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

DISSERTATION

Häufigkeit und prognostische Relevanz von zusätzlichen genetischen Veränderungen bei *ETV6/RUNX1*-positiven Rezidiven der akuten Iymphoblastischen Leukämie im Kindesalter

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

> von Almut Bokemeyer aus Göttingen

- 1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. K. Seeger
- 2. Gutachter: Prof. Dr. med. U. Kontny
- 3. Gutachter: Prof. Dr. med. C. A. Schmidt

Datum der Promotion: 25.10.2013

1	Einleitung				
	1.1 Akute lymphoblastische Leukämie im Kindesalter				
	1.2 Diagi	ose und Klassifizierung	1		
	1.2.1	Prognosefaktoren bei ALL-Ersterkrankung	2		
	1.3 ALL-	Rezidiv	3		
	1.3.1	Risikostratifizierung und Prognosefaktoren beim ALL-Rezidiv	4		
	1.3.2	Minimal residual disease (MRD)	4		
	1.3.3	Therapie des ALL-Rezidivs	5		
	1.3.4	Glukokortikoide in der Behandlung des ALL-Rezidivs	7		
	1.4 Mole	kulargenetische Veränderungen in Leukämiezellen	7		
	1.4.1	Chromosomale Translokationen und Aneuploidien	8		
	1.5 Trans	lokation t(12;21) und Fusionsgen ETV6/RUNX1	10		
	1.5.1	Transkriptionsfaktor ETV6 – Struktur und Funktion	10		
	1.5.2	Transkriptionsfaktor RUNX1 – Struktur und Funktion	11		
	1.5.3	ETV6/RUNX1 – Struktur und Funktion	12		
	1.5.4	Prävalenz und prognostische Signifikanz von ETV6/RUNX1	14		
	1.5.5	Klinische Merkmale ETV6/RUNX1-positiver ALL-Rezidive	15		
	1.6 Zusä	zliche genetische Veränderungen bei ETV6/RUNX1-positiver ALL	18		
2	Ziele die	ser Arbeit	21		
2 3	Ziele die Patienter	ser Arbeit Iproben, Material und Methoden	21 23		
2 3	Ziele die Patienter 3.1 Patie	ser Arbeit Aproben, Material und Methoden Inten und Proben	21 23 23		
2 3	Ziele die Patienter 3.1 Patie 3.1.1	ser Arbeit Aproben, Material und Methoden Inten und Proben Referenz-DNA für die array CGH	21 23 23 24		
2 3	Ziele die Patienter 3.1 Patie 3.1.1 3.2 Mate	ser Arbeit Aproben, Material und Methoden Inten und Proben Referenz-DNA für die array CGH rial	21 23 24 24		
2 3	Ziele die Patienter 3.1 Patie 3.1.1 3.2 Mate 3.2.1	ser Arbeit proben, Material und Methoden nten und Proben Referenz-DNA für die array CGH rial Verbrauchsmaterialien	21 23 23 24 24 24 24		
2 3	Ziele die Patienter 3.1 Patie 3.1.1 3.2 Mate 3.2.1 3.2.2	ser Arbeit proben, Material und Methoden nten und Proben Referenz-DNA für die array CGH rial Verbrauchsmaterialien Geräte	21 23 24 24 24 24 24 26		
23	Ziele die Patienter 3.1 Patie 3.1.1 3.2 Mate 3.2.1 3.2.2 3.3 Meth	ser Arbeit proben, Material und Methoden nten und Proben Referenz-DNA für die array CGH rial Verbrauchsmaterialien Geräte	21 23 24 24 24 24 26 27		
23	Ziele die Patienter 3.1 Patie 3.1.1 3.2 Mate 3.2.1 3.2.2 3.3 Meth 3.3.1	ser Arbeit proben, Material und Methoden nten und Proben Referenz-DNA für die array CGH rial Verbrauchsmaterialien Geräte oden Zellaufarbeitung - Dichteseparation mononukleärer Zellen	21 23 24 24 24 24 26 27 27		
23	Ziele die Patienter 3.1 Patie 3.1.1 3.2 Mate 3.2.1 3.2.2 3.3 Meth 3.3.1 3.3.2	ser Arbeit proben, Material und Methoden nten und Proben Referenz-DNA für die array CGH rial Verbrauchsmaterialien Geräte oden Zellaufarbeitung - Dichteseparation mononukleärer Zellen DNA-Isolierung	21 23 24 24 24 24 26 27 27 27		
23	Ziele die Patienter 3.1 Patie 3.1.1 3.2 Mate 3.2.1 3.2.2 3.3 Meth 3.3.1 3.3.2 3.3.3	ser Arbeit proben, Material und Methoden nten und Proben Referenz-DNA für die array CGH ial Verbrauchsmaterialien Geräte oden Zellaufarbeitung - Dichteseparation mononukleärer Zellen DNA-Isolierung Agarose-Gelelektrophorese	21 23 24 24 24 24 26 27 27 27 27 28		
23	Ziele die Patienter 3.1 Patie 3.1.1 3.2 Mate 3.2.1 3.2.2 3.3 Meth 3.3.1 3.3.2 3.3.3 3.3.3	ser Arbeit proben, Material und Methoden nten und Proben Referenz-DNA für die array CGH ial Verbrauchsmaterialien Geräte oden Zellaufarbeitung - Dichteseparation mononukleärer Zellen DNA-Isolierung Agarose-Gelelektrophorese Microarray-basierte komparative Genomhybridisierung	21 23 24 24 24 24 26 27 27 27 27 28 28		
23	Ziele die Patienter 3.1 Patie 3.1.1 3.2 Mate 3.2.1 3.2.2 3.3 Meth 3.3.1 3.3.2 3.3.3 3.3.4 3.3.5	Ser Arbeit proben, Material und Methoden Inten und Proben Referenz-DNA für die array CGH fial Verbrauchsmaterialien Geräte oden Zellaufarbeitung - Dichteseparation mononukleärer Zellen DNA-Isolierung Agarose-Gelelektrophorese Microarray-basierte komparative Genomhybridisierung Whole Genome Amplification (WGA)	21 23 24 24 24 26 27 27 27 27 28 28 31		
23	Ziele die Patienter 3.1 Patie 3.1.1 3.2 Mate 3.2.1 3.2.2 3.3 Meth 3.3.1 3.3.2 3.3.3 3.3.4 3.3.5 3.3.6	Ser Arbeit nroben, Material und Methoden nten und Proben Referenz-DNA für die array CGH ial Verbrauchsmaterialien Geräte oden Zellaufarbeitung - Dichteseparation mononukleärer Zellen DNA-Isolierung Agarose-Gelelektrophorese Microarray-basierte komparative Genomhybridisierung Whole Genome Amplification (WGA) Random Primed Labeling	21 23 24 24 24 26 27 27 27 28 28 31 32		
23	Ziele die Patienter 3.1 Patie 3.1.1 3.2 Mate 3.2.1 3.2.2 3.3 Meth 3.3.1 3.3.2 3.3.3 3.3.4 3.3.5 3.3.6 3.3.7	Ser Arbeit proben, Material und Methoden nten und Proben Referenz-DNA für die array CGH ial Verbrauchsmaterialien Geräte oden Zellaufarbeitung - Dichteseparation mononukleärer Zellen DNA-Isolierung Agarose-Gelelektrophorese Microarray-basierte komparative Genomhybridisierung Whole Genome Amplification (WGA) Random Primed Labeling Hybridisierung und Waschen der Arrays	21 23 24 24 24 26 27 27 27 27 28 28 31 32 32		
23	Ziele die Patienter 3.1 Patie 3.1.1 3.2 Mate 3.2.1 3.2.2 3.3 Meth 3.3.1 3.3.2 3.3.3 3.3.4 3.3.5 3.3.6 3.3.7 3.3.8	Ser Arbeit nroben, Material und Methoden nten und Proben Referenz-DNA für die array CGH ial Verbrauchsmaterialien Geräte oden Zellaufarbeitung - Dichteseparation mononukleärer Zellen DNA-Isolierung Agarose-Gelelektrophorese Microarray-basierte komparative Genomhybridisierung Whole Genome Amplification (WGA) Random Primed Labeling Hybridisierung und Waschen der Arrays Aufzeichnung und Auswertung der array CGH-Hybridisierungssignale	21 23 24 24 24 26 27 27 27 27 28 28 31 32 32 34		
23	Ziele die Patienter 3.1 Patie 3.1.1 3.2 Mate 3.2.1 3.2.2 3.3 Meth 3.3.1 3.3.2 3.3.3 3.3.4 3.3.5 3.3.6 3.3.6 3.3.7 3.3.8 3.3.9	Ser Arbeit nroben, Material und Methoden nten und Proben Referenz-DNA für die array CGH rial Verbrauchsmaterialien Geräte oden Zellaufarbeitung - Dichteseparation mononukleärer Zellen DNA-Isolierung Agarose-Gelelektrophorese Microarray-basierte komparative Genomhybridisierung Whole Genome Amplification (WGA) Random Primed Labeling Hybridisierung und Waschen der Arrays Aufzeichnung und Auswertung der array CGH-Hybridisierungssignale	21 23 24 24 24 26 27 27 27 27 28 28 31 32 32 34 37		

		3.3.11	Statistische Auswertung	41
4	Ergebnisse			
	4.1 Patientenkollektiv			43
	4.2 Ergebnisse der array CGH-Analyse			46
	4.2.1 Häufigkeit von DNA-Kopienzahlveränderungen			
		4.2.2	DNA-Kopienzahlveränderungen gesamter Chromosomen	47
	4.3	Rekurr	ente DNA-Kopienzahlveränderungen	50
		4.3.1	Chromosom 12p13.2	54
		4.3.2	Chromosom 6q21	57
		4.3.3	Chromosom 9p21.3	58
		4.3.4	Chromosom 3	59
		4.3.5	Chromosom 15q15.1	60
		4.3.6	CNA des X-Chromosoms	60
		4.3.7	Chromosom 5q31.3	61
		4.3.8	Verifizierung der CNA auf Chromosom 5q31.3 durch Interphase FISH	64
		4.3.9	CNA von Genen der B-Zell-Differenzierung und B-Zell-Reifung	66
		4.3.10	Kopienzahlzugewinne in ETV6/RUNX1-positiven ALL-Rezidiven	67
	4.4	Kombi	nierter Nachweis rekurrenter CNA	67
5	Dis	kussio	n	71
	5.1	Häufig	keit von CNA in ETV6/RUNX1-positiven ALL-Rezidiven	71
	5.2	Rekurr	ente CNA in ETV6/RUNX1-positiven ALL-Rezidiven	73
	5.3	Beteili	gung von Genen der B-Zell-Differenzierung und B-Zell-Reifung	77
	5.4 Geschlechtsspezifische Veränderungen des X-Chromosoms			79
	5.5 Deletionen des Glukokortikoidrezeptorgens NR3C1			
	5.6	Einord	nung der Ergebnisse und Ausblick	85
6	Zus	samme	nfassung	89
7	Lite	eraturv	erzeichnis	91
8	Abl	bildung	jsverzeichnis	101
9	Tab	oellenvo	erzeichnis	103
10	Abl	kürzung	gsverzeichnis	105
Le	ben	slauf		109
Ve	röffe	entlich	ungen und Kongressbeiträge	111
Danksagung			113	
Erl	Erklärung			115

1.1 Akute lymphoblastische Leukämie im Kindesalter

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) ist eine Erkrankung des hämatopoetischen Systems. Durch eine klonale Proliferation lymphatischer Progenitorzellen wird die normale Hämatopoese im Knochenmark (KM) verdrängt und schließlich insuffizient. Daraus resultieren Anämie, Thrombopenie und Infektanfälligkeit infolge Leukozytopenie als Leitsymptome der Erkrankung. Häufig kommt es zusätzlich zu einer Infiltration extramedullärer Organe wie Milz, Leber, Lymphknoten, ZNS oder Testis, die weitere organbezogene Symptome bedingen sowie zur Ausschwemmung leukämischer Zellen in das Blut, die sich als Lymphoblasten im Blutausstrich zeigen. Die Bezeichnung "akut" beschreibt den Krankheitsverlauf der ALL, die unbehandelt innerhalb von Wochen bis wenigen Monaten letal verläuft¹.

Die ALL ist die häufigste Leukämieform und die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter. In Deutschland werden jährlich etwa 550 Neuerkrankungen bei Kindern und Jugendlichen unter 15 Jahren diagnostiziert. Der Häufigkeitsgipfel der ALL liegt zwischen dem zweiten und fünften Lebensjahr².

1.2 Diagnose und Klassifizierung

Die Diagnose einer ALL wird anhand der morphologischen Beurteilung von KM- und Blutausstrichen gestellt. Definitionsgemäß müssen >25 % der kernhaltigen Zellen im KM aus unreifen Zellen (Lymphoblasten) bestehen oder Blasten im Blut nachgewiesen werden. Bei Nachweis von mindestens 5 Zellen/mm³ mit Blastenmorphologie im Liquor cerebrospinalis liegt ein Befall des ZNS vor.

Die weitere Klassifikation der ALL basiert auf morphologischen, immunologischen und molekulargenetischen Merkmalen der Leukämiezellen. Unter Berücksichtigung dieser klinischen und biologischen Faktoren gelingen eine Prognoseabschätzung und eine Einordnung der Patienten in verschiedene Risikogruppen, die eine Adaptation der Behandlung an das Rezidivrisiko ermöglichen.

Wesentliche prognostische und therapeutische Konsequenzen hat die Klassifizierung der ALL durch Immunphänotypisierung der Leukämiezellen. Mithilfe von fluoreszenz-

markierten monoklonalen Antikörpern können Differenzierungsantigene, die auf der Zelloberfläche intrazellulär der Leukämiezellen oder lokalisiert sind. durchflusszytometrisch nachgewiesen werden und die Zellen einer bestimmten hämatopoetischen Differenzierungsstufe zugeordnet werden³. Dadurch gelingt eine Einordnung in die B-Zell- oder T-Zell-Reihe. Etwa 85 % der ALL im Kindesalter sind B-Vorläuferzell-ALL (B-cell precursor, BCP-ALL). Diese werden entsprechend ihrer Differenzierungsstufe unterteilt in die pro-B-ALL, die common-ALL (mit ca. 62 % am häufigsten) und die am weitesten ausgereifte prä-B-ALL. Die T-Zell-Leukämien sind mit ca. 13 % im Kindesalter seltener. Unterschieden werden die unreiferen pro- und prä-T-ALL von der kortikalen T-ALL und der reifen T-ALL^{4,5}.

1.2.1 Prognosefaktoren bei ALL-Ersterkrankung

Der Risikoabschätzung dienen bei der ALL-Ersterkrankung verschiedene klinische und laborchemische Faktoren wie die initiale Leukozytenzahl, das Alter bei Diagnose und der Immunphänotyp. Dem Ansprechen auf die Therapie, initial gemessen an der in-vivo Reaktion auf Glukokortikoide während der zytoreduktiven Vorphase (Prednison-response) und am Ende der Induktionstherapie beurteilt durch Bestimmung der Leukämiezellast auf molekularer Ebene (minimal residual disease, MRD, siehe auch 1.3.2), kommt dabei eine besondere prognostische Aussagekraft zu⁶⁻⁸ (siehe Tabelle 1). Eine zusätzliche Prognoseeinschätzung gelingt durch den Nachweis spezifischer chromosomaler Veränderungen in den Leukämiezellen (siehe 1.4). Dadurch wird die Identifizierung von Subtypen ermöglicht, die sich in ihrer Prognose voneinander unterscheiden und entsprechend von unterschiedlichen Behandlungsintensitäten oder spezifischen Therapieansätzen profitieren.

Klinisch/laborchemische Parameter	Prognostische Bedeutung		
männliches Geschlecht	ungünstig		
Alter <1 oder >6 Jahre	ungünstig		
Leukozytenzahl im Blut >50x10 ³ /µl	ungünstig		
ZNS-Beteiligung	ungünstig		
Prednison-poor-response (>10 ³ Blasten im Blut an Therapietag 8)	ungünstig		
schlechte morphologische Remission (>5 % Blasten im KM-Ausstrich an Tag 33)	ungünstig		
Molekularbiologische Faktoren	Prognostische Bedeutung		
schlechte molekulare response (MRD >10 ⁻³)	ungünstig		
Chromosomale Translokation t(9;22) (BCR-ABL)	ungünstig		
Chromosomale Translokation t(4;11) (MLL-AF4)	ungünstig		
Hypodiploidie (<44 Chromosomen)	ungünstig		
Chromosomale Translokation t(12;21) (ETV6/RUNX1)	günstig		

Prognosefaktoren und deren prognostische Bedeutung bei ALL-Ersterkrankung

Tabelle 1: Prognosefaktoren und deren prognostische Bedeutung bei ALL-Ersterkrankung nach Ergebnissen der ALL-BFM Studien^{6,9}

1.3 ALL-Rezidiv

Trotz der großen Fortschritte in der Ersterkrankungsbehandlung der ALL im Kindesalter mit Heilungsraten bis zu 75 %¹⁰, erleiden etwa 25 % der betroffenen Kinder ein Rezidiv der Erkrankung¹¹. Das ALL-Rezidiv stellt damit die viert häufigste maligne Krankheitsentität im Kindesalter dar. Mit einer Überlebenswahrscheinlichkeit von kaum 40 % sind die Chancen auf eine komplette Heilung für das ALL-Rezidiv deutlich vermindert¹². Umso bedeutender ist daher die Adaptation der Intensität der Rezidivtherapie des Patienten. Die an das individuelle Risiko klinischen Stratifizierungskriterien der ALL-REZ BFM Studie (siehe 1.3.1) ermöglichen die Zuordnung der Patienten zu Risikogruppen mit signifikant unterschiedlicher Prognose. Allerdings bestehen innerhalb der Risikogruppen deutliche Unterschiede im Krankheitsverlauf einzelner Patienten. Für eine präzisere Abschätzung des individuellen Risikos ist die Identifizierung und Charakterisierung genetischer Veränderungen in den Leukämiezellen erforderlich. Dadurch können mögliche funktionelle Veränderungen in den Leukämiezellen oder Mechanismen die zu einer Resistenz der Leukämiezellen

gegenüber der Chemotherapie beitragen, besser verstanden werden und neue Therapieansätze identifiziert werden (siehe 1.4).

1.3.1 Risikostratifizierung und Prognosefaktoren beim ALL-Rezidiv

Für das ALL-Rezidiv haben die Ergebnisse der konsekutiv durchgeführten Therapieoptimierungsstudien ALL-REZ BFM ergeben, dass der Zeitpunkt des Rezidivs, der Ort des Rezidivs und der Immunphänotyp derzeitig die wichtigsten bekannten prognostischen Faktoren sind^{11,12} (siehe Tabelle 1.2). Als prognostisch ungünstig gelten ein früher Erkrankungsrückfall¹³, ein isolierter KM-Befall¹⁴, sowie ein T-Zell-Immunphänotyp¹⁵. Durch Kombination der drei Prognosefaktoren werden im Wesentlichen vier Hauptgruppen mit signifikant unterschiedlichen ereignisfreien Überlebensraten zur Therapiestratifizierung definiert (S1, Standardrisiko; S2. Intermediärrisiko; S3/4, Hochrisiko; siehe Tabelle 2). Etwa 10 % der Patienten werden in die prognostisch günstigste Standardrisikogruppe (S1) stratifiziert, 65 % der Intermediärrisikogruppe (S2) zugeordnet und etwa 25 % den Hochrisikogruppen S3 und S4 zugeteilt. Entsprechend der Strategiegruppe entscheidet sich gemäß des ALL-REZ BFM 2002 Protokolls die Intensität der chemotherapeutischen Behandlung und wird die Indikation zur Stammzelltransplantation (SZT) gestellt.

