isolierten mRNA durchgeführt. Hierbei entsteht durch die Transkription der mRNA ein cDNA-Template, welches durch PCR vervielfältigt wird. Nach vorangehendem DNase-Verdau wurde zunächst 1 µl RNA (~621 ng/µl) mit 0,5 µl Random Primer und 12,5 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O für 5 Minuten bei 70 °C erhitzt, danach erfolgte die Kühlung auf Eis. Anschließend wurde zu jedem Ansatz Folgendes zugesetzt: 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase, 200 U/µl, 5 µl M-MLV RT 5x Puffer, 1,25 µl dNTPs und 3,75 µl RNase-freies Wasser.

Die Proben durchliefen im Cycler folgendes Programm („RT“; Mastercycler R0005):

Tabelle 24: Cycler-Programm zur cDNA-Synthese

	Temperatur	Dauer
1.)	22 °C	10 min
2.)	55 °C	1 Stunde
3.)	70 °C	15 min

Die Synthese wurde mit der Probe der Ersterkrankung, der HP-RNA sowie als Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O durchgeführt. Die Überprüfung der Produkte erfolgte anhand einer PCR mit dem Primer TPX2.

### 6.5.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### 6.5.7.1 Primerdesign

Die für die Sequenzierung und die qPCR benötigten Primer wurden mit Hilfe der Programme „Primer 3“ und „Clone Manager Suite“ ausgewählt. Basierend auf den Gensequenzen (ENSEMBL, Release 68, GrCh37/hg19, www.ensembl.org) wurden Primer mit

einer Länge von 18 bis 25 Nukleotiden ausgewählt. Zunächst wurde versucht, Primer mit einer optimalen Schmelztemperatur von 60 °C, einem GC-Gehalt von 40-60% und einem Abstand zum Sequenzbeginn von mind. 50 Basen zu finden, während der PCR-Optimierung wurden jedoch Primer mit abweichenden Eigenschaften notwendig.

Die zur Sequenzierung genutzten Primerpaare sollten eine maximale Produktlänge von 800 bp umspannen, im Fall von längeren Sequenzen wurden zusätzliche Primer innerhalb des ersten Paares designt. Die Sequenzen der zur Sequenzierung verwendeten Primer sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Die Optimierung der Primer wurde mit Kontroll-DNA unter verschiedenen Bedingungen (s. Abschnitt 6.5.7) durchgeführt, für einige Sequenzen wurden mehrere Primer getestet. In der Primerübersicht in den Tabellen 12-14 werden nur die weiter verwendeten Primer angegeben. Aufgrund eines hohen GC-Gehaltes (>90%) konnten für einige Exons keine passenden Primer gefunden werden, diese wurden von der weiteren Sequenzierung ausgeschlossen.

Für die qPCR wurden Produktlängen zwischen 80-150 bp gewählt, die Optimierung erfolgte über konventionelle PCR mit Kontroll-DNA. Dabei wurden die PCR-Bedingungen wie im nächsten Abschnitt beschrieben angepasst.

Die Primer wurden von den Firmen TIB MOLBIOL, Eurofins MWG Operon und Invitrogen bezogen und mit Konzentrationen von 5 bzw. 10 µM gearbeitet.

#### 6.5.7.2 Konventionelle PCR

Die Amplifikation der genomischen DNA zur anschließenden Sequenzierung wurde größtenteils mit der aus der WGA gewonnenen DNA (Verdünnung 1:20) durchgeführt. In einigen Fällen mit nicht eindeutigen Ergebnissen, wie auch als Kontrolle zur Sequenzierung von *KRAS* wurde zusätzlich die Original-DNA (~50 ng/µl) eingesetzt.

Standardmäßig wurde die PCR mit dem Kit „HOT FIREPol DNA Polymerase“ wie folgt durchgeführt: Pro Ansatz wurden 3 µl 10x PCR Puffer, 1 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,4 µl dNTP-Mix (10 mM), je 1 µl Forward und Reverse Primer (je 10 µM), 0,2 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) und 1 µl Template (~50 ng DNA) mit PCR-H<sub>2</sub>O auf 30 µl aufgefüllt.

Um die Bildung von unerwünschten Nebenprodukten zu vermindern, wurde die PCR als *touchdown* PCR durchgeführt. Hierbei werden zunächst einige Zyklen mit erhöhter *Annealing*-Temperatur durchlaufen, die sich bis zum Erreichen der gewünschten Temperatur pro Zyklus um 1 °C verringert.

Tabelle 25: Cycler-Programm konventionelle PCR und Hochtemperatur-PCR

Konventionelle PCR			Hochtemperatur-PCR		
	Temperatur	Dauer	Wiederholungen	Temperatur	Dauer
1.	94 °C	5 min		94 °C	15 min
2.	94 °C	30 sec	5 Zyklen. Bei Punkt 3. je Zyklus -1 °C	94 °C	45 sec
3.	62 - 58 °C	30 sec		70-66 °C	30 sec
4.	72 °C	1 min		72 °C	1 min
5.	94 °C	30 sec	36 Zyklen	94 °C	45 sec
6.	57 °C	30sec		65 °C	30 sec
7.	72 °C	1min		72 °C	1 min
8.	72 °C	7min		72 °C	7 min
9.	Hold at 14 °C			Hold 14 °C	

Falls unter den Bedingungen der konventionellen PCR keine Amplifikation des gewünschten Produktes stattfand, wurde das oben beschriebene Protokoll in folgenden Punkten modifiziert:

- Zugabe von DMSO (5%) zum Aufbrechen von Sekundärstrukturen v.a. bei GC-reichen Produkten
- Zugabe von Betain 5M (10 µl pro 30 µl Ansatz)
- Durchführung der PCR als Hochtemperatur-PCR (Programm s. Tabelle 25)

Alternativ wurde für die Amplifikationen auch das „Platinum Taq Polymerase Kit“ mit höherer Enzymaktivität und –spezifität eingesetzt. Hierbei wurden pro Ansatz 1,5 µl 10x PCR-Puffer, 0,45 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,3 µl dNTP-Mix (10 mM), je 0,5 µl Forward und Reverse Primer (je 10 µM), 0,1 µl Platinum Taq Polymerase und 1 µl Template (~50 ng DNA) mit PCR-H<sub>2</sub>O auf 15 µl aufgefüllt. Das Cycler-Programm wurde analog zum Ansatz mit FireTaq-Polymerase wie in Tabelle 25 beschrieben ausgeführt. Auch bei diesem Ansatz wurden gegebenenfalls die Bedingungen nach oben genannten Punkten modifiziert. Für jedes Primerpaar wurden zusätzlich Ansätze mit Kontroll-DNA und Leerwert sowie eine Positivkontrolle mit einem zusätzlichen Primerpaar durchgeführt.

### 6.5.7.3 coldstart PCR

Mit dieser Form der PCR können Allele amplifiziert werden, die nur in Subklonen vorliegen. Nach initialem Erhitzen und Abkühlen mit der Bildung von homogenen und heterogenen Doppelsträngen werden durch eine niedrige Denaturierungstemperatur nur die heterogenen Stränge aufgetrennt und amplifiziert. So können bei der Sequenzierung Mutationen detektiert werden, die nur in einem Teil der Blasten vorliegen.<sup>57</sup> Wie im Paper von Zuo et al.<sup>50</sup> beschrieben, führten wir diese PCR für den Abschnitt von *KRAS* Exon 2 durch, der am häufigsten von Mutationen betroffen ist.

In Anlehnung an den Versuchsaufbau des Papers wurden pro Ansatz 2,5 µl 10x PCR Puffer, 2,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM), je 1 µl Forward und Reverse Primer (je 10 µM), 0,25 µl FireTaq-Polymerase (5 U/µl) und 1 µl Template (~50 ng DNA) mit PCR-H<sub>2</sub>O auf 25 µl aufgefüllt. Das Cyclex-Programm entspricht den Vorgaben des Papers (s. Tabelle 26).

#### 6.5.7.4 *long-distance* PCR

Um die vermutete *TCF3-ZNF384*-Fusion nachzuweisen, wurde zunächst die Methode der *long-distance* PCR angewendet. Damit können theoretisch Produkte mit einer Länge von bis zu 20 kb gewonnen werden. Hierzu wurden verschiedene Primerkombinationen von TCF3-Forward mit ZNF384-Reverse-Primern gewählt, die theoretisch mögliche Bruchpunkt-überspannende Produkte amplifizieren können.

Zur Durchführung wurde das „Expand Long Template PCR System Kit“ genutzt. Bei einer erwarteten Produktlänge >12 kb wurde der enthaltene Puffer #3 verwendet. Das Herstellerprotokoll wurde bei GC-reichen Sequenzen durch die Zugabe von 2% DMSO modifiziert, so dass sich folgender Ansatz ergab: 2,5 µl 10x Puffer #3, 0,375 µl Enzym Mix, 0,5 µl DMSO, 0,88 µl dNTP-Mix (10 mM), je 0,75 µl Forward und Reverse Primer (je 10 µM), 1,5 µl Template wurden mit PCR-H<sub>2</sub>O auf 25 µl aufgefüllt. Das Programm wurde nach Angaben des Herstellers wie folgt durchlaufen:

Tabelle 26: Cyclex-Programm *long distance* PCR

	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
1.	94 °C	2 min	
2.	94 °C	10 sec	10 Zyklen
3.	58 °C °C	30 sec	
4.	68 °C	20 min	
5.	94 °C	15 sec	25 Zyklen, bei 7.) Verlängerung von 20 Sec. pro Zyklus
6.	58 °C	30 sec	
7.	68 °C	20 min +20 sec/Zyklus	
8.	68 °C	7 min	
9.	Hold at 20 °C		

Diese PCR wurde mit Original-DNA und WGA-Produkt durchgeführt. Zusätzlich wurden als Positivkontrolle weitere Primerpaare (s. Tabelle 27) mit verschiedenen Produktlängen eingesetzt (Sequenzen s. Tabelle 12).

Tabelle 27: Verwendete Kontrollprimerpaare für *long-distance* PCR

Kontrollprimerpaare	Zu erwartende Produktlänge	Puffer
KRAS E5a F x KRAS E5b R	~ 5,5 kb	Puffer 1
KRAS E4 F x KRAS E5a R	~ 10 kb	Puffer 2
KRAS E4 F x KRAS E5b R	~ 15 kb	Puffer 3
ETV6 E3 F x ETV6 E4 R	~ 15 kb	Puffer 3

ETV6 E3 F x ETV6 E5 R	~ 30 kb	Puffer 3
KRAS E5a F x KRAS E5b R	~ 5,5 kb	Puffer 1
KRAS E4 F x KRAS E5a R	~ 10 kb	Puffer 2
KRAS E4F x KRAS E5b R	~15 kb	Puffer 3
ETV6 E3 F x ETV6 E4 R	~15 kb	Puffer 3

#### 6.5.7.5 PCR möglicher Fusionsgentranskripte

Die oben beschriebene Methode der konventionellen PCR wurde auch zur Amplifikation von möglichen Fusionsgentranskripten genutzt (cDNA-Präparation s. Abschnitt 6.5.6). Basierend auf den Ergebnissen der weiteren Analysen wurden Fusionsgene gewählt, die nach Translokationen, Bruchpunkten und Leserichtung möglich erschienen und die entsprechenden Primerkombinationen gewählt. Für die Amplifikation möglicher Fusionsgentranskripte wurden folgende qPCR-Primer kombiniert (s. Tabelle 13):

- MIDN E8 F
- METTL4 E4 R
- ADCYAP1 E4 F
- SYT10 E1 R
- ITPR2 E42 R

Eine PCR-Amplifikation der möglichen *TCF3-ZNF384*-Fusion wurde auf cDNA-Ebene, aber auch auf genomischer Ebene durchgeführt. Dafür wurden folgende Primer miteinander kombiniert:

- TCF3 alle Forward-Primer von Exon 2 bis einschließlich Intron 3-4
- alle ZNF384 Reverse-Primer von Intron 2-3 bis einschließlich Exon 4

Zusätzlich wurden weitere Primer für die Anwendung auf cDNA entworfen, sie sind in Tabelle 14 dargestellt.

#### 6.5.7.6 nested PCR

Zum Nachweis möglicher Fusionsgene wurde zusätzlich *nested* PCR eingesetzt. Dazu wird das aus der konventionellen PCR gewonnene Produkt gereinigt (s. Abschnitt 6.5.9.1) und erneut als Template analog der Methodik der konventionellen PCR (s. Abschnitt 6.5.7.2) eingesetzt. Die *nested* PCR wird mit Primern durchgeführt, die innerhalb der zuvor amplifizierten Sequenz liegen, möglich ist auch die Durchführung als *semi-nested* PCR, bei der ein zuvor verwendeter Primer mit einem neuen Primer kombiniert wird. Vorteil dieser Methode ist die Selektion eines Produkts bei vorliegenden Nebenprodukten.

### 6.5.8 Gelelektrophorese

Zum Nachweis der erfolgreichen PCR erfolgte die Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dabei können Informationen über das Vorhandensein, Länge und Reinheit des Produktes gewonnen werden. Die Auftrennung der Produkte erfolgt in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe. Zur Darstellung wird Ethidiumbromid zugesetzt, welches sich als Interkalans in die DNA-Doppelstränge einlagert und unter UV-Licht sichtbar gemacht wird. Ein Größenstandard lässt die Einschätzung der Produktgröße zu. Dazu wurden Agarose-Gele mit einer Konzentration von 1% in TBE-Puffer hergestellt und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Zur besseren Sichtbarkeit der Proben im Gel wurden diese mit ~30% Dye versetzt. Die angelegte Spannung betrug 95 Volt, die Laufzeit wurde nach Produktauftrennung variiert. Anschließend wurden die Banden unter UV-Licht anhand eines Polaroidphotos dokumentiert und ausgewertet.

### 6.5.9 Sequenzierung nach Sanger

#### 6.5.9.1 Aufreinigung

Zunächst erfolgte die Aufreinigung der erhaltenen PCR-Produkte nach folgendem Ansatz: 5 µl des PCR-Produktes werden mit 0,5 µl Exonuclease1-Puffer (10x), 0,5 µl Antarctic-Phosphatase-Puffer (10x), 0,05 µl Exonuclease1 (20000 U/µl), 0,1 µl Antarctic-Phosphatase (5000 U/µl) und 3,85 µl PCR-H<sub>2</sub>O versetzt und nach folgendem Programm inkubiert:

**Tabelle 28: Cyclor-Programm Aufreinigung Sequenzierung**

	Temperatur	Dauer
1.)	37 °C	1 Stunde
2.)	80 °C	15 min
3.)	Hold at 14 °C	

#### 6.5.9.2 Sequenzierungsreaktion

Anschließend erfolgte die Sequenzierung nach der Sanger-Didesoxymethode unter Anwendung des „Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits“. Je Ansatz wurden 2 µl des aufgereinigten PCR-Produktes, 1 µl 5x Big Dye Puffer, 1 µl Big Dye Mix, 0,5 µl eines Primers (10 µM) mit PCR-H<sub>2</sub>O auf 7,5 µl aufgefüllt. Für jedes Produkt wurden dabei zwei Ansätze mit dem jeweiligen Forward oder Reverse-Primer, bei Produktlängen >800 kb weitere Ansätze mit zusätzlichen Primern pipettiert. Das verwendete Programm wird in Tabelle 29 dargestellt.

**Tabelle 29: Cyclor-Programm Sequenzreaktion**

	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
1.)	96 °C	1 min	
2.)	96 °C	30 sec	25 Zyklen
3.)	50 °C	30 sec	

4.)	60 °C	4 min
5.)	Hold at 4 °C	

#### 6.5.9.3 Fällung

Die Fällung der Proben erfolgte nach Überführung in eine 96-Well-Mikrotiterplatte. Zuerst wurden in jedes mit Probe belegte Well 26 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> pipettiert, anschließend wurden je 64 µl Ethanol (100%) zugegeben und durch wiederholtes Pipettieren gemischt. Die Platten wurden für 30 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes erfolgte die Zugabe von je 100 µl Ethanol (70%) ohne Vermischen, es wurde erneut für 10 min bei 300 rpm zentrifugiert und dekantiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Zum Trocknen wurde die Platte einige Sekunden bei max. 200 rpm über Kopf zentrifugiert und anschließend für 1-2 Minuten bei 95 °C im Cycler ohne Abdeckung erwärmt. Die Pellets wurden in je 16 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> für 5 Minuten gelöst. Für die Sequenzierung erfolgte die Überführung der gelösten Proben in einer 1:10 Verdünnung mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> (gesamt: 20 µl/Well) in die Sequenzerplatte.

#### 6.5.9.4 Analyse

Die Analyse erfolgte auf dem „3730 DNA Analyzer“ von Applied Biosystems, für die Auswertung der Sequenzen wurde die „Sequence Scanner Software“ von Applied Biosystems genutzt. Auf die Referenzsequenzen wurde über ENSEMBL (Release 68, GrCh37/hg19, [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) und über den *UCSC Genome Browser* (hg19, <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) zugegriffen.

#### 6.5.10 **Microarray-basierte komparative genomische Hybridisierung (aCGH)**

Die aCGH ist eine Methode zum Nachweis von Verlusten und Gewinnen innerhalb eines Genoms. Hierbei erfolgt eine Hybridisierung fluoreszenzmarkierter Proben-DNA gemeinsam mit einer andersfarbig markierten Referenz-DNA auf einem Array mit fixierten DNA-Sonden. Aus dem Verhältnis der Fluoreszenzsignale können anschließend numerische Aberrationen berechnet und dargestellt werden.

Die aCGH-Analysen der Ersterkrankung und des Erstrezidivs wurden von der Arbeitsgruppe Array-CGH unter der Leitung von Prof. Dr. E. Klopocki des Instituts für Medizinische Genetik und Humangenetik der Charité durchgeführt. Die Analyse erfolgte auf einem 1M-Oligonukleotid-Array (Agilent Technologies), welches mit einem medianen Sondenabstand von 2,1 kb auch den Nachweis von Mikrodeletionen und –gewinnen ermöglicht. Die Durchführung erfolgte nach vorbeschriebenen Protokollen.<sup>58</sup>

Die Ergebnisse wurden mittels der Software „Genomic Workbench Standard Edition“ dargestellt und ausgewertet. Als Einstellungen wurden folgende Parameter gewählt: Algorithmus: ADM-2, Filter: 5 probes, log2ratio=0.29.

Die Ergebnisse wurden hinsichtlich der Eingrenzung von Bruchpunkten, möglichen Fusionengen und Genen mit Veränderung der Kopienzahl und deren Zuordnung zu Signalwegen ausgewertet. Basierend auf den Ergebnissen wurden auch weitere Sondenkombinationen für die FISH-Diagnostik geplant.

### 6.5.11 Quantitative *real-time* PCR (qPCR)

Diese Methode ermöglicht eine relative Quantifizierung des eingesetzten Nukleinsäure-Templates und kann damit zur Bestimmung von Deletionen, Amplifikationen und daraus resultierend von Bruchpunkten in genomischer DNA, sowie zur Bestimmung von Genexpressionsniveaus in cDNA genutzt werden.

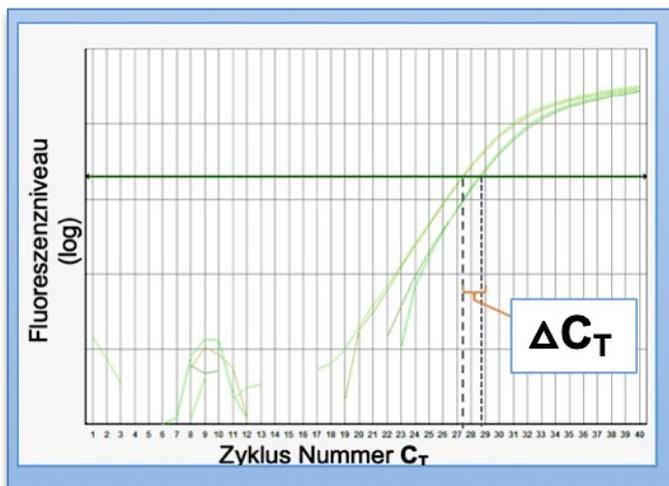


Abbildung 10: Darstellung des  $\Delta C_T$ -Wertes

Am Beispiel der qPCR-Fluoreszenzkurve von Patienten- und Kontrollprobe

nierten Fluoreszenzniveaus notwendig waren (s. Abbildung 10). Bei der relativen Quantifizierung wird der Wert des Zielgens auf ein Referenzgen bezogen. Für die Analyse genomischer DNA sollte dieses in einem nicht aberranten Bereich liegen, für Genexpressionsanalysen wird ein sogenanntes *housekeeping*-Gen gewählt, welches keiner Regulation unterliegt. Zusätzlich wird immer eine normale Kontrollprobe mitgeführt. Zur Berechnung des relativen Verhältnisses wird die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode angewendet:<sup>59</sup>

$$\Delta C_T = C_{T \text{ Zielgen}} - C_{T \text{ Referenzgen}}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Probe}} - \Delta C_{T \text{ Kontrolle}}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

## Material und Methoden

Zur Durchführung wurde der „5x HOT FirePol EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX)“ mit folgendem Ansatz genutzt: 5 µl EvaGreen Mix 5x, je 1,0 µl Forward und Reverse Primer (5 µM), 10 µl einer 1:10-Verdünnung des Templates (Gesamtmenge ~50 ng/Ansatz) wurden mit PCR-H<sub>2</sub>O auf 25 µl aufgefüllt und durchliefen im 7500 Real-Time PCR System das in Tabelle 30 gezeigte Programm.

Tabelle 30: Cyclor-Programm qPCR

	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
1.)	95 °C	1 min	
2.)	95 °C	15 sec	
3.)	60 °C	30 sec	40 Zyklen
4.)	72 °C	45 sec	
5.)	Hold at 14 °C		

Zusätzlich wurden zur Ergebnisvalidierung weitere Versuche auf dem Step OnePlus Real-Time PCR System mit dem „Power SYBR Green PCR Master Mix“ durchgeführt. Dazu wurden pro Ansatz 10 µl des Power SYBR 2x Mix, je 0,8 µl Forward und Reverse Primer (5 µM), 5 µl einer 1:5-Verdünnung des Templates (Gesamtmenge ~50 ng/Ansatz) mit PCR-H<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt und das oben angegebene Programm durchlaufen.

Pro Ansatz wurde immer ein Leerwert mitgeführt, und die Ansätze als Duplikate bzw. teilweise auch als Triplikate pipettiert. Zur Überprüfung der Produktreinheit wurde am Ende jedes Durchlaufes die Schmelzkurve bestimmt und überprüft, dass nur ein Produkt mit spezifischer Schmelztemperatur vorlag.

Folgende Einschlusskriterien der Messungen galten für die Auswertung:

1. Entstehung eines reinen Produktes, siehe Schmelzkurve
2. Fluoreszenzkurve mit exponentiellem Anteil
3. kein Produkt in der Leerwertmessung
4. effizienter Primer:  $C_T < 30$
5. Standardabweichung des  $\Delta C_T \leq 0,250$

Zur Auswertung der Daten wurde verglichen, ob Original-DNA und WGA-Produkt als Template gleichwertig verwendbar sind. Dazu wurde für die für beide Templates vorliegenden Daten der Korrelationskoeffizient bestimmt, der ein Maß für den linearen Zusammenhang der Daten ist. Zusätzlich wurde bestimmt, ob für die Auswertung der Mittelwert aller die Kriterien erfüllenden Messungen oder der Wert mit der niedrigsten Standardabweichung zu nutzen ist. Auch hier wurde der lineare Zusammenhang mittels Korrelationskoeffizient bestimmt.

### 6.5.11.1 Chromosomale Bruchpunktanalyse

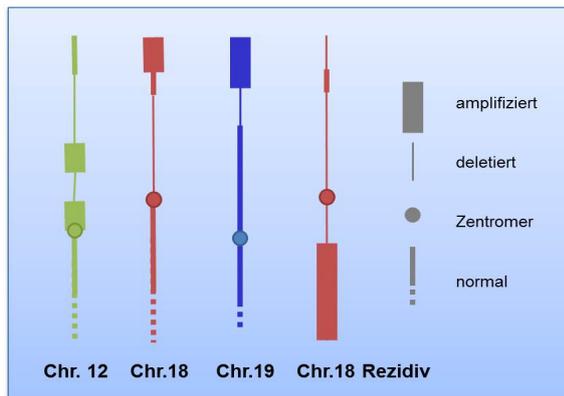


Abbildung 11: Schematische Übersicht des aCGH-Profiles: Chromosomen 12, 18 und 19 von Ersterkrankung und Rezidiv

Als Template für die Bruchpunktanalyse wurden in erster Linie die WGA-Produkte von Patienten- und Kontroll-DNA genutzt. Bei unklaren Ergebnissen und zur Bestimmung der absoluten Kopienzahl wurde zusätzlich Original-DNA eingesetzt.

Basierend auf der genauen Analyse des aCGH-Profiles (Schema s. Abbildung 11) wurden die in Tabelle 13 aufgelisteten Primerpaare zur Amplifikation der in den oder in der Nähe

von Bruchpunktbereichen liegenden Gene bzw. Exons gewählt, um die Bruchpunkte weiter einzuengen. Als Referenzgen wurde hierfür *MCPH1* gewählt, welches in einem unveränderten Chromosomenabschnitt liegt.

### 6.5.11.2 Genexpressionsanalyse des Fusionstranskripts

Weiterhin wurde die qPCR im Verlauf der Arbeit zur Untersuchung der Genexpression des gefundenen *TCF3-ZNF384*-Fusionsgens genutzt. Dazu wurden relative Expressionsniveau von nicht deletierten und deletierten Exons von *TCF3* und *ZNF384* bestimmt. Es wurde angenommen, dass das Niveau nicht-deletierter Exons die Gesamtexpression von Fusionsgentranskript und normalem Allel repräsentiert, während deletierte Exons nur vom normalen Allel exprimiert werden können. Die Differenz beider Expressionsniveaus muss folglich vom Fusionsgentranskript getragen werden.

Für die Analysen wurde die präparierte MPAL-cDNA als Template sowie Humane Plazenta-cDNA und HeLa-cDNA als Kontrollproben eingesetzt. Folgende Primerkombinationen (s.) wurden genutzt:

- ZNF384 Exon 2 No2 Forward mit ZNF384 Exon 3 Reverse
- ZNF384 Exon 4 Forward mit ZNF384 Exon 4 Reverse
- ZNF384 Exon 4-5 Forward mit ZNF384 Exon 4-5 Reverse
- TCF3 E2\_cDNA Forward mit TCF3 E2\_cDNA Reverse
- TCF3 E2\_cDNA Forward mit TCF3 E2-3 Reverse
- TCF3 Exon 17 Forward mit TCF3 Exon 17 Reverse

Als Referenz wurden Primerpaare für *TPX2* und *HPRT1* genutzt. Die Analyse wurde mit dem *Power SYBR Green Kit* auf dem *Step One qPCR-Cycler* nach dem o.g. Protokoll durchgeführt, die Menge des verwendeten Templates betrug hier ~25 ng.

### 6.5.12 RNA-Microarray-Analysen

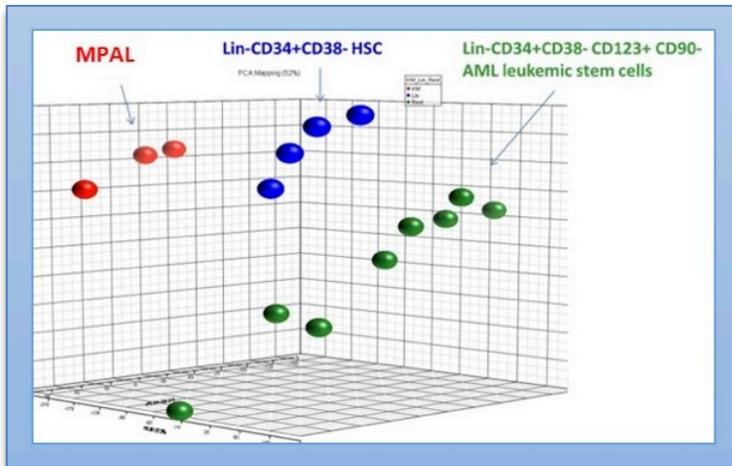


Abbildung 12: *Principal component analysis*  
MPAL (rot), HSC (blau) und LSC (grün)

Die Genexpressionsanalysen der Ersterkrankung wurde im Labor für Funktionelle Genomforschung der Charité (Dr. U. Ungethüm) durchgeführt. Zur Analyse wurde der Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 verwendet. Als Referenz wurden die Daten von myeloischen leukämischen (LSC) und hämatopoetischen Stammzellen (HSC) aus der Publikation von

Majeti et al.<sup>60</sup> genutzt. Die RNA-Isolierung und Aufreinigung sowie die Durchführung des Genexpressionsarrays wurden zur besseren Vergleichbarkeit an die in der Publikation beschriebenen Methoden angelehnt. Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*), mit der die Konformität innerhalb der Gruppen und die Abgrenzung gegenüber den anderen Typen von Zellen dargestellt wird. Die Validität der Verwendung der HSC als Vergleichsgruppe wurde auch durch die Arbeit von Janette Nickel (AG Seeger) bestätigt, die Analyse der Genexpressionsdaten analog der Methode von Rapin et al.<sup>61</sup> zeigte eine enge Verwandtschaft der MPAL zu den HSC.

## 6.6 Weitergehende Auswertung der Daten

### 6.6.1 Auswertung der Daten aus aCGH

Bereits in den Vorarbeiten wurde durch Dr. Dr. T. Heiden (AG Seeger) basierend auf den Daten der aCGH für die Ersterkrankung eine Liste der Gene mit Abweichungen der Kopienzahl erstellt. Dabei wurden sogenannte *copy number variations* (CNV), Bereiche des Genoms, die generell einer breiten Variation ihrer Kopienzahl unterliegen, von der weiteren Betrachtung der Ergebnisse ausgeschlossen.<sup>62</sup> Aus dieser Liste von Gene mit *copy number aberrations* (CNA) wurden die Kandidatengene wie in Abschnitt 5.2.3 beschrieben ausgewählt.

Zur Bestätigung der gewählten Gene und zur Suche nach zusätzlichen Kandidatengen wurden die Daten im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit weitergehend ausgewertet. Hier wurden auch die aCGH-Daten des Erstrezidives mit einbezogen. Basierend auf den unten genannten Datenbanken, die eine Zuordnung zu den Kategorien „Tumorsuppressor,“ und „Onkogen“ ermöglichen, wurde eine Liste von Genen erstellt, die im Zusammenhang mit diversen Malignomen in der Literatur beschrieben wurde. Gene der Listen von Ersterkrankung und Erstrezidiv wurden wie folgt analysiert:

1. Art der Kopienzahländerung: Verlust oder Gewinn
2. in der Literatur beschriebene Funktion: Onkogen oder Tumorsuppressor (soweit bekannt)
3. Malignomtyp, für den ein Zusammenhang in der Literatur beschrieben wurde
4. Vergleich von Aberration und Funktion: proliferative oder tumorsuppressive Wirkung

Für die Literaturrecherche wurden verschiedene Datenbanken genutzt:

- PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>) und Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*,
- Wikigenes (<https://www.wikigenes.org>),
- Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology (<http://atlas-geneticsoncology.org>),
- GeneNote (Online Tool existiert inzwischen nicht mehr)
- Onkogendatenbank des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (<http://apps2.bvl.bund.de/oncogene/protected/main/oncoGene.do>)

Für die Auswertung wurde eine proliferative Wirkung deletierter Tumorsuppressoren und amplifizierter Onkogene angenommen. Zusätzlich wurden die CNA-Genlisten, wie unten in 6.6.2.3 beschrieben, mit „GeneCodis 3.0 oder 4.0“<sup>33,34,63</sup> für die Integration von Genexpressionsdaten analysiert.

### **6.6.2 Auswertung der Genexpressionsdaten**

Wie bereits in Abschnitt 6.5.12 beschrieben, wurden die Genexpressionsdaten mit den publizierten Daten von HSC und LSC<sup>60</sup> verglichen. Für den ersten Vergleich mit dem Immunphänotyp wurden zunächst die normalisierten Genexpressionsdaten (RMA Algorithmus Partek, Genomics Suite) verwendet, in den weitergehenden Auswertungen

wurde überwiegend das Verhältnis dieser normalisierten linearen Expressionsniveaus von MPAL zu HSC genutzt, da HSC in der Literatur als MPAL-Vorläuferzellen beschrieben werden.

Die weitere statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels „limma“, einer Bioconductor-Software, welche Microarray- und RNA-seq Daten verarbeiten kann.<sup>64</sup> Die primäre Auswertung mittels limma-Package erfolgte durch Janette Nickel (AG Seeger). Die durchgeführte Datenanalyse und -filterung gestattete die Identifizierung differentiell exprimierter Gene (*adjusted p-value* <0,01). Für die weitere Verwendung in dieser Arbeit wurden die Daten durch die Zuordnung der ENSEMBL-Gennummern sowie des aus logFC berechneten linearen Ratio ergänzt. Des Weiteren entstammen dieser Auswertung auch Vergleiche der Genexpressionsdaten mit derer anderer hämatopoetischer Zellreihen, aus denen Aussagen über die Verwandtschaft gemacht werden konnten (s. letzter Abschnitt von 6.5.12). Als *Cut-Off* Wert für überexprimierte Gene wurde eine Ratio MPAL/HSC >3 bzw. für unterexprimierte Gene <0,33 definiert.

#### 6.6.2.1 Vergleich Genexpression (RNA-Microarray) und Immunphänotyp

Um einen Zusammenhang zwischen den Daten von RNA-Microarray- und Protein-Expressionsanalysen zu prüfen, wurden die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Immunphänotypisierung mit denen der Microarrayanalysen der entsprechenden Gene verglichen. Dieser Vergleich erfolgte für die zellreihendefinierenden Marker nach WHO-Klassifikation. Für die Übersicht wurden die normalisierten Daten für die einzelnen Probesets der Affymetrix-Chips verwendet, beim Vorliegen mehrerer Probesets für einen Marker wurde der Mittelwert dargestellt.

#### 6.6.2.2 Ergänzung der Kandidatengenanalyse der aCGH

Die mittels Vergleich von aCGH-Daten und Literaturrecherche (s. Abschnitt 6.6.1) erstellte Liste aberranter Tumorsuppressor- und Onkogene wurde für die Ersterkrankung mit den Daten der Genexpression ergänzt. Dazu wurde für alle Genen, die nach limma-Analyse eine signifikant aberrante Genexpression gegenüber den hämatopoetischen Stammzellen aufweisen, das Expressionsverhältnis MPAL/HSC berechnet. Amplifizierte Onkogene mit verstärkter Genexpression und deletierte Tumorsuppressoren mit reduzierter Genexpression wurden identifiziert und somit einer zu erwartenden proliferativen oder antiproliferativen Wirkung zugeordnet. Zusätzlich wurde die Gewebespezifität berücksichtigt, z.B. wurden Gene aussortiert, für die lediglich eine Relevanz bei Prostatakarzinomen beschrieben wurde.

### 6.6.2.3 „GeneCodis“ und Signalweganalysen

Zur Auswertung der Genexpressionsdaten wurden Analysen mit „GeneCodis 3.0 bzw. 4.0“ (<https://genecodis.genyo.es/>) durchgeführt. Unter Anwendung der älteren Version des Programmes wurden bereits zu Beginn des Projektes die Kandidatengene ausgewählt. „GeneCodis“ berücksichtigt keine absoluten Expressionsdaten, es analysiert eine eingegebene Liste von Gennamen hinsichtlich ihrer Zuordnung zu verschiedenen Signalwegen und deren Signifikanz.<sup>33,34,63</sup>

Vorteil dieser Methode ist die Variabilität der Genlisten nach frei wählbaren Kriterien. So können mit dem Programm die nach limma-Analyse signifikant aberrant exprimierten Gene der MPAL wie auch die Listen mit CNA nach aCGH für MPAL (wie in den Vorarbeiten) und Rezidiv analysiert werden.

Mit den gewonnenen Informationen wurden signifikante von Aberrationen betroffene Signalwege zwischen den verschiedenen Zellreihen sowie zwischen Ersterkrankung und Rezidiv verglichen. Auch ein differenzierter Vergleich der Gruppen mit Über- und Unterexpression wurde durchgeführt.

Für die Durchführung wurden in „GeneCodis 4“ folgende Parameter gewählt: *organism: „Homo sapiens“, annotation: „KEGG“, test: „Hypergeometric“, mode of analysis: „Single“, P-value correction: „FDR“, min. genes annotated: „3“, universe: „Whole Genome“*. Es wurden die Ergebnisse der *co-annotated* Analyse verwendet.

„GeneCodis“ ermöglicht auch die Analyse basierend auf anderen Kategorien wie z.B. *Gene Ontology (Biological Process, Cellular Component, Molecular Function), Omin Diseases, Pub Med* und *MicroRNAs*, auch kombinierende Analysen (*modular enrichment analysis*) sind möglich.<sup>63</sup> Zusätzlich zu den Signalweganalysen wurden die Listen in Bezug auf *GO Biological Process* untersucht.

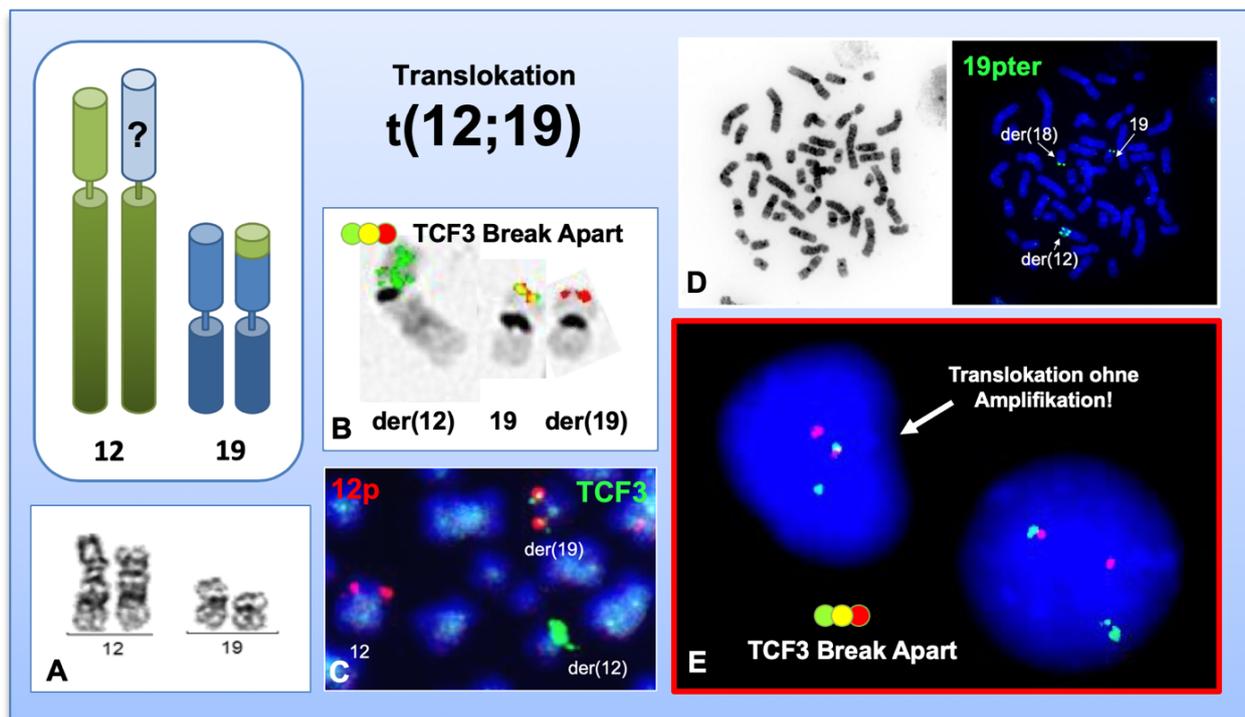
Aufbauend auf den durch diese Auswertungen gewonnenen Ergebnissen wurden für die Diskussion Signalwege weitergehend ausgewertet. Hierzu wurde direkt über die Seite von KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>)<sup>35–37</sup> auf die im jeweiligen Signalweg vertretenen Gene zugegriffen und die farbliche Darstellung über *user data mapping* generiert.

## 7 Ergebnisse

### 7.1 Molekularzytogenetik

#### 7.1.1 Ersterkrankung (MPAL)

Die ersten tumorgenetischen Voruntersuchungen der Ersterkrankung (s. Abschnitt 5.2.3) ließen bereits eine hohe genetische Komplexität der Leukämiezellen erahnen. Zur genaueren Klärung der chromosomalen Aberrationen wurden weitere FISH-Analysen mit verschiedenen Sondenkombinationen (s. Abschnitt 6.5.2.1) durchgeführt. Die Karyotypisierung zeigte eine mögliche chromosomale Translokation t(12;19), unter Berücksichtigung der Bruchpunkte im aCGH-Profil wurde eine *TCF3-ZNF384*-Fusion vermutet. Erste FISH-Untersuchungen mit *TCF3*-Sonden zeigten dabei eine Spaltung von *TCF3* mit Translokation und Amplifikation des distalen Sondenanteils (s. Abbildung 7 und Abbildung 13 B).



**Abbildung 13: Nachweis der chromosomalen Translokation t(12;19) in leukämischen Blasten der MPAL-Ersterkrankung - schematischer Aufbau und repräsentative Abbildungen**

[A] Ausschnitt Karyogramm: der(12) und der(19), [B] FISH: Translokation und Amplifikation von 19pter auf Chr. 12 mit Spaltung der *TCF3* Break-Apart Sonde DAKO (distales *TCF3* / proximales *TCF3*), [C] FISH: Translokation von 12p an *TCF3* auf Chr. 19 (RP11-707G18 / (*TCF3* / *PBX1*)), [D] FISH: Translokation und Amplifikation von 19pter auf der12 und der18 (CTD-3113P16), [E] FISH: linke Interphase: Spaltung der *TCF3* Break-Apart Sonde DAKO (distales *TCF3* / proximales *TCF3*) ohne Amplifikation des distalen Sondenanteils

## Ergebnisse

Durch weitere Hybridisierung konnte die Translokation des 12p-Abschnittes mit *ZNF384* an das *TCF3*-Gen nachgewiesen werden, die Fusion der roten und grünen Sonde auf Chromosom 19 ist in Abbildung 13 C erkennbar. Diese Translokation wurde in allen Leukämiezellen einheitlich beobachtet. Durch den Einsatz der *TCF3*-Splitsonde fielen auch Amplifikationen des distalen Sondenanteils auf den Chromosomen 12 und 18 in nahezu allen Blasten auf. Allerdings fanden wir auch vereinzelt Zellen, die zwar die Translokation des distalen *TCF3*-Sondenanteils jedoch ohne weitere Amplifikation aufwiesen (s. Abbildung 13 E). Um die Amplifikationen genauer zu analysieren wurden weitere Sondenkombinationen hybridisiert. Die Sondenauswahl wurde in Hinblick auf die Bereiche mit Zugewinnen im aCGH-Profil getroffen. Mit einer weiteren Sonde wurde die Translokation und Amplifikation des terminalen Abschnitts von 19p auf die Chromosomen 18 und 12 (s. Abbildung 13 D) bestätigt.