ALL-Rezidiv Risikostratifizierung gemäß Protokoll ALL-REZ BFM 2002						
	Immunphänotyp			Immunphänotyp		
	non-T (B-Zell-Vorläufer)			(prä-) T		
Lokalisation	Extramedullär	KM	KM	Extramedullär	KM	KM
	isoliert	kombiniert	isoliert	isoliert	kombiniert	isoliert
Zeitpunkt						
sehr früh ¹	S2	S4	S4	S2	S4	S4
früh ²	S2	S2	S3	S2	S4	S4
omp ³	S1	S2	S2	S1	S4	S4

Tabelle 2: ALL-Rezidiv Risikostratifizierung gemäß Protokoll ALL-REZ BFM 2002

< 18 Monate nach Erstdiagnose und < 6 Monate nach Ende der Ersttherapie

XVIII ≥ 18 Monate nach Erstdiagnose und < 6 Monate nach Ende der Ersttherapie

XVIII ≥ 6 Monate nach Ende der Ersttherapie

1.3.2 Minimal residual disease (MRD)

Zusätzlich zu den in 1.3.1. genannten Stratifizierungskriterien kommt dem Ansprechen auf die Therapie bei der Einschätzung der Wirksamkeit einer ALL-Therapie besondere

Bedeutung zu. Neben der klassischen zytomorphologischen Beurteilung der Reduktion der Leukämiezelllast, hat sich der quantitative Nachweis von geringen Mengen an residuellen Leukämiezellen (MRD) auf molekularer Ebene, als überlegene Methode für die prognostische Einschätzung erwiesen. Durch sensitive und spezifische molekularbiologische Methoden können Leukämiezellen unterhalb der mikroskopischen Nachweisgrenze aufgespürt werden^{7,8}. Dies ermöglicht die Dokumentation der Leukämiezelllast im Therapieverlauf und dient als Grundlage für eine weitere Risikoadaptation der Behandlung. Als Goldstandard für die MRD-Messung hat sich aktuell in Europa der quantitative Nachweis leukämiezellklonspezifischer Marker wie den Genumlagerungssequenzen der Immunglobulin- oder T-Zellrezeptor-Genloci mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgesetzt. Anhand dieser Marker können leukämische Restzellen bis zu einer Sensitivität von <10⁻⁵ (eine Leukämiezelle in 100.000 gesunden Zellen) nachgewiesen werden^{7,8,16}.

Für die beim ALL-Rezidiv zahlenmäßig größte intermediäre Risikogruppe S2, hat sich der Nachweis des MRD-Niveaus nach dem zweiten Therapieelement der Rezidivbehandlung (F2) als stärkster unabhängiger prädiktiver Faktor des ereignisfreien Überlebens erwiesen¹⁷ und findet in der ALL-REZ BFM 2002 Studie routinemäßig Anwendung zur Therapiestratifizierung in dieser bezüglich ihrer Prognose heterogenen Risikogruppe. Patienten, bei denen zu diesem Therapiezeitpunkt weniger als eine Leukämiezelle in 1000 gesunden Zellen nachgewiesen werden (MRD <10⁻³, MRD good response), haben eine signifikant bessere Prognose als Patienten, bei denen zu diesem Zeitpunkt höhere MRD-Werte gemessen werden (MRD ≥10⁻³, MRD poor response)¹⁷. Anhand des MRD-Befundes wird in der Risikogruppe S2 die Indikation für eine weitere Intensivierung der Therapie durch SZT für Patienten der MRD-poor-responder-Gruppe gestellt. Die biologischen Hintergründe, die diese Unterschiede im Ansprechen auf die Therapie erklären könnten, sind bislang allerdings weitestgehend unbekannt.

1.3.3 Therapie des ALL-Rezidivs

Die Behandlung der ALL erfolgt in Deutschland durch eine intensive Polychemotherapie sowie für einen Teil der Patienten durch Bestrahlung und SZT nach einheitlichen Protokollen im Rahmen von Therapieoptimierungsstudien und ist pädiatrischonkologischen Zentren vorbehalten. Kinder mit Rezidiv einer ALL werden im deutschsprachigen Raum gemäß der ALL-REZ BFM Therapieoptimierungsstudien behandelt.

besondere Herausforderung stellt die Rezidivtherapie einerseits durch Eine Resistenzen der Leukämiezellen gegenüber der chemotherapeutischen Behandlung dar, die eine weitere Intensivierung der Therapie durch eine höhere Dosierung der deren kombinierte Applikation und eine dichtere Abfolge der Medikamente. Medikamentengabe erfordern^{18,19}. Andererseits ist die Therapietoleranz der Patienten bei der Rezidivbehandlung durch die vorhergehende Chemotherapie in jeder Hinsicht herabgesetzt. Gemäß des aktuellen ALL-REZ BFM 2002 Protokolls (siehe Abbildung 1) Rezidivtherapie in Form Therapieblöcken, erfolgt die von in denen Mehrfachkombinationen von Zytostatika alternierend appliziert werden (F1, F2, R1, R2). Zu diesen zählen Glukokortikoide (GC), Mitosehemmer, Alkylantien, Anthrazykline, Antimetabolite und L-Asparaginase. Zwischen den fünf bis sechs Tage dauernden Therapieblöcken dienen zweiwöchige Pausen der Regeneration des KM. Alternativ wird für einen Teil der R-Blöcke eine kontinuierliche Gabe der Chemotherapie (Protokoll II-IDA) erprobt. Zusätzlich zu dieser systemischen Therapie wird das ZNS in jedem Block durch die intrathekale Gabe einer 3-fach Kombination von Zytostatika (Prednison, Methotrexat und Cytarabin) behandelt. Nach Erreichen einer zweiten Remission stellt die SZT, die mit einer hohen Morbidität und Letalität verbunden ist, für einen wesentlichen Teil der Patienten mit ALL-Rezidiv den einzigen kurativen Ansatz dar²⁰. Dies trifft für alle Patienten zu, die in den Hochrisikogruppen S3/S4 behandelt werden. In der intermediären Risikogruppe S2 wird die Indikation zur SZT anhand des MRD-Wertes am Ende der Induktionstherapie (F1 und F2) gestellt (siehe auch 1.3.2). Für Patienten der Standardrisikogruppe S1 sowie für S2-Patienten mit guter molekularer Therapieresponse, wird die Behandlung anschließend mit einer oral applizierten Dauertherapie (Mercaptopurin und MTX) für 12 bzw. 24 Monate fortgesetzt. Diese Patienten erhalten bei Beteiligung des KM zudem eine prophylaktische Bestrahlung des ZNS, wodurch das Risiko eines Folgerezidivs signifikant vermindert werden kann²¹ sowie eine Bestrahlung des eventuell beteiligten Extrakompartiments.



Abbildung 1: Behandlungsprotokoll der ALL-REZ BFM 2002 Studie.

Abkürzungen: F1, F2 (=Induktion), R1, R2, Protokoll II-IDA, Chemotherapieblöcke; ®, Randomisierung; S, Stratifizierung; ♥, lokale Strahlentherapie; D12/24, 12/24 Monate Dauertherapie; V, VP-16-Reinduktionspulse; KMP, KM-Punktion; MRD, minimal residual disease; ♥, KMP/MRD, Zeitpunkt der KMP für die Stratifizierung der Postremissionstherapie gemäß MRD in S2.

1.3.4 Glukokortikoide in der Behandlung des ALL-Rezidivs

Glukokortikoide (GC) gehören zu den essentiellen Medikamenten der ALL-Therapie und sind ein wichtiger Bestandteil der ALL-REZ BFM Rezidivprotokolle. Der Einsatz von GC bei der ALL-Therapie gründet sich auf deren Fähigkeit, in unreifen lymphoblastischen Leukämiezellen Apoptose zu induzieren. Dabei besitzt Dexamethason im Vergleich mit anderen GC eine erhöhte Affinität für den Glukokortikoidrezeptor (GR), der auf lymphoblastischen Leukämiezellen exprimiert wird²². Im aktuellen ALL-REZ BFM 2002 Protokoll wird Dexamethason in der zytoreduktiven Vorphase als einziges Medikament verabreicht, mit dem Ziel, die initiale Leukämiezellmasse zu reduzieren und wird kombiniert mit weiteren Zytostatika in den Therapieblöcken F1, F2, R1 und R2 bzw. in niedrigerer Dosierung über einen längeren Zeitraum während des Protokoll II-IDA appliziert. Für die intrathekale Therapie wird Prednison verwendet.

1.4 Molekulargenetische Veränderungen in Leukämiezellen

Durch die Entwicklung neuer Nachweismethoden konnten in den vergangenen Jahren zusätzlich zu den bekannten vornehmlich klinischen Stratifizierungskriterien, spezifische molekulargenetische Veränderungen in den Leukämiezellen nachgewiesen werden. Die Identifizierung prognostisch relevanter biologischer Marker für die ALL hat wesentlich zum Verständnis der Leukämieentstehung und zur Verbesserung der Behandlung beigetragen.

Eine ALL entsteht durch Transformation und klonale Proliferation einer pluripotenten Stammzelle oder einer lymphatischen Progenitorzelle. Die Leukämiezellen sind durch eine Differenzierungsblockade gekennzeichnet, die zu einer Arretierung in einem bestimmten Entwicklungsstadium führt. Die Ursachen, die für die Transformation der Zelle verantwortlich sind oder diese begünstigen, sind nicht vollständig geklärt. Bekannt ist, dass genetische Aberrationen, die in einem veränderten Proliferationsverhalten, einer Beeinträchtigung der Differenzierung oder einem gestörten Apoptoseverhalten der Zelle resultieren können, eine zentrale Rolle in der Leukämogenese einnehmen.

Grundsätzlich können genetische Veränderungen in Form von Mutationen wie Insertionen, Deletionen oder Punktmutationen einerseits zu einem Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen infolge Deletion oder Inaktivierung führen und damit deren natürliche Wirkung als negativer Wachstumsregulator aufheben. Zellen können dadurch eine uneingeschränkte Teilungsfähigkeit erlangen. Andererseits können Proto-Onkogene durch einen Funktionsgewinn, z. B. durch Amplifikation oder Translokation, zu Onkogenen aktiviert werden. Die Störung der zellulären Signaltransduktion kann letztlich dazu führen, dass Zellen gegenüber apoptotischen Signalen resistent werden und die Steuerung von Zellproliferation und –Differenzierung gestört wird. Bei der ALL häufige genetische Veränderungen sind numerische Aberrationen wie Hyperdiploidie (>51 Chromosomen) oder Hypoploidie (<45 Chromosomen) und strukturelle Aberrationen, zu denen die chromosomalen Translokationen zählen.

1.4.1 Chromosomale Translokationen und Aneuploidien

Chromosomale Translokationen gehören zu den häufigsten genetischen ALL dem ALL-Rezidiv Veränderungen bei der und und sind für die Leukämieentstehung, die Prognose und die Behandlung von besonderer Bedeutung. Für die ALL typisch sind balanzierte oder reziproke Translokationen, die zum Austausch von genetischem Material zwischen zwei nicht-homologen Chromosomen führen. Dadurch entstehen Fusionsgene, die Proteine mit veränderten Eigenschaften exprimieren und eine entscheidende Rolle in der Leukämogenese spielen²³. So können Translokationen in der Aktivierung onkogener Proteinkinasen resultieren oder in einer Störung der Funktion von Transkriptionsfaktoren^{23,24}. Durch den Nachweis spezifischer Translokationen lassen sich bei der ALL einzelne Subtypen mit unterschiedlicher Prognose charakterisieren. Die biologische Relevanz chromosomaler Translokationen konnte für einige der Veränderungen in Mausmodellen demonstriert werden²⁵⁻²⁷ und zeigte sich in Genexpressionsanalysen der ALL, in denen charakteristische Genexpressionssignaturen einzelnen ALL-Subtypen zugeordnet werden konnten²⁸⁻³⁰.

Zu den häufigsten rekurrenten chromosomalen Translokationen bei der BCP-ALL zählen die Translokationen t(12;21), t(1;19) und t(9;22), mit ihren molekulargenetischen Äquivalenten, den Fusionsgenen *ETV6/RUNX1*, *E2A/PBX* und *BCR/ABL*. Eine Sonderstellung nehmen Translokationen unter Beteiligung des *MLL*-Gens (Chromosom 11q23) ein, die bei der Säuglings-ALL die häufigsten Translokationen darstellen. Das *MLL*-Gen kann bei dieser ALL-Subgruppe mit einer Vielzahl von Partnergenen fusionieren, am häufigsten ist die t(4;11), die in der Fusion mit dem *AF4*-Gen resultiert³¹.

Während die *BCR/ABL*-Genfusion, Fusionen des *MLL*-Gens und Hypodiploidie mit einer sehr ungünstigen Prognose assoziiert sind³¹⁻³⁵, gelten die *ETV6/RUNX1*-Fusion sowie ein hyperdiploider Chromosomensatz sowohl bei der ALL-Ersterkrankung als auch beim Rezidiv als prognostisch günstig³⁶⁻⁴⁴. Abbildung 2 zeigt die Verteilung der genetisch definierten Subgruppen bei der BCP-ALL-Ersterkrankung und beim Rezidiv.



Abbildung 2: Häufigkeit der genetisch definierten Subgruppen bei der ALL-Ersterkrankung und beim ALL-Rezidiv. Dargestellt sind ausschließlich BCP-ALL. Der prozentuale Anteil der einzelnen Subgruppe ist für die Ersterkrankung entnommen aus Armstrong et al.⁴⁵, die Häufigkeiten für das Rezidiv entstammen den aktuellen Ergebnissen der ALL-REZ BFM Studie, persönliche Kommunikation Drs. Kirschner-Schwabe und Eckert.

1.5 Translokation t(12;21) und Fusionsgen *ETV6/RUNX1*

Die kryptische chromosomale Translokation t(12;21)(p13;q22) ist die häufigste strukturelle interchromosomale Veränderung bei der ALL-Ersterkrankung und beim ALL-Rezidiv im Kindesalter und findet sich in den Leukämiezellen von etwa 20-25 % der BCP-ALL-Ersterkrankungen- und ALL-Rezidive. Die Translokation resultiert in der Fusion der Gene für die Transkriptionsfaktoren ETV6 und RUNX1, deren Bedeutung für die Hämatopoese essentiell ist⁴⁶⁻⁴⁸.

1.5.1 Transkriptionsfaktor ETV6 – Struktur und Funktion

Das ETV6-Gen (ets variant gene 6) (Synonym TEL für translocation ets leukemia) ist auf Chromosom 12p13.2 lokalisiert, besteht aus 8 Exons⁴⁹ und gehört zu den ETS (etwenty-six-specific)-Transkriptionsfaktoren⁵⁰. Die Familie der ETS-Transkriptionsgroße Gruppe von faktoren umfasst eine evolutionär hochkonservierten Transkriptionsregulatoren, die in verschiedenen zellulären Prozessen der Entwicklung und Differenzierung von wesentlicher Bedeutung sind⁵¹. ETV6 besitzt wie alle Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie C-terminal eine hochkonservierte DNAbindende ETS-Domäne, die für die nukleäre Lokalisation und die sequenzspezifische DNA-Bindungsaktivität von ETV6 verantwortlich ist^{50,52}. Die ETS Domäne erkennt das "core motif" mit der Basenabfolge GGAA/T in Promotoren und Enhancern (regulatorische DNA-Elemente, die die Bindungsaffinität eines Promotors und damit die Expression eines Zielgens verstärken) zahlreicher Zielgene⁵³. N-terminal lokalisiert ist die ebenfalls hochkonservierte helix-loop-helix (HLH)-Domäne, die auch als "pointed domain" bezeichnet wird und durch Protein-Protein-Interaktion die transkriptionelle Aktivierung von ETV6 moduliert. Sie vermittelt sowohl die Homo- als auch die Heterodimerisierung von ETV6 und seinen Fusionsproteinen und ist für die normale Funktion von ETV6 essentiell⁵⁴⁻⁵⁶. ETV6 ist sowohl bei myeloischen als auch bei lymphatischen Leukämien in chromosomale Translokationen involviert. Erstmals beschrieben wurde es von Golub et al.55 bei der chronischen myelomonozytären Leukämie als Fusionspartner des platelet-derived growth factor receptor ß (PDGFRB)-Gens (Translokation (t5:12)). Seitdem konnten eine Vielzahl von chromosomalen Translokationen mit Beteiligung des ETV6-Gens identifiziert werden. Zu den Fusionspartnern zählen sowohl Proteintyrosinkinasen (PDGFRB⁵⁵, ABL1/2^{57,58}, JAK2⁵⁹) als auch Transkriptions-faktoren (RUNX1⁶⁰, MN1⁶¹, BTL⁶²).

Wenig bekannt ist bisher über spezifische Zielgene von ETV6. Untersuchungen legen nahe, dass ETV6 als transkriptioneller Repressor fungiert. Die Repression der Transkription erfolgt dabei durch Interaktion der zentralen Region von ETV6 mit den Co-Repressoren mSin3A, SMRT und N-CoR sowie durch die N-terminale Domäne des Proteins⁶³.

Während der embryonalen Entwicklung wird *ETV6* ubiquitär exprimiert. Die Bedeutung von ETV6 für Entwicklung und Hämatopoese konnte durch Mausmodelle demonstriert werden: Homozygote *ETV6*-defiziente Mäuse versterben im Embryonalstadium infolge schwerer Defekte der Dottersack-Angiogenese und zeigen Apoptose mesenchymaler und neuraler Zellen⁶⁴. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass ETV6 zwar nicht für die fetale Hämatopoese in der Leber erforderlich ist, aber für die definitive Hämatopoese im KM eine essentielle Funktion besitzt⁶⁵.

1.5.2 Transkriptionsfaktor RUNX1 – Struktur und Funktion

Das RUNX1 (runt related transcription factor 1)-Gen (Synonyme AML1 für acute myeloid leukemia 1 und CBFα2 für core binding factor α2) ist auf Chromosom 21q22 lokalisiert, besteht aus 9 Exons⁶⁶ und gehört zur Familie der Runt-ähnlichen (RUNX)oder core binding factor a (CBFa)- Transkriptionsfaktoren. Proteine der RUNX-Familie bilden heterodimere Komplexe mit CBFß. Dabei bindet die ß-Untereinheit (CBFß) nicht direkt an DNA, verstärkt jedoch die DNA-Bindung der a-Untereinheit (CBFa) und stabilisiert den Komplex^{67,68}. Neben RUNX1 existieren die α -Untereinheiten RUNX2 und RUNX3⁶⁹. Die DNA-Bindung der RUNX-Transkriptionsfaktoren wird durch die evolutionär hoch konservierte N-terminal lokalisierte "Runt Homologie Domäne" (RHD) vermittelt⁷⁰. Diese weist eine hohe Sequenzübereinstimmung mit dem runt Gen auf, welches bei Drosophila melanogaster verschiedene Entwicklungsprozesse während der Embryogenese kontrolliert⁷¹. Die DNA-Bindung erfolgt bei RUNX1 über die Zielseguenz TGT/cGGT, die in den Promotoren und Enhancern der Zielgene erkannt wird⁶⁷. Nachgewiesen werden konnte diese Sequenz in den regulatorischen Elementen mehrerer hämatopoese-spezifischer Gene, die durch RUNX1 aktiviert werden. Dazu zählen die Promotoren GM-CSF (Granulozyten/Makrophagen-Kolonievon stimulierender Faktor)⁷², M-CSF (Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor)⁷³, Myeloperoxidase und Neutrophilen-Elastase⁷⁴ und IL-3⁷⁵ sowie die Enhancer der T-Zell Antigenrezeptoren⁷⁶. Die zweite funktionelle Einheit von RUNX1 wird von der C-terminal gelegenen Transaktivierungsdomäne gebildet, die die Transkription der Zielgene von

RUNX1 aktiviert^{77,78}. Neben seiner Rolle als Transkriptionsaktivator fungiert RUNX1 als transkriptioneller Repressor. Zu den Interaktionspartnern von RUNX1, die eine transkriptionelle Repression vermitteln, gehören unter anderem die sin3A-Proteine, die ihre Wirkung als Corepressoren durch direkte Beeinflussung der basalen Transkriptionsmaschinerie entfalten⁷⁹.