Durch die Wahl einer auf *KRAS* hybridisierenden Sonde zum Nachweis der 12p-Amplifikation konnte auch die nach aCGH-Profil vermutete *KRAS*-Amplifikation in nahezu allen Blasten bewiesen werden. Die *KRAS*-Färbung auf Interphasen ist in Abbildung 14 beispielhaft dargestellt. Durch die gezielten Hybridisierungskombinationen konnte im Folgenden die Kolokalisation und -amplifikation von Abschnitten von 12p (mit *KRAS*) sowie der Subtelomerbereiche von 18p und 19p auf verschiedenen aufgebauten derivativen Chromosomen 12 und 18 bewiesen werden (s. Abbildung 16-19). Jedoch wurde auch in diesen Färbungen eine einzelne Metaphase gefunden, die (analog zur Zelle aus 13E) eine Kolokalisation ohne Amplifikation dieser Bereiche aufweist (s. Abbildung 15).

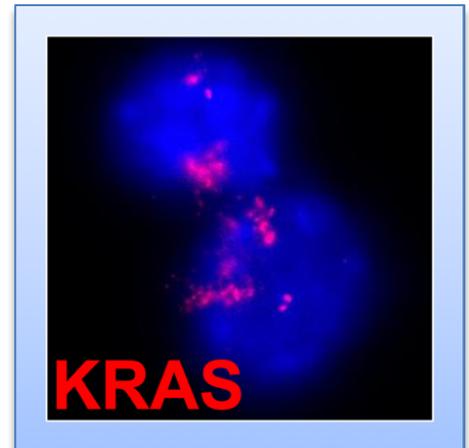


Abbildung 14: *KRAS*-Amplifikation  
Interphase-FISH (RP11-708G18)

## Ergebnisse

Beruhend auf diesen Ergebnissen ist eine primär bei der Blastenentstehung aufgetretene Translokation  $t(12;19)$  als *first hit* oder *founder mutation* sehr wahrscheinlich. Diese Annahme wird unterstützt durch die Identifizierung einer Zelle mit  $t(12;19)$  als wahrscheinlich einziger Veränderung (s. Abschnitt 5.2.3) und den einheitlichen

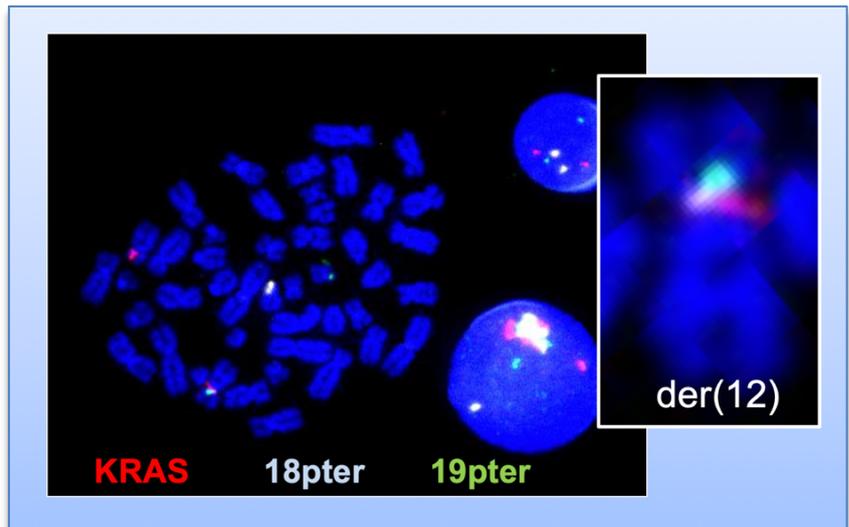
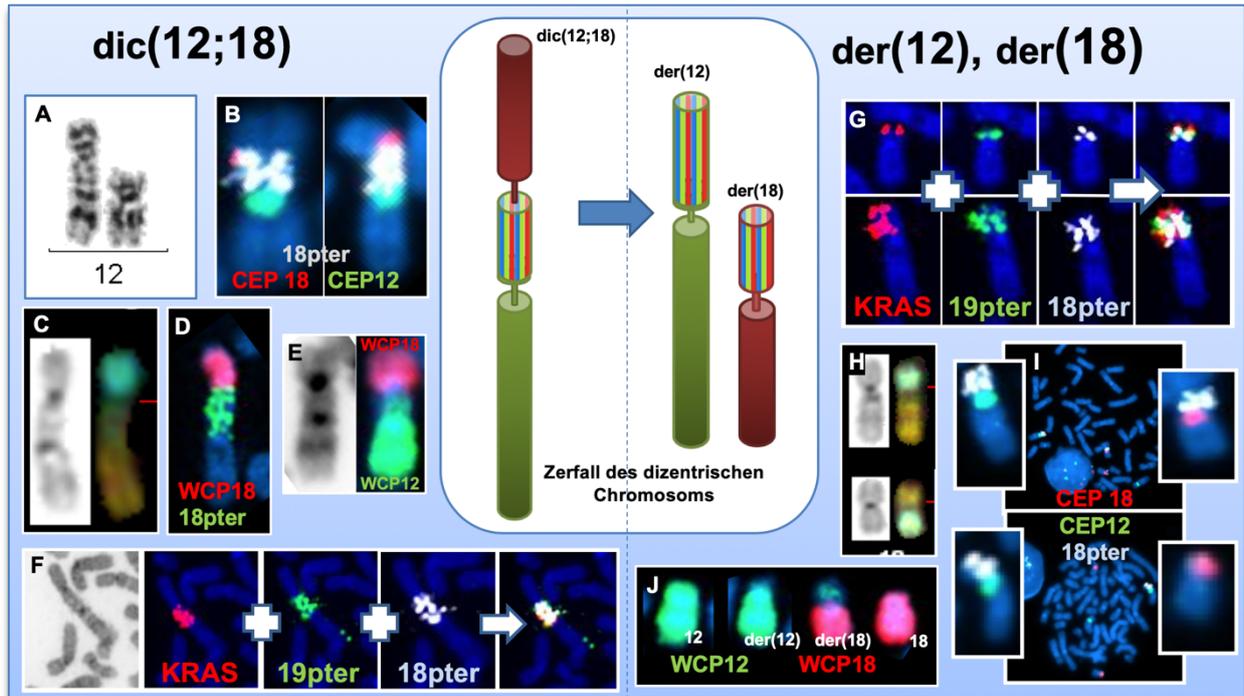


Abbildung 15: FISH-Analyse einer Metaphase der MPAL mit Kolokalisation ohne Amplifikation der Abschnitte von 12p, 18p und 19p auf der(12) (RP11-708G18, RP11-769O8\* und CTD-3113P16), im Vergleich rechts unten eine Interphase mit Amplifikation, das rechte Bild zeigt eine vergrößerte Ansicht des der(12)

Nachweis dieser Translokation in allen Leukämiezellen.

Erst in der Folge könnten dann die weiteren – auf den ersten Blick vorherrschenden – Amplifikationen entstanden sein, welche zunächst sehr verschieden und komplex imponierten. So ließen sich die koamplifizierten Bereiche mit variabler Lokalisation und Amplifikatquantität sowohl auf dizentrischen Chromosomen  $dic(12;18)$  als auch auf derivativen Chromosomen 12 und 18 nachweisen.

Mittels Auswertung der weiteren Hybridisierungen gelang eine vereinfachte Darstellung der diversen Aberrationen, welche dann als Subtypen von Klonen identifiziert und zusammengefasst werden konnten. Abbildung 16 zeigt den Aufbau des vorherrschenden dizentrischen Chromosoms  $dic(12;18)$  mit Lokalisation der amplifizierten Bereiche zwischen den beiden Zentromeren. Auch derivative Chromosomen, welche zunächst monozentrisch erschienen, konnten durch den Einsatz von Zentromerproben für 12 und 18 als ein solches  $dic(12;18)$  identifiziert werden, sie sind jedoch morphologisch nur eingeschränkt als dizentrisches Chromosom in den Metaphasepräparaten erkennbar (s. Abbildung 16 B). Des Weiteren wurde bei bekannter Instabilität dizentrischer Chromosomen ein potenzieller Zerfall des dizentrischen Chromosoms angenommen. Daher wurden die Zellen mit endständigem Amplifikat auf der(12) und der(18) unter einem Klontyp mit den Zellen mit dizentrischem Chromosom zusammengefasst (s. Abbildung 16 G-J).

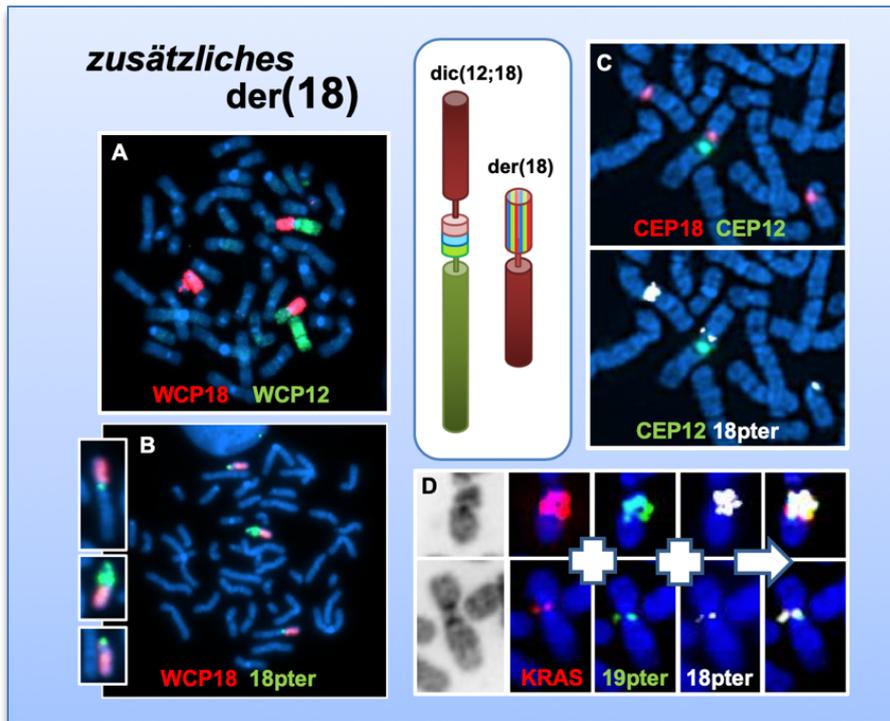


**Abbildung 16: Dizentrisches Chromosoms dic(12;18) sowie derivative Chromosomen der(12) und der(18) - schematischer Aufbau und repräsentative Abbildungen**

[A] Karyogramm: dic(12;18), [B] FISH: dic(12;18) mit Färbung der Zentromere, links ohne Kondensation des Zentromers 12 (CEP18 / CEP12 / RP11-769O8\*), [C] SKY: dic(12;18), [D] FISH: dic(12;18), der amplifizierte Subtelomerbereich von 18p wird nicht durch WCP 18 erfasst (XCP18 / RP11-769O8), [E] FISH: dic(12;18) (XCP18 / XCP12), [F] FISH: dic(12;18) mit Koamplifikation der Abschnitte von 12p und der Subtelomerbereiche von 18p und 19p (von links nach rechts: Bandenfärbung; je einzeln RP11-708G18, CTD-3113P16 und RP11-769O8\*, Overlay aller 3 Sonden), [G] FISH: der(12) und der(18) mit Koamplifikation der Abschnitte von 12p und der Subtelomerbereiche von 18p und 19p (von links nach rechts: Bandenfärbung; je einzeln RP11-708G18, CTD-3113P16 und RP11-769O8\*, Overlay aller 3 Sonden), [H] SKY: der(12) und der(18), [I] FISH: variable Amplifikatmenge auf der(12) und der(18) (CEP18 / CEP12 / RP11-769O8\*), [J] FISH: normales Chr. 12, der(12), der(18) und normales Chr.18 (XCP18 / XCP12),

\*Spectrum aqua: in den Aufnahmen zur besseren Erkennbarkeit als weißes Signal aufgenommen

Die parallele Hybridisierung von WCP18 mit einer Sonde für das Subtelomer 18p -wie in Abbildung 16 D dargestellt- zeigt auch, warum die ersten Analysen der Vorarbeiten diese Amplifikation nicht erkennen ließen: So wird der Subtelomerbereich durch die eingesetzte WCP18-Sonde nicht markiert, ohne die gezielte Sondauswahl aufgrund des aCGH-Profiles wäre dieser Zugewinn wahrscheinlich nicht gesehen worden. Unter anderem zeigt diese Hybridisierung auch die unterschiedliche Amplifikatmenge auf den derivativen Chromosomen 12 und 18 (s. Abbildung 16 I). Insgesamt lässt sich beobachten, dass meist eine offenbar kontinuierliche Verschiebung vorliegt. Das heißt, der Hauptanteil liegt entweder auf der(12) oder auf der(18) oder das Amplifikat ist relativ gleichmäßig verteilt.



**Abbildung 17: Subklon mit zusätzlichem der(18) - schematischer Aufbau und repräsentative Abbildungen**

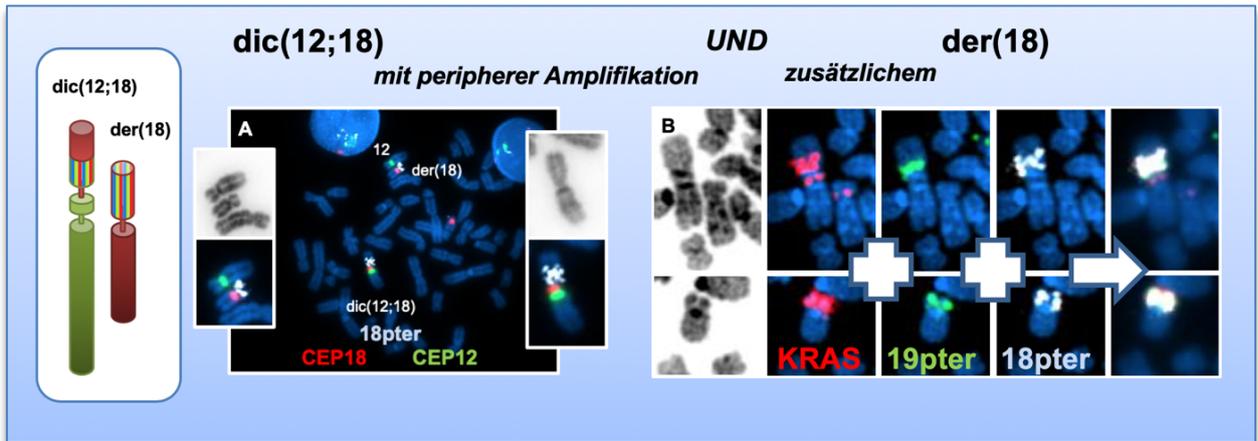
[A] FISH: gemeinsames Vorliegen von dic(12;18) und der(18) (XCP18 / XCP12), [B] FISH: gemeinsames Vorliegen von dic(12;18) (oben), der(18) (mittig) und normalem Chromosom 18 (unten) (XCP18 / RP11-769O8), [C] FISH: Lokalisation von 18pter ohne Amplifikation zwischen den Zentromeren (oben: CEP18 / CEP12, unten: CEP12 / RP11-769O8\*), [D] FISH: dic(12;18) ohne Amplifikation (unten) und der(18) (oben) (von links nach rechts: Bandenfärbung; je einzeln RP11-708G18, CTD-3113P16 und RP11-769O8\*, Overlay aller 3 Sonden)

\*Spectrum aqua: in den Aufnahmen zur besseren Erkennbarkeit als weißes Signal aufgenommen

Weitere Metaphasen weisen sowohl ein dizentrisches Chromosom der(12;18) wie auch ein derivatives Chromosom 18 zusätzlich zum normalen Chromosom 18 auf (s. Abbildung 17). Das heißt, diese Zellen besitzen zusätzlich Material von 18q. Da dieser Subklon jedoch in den Metaphasen deutlich seltener vorlag, erklärt das wahrscheinlich, warum im aCGH-Profil der Ersterkrankung kein Zugewinn sichtbar ist. Abweichend vom in Abbil-

dung 16 dargestelltem dic(12;18) zeigt dieses dizentrische Chromosom hier nur eine Lokalisation ohne Amplifikation aller 3 Bereiche, auf dem zusätzlichen der(18) liegen diese amplifiziert vor.

Eine abweichende Amplifikationsanordnung im dizentrischen Chromosom wies ein weiterer Subklon wie in Abbildung 18 gezeigt auf: Im Gegensatz zu den bisher dargestellten dic(12;18) liegt hier zwischen den beiden Zentromeren nur Material von Chromosom 12, die gemeinsame Koamplifikation befindet sich distal des Zentromers 18. Aufgrund der Entwicklung im Rezidiv nehmen wir an, dass der amplifikationstragende Arm endständig 18q-Material aufweist. Dies konnte jedoch in keiner Hybridisierung nachgewiesen werden. Auch hier liegt ein zusätzliches derivatives Chromosom 18 vor.

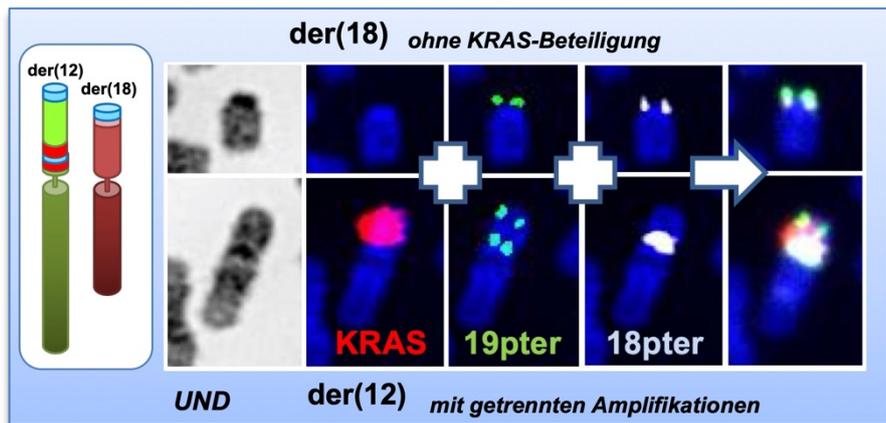


**Abbildung 18: Dizentrisches Chromosoms dic(12;18) mit peripherer Amplifikation und zusätzlichem der(18)-schematischer Aufbau und repräsentative Abbildungen**

[A] FISH: dic(12;18) (rechts) mit peripherer Amplifikation sowie der(18) (links) (**CEP18** / **CEP12** / **RP11-769O8\***), [B] FISH: dic(12;18) (oben) und der(18) (unten) (von links nach rechts: Bandenfärbung; je einzeln **RP11-708G18**, **CTD-3113P16** und **RP11-769O8\***, Overlay aller 3 Sonden)

\***Spectrum aqua**: in den Aufnahmen zur besseren Erkennbarkeit als weißes Signal aufgenommen

Eine interessante Entdeckung war der Nachweis eines Subklons, welcher erstmals eine getrennte Lokalisation der verschiedenen Zugewinne zeigt (wie in Abbildung 19 dargestellt). So beinhaltet ein derivatives Chromosom 12 zwar alle Zugewinne auf dem p-Arm, jedoch befindet sich der 18p-Subtelomerbereich hier nur zentromernah in Kolokalisation mit einem Subtelomer 19p-Signal. Ein weiteres Signal vom 19p-Subtelomerbereich liegt distal, dazwischen liegt 12p mit **KRAS** allein amplifiziert vor. Das derivative Chromosom 18 derselben Zelle weist dafür kein 12p-Material auf, hier liegen die Subtelomerbereiche von 18p und 19p singular kolokalisiert vor. Für das Verständnis der Rezidiventwicklung mit der Deletion des in der Ersterkrankung noch amplifizierten Subtelomerbereichs von 18p ist der Nachweis der getrennt vorliegenden Amplifikationen eine wichtige Beobachtung. So kann der Verlust ein-



**Abbildung 19: Derivatives Chromosom der(12) mit getrennten Amplifikationen und der(18) ohne KRAS-Beteiligung- schematischer Aufbau und repräsentative Abbildungen**

FISH: der(18) (oben) und der(12) (unten) (von links nach rechts: Bandenfärbung; je einzeln **RP11-708G18**, **CTD-3113P16** und **RP11-769O8\***, Overlay aller 3 Sonden)

\***Spectrum aqua**: in den Aufnahmen zur besseren Erkennbarkeit als weißes Signal aufgenommen

## Ergebnisse

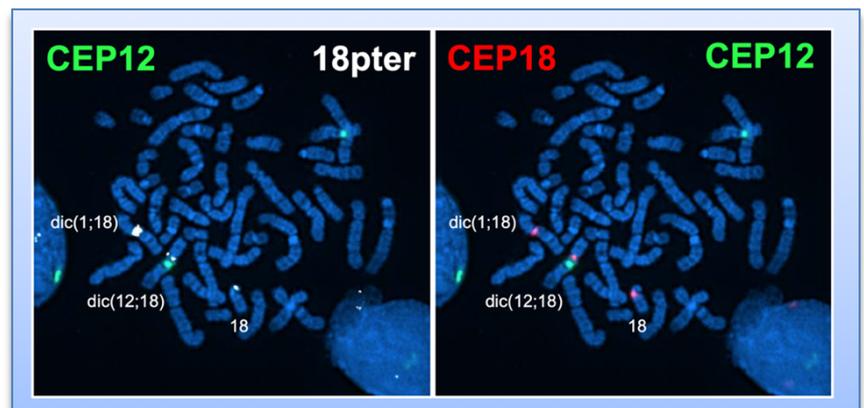
zelter Bereiche, die zunächst nur in Kolokalisation der amplifizierten Abschnitte gesehen wurde, besser nachvollzogen werden.

Für die Beschreibung dieser komplexen Karyotypen sind die Empfehlungen des ISCN nicht ausreichend und mussten variiert bzw. ergänzt werden. Im tumorgenetischen Befund der Ersterkrankung des Instituts für Medizinische Genetik und Humangenetik der Charité wurde er basierend auf den Analyseergebnissen der hier vorliegenden Arbeit, auch unter Berücksichtigung der aCGH-Analyse, wie folgt beschrieben:

46,XX,der(12)(18pter→ 18p11.32 and 19pter→19p13.3 and 12p12.1→12p11.21::12p11.1→12qter), der(18)(19pter→19p13.3 and 12p1? 2.1→12p11? ::18p1?32→18p11.32::18p11.1→18qter),der(19)(12pter→12p13.31::19p13.3→19qter)  
ish der(12)(ETV6-,WCP18+,(RP11 -769O8,5'TCF3,subtel.19,KRAS)coamp\*\*),  
ish der(18)(WCP12+,WCP18+)(5'TCF3,KRAS)coamp),  
ish der(19)(subtel 19p-,3'TCF3+,WCP12+,subtel.12p+)/  
45,XX,dic(12;18)(18qter→p1?1:: 19pter→p13.3 and 12p12.1→11.23::12p11.21→12qter)  
ish dic(12;18)(WCP12+,WCP18+,(5'TCF3,KRAS)coamp  
ish der(19)(subtel 19p-,3'TCF3+,WCP12+,subtel. 12p+)/  
46,XX,der(1)t(1;?)(p1?1;?),+der(?)(1;?)(q11;?),der(12)(18? →18?::12p1? →12q),  
der(19)(12pter→p13.31::19p13.3→qter)\*\*  
ish der(1)(subtel.19+),der(12)(subtel19)amp,  
der(19)(subtel.19p-,subtel.12p+)/

46,XX

In diesem Befund wird auch ein Subklon aufgeführt, welcher zusätzlich ein derivatives Chromosom 1 beschreibt. In den Analysen konnte dieses als weiteres dizentrisches Chromosom dic(1;18) zusätzlich zum vorbeschriebenen dic(12;18) klassifiziert werden (s. Abbildung 20). In den Rezidiven wurde es nicht mehr nachgewiesen.

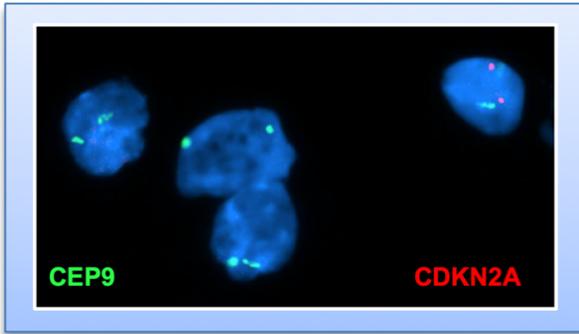


**Abbildung 20: Bildung eines weiteren dizentrischen Chromosoms dic(1;18)**

Links: Metaphase mit dic(12;18) sowie dic(1;18) mit zusätzlichem Material 18pter zwischen den Zentromeren beider dizentrischen Chromosomen, rechts: Aufnahme der gleichen Metaphase mit beiden Zentromerproben. (CEP18 / CEP12 / RP11-769O8\*)

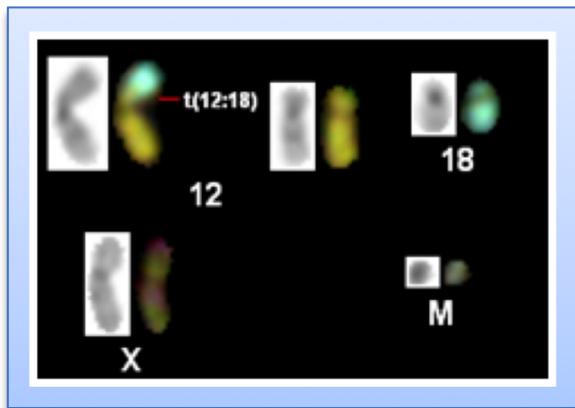
\*Spectrum aqua: in den Aufnahmen zur besseren Erkennbarkeit als weißes Signal aufgenommen

## Ergebnisse



**Abbildung 21: Homozygote Deletion des CDKN2A-Lokus**

Ausstrichpräparat der Ersterkrankung (Vysis CDKN2A / CEP 9 FISH Probe Kit), links Zellen mit homozygoter Deletion, rechte Zelle ohne Deletion



**Abbildung 22: Potenzielle Vorläuferzelle**

SKY: Teil einer Metaphase mit t(12;18), Monosomie 18, Monosomie X sowie Markerchromosom

Eine weitere Hybridisierung erfolgte zur Verifizierung der im aCGH-Profil sichtbaren Deletion im Bereich des Tumorsuppressorgens *CDKN2A* (p16) auf Chromosom 9. Zur Bestimmung der Kopienzahl wurde die *CDKN2A/CEP9*-Sonde auf Interphasekernen hybridisiert. Eine homozygote Deletion des *CDKN2A* Lokus wurde in 47% von 100 der gezählten Zellkerne beobachtet (s. Abbildung 21), keine Zelle zeigte in dieser Analyse eine heterozygote Deletion.

Für die Ersterkrankung ergaben sich durch die zusätzliche SKY-Diagnostik keine neuen, durch konventionelle FISH-Analysen unerkannt gebliebenen Aberrationen. Jedoch sahen wir eine Zelle mit zusätzlichen Aberrationen, die gemeinsame Merkmale mit dem Erstrezidiv besitzt (s. Abbildung 22): Sie wies eine Monosomie 18 sowie eine Monosomie X auf, die in keiner anderen Zelle der MPAL

nachweisbar war. Außerdem besaß diese Metaphase ebenso wie alle Zellen des Erstrezidivs ein weiteres nicht zuordenbares Markerchromosom. Aufgrund dieser eindeutigen Merkmale kann sie retrospektiv als potenzielle Vorläuferzelle der Rezidivkrankung betrachtet werden, auch wenn sie für die Ersterkrankung als Einzelzelle nicht als eigenständiger Klon gewertet werden kann.

### 7.1.2 Erstrezidiv

Die für die im vorigen Abschnitt beschriebenen Veränderungen der Einzelzellen der MPAL können bereits im Karyogramm des Erstrezidivs deutlich wiedererkannt werden (s. Abbildung 23): Alle Zellen weisen hier neben der Translokation t(12;19) eine Monosomie X, eine Monosomie 18 sowie ein Markerchromosom auf. Weiterhin weisen alle aberranten Metaphasen unterschiedlich lange derivative Chromosomen 12 auf, es lassen sich jedoch keine dizentrischen Chromosomen mehr nachweisen. Die in der Ersterkrankung beobachteten komplexen Umbauten unter Beteiligung der Chromosomenabschnitte von 12, 18 und 19 erscheinen im Erstrezidiv mit nur 2 Subklonen deutlich einheitlicher, was sich durch FISH-Analysen in der Folge genauer darstellen ließ.

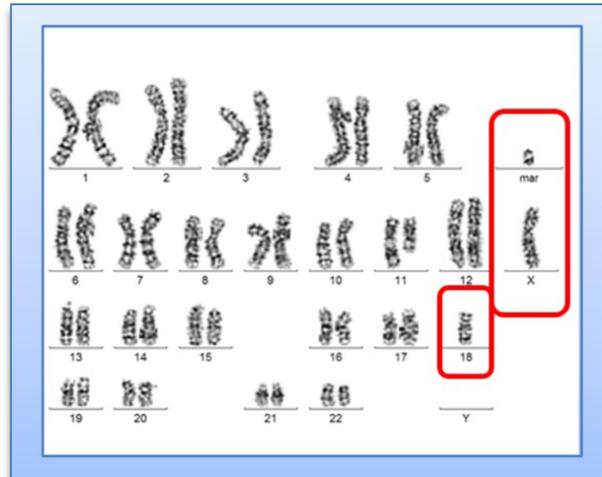


Abbildung 23: Karyogramm des Erstrezidivs

Rot markiert sind das Markerchromosom sowie die Monosomie X und 18

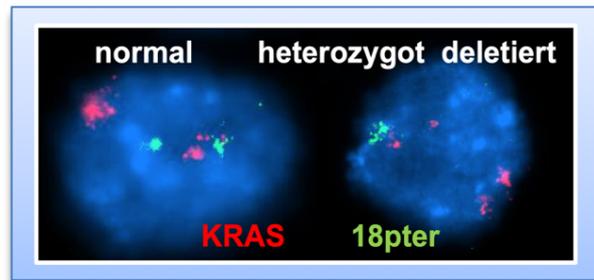


Abbildung 24: Heterozygote Deletion des Subtelomerbereichs 18p im Erstrezidiv

(Interphase-FISH) (RP11-707G18 / RP11-769O8)

Unterstützt durch die Informationen aus der aCGH konnte verifiziert werden, dass der vormals amplifizierte Subtelomerbereich von 18p nun heterozygot deletiert ist (s. Abbildung 24). Koamplifiziert sind jedoch weiterhin gemeinsam die Bereiche der Chromosomen 12 und 19 auf dem derivativen Chromosom 12. Dort werden diese amplifizierten Abschnitte von translozierten Abschnitten des 18q-Arms in mehrfacher Kopienzahl unterbrochen. Wie in Abbildung 25 zu sehen, sind die 18q-Abschnitte dabei invertiert eingebaut. Dabei unterscheiden sich die beiden Subklone nur durch die Duplikation der Amplifikationsanordnung auf dem 12p-Arm. Weiterhin besteht die Translokation t(12;19) mit wahrscheinlicher *TCF3-ZNF384*-Fusion in allen Zellen.

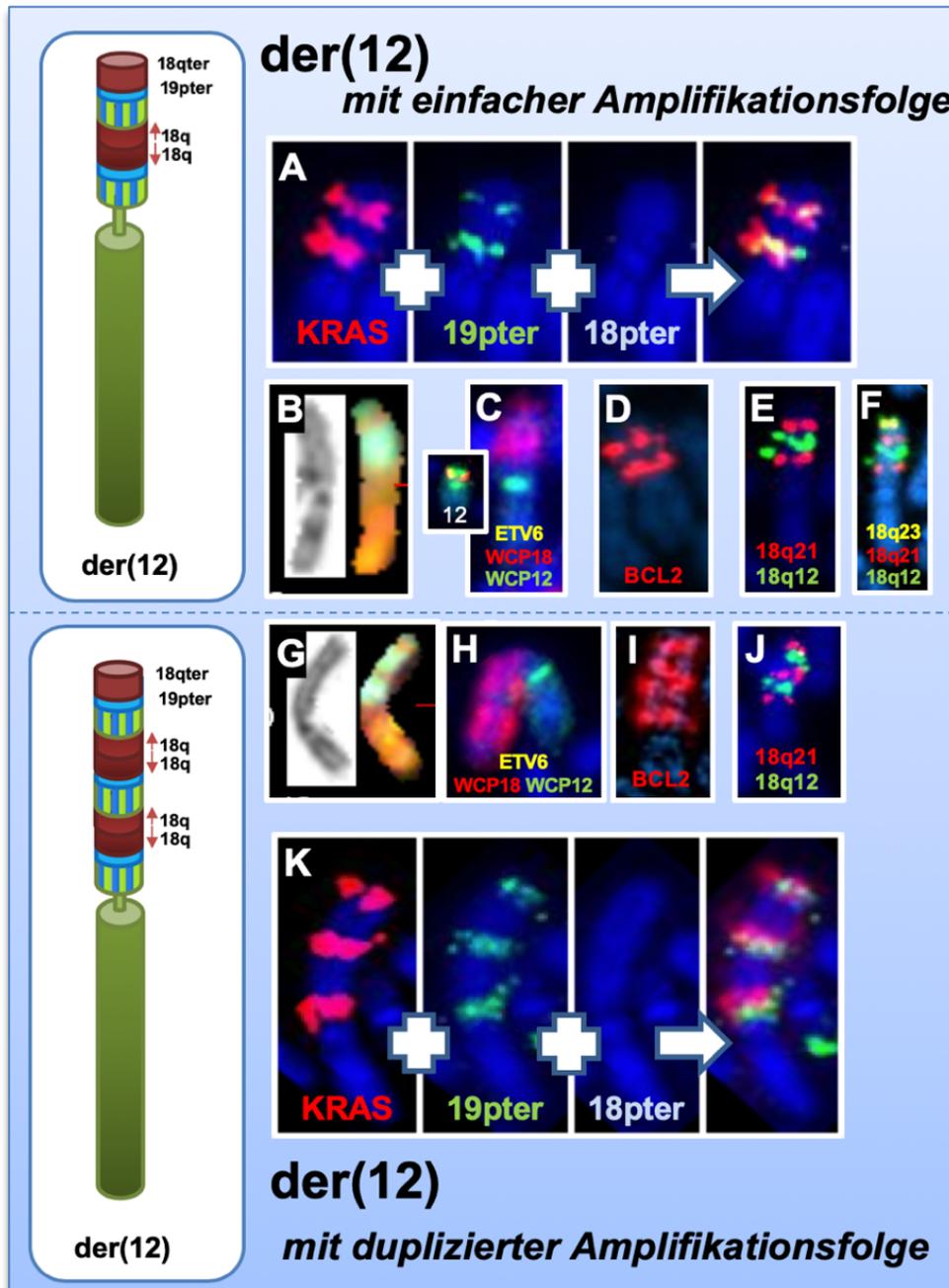
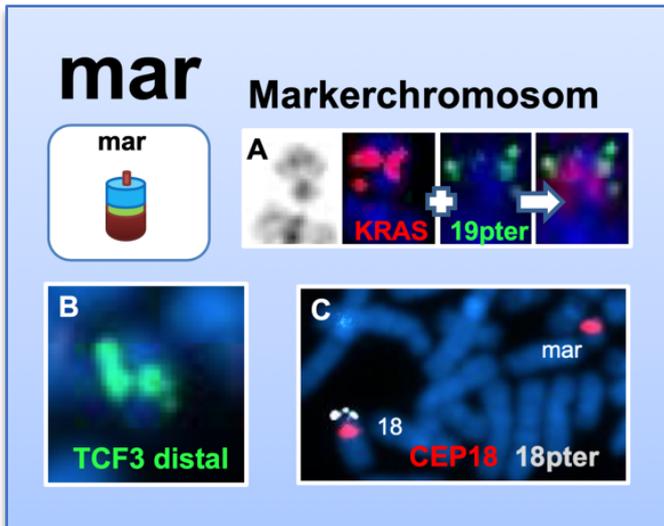


Abbildung 25: der(12) im Rezidiv - schematischer Aufbau und repräsentative Abbildungen

[A] FISH: der(12) im Subklon 1 mit Koamplifikation von KRAS und 19pter bei Deletion von 18pter (von links nach rechts: Bandenfärbung; je einzeln RP11-708G18, CTD-3113P16 und RP11-769O8\*, Overlay aller 3 Sonden), [B] SKY: der(12) aus Subklon 1 mit einfacher Duplikation, [C] FISH: der (12) aus Subklon 1 mit ETV6-Deletion (groß, im Vergleich normales Chr. 12) (XCP18 / XCP12 / ETV6), [D] FISH: BCL2-Amplifikation auf der(12) aus Subklon 1 (IGH/ BCL2 Dual Color Probe - nur BCL2 dargestellt), [E] FISH: der(12) aus Subklon 1 mit Duplikation und Inversion von 18q-Abschnitt (RP11-28F1, RP11-463D17), [F] FISH: der(12) Subklon 1 mit Duplikation und Inversion von 18q-Abschnitt und endständigem 18qter (RP11-28F1, RP11-463D17, RP11-118I2), [G] SKY: der(12) aus Subklon 2 mit doppelter Duplikation, [H] FISH: der (12) aus Subklon 2 mit ETV6-Deletion (XCP18 / XCP12 / ETV6), [I] FISH: BCL2-Amplifikation auf der(12) aus Subklon 2 (IGH/ BCL2 Dual Color Probe - nur BCL2 dargestellt), [J] FISH: der(12) aus Subklon 2 mit doppelter Duplikation und Inversion von 18q-Abschnitt (RP11-28F1, RP11-463D17), [K] FISH: der(12) im Subklon 2 mit Koamplifikation von KRAS und 19pter bei Deletion von 18pter (von links nach rechts: Bandenfärbung; je einzeln RP11-708G18, CTD-3113P16 und RP11-769O8\*, Overlay aller 3 Sonden)



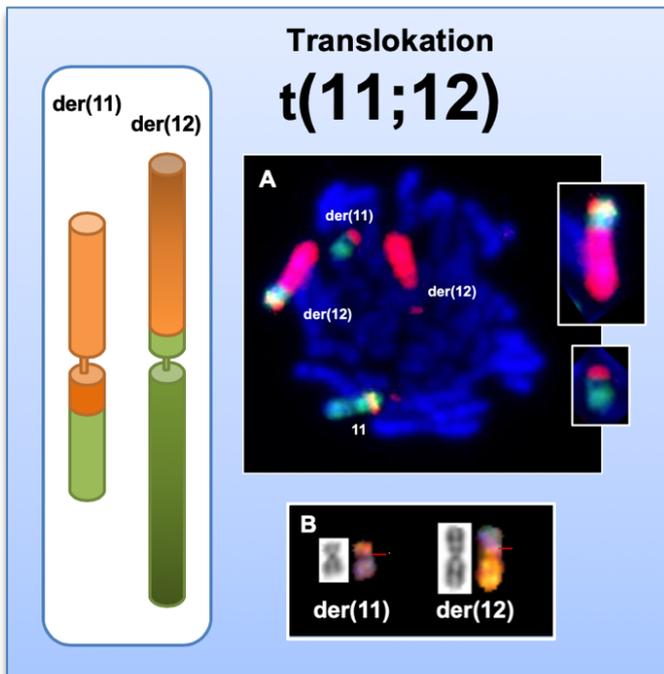
**Abbildung 26: Markerchromosom - schematischer Aufbau und repräsentative Abbildungen**

[A] FISH: mar mit KRAS und 19pter (von links nach rechts: Bandenfärbung; je einzeln **RP11-708G18**, **CTD-3113P16**, Overlay beider Sonden), [B] FISH: mar mit distaler TCF3-Break-Apart Sonde DAKO (**distales TCF3** / **proximales TCF3**), [C] FISH: mar mit Zentromer 18 (links im Bild normales Chr. 18) (**CEP18** / **RP11-769O8\***)

\***Spectrum aqua**: in den Aufnahmen zur besseren Erkennbarkeit als weißes Signal aufgenommen

Der Ursprung des Markerchromosoms (s. Abbildung 26) von Chromosom 18 konnte in den Analysen nachgewiesen werden. Es enthält neben dem Zentromer 18 auch Anteile der 19p-Amplifikation sowie *KRAS*, möglicherweise liegt es auch als Ringchromosom vor.

Neu aufgetreten ist auch eine balancierte Translokation  $t(11;12)$  zwischen den beiden q-Armen (s. Abbildung 27). Eine zunächst vermutete *MLL*-Rekombination konnte durch entsprechende Hybridisierungen ausgeschlossen werden, der Bruchpunkt muss in der Nähe des vollständig mittranslozierten *CCND1*-Gens liegen.



**Abbildung 27: Translokation  $t(11;12)$  – schematischer Aufbau und repräsentative Abbildungen**

[A] FISH: Translokation  $t(11;12)$  mit kompletter *MLL*-Translokation (groß: Metaphase, rechts oben: der(12), rechts unten: der(11) (**XCP12** / **XCP11** / **MLL**)), [B] SKY: der(11) und der(12)

Der Nachweis einer weiteren Translokation gelang nur in den SKY-Analysen: Hier konnte gezeigt werden, dass zusätzlich zu den oben genannten Aberrationen noch eine bisher nicht gezeigte balancierte Translokation  $t(5;6)$  in allen aberranten Zellen vorliegt. (s. Abbildung 28).

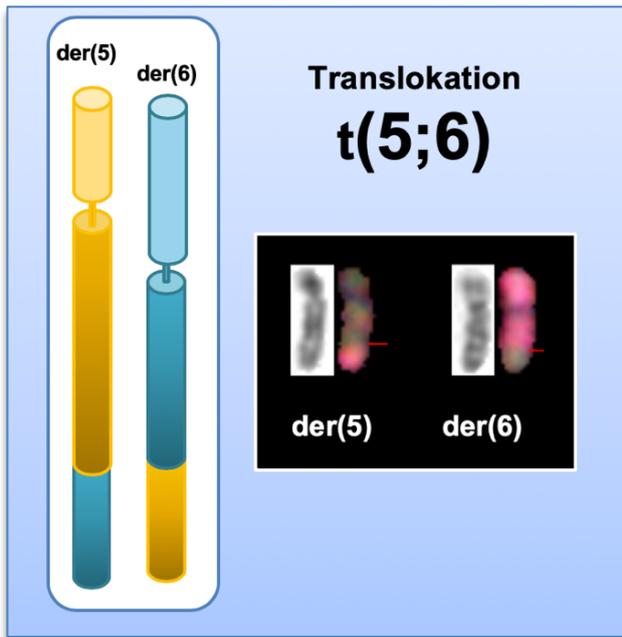


Abbildung 28: SKY-Analyse: Translokation t(5;6) der(5) und der(6) - schematischer Aufbau und repräsentative Abbildung

Die Färbungen der Patientenproben von Erst- und Zweitrezidiv wurden wegen mangelndem Patientenmaterial an konservierten Ausstrichen durchgeführt. Aufgrund von Überlagerungen konnten hier deutlich weniger Zellen ausgewertet werden.

Des Weiteren zeigten die Metaphase-FISH-Analysen des *CDKN2A*-Lokus eine fortbestehende homozygote Deletion in 8 von 15 Metaphasen.

### 7.1.3 Zytogenetische Veränderungen im Krankheitsverlauf

Zur Untersuchung der Entwicklung der Leukämiezellen in den verschiedenen Krankheitsstadien erfolgten weitere Untersuchungen. So wurden die obigen Ergebnisse durch die SKY-Analysen des Zweitrezidivs ergänzt. Des Weiteren wurde der Vergleich zu den Ergebnissen der SKY-Analytik der Zellen aus dem Engraftment angestellt.

#### 7.1.3.1 Vergleich primäre Patientenproben mit Zellen aus Engraftment

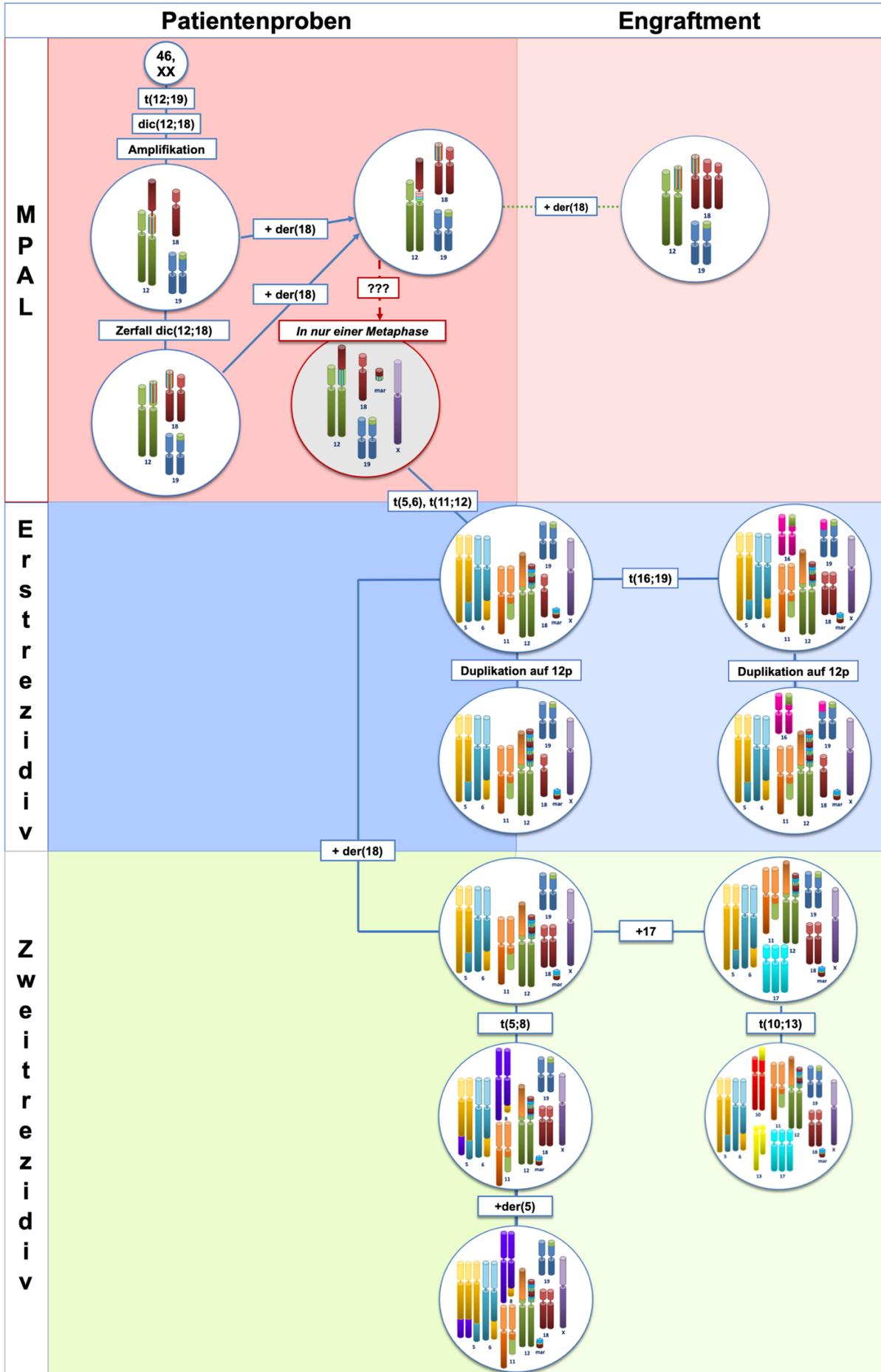
In Abbildung 29 werden die oben aufgeführten Ergebnisse der zytogenetischen Diagnostik der MPAL und des Erstrezidivs durch die weitere SKY-Analytik ergänzt und schematisch dargestellt. Hierfür wurden Zellen mit identischen Veränderungen idealisiert zu einem Klon zusammengefasst, nicht berücksichtigt wurden hierbei Aberrationen, die sich lediglich in einer Zelle ohne relevante Bedeutung für davon abstammende Klone nachweisen ließen. Die Anordnung in der Graphik zeigt die verschiedenen Erkrankungsstadien im Vergleich zu den Originalzellen und zu den aus dem Engraftment gewonnenen Zellen sowie deren jeweilige hypothetische Entwicklung im Erstrezidiv und nach SZT. Ein Teil der Klone ließ sich dabei sowohl in den Proben der Patientin wie im Engraftment-Material nachweisen. Die Einordnung der Zellen mit den jeweiligen Aberrationen in den Stammbaum zeigt hierbei lediglich eine hypothetische Möglichkeit der Klonentwicklung, eine Diskussion der zugrunde liegenden Mechanismen erfolgt in Abschnitt 8.3.4.

## Ergebnisse

Hierbei zeigt sich eine hohe Übereinstimmung auf Ebene der jeweiligen Erkrankungsstadien für Patienten- und Engraftment-Proben. Zumeist zeigen die Engraftment-Proben lediglich eine weitere zusätzliche Veränderung. Während sich im Engraftment der Ersterkrankung nur ein Klon und damit ein deutlich homogeneres Bild darstellt, zeigen die weiteren Erkrankungsstadien im Engraftment eine höhere Heterogenität gegenüber den Patientenproben. Die Diversität ist im Zweitrezidiv deutlich höher als in den vorherigen Erkrankungsstadien mit zusätzlichen Chromosomen 17, der(5) und der(18) sowie den Translokationen t(5;8) und t(10;13). Die zuvor beschriebene äquivalente Entwicklung von Rezidiv und Engraftment der Ersterkrankung<sup>65</sup> konnte nicht bestätigt werden.

**Abbildung 29: Zytogenetik – hypothetische Entwicklung und Verwandtschaftsverhältnisse der Klone in den verschiedenen Erkrankungsstadien und in den Engraftment-Zellen (s. Seite 68)**

Linke Spalte: Patientenproben, rechte Spalte: Engraftment. rot: MPAL, blau: Erstrezidiv, grün: Zweitrezidiv. Mittig dargestellte Klone wurden sowohl in Patientenproben wie im Engraftment nachgewiesen



## Ergebnisse

### 7.1.3.2 Automatisierte Interphase-FISH-Analyse

Die Interphase-FISH Analysen wurden zeitgleich zu den obigen Analysen durch Dr. Dr. T. Heiden (AG Seeger) durchgeführt und sind nicht Bestandteil der vorliegenden Dissertation. Da die Ergebnisse jedoch zum Verständnis und Interpretation der obigen Analysen beitragen, werden hier in Tabelle 31 nur die für die Arbeit relevanten Ergebnisse kurz aufgeführt:

**Tabelle 31: Ergebnisse der automatisierten Interphase-FISH Analyse vor und nach Sorafenib-Behandlung**

Anteil von Zellen mit Signalverlusten/-gewinnen (%) in Ersterkrankung und Erstrezidiv vor und nach Sorafenib-Behandlung (Untersuchungsergebnisse von Dr. Dr. T. Heiden (AG Seeger))

Die Analyse zeigt jeweils für die gesamte Zellpopulation die Prozentwerte leukämischer Zellen mit (kombinierten) Gewinnen und/oder Verlusten von Allelen über dem Cut-off von 10% (fett gedruckt). Werte unter dem Cutoff werden nur als '-' gezeigt. n.d.: nicht durchgeführt

Anzahl von Zellkernen mit		MPAL (Ausstrich)	REZ (Ausstrich)	REZ_SFB (Auftropfpräparat)
<b>GESAMT</b>		379	354	558
<b>KRAS</b>	>2	62,0*	40,9*	21,0
	<2	-	-	-
<b>19pter</b>	>2	62,3	15,5	n. d.
	<2	-	25,1	n. d.
<b>18pter</b>	>2	62,0	-	-
	<2	-	42,9	24,3
<b>KRAS&gt;2 + 19p&gt;2</b>		60,4	10,2	
<b>KRAS&gt;2 + 18p&gt;2</b>		60,9	-	-
<b>19p&gt;2 + 18p&gt;2</b>		59,9	-	n. d.
<b>KRAS&gt;2 + 18p&gt;2 + 19p&gt;2</b>		59,9	-	n. d.
<b>KRAS&gt;2 + 19p&lt;2</b>		-	18,6	n. d.
<b>KRAS&gt;2 + 18p&lt;2</b>		-	35,6	18,0
<b>19p&lt;2 + 18p&lt;2</b>		-	17,2	n. d.
<b>19p&gt;2 + 18p&lt;2</b>		-	-	n. d.
<b>KRAS&gt;2 + 19p&lt;2 + 18p&lt;2</b>		-	16,7	n. d.
<b>GESAMT</b>				251
<b>BCL2</b>	>2	n. d.	n. d.	24,3
	<2	n. d.	n. d.	-
<b>GESAMT</b>				305
<b>CDKN2A</b>	>2	n. d.	n. d.	-
	<2	n. d.	n. d.	17,3 heterozygot 10,4 homozygot

In der Ersterkrankung zeigen sich für die drei genomischen Regionen von *KRAS*, 19pter und 18pter ausschließlich Gewinne sowohl separat als auch kombiniert in ca. 60% der Zellen. Die Koamplifikation der drei genomischen Regionen tritt also offenbar in allen

veränderten Zellen auf. Das Erstrezidiv zeigt ausschließlich Gewinne für *KRAS*, ausschließlich Verluste für 18pter sowie Gewinne und Verluste für 19pter; insgesamt liegen heterogene Zellpopulationen mit unterschiedlichen Kombinationen von Gewinnen und Verlusten vor.

Im Erstrezidiv zeigt sich keine Selektion von Zellen mit erhöhter *KRAS*-Gendosis (Daten nicht gezeigt). Nach Sorafenib-Behandlung tritt keine auffällige Verringerung des Anteils von Zellen mit *KRAS*-Amplifikation auf. Hierbei sind aufgrund der unterschiedlichen Präparationen (Auftropfpräparat, Ausstrich) die absoluten Werte nicht vergleichbar. Im Rezidiv nach Sorafenib-Behandlung bestätigten sich der Gewinn von *BCL2* und der *CDKN2A* (*p16*)-Verlust. Hier zeigte sich jedoch, dass das Rezidiv nur zum Teil eine homozygote *CDKN2A* (*p16*)-Deletion, jedoch auch in relevantem Maße eine heterozygote Deletion des Lokus aufweist und damit von den Ergebnissen der manuellen FISH abweicht. Das Erstrezidiv zeigt ausschließlich Gewinne für *KRAS*, ausschließlich Verluste für 18pter sowie Gewinne und Verluste für 19pter; insgesamt liegen heterogene Zellpopulationen mit unterschiedlichen Kombinationen von Gewinnen und Verlusten vor.

## 7.2 Bruchpunkte und Fusionsgene

### 7.2.1 Bruchpunktanalyse

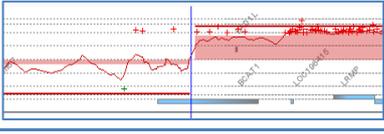
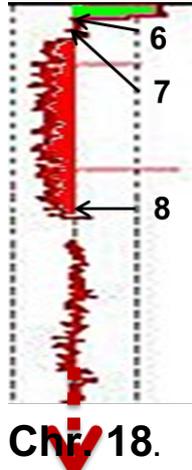
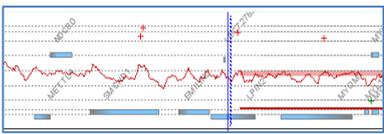
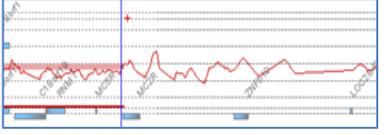
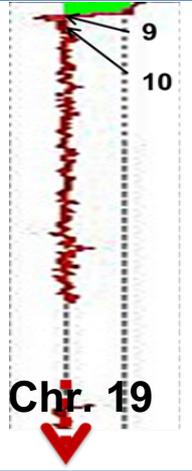
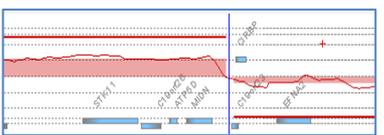
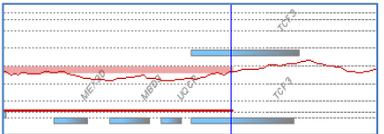
#### 7.2.1.1 Vergleich aCGH-Profil von Ersterkrankung und Erstrezidiv

Die aCGH-Analysen des Erstrezidivs im Vergleich mit den bereits vorliegenden Daten der Ersterkrankung offenbarten neu hinzugewonnene Aberrationen. Abbildung 30 zeigt beispielhaft vier Profilausschnitte von Ersterkrankung und Rezidiv im Vergleich. Auf den ersten Blick ist neben der nicht dargestellten Monosomie X das Chromosom 18 auffällig: ein großer Teil des q-Arms liegt nun in mehrfacher Kopienzahl bei zeitgleicher Deletion des zentromernahen Abschnittes vor. Auch sichtbar ist der monoallelische Verlust des vormals amplifizierten 18p-Subtelomerbereiches. Diese Erkenntnis gab wichtige Hinweise für die Identifikation der im Rezidiv neu aufgetretenen Koamplifikationen (s. Abschnitt 7.1.2). Kleinere Abweichungen ergaben sich für die amplifizierten Bereiche auf 12p, hier zeigten sich lediglich Kopienzahländerungen in den Randbereichen der Amplifikationen. Die Grenzen der aCGH-Analytik zeigten sich am Beispiel des Profils von Chromosom 9: So würde man nur anhand dieser Ergebnisse im Rezidiv eine homozygote Deletion eines in der Ersterkrankung heterozygot deletierten Tumorsuppressors *CDKN2A* vermuten (s. Abbildung 30 C).

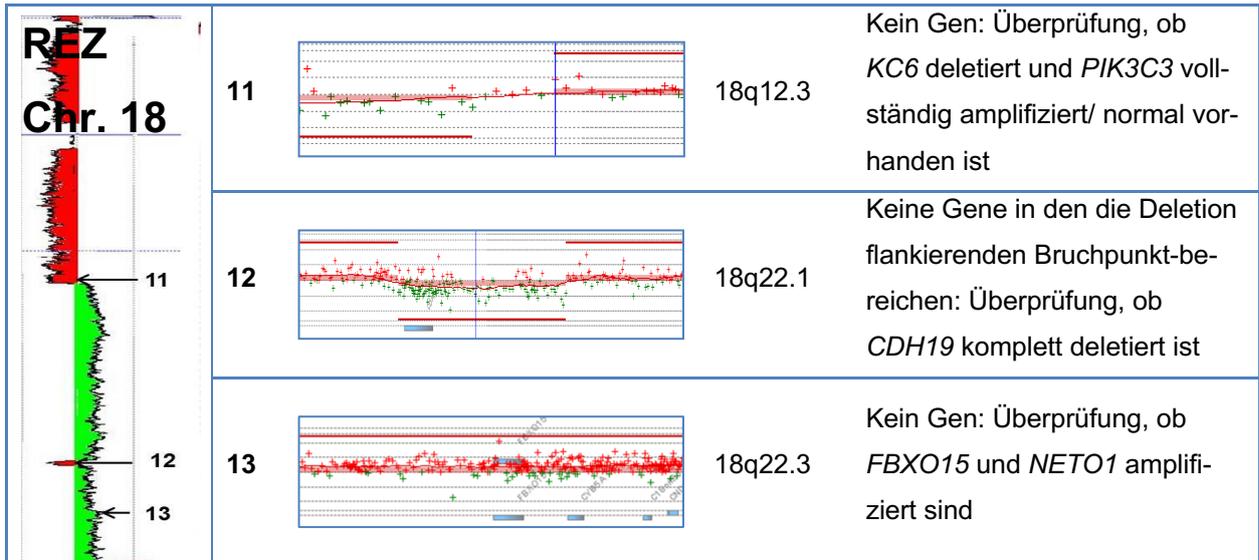


## Ergebnisse

**Tabelle 32: Darstellung der chromosomalen Bruchpunkte (BP) der Chromosomen 12, 18 und 19 im aCGH-Profil und Zuordnung der im Bruchpunktbereich liegenden Gene - Ersterkrankung und erstes Rezidiv**

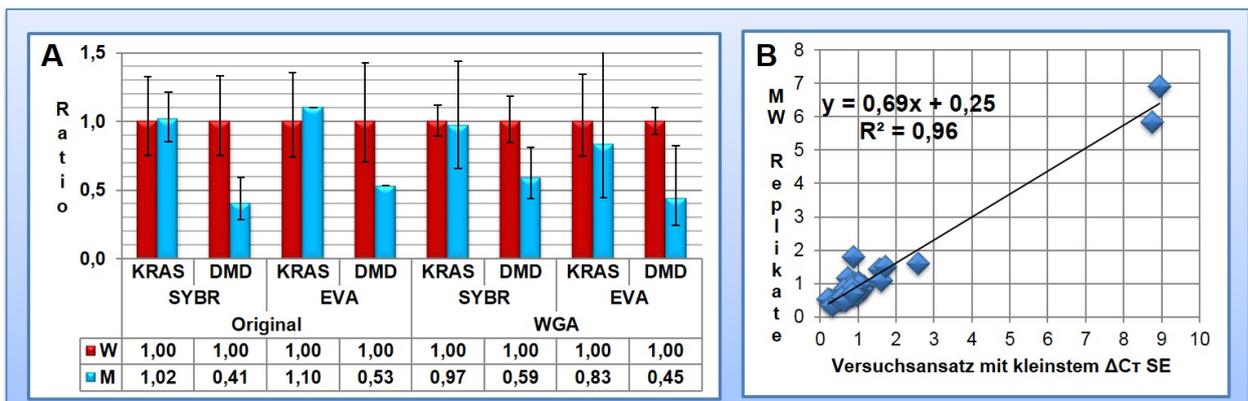
aCGH-Profil Chromosom	BP #	aCGH-Profil Ausschnitt	Chr.	Bruchpunkt nach aCGH /Zielsetzung Sequenzierung
 <p>Chr. 12</p>	1		12p13.31	Langsamer Übergang: BP im Bereich von: <i>ING4</i> , <i>ZNF384</i> , <i>c12orf53</i> , <i>COP57A</i>
	2		12p12.1	Bruchpunkt in <i>BCAT1</i> : Intron 5-6 (ENST00000261192)
	3		12p11.2	Bruchpunkt in <i>ITPR2</i> : Intron 41-42 (ENST00000381340)
	4		12p11.21	Kein Gen: Überprüfung, ob <i>DDX11</i> vollständig deletiert ist
	5		12p11.1	Kein Gen: Überprüfung, ob <i>SYT10</i> vollständig amplifiziert ist
 <p>Chr. 18.</p>	6		18p11.32	Kein Gen: Überprüfung, ob <i>ADCYAP1</i> vollständig amplifiziert ist
	7		18p11.32	Langsamer Übergang: BP im Bereich von: <i>METTL4</i> , <i>SMCHD1</i> , <i>EMILIN2</i> , <i>LPIN2</i>
	8		18p11.21	Kein Gen: Überprüfung, ob <i>MC2R</i> und <i>ZNF519</i> vollständig deletiert ist
 <p>Chr. 19</p>	9		19p13.3	Kein Gen: Überprüfung, ob <i>MIDN</i> komplett amplifiziert und <i>c19orf24</i> komplett deletiert
	10		19p13.3	Langsamer Übergang: Bruchpunkt in <i>TCF3</i>

## Ergebnisse



### 7.2.1.3 Einsatz von WGA-Produkt bei der qPCR

Zur Überprüfung der Verwendbarkeit des WGA-Produktes als Template in der qPCR wurde zunächst ein Test mit Kontrollproben durchgeführt. Es wurden jeweils männliche und weibliche Kontroll-DNA und deren WGA-Produkt (GenomiPhi) mit Primern in *KRAS* und *DMD* getestet, zum Vergleich wurden beide für die Analysen genutzten qPCR-Kits (Power SYBRGreen von Applied Biosystems, EVAGreen von Solis Biodyne) genutzt. Die Ergebnisse werden in Abbildung 31 A dargestellt. Im Idealfall sollten die Ratios für *KRAS*=1 und für *DMD*=0,5 beim männlichen Template betragen. Zu erkennen ist die qualitative Gleichwertigkeit der beiden verwendeten Kits. Bei kleinerer Standardabweichung der Versuchsansätze für *DMD* mit Original-DNA wurde in den weiteren qPCR-Analysen von einer höheren quantitativen Aussagekraft für Ratios <1 mit Original-DNA als Template ausgegangen.



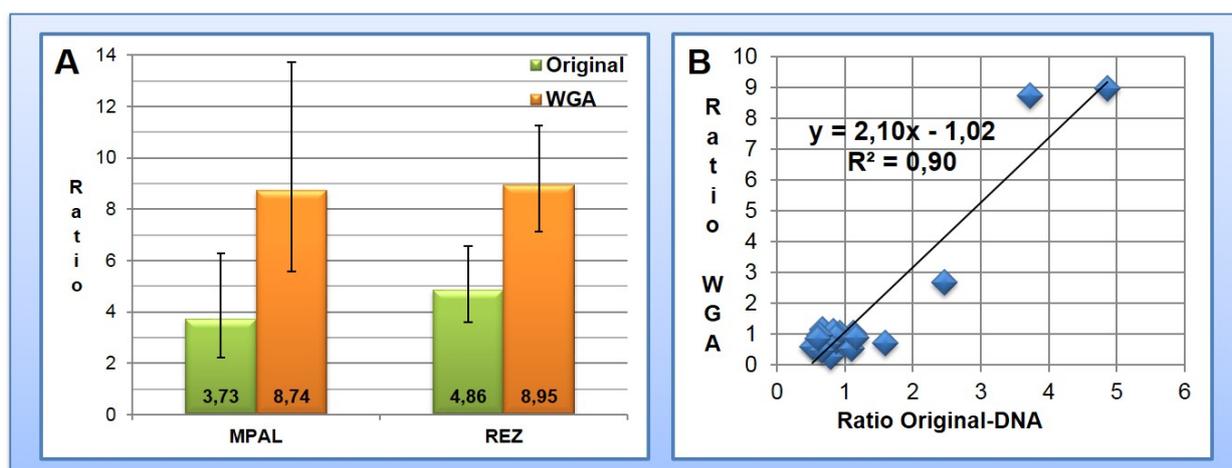
**Abbildung 31:** [A] Vergleich qPCR mit Original-DNA und WGA-Template, [B] Vergleich der Ergebnisse des Versuchsansatzes mit minimaler SE zum Mittelwert aller Replikate

[A] Darstellung der Ratios (Mittelwert und Standardabweichung) des jeweiligen Versuchsansatzes mit kleinster Standardabweichung unter Verwendung beider qPCR-Kits von *KRAS* und *DMD* für weibliche (w, rot) und männliche (m, blau) Kontroll-DNA und deren GenomiPHI-Produkt als Template. *MCPH1* ist Referenzgen, interne Kontrolle ist jeweils die weibliche DNA des jeweiligen Templates. [B] Linearer Zusammenhang der Ratios des Versuchsansatzes mit minimalen SE zum Mittelwert aller Replikate

## Ergebnisse

Um eine möglichst hohe Genauigkeit der Bruchpunktanalysen zu erreichen, wurde zur Auswertung jeweils der Versuchsansatz mit der kleinsten Standardabweichung für  $\Delta CT$  gewählt. Die Versuchsansätze wurden jeweils mit Duplikaten bzw. Triplikaten durchgeführt, die Vergleichbarkeit von Werten für den Versuchsansatz mit minimalem  $\Delta CT$  SE gegenüber den Mittelwerten aller gleichen Versuchsansätze ist in Abbildung 31 B dargestellt. Bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,96 erscheint dieses Vorgehen zu keinen relevanten Fehlern zu führen.

Nach dem Vorliegen der ersten Ergebnisse zur Kopienzahl von *KRAS* fiel auf, dass es Abweichungen zwischen dem Original und dem WGA-Template gab. So ergab der Einsatz des WGA-Template eine deutlich höhere Kopienzahl (s. Abbildung 32 A), dieser Trend zeigte sich auch in den weiteren Analysen. Die Bruchpunkte ließen sich beim Einsatz von WGA-Template aufgrund der größeren Differenz deutlicher darstellen, zu vermuten ist eine Verzerrung der Kopienzahlrelation durch die Amplifikationsmethode.



**Abbildung 32: Vergleich von Original-DNA und WGA-Produkt als Template in der qPCR**

[A] Vergleich Ratio *KRAS* Ersterkrankung (MPAL) und Erstrezidiv (REZ) mit Original-DNA und WGA-Template (GPHI) Referenzgen ist MCPH1, interne Kontrolle Original- bzw. WGA-Template der weiblichen Kontroll-DNA  
[B] Vergleich Ratio von Original-DNA mit WGA-Template Vergleich der Ratios für alle identischen Versuchsansätze mit kleinster Standardabweichung mit Original-DNA und WGA-Produkt als Template

In Abbildung 32 B werden die Ergebnisse von Original-DNA und WGA-Produkt verglichen, der Anstieg der Ausgleichsgerade unterstützt unsere Vermutung. Die Verwendbarkeit des WGA-Produktes für die Bruchpunktbestimmung erscheint bei einem linearen Zusammenhang mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,90 gegeben. Bei jedoch nur begrenzte Probedaten für höhere Kopienzahlen sowie einer unzureichenden Aussagekraft für Ratios  $<1$  lässt sich keine endgültige Aussage treffen. Aufgrund dieser Tatsache und der in Abbildung 31 dargestellten geringeren Standardabweichung für Original-DNA

## Ergebnisse

wurden in der Folge zunächst alle Ansätze mit WGA-Template zur Probeneinsparung durchgeführt und bei nicht eindeutigen Ergebnis mit Original-DNA wiederholt.

### 7.2.1.4 Bruchpunktbestimmung mit qPCR

Mittels qPCR wurde versucht, alle in Tabelle 32 dargestellten Bruchpunkte zu validieren und wenn möglich die Lage genauer einzugrenzen. Abbildung 33 stellt die Ergebnisse für alle Bruchpunkte anhand der mittels  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode gewonnenen Ratios dar. So ließen sich die im aCGH-Profil klaren Übergänge mit Abweichungen >1 Kopienzahl übereinstimmend mittels qPCR validieren, lediglich für *SYT10* ergab sich im Rezidiv ein abweichendes Ergebnis ohne Bestätigung der erwartenden Amplifikation. Hier ist jedoch anzumerken, dass das Amplifikationsniveau im aCGH-Profil des Rezidivs für dieses Gen deutlich geringer ist, als in der Ersterkrankung (s. Abbildung 30 B).

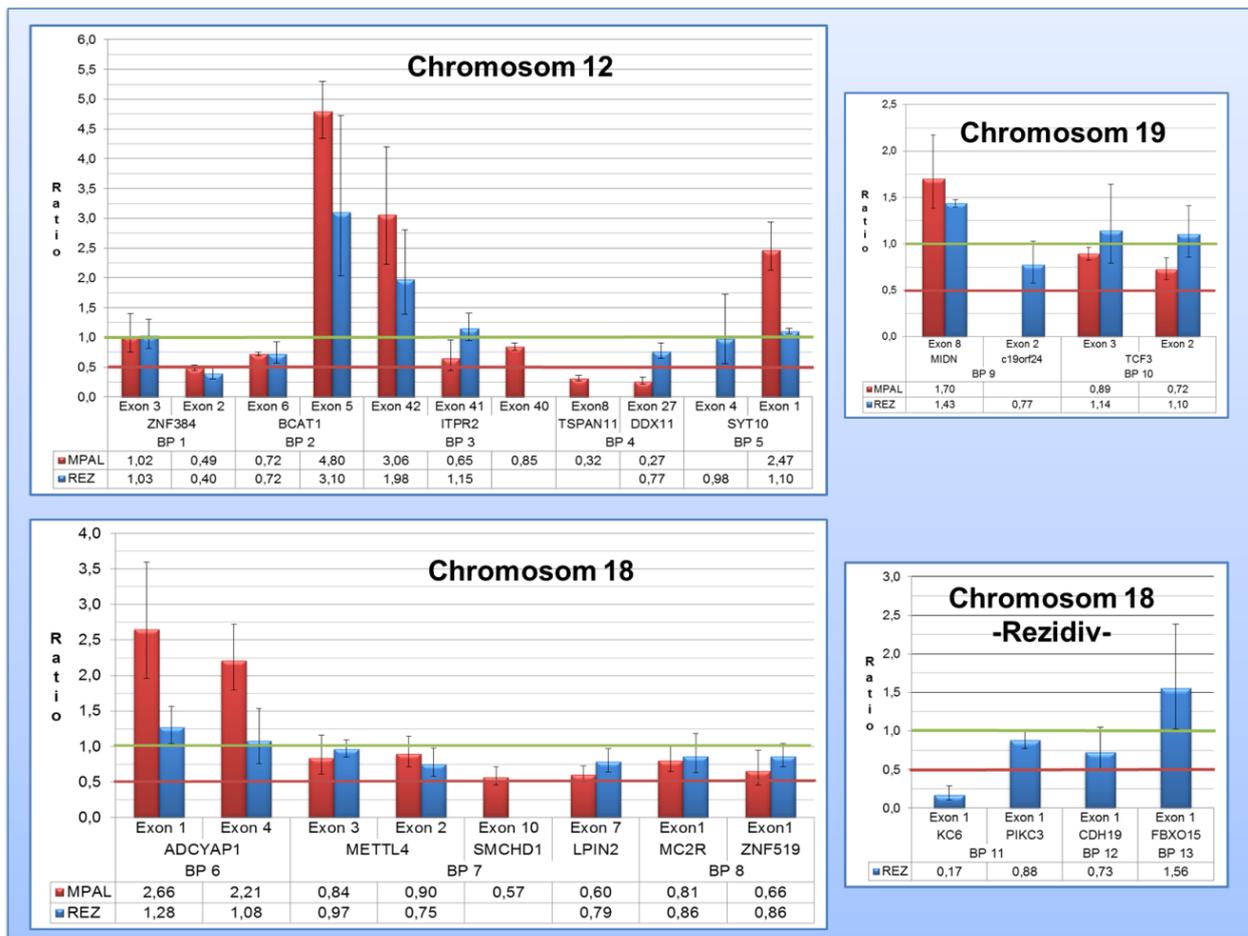


Abbildung 33: Ergebnisse der Bruchpunktbestimmung mittels qPCR

Ratios Probe / Kontroll-DNA für die Bruchpunkt-begrenzenden Gene

Für die diskreter verlaufenden Übergänge mit Abweichungen von max. einer Kopienzahl ergaben sich in den qPCR-Analysen Schwierigkeiten. So ergaben die Analysen in den

## Ergebnisse

meisten Fällen Werte, die mit ihrer Standardabweichung sowohl einer normalen Kopienzahl wie auch einer Deletion zugeordnet werden könnten. Für den Bruchpunkt in *ZNF384* konnte damit der Bruchpunkt etwas exakter als im aCGH-Profil möglich bestimmt werden, der genaue Bruchpunkt im Intron ließ sich jedoch nicht bestimmen. Für den Bruchpunkt in *TCF3* und weiteren Genen (s. Tabelle 33) konnte mittels qPCR keine genauere Bestimmung erfolgen.

Zusätzlich problematisch war der Mangel an geeigneten Primerpaaren für die vorderen *TCF3*-Exons, trotz mehrfachem Design und Methodenoptimierung (s. Abschnitt 6.5.7) konnten die GC-reichen Sequenzen nur eingeschränkt amplifiziert werden. Tabelle 33 zeigt die Lokalisation der Bruchpunkte nach qPCR sowie deren Übereinstimmung mit den Erwartungen gemäß aCGH-Profil.

**Tabelle 33: Zusammenfassung der Ergebnisse der Bruchpunktbestimmung (BP) mittels qPCR und Übereinstimmung mit dem aCGH-Profil**

BP#	Bruchpunkt nach qPCR	Position (GRCh37)	Übereinstimmung mit aCGH
1	<i>ZNF384</i> Intron 2-3 (ENST00000396801)	12:6.797.332 - 6.788.692	mit qPCR genauere Bestimmung möglich
2	<i>BCAT1</i> Intron 5-6 (ENST00000261192)	12:25.031.463 - 25.002.884	übereinstimmend
3	<i>ITPR2</i> Intron 41-42 (ENST00000381340)	12:26.639.036 - 26.636.832	übereinstimmend
4	<i>DDX11</i> vollständig deletiert	hinter 12:31.257.725	übereinstimmend
5	<i>SYT10</i> in MPAL amplifiziert, im REZ normal	MPAL: hinter / REZ: vor 12:33.527.173	für REZ abweichend
6	<i>ADCYAP1</i> in MPAL vollständig amplifiziert, im REZ normale Kopien- zahl	hinter 18:912.173	übereinstimmend
7	BP nicht genauer bestimmbar: vor <i>SMCHD1</i> Exon 10 (ENST00000320876)	vor 18: 2.697.829	nur geringe Eingrenzung möglich
8	Kopienzahl von <i>MC2R</i> und <i>ZNF519</i> nicht eindeutig bestimmbar	wahrscheinlich bis zum Zentromer deletiert	keine Aussage möglich
9	<i>MIDN</i> komplett amplifiziert, <i>c19orf24</i> deletiert	19:1.259.139 – 1.275.438	übereinstimmend
10	nach Sequenzierung: in <i>TCF3</i> Intron 3-4 (ENST00000262965)	19:1.646.353 - 1.632.405	mit qPCR keine genauere Bestimmung möglich
11	Zwischen <i>KC6</i> und <i>PIK3C3</i>	18:39.100.561 – 39.535.199	übereinstimmend
12	<i>CDH19</i> deletiert	18:64.168.320-64.271.375 komplett deletiert	übereinstimmend
13	<i>FBXO15</i> amplifiziert, <i>NETO1</i> nicht bestimmbar	keine Aussage möglich	keine Aussage möglich

### 7.2.2 *long-distance* PCR

Zum Nachweis des möglichen *TCF3-ZNF384*-Fusionsgens und der Bruchpunktsequenz wurde eine *long-distance* PCR etabliert. Wegen der Unsicherheit über die den Bruchpunkt flankierenden Exons wurden hierfür verschiedene Primerkombinationen verwendet. In der anschließenden Gelelektrophorese konnte kein Produkt der Fusionsgenamplifikation nachgewiesen werden. Für die Kontrollprimerpaare mit Produktlängen zwischen 0,7-5,5 kB (s. Tabelle 27) zeigten sich saubere Produkte unter der Verwendung der Original-DNA (Konzentration 25-50 ng/μl). Beim Kontrollansatz mit (ETV6 E3 L x ETV6 E5 R) mit einer erwarteten Produktlänge von ~ 30 kB waren jedoch nur mehrfache Banden in der Gelelektrophorese sichtbar. Bei Verwendung des WGA-Produkts als Template konnte weder mit den Fusionsgen- noch mit den Kontrollprimern ein Produkt amplifiziert werden. Daher wurde angenommen, dass das WGA-Produkt für den Einsatz in der *long-distance* PCR zumindest mit dem verwendeten Kit nicht geeignet ist.

### 7.2.3 Sequenzierung möglicher Fusionsgentranskripte

#### 7.2.3.1 *TCF3-ZNF384*-Fusion

Da die Amplifikation des Fusionsgens mittels *long-Distance* PCR nicht erfolgreich war, wurde im nächsten Schritt die Amplifikation und anschließende Sequenzierung des Fusionsgentranskriptes auf cDNA-Ebene versucht. Dieses Template hat den Vorteil, dass ein vergleichsweise kurzes PCR-Produkt zu erwarten ist und daher mit konventioneller PCR durchführbar ist. Auch hier wurden verschiedene Primerkombinationen verwendet. In der Gelelektrophorese zeigten sich für einige Ansätze Produkte, die jedoch mangels klarer Banden im Gel unspezifisch erschienen. Daher wurde das gewonnene Produktgemisch einerseits als Template für (*semi*-)nested PCR eingesetzt, andererseits eine direkte Sequenzierung versucht. Tatsächlich bestätigten zwei Chromatogramme der direkten Sequenzierung das Vorliegen von *TCF3-ZNF384*-Fusionstranskripten in den Proben. Es wurden zwei verschiedene Transkriptvarianten nachgewiesen, die sich durch die Beteiligung von *TCF3* Exon 2 bei identischem *ZNF384*-Anteil unterscheiden. Es ist anzunehmen, dass es sich bei den Fusionstranskripten um Splicevarianten handelt, auch wenn dies nicht durch Sequenzierung des Bruchpunktes auf Genomebene belegt werden konnte.