Auch für RUNX1 konnte in Mausmodellen eine essentielle Bedeutung für die Hämatopoese nachgewiesen werden. Bei homozygot *RUNX1*-defizienten Mäusen ist die fetale Leberhämatopoese aller Zellreihen durch einen Differenzierungsblock schwer beeinträchtigt und es treten letale Blutungen und Nekrosen des ZNS auf^{46,47}.

Wie *ETV6* ist auch *RUNX1* bei verschiedenen Leukämien in chromosomale Translokationen involviert. Identifiziert wurde das Gen durch die chromosomale Translokation t(8;21) bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) M2^{80,81}, durch die das Fusionsgen *RUNX1/ETO* generiert wird. Eine weitere chromosomale Translokation unter Beteiligung von *RUNX1/ETO* generiert wird. Eine weitere chromosomale Translokation therapieassoziierten Leukämien sowie bei der chronisch myeloischen Leukämie in der Blastenkrise und bei myelodysplastischen Syndromen beschrieben wurde^{82,83}. Gemeinsam ist den unter Beteiligung von RUNX1 gebildeten Fusionsproteinen, dass die DNA-bindende RHD und damit die Fähigkeit zur Bindung an die Promotoren der Zielgene von RUNX1 und die Dimerisierung mit CBFß erhalten bleiben. Dadurch wird die transkriptionsaktivierende Wirkung des normalen RUNX1 supprimiert⁸⁴.

1.5.3 ETV6/RUNX1 – Struktur und Funktion

Durch die reziproke Translokation t(12;21) wird die HLH-Domäne von *ETV6* mit nahezu dem gesamten *RUNX1*-Gen im Bereich der DNA-bindenden RHD-Domäne von *RUNX1* fusioniert^{60,85}. Dabei werden Exon 5 von *ETV6* mit Exon 2 oder 3 von *RUNX1* leserastererhaltend miteinander verbunden. Es resultiert die Expression des chimären Proteins ETV6/RUNX1. Das reziproke Fusionstranskript *RUNX1/ETV6* wird nur sporadisch exprimiert^{42,56} und seine Bedeutung für die Leukämogenese als weniger relevant eingeschätzt⁸⁶. Wie in 1.5.2 beschrieben, ist das Fusionsprotein ETV6/RUNX1 weiterhin in der Lage, an die Enhancer- und Promotorregionen der RUNX1-Zielgene zu binden. Im Gegensatz zum normalen RUNX1 vermittelt das Fusionsprotein allerdings eine Repression der Expression dieser Gene. Die Repressorfunktion ist dabei abhängig von der im Fusionsprotein enthaltenen HLH-Domäne und der zentralen Region von

ETV6^{84,87-89}. Die Repressorfunktion der zentralen ETV6-Domäne erfolgt durch Interaktion mit N-CoR, einem Bestandteil des nukleären Corepressor-Komplexes⁸⁷, sowie mit weiteren Corepressor-Komplexen wie mSin3A, SMRT. N-CoR und SMRT vermitteln ihre Repression durch die Rekrutierung von Enzymen wie HDAC3 (Histondeacetylase 3), die durch eine Verdichtung der Chromatinstruktur den Zugang von Transkriptionsfaktoren zur DNA behindern^{63,90,91}.



Abbildung 3: Schematische Darstellung von ETV6 und RUNX1 und dem aus der Fusion resultierenden Protein ETV6/RUNX1. HLH, helix-loop-helix Domäne; r, repression; ETS, DNA-bindende Domäne; RHD, runt homology domain; TA, Transaktivierungsdomäne

Es wird angenommen, dass die Unterdrückung der normalen RUNX1-Funktion und damit die Störung der Differenzierung hämatopoetischer Zellen im KM, einen wesentlichen Schritt in der Leukämogenese darstellt^{84,89,92}. Weiterhin könnte eine Unterdrückung der normalen ETV6-Wirkung durch Heterodimerisierung des ETV6/RUNX1 Fusionsproteins mit dem zweiten nicht translozierten Wildtyp-ETV6 ein wichtiges Ereignis für die ETV6/RUNX1-Leukämogenese darstellen⁵⁶ (vgl. auch 1.6).

In verschiedenen Analysen konnte gezeigt werden, dass die Expression von *ETV6/RUNX1* die normale hämatopoetische Differenzierung beeinträchtigt und die Entstehung präleukämischer Klone fördert^{25,90,93}, allein jedoch keine Leukämie verursacht⁹⁴. Dies wird veranschaulicht durch die Detektion des Fusionsgens bzw. – transkripts in Nabelschnurblutproben gesunder Neugeborener mit einer Häufigkeit, die höher zu sein scheint als die tatsächliche Prävalenz *ETV6/RUNX1*-positiver ALL^{95,96}.

Die Prävalenz der *ETV6/RUNX1*-Fusion in gesunden Neugeborenen war kürzlich Gegenstand einer intensiven Literaturdebatte⁹⁶⁻⁹⁸, die vermutlich erst durch weitere Studien zu einem abschließenden Ergebnis führen wird. Weiterhin konnte der identische, in utero durch feto-fetale Transfusion übertragene Zellklon in monozygoten Zwillingen nachgewiesen werden, die später zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine

ETV6/RUNX1-positive ALL entwickelten^{99,100}. Darüber hinaus zeigte sich im Mausmodell, dass ETV6/RUNX1-positive Mäuse zwar eine gestörte B-Zell-Differenzierung aufwiesen, jedoch keine Leukämie entwickelten^{25,93,94,101,102}. Hong et al.¹⁰⁰ untersuchten kürzlich die Identität und Funktion der transformierten Stammzellpopulation, die den präleukämischen Klon der ETV6/RUNX1-positiven ALL möglicherweise erzeugt und erhält. Im Fokus ihrer Untersuchungen stand eine Zellpopulation, die bei der ALL im Kindesalter, nicht aber in gesundem KM nachweisbar ist und durch die Zelloberflächenmarkerkonstellation CD34⁺CD38⁻CD19⁺ charakterisiert wird¹⁰³. Ihnen gelang der Nachweis dieser potentiellen Leukämie-Ursprungszelle sowohl klinisch in ETV6/RUNX1-positivem Patientenmaterial als auch funktionell im Mausmodell. Lentivirale Transduktion humaner Nabelschnurblutzellen mit dem ETV6/RUNX1-Fusionsgen führte zur Ausbildung von Zellen des aberranten CD34⁺CD38⁻CD19⁺ Immunphänotyps. Die ETV6/RUNX1-positiven CD34⁺CD38⁻CD19⁺exprimierenden Zellen besaßen zudem nach Transplantation in immundefizienten NOD/SCID-Mäusen die Fähigkeit, die CD34⁺CD38⁻CD19⁺ Zellpopulation im KM wiederherzustellen und zu reifen B-Zellen zu differenzieren¹⁰⁰.

Die Ergebnisse der genannten Untersuchungen veranschaulichen, dass die *ETV6/RUNX1*-Fusion ein frühes und auslösendes Ereignis für die Leukämieentstehung darstellt, das bereits pränatal stattfindet und in der Bildung präleukämischer Klone mit veränderten Selbsterneuerungs- und Überlebens-eigenschaften resultiert. Diese sind in der Lage für mehrere Jahre vor Auftreten einer ALL im KM zu persistieren. Für die endgültige leukämogene Transformation der Zelle sind jedoch zusätzliche genetische Veränderungen erforderlich.

1.5.4 Prävalenz und prognostische Signifikanz von ETV6/RUNX1

Aufgrund der ähnlichen Bandenmuster der Chromosomenbanden 12p21 und 21q22, die eine Detektion der Translokation t(12;21) durch konventionelle zytogenetische Methoden stark einschränken, konnte die tatsächliche Häufigkeit der *ETV6/RUNX1*-Genfusion erst durch die Einführung molekulargenetischer Methoden wie der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) in die ALL-Diagnostik ermittelt werden. Kurz nach Identifizierung des Fusionsgens 1995 durch Golub et al.⁶⁰ und Romana et al.⁸⁵ folgten Studien zur Prävalenz der Genfusion bei der ALL-Ersterkrankung im Kindesalter, die die Translokation t(12;21) bei etwa 20 % der untersuchten ALL-Ersterkrankungen beschrieben^{43,44}. Hinsichtlich der prognostischen Relevanz zeigte

sich eine Assoziation mit günstigen Prognosefaktoren wie BCP-Immunphänotyp, mittleres Erkrankungsalter und niedrigere Leukozytenzahlen, die in einem signifikant höheren pEFS für diese Subgruppe resultierten^{36,37,42,44,56,86,104}. Diese Ergebnisse wurden durch Studien beim ALL-Rezidiv zunächst in Frage gestellt, die eine nahezu identische Häufigkeit der *ETV6/RUNX1*-Fusion zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose nachweisen konnten (etwa 20 %)^{39,44,105}. Allerdings zeigte sich auch für das Rezidiv, dass die *ETV6/RUNX1*-Fusion insgesamt mit günstigen prognostischen Merkmalen wie spätem Zeitpunkt des Rezidivs und BCP-ALL assoziiert ist^{39,41,106,107}. In der Zwischenzeit konnte durch längere Nachbeobachtungszeiten, die dem typischerweise späten Auftreten von Rezidiven oder Folgerezidiven bei der *ETV6/RUNX1*-positiven ALL Rechnung tragen, belegt werden, dass der Nachweis von *ETV6/RUNX1* in den Leukämiezellen sowohl für die ALL-Ersterkrankung als auch für das ALL-Rezidiv insgesamt ein günstiges prognostisches Merkmal darstellt^{36,37,106}.

1.5.5 Klinische Merkmale ETV6/RUNX1-positiver ALL-Rezidive

Wie in 1.5.4 beschrieben, repräsentiert die *ETV6/RUNX1*-positive ALL sowohl bei der Ersterkrankung als auch beim Rezidiv einen prognostisch günstigen Subtyp der Erkrankung. Entsprechend den Stratifizierungskriterien der ALL-REZ BFM 2002-Studie (siehe auch 1.3.1) treten *ETV6/RUNX1*-positive Rezidive in der Mehrzahl der Fälle (>80 %) zu einem späten Zeitpunkt in Bezug auf die Vortherapie auf. Etwa 14 % zählen zu den prognostisch ungünstigeren frühen Rezidiven, nur knapp 4 % sind sehr frühe Rezidive. Der Ort des Rezidivs betrifft bei etwa 75 % der Patienten isoliert das KM, bei etwa 25 % wird der zusätzliche Befall eines extramedullären Kompartiments diagnostiziert. Darüber hinaus werden nahezu alle *ETV6/RUNX1*-positiven Rezidive durch einen BCP-Immunphänotyp charakterisiert. Aufgrund dieser Merkmale wird die Mehrheit der *ETV6/RUNX1*-positiven Rezidive (ca. 85 %) in die intermediäre Risikogruppe der S2-Patienten stratifiziert. Immerhin knapp 15 % werden den Hochrisikogruppen S3/S4 zugeordnet.

Den Ergebnissen der ALL-REZ BFM Studien 96/2002 nach beträgt die Wahrscheinlichkeit eines ereignisfreien Überlebens (pEFS) für *ETV6/RUNX1*-positive Erstrezidive 82 % SE ± 0,1 nach 4 Jahren und ist damit vergleichbar mit dem pEFS von BCP ALL-Rezidiven mit hyperdiploidem Karyotyp (76 % SE ± 0,14), jedoch signifikant besser als die ereignisfreie Überlebenswahrscheinlichkeit der übrigen BCP ALL-Rezidive (pEFS 21 % SE ± 0,11 nach 4 Jahren) (P = 0,01) (siehe Abbildung 4, bisher

15

unveröffentlichte Daten, persönliche Kommunikation Drs. Kirschner-Schwabe und Eckert).

Trotz der insgesamt günstigen Prognose zeigt die Analyse des molekularen Ansprechens auf die Therapie durch Quantifizierung der minimalen Resterkrankung (MRD), dass die *ETV6/RUNX1*-positiven ALL-Rezidive eine heterogene Gruppe bilden, die sich anhand ihres molekularen Ansprechens auf die Behandlung in zwei Gruppen aufteilen lässt, die sich in ihrem pEFS deutlich voneinander unterscheiden. Für die Gruppe der *ETV6/RUNX1*-positiven MRD good responder liegt das pEFS bei 80 % SE \pm 7,6 nach 6 Jahren, für die *ETV6/RUNX1*-positiven MRD poor responder bei 61 % SE \pm 13 (*P* = 0,073) (siehe Abbildung 5). Insgesamt zeigen etwa 40 % der *ETV6/RUNX1*-positiven SE molekulares Ansprechen auf die Therapie (bisher unveröffentlichte Daten, persönliche Kommunikation Dr. Eckert).

Diese klinischen Daten zeigen, dass die *ETV6/RUNX1*-Fusion insgesamt betrachtet und im Vergleich mit anderen genetisch definierten Subtypen, mit einem vorteilhaften Risikoprofil assoziiert ist. Jedoch veranschaulichen sie ebenfalls, dass es sich hierbei um eine klinisch sehr heterogene Untergruppe von Rezidiven handelt, die durch deutliche Unterschiede im Ansprechen auf die Therapie und folglich in der Überlebenswahrscheinlichkeit gekennzeichnet wird. Bisher ist nicht bekannt ob und welche genetischen Veränderungen zu einer Erklärung dieser Unterschiede beitragen können.



Abbildung 4: Kaplan-Meier Analyse der Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (pEFS ± Standardabweichung, SE) in Abhängigkeit von der genetisch definierten Subgruppe.

Dargestellt sind die in der ALL-REZ BFM Studie behandelten ALL-Erstrezidive mit BCP-Immunphänotyp (T-ALL ausgeschlossen). Das pEFS beträgt 82 % SE \pm 0,10 in der Patientengruppe mit Nachweis von *ETV6/RUNX1* und 76 % SE \pm 0,14 für die Subgruppe mit hyperdiploidem Chromosomensatz. Für BCP-ALL-Rezidive ohne Nachweis von *ETV6/RUNX1* oder Hyperdiploidie beträgt das pEFS 21 % SE \pm 0,11. Die Daten entstammen der aktuellen ALL-REZ BFM 2002 Studie, persönliche Kommunikation Drs. Kirschner-Schwabe und Eckert.



Abbildung 5: Kaplan-Meier Analyse der Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (pEFS \pm Standardabweichung, SE) der *ETV6/RUNX1*-positiven Erstrezidive der intermediären Risikogruppe S2 in Abhängigkeit von der molekularen Therapieresponse (MRD) am Ende der Induktionstherapie. Das pEFS beträgt 80 % SE \pm 7,6 für die ALL-Erstrezidive in der Patientengruppe mit gutem Ansprechen auf die Therapie, gegenüber 61 % SE \pm 13 für die Patientengruppe mit schlechtem molekularen Ansprechen auf die Therapie. Die Daten entstammen der aktuellen ALL-REZ BFM 2002 Studie,

persönliche Kommunikation Dr. Eckert.

1.6 Zusätzliche genetische Veränderungen bei ETV6/RUNX1-positiver ALL

Die in 1.5.3 dargestellten Ergebnisse verschiedener Studien legen nahe, dass für die Transformation eines *ETV6/RUNX1*-positiven präleukämischen Klons zusätzliche genetische Veränderungen erforderlich sind.

Unter anderem durch FISH-Analysen zum Nachweis der *ETV6/RUNX1*-Fusion, konnten bereits bald nach deren Entdeckung zusätzliche Veränderungen der beiden involvierten Gene nachgewiesen werden. Dabei konnten Deletionen des nicht translozierten *ETV6*-Allels, Amplifikationen des zweiten *RUNX1*-Allels und Duplikationen des derivativen Chromosoms 21, als häufige Aberrationen bei der *ETV6/RUNX1*-positiven ALL sowohl zum Zeitpunkt der Ersterkrankung als auch beim Rezidiv, identifiziert werden¹⁰⁸⁻¹¹⁸. Bei der *ETV6/RUNX1*-positiven ALL-Ersterkrankung wurde dabei der Verlust des zweiten nicht-translozierten *ETV6*-Allels am häufigsten nachgewiesen (etwa 70 %), zusätzliche Kopien von *RUNX1* zeigten sich in 15-23 %, die Duplikation von der (21)t(12;21) in etwa 10 %^{108,112-114}. Weniger Daten existieren zur Häufigkeit zusätzlicher Veränderungen von *ETV6* und *RUNX1* beim Rezidiv der Erkrankung. Peter et al.¹¹⁸ untersuchten 27 *ETV6/RUNX1*-positive Erstrezidive mittels Interphase-FISH und fanden in 85 % zusätzliche Veränderungen der beiden Gene. Die *ETV6*-Deletion zeigten 52 %, eine *RUNX1*-Amplifikation 37 % und Duplikation der(21)t(12;21) 26 % der Rezidive¹¹⁸.

Deletionen des ETV6-Gens gehören aufgrund ihrer hohen Häufigkeit bei der ETV6/RUNX1-positiven ALL zu den am besten charakterisierten zusätzlichen Veränderungen. Die Ergebnisse verschiedener Studien weisen darauf hin, dass es sich bei der ETV6-Deletion um ein in Bezug auf die Translokation sekundäres Ereignis handelt. Dafür spricht, dass die ETV6-Deletion bei einigen Patienten ausschließlich in Subklonen der Erkrankung nachgewiesen werden konnte^{108,119,120} sowie der fehlende Nachweis einer ETV6-Deletion in putativ präleukämischen ETV6/RUNX1-positiven Zellen klinisch Gesunder^{95,100}. Weiterhin konnte durch Bruchpunktanalysen der Deletion zwischen Ersterkrankung und Rezidiv derselben ETV6/RUNX1-positiven ALL die Größe nachgewiesen werden, dass der Deletionen zwischen den Erkrankungsstadien variierte, sowohl im Sinne einer Zunahme als auch einer Abnahme oder auch fehlendem **Nachweis** der initial vorhandenen Deletion zum Rezidivzeitpunkt^{121,122}.

Durch konventionelle Chromosomenanalysen (G-banding) konnten auch in weiteren Chromosomen Aberrationen identifiziert werden. Dabei wurden Deletionen der Chromosomen 6q, 8q, 9p, 11q, 12p und 13q, der Verlust des gesamten X-Chromosoms sowie Zugewinne der Chromosomen 10, 16 und 21 als rekurrente zusätzliche Aberrationen bei der *ETV6/RUNX1*-positiven ALL-Ersterkrankung nachgewiesen^{105,116,123}.