## Ergebnisse

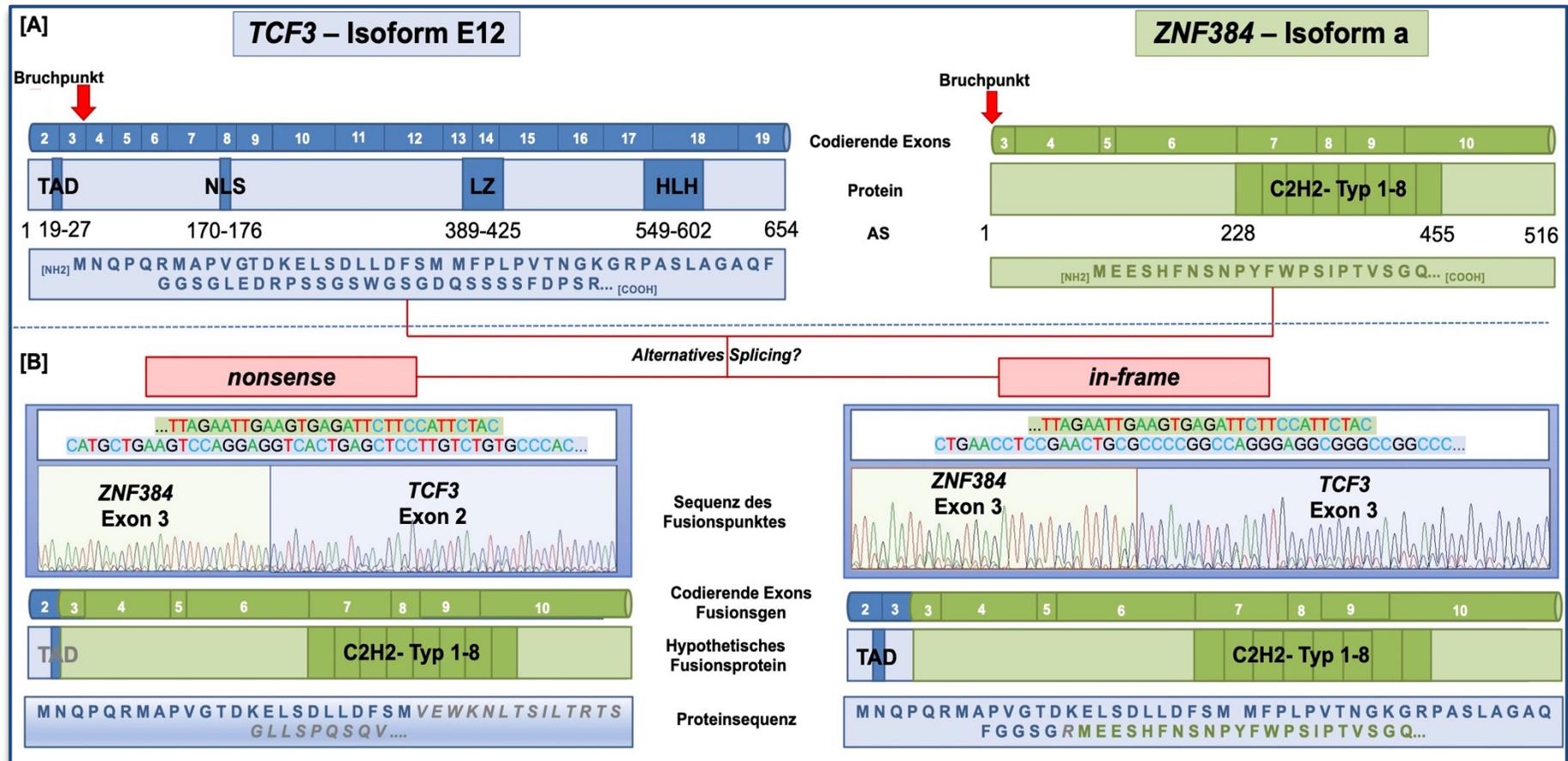


Abbildung 34: TCF3-ZNF384-Fusionsgen

**[A] Wildtypallele von TCF3 Isoform E12 (links) und ZNF384 Isoform a (rechts) oben:** kodierende Exons mit Angabe der gefundenen Bruchpunkte; **mittig:** Proteinaufbau mit Angabe der Aminosäureposition, TAD: *transactivation domain*, NLS – *nuclear localization signal*, LZ – *leucine zipper*, HLH – *helix-loop-helix motif*, C2H2-Typ 1-8: Zindefinger 1-8 (Krueppel C2H2-Typ der Zindefingerfamilie), Abbildungen nach Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>) und UniProt (<http://www.uniprot.org/>, ZNF384-entry: Q8TF68, TCF3-entry: P15923), **unten:** Tabelle der Proteinsequenz

**[B] TCF3-ZNF384-Fusionsgentranskripte, links: nonsense Transkript mit TCF3 Exon2 / ZNF384 Exon 3-Fusion, rechts in-frame Transkript mit TCF3 Exon3 / ZNF384 Exon 3-Fusion oben:** Original-Graphik der Fusionstranskriptsequenzen in der Sanger-Sequenzierung mit Angabe der auslesbaren Sequenz (ausgehend vom ZNF384-Primer); **mittig:** kodierende Exons des Transkripts; **vorletzte Zeile:** Aufbau des hypothetischen Fusionsproteins; **ganz unten:** Beginn der Proteinsequenz (TCF3-Sequenz, ZNF384-Sequenz, nicht dem Wildtyp entsprechende Sequenz)

Abbildung 34 A zeigt eine Übersicht zu den Wildtypen *TCF3* Isoform E12 (Ensembl-Transkriptvariante ENST00000262965) und *ZNF384* Isoform a (ENST00000319770) und den beiden nachgewiesenen Fusionsgentranskriptvarianten. Die Sequenzanalyse ergab, dass es sich bei der in Abbildung 34 B links dargestellten Transkriptvariante mit Beteiligung von *TCF3* Exon 2 um eine *nonsense* Mutation handelt, die zu einer falschen Aminosäuresequenz ab dem Fusionspunkt führt. Die rechts dargestellte Variante ohne *TCF3* Exon 2 ergibt übersetzt eine *in-frame* Mutation mit Möglichkeit zur Bildung eines funktionsfähigen Fusionsproteins. Zwischen *TCF3*- und *ZNF384*-Anteil befindet sich ein zusätzliches Arginin, es kommt jedoch zu keinem *Frameshift*. Die Analyse der Proteindomänen zeigt, dass der erhaltene Teil des *TCF3* die Transaktivierungsdomäne enthält, während *ZNF384* bei Beginn der kodierenden Sequenz im Exon 3 vollständig folgt. In einem potenziellen Fusionsprotein würde der *ZNF384*-Anteil dem regulatorischen Einfluss des (stärkeren) *TCF3*-Promotors unterliegen und die *TCF3*-Transaktivierungsdomäne zu einer aberranten Regulation der Aktivität des Fusionsproteins führen.

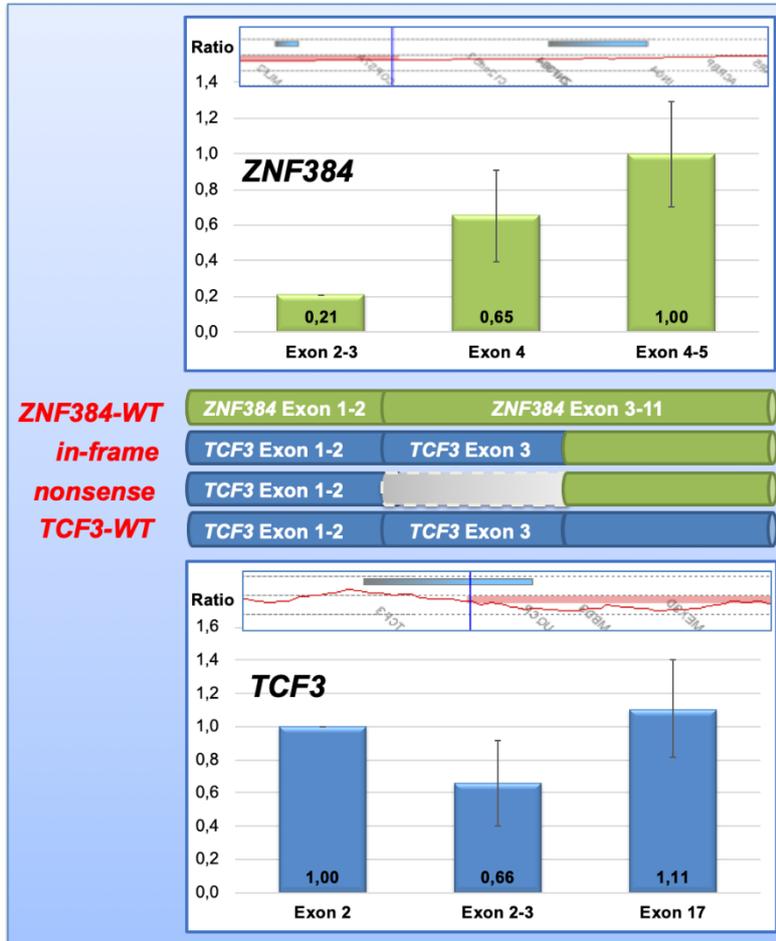
Beide Transkriptvarianten wurden im Amplifikat der Primer „TCF3 Exon 2 No.2“ und „ZNF384 Exon 4“ (s. Tabelle 13) nachgewiesen, die Sequenzierung erfolgte ausgehend vom *ZNF384*-Primer. Die Sequenzierungen der (*semi*-)nested PCR-Produkte zeigten keine auswertbaren Ergebnisse. Die Amplifikation und Sequenzierung des genauen genomischen Bruchpunkts im Intron durch weitere Primerkombinationen gelang nicht. Auch hier wurden die Analysemöglichkeiten durch den Mangel verwendbarer Primer aufgrund von hohem GC-Gehalt bzw. einem Mangel an spezifischen Bindesequenzen stark eingeschränkt.

#### 7.2.3.2 Sequenzierung weiterer möglicher Fusionsgentranskripte

Nach Bestimmung der Bruchpunkte (s. Abschnitt 7.2.1) erfolgten weitere Untersuchungen auf das Vorliegen folgender möglicher Fusionstranskripte: *BCAT1-METTL4*, *ADCYAP1-ITPR2*, *BCAT1-SYT10*, *MIDN-ITPR2*, *BCAT1-ITPR2*. Diese Kombinationen wurden auf cDNA-Ebene mittels PCR und Sequenzierung analysiert, es konnte kein weiteres Fusionsgen nachgewiesen werden.

### 7.2.4 TCF3-ZNF384-Expression

Um einen Anhalt zu gewinnen, ob die nachgewiesenen *TCF3-ZNF384*-Fusionstranskripte auch im relevanten Maß exprimiert werden, wurden für die Ersterkrankung weitere qPCR Analysen auf cDNA-Ebene durchgeführt. Zur Repräsentation der nicht-deletierten Genabschnitte (*TCF3* Exon 1-2, *ZNF384* Exon 3-11) wurde die Expression von *ZNF384*



**Abbildung 35: Expressionsanalyse der *TCF3-ZNF384*-Fusionsgen-transkripte – Darstellung der Ergebnisse aus qPCR**

Relative Genexpression (Für jeden untersuchten Exonbereich: Mittelwerte aller Versuchsansätze zu *TCF3* Exon 2 bzw. *ZNF384* Exon 4-5); oben: Expressionsniveau und aCGH-Profil für *TCF3*; mittig: Aufbau der Wildtyp-Allele und der Transkriptvarianten; unten: Expressionsniveau und aCGH-Profil für *ZNF384*.

Die roten Balken des aCGH-Profiles weisen die Deletion aus, die Exons liegen gematcht zum Profil.

Exon 4 und *TCF3* Exon 2 quantifiziert. Eine direkte Bruchpunkt-übergreifende PCR war aufgrund fehlender Kontrollprobe mit definierter Menge eines *TCF3-ZNF384*-Fusionstranskriptes nicht möglich. Zum Ausschluss einer Verunreinigung mit genomischer DNA trotz vorhergehendem DNase-Verdau wurde zusätzlich exonübergreifend *ZNF384* Exon 4-5 amplifiziert. Primerpaare für *TCF3* Exon 17 und *ZNF384* Exon 2-3 wurden für die Bestimmung der deletierten Exons (*ZNF384* Exon 1-2, *TCF3* Exon 3-17) gewählt. Zur Differenzierung der beiden Fusionsgen-transkript-Varianten wurde das Expressionsniveau von *TCF3* Exon 2-3 mitbestimmt. Für die Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 35 wurde für die nicht-deletierten Abschnitte *ZNF384* Exon 4 und *TCF3* Exon 2 eine Ratio von 1 entsprechend dem Vorliegen sowohl in Wildtyptranskript wie auch Fusionsgen-transkripten eingesetzt, für die anderen Exons wurde die Relation jeweils zu *ZNF384* Exon 4 bzw. *TCF3* Exon 2 berechnet. In der Abbildung wird der Mittelwert aller Ratios für das jeweilige Exon mit der entsprechenden Standardabweichung dargestellt.

Eine relevante Verunreinigung der cDNA durch genomische DNA kann aufgrund der innerhalb der Standardabweichung übereinstimmenden Werte für *ZNF384* Exon 4 und Exon 4-5 ausgeschlossen werden. Für *ZNF384* ist ein deutlicher Unterschied zwischen der Expression der nur im Wildtyp vorkommenden Sequenz Exon 2-3 und der hinteren Exone (Exon 4, Exon 4-5) zu erkennen. Dieses deutet auf eine höhere Gesamtexpression von *ZNF384* hin, als allein durch den Wildtyp erreicht wird. Diese könnte theoretisch durch eine relevante Expression des Fusionsgens erklärt werden. Für *TCF3* lässt sich diese Beobachtung jedoch nicht bestätigen. Hier zeigen die Werte keine signifikante Differenz. Ebenso wenig kann eine Aussage über die Expression der beiden Transkriptvarianten gemacht werden.

So konnte mit dieser Analyse die Expression des *TCF3-ZNF384*-Fusionsgens nicht quantifiziert werden. Aus dem Einsatz der qPCR in der Bruchpunktsuche war bereits die Schwierigkeit der Amplifikation von *TCF3*-Abschnitten bekannt, dies wäre eine mögliche Fehlerquelle. Eine äquivalente Analyse auf Basis der Daten des Genexpressionsarrays (*GeneChip Humane Genome U133 Plus 2.0*) war nicht möglich, da nur ein Probeset für *TCF3 upstream* von Exon 3, jedoch im Intron 2-3 lokalisiert ist und somit kein Vergleich vorliegt.

### 7.3 Signalweganalysen und Kandidatengene

#### 7.3.1 Sequenzierung der Kandidatengene

Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Tabelle 34 zusammengefasst. Es konnten für 11 der Kandidatengene keine funktionsverändernden Mutationen gefunden werden. Im *KRAS*- und *YES1*-Gen wurde jeweils eine Punktmutation gefunden, die bereits als *Synonymous Coding* vorbeschrieben waren. Außerdem wurde in *CDKN2A* ein unbekannter Basenaustausch nachgewiesen, dieser befand sich jedoch im nicht translatierten Bereich. Nicht alle der genannten Kandidatengene konnten vollständig sequenziert werden. Trotz der unter 6.5.7.2 genannten Modifikationen konnte auch mit unterschiedlichen Primerpaaren kein Produkt amplifiziert werden. Hierbei handelte es sich hauptsächlich um GC-reiche Sequenzen. In Tabelle 34 sind die nicht sequenzierbaren Exone mit aufgeführt. Mittels *cold-start* PCR konnte der oben beschriebene Basenaustausch in *KRAS* bestätigt werden. Weitere Mutationen wurden nicht gefunden.

## Ergebnisse

Tabelle 34: Ergebnisse der Mutationsanalyse der Kandidatengene

Gen	#ENSG	Länge mRNA (in bp)	Mutationen (nach GrCh37) →Änderung der Proteinsequenz
<i>APC2</i> außer Exon 1,15	ENSG00000115266	11650	keine
<i>CDKN2A</i> außer IF 4 Ex.1	ENSG00000147889	1218	<b>9:21968199C&gt;G</b> →in UTR
<i>CDKN2B</i>	ENSG00000147883	3829	keine
<i>ETV6</i> außer Exon 1	ENSG00000139083	2211	keine
<i>FGF22</i>	ENSG00000070388	513	keine
<i>FSTL3</i> außer Exon 1, 3	ENSG00000070404	2511	keine
<i>KRAS</i>	ENSG00000133703	5419	<b>12:25368462C&gt;T</b> →Synonymous Coding (rs4362222)
<i>RERG</i>	ENSG00000134533	2264	keine
<i>SHC2</i> außer Exon 1	ENSG00000129946	2490	keine
<i>STK11</i> außer Exon 9	ENSG00000118046	3276	keine
<i>YES1</i> außer Exon 1	ENSG00000176105	4767	<b>18:724612 A&gt;G</b> →Synonymous Coding (rs537141)

### 7.3.2 Genexpressionsanalyse

#### 7.3.2.1 Korrelation zwischen mRNA-Expression und Immunphänotyp

Erster Schritt ist die Überprüfung der Korrelation der Microarray-Expressionsdaten mit dem in der Routinediagnostik ermittelten Immunphänotyp. Dazu wurden diese Expressionsdaten der MPAL der zellreihendefinierenden Marker gemäß WHO-Klassifikation mit den Ergebnissen der Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie verglichen. Die Auswertung zeigte eine gute Korrelation der Daten und bestätigen die Klassifikation als MPAL (s. Abbildung 36). Hierfür wurden die normalisierten Daten der einzelnen Probesets gewählt, beim Vorliegen mehrerer Probesets für einen Marker wird der Mittelwert dargestellt.

## Ergebnisse

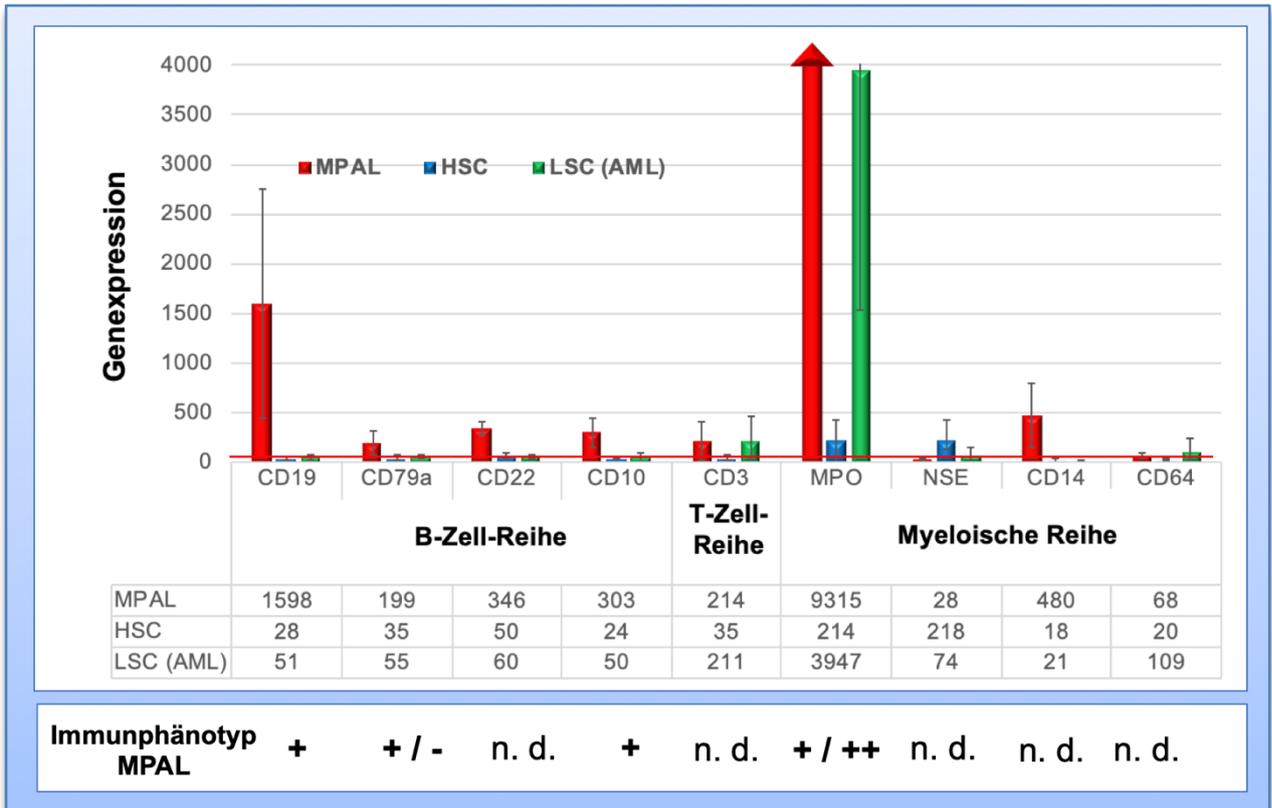


Abbildung 36: Zellreihendefinierende Marker nach WHO: Vergleich mRNA-Genexpression und Immunphänotyp

Genexpressionsdaten für die einzelnen Marker (lineare Mittelwerte für Analysen mit drei (MPAL), vier (HSC) und acht (LSC) Arrays, für Marker mit mehreren Probesets wurden Mittelwerte dieser Probesets berechnet) sowie zum Vergleich die Analyseergebnisse der Marker in der Immunphänotypisierung (+ positiv, ++ stark positiv, - negativ, n.d. nicht detektiert, / - unterschiedliche Populationen im FACS) Zur besseren Darstellung wurde die y-Achse auf 4000 begrenzt. Die rote Linie gibt das Niveau der signifikanten Expression an (>64).

Auf Basis dieser Ergebnisse wurde für die weiteren Auswertungen eine weitgehende Übereinstimmung der RNA-Microarray-Expressionsdaten und der Proteinexpression angenommen.

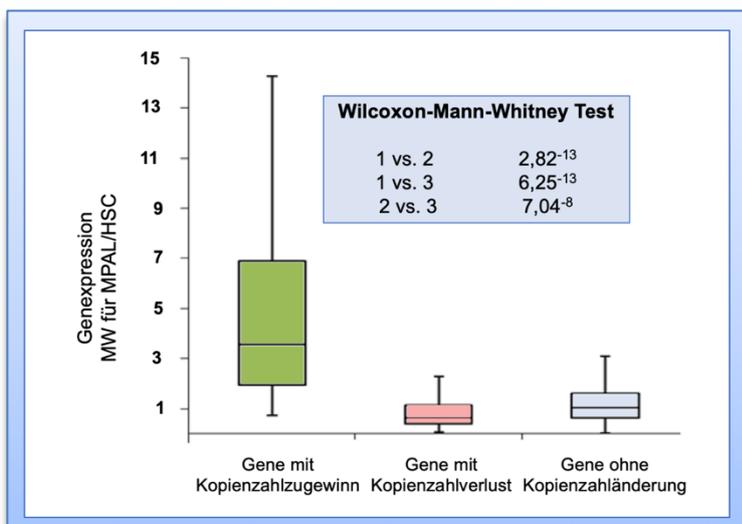


Abbildung 37: Korrelation von aCGH und Mikroarray-Expressionsdaten

Die Validität der Microarray-Expressionsdaten wird auch durch eine signifikante Korrelation mit den aCGH-Daten unterstützt. In Abbildung 37 werden die Ergebnisse der Analyse von Dr. Dr. T. Heiden gezeigt, welche die statistische Signifikanz des Zusammenhangs der Gene mit und ohne CNA zu den Mittelwerten der Genexpressionsdaten wiedergibt.

7.3.2.2 Gene mit CNA und deren Funktion

Die Auswertung der aCGH-Daten der Ersterkrankung wurde um die Daten der Erstrezidiv-Analyse erweitert. Waren nach Ausschluss von bekannten CNV in der Ersterkrankung 384 Gene von CNA betroffen, zeigte das Rezidiv eine Zunahme der CNA auf 1435 betroffene Gene.

Abbildung 38 zeigt die schematische Auswertung für die Ersterkrankung, hier konnten zusätzlich die Microarray-Genexpressionsdaten in die Auswertung miteinbezogen werden.

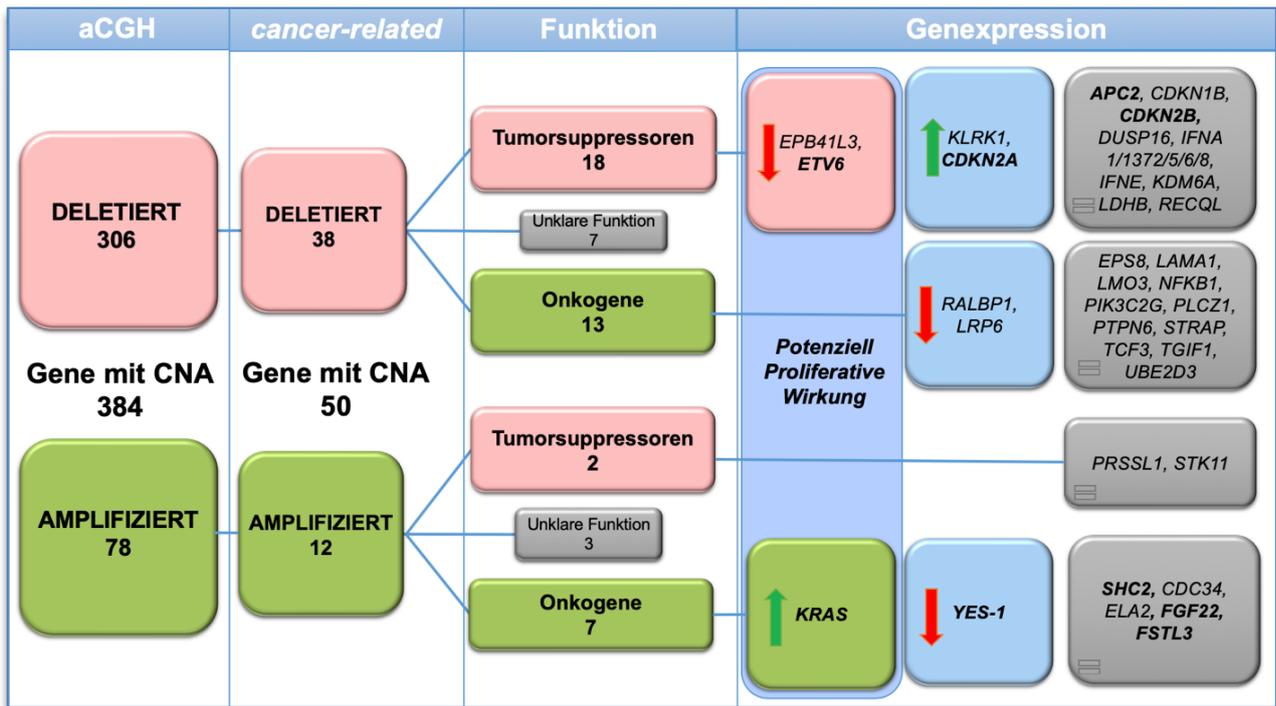


Abbildung 38: Flussdiagramm Ersterkrankung: Darstellung der einzelnen Auswertungsschritte

Farbkodierung in der Spalte Genexpression **grün**: überexprimierte Onkogene, **rot**: unterexprimierte Tumorsuppressoren, **grau**: in dieser Arbeit keine signifikant aberrante Expression bestimmt, **blau**: antiproliferative Wirkung zu erwarten, **fett markiert**: Kandidatengene, die Pfeile geben die Richtung der Expressionsänderung (basierend auf MPAL/HSC) an

Im ersten Schritt erfolgte die Filterung der von CNA betroffenen Gene mit der anhand Literaturrecherche erstellten Liste *cancer-related genes*, im zweiten Schritt – sofern in der Literatur beschrieben - die Zuordnung der wahrscheinlichen Funktion (als Tumorsuppressor bzw. Onkogen) in der Tumorentstehung. Diese Zuordnung hat z.T. einen hypothetischen Charakter, bei divergenter Funktion in verschiedenen Krebsarten wurde die für Leukämien wahrscheinlichste Funktion berücksichtigt.

Die genaue Betrachtung der vorausgewählten Kandidatengene ergibt: Einige Gene weisen eine zur Kopienzahländerung divergente Genexpression auf. Für *ETV6* und *KRAS* aus der Gruppe der Kandidatengene lässt sich eine Übereinstimmung von Aberration,

## Ergebnisse

Expression und Funktion nachweisen. Für Mutationen dieser Gene ist eine potenziell proliferative *driver*-Wirkung anzunehmen.

Für das Erstrezidiv wurde eine äquivalente Analyse (s. Abbildung 39) durchgeführt, es lagen jedoch keine Genexpressionsdaten vor. Bedingt durch die größere Menge aberranter Gene ist die Zahl der betroffenen Tumorsuppressoren und Onkogene angestiegen, eine Verschiebung der Relationen lässt sich nicht beobachten.

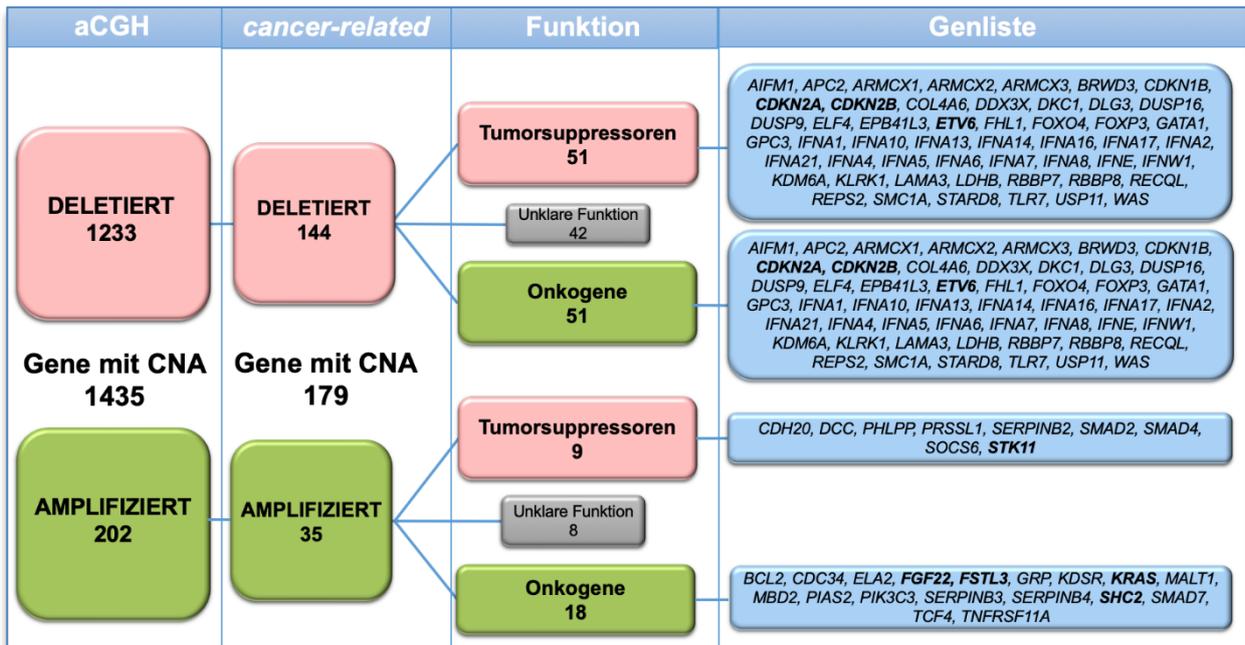


Abbildung 39: Flussdiagramm Erstrezidiv: Darstellung der einzelnen Auswertungsschritte

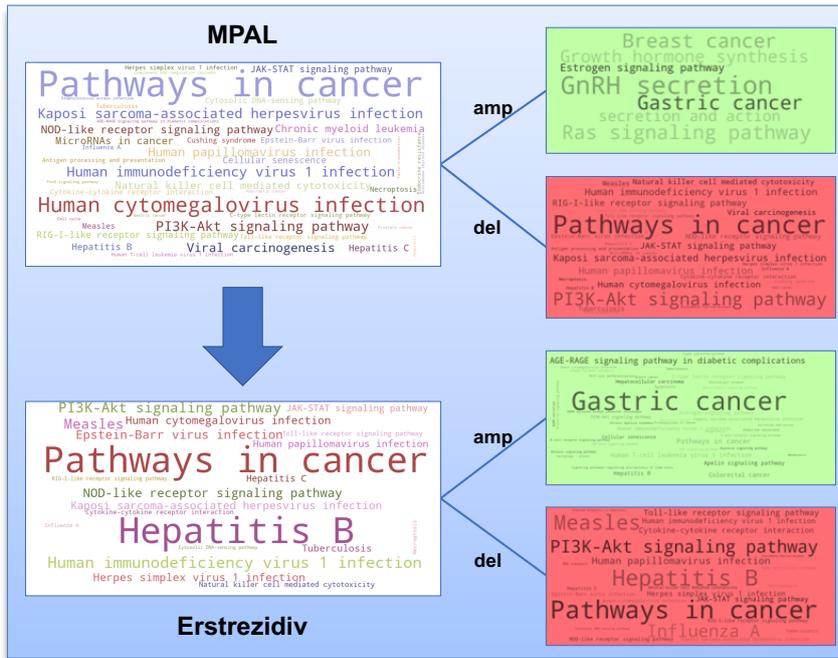
Farbkodierung in der Spalte Funktion **grün**: amplifizierte Onkogene, **rot**: deletierte Tumorsuppressoren, **grau**: unklare Funktion in der Tumorentstehung, **fett markiert**: Kandidatengene

Aufgrund der Planung einer Transkriptomsequenzierung wurde von der Sequenzierung zusätzlicher Gene abgesehen. Auch erfolgte an dieser Stelle noch keine Gewichtung nach Relevanz der (anti-)proliferativen Wirkung: So wurde ein Teil der aufgeführten tumorrelevanten Gene bisher nicht im Zusammenhang mit Leukämien beschrieben. Wiederum ist zu erwarten, dass auch Gene ohne CNA eine aberrante Expression aufweisen können. Um die vorliegenden Daten derart zu differenzieren wurden in den nächsten Schritten Signalweganalysen auf Basis aller Genexpressionsdaten durchgeführt.

### 7.3.2.3 Signalweganalyse mit „GeneCodis“

Mit „GeneCodis“ wurden die Daten des Microarray und der aCGH in Hinblick auf potenzielle Signalwegveränderungen analysiert.

## Ergebnisse

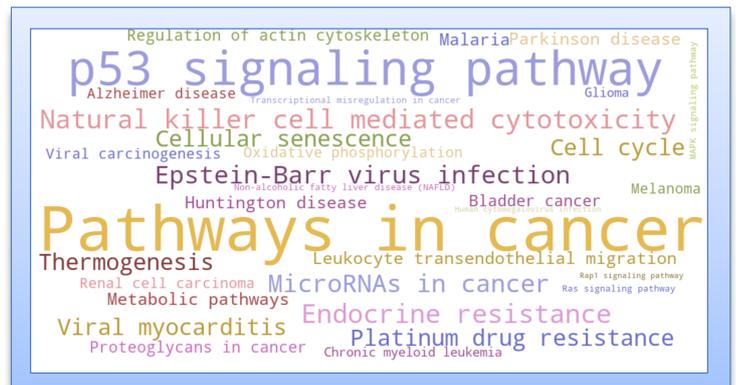


**Abbildung 40:** „GeneCodis“ – Auswertung der CNA-Listen nach KEGG Pathways

oben – Wordcloud aller signifikant von CNA betroffenen Signalwege in der Erstkrankung, unten – Wordcloud aller signifikant von CNA betroffenen Signalwege im Erstrezidiv, links jeweils alle Aberrationen, rechts getrennt nach Amplifikation (**grün**) und Deletion (**rot**) (alle Abbildungen wurden dem Programm entnommen: <https://genecodis.genyo.es/>)

Zunächst wurden die aCGH-Daten erneut mit der aktuellen Version von „GeneCodis“ analysiert, hierfür wurden die Gene mit CNA für Erstkrankung und Erstrezidiv verwendet. Sowohl in der Gesamtauswertung als auch in der Einzelauswertung für deletierte Gene zeigt sich eine signifikante Anreicherung der von Kopienzahländerungen betroffenen Gene in den KEGG *Pathways in cancer* für beide Erkrankungsstadien (s. Abbildung 40).

Analog wurden die Microarray-Genexpressionsdaten aller signifikant aberrant exprimierten Gene der Erstkrankung analysiert. Zusätzlich erfolgte die vergleichende Auswertung von in Relation zu den HSC überexprimierten Genen und unterexprimierten Genen separat. Hier bestätigt sich für die Gruppe der überexprimierten Gene (MPAL/HSC-Ratio >3) das Ergebnis der KEGG *Pathways in cancer* als signifikant veränderter Signalweg.



**Abbildung 41:** „GeneCodis“ – Auswertung der *microarray*-Genexpressionsdaten der MPAL nach KEGG Pathways

Wordcloud der signifikant veränderten Signalwege für die überexprimierten Gene in der MPAL (Abbildung wurde dem Programm entnommen / <https://genecodis.genyo.es/>)

Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 41 zu sehen. Zusammenfassend bestätigen die Analysen die signifikanten Änderungen der PiC auf verschiedenen Funktionsebenen

(strukturelle Aberrationen und Genexpression). Zusätzlich fällt unter anderem auch eine signifikante Anreicherung des *p53 signaling pathway* auf.

Als weiteres Beispiel für die Analyse basierend auf anderen Kategorien wurden die Genexpressions- wie auch die CNA-Daten hinsichtlich GO *Biological Process* ausgewertet. Hier zeigen sich signifikante Veränderungen der Prozesse u.a. für B-Zell-Differenzierung, Neutrophilendegeneration sowie weitere diverse Immunprozesse.

### 7.3.2.4 KEGG Pathways in cancer – Integration von CNA und Genexpressionsdaten

Wie oben ausgeführt, wiesen die bisherigen Auswertungen auf deutlich veränderte Signalwege hin, die gemeinsam in den KEGG *Pathways in cancer* (Pic) beschrieben werden. Jedoch geben diese Analysen keinen Aufschluss über die Funktion der veränderten Gene. Um besser differenzieren zu können, welche potenzielle Rolle die Änderungen der Kopienzahl und der Genexpression in der Leukämogenese spielen können, erfolgte die genauere Betrachtung der Pic. Die Genliste wurde der KEGG-Website (<http://www.genome.jp/kegg/>)<sup>35–37</sup> entnommen und mit den Microarray-Expressionsdaten der MPAL sowie den CNA-Daten von MPAL und Erstrezidiv abgeglichen (s. Tabelle 35). Die Auswertung der Genexpressionsdaten belegt die deutlich überwiegende Anzahl an Genen mit alleiniger Expressionsabweichung, nur ein kleiner Teil der Gene mit Veränderungen weist CNA auf. Jedoch gibt es auch CNA ohne signifikant aberrante Expression. Besonders auffällig sind die divergenten Ergebnisse für *CDKN2A* mit vermeintlicher Überexpression trotz Deletion. Dieses Ergebnis zeigt insgesamt, dass die parallele Betrachtung von CNA und Genexpressionsdaten sinnvoll ist. Jedoch zeigen sich in dem gesamten Weg vielfache Abweichungen, die potenziell leukämogen wirken können. Für eine genauere Beurteilung ist die Betrachtung der Funktion notwendig. Das Wissen über die veränderten Signalwege bildet die Grundlage zur Evaluation von individuellen Therapieansätzen. Welche Relevanz die beobachteten Veränderungen in der Leukämogenese besitzen können und welche Therapiemöglichkeiten realisierbar sind, wird im Abschnitt 8 diskutiert.

## Ergebnisse

**Tabelle 35: Genexpression und CNA in KEGG Pathways in cancer**

Die Tabelle führt die in den KEGG Pathways in cancer enthaltenen Gene mit Zuordnung der Daten aus limma-Analyse (lineare Ratio MPAL/HSC, **rot**: Unterexpression, **grün**: Überexpression) und aCGH für MPAL und Erstrezidiv (log<sub>2</sub>, **rot**: Deletion, **grün**: Zugewinn) auf. Werte, die nicht signifikant gegenüber der Vergleichsprobe verändert sind, werden nicht aufgeführt.

Genname	Genexpression MPAL/HSC	CNV MPAL	CNV REZ
PRKACB	0,02		
MGST1	0,03	-0,43	-0,32
IL15	0,04		
GSTM5	0,05		
EGLN3	0,05		
IL12RB2	0,05		
STAT4	0,06		
GSTO2	0,06		
TGFBR1	0,07		
GSTA4	0,09		
TRAF3	0,09		
SMAD3	0,11		
CREBBP	0,12		
SMAD4	0,15		0,35
CCDC6	0,16		
IGF1R	0,19		
RUNX1	0,25		
DAPK1	0,27		
RAC1	3,09		
CKS2	3,10		
RASGRP3	3,39		
KRAS	3,61	1,65	1,83
CALM1	4,85		
CKS1B	5,37		
CDKN2A	5,47	-0,47	-0,45
TRAF4	5,58		
MMP9	7,85		
MDM2	8,58		
BCL2L11	10,09		
BCL2	10,58		0,35
CALM3	13,37		

Genname	Genexpression MPAL/HSC	CNV MPAL	CNV REZ
EGLN1	15,05		
CDC42	17,68		
IL2RB	19,25		
SOS2	22,25		
TPM3	30,71		
IL7R	31,65		
CDKN1A	38,50		
IL13RA1	94,47		-0,36
CCNA1	146,66		
LEF1	190,50		
LPAR6	243,03		
HGF	491,43		
APC2		-0,49	-0,49
CDKN2B		-0,47	-0,45
IFNA1		-0,47	-0,45
IFNA2		-0,47	-0,45
IFNA5		-0,47	-0,45
IFNA6		-0,47	-0,45
IFNA8		-0,47	-0,45
IFNA13		-0,47	-0,45
CDKN1B		-0,43	-0,32
NFKB1		-0,38	-0,38
FGF22		1,00	1,26
IFNA4			-0,45
IFNA7			-0,45
IFNA10			-0,45
IFNA14			-0,45
IFNA16			-0,45
IFNA17			-0,45
IFNA21			-0,45
FGF16			-0,36

**Tabelle 36: Genexpression weiterer aberrant exprimierter Gene**

Daten aus limma-Analyse (lineare Ratio MPAL/HSC, **rot**: Unterexpression, **grün**: Überexpression)

Genname	Genexpression MPAL/HSC
HBEGF	93,13
ETV6	0,07
YES1	0,02
ATR	0,11

Die Daten weiterer, nicht in den Pic enthaltener Gene, deren aberrante Expression in der folgenden Diskussion berücksichtigt wurde, finden sich in Tabelle 36. Nicht aberrant exprimierte Gene werden nicht tabellarisch aufgeführt.

## 8 Diskussion

Übereinstimmend mit dem Krankheitsverlauf der Patientin mit MPAL unterstützen die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit den aggressiven Charakter der Leukämie mit komplexen Veränderungen. Um die Pathogenese dieser MPAL besser verstehen zu können, werden die gewonnenen Ergebnisse folgend im Kontext mit den bisherigen Erkenntnissen in der Literatur diskutiert. Es soll außerdem analysiert werden, welche Veränderungen im Zusammenhang mit der genetischen Instabilität stehen können. In der Folge werden mögliche Modelle zur Leukämogenese in diesem Fall entwickelt. Darauf basierend sollen mögliche individuelle Therapieansätze diskutiert werden. Zuletzt werden die eingesetzten Methoden verglichen und diskutiert.

### 8.1 **TCF3-ZNF384-Fusion**

Die Ergebnisse der zytogenetischen Analysen weisen auf die *TCF3-ZNF384*-Fusion als *first hit* der Leukämogenese dieser MPAL und auf das Vorhandensein dieses Fusionsgens in allen Blasten hin. So sprechen der Nachweis von vereinzelt Zellen in der *FISH*-Analytik, die diese Translokation als einzige Aberration zeigen, sowie die Konstanz der Veränderung in allen Erkrankungsstadien, für diese Translokation als *founder* Mutation in der Leukämogenese.