Durch die Weiterentwicklung der molekulargenetischen Diagnostik, insbesondere durch gesamtgenomisch hochauflösende Untersuchungsmethoden wie der Microarraybasierten Genomhybridisierung (array comparative genomic hybridization, array CGH) und dem Single Nucleotide Polymorphism (SNP)-array, konnten in den letzten Jahren eine Vielzahl zusätzlicher numerischer Aberrationen (DNA copy number aberrations, CNA) in ETV6/RUNX1-positiven Leukämiezellen bei der ALL-Ersterkrankung auch auf submikroskopischer Ebene identifiziert werden¹²⁴⁻¹³¹. Dabei bestätigten sich einerseits die zuvor mit niedrigerer Auflösung als häufig nachgewiesenen Veränderungen. Zusätzlich konnten verschiedene fokale, auf einzelne Gene begrenzte Veränderungen nachgewiesen werden. Eindeutig in der Überzahl waren dabei Gendeletionen. Häufig betroffen waren Gene, die für die normale B-Zell-Differenzierung und B-Zell-Reifung von Bedeutung sind. Dazu zählen die B-Zell-Transkriptionsfaktoren ETV6, PAX5, EBF1 häufig betroffen waren Gene mit Einfluss auf die *TCF4.* Weiterhin und Zellzyklusregulation, Tumorsuppression und Apoptose. Das TBL1XR1-Gen, ein negativer Transkriptionsregulator mit Schlüsselfunktion für die durch nukleäre Hormonrezeptoren vermittelte Transkriptionsrepression, sowie das Glukokortikoidrezeptorgen NR3C1, waren spezifisch bei der ETV6/RUNX1-positiven ALL rekurrent deletiert^{127,128,130}.

Einzelne Studien untersuchten die Häufigkeit zusätzlicher CNA sowohl bei der Erstdiagnose als auch beim Rezidiv der BCP-ALL in gepaarten Proben¹³²⁻¹³⁴. Bezüglich der rekurrent veränderten Gene ergaben die Untersuchungen, dass Gene mit Bedeutung für B-Zelldifferenzierung, Zellzyklusregulation sowie für Metabolisierung und Wirkung von Medikamenten, beim Rezidiv ebenfalls häufig CNA aufwiesen. Insgesamt zeigte sich eher eine Zunahme der Anzahl von Veränderungen von Ersterkrankung zum Rezidiv. Mullighan et al. Konnten zeigen, dass Veränderungen, die ausschließlich in den Rezidivproben nachweisbar waren, initial bereits in Subklonen der ALL existierten¹³².

19

Kürzlich untersuchte eine Studie eine kleine Anzahl gepaarter *ETV6/RUNX1*-positiver Ersterkrankungs- und Rezidivproben auf das Vorhandensein zusätzlicher CNA. Hierbei zeigte sich ebenfalls eine Zunahme der Anzahl von Veränderungen von der Ersterkrankung zum Rezidiv (von durchschnittlich 7,5 auf 12,5 CNA pro untersuchte Probe). Rekurrente Veränderungen in den 14 Proben waren Deletionen von Genen mit Bedeutung für die GC-vermittelte Apoptose wie *Bcl2 modifying factor (BMF)* und *NR3C1*. Weiterhin waren Gene des MMR-pathways (*MLH1, MSH2*) rekurrent deletiert. Die identifizierten *BFM*-Deletionen waren bereits initial vorhanden und blieben im Rezidivmaterial erhalten, während Deletionen von *NR3C1* sowie der MMR-pathway-Gene ausschließlich bzw. vorwiegend im Rezidivmaterial nachweisbar waren¹³¹.

Zusammenfassend durch die beschriebenen konnte hochauflösenden gesamtgenomischen Untersuchungen demonstriert werden, dass die ETV6/RUNX1-Inzidenz zusätzlicher genetischer Veränderungen positive ALL durch eine hohe charakterisiert wird. In Übereinstimmung mit dem derzeit angenommenen Modell für die ETV6/RUNX1-positive Leukämieentstehung, demnach ein ETV6/RUNX1-positiver präleukämischer Zellklon erst durch weitere genetische Veränderungen leukämogen transformiert wird, konnte ein Teil der ausschließlich im Rezidiv detektierten Veränderungen auch in Subklonen der Ersterkrankung nachgewiesen werden. Wenig ist bisher bekannt über die prognostische Relevanz der identifizierten Veränderungen, da eine Korrelation mit klinischen Daten bisher nicht systematisch erfolgte.

Ziele dieser Arbeit

2 Ziele dieser Arbeit

Trotz risikoadaptierter Behandlungsprotokolle sind die Heilungschancen von Kindern mit Rezidiv einer ALL ungünstig. Verschiedene bekannte Risikofaktoren helfen, die Patienten einzelnen Risikogruppen zuzuordnen und die Behandlungsintensität entsprechend anzupassen. Von wichtiger Bedeutung für die Subklassifizierung beim ALL-Rezidiv sind neben klinischen Faktoren bekannte genetische Veränderungen. Zu diesen zählt die chromosomale Translokation t(12;21), aus der das Fusionsgen *ETV6/RUNX1* resultiert und die die häufigste bekannte chromosomale Translokation beim ALL-Rezidiv darstellt. Insgesamt ist der Nachweis von *ETV6/RUNX1* in den Leukämiezellen beim ALL-Rezidiv mit einer günstigen Prognose assoziiert. Allerdings gilt dies nicht für alle Patienten mit Nachweis des Fusionsgens. Welche genetischen Veränderungen für die Unterschiede im Krankheitsverlauf von Bedeutung sind ist bislang nicht bekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung zusätzlicher genetischer Veränderungen in *ETV6/RUNX1*-positiven Leukämiezellen zum Zeitpunkt der ALL-Rezidivdiagnose. Hierfür wurden die Leukämiezellen von 51 *ETV6/RUNX1*-positiven ALL-Rezidiven mittels hochauflösender gesamtgenomischer BAC-Array-CGH auf das Vorhandensein von Kopienzahlveränderungen hin untersucht. Rekurrent identifizierte Veränderungen wurden anschließend durch Korrelation mit klinischen Patientendaten auf eine mögliche prognostische Relevanz hin analysiert. Schließlich wurde für eine der gefundenen Veränderungen eine Validierung der Ergebnisse mittels Interphase FISH an KM-Ausstrichen vom Zeitpunkt der Rezidivdiagnose durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit sollten im Einzelnen folgende Fragen beantwortet werden:

- Welche Art von zusätzlichen numerischen Aberrationen (Kopienzahlveränderungen) sind in ETV6/RUNX1-positiven Leukämiezellen zum Zeitpunkt der Diagnose eines ALL-Rezidivs im Kindesalter nachweisbar?
- Gibt es eine Häufung von Kopienzahlveränderungen in einzelnen chromosomalen Regionen?
- Zeigt sich eine Assoziation zwischen rekurrent nachweisbaren Kopienzahlveränderungen und klinisch prognostischen Parametern der ALL-Rezidive?

3 Patientenproben, Material und Methoden

3.1 Patienten und Proben

Für die Untersuchungen wurden DNA und KM-Ausstriche von KM-Proben verwendet, die zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose aus dem KM der Patienten entnommen worden waren. Die Patientenproben stammen aus Kliniken, die an der multizentrischen Therapieoptimierungsstudie zur Behandlung von Kindern mit Rezidiv einer ALL (ALL-REZ BFM) teilnehmen. Die Patienten wurden für die Rezidivtherapie in die Studie eingeschlossen und entsprechend der Protokollfassungen aus den Jahren 1990, 1995/1996 und 2002 behandelt. Von allen Patienten bzw. deren Eltern oder Erziehungsberechtigten liegt eine schriftliche Einwilligungserklärung zur Teilnahme an der Therapieoptimierungsstudie und damit verbundener Untersuchungen von KM und Blut im Rahmen begleitender Forschung vor. Die Proben wurden für die Begleituntersuchungen im Rahmen der ALL-REZ BFM Studie asserviert. Die Rezidivproben wurden auf das Vorhandensein der Fusionstranskripte ETV6/RUNX1 und BCR-ABL sowie auf Aberrationen des *MLL*-Gens nach Umschreibung der RNA in cDNA mittels PCR untersucht.

Für die vorliegende Arbeit wurden Patienten anhand der folgenden Einschlusskriterien ausgewählt:

- Erstrezidiv einer BCP-ALL
- Alter bei Rezidivdiagnose <18 Jahre
- Behandlung protokollgerecht gemäß ALL-REZ BFM
- Beteiligung des KM bei Rezidivdiagnose
- Nachweis des ETV6/RUNX1-Fusionsgens (Translokation t(12;21))
- Leukämiezellanteil im KM bei Rezidivdiagnose >60 % vor Anreicherung der mononukleären Zellen durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation

Von 113 protokollgerecht gemäß ALL-REZ BFM behandelten ALL-Rezidivpatienten, bei denen die o.g. Einschlusskriterien erfüllt waren, konnten nach Berücksichtigung des erforderlichen Leukämiezellanteils im KM und der notwendigen DNA-Qualität und DNA-Menge 51 Patientenproben ausgewählt werden.

3.1.1 Referenz-DNA für die array CGH

Als gesunde Referenz- oder Kontroll-DNA für die array CGH wurde von zehn gesunden weiblichen und zehn gesunden männlichen Spendern Blut entnommen und die DNA aus Blutleukozyten extrahiert. Die DNA-Proben wurden anschließend nach Geschlecht getrennt zu Mischproben gepoolt und als weiblicher bzw. männlicher DNA-Pool als Referenz für die array CGH-Hybridisierungen eingesetzt.

3.2 Material

3.2.1 Verbrauchsmaterialien

Chemikalien	Hersteller		
PBS-Dulbecco (1x)	Biochrom AG, Berlin, D		
RPMI 1640 Medium, 1x	Biochrom AG, Berlin, D		
Türks Lösung	Merck, Darmstadt, D		
2-Propanol	Merck, Darmstadt, D		
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin, D		
Agarose SERVA	Serva, Heidelberg, D		
Ethidiumbromid (Lösung 1 % in Wasser)	Merck, Darmstadt, D		
100 bp Basenleiter (1 μg/μl)	Invitrogen, Karlsruhe, D		
Ethanol zur Analyse (z. A.)	Merck, Darmstadt, D		
Methanol z. A.	Merck, Darmstadt, D		
Essigsäure z. A.	Merck, Darmstadt, D		
Magnesiumchorid-Hexahydrat z. A.	Merck, Darmstadt, D		
Salzsäure 1 mol/L	Merck, Darmstadt, D		
Formaldehyd mindestens 37 % z. A.	Merck, Darmstadt, D		
Formamid deionisiert	Merck, Darmstadt, D		
Natrium-Acetat, wasserfrei z. A.	Merck, Darmstadt, D		
SDS 10 %	Merck, Darmstadt, D		
Dextransulfat 500 Natriumsalz	Serva, Heidelberg, D		
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D		
Vectashield Eindeckmedium	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA		
Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaureate (Tween 20)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D		
Fixogum	Marabuwerke GmbH & Co., Tamm, D		

Kits	Hersteller
Puregene DNA Isolation Kit	Gentra Systems, Minneapolis, USA
GenomePlex Whole Genome Amplification (WGA) Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Nick Translation Reagent Kit	Abbott GmbH, Wiesbaden, D
BioPrime Labeling System	Invitrogen, Karlsruhe, D
Puffer bzw. Lösungen	Zusammensetzung
10x Erythrozytenlyse-Puffer	82,9g 1,55M NH ₄ Cl + 10g 0,1M KHCO ₃ + 2ml 0,5M EDTA ad 1000ml H ₂ O
50x TAE	242g Tris Base + 57,1ml Eisessig 100 % + 100ml 0,5mM EDTA ad 1000ml H_2O
10x PBS	1,37M NaCL, 27mM KCl, 100mM Na2HPO4, pH 7,4
20x SSC-Puffer	3M NaCl, 300mM Natriumcitrat, ddH2O, pH 7,0
Ladepuffer, Gelelektrophorese	20g Saccharose + 0,125g Xylene Cyanol + 0,125g Bromphenolblau ad 50ml H_2O
Prähybridisierungspuffer (FISH)	2x SSC, 10 % Dextransulfat, 50 % Formamid, pH 7- 8
FDST-Puffer	0,8g Dextransulfat in 5ml Formamid + 1ml 20x SSC + 7 ml H ₂ O. Auf 70 °C erhitzen, durch kräftiges mischen lösen. pH7
Waschlösung 1	50 % Formamid, 2x SSC, 0,1 % SDS
PN-Puffer	100mM Natriumphosphat (pH 8,0) + 0,05 % NP40
Prähybridisierungspuffer (array CGH)	4x SSC, 0,1 % SDS, 25 % Formamid
Hybridisierungspuffer	2,8x SSC, 8 % Dextransulfat, 70 % Formamid

Enzyme	Hersteller
RNAse A	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Pepsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D

Nukleinsäure	Hersteller
Cot1 Human DNA	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Ultra Pure Herring Sperm DNA Solution	Invitrogen, Karlsruhe, D
tRNA	Invitrogen, Karlsruhe, D
BAC-Klon RP11-773M18	MPI für Molekulare Genetik, Berlin, D
BAC-Klon RP11-614D16	MPI für Molekulare Genetik, Berlin, D

Hersteller
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Abbott GmbH, Wiesbaden, D
Roche Diagnostics, Mannheim, D
Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, D
Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, D

3.2.2 Geräte

Geräte	Hersteller
Elektrophoresekammer, Wide Mini Sub Cell	BIO-RAD, München, D
Spannungsgenerator Power Pack P25	Whatman Biometra, Göttingen, D
Geldokumentationsanlage, Video Graphic Printer UP-895 MD	Sony, Tokio, Japan
UV-Transluminator, Gene Flash	Syngene, Cambridge, UK
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
Zentrifuge 5415D und 5810	Eppendorf, Hamburg, D
Heizblock, Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg, D
Heizplatte	UniEquip GmbH, Planegg, D
Thermo Leader Dry Block Heat Bath	UniEquip GmbH, Planegg, D
Wasserbad, Schüttelwasserbad	Grant Instruments, Cambridge, UK
Kombischüttler KL2	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, D
Thermomixer 5430	Eppendorf, Hamburg, D
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Slidebooster	Implen, München, D
Laserscanner	Agilent Technologies, Böblingen, D
PDC Cycler Primus Multiblock	MWG Biotech AG, Ebersberg, D
Fluoreszenzmikroskop, ZEISS Axiophot	ZEISS, Oberkochen, D
ZEISS Neofluar Objektive: 63x1,25 Oil Iris, 63x1,4 Oil	ZEISS, Oberkochen, D
Lichtmikroskop (CPL W 10x/18)	ZEISS, Oberkochen, D
HBO100 Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe	Osram GmbH, München, D
Reflektorschieber 4 FL für ZEISS Axiophot	AHF Analysetechnik, Tübingen, D
Dualband-Filterset FITC	AHF Analysetechnik, Tübingen, D
Filterset DAPI	AHF Analysetechnik, Tübingen, D
Filterset SpectrumOrange [™]	AHF Analysetechnik, Tübingen, D
Deckgläser eckig 18x18mm, 24x60mm	Engelbrecht GmbH, Edermünde, D

3.3 Methoden

3.3.1 Zellaufarbeitung – Dichteseparation mononukleärer Zellen

Vor Extraktion der DNA erfolgte die Separation der mononukleären Zellen aus dem KM der Patienten bzw. aus dem Blut der gesunden Spender durch eine Dichteseparation mittels Ficoll-Gradienten. Zunächst wurde die Leukozytenzahl der Probe in der Zählkammer bestimmt und entsprechend der Zellzahl mit RPMI-Medium verdünnt. 5 ml der verdünnten Probe wurden über 4 ml Ficoll-Separations-Lösung geschichtet und bei 2000 U/min für 18 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der über der Ficoll-Lösung durch die Zentrifugation entstandene Zellring mit den darin enthaltenen mononukleären Zellen abpipettiert und in ein neues Röhrchen überführt. Wiederum wurde mit RPMI aufgefüllt und bei 1500 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Konsistenz des Zellpellets beurteilt. Waren Erythrozyten sichtbar, erfolgte eine Erythrozytenlyse. Hierfür wurde das Zellpellet in Erythrozytenlyselösung resuspendiert, erneut zentrifugiert (1500 U/min, 10 min.), der Überstand verworfen und das Zellpellet wiederum mit PBS gewaschen und zentrifugiert (1500 U/min, 10 min.). Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS (10 ml) und jeweils zwischenzeitlicher Zentrifugation (1500 U/min, 10 min) wurde das Zellpellet abhängig von der Größe in 1-10 ml PBS aufgenommen und abschließend die Zellzahl bestimmt. Für die sich anschließende DNA-Extraktion wurden die Zellen umgehend in DNA-Lysepuffer transferiert.

3.3.2 DNA-Isolierung

Für die DNA-Isolierung wurde der Puregene DNA-Isolation Kit (Gentra Systems, Minneapolis, USA) entsprechend der Empfehlungen des Herstellers verwendet. Die Zellen wurden zuerst mit der Cell Lysis Solution lysiert, Proteine dann mittels Protein Precipitation Solution entfernt und anschließend wurde die DNA mittels 100 % Isopropanol gefällt und mit 70 % Ethanol gewaschen. Schließlich wurde die DNA in der DNA Hydration Solution rehydriert und bleibt in Lösung bei –20 °C stabil. Die DNA-Quantität wurde durch ein NanoDrop Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) ermittelt. Die DNA-Qualität wurde mittels NanoDrop und durch Agarose-Gelelektrophorese beurteilt.

3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von Nukleinsäuren (DNA, RNA) ihrer Größe nach. Ein Basenpaarmarker bekannter Basenpaarlänge dient als Größenstandard und wird zusätzlich zu der zu untersuchenden DNA im Agarosegel aufgetragen. Nach Anlegen einer Spannung wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle vom negativen zum positiven Spannungspol durch die Gelmatrix. Die Geschwindigkeit ist abhängig von der Basenpaarlänge der zu analysierenden DNA sowie der Konzentration des Agarosegels. Dies resultiert in einer Auftrennung der DNA nach ihrer Molekülgröße. Durch Färbung des Gels mit Ethidiumbromidlösung, das in die DNA interkaliert, können die aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Für die vorliegende Arbeit wurde die Agarose-Gelelektrophorese für die Beurteilung der Qualität der isolierten Patienten-DNA sowie zur Beurteilung der Größe der bei der Whole Genome Amplification und Nick Translation generierten DNA-Fragmente gebraucht. Dafür wurden 1 bzw. 2 %ige Agarosegele (1 bzw. 2 g Agarose gelöst in 100 ml 1x TAE-Puffer) verwendet.

3.3.4 Microarray-basierte komparative Genomhybridisierung

Die Microarray-basierte komparative Genomhybridisierung (array CGH) ist eine molekularzytogenetische Methode, die die genomweite Detektion von numerischen ermöglicht^{135,136}. Aberrationen Dadurch chromosomalen können in einem Hybridisierungsschritt eine Vielzahl von Genloci simultan auf das Vorhandensein von CNA untersucht werden. Die array CGH stellt eine Weiterentwicklung der konventionellen CGH dar, bei der unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Test-(Patienten-) und Referenz- (Kontroll-) DNA auf normale Metaphase-Chromosomen hybridisiert werden¹³⁷. Die maximale Auflösung, die mit der konventionellen CGH im günstigsten Fall erreicht werden kann, liegt bei 3 Mb¹³⁸.

Bei der array CGH werden die Metaphasechromosomen durch genomisch kartierte DNA-Fragmente ersetzt, die bestimmte genomische Regionen oder das gesamte Genom repräsentieren und auf einem Glasobjektträger immobilisiert sind. Dadurch kann das Auflösungsvermögen der Methode wesentlich gesteigert werden. Außerdem wird durch die weitgehende Automatisierung der Prozessabläufe eine hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit erreicht. Als DNA-Fragmente können unter anderem BAC (Bacterial Artificial Chromosome)-Klone, cDNA-Klone oder Oligonukleotide dienen. BAC-Klone sind künstlich erzeugte Bakterienchromosomen, die aus E. coli hergestellt werden und als Vektoren für die Vermehrung von Fremd-DNA mit einer Fragmentgröße bis maximal 300 kb dienen. Die Kopienzahl der im BAC-Klon enthaltenen DNA-Fragmente beschränkt sich auf ein oder zwei Kopien pro Bakterienzelle. Durch Kultivierung der Zellen kann eine größere Menge der inserierten DNA-Fragmente gewonnen werden¹³⁹. Im Vergleich zu alternativen Vektortypen wie YACs (Yeast Artificial Chromosome), mit denen größere Genomabschnitte kloniert werden können (>20 Mb) und Plasmiden, deren maximale Insertionsgröße bei 40 kb liegt, zeichnen sich BAC-Klone durch ihre Stabilität aus. So sind Deletionen oder Rearrangments der klonierten Genomabschnitte sehr selten. Weiterhin ist die hohe Intensität des Hybridisierungssignals bei der Verwendung von BAC-Klonen für die array CGH von Vorteil.