Diese Vermutung deckt sich auch mit den Ergebnissen einer neuen Studie des *St. Judes Hospitals* von Alexander et al., welche die genetischen Merkmale von 115 ALAL im Kindesalter untersucht. In der Untergruppe der B/M MPAL lag hier ein *ZNF384*-Rearrangement (*ZNF384r+*) in 48% vor, in 8 Fällen (53%) davon mit *TCF3* als Translokationspartner. Weitergehende Untersuchungen wiesen das Vorliegen der Translokation nicht nur in allen leukämischen Zellen, sondern auch in einigen hämatopoetischen Vorläuferzellen nach, nicht leukämische T- und NK- Zellen wiesen diese dahingegen nicht auf. Basierend auf diesen Ergebnissen postulierten die Autoren, dass *ZNF384*-Translokationen als primäre *founder* Mutationen in hämatopoetischen Stammzellen die Leukämie initiieren können und zur Ausprägung heterogener Immunphänotypen in der Blasten prädisponieren. Auch in Subpopulationen der Blasten zeigte sich eine Konstanz dieser primären Veränderungen bei Varianz weiterer *driver*-Mutationen.<sup>48</sup>

Weitere erworbene Mutationen treten im Krankheitsverlauf auf und können den Immunphänotyp wie auch das Therapieregime beeinflussen, sind jedoch nicht ursächlich an der

## Diskussion

Promiskuität der Zellen beteiligt. Auch sequenzielle Untersuchungen von Erkrankungsstadien bestätigten diese Hypothese, so wiesen einige MPAL starke Mutationsveränderungen bei gleichbleibendem gemischtem Immunphänotyp auf, während andere einen *Shift* des Phänotypes zeigten. Dieser *Shift* war jeweils therapieabhängig, nach ALL-gerichteter Therapie entwickelte sich ein AML-Rezidiv und nach AML-gerichteter Therapie ein ALL-Rezidiv. Untersuchungen an NSG-Mäusen bestätigen das multilineäre Potenzial der MPAL Zellen: Die Transplantation von mittels FACS aufgereinigten Subpopulationen führte erneut zur Entwicklung der diversen Immunphänotypen der primären Proben. Diese Entwicklung trat dabei auch ohne den Selektionsdruck einer Therapie auf. Die Sequenzierung der immunphänotypisch divergenten Subpopulationen zeigte überwiegend übereinstimmende Mutationen. Auch die Methylierungsprofile wiesen keine Unterschiede für die Subpopulationen auf.<sup>48</sup>

Analog zeigt die hier untersuchte MPAL eine Konstanz der primären chromosomalen Translokation t(12;19) trotz massiver Instabilität des Genoms (s. Abbildung 29). Hierbei kam es zu einem *Shift* des Immunphänotyps hin zu einer BCP-ALL trotz der Therapie mit Elementen aus AML- und ALL-Protokollen. Auch die Ergebnisse der zytogenetischen Untersuchungen korrelieren mit den Aussagen der *St.Judes*-Studie, da sie zwar auf den ersten Blick eine hohe genotypische Diversität aufzeigen, die Ähnlichkeiten der Aberrationen jedoch so ausgeprägt sind, dass von einer heterogenen Gruppe mit nicht klar abgrenzbaren Übergängen auszugehen ist. Auch die Entwicklung im Rezidiv ist daher aufgrund der Mutationsentwicklung eher als kontinuierliche Weiterentwicklung bei erhaltender Verwandtschaft zur Ersterkrankung zu interpretieren.

Nun stellt sich die Frage, welche Auswirkungen das Fusionsprotein auf die Zellen hat. Die Transkription des Fusionsgens konnte mit dem Nachweis zweier Fusionstranskripte bestätigt werden, bei einem bleibt das Leseraster (*in-frame*) erhalten. Dieses *in-frame* Fusionstranskript zeigt sich vom Aufbau analog zu den Beschreibungen der Fusionstranskripte der Studie von Alexander et al. und beinhaltet die *TCF3 transactivation domain* und die komplette kodierende Region des *ZNF384*, was auf einen funktionsfähigen aberanten Transkriptionsfaktor hindeutet. Mangels ausreichend signifikanter Ergebnisse konnte eine ausreichende quantitative Transkription des Fusionsgens nicht sicher bewiesen werden. Die Studienlage zeigt jedoch für die Zellen mit solcher Fusion die Expression des Fusionsproteins.<sup>48</sup>

Welche Auswirkungen dieses Fusionsprotein *in vivo* hat, wurde in der *St.Judes*-Studie durch *ChIP-seq* (*Chromatin immunoprecipitation with sequencing*) Analysen von Zellen

mit verschiedenen *ZNF384r+* in Mäusen untersucht: Die *peaks* mit erhöhter oder neuer Bindung durch die Fusionsproteine im Vergleich zum Wildtyp enthielten das *ZNF384* core-Bindungsmotiv und reichert sich primär in Genen an, die für die Entwicklung des Immunsystems sowie in der Transkriptionsregulation relevant sind.<sup>48</sup>

*Gene set enrichment*-Analysen zeigten deutliche Unterschiede für B/M-MPAL mit und ohne *ZNF384r+* und legten einen höheren Differenzierungsgrad für die Gruppe mit *ZNF384r+* nahe. Hierbei zeigt die Gruppe der *ZNF384r+*-B-ALL mit myeloischer Koexpression im Kindesalter sowohl vom Mutations- wie auch vom Genexpressionsprofil wenig Unterschiede zur *ZNF384r+*-MPAL. Ausnahme sind hier die *KDM6a*-Mutationen, welche nur bei MPAL (1/3 der Fälle) nachzuweisen waren. Auch in dieser Promotionsarbeit wurde eine Deletion des Genes in der Ersterkrankung und im Rezidiv nachgewiesen.<sup>48</sup>

Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten von MPAL und B-ALL mit *ZNF384r+* wird eine zukünftige Einordnung beider Erkrankungen in eine gemeinsame Gruppe empfohlen.<sup>32,48</sup>

Für die Gruppe der *ZNF384r+*-MPAL ist eine stärkere *FLT3*-Expression ohne Kopienzahländerung im Vergleich zu anderen MPAL auffällig. Diese ist so spezifisch, dass Alexander et al eine *FLT3*-Inhibition als potenzielle *targeted therapy* vorschlagen. Für die hier untersuchte MPAL zeigt sich jedoch eine zu HSC und LSC unveränderte *FLT3*-Expression.<sup>48</sup>

## 8.2 Signalweganalysen

### 8.2.1 RAS-abhängige Signalwege und deren Veränderungen

#### 8.2.1.1 MAPK-Signalweg

Bereits aufgrund der Voruntersuchungen wurde *KRAS* als relevantes *driver* Gen in der Leukämogenese postuliert und eine starke Aktivierung des RAS-Signalweges vermutet. Die Signalweganalysen bestätigen diese Annahme und zeigten diverse Veränderungen (s. Abbildung 45) insbesondere des gesamten RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweges (MAPK-Signalweg).

Die Aktivierung des MAPK-Signalweges beginnt über die Aktivierung der membrangebundenen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) durch Wachstumsfaktoren (GF), welche gemeinsam mit den *guanine nucleotide exchange factors* (GEF) die Proteine der RAS-Familie (*KRAS*, *HRAS*, *NRAS*) über GTP-Bindung aktivieren. Das GTP-RAS bildet in der Folge Dimere mit den RAF-Proteinkinasen (*ARAF*, *BRAF*, *CRAF*) und führt zur direkten Phosphorylierung und damit Aktivierung von MEK1 und MEK2 (MAPK/ERK Kinase 1 und

2). Diese wiederum führen zur Aktivierung von ERK1 und ERK2 (*extracellular signal-regulated kinases*), welche zur Gruppe der MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) gehören. Zu den ERK1/2-Substraten gehören hunderte Proteine, welche u.a. an der Regulation von Zellzyklus, Apoptose und Differenzierung beteiligt sind. Der Spiegel des phosphorylierten ERK (pERK) korreliert in Studien mit dem Aktivierungsgrad des MAPK-Signalweges. Die Auswirkungen der Aktivierung dieses Signalweges divergieren je nach Zelltyp, meist wirkt die MAPK-Aktivierung aber positiv auf die Proliferation.<sup>66,67</sup>

Im Mittelpunkt der gefundenen Veränderungen steht die Wildtyp-*KRAS*-Amplifikation (*ampKRAS*). Während aktivierende *KRAS*-Mutationen (*mutKRAS*) auch bei Leukämien häufig gesehen werden<sup>45</sup>, ist der Nachweis einer *ampKRAS* bei Leukämien in der Literatur bisher nicht beschrieben. Da in der MPAL *KRAS*-Mutationen (teilweise auch subklonal) ausgeschlossen wurden, kann die Bedeutung der vorliegenden Ergebnisse nur grundlegend in Hinblick auf Auswirkungen einer Überaktivierung des RAS-Signalweges diskutiert werden und mit den Erfahrungen zu den Wildtyp-Amplifikationen anderer Malignome verglichen werden.

In Tumoren wurden bisher verschiedene *mutKRAS* nachgewiesen, deren Gemeinsamkeit zumeist eine konstitutionelle Aktivierung der *KRAS*-Proteine aufgrund mangelnder Inaktivierung mittels GTPase ist. Auch Tumorzellen mit *ampKRAS* können eine dauerhafte Aktivierung aufweisen, diese basiert jedoch auf quantitativ erhöhten *KRAS*-Spiegeln anstatt auf reduzierter Inaktivierung.<sup>68</sup> Datenanalysen mittels des *The Cancer Genome Atlas* zeigen für alle Krebsarten mit *ampKRAS* eine Korrelation der Kopienzahl mit dem Expressions- wie auch dem Proteinniveau, hierbei weisen die Zellen mit der höchsten Kopienzahl auch die höchste Sensitivität auf *shRNA-silencing* auf.<sup>69</sup> Auch in der MPAL konnte ein deutlich erhöhtes Expressionsniveau bei erhöhter Kopienzahl nachgewiesen werden.

Aber nicht nur *KRAS* zeigt eine relevante Überexpression in der MPAL, sondern auch *SOS2*. Die beide Gene *SOS1* und *SOS2* (*son of sevenless homolog*) gehören zur Gruppe der GEF, welche RAS durch den Austausch von GDP gegen GTP aktivieren. Somit ist hier eine exponentielle Verstärkung anzunehmen, da in der MPAL ein erhöhtes Expressionsniveau sowohl des Aktivators *SOS2* wie auch des Substrats *KRAS* vorliegt. Die Expression von *SOS1* liegt für Patienten- und Kontrollproben unter der Nachweisgrenze. Hinzu kommt, dass nicht nur *SOS* den Austausch von GDP gegen GTP am RAS-Protein katalysiert, sondern auch selber durch eine Komplexbildung mit RAS-GTP stabilisiert wird

und so eine positive Feedbackregulation der GEF-Funktion stattfindet. Das hat theoretisch einen weiteren Verstärkungseffekt der Signalinduktion in der MPAL zur Folge.<sup>70</sup>

Zum Loop der KRAS-SOS2-Interaktion kommt noch eine dritte Komponente hinzu: das überexprimierte *RASGRP*, das ebenfalls zur Gruppe der GEF gehört. Dieser kann nach Aktivierung durch multiple GF, wie z.B. dem in der hier analysierten MPAL extrem stark überexprimierten *HGF*, und auch über B-Zell-Rezeptoren die verschiedenen RAS-Isoformen aktivieren. In einer Studie wurde nachgewiesen, dass RASGRP nicht nur ein direkter RAS-Aktivator ist, sondern auch SOS-Proteine eine RASGRP-Bindungsseite enthalten, und die Bindung von RASGRP an SOS auch das Priming mit RAS-GTP erleichtert.<sup>71</sup>

Welche Folgen eine solche KRAS-Aktivierung haben kann, zeigen Studien zu verschiedenen Mutationen des Signalweges: Zellen mit *mutKRAS* weisen zwar gleiche basale *KRAS*-mRNA-Niveaus wie Zellen mit Wildtyp-KRAS (*wtKRAS*) auf, reagieren aber signifikant stärker auf GF-Einwirkung und steuern eine höhere Anzahl an Zellen in die Mitose. Zellen mit *mutKRAS* können sowohl den Übertritt aus der G0-Phase auch GF-unabhängig katalysieren als auch die Hochregulation von GF induzieren.<sup>72</sup>

Eine solche Hochregulation zeigen auch die Analysen der MPAL: Es besteht eine Überexpression des in der obigen Studie aufgeführten *HBEGF* (*heparin-binding epidermal growth factor*). Des Weiteren weist *HGF* (*hepatocyte-growth factor*) eine ausgeprägte Überexpression auf. Eine solche Überexpression von HGF in AML kann nach Studienlage zur Induktion von PI3K/AKT und MAPK führen und proliferativ wirken.<sup>73</sup>

In diesem Zusammenhang ist das *EGLN1*-Gen zu erwähnen, welches für das PHD2-Protein (*Prolyl hydroxylase domain protein*) kodiert und in der MPAL stark überexprimiert ist. Die Überexpression von *EGLN1* führt in Leberzellkarzinomen zur Herunterregulation von p53 und Hochregulation von RAS und RAF und wirkt dort onkogen.<sup>74</sup> Andererseits ist *EGLN1* auch eine tumorsuppressive Funktion zuzuschreiben, da es in AML-LSC mit Knockdown des in beiden Erkrankungsstadien deletierten *BCAT1*-Gens eine Wachstumsverlangsamung vermittelt.<sup>75</sup> In diesem Kontext ist eine Einordnung der Überexpression für die Leukämogenese nicht sicher möglich.

Ein weiterer Wachstumsfaktor, der zwar keine Überexpression aufweist, jedoch in Erst-erkrankung und Rezidiv amplifiziert ist, wurde bereits bei der Auswahl der Kandidatengene berücksichtigt: *FGF22* (*fibroblast growth factor 22*) wirkt aktivierend auf Proliferation. Eine Induktion von MAPK durch *FGF22* konnte bei Lungenkarzinomen festgestellt werden, außerdem spielt es eine wichtige Rolle u.a. in der Gewebereparatur: So kann eine

FGF22-Hochregulation bei spinalen Verletzungen die Zellen vor Stress-induzierter Apoptose schützen, indem es das proapoptotische BAD runterreguliert.<sup>76</sup> Möglicherweise kann ein solcher Mechanismus bei amplifizierten und laut Sequenzierung nicht von inaktivierenden Mutationen betroffenem *FGF22* auch in den MPAL-Blasten einen zusätzlichen Schutz vor Apoptose bieten.

### 8.2.1.2 PI3K/AKT-Signalweg

Der MAPK-Signalweg ist nicht der einzige RAS-kontrollierte Signalweg: Die Aktivierung von RAS kann ebenfalls zur Aktivierung von PI3K (Phosphoinositid-3 Kinase) sowie von RALGDS (*Ral guanine nucleotide dissociation stimulator*) führen. Sowohl MAPK- wie auch der PI3K/AKT-Signalweg spielen eine wichtige Rolle in der Onkogenese, während der Einfluss von RALGDS bisher nicht endgültig geklärt ist.<sup>77</sup>

So kann RAS neben der Proliferation und Immunantwort auch die Apoptose beeinflussen: Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg kann neben aktiviertem RAS auch direkt durch RTK (und andere Rezeptoren) aktiviert werden, hierdurch wird die katalytische Untereinheit von PI3K aktiviert und über weitere Zwischenschritte die Phosphorylierung von AKT induziert, pAKT ist hierbei Gradmesser der Aktivierung. pAKT wirkt positiv auf das Zellüberleben ein, indem es u.a. den P53-Antagonisten MDM2 phosphoryliert und somit TP53 stabilisiert, Apoptose-Inhibitoren hochreguliert sowie propapoptotische Proteine (BAK1, BAD und BAX) negativ reguliert.<sup>78</sup>

RAF-Aktivierung wiederum supprimiert das proapoptotische PAR4 und reguliert das antiapoptotische BCL2 hoch. Beide Wege führen zur Phosphorylierung und damit Inaktivierung vom propapoptotischen BAD, welches für die Inaktivierung von BCL2 verantwortlich ist. Zwar werden zelltypabhängig auch propapoptotische Signale über den RAS-Signalweg vermittelt, jedoch scheinen diese Wege in Malignomen meist supprimiert zu sein.<sup>72</sup>

Auch die Analysen der MPAL belegen, dass *BCL2* zwar erst im Rezidiv amplifiziert ist, jedoch bereits in der Ersterkrankung überexprimiert ist, was eine Folge des aktivierten RAS-PI3K-AKT-Signalwegs sein könnte.

### 8.2.1.3 Weitere RAS-abhängige Mechanismen

Die RAS-Aktivierung beinhaltet auch Mechanismen, die es den Krebszellen erleichtert, einer Immunantwort zu entgehen: Einerseits reduziert RAS die Expression von Haupthistokompatibilitäts-Komplexen, andererseits scheinen Zellen mit mut*KRAS* spezifischen T-Zellen entkommen zu können, möglicherweise über die Rekrutierung regulatorischer T-Zellen.<sup>72</sup>

Angiogenese und Invasion spielen bei hämatologischen Malignomen eine untergeordnete Rolle, dennoch zeigen Studien, dass MMP9 als eine der hierfür relevanten Metalloproteasen durch RAS hochreguliert wird, auch in der MPAL zeigt sie eine signifikante Überexpression.<sup>72</sup> In der Literatur sind keine Daten im Zusammenhang mit akuten Leukämien beschrieben, jedoch ist eine Überexpression sowohl für diverse solide Tumoren wie auch CLL als prognostisch ungünstiger Faktor beschrieben. Zusätzlich ist in der MPAL auch *Calmodulin 1* und 3 (*CALM1*, *CALM3*) überexprimiert, zumindest für Brustkrebs ist die Hochregulation von MMP9 durch CALM beschrieben. Ein Therapieansatz bestünde in der Inhibition, eine Studie zeigt eine potenzielle Wirkung der MMP9-Inhibitoren Ro31-9790 und TIMP-1 *in vitro*.<sup>79,80</sup>

### 8.2.1.4 CREBBP

Neben den Genen des Ras-Signalweges ist auch das Gen *CREBBP* sehr häufig von Mutationen in der pädiatrischen ALL betroffen, insbesondere akkumulieren diese im Rezidiv. Bei zeitgleichem Vorliegen mit *mutKRAS* waren diese mit dem frühen Auftreten von Rezidiven assoziiert.<sup>81,82</sup> Klinisch sind nicht nur Mutationen sondern auch reduzierte Expressionsniveaus von *CREBBP* in pädiatrischer ALL mit einer kürzeren Remissionszeit, einem reduzierten OS und einem erhöhten WBC assoziiert.<sup>82</sup> *CREBBP* zeigt in der MPAL eine signifikante Unterexpression ohne Kopienzahländerung, auf das Vorliegen von Mutationen wurde es jedoch nicht untersucht.

*CREBBP* kodiert für eine Histonacetyltransferase und fungiert als Koaktivator der Transkription. Insbesondere ist hier der negative regulatorische Effekt auf den RAS-Weg über eine direkte Acetylierung von KRAS zu nennen, ein Mechanismus, der in der MPAL zu einer weiteren Verstärkung dieses Weges beitragen kann.<sup>83</sup>

### 8.2.2 **Bedeutung von KRAS-Mutationen in der Leukämogenese**

Verschiedene Studien kommen zu dem Schluss, dass es sich bei den *mutKRAS* um sekundäre Ereignisse in der Leukämogenese handelt. So konnten leukämische Vorläuferzellen bei hyperdiploiden Leukämien bereits in pränatalen Proben über IGH oder Hyperdiploidität nachgewiesen werden, während *mutKRAS* erst postnatal entstanden sind.<sup>84</sup>

Häufig liegen *mutKRAS* auch subklonal vor, was zu einem vermeintlichen Anstieg der Prävalenz durch Selektion eines *mutKRAS*-Subklons im Erkrankungsverlauf führen kann. So wies eine Studie in ca. 22,5% aller vermeintlich *wtKRAS*-Leukämien subklonale *KRAS*-Mutationen nach, in der Hälfte der vermeintlichen Neumutationen im Rezidiv lag die Mutation in der Ersterkrankung bereits subklonal vor.<sup>45</sup> Diese Studie zeigt sowohl eine

positive als auch negative Selektion der *KRAS*-Mutationen im Erkrankungsverlauf. Vermutet wird hier der unterschiedliche Einfluss der RAS-Aktivierung auf die Wirksamkeit verschiedener Chemotherapeutika: Leukämien mit mut*KRAS* haben demnach einerseits eine erhöhte MTX-Resistenz, jedoch sprechen sie deutlich besser auf Spindelgifte wie Vincristin an.<sup>45</sup> Außerdem weisen diverse Studien auch eine erhöhte Resistenz gegenüber Glukokortikoiden nach.<sup>43</sup> So kann ein Selektionsdruck je nach Therapieregime einwirken.

Auch wenn meist davon ausgegangen wird, dass mut*RAS* keine *founder*-Mutationen sind, sind mut*KRAS* sehr wohl in der Lage, akute Leukämien zu induzieren. Mäuse mit transplantierten mut*KRAS*-HSC entwickelten zunächst ein myeloproliferatives Syndrom. Durch Zugewinn weiterer kooperierender Mutationen, z.B. in *NOTCH1*, entstanden akute T-Zell-Leukämien. Hierbei scheint die onkogene Wirkung nicht nur ausschließlich über die PI3K- und MAPK-Signalwege vermittelt zu sein, so reagieren selbst Mäuse mit inaktiviertem *RAS* sensibel auf Wachstumssignale und können durch Induktion neuer Mutationen in der Folge T-Zell-Leukämien entwickeln.<sup>85,86</sup>

Zusammengefasst treten mut*KRAS* früh in der Tumorprogression auf, können aber nur in Kombination mit weiteren Defekten tumorauslösend sein.<sup>66,87</sup> Die Hypothese, dass es sich bei den *KRAS*-Veränderungen meist um frühe sekundäre Ereignisse handelt, deckt sich mit den hier gezeigten Ergebnissen mit dem Nachweis sowohl der Amplifikation wie auch deren Kopienzahl bereits in der MPAL-Ersterkrankung.

### 8.2.3 Unterschiede zwischen *KRAS*-Mutationen und Wildtyp-Amplifikationen

Trotz der Gemeinsamkeiten, die Tumore mit mut*KRAS* und amp*KRAS* durch die Ras-Aktivierung aufweisen, zeigen Studien, die die Biologie und Wirksamkeit von *targeted therapies* vergleichen, große Unterschiede auf: So traten amp*KRAS* in nur 3% der primären Endometrium-Karzinome, jedoch in 18% der metastasierten Karzinome auf. Das Vorliegen einer amp*KRAS* ist hierbei mit einem schlechten Outcome, geringerer Differenzierung, höherer Invasivität und Aneuploidie assoziiert, während dieser Zusammenhang für Karzinome mit aktivierender mut*KRAS* nicht gesehen wurde.<sup>88</sup>

Auch zeigte sich ein unterschiedliches Ansprechen auf Therapien: In einer Studie zu Kolonkarzinomen mit mut*KRAS* und amp*KRAS* wiesen nur Tumore mit amp*KRAS* eine Resistenz gegen EGFR-Inhibitoren auf.<sup>89</sup>

Die Ursache dieser Differenz scheint in den unterschiedlichen Regulationsmechanismen von Wildtyp- und mutierten *RAS* zu liegen: In Zellen mit heterozygoter *RAS*-Mutation

scheint das Wildtyp-Allel eine modulierende Funktion auf das onkogene Potential des mutierten Allels zu haben und die GF-abhängige Signalweginduktion zu vermitteln, während das mutierte RAS das basale MAPK-Signaling steigert.<sup>90</sup>

Amp*KRAS* führt außerdem zu einer verstärkten Aktivierung des PI3K-Signalweges: Die Behandlung von Lungenkrebs (NSCLC) mit Mutationen des HGF-Rezeptor MET mit dem MET-Inhibitors Crizotinib führte zur Entwicklung von resistenten Zellen. Diese wiesen einen Zugewinn von amp*KRAS* mit PI3K-Aktivierung auf und sprachen auf eine zusätzliche PI3K-Inhibition an. Hier wurde auch gezeigt, dass Zellen mit amp*KRAS* hypersensibel auf Wachstumsfaktorstimulation reagieren.<sup>91</sup>

### 8.2.4 Inhibition der RAS-abhängigen Signalwege

Eine direkte *KRAS*-Inhibition erschien lange Zeit als schwierig, dies liegt u.a. an den komplexen Bindungsstellen und Interaktionen.<sup>92</sup> Inzwischen befinden sich zwei *KRAS*-Inhibitoren in klinischen Studien, diese inhibieren spezifisch mutiertes *KRAS* und sind somit für die hier untersuchte MPAL nicht einsetzbar.<sup>93,94</sup> Jedoch liegen unterschiedliche Inhibitoren vor, die an den verschiedenen Punkten des RAS-Signalweges ansetzen. In Anbetracht der heutigen Studienlage in Zusammenschau mit den Ergebnissen der Analysen kommen weitere Therapieansätze in Frage.

#### 8.2.4.1 Inhibition von RAS und RAS-related proteins

Die erste Gruppe betrifft die Inhibition der *KRAS*-Aktivierung selbst. Aufgrund des Mangels suffizienter direkter RAS-Inhibitoren ist die SOS-Inhibition aus heutiger Sicht ein weiterer möglicher Therapieansatz in Malignomen mit RAS-Aktivierung. Präklinische Studien zeigen anhand von SOS1-Inhibition eine deutliche Reduktion der RAS-GTP-Niveaus mit nachfolgender signifikanter Inhibition des MAPK-Signalweges. Mit BI-3406 liegt ein oraler SOS1-Inhibitor vor, der in der präklinischen Testung bei Lungenkarzinomen (NSCLC) über eine angenommene Unterbindung der MEK-Feedback-Reaktivierung *KRAS*-abhängige Malignome sensibel auf MEK-Inhibition macht.<sup>95</sup> An Leukämiezellen mit mut*KRAS* konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass eine SOS1-Überexpression zur Aktivierung der Wildtypallele von *NRAS* und *HRAS* führt.<sup>96</sup> In der MPAL konnte zwar weder eine signifikante Überexpression von *SOS1*, *HRAS* oder *NRAS* gefunden werden, dennoch erscheint eine mögliche Wirkung über Abschwächung der *KRAS*-Aktivierung gegeben.

Zur Rolle des in der MPAL überexprimierten *SOS2* ist weniger bekannt. Es wurde nachgewiesen, dass *SOS2*-getriggerte Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges für die maligne Transformation von Zellen mit mut*KRAS* notwendig ist und sie vor Apoptose schützt.

SOS2-Knockdown führt in mutKRAS-Zellen entsprechend zur Reduktion der pAKT-Niveaus, nimmt jedoch kaum Einfluss auf die pERK-Niveaus. Für die Transformation scheint nur die GEF-Aktivität des SOS2 und nicht die Feedbackregulation durch GTP-Stabilisierung ausschlaggebend zu sein. Ein Inhibitor für SOS2 ist noch nicht verfügbar, in Zusammenschau mit den anderen Ergebnissen spricht diese Beobachtung aber für eine mögliche Wirksamkeit einer PI3K-Inhibition in der MPAL.<sup>97,98</sup>

### 8.2.4.2 MEK-Inhibition

Weitere Therapiemöglichkeiten liegen in der Inhibition der RAS-induzierten Signalwege. Auch in der MPAL erschien es primär aufgrund der prominenten Aktivierung des MAPK-Signalweges sinnvoll, diesen Weg zu inhibieren: Ein Inhibitor, der hier eingreift und zum Zeitpunkt der Erstrezidiv bereits für solide Tumoren zugelassen war, ist der Multi-Kinase-Inhibitor Sorafenib, der u.a. die RAF-Kinasen, FLT3, PDGFR  $\alpha$  und  $\beta$ , VEGFR1-3 und c-KIT inhibiert. Studien belegen die Sicherheit und Wirksamkeit in Kombination mit Clofarabin und Cytarabin in refraktärer AML.<sup>99,100</sup> Bei verschiedenen akuten Leukämien des Erwachsenenalters, inkl. BAL wurde eine sichere Inhibition von FLT3 und ERK nachgewiesen, weshalb zumindest für Leukämien mit FLT3-Mutation ein Einsatz empfohlen werden kann.<sup>101,102</sup> FLT3-Inhibition wurde auch von Alexander et al. als mögliches Therapeutikum zur Behandlung von ZNF384r+ Leukämien empfohlen.<sup>48</sup> Diese Empfehlungen lagen zum Zeitpunkt der Auswahl von Sorafenib noch nicht vor, bestärken aber prinzipiell die Wahl des Therapeutikums für die Behandlung der MPAL. Klinisch wie auch in der Laboranalysen gibt es keinen sicheren Hinweis auf ein ausreichendes Ansprechen auf die Sorafenib-Therapie. In der Therapiephase wurde mit Sorafenib in Kombination mit starken Chemotherapeutika ein Zurückdrängen der Leukämieblasten erreicht, die Stammzelltransplantation erfolgte jedoch bereits in der Aplasie ohne erneuten Nachweis eines Remissionsmarks. In den FISH-Analysen konnte keine Selektion eines Subklons mit abweichendem Genotyp während Sorafenib-Therapie nachgewiesen werden.

Da MEK1/2 die einzigen ERK-Aktivatoren sind, besitzt die Regulation durch MEK eine Schlüsselrolle und ist damit sinnvoller Ansatzpunkt in der medikamentösen Therapie.<sup>66</sup> So korreliert der Spiegel vom phosphoryliertem ERK (pERK) gut mit der Wirksamkeit einer MEK-Inhibition.<sup>45</sup> In den letzten Jahren spielen die MAPK-Kinase-Inhibitoren (MEKi) eine zunehmend wichtige Rolle. Es gibt bereits mehrere Wirkstoffe, die für die Therapie verschiedener solider Tumoren zugelassen sind. Insbesondere der Wirkstoff Selumetinib ist als *orphan drug* auch zur Behandlung von Kindern mit Neurofibromatose zugelassen.

Aktuell laufen klinische Studien zum Einsatz bei RAS-abhängigen Leukämien. Jedoch beziehen sich die Daten präklinischer Studien nur auf Leukämien mit aktivierenden *mutKRAS*. So sprechen B-ALL des Kindesalters mit Mutationen des RAS-Signalwegs gut auf MEK-Inhibition mit Selumetinib an, Leukämien ohne *KRAS*-Affektion oder anderen aktivierenden Mutationen zeigen zumeist wenig Ansprechen. Die Leukämien mit aktivierenden Mutationen wiesen im Vergleich zu denen mit *wtKRAS* entsprechend erhöhte pERK-Spiegel auf. Das Ansprechen auf Selumetinib korrelierte mit dem pERK-Spiegel. Im murinen Xenograft-Modell zeigte sich eine deutliche Reduktion der Leukämiezellen unter MEKi sowie eine deutlich reduzierte meningeale Infiltration durch Blasten.<sup>45</sup>

Ähnliche Beobachtungen mit Nachweis einer Apoptoseinduktion unter MEKi wurden auch für MLL-positive Leukämien mit *mutKRAS* gemacht. Zusätzlich konnte diese Studie zeigen, dass der Einsatz von MEKi in allen Leukämien, also auch mit *wtKRAS* das Ansprechen auf Prednisolon verbessert.<sup>103</sup>

Die daraus resultierende Hypothese einer synergistischen Wirkung von MEKi und Glukokortikoiden bei *mutRAS*-ALL wurde in einer präklinischen Studie für ALL im Kindesalter bestätigt. Hier zeigt sich eine massive Induktion des proapoptotischen *BCL2L11* unter Selumetinib und Dexamethason. Im Xenograft-Modell zeigt sich hierbei eine deutlich verbesserte antitumorale Wirkung für die Kombination als für die Monotherapie beider Substanzen.<sup>104</sup> Auch das Ansprechen auf das Folsäureantagonisten Methotrexat kann durch MEKi verbessert werden.<sup>45</sup>

Prinzipiell sprechen die obigen Ergebnisse für eine mögliche Wirkung von MEKi auf die MPAL. Jedoch gibt es eine Studie, die die Mechanismen von RAS-Aktivierung bei gastroösophagealen Karzinomen mit *ampKRAS* und *mutKRAS* vergleicht. Für die Gruppe mit *ampKRAS* besteht ein signifikant schlechteres Outcome. Die Studie zeigte, dass *ampKRAS*-Zellen höhere mRNA-Spiegel von *KRAS* im Vergleich zu *mutKRAS* aufwiesen. siRNA-induziertes *KRAS-silencing* führt in allen Zelltypen (*mutKRAS*, *ampKRAS*, *wtKRAS*) zu einer signifikanten Reduktion der Zellproliferation. Die Untersuchung der Inhibition von MAPK- und PI3K-Signalweg wies jedoch signifikante Differenzen zwischen *mutKRAS* und *ampKRAS* nach: Nach MEKi zeigten allein die Zelllinien mit *ampKRAS* nach 72h eine abnehmende Apoptoserate trotz weiterhin stabiler pERK-Inhibition. Diese Zellen wiesen im Gegensatz zu allen anderen eine starke pAKT-Induktion auf. Zu den gleichen Resultaten führte der Einsatz eines ERK-Inhibitors trotz sicheren Nachweises einer suffizienten MAPK-Blockade.<sup>40</sup>

Als Erklärungsversuch wurde die Hypothese aufgestellt, dass die negative pERK-Feedbackhemmung durch die MEKi beeinträchtigt wird und das amplifizierte *KRAS* somit noch stärker den bereits erhöhten *KRAS*-Proteinspiegel aktivieren kann. Das deckt sich auch mit dem Ergebnis, dass Zellen mit *ampKRAS* bereits initial höhere Spiegel an RAS-GTP aufweisen als *mutKRAS* und dennoch nach MEKi die RAS-GTP-Spiegel auf bis zu 500% weiter ansteigen. *mutKRAS*-Zellen zeigen keinen solchen Anstieg. Gleiche Effekte wurden auf Stimulation mit dem Wachstumsfaktor EGF gesehen.<sup>40</sup> Analog ist daher anzunehmen, dass eine MEKi bei *ampKRAS*-Leukämien ähnlich wie beim gastroösophagealen Karzinom allein nicht effizient ist.

Da die obigen Ergebnisse auf eine Selbstinduktion von RAS-GTP hinweisen, rückt die SOS-Inhibition (s. Abschnitt 8.2.4.1) erneut ins Blickfeld: *SOS-Silencing* führte *in vitro* zu einer Unterbindung der RAS-GTP-Induktion, des *pAKT-Rebound* plus einer Reduktion der pERK-Spiegel. Während die Kombination aus MEKi und SOS-Inhibition in *mutKRAS*-Zellen nur leichte Aktivität zeigte, führte es in den *ampKRAS*-Zellen zu einer signifikanten Apoptoseinduktion.<sup>40</sup>

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde noch ein weiterer Ansatzpunkt untersucht: Die Inhibition der Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP2, welche die SOS-vermittelte *KRAS*-Aktivierung erleichtert. Ein SHP2-Inhibitor in Kombination mit MEKi zeigte eine Unterbindung der RAS-GTP-Aktivierung sowie Prävention der *pAKT*-Induktion in *ampKRAS*-Zellen.<sup>40</sup> Aktuell erfolgen erste klinische Studien zum Einsatz von SHP2-Inhibitoren bei soliden Tumoren.<sup>105</sup>

Auch weitere Veränderungen können die Wirksamkeit von MEKi unterbinden: So sind *CDKN2A*-Deletionen mit erhöhter MEKi-Resistenz assoziiert.<sup>66</sup>

### 8.2.4.3 ERK-Inhibition

Die ERK-Inhibition (ERKi) unterliegt möglicherweise ähnlichen Resistenzmechanismen wie die MEKi. Allerdings konnte die Wirksamkeit eines ERK-Inhibitors (SCH772984) in Xenograft-Modellen von Melanom und Pankreaskarzinomen mit *mutRAS* und nachgewiesener MEKi-Resistenz beweisen werden. Es wird vermutet, dass diese Resistenzüberwindung auf der Unterbindung der RAF-Feedback-Regulation von pERK basiert.<sup>106</sup> Der ERK-Inhibitor Ulixertinib zeigt in ersten klinischen Studien eine akzeptable Anwendungssicherheit und klinische Aktivität in soliden Tumoren.<sup>107</sup>

#### 8.2.4.4 PI3K-Inhibition

Nicht nur der MEKi-Resistenzmechanismus scheint PI3K-Akt-vermittelt zu sein, auch die onkogene Wirkung von RAS-Aktivierungen scheint nicht allein MAPK-abhängig zu sein: So wurde an Fibroblasten im Mausmodell gezeigt, dass sie keine RAS-induzierte Tumorgenese aufweisen, wenn die RAS-Aktivierung des PI3K durch eingeschleuste Mutation der katalytischen PI3K-Untereinheit p110 $\alpha$  unterbunden wird. Während beim Wildtyp-PI3K sowohl die Spiegel von pERK wie pAKT ansteigen, kommt es bei homozygoter p110 $\alpha$ -Mutation zu einem deutlich reduzierten pAKT-Anstieg, das Ansprechen auf den Wachstumsfaktor FGF2 ist komplett unterbrochen.<sup>108</sup>

In der oben beschriebenen Studie zu gastroösophagealen Karzinomen wird eine Adaptation mit pAKT-Induktion über PI3K für ampKRAS-Zellen beschrieben. Dennoch zeigte alleinige PI3K-Inhibition (PI3Ki) in beiden Zelllinien (ampKRAS und mutKRAS) nur einen leichten Effekt, während eine erfolgreiche Koinhibition von MEKi und PI3Ki durchgeführt wurde.<sup>40</sup>

Diese wie auch weitere Studien an soliden Tumoren zeigten zwar eine antitumorale Aktivität von PI3Ki, jedoch war die Dosis aufgrund der Toxizität limitiert.<sup>40,109,110</sup> Für AML mit RAS-Mutation wurde bei hoher Toxizität keine ausreichende Wirkung beobachtet.<sup>111</sup>

### 8.2.5 **Zellzyklus**

#### 8.2.5.1 CDKN2A und CDKN2B

Auch in Hinblick auf die Aktivierung des MAPK-Signalweges erscheinen die Veränderungen des p53-Signalweges in der hier untersuchten MPAL relevant: Die oben aufgeführten Ergebnisse zeigen eine heterozygote und teils sogar homozygote Deletion von *CDKN2A* und *CDKN2B* für beide Erkrankungsstadien. Abweichend hierzu besteht für *CDKN2A* eine Überexpression in der MPAL, diese könnte aufgrund der Deletion jedoch von den gesunden Zellen getragen werden.

Deletionen von *CDKN2A/B* sind die häufigste Ursache von p53-Signalweginaktivierung bei pädiatrischen Leukämien, so weisen ca. 25% aller ALL eine dieser Deletionen auf. Studien weisen hierbei eher auf einen sekundären Erwerb in der Onkogenese hin. Die prognostische Relevanz dieser Veränderungen ist unklar: Einige Studien ergaben keinen Einfluss während andere ein schlechteres Outcome für Leukämien mit *CDKN2A/B*-Deletion zeigen. Möglicherweise sind die unklaren Ergebnisse auch in den unterschiedlichen Einschlusskriterien in Bezug auf B- und T-Zell-Leukämien begründet.<sup>112</sup>

## Diskussion

TP53 ist ein multipotenter Tumorsuppressor, der u.a. nach DNA-Schädigung die DNA-Reparatur induziert, zum reversiblen Arrest des Zellzyklus führt und letztendlich auch Apoptose induzieren kann. So sind in allen Tumoren Veränderungen des p53-Signalweges am häufigsten. *CDKN2A* kodiert dabei über alternatives Splicing für 2 Proteine: P14<sup>ARF</sup> inhibiert den TP53-Inhibitor MDM2. P16<sup>INKA</sup> sowie das von *CDKN2B* kodierte p15<sup>INKB</sup> binden wiederum an CDK4 und inhibieren den CDK4/CDK6/Cyclin1-Komplex, welcher die Phosphorylierung von Rb1 mit der Freisetzung des E2F-Transkriptionsfaktors katalysiert. Dieser ist verantwortlich für die den Wechsel des Zellzyklus von der G1 in die S-Phase und der damit verbundenen Zellteilung. Die Unterdrückung dieses Signalweges führt damit zu unkontrollierbarer Proliferation. Zusätzlich erfolgt die Aktivierung von *CDKN2A/B* über TGFB (*transforming growth factor*), das hierfür benötigte Rezeptorgen *TGFBR1* ist jedoch in der MPAL signifikant unterexprimiert. Des Weiteren erfolgt eine Suppression von TP53 durch KRAS. Eine zusätzliche Destabilisierung von TP53 kann die in der MPAL nachgewiesene Unterexpression des TP53-Stabilisators *EGLN3* bewirken.<sup>113</sup>

Zur gezielten Therapie von Malignomen mit p53-Signalwegveränderungen liegen schon einige Inhibitoren vor. CDK4/CDK6-Inhibitoren wie Palbociclib, Ribociclib und Abemaciclib weisen eine gute Wirksamkeit bei Tumoren mit *CDKN2A*-Deletion auf. Palbociclib ist bereits für die Therapie von Brustkrebs zugelassen. Ergebnisse klinischer Studien bei Kindern liegen bisher nicht vor. Diese Inhibitoren können z.B. mit MEKi oder PI3Ki kombiniert werden.<sup>112</sup>

Außerdem steht mit Idasanutlin ein MDM2-Inhibitor zur Verfügung, welcher die *TP53*-Expression verstärkt. Auch *MDM2* ist in der MPAL signifikant überexprimiert, so dass eine zusätzliche TP53-Inhibition anzunehmen ist. Da Idasanutlin jedoch nur beim Vorliegen von Wildtyp-*TP53* wirksam ist, wurden in Hinblick auf einen möglichen Therapieansatz die vorliegenden Transkriptomsequenzierungsdaten der MPAL (welche in der vorliegenden Arbeit jedoch sonst nicht berücksichtigt wurden) auf das Vorliegen möglicher *TP53*-Mutationen untersucht, es fanden sich lediglich zwei Polymorphismen. Eine Kombination verschiedener Inhibitoren erscheint auch hierbei sinnvoll, da verschiedene Studien zeigen, dass die MDM2-Inhibition langfristig zum Erwerb resistenter Subklone mit *TP53*-Mutation führen kann.<sup>114,115</sup>

#### 8.2.5.2 CCNA1

Das in der MPAL stark überexprimierte *CCNA1* kodiert für das Zellzyklusprotein Cyclin A1, dessen Expression während der S- und G2-Phase zur Progression des Zellzyklus führt. Seine Überexpression führt dort u.a. zur Suppression des Tumorsuppressors WT1 und kann so in den Zellen proliferativ und antiapoptotisch wirken.<sup>116</sup>

Normalerweise wird es nur in Hoden, Gehirn sowie in CD34+-HSC exprimiert, jedoch ist es auch in 50% der AML-LSC nachzuweisen. Medikamentöse Inhibitoren liegen zwar nicht vor, jedoch zeigte sich *CCNA1 in vitro* als geeignetes leukämie-assoziiertes Antigen für eine spezifische T-Zell-Therapie.<sup>117</sup>

#### 8.2.5.3 DAPK1

Die MPAL weist eine niedrige Expression des Tumorsuppressors *DAPK1* (*death-associated protein kinase 1*) auf, welcher Vermittler der ER-stress-induzierten Apoptose ist. *DAPK1* ist in vielen Tumoren meist durch Methylierung unterexprimiert und ist meist mit aggressiverem Phänotyp assoziiert. Die experimentelle Induktion von *DAPK1* kann eine *KRAS*-abhängige maligne Transformation durch ERK-Interaktion verhindern. Zusätzlich weisen Analysen auf eine p53- und p19ARF-abhängige Apoptoseinduktion hin, so kann nur in Abhängigkeit dieser funktionsfähigen Proteine der Zelltod initiiert werden. Ein klinisch anwendbares Medikament ist bisher nicht verfügbar.<sup>118</sup>

### 8.2.6 Apoptose

#### 8.2.6.1 BCL2

Ein weiteres Gen der *Pic* war bereits in den zytogenetischen Analysen in den Fokus der Untersuchungen gerückt. So wurden FISH-Sonden für den *BCL2*-Genlokus auf dem im Rezidiv amplifizierten Abschnitt von 18q eingesetzt, um die Anordnung in den aberranten Chromosomen zu untersuchen (s. Abbildung 25).