Die Auflösung der array CGH ist abhängig von der Anzahl der DNA-Fragmente und von der Dichte mit der diese das Genom abdecken und auf den Glasträger (Array) aufgebracht sind. Mit hochauflösenden tiling-path BAC-arrays, die das Genom in überlappender Form abdecken, kann eine Auflösung von bis zu 70 kb erreicht werden. Dies ermöglicht die Detektion submikroskopischer numerischer Aberrationen und die Identifizierung von Kopienzahlveränderungen einzelner Gene. Wie bei der konventionellen CGH werden die zu untersuchende DNA und die Referenz-DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen wie Carbocyanin (Cy) 3 (rotes Signal, Markierung der Referenz-Markierung der Test-DNA) unterschiedlich DNA) und Cy5 (grünes Signal, fluoreszenzmarkiert. Anschließend werden die markierten Proben auf die DNA-Fragmente (BAC-Klone), die auf einen Glasobjektträger aufgebracht sind. kohybridisiert.

Abhängig vom Kopienzahlverhältnis zwischen Test- und Referenz-DNA ergeben sich unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten. So bindet im Falle einer Deletion in der Test-DNA weniger Test-DNA an die entsprechenden BAC-Klone, die diese Region im Genom repräsentieren. Dadurch überwiegt das rote Fluoreszenzsignal der Referenz-DNA. Umgekehrt führen DNA-Kopienzahlzugewinne in der Test-DNA zu einem Überwiegen des grünen Fluoreszenzsignals. In Regionen, in denen das Verhältnis von Test- zu Referenz-DNA ausgewogen ist, also keine DNA-Kopienzahlveränderungen vorliegen, ergibt sich ein gelbes Fluoreszenzsignal. Die Fluoreszenzsignale für das gesamte Genom werden durch einen Laserscanner detektiert. Schließlich werden diese Daten mit Hilfe einer Auswertesoftware in Form eines genomischen Profils angezeigt

Patientenproben, Material und Methoden

und die weitere Auswertung der Daten hinsichtlich chromosomaler Verluste oder Zugewinne ermöglicht (siehe auch Abbildung 6).

Die Durchführung der array CGH-Hybridisierungen erfolgte am Max Planck Institut (MPI) für Molekulare Genetik Berlin, Abteilung Ropers, in der Arbeitsgruppe Molekulare Zytogenetik von Dr. R. Ullmann. Der am MPI hergestellte und etablierte Array ist ein hochauflösender tiling-path BAC array, der das gesamte Genom in überlappender Form abdeckt. Der Array besteht aus mehr als 36.000 Klonen und setzt sich zusammen aus dem 32.433 BAC-Klone umfassenden und das gesamte Genom überlappend abdeckenden ,human 32k Re-array Set^{140,141}, dem 1-Mb Sanger Set¹⁴² und einem Set aus subtelomeren Klonen. Die Auflösung liegt bei etwa 100 kb (70-150 kb).



Abbildung 6: Prinzip der Mikroarray-basierten komparativen genomischen Hybridisierung (array CGH). Die unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Patienten-DNA (Cy5, grün) und Referenz-DNA (Cy3, rot) sowie Cot1 DNA werden auf den array definierter genomisch kartierter BAC-Klone kohybridisiert. Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgt durch einen Laserscanner. Für die Visualisierung und weitere Analyse der Daten wurde die Software CGHPRO¹⁴³ verwendet. Rechts dargestellt ist ein Ausschnitt aus dem genomischen Profil eines der untersuchten ALL-Rezidive. Abgebildet ist Chromosom 12. Jeder Punkt entlang des Chromosoms entspricht einem einzelnen BAC-Klon. Im Bereich des kurzen Arms werden ein genomischer Verlust und ein Zugewinn durch Überschreitung definierter Schwellenwerte im Profil als rote bzw. grüne Markierung angezeigt.
3.3.5 Whole Genome Amplification (WGA)

Für die array CGH wurden alle DNA-Proben nach einheitlicher Isolierung der DNA aus KM (Patienten) bzw. Blut (gesunde Kontrollen) (siehe 3.3.2) zunächst mit dem GenomePlex Whole Genome Amplification (WGA) Kit (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D), einheitlich entsprechend der Empfehlungen des Herstellers amplifiziert. Die Methode der WGA beinhaltet zunächst eine zufällige Fragmentierung der eingesetzten DNA in überlappende DNA-Segmente von 100 bis 1000 bp Länge. Anschließend werden die generierten DNA-Fragmente durch die Ligation von Primern an die Fragmentenden in eine sogenannte OmniPlex[®]-Bibliothek umgewandelt. Die OmniPlex[®]-Bibliothek besteht aus kleinen DNA-Molekülen, die von universellen Primer-Bindungsstellen flankiert werden. Durch den Einsatz universeller Oligonukleotid-Primer können diese in einer PCR-Reaktion vervielfältigt werden. Durch die gleichmäßige und repräsentative PCR-Amplifikation des gesamten Genoms durch WGA, kann mit niedrigeren Ausgangsmengen der limitiert verfügbaren Patienten-DNA gearbeitet werden. So werden 10 µl DNA (Konzentration 1 ng/µl) für die WGA eingesetzt. Zusätzlich kann durch diese Vorbereitung der Proben das Ergebnis der Hybridisierungen durch die Verbesserung von Markierungseffizienz und Signal-Rausch-Verhältnis optimiert werden¹⁴⁴. Im Folgenden ist das Protokoll für die WGA beschrieben:

Zufällige Fragmentierung der DNA

- → Eingesetzte DNA auf eine Ausgangskonzentration von 1ng/µl verdünnen
- → Zugabe von 1 µl 10x Fragmentierungspuffers (Kit) zu 10 µl DNA
- → Inkubation bei 95 °C für 4 min, anschließend sofort auf Eis kühlen, kurz zentrifugieren

Generierung der OmniPlex-Bibliothek aus den DNA-Fragmenten

- → Zugabe von 2 µl ,Library Preparation' Puffer (Kit) und von 1 µl ,Library Stabilization' Lösung (Kit)
- → Inkubation bei 95 °C für 2 min, anschließend auf Eis kühlen, kurz zentrifugieren
- → Zugabe von 1 µl des ,Library Stabilization' Enzyms (Kit) (auf Eis pipettieren), sorgfältig mischen, kurz zentrifugieren
- → Inkubation in der PCR-Maschine bei 16 °C für 20 min, 24 °C für 20 min, 37 °C für 20 min, 75 °C für 5 min, 4 °C forever, PCR-Produkt kurz abzentrifugieren
- → Die Genomamplifizierung kann sofort oder bei Lagerung bei -20 °C nach bis zu 3 Tagen erfolgen

Amplifikation

- → Folgende Reagenzien werden zu dem 15 µl-OmniPlex-Bibliothek-Ansatz hinzupipettiert: 7,5 µl 10x ,Amplification Master Mix' (Kit); 47,5 µl nukleasefreies Wasser; 5,0 µl WGA DNA Polymerase (Kit)
- → sorgfältig mischen, kurz abzentrifugieren
- → Inkubation in der PCR-Maschine bei 95 °C für 3 min (initiale Denaturierung), dann 14 Zyklen bei 94 °C für 15 sec, 65 °C für 5 min, 4 °C forever
- → Überprüfen der Qualität des PCR-Produktes mittels Agarose-Gelelektrophorese (100 bp Größenstandard)

Protokoll 1: Whole Genome Amplification

3.3.6 Random Primed Labeling

Die präamplifizierte DNA der 51 *ETV6/RUNX1*-positiven Leukämiezellproben und die gepoolte DNA der zehn männlichen und der zehn weiblichen gesunden Spender, wurde anschließend durch sogenanntes ,Random Primed Labeling' (BioPrime Labeling System, Invitrogen, Carlsbad, USA) unterschiedlich fluoreszenzmarkiert. Je 1 µg DNA pro Probe wurden für das Labeling eingesetzt. Das ,Random Primed Labeling' ist eine Methode der direkten DNA-Markierung. Dafür wird die doppelsträngige zu markierende DNA zunächst denaturiert. Dann werden kurze zufällig an die DNA bindende ,random' Primer als Startpunkt für die Neusynthese des DNA-Strangs durch das Enzym Exo-Kleenow-Fragment (große Untereinheit der DNA Polymerase I aus E. coli), verwendet. Die Markierung erfolgt über den Einbau fluoreszenzmarkierter Nukleotide in den so synthetisierten komplementären DNA-Strang. Die Leukämiezell-DNA wurde mit Cy5 (grünes Fluoreszenz-Signal), die Referenz-DNA mit Cy3 (rotes Fluoreszenz-Signal) markiert. Die Einzelschritte der DNA-Markierung mittels ,Random Primed Labeling' sind in Protokoll 2 aufgeführt.

- → Je 1 µg präamplifizierte Leukämiezell- und Referenz-DNA (Referenz-DNA wie beschrieben getrennt nach Geschlecht und gepoolt) auf Eis in einzelne Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettieren
- → Zugabe von jeweils 20 µl 2,5x ,Random Primer' Lösung (Kit), mischen, kurz abzentrifugieren
- → Denaturierung der DNA bei 95 °C für 5 min
- → Sofort für 5 min auf Eis lagern, anschließend kurz abzentrifugieren
- → Folgende Reagenzien werden in jedes der Eppendorf-Reaktionsgefäße zur DNA hinzupippetiert: 5,0 µl 10x dUTP ,Nucleotide-Mix' (Kit); 3,0 µl Cy3-dUTP oder Cy5-dUTP; 1,0 µl Exo-Klenow Fragment (Kit)
- → sorgfältig mischen, kurz abzentrifugieren
- → Inkubation bei 37 °C über Nacht
- → sorgfältig mischen, kurz abzentrifugieren
- → Beendigung der Markierungsreaktion durch Zugabe von 5 µl ,Stop' Lösung (Kit) in jedes der Reaktionsgefäße, sorgfältig mischen
- → Aufreinigung der Proben mit Hilfe des im Kit enthaltenen ,Purification Modules' entsprechend der Empfehlungen des Herstellers um die nicht eingebauten Nukleotide zu entfernen
- → Markierte Proben zusammenführen (jeweils markierte weibliche Leukämiezell-DNA mit markierter weiblicher Referenz-DNA bzw. männliche Leukämiezell-DNA mit männlicher Referenz-DNA)
- → Lichtschutz beachten!

Protokoll 2: DNA-Markierung mittels Random Primed Labeling

3.3.7 Hybridisierung und Waschen der Arrays

Nach Aufreinigung der markierten DNA-Proben werden diese gemeinsam mit einem Überschuss an nicht markierter hochrepetitiver humaner Cot1 DNA gefällt und in tRNA und 10 % SDS sowie Hybridisierungspuffer (2,8x SSC, 8 % Dextransulfat, 70 %

Formamid) gelöst. Die Zugabe von Cot1 DNA unterdrückt die unspezifische Bindung hochrepetitiver DNA-Sequenzen und vermindert damit das Auftreten unspezifischer Signale. Nach Denaturierung wird das Hybridisierungsgemisch bei 42 °C für mindestens 2 Stunden inkubiert, um die Anlagerung der Cot1 DNA an die repetitiven DNA-Sequenzen von Test- und Referenz-DNA zu ermöglichen. Die Kohybridisierung der markierten DNA auf den Array erfolgt automatisiert in einer Slidebooster Hybridisierungsstation (Implen, München, D) bei 42 °C für 24 Stunden. Anschließend werden durch mehrere Waschschritte in verschiedenen Puffern unspezifisch gebundene Sonden entfernt. Die Vorbereitung der Glasobjektträger sowie die Einzelschritte der Hybridisierung und des sich anschließenden Waschens sind in den folgenden Protokollen beschrieben:

Durchführung kurz vor der Hybridisierung

- → Zugabe von 0,3 g BSA (Bovine Serum Albumin) und 200 µl Herring Sperm DNA zu 60 ml
- Prähybridisierungspuffer (4x SSC, 0,1 % SDS, 25 % Formamid), auf 42 °C vorwärmen
- → Inkubation des Glasobjektträgers im supplementierten Prähybridisierungpuffer bei 42 °C für 1 h
- \rightarrow Anschließend Glasobjektträger umgehend mit H₂O (Millipore) abspülen

→ Trocknen des Glasobjektträgers durch Zentrifugieren bei 150 g für 5 min bei Raumtemperatur Fällung und Denaturierung der Sonden, Hybridisierung

- → Zu den markierten und zusammengeführten Leukämiezell- und Referenz-DNA-Proben werden 500 µg humaner Cot1-DNA hinzugefügt.
- → Fällung der gepoolten DNA (markierte DNA + nicht markierte Cot1-DNA) durch Zugabe von 30 µl Natriumacetat 3M, pH 5,5 und 825 µl eiskaltem EtOH 100 % bei -20 °C über Nacht (mind. 2 h)
- → Zentrifugieren bei 4 °C für 30 min
- → den Überstand verwerfen
- → Pellet (gefällte DNA) mit 100 µl EtOH 70 % waschen
- → Zentrifugieren bei 4 °C für 15 min (Entfernung überschüssiger Salze)
- \rightarrow Überstand verwerfen und Pellet bei Raumtemperatur trocknen lassen
- \rightarrow Pellet lösen in 4 µl Hefe-tRNA (100 µg/µl) und 8 µl SDS, gut mischen
- → Zugabe von 28 µl FDST, gut mischen
- → Denaturierung bei 70 °C für 15 min
- → Inkubation bei 42 °C für 2 h um die Anlagerung der Cot1-DNA an die repetitiven Sequenzen der Leukämiezell- und Referenz-DNA zu ermöglichen
- → den Ansatz aus markierten Proben und Cot1-DNA auf den Glasobjektträger (Array) überführen, mit einem Deckglas abdecken
- → Hybridisierung bei 42 °C für 20-24 h im Slide Booster

Waschen

- → Vorwärmen der Waschlösung 1 (50 % Formamid, 2 x SSC, 0,1 % SDS) auf 42 °C
- → Deckgläser in 2 x SSC entfernen
- → Glasobjektträger für 15 min in der Waschlösung 1 bei 42 °C waschen
- → kurz in PN-Puffer bei Raumtemperatur eintauchen
- → Glasobjektträger in eine zweite Glasküvette mit frischem PN-Puffer für 10 min bei Raumtemperatur (Schüttler) waschen
- → Waschen in PBS für 30 sec bei Raumtemperatur
- → Für 2-3 sec in H2O (Millipore) eintauchen
- → Trocknen der Glasobjektträger durch Zentrifugieren bei 150 g für 5 min bei Raumtemperatur
- → Glasobjektträger direkt anschließend Scannen

Protokoll 3: Prähybridisierung des Glasobjektträgers (Array)

3.3.8 Aufzeichnung und Auswertung der array CGH-Hybridisierungssignale

Direkt nach dem Waschen werden die Fluorezenzsignale durch einen Laserscanner (Agilent Technologies, Böblingen, D) bei 532 nm (Cy3) und 635 nm (Cy5) gescannt, um die Fluoreszenzintensitäten beider Farbstoffe aufzuzeichnen. Dabei spiegelt das Verhältnis der Signalintensitäten der Fluorochrome die Kopienzahl im Patientengenom relativ zum Referenzgenom wider.

Die resultierenden 16-bit TIFF Bilder enthalten ein Überlagerungsbild der gescannten Fluoreszensignale und wurden mittels GenePixPro 5.0 analysiert. Die Analyse beinhaltete die Selektion der auswertbaren Spots, die Berechnung der Fluorezenzintensitäten sowie des lokalen Hintergrundes für jeden einzelnen Spot und die Segmentierung der Daten. Dabei werden die erfassten Fluoreszenzintensitäten jedes einzelnen Pixels des gescannten Bildes den entsprechenden Spots im Array und deren Lokalisation im Genom zugeordnet. Diese Ergebnisse werden in einer GenePix Result (gpr.) Datei gespeichert, die dann in die Auswertesoftware eingelesen werden kann. Für die weitere Analyse und Visualisierung der array CGH-Daten wurde die am MPI für Molekulare Genetik in Berlin entwickelte Software CGHPRO¹⁴³ verwendet. Die Normalisierung der Daten erfolgte mittels subgrid LOWESS. Ziel der Normalisierung ist die Korrektur systematischer Fehler, die bei der Aufzeichnung der Fluoreszenzintensitäten beispielsweise durch unterschiedliche Markierungseffizienzen können. Kopienzahlunterschiede auftreten Die werden anschließend durch verschiedene Algorithmen wie Hidden Markov Models oder Circular Binary Segmentation objektiv festgestellt.

Durch die CGHPRO-Software werden die Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten zwischen Leukämiezell- und Referenz-DNA in Log2-Werte umgewandelt und die Kopienzahlunterschiede (chromosomale Verluste bzw. Zugewinne in der Leukämiezell-DNA relativ zur Referenz-DNA) durch die Überschreitung definierter Schwellenwerte graphisch dargestellt (siehe Abbildung 7). Als Grenzwert für einen Kopienzahlverlust wurde eine Log2-Ratio Probe/Referenz von kleiner -0,3, für einen Kopienzahlzugewinn ein Log2-Ratio Probe/Referenz von größer 0,3 festgesetzt. Im Profil angezeigte Veränderungen wurden als genomische Aberration gewertet, wenn mindestens drei benachbarte BAC-Klone betroffen waren und die Veränderungen nicht durch bekannte Kopienzahlvariationen (CNV) überlagert wurden. Daraus ergibt sich eine praktische Auflösung des Arrays von ca. 100-150 kb, in Abhängigkeit von der Dichte mit der die

jeweiligen chromosomalen Regionen durch die überlappenden BAC-Klone repräsentiert werden.

Mit zunehmender Auflösung gesamtgenomischer Untersuchungsverfahren wie der array CGH und den SNP-arrays, werden neben CNA in wachsender Zahl auch CNV identifiziert. Als CNV werden DNA-Abschnitte bezeichnet, die in variabler Kopienzahl (Deletionen oder Amplifikationen) verglichen zu einem Referenzgenom vorliegen. CNV sind häufig von submikroskopischer Größe und werden sowohl bei bestimmten Erkrankungen, als auch in der Normalbevölkerung detektiert. CNV die in mehr als 1 % der Normalbevölkerung nachweisbar sind und nicht mit einem pathologischen Phänotyp assoziiert sind, werden als Kopienzahlpolymorphismen bezeichnet¹⁴⁵.

In einer online verfügbaren Datenbank, der "Database of Genomic Variants' (http://projects.tcag.ca/variation) werden CNV, die in gesunden Kontrollproben identifiziert wurden, erfasst. Die Datenbank enthält über 6000 CNV, die für einen Vergleich mit identifizierten Veränderungen zur Verfügung stehen. Die CGHPRO Software ermöglicht die direkte Projektion aller in der Datenbank erfassten CNV auf die chromosomalen Regionen. In der vorliegenden Arbeit wurden detektierte chromosomale Veränderungen, die von bekannten CNV überlagert wurden, von der weiteren Datenauswertung ausgeschlossen.