Das antiapoptotisch wirkende *BCL2* gehört zur *BCL2*-Familie und wurde primär durch die Translokation t(14;18) mit der IgH-Promotorregion in B-Zell Lymphomen bekannt. In diesem Fall führt die Translokation zur *BCL2*-Überexpression, jedoch zeigen spätere Studien auch eine nicht-translokationsbedingte Überexpression in weiteren hämatologischen Malignomen: So wurde eine Überexpression für adulte AML nachgewiesen, diese bestand insbesondere zum Zeitpunkt der Erst- bzw. Rezidivdiagnose, während die Niveaus in der Remissionsphase deutlich niedriger lagen. Der Nachweis einer *BCL2*-Überexpression korrelierte signifikant mit der Zuordnung zum morphologischen Phänotyp FAB M0 und M1 sowie mit CD34-Positivität und legt eine Überexpression in eher unreifen

## Diskussion

leukämischen Blasten nah. Diese Studie zeigte keinen Einfluss auf das OS.<sup>119</sup> Weitere Studien kamen jedoch zu dem Schluss, dass eine Überexpression mit niedrigeren Remissionsraten und einem schlechteren Outcome assoziiert sind.<sup>120</sup>

Auch in 84% der lymphoblastischen B-Vorläufer Leukämien zeigte sich eine *BCL2*-Überexpression. Im Vergleich dazu zeigen gesunde hämatopoetische Vorläuferzellen des Knochenmarks regulär eher niedrige Expressionsspiegel, während periphere Blutzellen hohe Niveaus aufweisen.<sup>121</sup>

Für ALL zeigt sich kein prognostischer Einfluss des Vorliegens einer aberranten *BCL2*-Expression. Dieselbe Studie vermutete eine *BCL2*-Hochregulation zum proliferativen Vorteil von Blasten mit anderen *founder*-Mutationen, wie z.B. einem *BCR-ABL*-Rearrangement.<sup>122</sup>

So zeigten auch Versuche an murinen Tiermodellen, dass eine induzierte *BCL2*-Überexpression nur in Kombination mit *cMYC*-Aktivierung unreife lymphoblastische Leukämien induzieren kann. Alleinige *BCL2*-Induktion führt dahingegen ausschließlich zur Entwicklung von B-Zell-Lymphomen. Durch *BCL2*-Inhibition kann in den Leukämien eine Remission mit verlängertem Überleben erreicht werden.<sup>123</sup>

Diese Hypothese deckt sich auch mit den Ergebnissen dieser Promotionsarbeit: In der MPAL lag noch keine Kopienzahländerung von *BCL2* vor, jedoch zeigen die Genexpressionsdaten bereits eine starke Überexpression. In den weiteren Erkrankungsstadien schreitet die *BCL2*-Amplifikation und wahrscheinlich damit verbunden die Zunahme der Genexpression fort. Diese *BCL2*-Mutation ist nicht Ursache der malignen Entartung, stellt jedoch wahrscheinliche eine relevante *driver*-Mutation dar. Auch die oben beschriebene Assoziation von *BCL2*-Überexpression mit unreifen Leukämietypen von ALL wie auch AML unterstützt die Vermutung, dass die erhöhte *BCL2*-Expression in der HSC-nahen, CD34-positiven MPAL eine relevante Rolle spielt. Umso wichtiger ist diese Erkenntnis, da mit Venetoclax seit 2016 ein oraler *BCL2*-Inhibitor zur Therapie bei refraktärer CLL in Deutschland zugelassen ist.

Die antiapoptotische Wirkung von *BCL2* basiert auf der Inhibition von proapoptotischen Proteinen der *BCL2*-Familie (*BAX*, *BAK*), die sonst durch die Erhöhung der mitochondrialen Membranpermeabilisierung zur Apoptose führen. Zusätzliche Regulation des Systems erfolgt durch die dritte Gruppe der Proteinfamilie, der *BH3-only* Proteine, welche durch Bindung an die jeweilige *BH3*-Domäne entweder direkt über *BAX/BAK*-Aktivierung oder indirekt als *BCL2*-Antagonisten proapoptotisch wirken.<sup>124</sup>

## Diskussion

Venetoclax ist ein wirksames und sicheres BH3-Mimetikum, welches mit hoher Affinität an die BH3-Domäne des BCL2-Proteins bindet und dieses inhibiert.<sup>125</sup> Klinische Studien bestätigten die Sicherheit und Wirksamkeit von Venetoclax an adulten AML-Patienten. Sowohl als Monotherapie wie auch in Kombination führte die Anwendung zu signifikant verbesserten Remissionsraten und OS.<sup>126</sup> Die prinzipielle Wirksamkeit auf pädiatrische Malignome wurde bereits in präklinischen Studien bewiesen, insbesondere die Gruppe der Hochrisiko-ALL mit *TCF3-HLF*-Translokation zeigte ein gutes Ansprechen.<sup>125,127</sup>

Aktuell laufen erste klinische Studienphasen zur Anwendung von Venetoclax bei refraktären bzw. rezidivierenden Malignomen bei Kindern. Eine Studie schließt hierbei auch explizit die Gruppe der AUL mit ein. Erste Zwischenberichte weisen auf eine Wirksamkeit und tolerable Verträglichkeit hin, ein Vorteil für die Kombination von Venetoclax mit konventioneller Chemotherapie gegenüber Venetoclax-Monotherapie scheint zu bestehen.<sup>127–129</sup>

*BCL2* ist nicht das einzige Mitglied der BCL2-Familie, welches in der MPAL dysreguliert ist. So wurde auch eine Überexpression des proapoptotischen *BCL2L11*-Gens in der MPAL nachgewiesen. Trotz seiner potenziell antitumoralen Wirkung wurde in einer Studie nachgewiesen, dass nur Zellen, die bereits eine hohe Bindung von BCL2L11 an den BCL-2-Proteinen aufweisen, auf BCL2-Inhibitoren ansprechen. Hintergrund ist die Freisetzung des gebundenen BCL2L11 als Folge der Verdrängung durch den Inhibitor und der direkten Aktivierung der BAX/BAK-induzierten Membranpermeabilisierung durch BCL2L11.<sup>124</sup>

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen für eine mögliche Wirksamkeit von Venetoclax auf die MPAL. Die Wirksamkeit von Venetoclax kann jedoch durch andere Faktoren vermindert werden und die Leukämiezellen können Resistenzen bilden: So kann die Inhibition von BCL2 zu einer Hochregulation des antiapoptotischen MCL1 der gleichen Familie führen, welches nicht von Venetoclax inhibiert wird. Die Kombination mit hypomethylierenden Medikamenten wie 5-Azacytidin oder Decitabine führte hierbei zur Reduktion der MCL1-Spiegel.<sup>125</sup>

Auch zeigt sich keine Abhängigkeit der Therapiesensitivität von *CDKN2A/B*-Deletionen, was insofern überraschend ist, da für Leukämien mit p53-Signalwegveränderungen ein nachgewiesen vermindertes Ansprechen auf Venetoclax besteht. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass eine Aktivierung des MAPK-Signalweges zur Stabilisierung von MCL1 durch Phosphorylierung führt. Die bei Leukämien mit *TP53*-Deletion fehlende

Hemmung der MAPK-Signalkette führt zu hohen MCL1-Spiegeln mit entsprechender antiapoptotischer Wirkung und Resistenzbildung.<sup>130</sup> Daher scheint die Kombination von Venetoclax mit MEKi ein möglicher Therapieansatz zu sein, der daher für die Testung an den MPAL-Zellen naheliegt.

Eine weitere Option ist die kombinierte medikamentöse Aktivierung von TP53 durch MDM2-Inhibitoren wie Idasanutlin (s. Abschnitt 8.2.5.1). Eine Studie, welche die Anwendung von Venetoclax in Kombination mit Idasanutlin oder dem MEK Inhibitor Cobimetinib bei refraktärer AML bei Erwachsenen untersucht, weist auf eine verbesserte Effektivität im Vergleich zur Monotherapie hin.<sup>131</sup> Eine erste Studie zur Verträglichkeit und Wirksamkeit von Venetoclax in Kombination mit Idasanutlin bei refraktären Leukämien und anderen soliden Tumoren untersuchen läuft aktuell (ClinicalTrials.gov, NCT04029688).

### 8.2.6.2 TGF- $\beta$

Proteine der TGF- $\beta$ -Familie sind Cytokine mit multiplen Funktionen, insbesondere in der Tumorsuppression. In der MPAL sind 3 Gene der Familie von Veränderungen betroffen: TGF- $\beta$ -Rezeptor 1 (*TGFBR1*) sowie die Mediatoren *SMAD3* und *SMAD4* zeigen eine verminderte Expression. Das kann zu einer relevanten Reduktion der Aktivität dieses Signalweges führen: Der nach Bindung von TGF $\beta$  durch Autophosphorylierung aktivierte TGFBR1 phosphoryliert SMAD2 und 3, welche in der Folge mit SMAD4 oligomerisieren und in dieser Form als Transkriptionsregulator fungieren.<sup>132</sup>

Die Phosphorylierung von SMAD2 und 3 wird auch durch Aktivin gefördert. Mit dem *FSTL3* (follistatin-like 3)-Gen ist ein Aktivin-Antagonist in der MPAL amplifiziert. *FSTL3* ist z.B. in Mammakarzinomen überexprimiert und Hemmung führt zum Wachstumsstopp.<sup>133</sup> Zur Rolle in einer potenziellen Leukämogenese gibt es keine Studien, es ist jedoch als Translokationspartner bei hämatologischen Malignomen nachgewiesen beschrieben.<sup>134</sup>

Eine Aktivierung des TGF- $\beta$ -Signalweges führt in frühen Tumorstadien über ERK-Feedback-Hemmung zu einem Wachstumsstopp. So kann die Reduktion der tumorsuppressiven Funktion des TGF- $\beta$ -Signalweges ein weiterer Baustein für die Aggressivität der Erkrankung sein. Ein alleiniger *SMAD*-Verlust ist unzureichend für die Initiation einer Leukämie, in soliden Tumoren führt eine Kombination aus *RAS*-Mutation mit *SMAD4*-Defizienz zur einer raschen Progression der Erkrankung, während beide Mutationen allein dies nicht bewirkten.<sup>135,136</sup>

TRAF4 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 4) ist ein TGF- $\beta$ -Stimulans, Überexpression, wie auch für die MPAL nachgewiesen, ist für einige solide Tumoren nachgewiesen und führt dort zu Proliferation und Metastasierung.<sup>137</sup>

Paradoxerweise zeigen Studien verschiedenster Malignome, dass in fortgeschrittenen Tumorstadien keine TGF- $\beta$ -Spiegel-abhängige Suppression mehr zu beobachten und ERK dauerhaft aktiviert ist. Welche Mechanismen dazu führen, ist noch nicht abschließend geklärt. Jedoch wurde nachgewiesen, dass TGFBR1 auch eine Tyrosinkinaseaktivität aufweist und so über GRB2- und SOS-Interaktion den RAS-Signalweg aktivieren kann. TGFBR1 hat damit Einfluss auf die ERK-Phosphorylierung, während wiederum ERK und andere MAPK auch die SMAD-abhängigen Signalwege über Phosphorylierung von SMAD 2 und 3 regulieren können.<sup>132</sup>

In diesem Zusammenhang erscheint jedoch ein Therapieansatz über TGF- $\beta$ -gerichtete Therapie in der MPAL nicht primär zielführend, da aufgrund der anderen Veränderungen von einer überproportionalen ERK-Aktivierung auszugehen ist, die unabhängig vom TGF- $\beta$ -Signalweg besteht.

### 8.2.6.3 RAC1

*RAC1* kodiert für eine GTPase der Rho-GTPase-Familie (small GTP-binding protein) und ist in der MPAL überexprimiert. Diese GTPasen katalysieren den Wechsel zwischen inaktiver GDP-gebundener und aktiver GTP-gebundener Form. Eine Überexpression von *RAC1* und *RAC2* wird häufig in Leukämien gesehen, beide führen zu verstärktem Wachstum und Überleben der Blasten durch Apoptosehemmung.<sup>138</sup>

Ein weiterer wichtiger Pathomechanismus der *RAC1*-Überexpression betrifft eine veränderte Interaktion der Blasten mit ihrer Umgebung: *RAC1*-Überexpression erleichtert die Niederlassung CD34-positiver myeloischer Leukämiezellen im Knochenmark. Hierdurch befinden sich mehr Blasten im G0-Ruhezustand, was zu einem verminderten Ansprechen von Chemotherapie führt.<sup>139</sup>

Ein Knockdown von *RAC1* kann diese Mechanismen deutlich verringern und so auf Chemotherapie sensibilisieren.<sup>140</sup> In präklinischen Studien führen *RAC1*-Inhibitoren zur Apoptoseinduktion in Leukämiezellen ohne Affektion normaler mononuklearer Zellen des Knochenmarks.<sup>138</sup> Allerdings kann eine *RAC1*-Inhibition auch zu Resistenz gegen Topoisomerase II-Hemmer wie Doxorubicin führen. Es wird angenommen, dass *RAC1* für die Induktion der DNA-Schadensantwort benötigt wird.<sup>141</sup>

#### 8.2.6.4 STAT4

Der in der MPAL unterexprimierte Tumorsuppressor *STAT4* (signal transducer and activator of transcription 4) ist wichtiger Mediator des JAK-STAT-Signalweges. In hämatologischen Malignomen kann *STAT4*-Aktivierung die B-Zell-Apoptose induzieren.<sup>142</sup>

### 8.2.7 Weitere potenziell leukämierrelevante Gene

#### 8.2.7.1 ETV6

*ETV6* ist primär als Translokationspartner von *RUNX1* in der häufigsten Translokation bei präB-ALL des Kindesalters bekannt. In der MPAL liegt eine solche Translokation nicht vor, aber *ETV6* ist heterozygot deletiert (somit nicht exprimiert). Es wird vermutet, dass *ETV6* als Tumorsuppressor fungiert und die fehlende Expression ausschlaggebend für die Tumorentstehung ist. Auch Keimbahnmutationen prädisponieren zur Entwicklung familiärer ALL.<sup>143</sup>

#### 8.2.7.2 CDC42

Das *CDC42*-Gen (*cell division control protein 42 homolog*), welches die Zellpolarität und Teilungssymmetrie reguliert, zeigt in der MPAL eine signifikant erhöhte Expression. Eine Studie an AML-Zelllinien zeigte, dass hohe Expressionsniveaus an der Transformation von hämatopoetischen Progenitorzellen zu AML beteiligt sind. Die Suppression von *CDC42* führt zu einer deutlichen Zunahme der Differenzierung und Reduktion der Progression.<sup>144</sup>

#### 8.2.7.3 MGST1

Das *MGST1*-Gen, welches die mikrosomale Glutathion-S Transferase kodiert, ist sowohl in der Ersterkrankung wie auch im Rezidiv deletiert und weist in der MPAL eine sehr niedrige Expression auf. Für solide Tumoren, wie Lungenkarzinome, wird sie zwar als Onkogen beschrieben<sup>145</sup>, in dem Kontext der MPAL ist jedoch ihre essenzielle Funktion in der Hämatopoese wichtiger: *MGST1* wird in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen in Mäusen hoch exprimiert. Ein *MGST1*-Knockdown führt zu einer deutlichen Reduzierung der Blutzelldifferenzierung.<sup>146</sup> So kann die Deletion von *MGST1* möglicherweise im Zusammenhang mit der mangelnden Differenzierung der MPAL stehen.

#### 8.2.7.4 Sequenzierte Kandidatengene

In den CNA-Untersuchungen wurden Kandidatengene mit aberranter Kopienzahl aufgrund ihrer möglichen Tumorassoziation benannt (s. Abbildung 8), die Sequenzierung ergab keine relevanten Mutationen. Einige dieser Gene wurden schon zuvor in Hinblick

auf ihre Beteiligung in der Leukämogenese diskutiert, während die Funktion anderer weniger relevant erscheint:

Für das heterozygot deletierte Tumorsuppressorgen *APC2* (adenomatosis polyposis coli 2) liegen keine Literaturdaten im Zusammenhang mit einer möglichen Leukämogenese vor.

Der Tumorsuppressor RERG (RAS-like estrogen-regulated, growth inhibitor) unterliegt einer östrogenabhängigen Regulation und seine Relevanz wurde bisher nur für hormonabhängige Tumoren belegt.<sup>147</sup>

Das *SHC2* (Src homology 2 domain containing transforming protein 2)-Gen wurde primär ausgewählt, da es CD95-vermittelt aktivierend auf den MAPK- und den PI3K- Signalweg wirken kann.<sup>148</sup> Es liegt für *SHC2* keine aberante Expression in der MPAL vor.

Der Verlust der Serin-Threonin-Kinase STK11 ist mit einer leukämischen Progression myeloproliferativer Erkrankungen assoziiert.<sup>149</sup> Das amplifizierte Gen weist keine inaktivierenden Mutationen auf.

In diversen Tumoren wurde das onkogene Potenzial von *YES1* (Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1) belegt und seine Hochregulation als Resistenzmechanismus gegen eine IFGR1-Blockade gezeigt.<sup>150,151</sup> Jedoch scheint die Amplifikation in der MPAL keine relevante *driver*-Funktion zu haben, bereits initial zeigte sich keine Hochregulation und im Rezidiv kam es zur Deletion des vormals amplifizierten Gens.

### 8.3 Chromosomale Instabilität

In den zytogenetischen Analysen mittels konventioneller Chromosomenanalyse und FISH einschließlich SKY wurden komplexe Chromosomenaberrationen in den Leukämieblasten nachgewiesen. Diese zeigten sich im Krankheitsverlauf immer stärker ausgeprägt und weisen so auf eine hohe chromosomale Instabilität (CIN) hin. Die Integrität des Genoms ist essenziell für ein kontrolliertes Zellwachstum und -überleben. Ein instabiles Genom ist Merkmal der meisten Neoplasien und gehört zu den sogenannten *hallmarks of cancer*.<sup>152</sup>

Normale Zellen besitzen eine Vielzahl von Mechanismen, die ihr Genom vor Schädigung schützen. DNA-Mutationen können sowohl durch endogene intrazelluläre Prozesse, wie z.B. Replikationsfehler oder Methylierung von Basen entstehen, als auch durch exogene Noxen, wie UV-Strahlung, ionisierende Strahlung und DNA-Interkalantien. Daraus resultieren Basendefekte oder -fehlpaarungen, aber auch Strangbrüche mit der Bildung von

Einzelstrang-DNA (*single-stranded DNA*, ssDNA) und Doppelstrangbrüchen (DSB). Basendefekte werden durch Kontrollmechanismen der Replikation wie *mismatch*-, Nukleotidexzisions- und Basenexzisions-Reparatur repariert, Insuffizienz dieser Mechanismen führt zu Punktmutationen, Leserasterverschiebungen und Mikrosatelliteninstabilität. Dagegen kann die Akkumulation von DSB zu einer exzessiven CIN mit großen chromosomalen Rearrangements, wie auch für die MPAL gezeigt, führen.<sup>153</sup>

Bei der Patientin waren weder eine Mutagen-Exposition noch ein Instabilitätssyndrom bekannt, so dass der Einfluss exogener Noxen in der Betrachtung vernachlässigt wurde. Daher sollen im Folgenden nun mögliche Ursachen der genetischen Instabilität diskutiert und mögliche Mechanismen der klonalen Evolution im Krankheitsverlauf dargestellt werden.

### 8.3.1 ***TCF3-ZNF384-Fusion***

Um einen ersten Anhalt für eine mögliche Ursache der chromosomalen Aberrationen zu gewinnen, wurden zunächst die Ergebnisse der Bruchpunktanalyse mit Literaturdaten abgeglichen. Auf den Chromosomen sind spezifische Regionen, sogenannte *common fragile sites* (CFSs) bekannt, welche unter Replikationsstress eine erhöhte Bruchrate aufweisen, während sie sich unter normalen Zellkulturbedingungen als stabil erweisen. CFSs sind in allen menschlichen Genomen nachweisbar und weisen keine strukturellen Aberrationen auf. Sie sind sowohl in Frequenz wie auch in der Verteilung der induzierten Brüche gewebespezifisch.<sup>154</sup>

Der Abgleich der Bruchpunkte mit der Datenbank menschlicher CFS (HumCFS<sup>155</sup>) ergibt, dass lediglich der Bruchpunkt im *TCF3* in der *rare fragile site* FRA19B liegt. Möglicherweise wurde die Translokation t(12;19) hierdurch begünstigt.

Auch wenn für einzelne MPAL ein komplexer Karyotyp beschrieben ist (s. Abschnitt 5.1.3), scheint die *TCF3-ZNF384*-Translokation nicht primär zu einer ausgeprägten Instabilität zu prädisponieren. Die Gruppe der *ZNF384r+-B/M-MPAL* zeigt im *whole exome sequencing* keine signifikant erhöhte CNA-Anzahl. Die in der *St. Judes*-Studie untersuchten MPAL weisen zwar in einigen der Fälle numerische Aberrationen (in Chr. 4, 6, 13, 14 und X) auf, jedoch zeigt die Aufschlüsselung nach tumorrelevanten Genen kaum Zugewinne. Eine Amplifikation, wie in dieser Promotionsarbeit für *KRAS* nachgewiesen, wurde nicht beschrieben, die beschriebenen Mutationen waren ausschließlich *missense* Mutationen.<sup>48</sup>

Möglicherweise liegt jedoch eine Assoziation mit weiteren Mutationen vor, die eine CIN verursachen können: Bei den B/M MPAL waren in 63% der Fälle Gene des RAS-Signalweg von Veränderungen betroffen.<sup>48</sup> Auch eine weitere Studie vermutet ein vermehrtes Auftreten von aktivierenden Mutationen des RAS-Signalweges und Deletionen von *CDKN2A/B* bei *ZNF384r+-BCP-ALL*.<sup>32</sup>

### 8.3.2 RAS-Mutationen und genetische Instabilität

Aktivierungen des RAS-Signalweges sind häufig mit der Entstehung einer CIN assoziiert. Diese tritt bereits früh in der Tumorgenese auf, wie für Kolonkarzinome mit CIN in >90% der Frühkarzinome belegt.<sup>156</sup> Bereits 1994 wurde nachgewiesen, dass durch eine *HRAS*-Induktion Fibroblasten mit zusätzlicher *TP53*-Mutation innerhalb eines Zyklus große chromosomale Aberrationen mit azentrischen, multizentrischen und *double minute* Chromosomen entwickeln können. In dieser Analyse wurde zudem gezeigt, dass die Entstehung der CIN durch *silencing* von *HRAS* mittels shRNA oder MEK-Inhibition verhindert werden kann.<sup>157</sup>

Weitere Studien verifizierten, dass der RAS-Signalweg an der Mitose beteiligt ist: Die Hochregulation von ERK führt zu einer veränderten Mikrotubulidynamik und Spindelunterbrechung, die Zellen weisen eine verkürzte G2/M Phase auf.<sup>158</sup> Möglicherweise lagern sich sowohl aktiviertes MEK1/2 wie auch ERK1/2 an Centrosomen und Spindelapparat an.<sup>152</sup> MEKi verzögert zwar die G2/M-Progression, hat jedoch keinen Einfluss auf die Regulation der Mitosespindel-Checkpunkte.<sup>159</sup> Die Mikrotubuliregulation erfolgt u.a. auch über das in der MPAL überexprimierte *CDC42* (s. Abschnitt 8.2.7.2).<sup>158</sup>

Untersuchungen mit RNAi-Screens haben ergeben, dass Zellen als Folge von konstitutiv aktivem KRAS mitotischem Stress zeigen und hypersensitiv auf Inhibition bestimmter mitotischer „Schlüssel-Proteine“ wie PLK1 und das Proteasom reagieren. Solche Inhibitionen können den Mitose-Stress verschärfen, um selektiv *RAS*-mutierte Krebszellen zu töten. Ein Therapieansatz mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib - wie inzwischen im aktuellen Therapieprotokoll AIEOP-BFM ALL 2017<sup>20</sup> für ALL im Kindesalter eingesetzt – scheint insbesondere für Leukämien mit *RAS*-Aktivierung sinnvoll.<sup>160</sup>

Neben einer dysregulierten Mitose ist auch eine behinderte Replikation sowie inadäquate *DNA damage response* (DDR) als Ursache der Strangbrüche zu sehen: So führt die Wachstumsstimulation durch *RAS*-Aktivierung zu replikativem Stress.

Versuche an gesunden Thyroidzellen zeigen, dass die experimentell induzierte Überexpression von aktiviertem *HRAS* (nach Transfer von mutiertem *HRAS* durch Adenovirus-

## Diskussion

Infektion) einen genotoxischen Stress mit nachfolgender DDR induziert. So reagieren die Thyroidezellen mit Akkumulation von DSB und Induktion von  $\gamma$ H2AX, einem Marker von DSB, sowie vermehrter ATM- und ATR-Aktivierung mittels CHK1-Phosphorylierung. Die ATM- und ATR-Kinasen sind zentrale Mediatoren der DDR und regulieren beispielsweise den Zellzyklus. In den meisten Thyroidezellen führt die Expression des aktivierten *HRAS* so zum Arrest in der G1-Phase und zur Apoptose, jedoch induziert es in einer großen Subpopulation von Zellen auch die Umgehung der Apoptose. Diese Zellen zeigen in der Folge Zeichen einer malignen Transformation (Dedifferenzierung, Spindelform, Verlust der Zellkontakte) und CIN. Auch zeigen sie eine veränderte Schadensantwort, so erfolgt zwar eine unveränderte ATR-Aktivierung, jedoch wird TP53 nicht mehr vollständig aktiviert und Doppelstrangbrüche werden durch  $\gamma$ H2AX nicht markiert.<sup>161</sup>

Die MPAL weist eine relevante Unterexpression von *ATR* auf, was in dem Kontext von RAS-induziertem replikativem Stress die genetische Instabilität verstärken könnte bzw. Leukämiezellen selektieren könnte.

Nicht nur der replikative Stress kann zu Strangbrüchen führen: Die Induktion des Ras-Signalweges führt in Fibroblasten zur Proliferation mit Anstieg der intrazellulären und teilweise auch mitochondrialen ROS (*reactive oxygen species*), welche direkt zu DSB führen können. Dieser ROS-Anstieg induziert normalerweise die Seneszenz mit Anstieg der *senescence-associated endogenous  $\beta$ -galactosidase*-Aktivität und führt zum Wachstumsstopp. Ein noch deutlicher gesteigertes Wachstum ist in den Fibroblasten mit zusätzlicher *RAC1*-Überexpression zu beobachten. Diese weisen dennoch weniger  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität auf und sind vor Seneszenz-induzierter Apoptose geschützt.<sup>162</sup> Auch in der MPAL weist *RAC1* eine Überexpression auf und kann so antiapoptotisch wirken.

Ein Ansatzpunkt dieser Peroxid-Bildung und DNA-Schädigung entgegenzuwirken, ist die COX2-Hemmung. In Lungenkarzinomen wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen der KRAS- und COX2-Aktivität mit erhöhten Prostaglandin E-Spiegeln beschrieben. COX2-Inhibition führte dabei sowohl zu signifikant reduzierten Peroxid-Spiegeln wie auch zu verminderten DSB.<sup>163</sup> Auch für akute Leukämien wurde eine antitumorale Wirkung des COX2-Inhibitors Celecoxib *in vitro* nachgewiesen.<sup>164</sup>

Wahrscheinlich liegt die Ursache der CIN nicht nur in der vermehrten Entstehung von DSB, sondern auch der *KRAS*-induzierten aberranten Reparatur dieser. So erfolgt die Reparatur von DSB üblicherweise über zwei verschiedene DNA-Reparaturmechanismen: Homologe Rekombination (HR) und *nonhomologous end joining* (NHEJ). HR ist

dabei akkurater und verwendet den Schwesterstrang als Template, sie findet nur in der S/G2-Phase statt. Eine Reparatur von Strangbrüchen vor DNA-Replikation findet wiederum ausschließlich über NHEJ statt, welcher in den klassischen (cNHEJ) und alternativen NHEJ (altNHEJ) unterteilt wird.<sup>165</sup> Für aktivierende *mutKRAS* wurde im Modell akuter T-Zell-Leukämien eine Verschiebung zum altNHEJ mit erhöhter Expression der relevanten Gene *LIG3*, *PARP1* und *XRCC1* wie auch Erhöhung derer Proteinspiegel beobachtet. altNHEJ führt zu verspäteter Reparaturskinetik und bevorzugter Nutzung von Mikrohomologien mit erhöhter Falschreparatur der DSB. So konnte nach Bestrahlung eine verzögerte DSB-Reparatur für die *mutKRAS*-Zellen nachgewiesen werden. Die Abhängigkeit der *mutKRAS*-Zellen vom altNHEJ zeigt sich auch im Therapieansprechen auf genotoxische Therapeutika: *mutKRAS*-Zellen sind u.a. resistent gegen Daunorubicin. Knockdown von *LIG3* und *PARP1* stellt die Therapiesensibilität wieder her. Auch MEKi-Behandlung führt zu einer deutlichen Suppression des altNHEJ in *mutKRAS*-Zellen.<sup>165</sup> Möglicherweise ist die Hochregulation des altNHEJ eine wichtige Basis der genetischen Instabilität *mutKRAS*-Zellen. Es stellt sich die Frage, ob die *ampKRAS* solche Veränderungen auch aufweisen, da in *wtKRAS*-Zellen keine Änderung gezeigt wurde. Die Genexpressionsdaten zeigen für die MPAL zumindest keine signifikant aberrante Expression der Gene sowohl des cNHEJ als auch des altNHEJ, eine mögliche Aktivierung der Proteine kann mit den erfolgten Untersuchungen jedoch nicht ausgeschlossen werden. Zumindest wurde eine Überexpression von *MSH6* für die MPAL nachgewiesen, welches neben seiner Funktion in der *mismatch*-Reparatur die DSB-Reparatur über den NHEJ in Assoziation mit Ku70 hochregelt.<sup>166</sup>

Insgesamt muss man in der Zusammenschau davon ausgehen, dass die primäre Rolle von *KRAS*-Mutationen in der Onkogenese die eines Mutator-Phänotyps und die chromosomale Instabilität Zeichen der *KRAS*-induzierten Transformation ist.<sup>159</sup> In der Regel scheinen weitere Mutationen notwendig zur Malignomentstehung zu sein und es entsteht ein Selektionsdruck zum Erwerb von *driver* Mutationen: Zellen mit auf Onkogenaktivitäten beruhenden DNA-Schäden können in einem *oncogene-induced senescence* (OIS) genannten Prozess irresversibel in den Zellzyklus-Arrest geführt werden. OIS kann jedoch z.B. durch das Fehlen (oder Inaktivierung) von DNA-Zellzyklus *checkpoint*-Genen wie *TP53* und *p19* umgangen werden.<sup>72</sup>

### 8.3.3 **TP53-Mutationen, -Deletionen und chromosomale Instabilität**

Gerade dieser Zusammenhang mit Veränderungen des p53-Signalweges erscheint für die vorliegende MPAL umso relevanter, da wie bereits in Abschnitt 8.2.5.1 ausgeführt, eine Dysregulation des p53-Signalweges in der MPAL vorliegt.

Studien belegen die synergistische Wirkung von *TP53*-Mutationen und *mutKRAS* in Bezug auf CIN: Duktale Pankreasadenokarzinome (PDAC) weisen in >90% *mutKRAS* und inaktivierende *CDKN2A*-Mutationen auf. Etwas seltener treten *TP53*-Mutationen (75%) und *SMAD4*-Deletionen (55%) auf. PDAC weisen dabei typischerweise eine hohe Metastasierungsrate mit hoher genetischer Instabilität mit Amplifikationen, Deletionen und Translokationen auf.<sup>167</sup> Damit zeigen PDAC deutliche Ähnlichkeiten zu den beobachteten Veränderungen in der MPAL, besonders wenn angenommen wird, dass P53-Inaktivierung durch MDM2 ähnliche Effekte hat wie inaktivierende *TP53*-Mutationen.

*mutKRAS* führen primär zu präinvasiven Pankreasneoplasien, nur ein Teil davon entwickelt sich spontan zu aggressiven Karzinomen. Es spricht vieles dafür, dass dieser zweite Schritt durch *TP53*-Mutation oder -Deletion initiiert wird. In Versuchen entwickelten transgene Mäuse mit *mutKRAS* und *TP53*-Deletion bzw. Mutation verschiedene Malignome in verschiedensten Stadien. Die präinvasiven Neoplasien wiesen dabei alle weiterhin Wildtypallele von *TP53* auf, während die metastasierten und aggressiven PDAC alle einen Verlust des Wildtyp-*TP53* durch LOH oder Mutation aufwiesen.<sup>167</sup>

Nicht nur in der Funktion als *second hit*, sondern auch für *TP53*-Inaktivierung allein besteht ein Zusammenhang mit Entwicklung einer CIN. So scheint bei *TP53*-Deletion eine Amplifikation von Centrosomen aufzutreten, was zu defekter Mitose, chromosomaler Missegregation, Aneuploidie und meist zum Zelltod führt. Auch die PDAC-Zelllinien in der Studie von Hingorani et al. wiesen eine deutlich erhöhte Zahl an Centrosomen auf.<sup>167</sup>

Man geht davon aus, dass *TP53*-Verlust zur Deregulation des Centrosom-Duplikationszyklus führt. Sowohl die Initiation wie die Suppression der Reduplikation unterliegen der direkten Kontrolle durch *TP53*. *MDM2*-Hochregulierung, wie in der MPAL nachgewiesen, beschleunigt diese Hyperamplifikation.<sup>168</sup> Jedoch wurde in einer weiteren Studie gezeigt, dass auch bei intaktem *TP53* (wie für die MPAL nachträglich mittels NGS-Auswertung belegt), ein gleicher Effekt der Centrosomen-Hyperamplifikation allein durch *MDM2*-Überexpression erreicht wird.<sup>169</sup>

Centrosomale Amplifikationen (CA) wurden in verschiedenen Krebsarten nachgewiesen und sind meist klinisch mit *high-grade* Tumoren und schlechter Prognose sowie mit CIN

assoziiert. In Multiplen Myelomen ist die Anzahl der CA in der Blastenkrise im Vergleich zur chronischen Phase deutlich erhöht, so dass aktuelle Studien untersuchen, ob CA als prognostische Marker verwendet werden können.<sup>170</sup>

### 8.3.4 Breakage-fusion-bridge Zyklus

Als weiteres Zeichen der CIN wiesen die PDAC-Zellen in der Studie von Hingorani et al. auch Anaphase-Brücken auf. Diese Chromatinbrücken entstehen bei der Zellteilung durch die Anordnung multizentrischer Chromosomen zwischen den Spindelpolen. Hierbei kommt es zur Trennung di- oder multizentrischer Chromosomen mit der Bildung neuer nonreziproker Translokationen.<sup>167</sup>

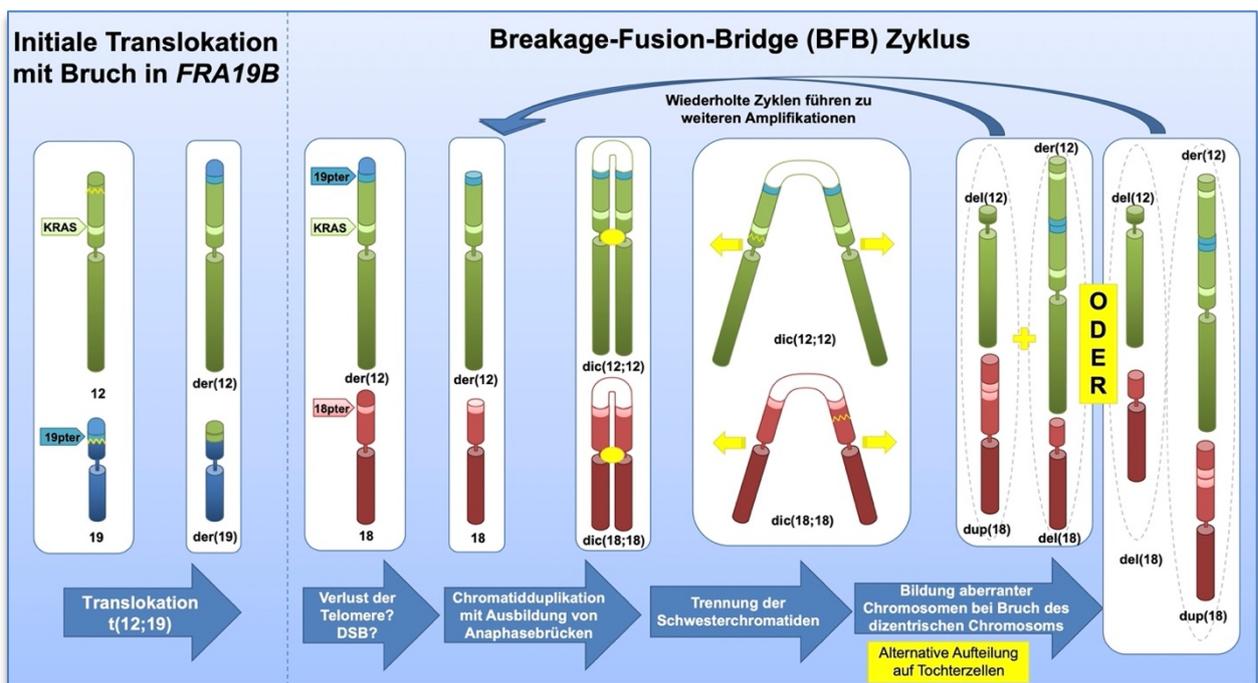


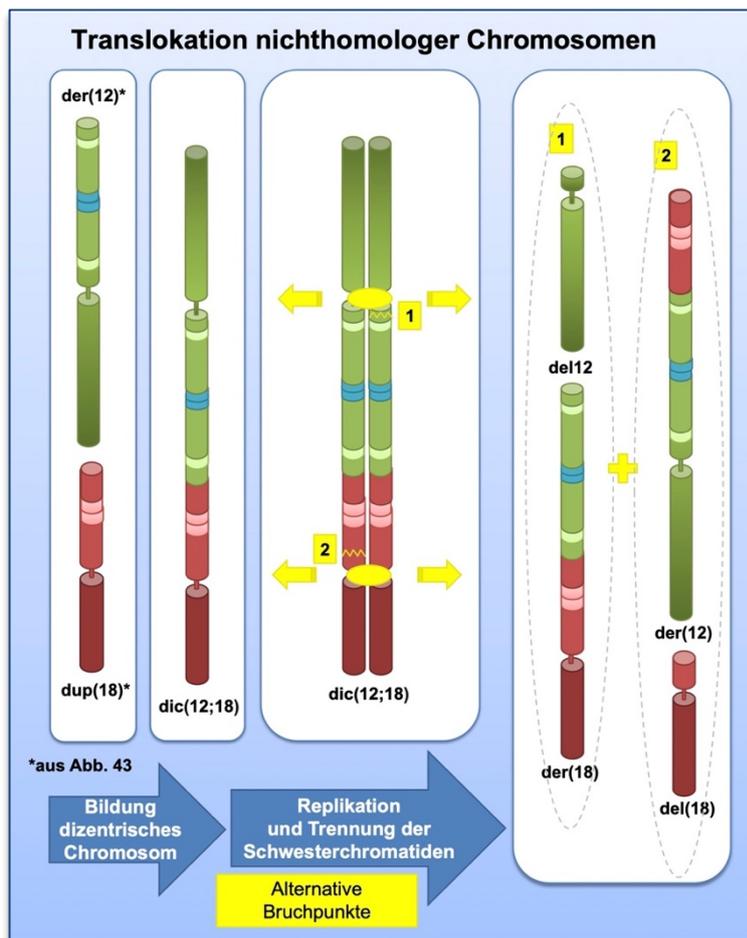
Abbildung 42: Translokation  $t(12;19)$  und breakage-fusion-bridge Zyklus

Links: primäre Translokation  $t(12;19)$  mit Bruchpunkt in *rare fragile site* FRA19B

Rechts: hypothetische Entstehung der ersten Aberrationen durch BFBC: Fraglicher Verlust der Telomerregionen oder Entstehung Bruchstellen durch DSB, Bildung von Anaphasebrücken zwischen den Schwesterchromatiden und Trennung durch den Spindelapparat, zuletzt Entstehung von Tochterzellen mit verschiedenen derivativen Chromosomen

Dieser Zyklus wird als *breakage-fusion-bridge cycle* (BFBC) beschrieben. Dieser beginnt typischerweise mit dem Verlust von Telomeren und der Bildung dizentrischer Chromosomen mit den Schwesterchromatiden während der Replikation. Diese werden dann in der Anaphase meist mit azentrischen Bruchstellen getrennt. Hierdurch kommt es in der Folge zu Zellen mit Deletion wie auch Amplifikation. Durch mehrfache Zyklen können so komplexe Chromosomenaberrationen entstehen. Der BFBC und die Telomerdysfunktion werden als relevant für die Entstehung von Aberrationen in Malignomen angesehen.<sup>171</sup>

Interessanterweise zeigten FISH Analysen in den PDAC-Zellen intakte Telomerregionen, insbesondere ließen sich an den Bruchpunkten auch Telomersequenzen finden. Das heißt, hier scheint es zu BFBC-vergleichbaren Umlagerungen ohne initialen Telomerverlust gekommen zu sein.<sup>167</sup> Eine solche FISH-Analyse ist für die MPAL nicht erfolgt. Dies wäre eine interessante zusätzliche Untersuchung, da die zytogenetischen Analysen für eine Entstehung per BFBC sprechen.

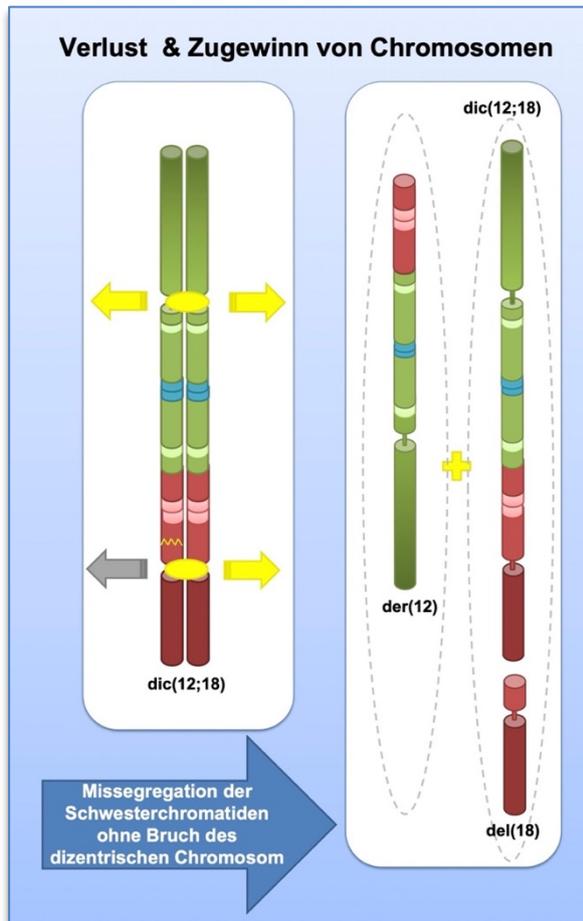


**Abbildung 43: Translokation nichthomologer Chromosomen**

Bildung eines dizentrischen Chromosoms  $dic(12;18)$  aus  $der(12)$  und  $der(18)$  mit Duplikationen und folgender mitotischer Teilung mit Bruch an verschiedenen Stellen, Bildung von Tochterzellen mit komplexen Aberrationen.

Wie die beobachteten Chromosomenveränderungen per BFBC hypothetisch entstanden sein können, ist in Abbildung 42 dargestellt. Wahrscheinlich ist primär die reziproke Translokation  $t(12;19)$  - mit Bruchpunkt auf Chromosom 19 in  $FRA19B$ , jedoch unklarer Genese des Bruchpunkts auf Chromosom 12 - erfolgt. In der Folge können die Zellen dem BFBC durchlaufen haben. Unklar bleibt, wodurch die primäre Bildung ungeschützter DNA-Enden erfolgt ist: Sowohl Telomerdysfunktion wie auch (KRAS-induzierte?) DSB kommen hierfür in Frage. Die ungeschützten Chromatiden bilden Anaphasebrücken aus und werden durch den Spindelapparat getrennt.

Die Tochterzellen weisen je nach Bruchpunkt verschiedene derivative Chromosomen mit Duplikationen, Inversionen und Deletionen auf. Durch weitere Zyklen des BFBC können weitere Amplifikationen und komplexere Umlagerungen entstehen. Hierbei muss man von einer Selektion der Zellen ausgehen, die z.B. aufgrund des Zugewinns von *driver*-Mutationen einen Überlebensvorteil aufweisen.



**Abbildung 44: Missegregation mit Entstehung numerischer Aberrationen**

Gestörte Trennung der Schwesterchromatiden des dizentrischen Chromosoms durch fehlende Trennung des Chr. 18-Zentromers. Die Tochterzellen weisen einen Verlust bzw. einen Zugewinn eines Chromosoms 18 auf.

Durch die Fusion nichthomologer Chromosomen mit ungeschützten Strangenden können ebenfalls dizentrische Chromosomen entstehen. So werden in *TP53*-defizienten und RAS-aktivierten Zellen gehäuft dizentrische oder azentrische Chromosomen gesehen.<sup>72</sup> Abbildung 43 zeigt dies für die MPAL am Beispiel eines dizentrischen Chromosoms bestehend aus den derivativen Chromosomen 12 und 18 aus der vorhergehenden Abbildung. Nach Replikation können in der Schwesterchromatidteil Interferenzen auftreten und das dizentrische Chromosom kann an verschiedenen Stellen brechen (hier beispielhaft für zwei Bruchpunkte gezeigt). Dieser Zyklus kann sich wiederholen und die Tochterzellen können damit komplexere Umlagerungen mit derivativen Chromosomen mit Material mehrerer Chromosomen aufweisen. In der Folge kommt es dann vermehrt zu strukturellen und numerischen Aberrationen, da die Chromosomensegregation durch die aberranten Chromosomen gestört wird.

Die Abbildung 44 zeigt beispielhaft eine solche Missegregation des dizentrischen Chromosoms dic(12;18). Durch die fehlende Trennung im Bereich der Zentromerregion des Chromosom 18 können die Tochterzellen einen Verlust eines Chromosoms aufweisen, während die andere ein zusätzliches derivatives Chromosom 18 erhält. Ein solcher Chromosom 18-Zugewinn wurde bereits in der Ersterkrankung der MPAL beschrieben. In der Folge wurden die Aberrationen immer komplexer, eine Darstellung der Entstehung der weiteren Umlagerungen erfolgt an dieser Stelle daher nicht.

Zusammenfassend ist wahrscheinlich die KRAS-Aktivierung in Kombination mit den Fehlregulationen des Zellzyklus hauptverantwortlich für die genetische Instabilität, die ausgeprägte im Krankheitsverlauf zunehmende intratumorale Heterogenität und die Entstehung weiterer *escape*-Mutationen.

Die Analyse der Signalwegveränderungen ergab mehrere Ansatzpunkte einer möglichen medikamentösen Therapie gerade in diesen Signalwegen. In einer Frühphase einer Erkrankung mit vergleichbaren Merkmalen, könnten diese auch Einfluss auf die Entstehung chromosomaler Instabilität nehmen.

### 8.4 Zusammenfassung der relevanten Gene und möglicher medikamentöser Ansatzpunkte

Zusammenfassend ergeben die obigen Ergebnisse in Zusammenschau mit der Identifikation potenzieller *driver*-Mutationen verschiedene Optionen der *targeted therapy*. In Abbildung 45 sind die in den vorherigen Abschnitten diskutierten relevanten Genveränderungen in der MPAL sowohl durch Kopienzahländerung als auch durch aberrante Expression in den KEGG *Pathways in cancer* zusammengefasst. Ebenfalls dargestellt sind die möglichen

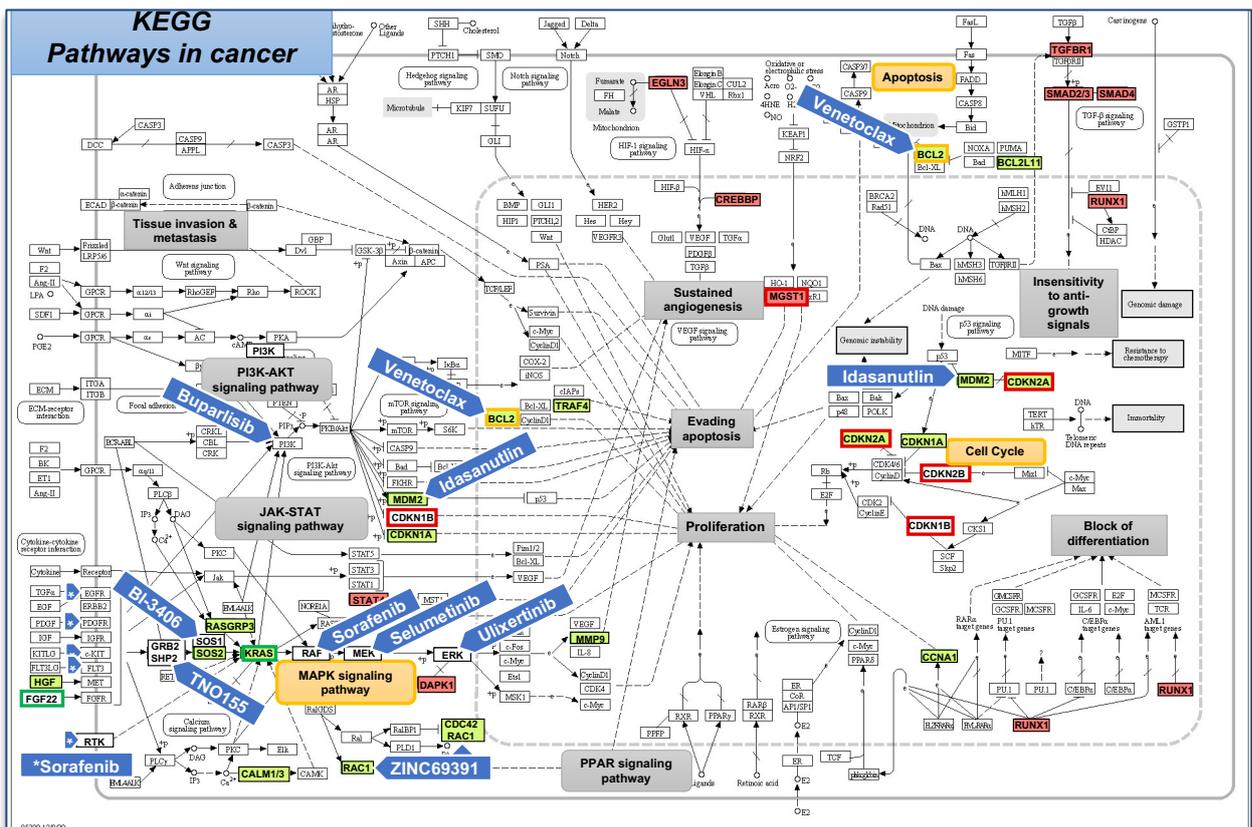


Abbildung 45: KEGG *Pathways in cancer* – potenzielle *driver* Gene in der MPAL und Ansatzpunkte für eine personalisierte Therapie

Darstellung aller zuvor in der Diskussion aufgeführten potenziellen *driver* Gene und ihre Aberrationen (Füllung entspricht der relativen Genexpression MPAL/HSC: grün: Überexpression, rot: Unterexpression, Umrandung entspricht CNA: grün: Zugewinn in Ersterkrankung, rot: Verlust in Ersterkrankung, gelb: Zugewinn in Erstrezidiv)

Mögliche Angriffspunkte von Medikamenten (blaue Pfeile) zur *targeted therapy* (Pfeile mit \* zeigen verschiedene Angriffspunkte des Multi-Kinase-Inhibitors Sorafenib), bei mehreren verfügbaren Wirkstoffen einer Wirkstoffklasse wird jeweils ein Wirkstoff exemplarisch erwähnt

Die Verwendung der KEGG *Pathways in cancer* erfolgt mit freundlicher Genehmigung Kanehisa Laboratories<sup>35–37</sup>

therapeutischen Ansatzpunkte der zuvor genannten Medikamente, die in verschiedenen Kombinationen auf ihre antileukämische Wirkung in der MPAL getestet werden können. Zum Zeitpunkt der Behandlung des Erstrezidivs bot **Sorafenib** (Nexavar<sup>®</sup>, Bayer) als zugelassenes Medikament eine gute Therapieoption auf Basis der bis dahin gewonnenen Erkenntnisse. Hierbei ist insbesondere die Hemmung des RAS-Signalweges durch Inhibition der RAF-Kinasen hervorzuheben (s. Abbildung 45). Die Wirksamkeit dieses Medikaments konnte im Verlauf aufgrund der Therapiekombination mit anderen Medikamenten und fehlendem Hinweis auf einen selektiven Einfluss nicht sicher beurteilt werden, zur Überprüfung der Wirksamkeit durch Untersuchungen könnten weitere Analysen an den MPAL-Zellen *in vitro* oder im Mausmodell erfolgen.

Inzwischen liegen mit den MEK-Inhibitoren, insbesondere mit dem zur Verwendung bei Kindern zugelassenen **Selumetinib** (Koselugo<sup>®</sup>, AstraZeneca), verschiedene zugelassene Präparate vor, deren Inhibition des MAPK-Signalweges eine potenzielle Wirkung in der MPAL nahelegt. Die Wirksamkeit einer Monotherapie mit MEKi sollte getestet werden, aber die Kombination mit anderen Therapeutika (wie in Abschnitt 8.2.4.2 diskutiert) kann das Ansprechen verbessern und Resistenzbildung vorbeugen:

Der SOS1-Inhibitor **BI 1701963** (Boehringer Ingelheim), Nachfolger von BI-3406, wird aktuell in klinischen Studien u.a. in Kombination mit dem MEKi **Trametinib** (Mekinist<sup>®</sup>, Novartis) getprüft.<sup>172</sup> Mehrere SHP2-Inhibitoren, wie **TNO155** (Novartis) und **RMC-4630** (Sanofi) befinden sich u.a. in Kombination mit dem MEKi **Cobimetinib** (Cotellic<sup>®</sup>, Roche)<sup>105</sup> in der klinischen Prüfung. Außerdem kann die MEK-Inhibition durch den Einsatz der konventionellen Therapeutika **MTX** und **Dexamethason** unterstützt werden.

Ergänzend kann eine Testung des ERK-Inhibitors **Ulixertinib** (BioMed Valley Discoveries), der zuletzt eine erweiterte Zulassung zum *compassionate use* erhalten hat (ClinicalTrials.gov, NCT04566393), erfolgen. Auch wenn mit **Alpelisib** (Piqray<sup>®</sup>, Novartis) ein erster Pi3K-Inhibitor zugelassen wurde, scheint dieser Ansatz in Anbetracht des Wirkungs-Toxizitäts-Verhältnisses (s. Abschnitt 8.2.4.4) nicht primär sinnvoll.

Neben der Inhibition des MAPK-Signalweges scheint die Testung des BCL2-Inhibitors **Venetoclax** (Venclyxto<sup>®</sup>, AbbVie) vielversprechend, insbesondere da sich im Rezidiv die Selektion von Zellen mit *BCL2*-Amplifikation gezeigt hat. Die BCL2-Inhibitionstherapie kann neben der Kombination mit hypomethylierenden Agenzien wie **5-Azacytidin** oder **Decitabine** auch mit MEK- und MDM2-Inhibitoren ergänzt werden. Gerade der kombi-

nierte Einsatz eines MDM2-Inhibitor erscheint in der hier untersuchten MPAL aussichtsreich: Sowohl die zahlreichen Veränderungen der Zellzyklus-Kontrollmechanismen, insbesondere die Dysregulation des p53-Signalweges durch *CDKN2A/B*-Deletion und *MDM2*-Überexpression (s. Abschnitt 8.2.5.1), wie auch der wahrscheinliche Zusammenhang mit der ausgeprägten chromosomalen Instabilität (s. Abschnitt 8.3.3) weisen auf eine potenzielle Wirksamkeit des in klinischen Studien getesteten MDM2-Inhibitors **Idasanutlin** (Roche) hin.

Des Weiteren sollten die MPAL-Zellen auf ein Ansprechen des Proteasom-Inhibitors **Bortezomib** untersucht werden.

Zur Vermeidung der Bildung KRAS-induzierter ROS kann eine Testung des COX2-Hemmers **Celecoxib** erfolgen, dessen klinische Anwendungssicherheit bei Malignomen des Kindesalters bereits belegt wurde.<sup>22</sup> Der additive Einsatz von Celecoxib kann synergistisch die Wirkung diverser Chemotherapeutika verstärken. Insbesondere in Hinblick zur Hemmung einer Prostglandin E-induzierten BCL2-Hochregulation erscheint die Kombination mit Venetoclax sinnvoll.<sup>173</sup>

Zudem kann in dieser Kombination wie auch als Monotherapie der RAC1-Inhibitor **ZINC69391**, welcher in präklinischen Studien antileukämische Wirkung zeigte, *in vitro* getestet werden.<sup>95</sup>

## 8.5 Möglichkeiten und Einschränkungen der Analytik

### 8.5.1 Zytogenetische Analysen

Der Ablauf der Analysen zeigt eindrücklich, dass mittels der standardisierten Diagnostik das Ausmaß der komplexen Chromosomenaberrationen zunächst nicht vollständig erfasst werden konnte. So wurde z.B. die Involvierung des Chromosoms 19 in die Translokationen erst durch die WCP-Färbungen erkannt, durch die daraufhin initiierten weiteren Analysen konnten die weiteren Umlagerungen beschrieben werden.

Insbesondere die *KRAS*-Beteiligung, die wie oben diskutiert eine relevante Rolle in der Leukämogenese zu haben scheint, wäre im Rahmen der initialen Zytogenetik durch die Studienlabore nicht aufgefallen, da Leukämien nicht regulär auf das Vorliegen von *KRAS*-Veränderungen analysiert werden. In Anbetracht dessen, dass die vorliegende Promotionsarbeit die erste Beschreibung von Wildtyp-Amplifikationen von *KRAS* in Leukämien darstellt, stellt sich die Frage, ob solche Amplifikationen doch häufiger auftreten. So sollte

zumindest nach Ausschluss einer Beteiligung von *C-MYC*, *MLL* und *ABL* und beim Vorliegen von *homogeneously staining regions* und *double minutes* Chromosomen an eine *KRAS*-Diagnostik gedacht werden.

Limitierende Faktoren der FISH-Analytik waren häufig die Begrenzung der Probenmenge mit der Notwendigkeit der gezielten Sondenvorauswahl und die begrenzte Anzahl an Metaphasen in der Metaphase-FISH. So konnte mittels automatisierter Interphase-FISH mit deutlich höherer Zellanzahl für den in der Metaphase-FISH homozygot deletiert erscheinenden *CDKN2A*-Lokus ein paralleles Vorliegen von heterozygoter und homozygoter Deletion nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten durch ergänzende SKY-Diagnostik weitere Veränderungen, wie die im Rezidiv die vorher unbekannte chromosomale Translokation t(5;6), nachgewiesen werden.

Zusammenfassend muss zu den durchgeführten Analysen gesagt werden, dass diese einerseits sehr umfassend waren und so der grobe Verlauf der klonalen Entwicklung über die Erkrankungsstadien skizziert werden konnte, andererseits auch weiterhin Fragen offen bleiben, die für die genauere Klärung der Instabilitätsmechanismen interessant wären.

### 8.5.2 Einsatz von WGA-Produkt als Template

Bei unzureichenden Probenmengen im Rahmen der geplanten Analytik wurde ein Teil der Untersuchungen (konventionelle PCR mit anschließender Sequenzierung, *long-distance* PCR und quantitative PCR) mit dem Produkt einer *Whole Genome Amplification* als Template durchgeführt. Prinzipiell konnte so die für die Analysen zur Verfügung stehende DNA-Menge erfolgreich erhöht werden, jedoch zeigten die Ergebnisse Einschränkungen der Anwendbarkeit:

In der konventionellen Sequenzierung zeigten die Ergebnisse mit Original-DNA eine bessere Analysequalität. Eine Amplifikation mittels *long-distance* PCR mit WGA-Template war zumindest für das von uns verwendete Kit nicht möglich.

In der qPCR zeigte sich qualitativ für die Amplifikation mit WGA-Produkt ein sauberer Kurvenerlauf. Quantitativ konnte eine Homozygotie (wie mit der Kontrolle des X-chromosomalen *DMD*) sicher nachgewiesen werden, jedoch mit größeren Standardabweichungen.

Bei der weiteren Analyse von Verlusten und Zugewinnen wurde jedoch eine quantitative Verzerrung der Ergebnisse im Vergleich zu der Original-DNA festgestellt, was ohne die parallele Versuchsführung möglicherweise zu Interpretationsfehlern hätte führen können.

Durch diese Verzerrung waren gerade Deletionen und deren begleitende Bruchpunkte, die nur einen Teil der Zellen betrafen, schwer zu detektieren. Weiterhin ist es möglich, dass subklonale Mutationen nicht ausreichend amplifiziert werden und so in der Sequenzierung der Kandidatengene mit WGA-Template nicht nachzuweisen waren. Für *KRAS* kann dieses Bias jedoch ausgeschlossen werden, da hier mit Original-DNA sequenziert wurde. Diese Beobachtungen zur quantitativen Verzerrung durch WGA müssten jedoch noch durch eine höhere Datenmenge validiert werden.

### 8.5.3 Signalweganalysen: aCGH und Microarray-Genexpressionsdaten

Primär wurden für die Analysen möglicher Signalwegveränderungen sowohl die CNA-Daten basierend auf der aCGH wie auch die Daten der *micoarray*-Genexpressionsdaten verwendet. Beide Methoden waren in der Identifikation der Veränderungen der Pic und insbesondere der Aktivierung des RAS-Signalweges zielführend.

Für die Auswertung und Diskussion der für die Leukämogenese relevanten Gene scheinen die Ergebnisse der Microarray-Genexpressionsdaten zumeist eine bessere Vorhersagekraft zu haben. So befinden sich in der Liste der veränderten Gene in den Pic die relevantesten bereits allein in der Gruppe mit signifikant aberranter GE. Abweichend hiervon ist jedoch die relevant erscheinende Deletion von *CDKN2A*, die aufgrund der Überexpression in der Genexpressionsanalyse nicht auffällig gewesen wäre. Die weitaus wichtigere Rolle der aCGH-Diagnostik ist jedoch die Darstellung der strukturellen Veränderungen als Basis der weiteren Diagnostik, wie z.B. der Auswahl der FISH-Sonden. Insbesondere die Identifizierung der *KRAS*-Wildtyp-Amplifikation als Ursache der RAS-Aktivierung wäre ohne aCGH nicht möglich gewesen. Die Durchführung beider Methoden ist retrospektiv betrachtet relevant und einander ergänzend.

## 8.6 Kritische Anmerkungen

Die vorliegende Promotionsarbeit hatte initial zwei Ziele: die umfassende Erfassung und Differenzierung der genetischen Aberrationen in der MPAL und die Identifizierung möglicher therapeutischer Ansatzpunkte auf Basis der Signalweganalysen. In Anbetracht der umfassenden zytogenetischen Analysen und insbesondere der erstmals für eine Leukämie beschrieben *ampKRAS* wurde das erste Ziel erreicht. Eine solche genaue Darstellung der Aberrationen einer MPAL und insbesondere der Vergleich von Genotyp und Phänotyp ist in der Literatur selten zu finden. Hierfür bot sich diese MPAL aufgrund der

ausgeprägten Aberrationen mit Proben des gesamten Krankheitsverlaufs an und die extensive Diagnostik ist für diesen Fall als exemplarische Darstellung zu rechtfertigen.

Für die Signalweganalysen zur Suche nach geeigneten Therapieansätzen sind die Analysen jedoch für eine standardisierte Durchführung zu umfassend. Hier gibt es jedoch inzwischen weitere, zunehmend eingesetzte Methoden, insbesondere *whole genome sequencing* und Transkriptomsequenzierung, welche vergleichbare Ergebnisse in schnellerer Zeit liefern können. Auch für die MPAL wurde eine Transkriptomsequenzierung durchgeführt, jedoch nicht im Rahmen dieser Arbeit ausgewertet.

## **9 Ausblick**

### **9.1 Weitere zytogenetische Analysen**

Als Ergänzung der oben aufgeführten Analysen würden FISH-Analysen der Telomerregionen sowie Färbungen der Centrosomen Aufschluss über Mechanismen der CIN geben. Zur Bestätigung der *TCF3-ZNF384*-Translokation als primäre *founder*-Mutation böte sich die automatisierte FISH-Analyse an den Xenograftzellen zur Bestätigung des Vorliegens in allen Zellen an.

### **9.2 Transkriptomsequenzierung und *single cell sequencing***

Die für die MPAL bereits vorliegenden Daten der Transkriptomsequenzierung wurden bisher nicht umfassend ausgewertet. Interessant wäre diese Auswertung in Hinblick auf die Vergleichbarkeit mit den oben genannten Analyseergebnissen. Die nach Signalweganalysen relevant erscheinenden Gene könnten -wie für *TP53* erfolgt- umfassender auf das Vorliegen von Mutationen untersucht werden. Außerdem wäre zur besseren Charakterisierung die Durchführung von *single cell sequencing* Analysen aufschlussreich.

### **9.3 Western Blot**

Bisher konnte das *TCF3-ZNF384*-Fusionsgen nur auf Transkriptebene nachgewiesen werden. Ergänzend könnten Western Blot Analysen durchgeführt werden, wofür aufgrund des Vorliegens der Translokation in allen Zellen auch die Zellen des Engraftments verwendet werden können. Da in der Literatur die Synthese von Fusionsproteinen beim Vorliegen ähnlicher Bruchpunkte beschrieben wird, ist eine Translation des Fusionsproteins in der hier untersuchten MPAL als wahrscheinlich anzunehmen.<sup>48</sup>

## 9.4 KRAS-Aberrationen bei Leukämien des Kindesalters

Aufgrund der fehlenden Datenlage zu *KRAS*-Amplifikationen bei Leukämien im Kindesalter erscheint die weitere diesbezügliche Analyse sinnvoll. Sollte sich das Vorliegen von *KRAS*-Amplifikationen in weiteren Proben bestätigen lassen, könnten hieraus weitere Rückschlüsse über die Biologie dieser Leukämien und eine mögliche prognostische Relevanz gezogen werden. Es wäre interessant, ob analog zu den soliden Tumoren Unterschiede zwischen *mutKRAS* und *ampKRAS* bestehen. Außerdem ist insbesondere ein möglicher Zusammenhang zwischen *KRAS*-Aktivierung und MPAL oder auch mit *TCF3-ZNF384*-Translokation zu bewerten.

## 9.5 Medikamentenstudien

In Hinblick auf die zukünftige Therapie vergleichbarer Leukämien erscheinen weitere medikamentöse Studien auf Basis der oben genannten Signalweganalysen sinnvoll. Da die Xenograft-Zellen eine hohe biologische Ähnlichkeit aufweisen, könnten diese Zellen für *in vitro*-Analysen der in Abschnitt 8.4 aufgeführten Therapieoptionen verwendet und ggf. die Medikamente auch in murinen Modellen getestet werden.

## 10 Literaturverzeichnis

1. Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J. *Pädiatrische Hämatologie Und Onkologie*. 1. Auflage. Springer Berlin; 2006.
2. Campana D, Behm FG. Immunophenotyping of leukemia. *J Immunol Methods*. 2000;243(1-2):59-75.
3. Naeim F, Rao N, Song S, Grody W. Acute Leukemias of Ambiguous Lineage. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, eds. *Atlas of Hematopathology*. Lyons: IARC Press; 2013:317-324.
4. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405.
5. Bene M, Castoldi G, Knapp W, Ludwig W, Matutes E, Orfao A, van't Veer M. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia*. 1995;9(10):1783-1786.
6. Multizentrische Therapieoptimierungsstudie AML-BFM 2004-zur Behandlung der akuten myeloischen Leukämien bei Kindern und Jugendlichen. 03/2004.
7. Matutes E. The value of c-kit in the diagnosis of biphenotypic acute leukemia. *Leukemia*. 1998;12(12):2038.
8. Bene MC. Biphenotypic, bilineal, ambiguous or mixed lineage: strange leukemias! *Haematologica*. 2009;94(7):891-893.
9. Weinberg OK, Arber DA. Mixed-phenotype acute leukemia: Historical overview and a new definition. *Leukemia*. 2010;24(11):1844-1851.
10. Al-Seraihy AS, Owaidah TM, Ayas M, El-Solh H, Al-Mahr M, Al-Ahmari A, Belgaumi AF. Clinical characteristics and outcome of children with biphenotypic acute leukemia. *Haematologica*. 2009;94(12):1682-1690.
11. Dworzak MN, Buldini B, Gaipa G, Ratei R, Hrusak O, Luria D, Rosenthal E, Bourquin JP, Sartor M, Schumich A, Karawajew L, Mejstrikova E, Maglia O, Mann G, Ludwig WD, Biondi A, Schrappe M, Basso G. AIEOP-BFM consensus guidelines 2016 for flow cytometric immunophenotyping of Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2018;94(1):82-93.
12. Rubnitz JE, Onciu M, Pounds S, Shurtleff S, Cao X, Raimondi SC, Behm FG, Campana D, Razzouk BI, Ribeiro RC, Downing JR, Pui CH. Acute mixed lineage leukemia in children: The experience of St Jude Children's Research Hospital. *Blood*. 2009;113(21):5083-5089.
13. Gerr H, Zimmermann M, Schrappe M, Dworzak M, Ludwig WD, Bradtke J, Moericke A, Schabath R, Creutzig U, Reinhardt D. Acute leukaemias of ambiguous lineage in children: Characterization, prognosis and therapy recommendations. *Br J Haematol*. 2010;149(1):84-92.

## Literaturverzeichnis

14. Ratei R, Schabath R, Karawajew L, Zimmermann M, Möricke A, Schrappe M, Ludwig WD. Lineage classification of childhood acute lymphoblastic leukemia according to the EGIL recommendations: Results of the ALL-BFM 2000 trial. *Klin Padiatr.* 2013;225(SUPPL1):S34-9.
15. Manola KN. Cytogenetic abnormalities in acute leukaemia of ambiguous lineage: An overview. *Br J Haematol.* 2013;163(1):24-39.
16. Xu XQ, Wang JM, Lü SQ, Chen L, Yang JM, Zhang WP, Song XM, Hou J, Ni X, Qiu HY. Clinical and biological characteristics of adult biphenotypic acute leukemia in comparison with that of acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia: A case series of a Chinese population. *Haematologica.* 2009;94(7):919-927.
17. Tassano E, Tavella E, Micalizzi C, Scuderi F, Cuoco C, Morerio C. Monosomal complex karyotype in pediatric mixed phenotype acute leukemia. *Cancer Genet.* 2011;204(9):507-511.
18. Eckstein OS, Wang L, Punia JN, Kornblau SM, Andreeff M, Wheeler DA, Goodell MA, Rau RE. Mixed-phenotype acute leukemia (MPAL) exhibits frequent mutations in DNMT3A and activated signaling genes. *Exp Hematol.* 2016;44(8):740-744.
19. de Leeuw DC, van den Ancker W, Denkers F, de Menezes RX, Westers TM, Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht A, Smit L. MicroRNA profiling can classify acute leukemias of ambiguous lineage as either acute myeloid leukemia or acute lymphoid leukemia. *Clin Cancer Res.* 2013;19(8):2187-2196.
20. AIEOP-BFM study group. *AIEOP-BFM ALL 2017 - International Collaborative Treatment Protocol for Children and Adolescents with Acute Lymphoblastic Leukemia Protocol (Version 1.5).*
21. Wolach O, Stone RM. Mixed-phenotype acute leukemia: Current challenges in diagnosis and therapy. *Curr Opin Hematol.* 2017;24(2):139-145.
22. Stevens M, Frobisher C, Hawkins M, Jenney M, Lancashire E, Reulen R, Taylor A, Winter D. The British Childhood Cancer Survivor Study: Objectives, methods, population structure, response rates and initial descriptive information. *Pediatr Blood Cancer.* 2008;50(5):1018-1025.
23. Munker R, Brazauskas R, Wang HL, de Lima M, Khoury HJ, Gale RP, Maziarz RT, Sandmaier BM, Weisdorf D, Saber W. Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Patients with Mixed Phenotype Acute Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22(6):1024-1029.
24. Tian H, Xu Y, Liu L, Yan L, Jin Z, Tang X, Han Y, Fu Z, Qiu H, Sun A, Wu D. Comparison of outcomes in mixed phenotype acute leukemia patients treated with chemotherapy and stem cell transplantation versus chemotherapy alone. *Leuk Res.* 2016;45:40-46.
25. Pomerantz A, Rodriguez-Rodriguez S, Demichelis-Gomez R, Barrera-Lumbreras G, Barrales-Benitez O, Lopez-Karpovitch X, Aguayo-Gonzalez A. Mixed-phenotype acute leukemia: Suboptimal treatment when the 2008/2016 WHO classification is used. *Blood Res.* 2016;51(4):233-241.
26. Weinberg OK, Seetharam M, Li R, Alizadeh A, Arber DA. Mixed phenotype acute leukemia a study of 61 cases using world health organization and european group for the immunological classification of leukaemias criteria. *Am J Clin Pathol.* 2014;142(6):803-808.
27. Oberley MJ, Li S, Orgel E, Wee P, Hagiya A, O'Gorman MRG. Clinical significance of isolated myeloperoxidase expression in pediatric B-lymphoblastic leukemia. *Am J Clin Pathol.* 2017;147(4):374-381.
28. Zhang Y, Wu D, Sun A, Qiu H, He G, Jin Z, Tang X, Miao M, Fu Z, Han Y. Clinical characteristics, biological profile, and outcome of biphenotypic acute leukemia: A case series. *Acta Haematol.* 2011;125(4):210-218.
29. Zhong CH, Prima V, Liang X, Frye C, McGavran L, Meltesen L, Wei Q, Boomer T, Varella-Garcia M, Gump J, Hunger SP. E2A-ZNF384 and NOL1-E2A fusion created by a cryptic t(12;19)(p13.3; p13.3) in acute leukemia. *Leukemia.* 2008;22(4):723-729.
30. La Starza R, Aventin A, Crescenzi B, Gorello P, Specchia G, Cuneo A, Angioni A, Bilhou-Nabera C, Boqué C, Foà R, Uyttebroeck A, Talmant P, Cimino G, Martelli MF, Marynen P, Mecucci C, Hagemeijer A. CIZ gene rearrangements in acute leukemia: Report of a diagnostic FISH assay and clinical features of nine patients. *Leukemia.* 2005;19(9):1696-1699.
31. Shago M, Abla O, Hitzler J, Weitzman S, Abdelhaleem M. Frequency and outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia with ZNF384 gene rearrangements including a novel translocation resulting in an ARID1B/ZNF384 gene fusion. *Pediatr Blood Cancer.* 2016;63(11):1915-1921.
32. Hirabayashi S, Ohki K, Nakabayashi K, Ichikawa H, Momozawa Y, Okamura K, Yaguchi A, Terada K, Saito Y, Yoshimi A, Ogata-Kawata H, Sakamoto H, Kato M, Fujimura J, Hino M, Kinoshita A, Kakuda H, Kurosawa H, Kato K, Kajiwara R, Moriwaki K, Morimoto T, Nakamura K, Noguchi Y, Osumi T, Sakashita K, Takita J, Yuza Y, Matsuda K, Yoshida T, Matsumoto K, Hata K, Kubo M, Matsubara Y, Fukushima T, Koh K, Manabe A, Ohara A, Kiyokawa N. ZNF384-related fusion genes define a subgroup of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a characteristic immunotype. *Haematologica.* 2017;102(1):118-129.
33. Carmona-Saez P, Chagoyen M, Tirado F, Carazo JM, Pascual-Montano A. GENECODIS: A web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol.* 2007;8(1):R3.
34. Nogales-Cadenas R, Carmona-Saez P, Vazquez M, Vicente C, Yang X, Tirado F, Carazo JM, Pascual-Montano A. GeneCodis: Interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(SUPPL. 2):W317-22.
35. Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, Ishiguro-Watanabe M, Tanabe M. KEGG: integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(D1):D545-D551.

## Literaturverzeichnis

36. Kanehisa M. Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein Sci.* 2019;28(11):1947-1951.
37. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):27-30.
38. Flex E, Jaiswal M, Pantaleoni F, Martinelli S, Strullu M, Fansa EK, Caye A, De Luca A, Lepri F, Dvorsky R, Pannone L, Paolacci S, Zhang SC, Fodale V, Bocchinfuso G, Rossi C, Burkitt-Wright EMM, Farrotti A, Stellacci E, Cecchetti S, Ferese R, Bottero L, Castro S, Fenneteau O, Brethon B, Sanchez M, Roberts AE, Yntema HG, Van Der Burgt I, Cianci P, Bondeson ML, Digilio MC, Zampino G, Kerr B, Aoki YK, Loh ML, Palleschi A, Di Schiavi E, Caré A, Selicorni A, Dallapiccola B, Cirstea IC, Stella L, Zenker M, Gelb BD, Cavé H, Ahmadian MR, Tartaglia M. Activating mutations in RRAS underlie a phenotype within the RASopathy spectrum and contribute to leukaemogenesis. *Hum Mol Genet.* 2014;23(16):4315-4327.
39. Marín-Ramos NI, Ortega-Gutiérrez S, López-Rodríguez ML. Blocking Ras inhibition as an antitumor strategy. *Semin Cancer Biol.* 2019;54(January):91-100.
40. Wong GS, Zhou J, Liu J Bin, Wu Z, Xu X, Li T, Xu D, Schumacher SE, Puschhof J, McFarland J, Zou C, Dulak A, Henderson L, Xu P, O'Day E, Rendak R, Liao WL, Cecchi F, Hembrough T, Schwartz S, Szeto C, Rustgi AK, Wong KK, Diehl JA, Jensen K, Graziano F, Ruzzo A, Fereshetian S, Mertins P, Carr SA, Beroukhi R, Nakamura K, Oki E, Watanabe M, Baba H, Imamura Y, Catenacci D, Bass AJ. Targeting wild-type KRAS-amplified gastroesophageal cancer through combined MEK and SHP2 inhibition letter. *Nat Med.* 2018;24(7):968-977.
41. Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, Walsh M, Zhang J, Ding L, Payne-Turner D, Churchman M, Andersson A, Chen SC, Mccastlain K, Becksfort J, Ma J, Wu G, Patel SN, Heatley SL, Phillips LA, Song G, Easton J, Parker M, Chen X, Rusch M, Boggs K, Vadodaria B, Hedlund E, Drenberg C, Baker S, Pei D, Cheng C, Huether R, Lu C, Fulton RS, Fulton LL, Tabib Y, Dooling DJ, Ochoa K, Minden M, Lewis ID, To LB, Mariton P, Roberts AW, Raca G, Stock W, Neale G, Drexler HG, Dickins RA, Ellison DW, Shurtleff SA, Pui CH, Ribeiro RC, Devidas M, Carroll AJ, Heerema NA, Wood B, Borowitz MJ, Gastier-Foster JM, Raimondi SC, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Hunger SP, Loh ML, Mullighan CG. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2013;45(3):242-252.
42. Paulsson K, Lilljebjörn H, Biloglav A, Olsson L, Rissler M, Castor A, Barbany G, Fogelstrand L, Nordgren A, Sjögren H, Fioretos T, Johansson B. The genomic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2015;47(6):672-676.
43. Jerchel IS, Hoogkamer AQ, Ariès IM, Steeghs EMP, Boer JM, Besselink NJM, Boeree A, Van De Ven C, De Groot-Kruseman HA, De Haas V, Horstmann MA, Escherich G, Zwaan CM, Cuppen E, Koudijs MJ, Pieters R, Den Boer ML. RAS pathway mutations as a predictive biomarker for treatment adaptation in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2018;32(4):931-940.
44. Oshima K, Khiabani H, Da Silva-Almeida AC, Tzoneva G, Abate F, Ambesi-Impiombato A, Sanchez-Martin M, Carpenter Z, Penson A, Perez-Garcia A, Eckert C, Nicolas C, Balbin M, Sulis ML, Kato M, Koh K, Paganin M, Basso G, Gastier-Foster JM, Devidas M, Loh ML, Kirschner-Schwabe R, Palomero T, Rabadan R, Ferrando AA. Mutational landscape, clonal evolution patterns, and role of RAS mutations in relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(40):11306-11311.
45. Irving J, Matheson E, Minto L, Blair H, Case M, Halsey C, Swidenbank I, Ponthan F, Kirschner-Schwabe R, Groeneveld-Krentz S, Hof J, Allan J, Harrison C, Vormoor J, Von Stackelberg A, Eckert C. Ras pathway mutations are prevalent in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia and confer sensitivity to MEK inhibition. *Blood.* 2014;124(23):3420-3430.
46. Stevens M, Frobisher C, Hawkins M, Jenney M, Lancashire E, Reulen R, Taylor A, Winter D. The British Childhood Cancer Survivor Study: Objectives, methods, population structure, response rates and initial descriptive information. *Pediatr Blood Cancer.* 2008;50(5):1018-1025.
47. Sano H, Shimada A, Taki T, Murata C, Park MJ, Sotomatsu M, Tabuchi K, Tawa A, Kobayashi R, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. RAS mutations are frequent in FAB type M4 and M5 of acute myeloid leukemia, and related to late relapse: A study of the Japanese childhood AML cooperative study group. *Int J Hematol.* 2012;95(5):509-515.
48. Alexander TB, Gu Z, Iacobucci I, Dickerson K, Choi JK, Xu B, Payne-Turner D, Yoshihara H, Loh ML, Horan J, Buldini B, Basso G, Elitzur S, de Haas V, Zwaan CM, Yeoh A, Reinhardt D, Tomizawa D, Kiyokawa N, Lammens T, De Moerloose B, Catchpoole D, Hori H, Moorman A, Moore AS, Hrusak O, Meshinchi S, Orgel E, Devidas M, Borowitz M, Wood B, Heerema NA, Carrol A, Yang YL, Smith MA, Davidsen TM, Hermida LC, Gesuwan P, Marra MA, Ma Y, Mungall AJ, Moore RA, Jones SJM, Valentine M, Janke LJ, Rubnitz JE, Pui CH, Ding L, Liu Y, Zhang J, Nichols KE, Downing JR, Cao X, Shi L, Pounds S, Newman S, Pei D, Auvil JMG, Gerhard DS, Hunger SP, Inaba H, Mullighan CG. The genetic basis and cell of origin of mixed phenotype acute leukaemia. *Nature.* 2018;562(7727):373-406.
49. Wulf-Goldenberg A, Keil M, Fichtner I, Eckert K. Intrahepatic transplantation of CD34+ cord blood stem cells into newborn and adult NOD/SCID mice induce differential organ engraftment. *Tissue Cell.* 2012;44(2):80-86.
50. Zuo Z, Chen SS, Chandra PK, Galbincea JM, Soape M, Doan S, Barkoh BA, Koeppen H, Medeiros LJ, Luthra R. Application of COLD-PCR for improved detection of KRAS mutations in clinical samples. *Mod Pathol.* 2009;22(8):1023-1031.