Abbildung 7: Genomisches array CGH-Profil eines ALL-Rezidivs.

Dargestellt ist der Log2 Wert des Verhältnisses der unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Patienten- und Referenz-DNA (Cy3 und Cy5). Die Überschreitung definierter Schwellenwerte wird im Profil als rote (log2ratio Probe/Referenz –0,3, DNA-Kopienzahlverlust) bzw. grüne (log2ratio Probe/Referenz 0,3, DNA-Kopienzahlverlust) bzw. grüne (log2ratio Probe/Refer

3.3.9 Nick Translation

Die Nick Translation ist eine Methode zur DNA-Markierung¹⁴⁶. Dabei werden durch die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der DNA Polymerase I Einzelstrangbrüche (sogenannte "Nicks") in die DNA gesetzt. An den so gebildeten DNA-Fragmentenden werden anschließend die eingesetzten markierten Nukleotide durch die Polymeraseaktivität des Enzyms am 3'OH-Ende angelagert und eine neue doppelsträngige DNA synthetisiert. Durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Nukleotide, die in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut werden, wird die DNA markiert und dient als Sonde. Diese kann durch ein Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Nick Translation angewendet, um die für die FISH als Sonden dienenden BAC-Klone zu markieren (siehe 3.3.10). Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden SpectrumOrange und FITC verwendet. Die Einzelschritte sind im folgenden Protokoll dargestellt.

Vorbereitung folgender Ansätze vor Beginn der Nick Translation										
→ 0,1 mM dTTP-Lösu	ıng: 10µl der 30 mM dTTP aus dem Kit + 20µl nuc	leasefreies Wasser (Kit)								
→ 0,1mM dNTP-Mix (jeweils 10µl 0,3 mM dATP, 0,3 mM dCTP, 0,3 mM	1 dGTP)								
→ SpectrumOrange u rekonstituieren auf	nd FITC als 0,2 mM Lösung einsetzen, ggf. nach 1 mM und dann verdünnen: 10 μl 1mM Lösung +	Anweisung der Packung 40μl nukleasefreies H ₂ O								
→ sämtliche Lösunge	→ sämtliche Lösungen auf Eis lagern, Farbstoffe lichtgeschützt aufbewahren									
→ auf Eis pipettieren	Nukleasefreies Wasser	14,5 µl								
	Genomische DNA	3 µl								
	0,2mM SpectrumOrange bzw. 0,2 mM FITC	2,5 µl								
	0,1mM dTTPs	5 µl								
	0,1mM dNTP-Mix	10 µl								
	10x Nick-Translations Puffer	5 µl								
	Nick-Translations-Enzyme	10 µl								
	Σ	50µl								
→ Inkubation des Ans	atzes im Cycler: 9h 15 °C, 10 min 75 °C									
Aufreinigung via Etha	nol-Fällung									
 → je 5 µl beider NT Ansätze (SpectrumOrange + FITC) werden vereinigt → Zugabe von 3 µl cot1 DNA (1 mg/ml) + 1 µl HS-DNA (10 mg/ml) Durch Zugabe von HS-DNA und cot1 DNA (Unterdrückung von Kreuzhybridisierungen mit repetitiven DNA-Abschnitten) werden unspezifische Signale vermieden → Zugabe von 35 µl EtOH abs + 6 µl Na Acetat (3M, pH 5,0-5,5) → für 1 h – 80 °C oder 2 h – 20 °C oder über Nacht – 20 °C → Zentrifugieren 14000 rpm, 30 min, 4 °C, Überstand verwerfen → 100 µl EtOH (70 %) hinzufügen, kurz mixen → Zentrifugieren 14000 rpm, 15 min, 4 °C, Überstand so weit wie möglich entfernen → Pellet lufttrocknen, 37 °C (5 –10 min) 										
→ Hybridisierungspuffer (2x SSC, 10 % Dextransulfat,50 % Formamid pH 7-8)										
→ Pellet in 7 µl 100 % Formamid aufnehmen, dann 7 µl 4x SSC, 20 % Dextransulfat zugeben										
→ mind. 20 Minuten b	ei 37 °C losen lassen									

Protokoll 4: DNA-Sondenmarkierung durch Nick-Translation

3.3.10 Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) ist eine molekularzytogenetische Methode, die den Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen direkt in der Zelle (in situ) ermöglicht¹⁴⁷. Die Methode basiert auf der Möglichkeit, doppelsträngige DNA in einzelsträngige DNA aufzutrennen (denaturieren) und anschließend mit einer markierten einzelsträngigen DNA-Sonde zu hybridisieren. Dabei bindet die DNA-Sonde an die entsprechenden komplementären DNA-Zielsequenzen. Als Ziel-DNA können sowohl ausgebreitete Metaphasechromosomen als auch Chromosomen in Interphasekernen dienen. Die Markierung der DNA-Sonde kann entweder direkt durch Einbau fluoreszierender Nukleotide erfolgen oder indirekt durch den Einsatz spezifischer fluoreszenzgekoppelter Antikörper. Bei der direkten Methode bindet die fluoreszenzmarkierte Sonde direkt an die DNA-Zielsequenz und kann anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

In dieser Arbeit wurde die FISH an Interphasekernen auf KM-Ausstrichen vom Zeitpunkt der Rezidivdiagnose durchgeführt. Hierdurch sollten die Ergebnisse der array CGH für DNA-Kopienzahlverluste auf Chromosom 5q31.3 validiert werden.

Als Sonden wurden BAC-Klone verwendet, die durch Nick Translation fluoreszenzmarkiert wurden. Für die Region 5q31.3 wurde der BAC-Klon RP11-614D16 (genomische Position 142.706911-142.910614) verwendet und mittels Nick Translation mit SpectrumOrange[™] markiert. Als Referenz wurde ein BAC-Klon der Region 5p15.33 (RP11-773M18, genomische Position 568397-760486) ausgewählt und mit FITC markiert. Die detaillierte Auswahl der BAC-Klone für die Interphase-FISH ist in 4.3.8 beschrieben.

Um das Ergebnis der FISH zu optimieren, mussten die KM-Ausstriche vor Beginn der Hybridisierung einer Vorbehandlung unterzogen werden, deren Ziel eine möglichst weitgehende Entfernung von Zytoplasmaresten war. Zytoplasmareste weisen eine Autofluoreszenz auf, die das Hybridisierungsergebnis beeinträchtigen kann. Nach Fixierung der Ausstriche in 70 %igem Ethanol über Nacht und anschließender Trocknung bei Raumtemperatur, wurden die KM-Ausstriche zur Lyse verbliebener Erythrozyten und zur Stabilisierung der DNA in den Zellkernen mit Fixativ (Lösung aus Methanol und Eisessig), behandelt. Die Beurteilung der KM-Ausstriche hinsichtlich der Zellmorphologie und Zelldichte unter dem Lichtmikroskop diente der Abschätzung der erforderlichen Einwirkzeiten für die sich anschließende Enzymbehandlung. Durch die

RNAse Ribonukleinsäuren Behandlung mit wurden die durch zerstört, Kreuzhybridisierung zu einer verstärkten Hintergrundfluoreszenz und dadurch zu einer Minderung der Signalintensität führen können. Proteine wurden durch den Verdau mit Pepsin entfernt, wodurch der Zellkern durchlässiger wird und die Bindung der Sonde an die DNA erleichtert wird. Zwischen den Enzymbehandlungen erfolgen mehrere Waschschritte. Abschließend werden die Ausstriche in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert, um die Effizienz der Sondenbindung zu erhöhen. Die Einzelschritte der Vorbehandlung sind im folgenden Protokoll aufgeführt:

Vorbehandlung der KM-Ausstriche für die FISH		
→ Fixieren der Ausstriche in 70 % Ethanol bei -20 °C für mindestens eine	Nacht.	
→ Ausstriche bei Raumtemperatur (RT) trocknen		
→ Fixieren in Methanol : Eisessig – 3:1		2 x 3 min
→ Lufttrocknen		
Beurteilung der KM-Ausstriche hinsichtlich Zelldichte und Qualität unter d	em Lichtn	nikroskop,
um die Einwirkzeiten der folgenden Enzymbehandlung festzulegen.		
→ Inkubation 2x SSC	37 °C	30 min
→ Dehydrierung in aufsteigender EtOH-Reihe (70 %, 90 %, 100 %)		je 5 min
→ Lufttrocknen		
→ Inkubation mit RNAse A, 100 μ g/ml 2x SSC (Dauer je nach Zelldichte)	37 °C	10-60 min
→ Waschen mit 2x SSC	RT	3x 5 min
→ Waschen mit 1x PBS	RT	5 min
→ Verdauen mit Pepsin 0,005 % in 10 mM HCI	37 °C	10 min
→ Waschen mit 1x PBS / 50 mM MgCl ₂	RT	5 min
(95 ml 1x PBS + 5 ml 1M MgCl ₂)		
→ Fixieren in 1 % Formaldehyd / 1xPBS / 50 mM MgCl ₂	RT	10 min
(97,3 ml 1x PBS / 50 mM MgCl ₂ + 2,7 ml Formaldehyd)		
→ Waschen mit 1x PBS	RT	3 min
→ Dehydrierung in aufsteigender EtOH-Reihe (70 %, 90 %, 100 %)		je 2 min
→ Lufttrocknen		
→ Durchführung möglichst am Tag der Hybridisierung		
RNAse A Stammlösung		
→ 50 mg RNAse A in 5 ml 2x SSC lösen; Konzentration = 10µg/µl		
→ Inkubation f ür 10 min in kochendem Wasser (im Wasserbad)		
→ Abkühlen lassen und in 100 µl Portionen aliquotieren, bei -20 °C agern		
→ pro Objektträger 1 µg RNAse A + 99 µl 2x SSC aufträgen	hai 27 °C	inkubioron
	Del 37 C	
→ 00 ml H2O + 1ml 1M HCl in der Küvette im Wasserbad auf 27 °C verwä	irmon	
\rightarrow Stammlösung (10 % Pensin): 10 g Pensin in 100 ml H2O bei 37 °C löse	n	
→ Lösung abkühlen und in 50 µl Aliguots bei -20 °C lagern)		
→ 50 µl 10 % Pepsin direkt vor der Pepsinbehandlung bei 37 °C in die vor	gewärmte	e Küvette mit 10
mM HCl geben (= 0,005 % Pepsin)		

Protokoll 5: Vorbehandlung der KM-Ausstriche für die FISH

Nach Vorbehandlung der KM-Ausstriche und Markierung der DNA-Sonden durch Nick Translation, wurden Sonden- und Ziel-DNA durch Erhitzung in Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung) und für die Hybridisierung vereinigt. Der sich an die Hybridisierung anschließende Waschschritt dient der Entfernung ungebundener Sondenanteile.

Denaturierung der Sonden-DNA

- → Denaturierung bei 85 °C für 5 min im Thermomixer
- → 2 min auf Eis lagern
- → Probe einige Minuten bei 37 °C inkubieren (im Dunkeln)

Denaturierung der Ziel-DNA

- → Heizplatte 78 °C, Heizplatte 60 °C (fakultativ), Wasserbad 37 °C vorbereiten
- → 130ul Prähybridisierungslösung (2x SSC; 70 % Formamid)* auf Deckglas (24x60) in zentralem Streifen auftragen
- → Deckglas und Objektträger vereinigen, Objektträger bei RT für 10 min inkubieren
- → Denaturieren der Objektträger bei 78 °C (Denaturierungszeit: 1 min 30 sec)
- → Deckglas abschütteln und Objektträger sofort in eiskaltes 70 % EtOH überführen
- → Waschen der Objektträger in aufsteigender EtOH-Reihe (70 %, 90 %, 100 % je 2 min)
- → Trocknen der Slides bei RT, gegebenenfalls abblasen *Prähybridisierungslösung 1 ml: 700 µl Formamid deionisiert (bei –20 °C gelagert), 100 µl 20 x SSC, 200 µl H₂O (Aqua bidest)

Hybridisierung

- → Hybridisierungskammer (Wasserbad) auf 37 °C vorheizen
- → den kompletten Ansatz der prähybridisierten Probe auf Deckglas (18x18) überführen
- → Deckglas und Objektträger vereinigen
- → Abdichtung des Objektträgers mit Fixogum
- → Hybridisierung bei 37 °C über Nacht im Wasserbad

Waschen der Objektträger

- → Wasserbad vorheizen
- \rightarrow Fixogum vorsichtig entfernen
- \rightarrow Deckglas in 2x SSC entfernen
- → Objektträger in 1x SSC bei 75 °C, 5 min waschen
- → Objektträger in 4x SSCT (4xSSC, 0,05 % Tween 20, pH 7-7,5) 5 min bei RT waschen
- → Objektträger in 1x PBS 3 min bei RT waschen
- → Objektträger abblasen

Protokoll 6: Denaturierung, Hybridisierung und Waschen

Abschließend wurden die getrockneten Objektträger mit Vectashield eingedeckt, um die markierten KM-Ausstriche vor dem Ausbleichen zu schützen. Die Gegenfärbung der Interphasekerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4.6-Di-amidino-2-Phenylindol) dient der Erleichterung der Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Durch DAPI werden die Zellkerne blau gefärbt und können dadurch unter dem Fluoreszenz-mikroskop leichter aufgefunden und eingestellt werden.

- → 300 µl DAPI auftragen, Einwirkzeit 2 min
- \rightarrow Waschen mit PBS (1 min), trocknen
- \rightarrow 30 µl Vectashield auftragen
- \rightarrow Slide und Deckglas vereinigen, lichtgeschützt lagern bei -20 °C

Protokoll 7: Einbettung und Kerngegenfärbung

Die Auswertung der fluoreszenzmarkierten KM-Ausstriche erfolgte manuell-visuell an einem Fluoreszenzmikroskop mit vier Filterblöcken zur Filterung der für die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe spezifischen Wellenlängen. Ausgezählt wurden 252 bis 318 Zellkerne pro KM-Ausstrich (siehe Tabelle 9). Die Auswertung erfolgte nach den folgenden Auswertungskriterien:

- ausschließlich einzeln liegende Zellkerne wurden analysiert, sich überlappende oder nicht intakte Zellkerne wurden nicht gewertet.
- Kerne ohne Signal wurden nur gewertet, wenn sie von mehreren Zellkernen mit Signalen umgeben waren.
- Kerne mit Signalen die im Bereich der Kernperipherie lagen, wurden nicht berücksichtigt.
- Diffuse oder geteilte Signale wurden nur dann als ein Signal gewertet, wenn sie durch ein Fluoreszenzband miteinander verbunden waren.

3.3.11 Statistische Auswertung

Eine statistische Analyse erfolgte zur Prüfung der Repräsentativität des ausgewählten Patientenkollektivs (siehe 4.1) sowie zur Untersuchung einer möglichen klinischen oder prognostischen Relevanz der mittels array CGH identifizierten chromosomalen Veränderungen. Hierfür wurden der Chi-Quadrat (χ^2)-Test und der Exakte Test nach Fisher angewendet. Diese Tests prüfen in einer Kreuztabelle, ob zwei Variablen unabhängig voneinander auftreten oder voneinander abhängig sind, also ein statistischer Zusammenhang zwischen zwei Merkmalen besteht.

Die prognostische Bedeutung der mittels array CGH identifizierten Veränderungen wurde mit dem Exakten Test nach Fisher oder dem Mann-Whitney U-Test untersucht. Analysiert wurde eine mögliche Korrelation zwischen chromosomalen Veränderungen, die bei ≥10 % der Patienten nachgewiesen worden waren und klinischen und biologischen Patienten- und Probendaten, die im Rahmen der ALL-REZ BFM Studie erhoben wurden. Die Parameter wurden als kategorielle oder stetige Variablen definiert. Zur Gruppe der kategoriellen Variablen zählten das Geschlecht, der Ort des Rezidivs

(KM isoliert oder kombiniert), der Zeitpunkt des Rezidivs in Bezug auf das Ende der Ersterkrankungsbehandlung, die Strategiegruppe (S 2 oder 3), das Outcome und das Ansprechen auf die Therapie. Für die Analyse des Outcome wurden Patienten, die an einem Folgerezidiv erkrankten und Patienten, die an dem Erstrezidiv verstarben, in der Gruppe *,non-continuous complete remission' (non-CCR*, keine anhaltende komplette Remission) zusammengefasst und mit Patienten in anhaltender kompletter Remission *,continuous complete remission' (CCR)* verglichen. Das Ansprechen auf die Therapie wurde durch den MRD-Nachweis am Ende der Induktionstherapie und durch den Zeitpunkt, an dem eine morphologische Remission erreicht worden war, beurteilt. Aufgrund der kleinen Fallzahlen und der dadurch bedingten niedrigen erwarteten Häufigkeiten wurden für die Untersuchung der Unterschiede in den kategoriellen Variablen der Exakte Test nach Fisher angewendet. Dieser Test ermöglicht bei kleinen Fallzahlen eine genauere Abschätzung als der χ^2 -Test. Für den Vergleich der Mediane quantitativer Variablen wie Dauer der ersten Remission, Alter, periphere Blastenzahl und Leukozytenzahl bei Rezidivdiagnose wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet.

Für einzelne Veränderungen, bei denen sich in den Gruppenvergleichen mittels Exaktem Test nach Fisher eine Assoziation mit prognostisch relevanten klinischen Daten gezeigt hatte, wurden zusätzlich Überlebenszeitanalysen durchgeführt. Die Wahrscheinlichkeit eines ereignisfreien Überlebens (probability of event-free survival, pEFS) wurde mit der univariaten Methode nach Kaplan-Meier¹⁴⁸ analysiert. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit berechnet, ob ein Ereignis (das Überleben) in einem bestimmten Zeitintervall eintritt. Dabei werden die Beobachtungsintervalle nicht vorgegeben, sondern von den Ereignissen definiert. Die dadurch errechneten Überlebenskurven können anschließend durch den Log-Rank-Test miteinander verglichen werden, um zu berechnen, ob ein signifikanter Unterschied im pEFS zwischen zwei Gruppen besteht. Um die Unabhängigkeit des prognostischen Einflusses mehrerer Variablen zu prüfen, wurde die multivariate Cox Regression (proportionales Hazard Modell)¹⁴⁹ angewendet. Dadurch kann der Effekt mehrerer Merkmale auf das Überleben multivariat untersucht werden.

Die statistischen Untersuchungen wurden mit Hilfe der Software SPSS for Windows, Version 18.0.1 (SPSS Inc., Chicago, USA) sowie der STATA software, Version 9.0 (StataCorp, Texas, USA), durchgeführt. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv

Anhand der Einschlusskriterien (siehe 3.1) konnten 51 leukämische KM-Aspirate ausgewählt und die daraus isolierte leukämische DNA auf den hochauflösenden BAC array hybridisiert werden.