## Literaturverzeichnis

51. Schmidt-Hieber M, Blau IW, Richter G, Türkmen S, Bommer C, Thiel G, Neitzel H, Stroux A, Uharek L, Thiel E, Blau O. Cytogenetic studies in acute leukemia patients relapsing after allogeneic stem cell transplantation. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010;198(2):135-143.
52. Bayani J, Squire JA. Fluorescence in situ hybridization (FISH). *Curr Protoc Cell Biol.* 2004;23(1):22.4.1-22.4.52.
53. Türkmen S, Riehn M, Klopocki E, Molkentin M, Reinhardt R, Burmeister T. A BACH2-BCL2L1 Fusion Gene Resulting from a Lymphoma Cell Line BLUE-1. *Cancer.* 2011;396(January):389-396.
54. Shaffer LG. *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2009.* Karger; 2009.
55. Bayani J, Squire JA. Advances in the detection of chromosomal aberrations using spectral karyotyping. *Clin Genet.* 2001;59(2):65-73.
56. Luthra R, Medeiros LJ. Isothermal multiple displacement amplification: A highly reliable approach for generating unlimited high molecular weight genomic DNA from clinical specimens. *J Mol Diagnostics.* 2004;6(3):236-242.
57. Li J, Wang L, Mamon H, Kulke MH, Berbeco R, Makrigiorgos GM. Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nat Med.* 2008;14(5):579-584.
58. Klopocki E, Fiebig B, Robinson P, Tönnies H, Erdogan F, Ropers H, Mundlos S, Ullmann R. A Novel 8 Mb Interstitial Deletion of Chromosome 8p12-p21.2. *Am J Med Genet A.* 2006;140(8):873-877.
59. Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum.* 2004;10:92-95.
60. Majeti R, Becker MW, Tian Q, Lee TLM, Yan X, Liu R, Chiang JH, Hood L, Clarke MF, Weissman IL. Dysregulated gene expression networks in human acute myelogenous leukemia stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(9):3396-3401.
61. Rapin N, Bagger FO, Jendholm J, Mora-Jensen H, Krogh A, Kohlmann A, Thiede C, Borregaard N, Bullinger L, Winther O, Theilgaard-Mönch K, Porse BT. Comparing cancer vs normal gene expression profiles identifies new disease entities and common transcriptional programs in AML patients. *Blood.* 2014;123(6):894-904.
62. Klopocki E, Mundlos S. Copy-number variations, noncoding sequences, and human phenotypes. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2011;12:53-72.
63. Tabas-Madrid D, Nogales-Cadenas R, Pascual-Montano A. GeneCodis3: A non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(W1):W478-83.
64. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(7):e47.
65. Clappier E, Gerby B, Sigaux F, Delord M, Touzri F, Hernandez L, Ballerini P, Baruchel A, Pflumio F, Soulier J. Clonal selection in xenografted human T cell acute lymphoblastic leukemia recapitulates gain of malignancy at relapse. *J Exp Med.* 2011;208(4):653-661.
66. Caunt CJ, Sale MJ, Smith PD, Cook SJ. MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: The long and winding road. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(10):577-592.
67. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EWT, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2007;1773(8):1263-1284.
68. Cargnelutti M, Corso S, Pergolizzi M, Mévellec L, Aisner DL, Dziadziuszko R, Varella-Garcia M, Comoglio PM, Doebele RC, Vialard J, Giordano S. Activation of RAS family members confers resistance to ROS1 targeting drugs. *Oncotarget.* 2015;6(7):5182-5194.
69. Chen Y, McGee J, Chen X, Doman TN, Gong X, Zhang Y, Hamm N, Ma X, Higgs RE, Bhagwat S V., Buchanan S, Peng S Bin, Staschke KA, Yadav V, Yue Y, Kouros-Mehr H. Identification of druggable cancer driver genes amplified across TCGA datasets. *PLoS One.* 2014;9(5).
70. Margarit SM, Sondermann H, Hall BE, Nagar B, Hoelz A, Pirruccello M, Bar-Sagi D, Kuriyan J. Structural evidence for feedback activation by Ras·GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS. *Cell.* 2003;112(5):685-695.
71. Roose JP, Mollenauer M, Ho M, Kurosaki T, Weiss A. Unusual Interplay of Two Types of Ras Activators, RasGRP and SOS, Establishes Sensitive and Robust Ras Activation in Lymphocytes. *Mol Cell Biol.* 2007;27(7):2732-2745.
72. Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: Weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(11):761-774.
73. Guo JR, Li W, Wu Y, Wu LQ, Li X, Guo YF, Zheng XH, Lian XL, Huang HF, Chen YZ. Hepatocyte growth factor promotes proliferation, invasion, and metastasis of myeloid leukemia cells through PI3K-AKT and MAPK/ERK signaling pathway. *Am J Transl Res.* 2016;8(9):3630-3644.
74. Guo J, Lan Z. PHD2 acts as an oncogene through activation of Ras/Raf/MEK/ERK and JAK1/STAT3 pathways in human hepatocellular carcinoma cells. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 2020;48(1):37-45.
75. Raffel S, Falcone M, Kneisel N, Hansson J, Wang W, Lutz C, Bullinger L, Poschet G, Nonnenmacher Y, Barnert A, Bahr C, Zeisberger P, Przybylla A, Sohn M, Tönjes M, Erez A, Adler L, Jensen P, Scholl

## Literaturverzeichnis

- C, Fröhling S, Cocciardi S, Wuchter P, Thiede C, Flörcken A, Westermann J, Ehninger G, Lichter P, Hiller K, Hell R, Herrmann C, Ho AD, Krijgsveld J, Radlwimmer B, Trumpp A. BCAT1 restricts 5mC levels in AML stem cells leading to IDHmut-like DNA hypermethylation. *Nature*. 2017;551(7680):384-388.
76. Zhu S, Chen M, Chen M, Ye J, Ying Y, Wu Q, Dou H, Bai L, Mao F, Ni W, Yu K. Fibroblast Growth Factor 22 Inhibits ER Stress-Induced Apoptosis and Improves Recovery of Spinal Cord Injury. *Front Pharmacol*. 2020;11(February):1-12.
77. Ward AF, Braun BS, Shannon KM. Targeting oncogenic Ras signaling in hematologic malignancies. *Blood*. 2012;120(17):3397-3406.
78. Britten CD. PI3K and MEK inhibitor combinations: Examining the evidence in selected tumor types. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013;71(6):1395-1409.
79. Kamiguti AS, Lee ES, Till KJ, Harris RJ, Glenn MA, Lin K, Chen HJ, Zuzel M, Cawley JC. The role of matrix metalloproteinase 9 in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2004;125(2):128-140.
80. Zhao H, Zhang L, Zhang Y, Zhao L, Wan Q, Wang B, Bu X, Wan M, Shen C. Calmodulin promotes matrix metalloproteinase 9 production and cell migration by inhibiting the ubiquitination and degradation of TBC1D3 oncoprotein in human breast cancer cells. *Oncotarget*. 2017;8(22):36383-36398.
81. Malinowska-Ozdowy K, Frech C, Schönegger A, Eckert C, Cazzaniga G, Stanulla M, Zur Stadt U, Mecklenbräuker A, Schuster M, Kneidinger D, Von Stackelberg A, Locatelli F, Schrappe M, Horstmann MA, Attarbaschi A, Bock C, Mann G, Haas OA, Panzer-Grümayer R. KRAS and CREBBP mutations: A relapse-linked malicious liaison in childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2015;29(8):1656-1667.
82. Ding LW, Sun QY, Tan KT, Chien W, Thippeswamy AM, Yeoh AEJ, Kawamata N, Nagata Y, Xiao JF, Loh XY, Lin DC, Garg M, Jiang YY, Xu L, Lim SL, Liu LZ, Madan V, Sanada M, Fernández LT, Preethi H, Lill M, Kantarjian HM, Kornblau SM, Miyano S, Liang DC, Ogawa S, Shih LY, Yang H, Koeffler HP. Mutational landscape of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 2017;77(2):390-400.
83. Dixon ZA, Nicholson L, Zeppetbauer M, Matheson E, Sinclair P, Harrison CJ, Irving JAE. CREBBP knockdown enhances RAS/RAF/MEK/ERK signaling in Ras pathway mutated acute lymphoblastic leukemia but does not modulate chemotherapeutic response. *Haematologica*. 2017;102(4):736-745.
84. Wiemels JL, Kang M, Chang JS, Zheng L, Kouyoumji C, Zhang L, Smith MT, Scelo G, Metayer C, Buffler P, Wiencke JK. Backtracking RAS mutations in high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cells, Mol Dis*. 2010;45(3):186-191.
85. Sabnis AJ, Cheung LS, Dail M, Kang HC, Santaguida M, Hermiston ML, Passequé E, Shannon K, Braun BS. Oncogenic Kras initiates leukemia in hematopoietic stem cells. *PLoS Biol*. 2009;7(3):0537-0548.
86. Shieh A, Ward AF, Donlan KL, Harding-Theobald ER, Xu J, Mullighan CG, Zhang C, Chen SC, Su X, Downing JR, Bollag GE, Shannon KM. Defective K-Ras oncoproteins overcome impaired effector activation to initiate leukemia in vivo. *Blood*. 2013;121(24):4884-4893.
87. Cox AD, Der CJ. Ras history: The saga continues. *Small GTPases*. 2010;1(1):2-27.
88. Birkeland E, Wik E, Mjos S, Hoivik EA, Trovik J, Werner HMJ, Kusonmano K, Petersen K, Raeder MB, Holst F, Øyan AM, Kalland KH, Akslen LA, Simon R, Krakstad C, Salvesen HB. KRAS gene amplification and overexpression but not mutation associates with aggressive and metastatic endometrial cancer. *Br J Cancer*. 2012;107(12):1997-2004.
89. Valtorta E, Misale S, Sartore-Bianchi A, Nagtegaal ID, Paraf F, Lauricella C, Dimartino V, Hobor S, Jacobs B, Ercolani C, Lamba S, Scala E, Veronese S, Laurent-Puig P, Siena S, Tejpar S, Mottolese M, Punt CJA, Gambacorta M, Bardelli A, Di Nicolantonio F. KRAS gene amplification in colorectal cancer and impact on response to EGFR-targeted therapy. *Int J Cancer*. 2013;133(5):1259-1265.
90. Young A, Lou D, McCormick F. Oncogenic and wild-type ras play divergent roles in the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling. *Cancer Discov*. 2013;3(1):113-123.
91. Bahcall M, Awad MM, Sholl LM, Wilson FH, Xu M, Wang S, Palakurthi S, Choi J, Ivanova E V., Leonardi GC, Ulrich BC, Paweletz CP, Kirschmeier PT, Watanabe M, Baba H, Nishino M, Nagy RJ, Lanman RB, Capelletti M, Chambers ES, Redig AJ, VanderLaan PA, Costa DB, Imamura Y, Janne PA. Amplification of wild-type KRAS imparts resistance to crizotinib in MET exon 14 mutant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2018;24(23):5963-5976.
92. Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, Luo J, Der CJ. Drugging the undruggable RAS: Mission Possible? *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(11):828-851.
93. Canon J, Rex K, Saiki AY, Mohr C, Cooke K, Bagal D, Gaida K, Holt T, Knutson CG, Koppada N, Lanman BA, Werner J, Rapaport AS, San Miguel T, Ortiz R, Osgood T, Sun JR, Zhu X, McCarter JD, Volak LP, Houk BE, Fakih MG, O'Neil BH, Price TJ, Falchook GS, Desai J, Kuo J, Govindan R, Hong DS, Ouyang W, Henary H, Arvedson T, Cee VJ, Lipford JR. The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature*. 2019;575(7781):217-223.
94. Hallin J, Engstrom LD, Hargi L, Calinisan A, Aranda R, Briere DM, Sudhakar N, Bowcut V, Baer BR, Ballard JA, Burkard MR, Fell JB, Fischer JP, Vigers GP, Xue Y, Gatto S, Fernandez-Banet J, Pavlicek A, Velastagui K, Chao RC, Barton J, Pierobon M, Baldelli E, Patricoin EF, Cassidy DP, Marx MA, Rybkin II, Johnson ML, Ignatius SH, Lito P, Papadopoulos KP, Jänne PA, Olson P, Christensen JG.

## Literaturverzeichnis

- The KRASG12C inhibitor MRTX849 provides insight toward therapeutic susceptibility of KRAS-mutant cancers in mouse models and patients. *Cancer Discov.* 2020;10(1):54-71.
95. Hofmann MH, Gmachl M, Ramharter J, Savarese F, Gerlach D, Marszalek JR, Sanderson MP, Kessler D, Trapani F, Arnhof H, Rumpel K, Botesteanu D-A, Ettmayer P, Gerstberger T, Kofink C, Wunberg T, Zoepfel A, Fu S-C, Teh J, Böttcher J, Pototschnig N, Schachinger F, Schipany K, Lieb S, Vellano CP, O'Connell JC, Mendes RL, Moll J, Petronczki M, Heffernan TP, Pearson M, McConnell DB, Kraut N. BI-3406, a Potent and Selective SOS1–KRAS Interaction Inhibitor, Is Effective in KRAS-Driven Cancers through Combined MEK Inhibition. *Cancer Discov.* 2021;11(1):142-157.
  96. You X, Kong G, Ranheim EA, Yang D, Zhou Y, Zhang J. Unique dependence on Sos1 in KrasG12D-induced leukemogenesis. *Blood.* 2018;132(24):2575-2579.
  97. Sheffels E, Sealover NE, Theard PL, Kortum RL. Anchorage-independent growth conditions reveal a differential SOS2 dependence for transformation and survival in RAS-mutant cancer cells. *Small GTPases.* 2021;12(1):67-78.
  98. Sheffels E, Sealover NE, Wang C, Kim DH, Vazirani IA, Lee E, Terrell EM, Morrison DK, Luo J, Kortum RL. Oncogenic RAS isoforms show a hierarchical requirement for the guanine nucleotide exchange factor SOS2 to mediate cell transformation. *Sci Signal.* 2018;11(546):1-16.
  99. Hu S, Niu H, Inaba H, Orwick S, Rose C, Panetta JC, Yang S, Pounds S, Fan Y, Calabrese C, Rehg JE, Campana D, Rubnitz JE, Baker SD. Activity of the multikinase inhibitor sorafenib in combination with cytarabine in acute myeloid leukemia. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(11):893-905.
  100. Inaba H, Rubnitz JE, Coustan-Smith E, Li L, Furmanski BD, Mascara GP, Heym KM, Christensen R, Onciu M, Shurtleff SA, Pounds SB, Pui CH, Ribeiro RC, Campana D, Baker SD. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the multikinase inhibitor sorafenib in combination with clofarabine and cytarabine in pediatric relapsed/refractory leukemia. *J Clin Oncol.* 2011;29(24):3293-3300.
  101. Pratz KW, Cho E, Levis MJ, Karp JE, Gore SD, McDevitt M, Stine A, Zhao M, Baker SD, Carducci MA, Wright JJ, Rudek MA, Smith BD. A pharmacodynamic study of sorafenib in patients with relapsed and refractory acute leukemias. *Leukemia.* 2010;24(8):1437-1444.
  102. Borthakur G, Kantarjian H, Ravandi F, Zhang W, Konopleva M, Wright JJ, Faderl S, Verstovsek S, Mathews S, Andreeff M, Cortes JE. Phase I study of sorafenib in patients with refractory or relapsed acute leukemias. *Haematologica.* 2011;96(1):62-68.
  103. Kerstjens M, Driessen EMC, Willekes M, Pinhanços SS, Schneider P, Pieters R, Stam RW. MEK inhibition is a promising therapeutic strategy for MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia patients carrying RAS mutations. *Oncotarget.* 2017;8(9):14835-14846.
  104. Matheson EC, Thomas H, Case M, Blair H, Jackson RK, Masic D, Veal G, Halsey C, Newell DR, Vormoor J, Irving JAE. Glucocorticoids and selumetinib are highly synergistic in RAS pathway-mutated childhood acute lymphoblastic leukemia through upregulation of BIM. *Haematologica.* 2019;104(9):1804-1811.
  105. Yuan X, Bu H, Zhou J, Yang CY, Zhang H. Recent Advances of SHP2 Inhibitors in Cancer Therapy: Current Development and Clinical Application. *J Med Chem.* 2020;63(20):11368-11396.
  106. Morris EJ, Jha S, Restaino CR, Dayananth P, Zhu H, Cooper A, Carr D, Deng Y, Jin W, Black S, Long B, Liu J, DiNunzio E, Windsor W, Zhang R, Zhao S, Angagaw MH, Pinheiro EM, Desai J, Xiao L, Shipps G, Hruza A, Wang J, Kelly J, Paliwal S, Gao X, Babu BS, Zhu L, Daublain P, Zhang L, Lutterbach BA, Pelletier MR, Philippar U, Siliphaivanh P, Witter D, Kirschmeier P, Robert Bishop W, Hicklin D, Gary Gillil D, Jayaraman L, Zawel L, Fawell S, Samatar AA. Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors. *Cancer Discov.* 2013;3(7):742-750.
  107. Sullivan RJ, Infante JR, Janku F, Lee Wong DJ, Sosman JA, Keedy V, Patel MR, Shapiro GI, Mier JW, Tolcher AW, Wang-Gillam A, Sznol M, Flaherty K, Buchbinder E, Carvajal RD, Varghese AM, Lacouture ME, Ribas A, Patel SP, DeCrescenzo GA, Emery CM, Groover AL, Saha S, Varterasian M, Welsch DJ, Hyman DM, Li BT. First-in-class ERK1/2 inhibitor ulixertinib (BVD-523) in patients with MAPK mutant advanced solid tumors: Results of a phase I dose-escalation and expansion study. *Cancer Discov.* 2018;8(2):184-195.
  108. Gupta S, Ramjaun AR, Haiko P, Wang Y, Warne PH, Nicke B, Nye E, Stamp G, Alitalo K, Downward J. Binding of Ras to Phosphoinositide 3-Kinase p110 $\alpha$  Is Required for Ras- Driven Tumorigenesis in Mice. *Cell.* 2007;129(5):957-968.
  109. Bardia A, Gounder M, Rodon J, Janku F, Lolkema MP, Stephenson JJ, Bedard PL, Schuler M, Sessa C, LoRusso P, Thomas M, Maacke H, Evans H, Sun Y, Tan DSW. Phase Ib Study of Combination Therapy with MEK Inhibitor Binimetinib and Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitor Buparlisib in Patients with Advanced Solid Tumors with RAS/RAF Alterations. *Oncologist.* 2020;25(1):160-169.
  110. Westin SN, Sill MW, Coleman RL, Waggoner S, Moore KN, Mathews CA, Martin LP, Modesitt SC, Lee S, Ju Z, Mills GB, Schilder RJ, Fracasso PM, Birrer MJ, Aghajanian C. Safety lead-in of the MEK inhibitor trametinib in combination with GSK2141795, an AKT inhibitor, in patients with recurrent endometrial cancer: An NRG Oncology/GOG study. *Gynecol Oncol.* 2019;155(3):420-428. doi:10.1016/j.ygyno.2019.09.024
  111. Ragon BK, Kantarjian H, Jabbour E, Ravandi F, Cortes J, Borthakur G, DeBose LK, Zeng Z, Schneider H, Pemmaraju N, Garcia-Manero G, Kornblau S, Wierda W, Burger J, DiNardo CD, Andreeff M,

## Literaturverzeichnis

- Konopleva M, Daver N. Buparlisib, a PI3K inhibitor, demonstrates acceptable tolerability and preliminary activity in a phase I trial of patients with advanced leukemias. *Am J Hematol.* 2017;92(1):7-11.
112. Carrasco Salas P, Fernández L, Vela M, Bueno D, González B, Valentín J, Lapunzina P, Pérez-Martínez A. The role of CDKN2A/B deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol.* 2016;33(7-8):415-422.
113. Yang H, Xiang S, Kazi A, Sebt SM. The GTPase KRAS suppresses the p53 tumor suppressor by activating the NRF2-regulated antioxidant defense system in cancer cells. *J Biol Chem.* 2020;295(10):3055-3063.
114. Skalniak L, Kocik J, Polak J, Skalniak A, Rak M, Wolnicka-Glubisz A, Holak TA. Prolonged idasanutlin (Rg7388) treatment leads to the generation of p53-mutated cells. *Cancers (Basel).* 2018;10(11):1-17.
115. Chapeau EA, Gembarska A, Durand EY, Mandon E, Estadieu C, Romanet V, Wiesmann M, Tiedt R, Lehar J, Weck A De, Rad R, Barysb L, Jeay S, Ferretti S, Kauffmann A, Sutter E, Grevot A, Moulin P, Murakami M, Sellers WR, Hofmann F, Jensena MR. Resistance mechanisms to TP53-MDM2 inhibition identified by in vivo piggyBac transposon mutagenesis screen in an Arf-/- mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(12):3151-3156.
116. Kondo T, Oka T, Sato H, Shinnou Y, Washio K. Accumulation of aberrant CpG hypermethylation by *Helicobacter pylori* infection promotes development. *Int J Oncol.* 2009;35:547-557.
117. Ochsenreither S, Majeti R, Schmitt T, Stirewalt D, Keilholz U, Loeb KR, Wood B, Choi YE, Bleakley M, Warren EH, Hudecek M, Akatsuka Y, Weissman IL, Greenberg PD. Cyclin-A1 represents a new immunogenic targetable antigen expressed in acute myeloid leukemia stem cells with characteristics of a cancer-testis antigen. *Blood.* 2012;119(23):5492-5501.
118. Gozuacik D, Kimchi A. DAPk protein family and cancer. *Autophagy.* 2006;2(2):74-79.
119. Zhou JD, Zhang TJ, Xu ZJ, Gu Y, Ma JC, Li XX, Guo H, Wen XM, Zhang W, Yang L, Liu XH, Lin J, Qian J. BCL2 overexpression: Clinical implication and biological insights in acute myeloid leukemia. *Diagn Pathol.* 2019;14(1):1-10.
120. Tzifi F, Economopoulou C, Gourgiotis D, Ardavanis A, Papageorgiou S, Scorilas A. The role of BCL2 family of apoptosis regulator proteins in acute and chronic leukemias. *Adv Hematol.* 2012;2012:524308.
121. Menendez P, Vargas A, Bueno C, Barena S, Almeida J, de Santiago M, López A, Roa S, San Miguel JF, Orfao A. Quantitative analysis of bcl-2 expression in normal and leukemic human B-cell differentiation. *Leukemia.* 2004;18(3):491-498.
122. Coustan-Smith E, Kitanaka A, Pui C, McNinch L, Evans W, Raimondi S, Behm F, Aricò M, Campana D. Clinical relevance of BCL-2 overexpression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1996;87(3):1140-1146.
123. Letai A, Sorcinelli MD, Beard C, Korsmeyer SJ. Antiapoptotic BCL-2 is required for maintenance of a model leukemia. *Cancer Cell.* 2004;6(3):241-249.
124. Del V, Moore G, Brown JR, Certo M, Love TM, Novina CD, Letai A. Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J Clin Invest.* 2007;117(1):112-121.
125. Seyfried F, Demir S, Hörl RL, Stirnweiß FU, Ryan J, Scheffold A, Villalobos-Ortiz M, Boldrin E, Zingrebe J, Enzenmüller S, Jenni S, Tsai YC, Bornhauser B, Fürstberger A, Kraus JM, Kestler HA, Bourquin JP, Stilgenbauer S, Letai A, Debatin KM, Meyer LH. Prediction of venetoclax activity in precursor B-ALL by functional assessment of apoptosis signaling. *Cell Death Dis.* 2019;10(8).
126. Konopleva M, Letai A. BCL-2 inhibition in AML: An unexpected bonus? *Blood.* 2018;132(10):1007-1012.
127. Place AE, Goldsmith K, Bourquin JP, Loh ML, Gore L, Morgenstern DA, Sanzgiri Y, Hoffman D, Zhou Y, Ross JA, Prine B, Shebley M, McNamee M, Farazi T, Kim SY, Verdugo M, Lash-Fleming L, Zwaan CM, Vormoor J. Accelerating drug development in pediatric cancer: A novel Phase I study design of venetoclax in relapsed/refractory malignancies. *Futur Oncol.* 2018;14(21):2115-2129.
128. Karol SE, Alexander T, Budraja A, Pounds S, Canavera KE, Wang L, Wolf J, Klco JM, Salem AH, Palenski T, Lacayo NJ, Pui C-H, Opferman JT, Rubnitz J. Venetoclax in Combination with High-Dose Chemotherapy Is Active and Well-Tolerated in Children with Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Blood.* 2019;134(Supplement\_1):178-178.
129. Karol SE, Cooper TM, Bittencourt H, Gore L, Brien MMO, Fraser C. Safety, Efficacy, and PK of the BCL2 Inhibitor Venetoclax in Combination with Chemotherapy in Pediatric and Young Adult Patients with Relapsed / Refractory Acute Myeloid Leukemia and Acute Lymphoblastic Leukemia: Phase 1 Study ( Email Alerts. Published online 2020:2020.
130. Pan R, Ruvolo V, Mu H, Levenson JD, Nichols G, Reed JC, Konopleva M, Andreeff M. Synthetic Lethality of Combined Bcl-2 Inhibition and p53 Activation in AML: Mechanisms and Superior Antileukemic Efficacy. *Cancer Cell.* 2017;32(6):748-760.e6.
131. Daver N, Pollyea DA, Yee KWL, Fenaux P, Brandwein JM, Vey N, Martinelli G, Kelly KR, Roboz GJ, Garcia JS, Pigneux A, Kshirsagar S, Dail M, Wang J, Mobasher M, Chen L-C, Hong W-J, Konopleva M, Andreeff M. Preliminary Results from a Phase Ib Study Evaluating BCL-2 Inhibitor Venetoclax in Combination with MEK Inhibitor Cobimetinib or MDM2 Inhibitor Idasanutlin in Patients with Relapsed or Refractory (R/R) AML. *Blood.* 2017;130(Suppl 1):813.

## Literaturverzeichnis

132. Principe DR, Doll JA, Bauer J, Jung B, Munshi HG, Bartholin L, Pasche B, Lee C, Grippo PJ. TGF- $\beta$ : Duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(2):1-16.
133. Razanajaona D, Joguet S, Ay AS, Treilleux I, Goddard-Léon S, Bartholin L, Rimokh R. Silencing of FLRG, an antagonist of activin, inhibits human breast tumor cell growth. *Cancer Res.* 2007;67(15):7223-7229.
134. Hayette S, Gadoux M, Martel S, Bertrand S, Tigaud I, Magaud JP, Rimokh R. FLRG (follistatin-related gene), a new target of chromosomal rearrangement in malignant blood disorders. *Oncogene.* 1998;16(22):2949-2954.
135. Bardeesy N, Cheng KH, Berger JH, Chu GC, Pahler J, Olson P, Hezel AF, Horner J, Lauwers GY, Hanahan D, DePinho RA. Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes Dev.* 2006;20(22):3130-3146.
136. Wolfrain LA, Fernandez TM, Mamura M, Fuller WL, Kumar R, Cole DE, Byfield S, Felici A, Flanders KC, Walz TM, Roberts AB, Aplan PD, Balis FM, Letterio JJ. Loss of Smad3 in Acute T-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2004;351(6):552-559.
137. Zhang L, Zhou F, García-Vinuesa A, deKruif EM, Mesker WE, Hui L, Drabsch Y, Li Y, Bauer A, Rousseau A, Sheppard KA, Mickanin C, Kuppen PJK, Lu CX, tenDijke P. TRAF4 Promotes TGF- $\beta$  Receptor Signaling and Drives Breast Cancer Metastasis. *Mol Cell.* 2013;51(5):559-572.
138. Cabrera M, Echeverria E, Lenicov FR, Cardama G, Gonzalez N, Davio C, Fernández N, Menna PL. Pharmacological Rac1 inhibitors with selective apoptotic activity in human acute leukemic cell lines. *Oncotarget.* 2017;8(58):98509-98523.
139. Wang JY, Yu P, Chen S, Xing H, Chen Y, Wang M, Tang K, Tian Z, Rao Q, Wang J. Activation of Rac1 GTPase promotes leukemia cell chemotherapy resistance, quiescence and niche interaction. *Mol Oncol.* 2013;7(5):907-916.
140. Huelsenbeck SC, Schorr A, Roos WP, Huelsenbeck J, Henninger C, Kaina B, Fritz G. Rac1 protein signaling is required for DNA damage response stimulated by topoisomerase II poisons. *J Biol Chem.* 2012;287(46):38590-38599.
141. Naci D, Berrazouane S, Barabé F, Aoudjit F. Cell adhesion to collagen promotes leukemia resistance to doxorubicin by reducing DNA damage through the inhibition of Rac1 activation. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-13.
142. Yang C, Mai H, Peng J, Zhou B, Hou J, Jiang D. STAT4: An immunoregulator contributing to diverse human diseases. *Int J Biol Sci.* 2020;16(9):1575-1585.
143. Rampersaud E, Ziegler DS, Iacobucci I, Payne-Turner D, Churchman ML, Schrader KA, Joseph V, Offit K, Tucker K, Sutton R, Warby M, Chenevix-Trench G, Huntsman DG, Tsoli M, Scott Mead R, Qu C, Leventaki V, Wu G, Mullighan CG. Germline deletion of ETV6 in familial acute lymphoblastic leukemia. *Blood Adv.* 2019;3(7):1039-1046.
144. Mizukawa B, O'Brien E, Moreira DC, Wunderlich M, Hochstetler CL, Duan X, Liu W, Orr E, Grimes HL, Mulloy JC, Zheng Y. The cell polarity determinant CDC42 controls division symmetry to block leukemia cell differentiation. *Blood.* 2017;130(11):1336-1346.
145. Zeng B, Ge C, Li R, Zhang Z, Fu Q, Li Z, Lin Z, Liu L, Xue Y, Xu Y, He J, Guo H, Li C, Huang W, Song X, Huang Y. Knockdown of microsomal glutathione S-transferase 1 inhibits lung adenocarcinoma cell proliferation and induces apoptosis. *Biomed Pharmacother.* 2020;121(October 2019):109562.
146. Bräutigam L, Zhang J, Dreij K, Spahiu L, Holmgren A, Abe H, Tew KD, Townsend DM, Kelner MJ, Morgenstern R, Johansson K. MGST1, a GSH transferase/peroxidase essential for development and hematopoietic stem cell differentiation. *Redox Biol.* 2018;17(February):171-179.
147. Finlin BS, Gau CL, Murphy GA, Shao H, Kimel T, Seitz RS, Chiu YF, Botstein D, Brown PO, Der CJ, Tamanoi F, Andres DA, Perou CM. RERG Is a Novel ras-related, Estrogen-regulated and Growth-inhibitory Gene in Breast Cancer. *J Biol Chem.* 2001;276(45):42259-42267.
148. Teodorczyk M, Kleber S, Wollny D, Sefrin JP, Aykut B, Mateos A, Herhaus P, Sancho-Martinez I, Hill O, Gieffers C, Sykora J, Weichert W, Eisen C, Trumpp A, Sprick MR, Bergmann F, Welsch T, Martin-Villalba A. CD95 promotes metastatic spread via Sck in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Death Differ.* 2015;22(7):1192-1202.
149. Marinaccio C, Suraneni PK, Celik H, Volk A, Wen JQ, Ling T, Lasho T, Koche RP, Famulare C, Stein BL, Gurbuxani S, Hoffman R, Gangat N, Chandel N, Levine RL, Rampal RK, Challen G, Tefferi A, Crispino JD. Loss of LKB1/STK11 Facilitates Leukemic Progression of the Myeloproliferative Neoplasms. *Blood.* 2020;136(Supplement 1):1.
150. Wan X, Yeung C, Heske C, Mendoza A, Helman LJ. IGF-1R Inhibition Activates a YES/SFK Bypass Resistance Pathway: Rational Basis for Co-Targeting IGF-1R and Yes/SFK Kinase in Rhabdomyosarcoma. *Neoplasia (United States).* 2015;17(4):358-366.
151. Garmendia I, Pajares MJ, Hermida-Prado F, Ajona D, Bértolo C, Sainz C, Lavín A, Remírez AB, Valencia K, Moreno H, Ferrer I, Behrens C, Cuadrado M, Paz-Ares L, Bustelo XR, Gil-Bazo I, Alameda D, Lecanda F, Calvo A, Felip E, Sánchez-Céspedes M, Wistuba II, Granda-Díaz R, Pablo Rodrigo J, García-Pedrero JM, Pio R, Montuenga LM, Agorreta J. YES1 drives lung cancer growth and progression and predicts sensitivity to dasatinib. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019;200(7):888-899.

## Literaturverzeichnis

152. Kamata T, Pritchard C. Mechanisms of aneuploidy induction by RAS and RAF oncogenes. *Am J Cancer Res.* 2011;1(7):955-971.
153. Aguilera A, García-Muse T. Causes of genome instability. *Annu Rev Genet.* 2013;47:1-32.
154. Glover TW. Common fragile sites. *Cancer Lett.* 2006;232(1):4-12.
155. Kumar R, Nagpal G, Kumar V, Usmani SS, Agrawal P, Raghava GPS. HumCFS: a database of fragile sites in human chromosomes. *BMC Genomics.* 2019;19(9):985.
156. Shih IM, Zhou W, Goodman SN, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 2001;61(3):818-822.
157. Denko NC, Giaccia AJ, Stringer JR, Stambrook PJ. The human Ha-ras oncogene induces genomic instability in murine fibroblasts within one cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(11):5124-5128.
158. Castagnola P, Giaretti W. Mutant KRAS, chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2005;1756(2):115-125.
159. Knauf JA, Ouyang B, Knudsen ES, Fukasawa K, Babcock G, Fagin JA. Oncogenic RAS induces accelerated transition through G2/M and promotes defects in the G2 DNA damage and mitotic spindle checkpoints. *J Biol Chem.* 2006;281(7):3800-3809.
160. Luo J, Emanuele MJ, Li D, Creighton CJ, Schlabach MR, Westbrook TF, Wong KK, Elledge SJ. A Genome-wide RNAi Screen Identifies Multiple Synthetic Lethal Interactions with the Ras Oncogene. *Cell.* 2009;137(5):835-848.
161. Abulaiti A, Fikaris AJ, Tsygankova OM, Meinkoth JL. Ras induces chromosome instability and abrogation of the DNA damage response. *Cancer Res.* 2006;66(21):10505-10512.
162. Lee AC, Fenster BE, Ito H, Takeda K, Bae NS, Hirai T, Yu ZX, Ferrans VJ, Howard BH, Finkel T. Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 1999;274(12):7936-7940.
163. Maciag A, Sithanandam G, Anderson LM. Mutant K-rasV12 increases COX-2, peroxides and DNA damage in lung cells. *Carcinogenesis.* 2004;25(11):2231-2237.
164. Lu Y, Liu XF, Liu TR, Fan RF, Xu YC, Zhang XZ, Liu LL. Celecoxib exerts antitumor effects in HL-60 acute leukemia cells and inhibits autophagy by affecting lysosome function. *Biomed Pharmacother.* 2016;84(December 1998):1551-1557.
165. Hähnel PS, Enders B, Sasca D, Roos WP, Kaina B, Bullinger L, Theobald M, Kindler T. Targeting components of the alternative NHEJ pathway sensitizes KRAS mutant leukemic cells to chemotherapy. *Blood.* 2014;123(15):2355-2366.
166. Shahi A, Lee JH, Kang Y, Lee SH, Hyun JW, Chang IY, Jun JY, You HJ. Mismatch-repair protein MSH6 is associated with Ku70 and regulates DNA double-strand break repair. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(6):2130-2143.
167. Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S, Tuveson DA. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell.* 2005;7(5):469-483.
168. Tarapore P, Fukasawa K. Loss of p53 and centrosome hyperamplification. *Oncogene.* 2002;21(40 REV. ISS. 4):6234-6240.
169. Carroll PE, Okuda M, Horn HF, Biddinger P, Stambrook PJ, Gleich LL, Li YQ, Tarapore P, Fukasawa K. Centrosome hyperamplification in human cancer: Chromosome instability induced by p53 mutation and/or Mdm2 overexpression. *Oncogene.* 1999;18(11):1935-1944.
170. Mittal K, Kaur J, Jaczko M, Wei G, Toss MS, Rakha EA, Janssen EAM, Søiland H, Kucuk O, Reid MD, Gupta M V., Aneja R. Centrosome amplification: a quantifiable cancer cell trait with prognostic value in solid malignancies. *Cancer Metastasis Rev.* Published online 2020.
171. Kinsella M, Bafna V. Combinatorics of the breakage-fusion-bridge mechanism. *J Comput Biol.* 2012;19(6):662-678.
172. Gerlach D, Gmachl M, Ramharter J, Teh J, Fu S-C, Trapani F, Kessler D, Rumpel K, Botesteanu D-A, Ettmayer P, Arnhof H, Gerstberger T, Kofink C, Wunberg T, Vellano CP, Heffernan TP, Marszalek JR, Pearson M, McConnell DB, Kraut N, Hofmann MH. Abstract 1091: BI-3406 and BI 1701963: Potent and selective SOS1::KRAS inhibitors induce regressions in combination with MEK inhibitors or irinotecan. *Cancer Res.* 2020;80(16 Supplement):1091 LP - 1091.
173. Hosseini F, Mahdian-Shakib A, Jadidi-Niaragh F, Enderami SE, Mohammadi H, Hemmatzadeh M, Mohammed HA, Anissian A, Kokhaei P, Mirshafiey A, Hassannia H. Anti-inflammatory and anti-tumor effects of  $\alpha$ -L-guluronic acid (G2013) on cancer-related inflammation in a murine breast cancer model. *Biomed Pharmacother.* 2018;98(December 2017):793-800.

## **11 Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Lina Verena Sevenich, geb. Selle, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Analyse chromosomaler Translokationen und potenziell Leukämie-relevanter Mutationen einer *mixed phenotype acute leukemia* im Kindesalter (Fallstudie)“ / „Case Study of a mixed phenotype acute leukemia - Chromosomal Aberrations and Dysregulated Signal Transduction Pathways“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe. Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, der 15.12.21

## **12 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

### **13 Danksagung**

Zuallererst möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Dr. Karlheinz Seeger für die Überlassung des Themas und Betreuung dieser Arbeit bedanken. Danke für Deinen immerwährenden Humor, Deine Herzlichkeit, Ehrlichkeit und die große Geduld mit mir! Danke, dass Du mir die Möglichkeit gegeben hast, meine ersten Schritte in der Kinderonkologie zu machen, die Jahre dort bedeuten mir sehr viel.

Für die jahrelange und tolle Betreuung meiner Arbeit möchte ich mich bei Dr. Dr. Thomas Heiden bedanken: Danke, dass mich jederzeit mit allen Fragen immer und immer wieder an Dich wenden konnte, danke für deine vielen Ideen, Vorschläge und deine stetige Unterstützung! Ohne Dich wäre ich verloren gewesen!

Für die fachübergreifende Betreuung möchte ich allen Beteiligten der Zyto- und Tumorgenetik des Instituts für Medizinische Genetik und Humangenetik danken. Insbesondere gilt mein herzlichster Dank Dr. Marc Trimborn für die Begleitung meiner allerersten Forschungsschritte und Dr. Christiane Bommer für die stetige Unterstützung & Förderung. Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Eva Klopocki, Dr. Seval Türkmen und Prof. Dr. Heidemarie Neitzel für viele interessante Gespräche und ihre Beiträge zur vorliegenden Arbeit bedanken. Lieben Dank an Antje Gerlach und Britta Teubner für die freundliche Aufnahme in ihr Labor: Danke für eure Hilfe, Erklärungen und euer immer offenes Ohr! Danke auch an Randi Koll & Fabienne Trotier für die Unterstützung.

Vielen Dank an Prof. Dr. Dr. Günter Henze und Prof. Dr. Angelika Eggert für die Anstellung und Förderung an der Klinik für Pädiatrie m.S. Kinderonkologie- und hämatologie. Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Stefan Mundlos für die Kooperation und, dass ich einen Großteil der Arbeit im Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik durchführen durfte.

Danke an PD Dr. Cornelia Eckert für die Bereitstellung der Proben, den spannenden Austausch und den mentalen Support bei meinem ersten Vortrag! Für die Unterstützung im Labor der AG Seeger möchte ich mich bei Katja Kaulfuß und Heike Schiebel bedanken. Ich möchte mich außerdem bei Véronique Dutrannoy-Tönsing und Mohsen Karbasiyan für die technische Unterstützung und bei B.Jonske de Condor für die Bereitstellung der Primer bedanken. Danke an Dr. Jochen Hecht für die Durchführung der Transkriptomsequenzierung, an Dr. Ute Ungethüm und Dr. Ralf-Jürgen Kuban für die Durchführung der Microarray-Genexpressionsanalysen und Dr. Iduna Fichtner und Marlen Keil für die Durchführung des NSG-Engraftments. Für die primäre Datenverarbeitung der Genexpressionsanalysen bedanke ich mich bei Prof. Dr. Peter Robinson und Janette Nickel. Danke an Dr. Leonid Karawajew bei der Hilfe zur Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen.

Mein großer Dank gilt der Kind-Philipp-Stiftung für pädiatrisch-onkologische Forschung, die mich für die vorliegende Dissertationsarbeit mit einem Promotionsstipendium unterstützt hat.

Zuletzt möchte ich mich aus tiefstem Herzen bei meiner Familie bedanken: Robert, der immer für mich da ist und mich überall unterstützt. Meinen beiden Kindern, Lotta und Joris, für ihre Liebe und Fröhlichkeit, auch wenn ich wieder stundenlang in Arbeit versunken war. Meiner Mama für die Liebe zur Wissenschaft und noch so vieles mehr. Meinen Schwiegereltern, Klaus und Ingrid, für das Rückenfreihalten.

Danke Papa, dass ich Dich solange begleiten durfte und ich trotz -oder gerade durch-deine Erkrankung meinen Weg finden konnte. Ich vermisse Dich!