Das untersuchte Patientenkollektiv setzt sich aus 31 männlichen und 20 weiblichen Patienten zusammen. Der Altersmedian bei Rezidivdiagnose liegt bei 8,5 Jahren. Die Mehrzahl der Rezidive (82 %) ereignete sich zu einem späten Zeitpunkt in Bezug auf die Vortherapie, bei 18 % der Patienten trat das Rezidiv zu einem frühen Zeitpunkt auf. Bei 78 % war das Rezidiv isoliert im KM aufgetreten, 22 % zeigten bei der Rezidivdiagnose zusätzlich den Befall eines extramedullären Organs, davon 8 im Testis und 3 im ZNS. Bezüglich des Immunphänotyps waren 24 % der Rezidive einer pre-B-ALL und 76 % einer common-ALL zuzuordnen. Entsprechend der ALL-REZ BFM Stratifizierungskriterien (siehe 1.3.1) wurden 88 % der Patienten in die Risikogruppe S2 und 12 % in die prognostisch ungünstigere S3-Gruppe eingeordnet. Informationen über das molekulare Ansprechen auf die Therapie gemäß MRD (siehe 1.3.2) lagen für 65 % der untersuchten Rezidive vor. Von diesen zeigten 67 % eine gute und 33 % eine schlechte molekulare Therapieresponse. Die Nachbeobachtungszeit der Patienten beträgt zwischen 5 und 21 Jahren, mit einem Median von 10 Jahren. In dieser Zeit entwickelten 27 % ein Folgerezidiv, ein Patient verstarb bereits vor Erreichen einer Remission ("Induktionstod") und ein Patient verstarb während der Therapie nach Erreichen einer Remission ("Therapietod"). Die Blastenzahl im Blut zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose konnte bei 88 % der Rezidive mit <10.000/µl beziffert werden, bei 12 % lag sie über diesem Wert (siehe auch Tabelle 3). Der Leukämiezellanteil im KM bei Rezidivdiagnose betrug zwischen 71 und 98 % mit einem Median von 92 % Leukämiezellen vor Ficoll-Anreicherung.

Um die durch die array CGH in der Leukämiezell-DNA der Patienten identifizierten Kopienzahlveränderungen auf eine Korrelation mit klinischen und biologischen Patientendaten untersuchen zu können, war Vorraussetzung, dass es sich bei dem ausgewählten Patientenkollektiv um eine repräsentative Stichprobe der in der ALL-REZ BFM Studie registrierten Patienten handelt. Um dies zu untersuchen, wurden die

ausgewählten 51 Patienten mit der Gesamtheit der ALL-REZ BFM Patienten, bei denen im selben Zeitraum ein *ETV6/RUNX1*-positives Erstrezidiv einer BCP-ALL mit KM-Beteiligung diagnostiziert wurde (n 113), anhand klinischer und biologischer Parameter verglichen. Dabei ergaben sich im χ^2 -Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen. Die Repräsentativität des Studienkollektivs konnte somit festgestellt werden (siehe Tabelle 3).

	Untersuchte Patienten		ALL-REZ I Vergleichs	3FM gruppe	<i>P</i> -Wert (χ ² -/Mann- Whitney-U- Test)
	n/median	(%/95 %Cl ¹)	n/median	(%/95 %Cl ¹)	,
Geschlecht					0,80
männlich	31	(61)	71	(63)	
weiblich	20	(39)	42	(37)	
Alter bei Initialdiagnose					0,84
Median (Jahre)	4,3	(3,8-4,7)	4,2	(3,7-4,6)	
Alter bei Rezidivdiagnose					0,96
Median (Jahre)	8,5	(7,1-10,3)	8,6	(7,7-9,3)	
Zeitpunkt des Rezidivs					0,35
sehr früh	0	(0)	4	(4)	
früh	9	(18)	16	(14)	
spät	42	(82)	93	(82)	
Ort des Rezidivs					0,57
KM isoliert	40	(78)	84	(74)	
KM kombiniert	11	(22)	29	(26)	
Immunphänotyp					0,85
prä-B-ALL	13	(25)	27	(24)	
c-ALL	38	(75)	85	(76)	
Strategiegruppe					0,39
S2	45	(88)	97	(86)	
S3	6	(12)	12	(11)	
ALL-REZ BFM Protokoll					0,72
90	2	(4)	8	(7)	
95/96	33	(65)	69	(61)	
2002	16	(31)	36	(32)	
periphere Blasten bei Diagnose					0,69
<1/µl	4	(8)	13	(12)	
≥1 bis <10.000/µl	39	(76)	86	(76)	
≥10.000/µl	8	(16)	14	(12)	
MRD nach Induktion					0,95
good response (<10 ⁻³)	22	(67)	33	(66)	
poor response (≥10 ⁻³)	11	(33)	17	(34)	
nicht verfügbar	18				
Event					0,80
CCR	34	(67)	66	(58)	
Folgerezidiv	15	(29)	36	(32)	
Induktionstod	1	(2)	4	(4)	
Therapietod	1	(2)	2	(2)	
Gesamt	51		113		

Repräsentativität und klinische Charakteristika des untersuchten Patientenkollektivs

Tabelle 3: Repräsentativität und klinische Charakteristika des mittels array CGH untersuchten Patientenkollektivs im Vergleich zur Gesamtheit der ALL-REZ BFM Studienpatienten mit ETV6/RUNX1positivem BCP-ALL-Rezidiv und KM-Beteiligung. ¹95 % Konfidenzintervall.

4.2 Ergebnisse der array CGH-Analyse

Für die Visualisierung und Analyse der array CGH-Daten der 51 *ETV6/RUNX1*positiven ALL-Rezidive wurde die Auswertungssoftware CGHPRO¹⁴³ (siehe auch 3.3.8) verwendet. Die Auswertung erfolgte manuell-visuell. Eine automatische Erfassung der im CGH-Profil als aberrant angezeigten BAC-Klone ist mithilfe der CGHPRO-Software zwar möglich, jedoch resultiert eine hohe Anzahl falsch positiver Veränderungen. So werden zusammenhängende Veränderungen durch minimale Schwankungen im genomischen Profil als mehrere einzelne Aberrationen gewertet und es erfolgt automatisch keine Differenzierung zwischen potentiellen CNV und CNA. Die automatische Auswertung ergab in etwa eine vierfache Gesamtzahl sowie durchschnittliche Zahl von CNA im Vergleich zur genaueren und stringenteren manuellen Analyse der array CGH-Daten.

Für die Auswertung wurde zunächst jede einzelne der ALL-Rezidivproben unter Berücksichtigung der in 3.3.8 beschriebenen Auswertungskriterien auf das Vorhandensein von CNA hin untersucht sowie CNV extrahiert. Die Größe und Ausdehnung der identifizierten Veränderungen wurde analysiert und die darin enthaltenen Gene unter Verwendung des USCS Genome Browsers (Assembly May 2004, HG 17/NCBI Build 37; http://genome.uscs.edu/) ermittelt. Alle im Folgenden beschriebenen genomischen Positionen und im Bereich von CNA lokalisierten Gene, beziehen sich auf diese Version des USCS Genome Browsers. Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob einzelne chromosomale Regionen in der Gesamtheit der untersuchten ALL-Rezidive wiederholt CNA aufwiesen. Die kleinsten gemeinsamen überlappenden Regionen (*minimal overlapping region*, MOR) dieser rekurrenten Veränderungen wurden determiniert und die darin enthaltenen Gene analysiert.

4.2.1 Häufigkeit von DNA-Kopienzahlveränderungen

CNA konnten in allen 51 *ETV6/RUNX1*-positiven Rezidivproben identifiziert werden. Die Häufigkeit variierte zwischen 1 und 18 CNA und lag im Mittel bei 7 Veränderungen pro untersuchtem Rezidiv. Chromosomale Verluste waren etwa 2,5 mal häufiger als Zugewinne (im Mittel 5 Verluste und 2 Zugewinne). Die durchschnittliche Größe der Veränderungen betrug für die chromosomalen Zugewinne ca. 21,3 Mb, für die chromosomalen Verluste ca. 9,12 Mb. Alle Chromosomen waren von CNA betroffen, allerdings zeigte sich eine deutliche Häufung von Veränderungen in einzelnen Chromosomen und Regionen. Abbildung 8 gibt einen Überblick über die Verteilung der Gesamtzahl von im Studienkollektiv nachgewiesenen Veränderungen auf die Chromosomen. Hier zeigte sich, dass Kopienzahlverluste am häufigsten die Chromosomen 3, 6, 12 und 15 betreffen. Ebenfalls häufig waren Verluste innerhalb der Chromosomen 4, 5, 7 und 9 sowie des X-Chromosoms. Die insgesamt seltener nachgewiesen Kopienzahlzugewinne betrafen am häufigsten die Chromosomen 12 und 21. Abbildung 9 gibt einen Überblick über die Gesamtzahl nachgewiesener Veränderungen entsprechend der automatischen Datenauswertung.



Abbildung 8: Verteilung der identifizierten CNA auf die Chromosomen. Chromosomale Verluste (loss), in blau dargestellt, betreffen am häufigsten die Chromosomen 3, 6, 12 und 15. Chromosomale Zugewinne (gain), in grün dargestellt, wurden am häufigsten innerhalb der Chromosomen 12 und 21 identifiziert. Der Anteil von CNA gesamter Chromosomen ist mit einer dunkleren Farbe hinterlegt. WCL betrafen am häufigsten das X-Chromosom, WCG am häufigsten die

4.2.2 DNA-Kopienzahlveränderungen gesamter Chromosomen

Chromosomen 10,16 und 21.

Zugewinne ganzer Chromosomen (*whole chromosome gain*, WCG) waren in der Leukämiezell-DNA von 12 Rezidiven nachweisbar. Bei der Mehrzahl dieser Rezidive betrafen die Zugewinne ein einzelnes Chromosom. Eine Rezidivprobe zeigte WCG von zwei Chromosomen (+10, +16), ein Rezidiv WCG von drei Chromosomen (+10, +16, +22) und bei einem Rezidiv war ein hyperdiploider Karyotyp mit Zugewinn der Chromosomen 10, 16, 18 und 21 zusätzlich zum *ETV6/RUNX1*-Fusionsgen nachweisbar. Insgesamt wurde der Zugewinn des Chromosoms 10 am häufigsten detektiert (6/52). Bei drei Rezidiven lag ein Zugewinn der Chromosomen 10 und 16

kombiniert vor. WCG 21 zeigte sich bei vier, WCG 16 bei drei und WCG 22 bei zwei Rezidiven. Zugewinne der gesamten Chromosomen 8, 18 und X wurden je einmal identifiziert (siehe Abbildung 8 und Tabelle 4).

Verluste ganzer Chromosomen (*whole chromosome loss*, WCL) zeigten sich bei 12 Rezidiven. Abgesehen von einer Rezidiv-DNA mit WCG der Chromosomen 9 und 13, einer weiteren mit WCL 4 und 15 und einer Leukämiezellprobe mit WCL 15, betrafen die WCL am häufigsten das X-Chromosom, das bei neun der untersuchten Rezidive einen Kopienzahlverlust zeigte (siehe Abbildung 8 und Tabelle 4).

	00 8 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9	
00 20 0 20 100 20 20 10	45 BY	

Abbildung 9: Summationsdarstellung der Gesamtzahl identifizierter CNA in den 51 *ETV6/RUNX1*-positiven ALL-Rezidiven.

Dargestellt ist die relative Häufigkeit für die einzelnen Veränderungen in der Gesamtgruppe der untersuchten Rezidive. Die Kopienzahlverluste entlang der einzelnen Chromosomen sind in rot dargestellt, die Kopienzahlzugewinne in grün. Die Bezifferung 0-50-100 entspricht der Anzahl von Proben, in denen die CNA detektiert wurden. Die Summationsdarstellung basiert auf einer automatischen Auslesung der array CGH-Daten und ist nicht hinsichtlich der Überlagerung durch CNV korrigiert.

Chromosom	WCL ¹ (n)	WCG ² (n)
4	1	0
8	0	1
9	1	0
10	0	6
13	1	0
15	2	0
16	0	3
18	0	1
21	0	4
22	0	0
Х	9	1

DNA-Kopienzahlveränderungen gesamter Chromosomen

Tabelle 4: DNA-Kopienzahlveränderungen gesamter Chromosomen bei ETV6/RUNX1-positiven ALL-Rezidiven

¹WCL (whole chromosome loss): Kopienzahlverlust im Bereich eines gesamten Chromosoms

²WCG (whole chromosome gain): Kopienzahlzugewinn im Bereich eines gesamten Chromosoms

4.3 Rekurrente DNA-Kopienzahlveränderungen

Die Mehrzahl der identifizierten Veränderungen wurde in chromosomalen Regionen detektiert, die wiederholt CNA aufwiesen. Von insgesamt 362 nachgewiesenen CNA wurden 237 (65 %) in überlappenden chromosomalen Regionen identifiziert, die bei mindestens 2 Rezidiven (≥4 %) betroffen waren. 174 (48 %) der insgesamt 362 Veränderungen wurden in chromosomalen Regionen nachgewiesen, die bei mindestens 5 Rezidiven (≥10 %) betroffen waren. Insgesamt konnten 18 chromosomale Regionen identifiziert werden, die bei ≥10 % der untersuchten Rezidivproben Veränderungen aufwiesen. Die am häufigsten beim ETV6/RUNX1-positiven ALL-Rezidiv nachgewiesenen rekurrent überlappenden Regionen sind in Tabelle 5 für die Gesamtgruppe zusammengefasst. Die Häufigkeit dieser rekurrenten Veränderungen pro Rezidiv ist in Tabelle 6 dargestellt. Die Anzahl von Genen, die innerhalb der minimal überlappenden Regionen identifiziert werden konnten, war in Abhängigkeit von der Größe der Veränderungen und der Gendichte sehr variabel. Einige Regionen enthielten nur ein einziges Gen. Dazu gehörte FHIT auf Chromosom 3p14.2, TBL1XR1 auf Chromosom 3q26.32, NR3C1 auf Chromosom 5q31.3, TTC26 auf Chromosom 7q34 und ETV6 auf Chromosom 12p13.2. In Tabelle 5 und Tabelle 6 ist eine Auswahl der in den betroffenen Regionen liegenden Gene dargestellt.

Häuf	Häufigkeit rekurrenter DNA-Kopienzahlveränderungen													
Chr ¹	Region	Start MOR ² (Mb)	Ende MOR ² (Mb)	Größe MOR ² (Mb)	Hä n (ufigkeit %)	Anzahl Gene MOR ²	Auswahl von Kandidatengenen						
DNA	Kopienzahlver	luste												
3	p14.2	59.9	60.6	0,57	6	(12)	1	FHIT						
3	p21.21	47.2	48.0	0,68	7	(14)	11	SMARCC1, MAP4						
3	q26.32	178.4	178.7	0,35	6	(12)	1	TBL1XR1						
4	q31	149.8	150.3	0,47	4	(8)	0 (1)*	<i>Keine annotierten Gene (NR3C2*del in 2/4)</i>						
5	q31.3	142.7	143.1	0,41	5	(10)	1	NR3C1						
5	q33.3	157.2	158.5	1,35	3	(6)	3	EBF1						
6	q21	108.0	111.0	3,20	17	(33)	26	FOXO3A, AIM1, ARMC2, SESN1						
7	p12.1-12.2	49.9	50.9	1,06	4	(8)	6	IKZF1						
7	q34	138.3	138.3	0,01	7	(14)	1	TTC26						
9	p13.2	36.9	37.3	0,27	4	(8)	3	PAX5, ZCCHC7						
9	p21	21.1	22.3	1,21	11	(22)	23	CDKN2A, CDKN2B, MTAP						
10	q24.1	97.6	98.7	1,08	5	(10)	15	BLNK (SLP-65)						
12	p13.2	11.7	12.0	0,31	22	(43)	1	ETV6						
12	p13.2	11.9	13.2	1,26	19	(37)	22	CDKN1B (KIP1), BCL2L14						
15	q15.1	39.4	39.9	0,49	11	(20)	11	LTK, ITPKA, TYRO3						
19	q13.11	39.0	39.7	0,73	6	(12)	7	GPI, PDCD2L, UBA2, WTIP						
DNA	Kopienzahlzug	gewinne												
3	p21.21	50.3	50.7	0,50	4	(8)	21	CISH, HEMK1, HYAL2, RASSF1						
8	q23.1-24.3	109.0	143.2	34,24	5	(10)	mehrere	cMYC						
9	p13.3	34.4	34.7	0,24	5	(10)	12	OPRS1, IL11RA, CCL27						
12	p13.2-13.33	0.01	12.0	11,98	11	(22)	mehrere	ETV6 (in 7/51, 14 %)						
16	q22.1	65.7	66.2	0,52	8	(16)	26	HSF4, E24F, CTCF, FAM65A, RLTPR						
21	q21.30-22.12	31.8	35.2	3,40	17	(33)	45	RUNX1						
X	q27.3-28	144.0	154.6	10,56	7	(14)	mehrere	SPANX1, HMGB3						

Tabelle 5: Rekurrente DNA-Kopienzahlveränderungen bei *ETV6/RUNX1*-positiven ALL-Rezidiven. ¹Chr, Chromosom; ²MOR: minimale überlappende Region (minimal overlapping region); *Innerhalb der MOR 4q31 liegen keine annotierten Gene. Direkt zentromerwärts der MOR befindet sich das *NR3C2*-Gen (Mineralokortikoidrezeptor), das in 2/4 Patienten deletiert ist. Rekurrente Veränderungen gesamter Chromosomen (siehe Tabelle 4), sowie wahrscheinlich infolge von B- an T-Zell Antigenrezeptor-Genumlagerungen entstandene CNA, sind in der Tabelle nicht dargestellt.

		Xq (<i>SPANXB, HMGB3</i>)						0							0				•						o				0
	vinne	21q22 (<i>RUNX1</i>)			0						0					0	0					•						0	0
	zugev	16q22.1							0							0				0			0						
	enzahl	12p														0						o						0	0
	Kopie	9p13.3																	0	0			o						
	Irrente	8q23.3 (<i>cMYC</i>)																	0		0								
	Reku	3p21.21							0			0																	
		19q13.1																											0
		15q15.1	o	o							o															o			0
		12p13.2 (<i>CDKN1B</i>)		o	0				0	0	0			0				0	0		0			0			0		
		12p13.2 (<i>BCL2L14</i>)		o	o	0		0	0	o	0			0				0	0		0			0			0		
		12p13.2 (<i>ETV6</i>)		0	0	0		0	0	0	0			0				0	0		0			0			0		
		10q24.1 (<i>BLNK</i>)						0									0												
		9p21 (<i>CDKN2A/B, MTAP</i>)	o					0	0		0			0				0			0			o	o				
lezidiv		9p13.2 (<i>PAX5</i>)	o					0																					
tem H		7q34 (<i>TTC26</i>)		o				0														0				o			
sucht		7p12 (<i>IKZF1</i>)											0		0														
unter		6q21	o	o		o			o	o				0				0	0		0				⊙			0	
A pro	te	5q33.3 (<i>EBF1</i>)																											
n CN	verlus	5q31.3 <i>(NR3C1)</i>																		o							0		
rente	Inzahl	4q31									0													0					
rekur	Kopie	3q26.32 (<i>TBL1XR1</i>)	o														0					o		0		0			
it der	rrente	3p21.21	0	o			0														0								
ıfigke	Rekul	3p14.2 (<i>FHIT</i>)																				o		0			o		
Häu		Probe	-	2	ო	4	5	9	ω	ი	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	29

Tabelle 6 (Fortsetzung nächste Seite): Häufigkeit der rekurrenten CNA pro untersuchtem Rezidiv. In Spalten: rekurrente CNA, in den Zeilen: 51 Rezidivproben. \odot , CNA vorhanden; Σ , Häufigkeit der Veränderungen in der Gesamtgruppe; innerhalb der MOR 4q31 liegen keine annotierten Gene. Direkt zentromerwärts der MOR befindet sich das *NR3C2*-Gen, das für den Mineralokortikoidrezeptor kodiert und in 2/4 der Rezidive mit 4q31-Verlust deletiert war.

		Xq (<i>SPANXB, HMGB3</i>)									o		0														7
	vinne	21q22 (<i>RUNX1</i>)			o	0	o			o			o			0			o	o			•		o		17
	Izugev	16q22.1									o		o			0									o		8
	enzah	12p			o	0							o			0				0			0		⊙		Ŧ
	Kopi	9p13.3		0							0																5
	Irrente	8q23.3 (<i>cMYC</i>)			o			o	o																		5
	Reku	3p21.21								o			o														4
		19q13.1	0	0								0							0							0	9
		15q15.1	0						•	0					0					0						0	Ŧ
		12p13.2 (<i>CDKN1B</i>)		0	o			o	•	o		0				0										0	19
		12p13.2 (<i>BCL2L14</i>)		o	o			0	•	0		0				0			o			0				0	23
(bun		12p13.2 (<i>ETV6</i>)		0				0	0			0			0			0	•			0				0	22
tsetz		10q24.1 (<i>BLNK</i>)							0					0						0							2
v (Foi		9p21 (<i>CDKN2A/B, MTAP</i>)							•					0													Ŧ
lezidi		9p13.2 (<i>PAX5</i>)									0						0										4
tem P		7q34 (<i>TTC26</i>)		0							0								0								7
such		7p12 (<i>IKZF1</i>)	0	0																							4
unter		6q21	0			o				0					o			0			o						17
A pro	te	5q33.3 (<i>EBF1</i>)	0																o							0	e
n CN	verlus	5q31.3 <i>(NR3C1)</i>												o			0		0								5
rente	Inzahl	4q31																	o	0							4
rekur	Kopie	3q26.32 (<i>TBL1XR1</i>)			0																						9
it der	rrente	3p21.21									0				o										0		7
ıfigke	Reku	3p14.2 (<i>FHIT</i>)					•								o	0											9
Häu		Probe	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	ω

Tabelle 6 (Fortsetzung): Häufigkeit der rekurrenten CNA pro untersuchtem Rezidiv.

In Spalten: rekurrente CNA, in den Zeilen: 51 Rezidivproben. \odot , CNA vorhanden; Σ , Häufigkeit der Veränderungen in der Gesamtgruppe; innerhalb der MOR 4q31 liegen keine annotierten Gene. Direkt zentromerwärts der MOR befindet sich das *NR3C2*-Gen, das für den Mineralokortikoidrezeptor kodiert und in 2/4 der Rezidive mit 4q31-Verlust deletiert war

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit bestand darin, die mittels array CGH in den Leukämiezellproben identifizierten ETV6/RUNX1-positiven chromosomalen Veränderungen auf ihre biologische Bedeutung und klinische Relevanz hin zu untersuchen. Dafür wurden wiederholt nachgewiesene CNA mit im Rahmen der ALL-REZ BFM Studie erhobenen prognostisch relevanten Patientendaten korreliert. Dies setzte einerseits die Repräsentativität des untersuchten Kollektivs voraus (siehe auch 4.1), andererseits war für eine statistische Korrelation eine möglichst große Anzahl von Patienten bzw. Rezidiven in den zu vergleichenden Gruppen Vorraussetzung. Daher wurde eine Korrelation mit klinischen Daten auf Veränderungen begrenzt, die bei ≥10 % (≥5/51) der untersuchten ALL-Rezidive nachweisbar waren. Diese in Tabelle 5 gezeigten Regionen wurden im Anschluss an die Auswertung der array CGH-Daten auf eine Assoziation mit klinischen und biologischen Daten der Patienten hin untersucht. Die detaillierten Ergebnisse der array CGH für diese Regionen werden in den folgenden Abschnitten in Zusammenhang mit den Ergebnissen der Untersuchung auf eine prognostische Relevanz im Einzelnen dargestellt.

4.3.1 Chromosom 12p13.2

Am häufigsten nachweisbar waren Kopienzahlverluste der Region 12p13. 49 % (25/51) der *ETV6/RUNX1*-positiven ALL-Rezidive zeigten Verluste innerhalb dieser Region. Die Größe der deletierten Bereiche war sehr heterogen und variierte zwischen Verlusten großer Teile des kurzen Arms von Chromosom 12, die mehrere benachbarte Gene einschlossen und fokalen Deletionen von 0,31 Mb Größe. Die kleinste überlappende Region (siehe Tabelle 5 und Abbildung 10) enthielt *ETV6* als einziges Gen, das bei 43 % (22/51) der Rezidive einen Kopienzahlverlust zeigte. Das direkt benachbarte *BCL2L14*-Gen war in 45 % (23/51), das etwa 0,8 Mb zentromerwärts von *ETV6* lokalisierte *CDKN1B* ($p27^{KIP1}$)-Gen in 37 % (19/51) der Rezidive mit Verlust der Region 12p13.2 deletiert. Die MOR der Verluste die die Gene *BCL2L14* und *CDKN1B* einschloss, enthielt etwa 15 Gene. *ETV6* lag außerhalb der MOR, allerdings waren bei 16 Rezidiven alle 3 der genannten Gene deletiert.

Die Auswertung der klinischen Daten ergab, dass Verluste von 12p häufiger in der Leukämiezell-DNA männlicher Patienten nachweisbar waren (P = 0,023). Die Deletion von *CDKN1B* ($p27^{KIP1}$) war signifikant mit einer kürzeren ersten Remissionsdauer bzw. einem früheren Zeitpunkt des Rezidivs (P = 0,009), mit einem c-ALL Immunphänotyp

(P = 0.018) sowie mit einem signifikant schlechteren pEFS (P = 0.001) assoziiert. Patienten mit Verlust dieser Region hatten ein pEFS von 42 % SE ± 11 % im Vergleich mit Patienten ohne Deletion, die ein pEFS von 81 % SE ± 7 % zeigten (siehe Abbildung 11). Aufgrund des bekanntermaßen starken Einflusses vom Zeitpunkt des Rezidivs auf die Prognose, wurde die Unabhängigkeit der Assoziation von CDKN1B-Deletion mit dem pEFS durch eine multivariate Analyse überprüft, in der alle relevanten prognostischen Parameter analysiert wurden. In das endgültige multivariate Cox-Regressionsmodell wurden der Zeitpunkt des Rezidivs und der Immunphänotyp als zusätzliche Einflussfaktoren miteinbezogen. Dabei zeigte sich, dass der Zeitpunkt des Rezidivs den stärksten prognostischen Faktor darstellt, während Deletionen von *CDKN1B* (Hazardrate 2,28; 95 % CI 0,71 – 7,31; *P* = 0,162) und der Immunphänotyp einen schwächeren prognostischen Einfluss haben als in der univariaten Analyse (Hazardrate 4,60, 95 % Konfidenzintervall 1,69 – 12,50, P = 0,003). Daraus folgt, dass die Assoziation mit einem schlechteren pEFS durch die Assoziation mit einem früheren Zeitpunkt beeinflusst wird und keinen unabhängigen prognostischen Faktor darstellt (siehe Tabelle 7).



Abbildung 10: CNA auf Chromosom 12p beim *ETV6/RUNX1*-positiven ALL-Erstrezidiv. Abgebildet sind die identifizierten Verluste unter Beteiligung des *ETV6*-Gens (rot) und Zugewinne (blau) der Region 12p13 im Verhältnis zum kurzen Arm von Chromosom 12. Jede senkrechte Linie repräsentiert die Kopienzahlveränderung, die in einer Leukämiezell-DNA nachgewiesen wurde. Im Bereich des gestrichelten Kastens liegen die für das *ETV6*-Gen kodierenden Sequenzabschnitte. Modifizierte Darstellung aus CGHPRO¹⁴³.



Abbildung 11: Kaplan-Meier Analyse der Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (pEFS \pm Standardabweichung, SE) in Abhängigkeit vom Nachweis einer Deletion von *CDKN1B*. Das pEFS beträgt 42 % SE \pm 11 % in der Patientengruppe mit Nachweis der Deletion verglichen mit einem pEFS von 81 % SE \pm 7 % in der Patientengruppe ohne Nachweis der Deletion.

Cox-Regressionsmode	I				
Parameter		Anzahl Patienten	Hazardrate	95 % Cl ¹	P-Wert
univariat					
CDKN1B loss	negativ	32	1		
	positiv	19	4,60	1,69 – 12,5	0,003
multivariat					
CDKN1B loss	negativ	32	1		
	positiv	19	2,28	0,71 – 7,31	0,162
Zeitpunkt des Rezidivs	früh	9	1		
	spät	42	0,13	0,04 - 0,41	0,001
Immunphänotyp	common	38	1,00		
	prä-B	13	4,17	1,03-16,90	0,046

Tabelle 7: Cox-Regressionsmodell für den Verlust von *CDKN1B* unter Einbeziehung von Zeitpunkt des Rezidivs und Immunphänotyp.

Es zeigt sich, dass der Zeitpunkt des Rezidivs den stärksten Einflussfaktor für das pEFS darstellt, während der Immunphänotyp und Verlust von *CDKN1B* einen geringeren Einfluss ausüben. Somit lässt sich der signifikante prognostische Einfluss des *CDKN1B*-Verlustes in der univariaten Analyse (Hazardrate 4,60, 95 % CI 1,69-12,50, P = 0,003) mit der multivariaten Analyse (Hazardrate 2,28; 95 % CI 0,71 – 7,31; p = 0,162) nicht bestätigen.

¹95 % Konfidenzintervall.

4.3.2 Chromosom 6q21

Die am zweithäufigsten im untersuchten Kollektiv detektierten Veränderungen waren Kopienzahlverluste der Chromosomenbande 6q21. Veränderungen, die diese Region einschlossen, waren bei 33 % (17/51) der Rezidive nachweisbar und in ihrer Größe (3,2 bis 92 Mb) und Verteilung heterogen. Die kleinste gemeinsame Region der Verluste von 3,1 Mb (genomische Position Mb 108-111, siehe auch Tabelle 5) enthielt zahlreiche Gene, darunter *FOXO3a*, das unter anderem für die Induktion der Gentranskription von *CDKN1B* ($p27^{KIP1}$) von Bedeutung ist¹⁵⁰, das putative Tumorsuppressorgen *AIM1*¹⁵¹ und *SESN1*, eines der Zielgene von $p53^{152}$. Außerhalb der kleinsten gemeinsamen Region, aber bei 16 der 17 Rezidive mit 6q21-Verlust nachweisbar, war der Verlust der Tyrosinkinase *FYN*. Die Korrelation mit klinischen Daten der Patienten zeigte keine prognostische Relevanz für Kopienzahlverluste von 6q21 allein.

Bei der Auswertung der Daten fiel jedoch auf, dass Kopienzahlverluste der Regionen 6q21 und 12p13.2 auffällig häufig in Kombination vorlagen. 23 % (12/21) der untersuchten ALL-Rezidive zeigten Verluste beider Regionen. Bei 16 % (8/51) waren dabei die für den zyklinabhängigen Kinaseinhibitor *CDKN1B* ($p27^{KIP1}$) kodierenden Sequenzen in die deletierten Bereiche auf Chromosom 12p13.2 eingeschlossen. Die Analyse der klinischen Patientendaten ergab, dass bei 3 dieser 8 Patienten das Rezidiv zu einem frühen Zeitpunkt aufgetreten war und 5 Patienten ein Folgerezidiv erlitten hatten. Diese Häufung von Folgerezidiven spiegelte sich in der statistischen Auswertung in einem schlechteren Outcome (P = 0,047) und einem niedrigeren pEFS (P = 0,045) für Patienten, in deren Leukämiezellen der kombinierte Verlust beider Regionen vorlag, wider. Dieses Ergebnis war nicht übertragbar auf die Kombination von Verlusten von 6q21 und *ETV6*.



Abbildung 12: Kaplan-Meier Analyse der Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (pEFS ± Standardabweichung, SE) in Abhängigkeit vom Nachweis des kombinierten Kopienzahlverlustes von 6q21 und *CDKN1B*.

Das pEFS beträgt 38 % SE \pm 17 % in der Patientengruppe mit Nachweis der kombinierten Deletion, verglichen mit einem pEFS von 72 % SE \pm 7 % in der Patientengruppe ohne Nachweis der kombinierten Deletion.

4.3.3 Chromosom 9p21.3

Die 0,89 Mb messende kleinste überlappende Region der bei 22 % (11/51) detektierten Verluste von 9p21.3 enthielt 19 Gene, darunter das für die Methyladenosin-Phosphorylase kodierende *MTAP*-Gen und das für p16^{INK4A} und p14^{ARF} kodierende *CDKN2A*-Gen. Das angrenzend zentromerwärts lokalisierte *CDKN2B* (p15^{INK4B}) war zusätzlich in 9 der 11 Rezidive mit Verlust von 9p21.3 in eine minimal überlappende Region von 1,21 Mb eingeschlossen. Die Korrelation mit den klinischen Daten ergab, dass Kopienzahlverluste dieser Region mit höheren Leukozyten- (P = 0,001), peripheren Blasten- (P = 0,0023) und Lymphoblastenzahlen im Blut (P = 0,0093) sowie mit einem höheren Alter der Patienten bei der Diagnose der Ersterkrankung (P = 0,0068) und bei Rezidivdiagnose (P = 0,0005) assoziiert war (siehe Abbildung 13).



Abbildung 13: Boxplots für die Assoziation von Kopienzahlverlust der MOR von Chromosom 9p21.3(*CDKN2A/B, MTAP*) mit Leukozyten- und Blastenzahl sowie Alter bei Initial- und Rezidivdiagnose. Der Vergleich der Mediane mittels Mann-Whitney-U-Test ergab, dass chromosomale Verluste dieser Region mit höheren Leukozyten- (P = 0,001) und Lymphoblastenzahlen (P = 0,0093) sowie mit höherem Alter bei Ersterkrankungs- (P = 0,0068) und Rezidivdiagnose (P = 0,0005) assoziiert war.

4.3.4 Chromosom 3

Chromosom 3 zählte zu den insgesamt am häufigsten von Kopienzahlverlusten betroffenen Chromosomen (siehe Abbildung 8). Dabei konzentrierten sich die CNA auf drei Regionen: Fokale Deletionen des *fragile histidine triad* (*FHIT*)-Gen und *FRA3B*-Lokus auf 3p14.2 und von *TBL1XR1* (*transducin beta like x-linked receptor 1*) auf 3q26.3, die jeweils bei 12 % (6/51) der Rezidive nachweisbar waren und deren MOR ausschließlich die genannten Gene einschloss sowie Verluste und Zugewinne der Region 3p21.3. Letztere schlossen größere Regionen ein und die MOR enthielt entsprechend mehrere Gene (siehe auch Tabelle 5). Für die auf Chromosom 3 identifizierten Veränderungen ergaben sich keine Assoziationen in der Korrelation mit den klinischen Daten.

4.3.5 Chromosom 15q15.1

Chromosom 15 war ebenfalls eines der vier Chromosomen, die besonders häufig chromosomale Verluste zeigten. Eine Anhäufung von Verlusten war im Bereich von 15q15.1 nachweisbar (in 20 %, 10/51), die MOR enthielt 11 Gene. Dazu zählten *LTK* (*leukocyte receptor tyrosine kinase*), *ITPKA (inositol-trisphosphate 3-kinase A)* und *TYRO3 (tyrosine-protein kinase receptor)*. In 16 % der untersuchten Rezidive waren zudem Deletionen der *BMF (Bcl2 modifying factor)*-Gens nachweisbar.

4.3.6 CNA des X-Chromosoms

Wie bereits in 4.2.2 beschrieben, war der Verlust des gesamten X-Chromosoms der am häufigsten beobachtete WCL und in 18 % der untersuchten Rezidive (9/51) nachweisbar. WCL X zeigte sich ausschließlich in der Leukämiezell-DNA weiblicher Patienten (P = <0,0001) und war mit einem höheren Alter der Patienten bei Ersterkrankungs- und Rezidivdiagnose (P = 0,024 bzw. P = 0,006) assoziiert.

Kopienzahlzugewinne von Chromosom Xq waren in 14 % (7/51) der untersuchten Rezidive nachweisbar. Im Gegensatz zu WCL X zeigten sich Zugewinne von Xq ausschließlich in der Leukämiezell-DNA männlicher Patienten (P = 0,034). In allen sieben Proben betrafen die Zugewinne große Teile des langen Arms und waren zwischen 10,5 und 59,6 Mb groß. Die proximalen zentromerwärts gelegenen Enden der Zugewinne betrafen unterschiedliche chromosomale Regionen zwischen Xq21.33 und Xq28 (MOR Xq27.3-Xq28). Die distalen Enden waren bei allen sieben Proben im Bereich des Telomers lokalisiert (siehe Abbildung 14). Die Analyse der klinischen Daten der Patienten mit Zugewinn von Xq zeigte, dass alle sieben Patienten in CCR waren. Die statistische Auswertung ergab allerdings nur eine marginale Assoziation für Outcome (P = 0,084) und pEFS (P = 0,073) und Zugewinn von Xq.



Abbildung 14: Verteilung der X-chromosomalen CNA bei *ETV6/RUNX1*-positiven ALL-Erstrezidiven Dargestellt sind die DNA-Kopienzahlverluste (rot) des gesamten X-Chromosoms (WCL) und die DNA-Kopienzahlzugewinne (blau) des langen Arms von Chromosom X, deren MOR im Bereich der Chromosomenbanden Xq27.3-Xq28 lokalisiert ist. WCL war ausschließlich in der Leukämiezell-DNA weiblicher Patienten nachweisbar, Zugewinne von Xq ausschließlich bei männlichen Patienten.



Abbildung 15: Boxplots für die Assoziation von Kopienzahlverlust des gesamten X-Chromosoms (WCL X) und dem Alter der Patienten bei Initial- und Rezidivdiagnose.

Der Vergleich der Mediane mittels Mann-Whitney-U-Test ergab, dass chromosomale Verluste des gesamten X-Chromosoms mit höheren Alter bei Ersterkrankungs- (P = 0,024) und Rezidivdiagnose (P = 0,006) assoziiert war.

4.3.7 Chromosom 5q31.3

Chromosom 5q31.3 zeigte bei 10 % (5/51) der untersuchten Rezidive einen Kopienzahlverlust. Alle in der array CGH identifizierten Veränderungen konnten durch FISH-Analyse an KM-Ausstrichen verifiziert werden (siehe 4.3.8). In vier der fünf betroffenen Rezidivproben waren diese Kopienzahlverluste von submikroskopischer Größe, eine der fünf Leukämiezellproben zeigte einen Kopienzahlverlust von 32 Mb der

5q31.3 einschloss. Die kleinste überlappende Region der Kopienzahlverluste war 0,4 Mb groß und enthielt als einziges Gen das Glukokortikoidrezeptor- (GR-) gen *NR3C1*. Die für das GR-Gen kodierende DNA umfasst 157 Kb von 5q31.3 und enthält neun Exons. In vier der fünf Rezidivproben war das komplette GR-Gen von dem Kopienzahlverlust betroffen. In einer der Leukämiezellproben war nicht das komplette Gen involviert, sondern nur das 5'-Ende. Soweit eine weitere Eingrenzung der Deletion anhand der betroffenen BAC-Klone möglich ist, waren bei dieser Probe Exon 1 und 2 des Gens und damit die für die Amino-terminale-Domäne des Proteins kodierenden Bereiche involviert (siehe Abbildung 16).



Abbildung 16: DNA-Kopienzahlverluste von NR3C1

a, schematische Darstellung des Glukokortikoidrezeptorgens und des resultierenden Proteins mit den drei funktionellen Einheiten: der Amino-terminalen Domäne, die eine der beiden Transaktivierungsdomänen (AF-1) enthält, der DNA-bindenen Domäne, die aus zwei "zinc fingers" besteht und der Caboxyterminalen Liganden-bindenden Domäne, die die zweite Transaktivierungsdomäne (AF-2) enthält. Das nicht translatierte Exon 1 ist nicht dargestellt

b, anhand der beteiligten BAC-Klone abgeleitete Ausdehnung der *NR3C1*-Verluste in Relation zu den funktionellen Einheiten des Proteins. Die roten Linien repräsentieren die Deletion in der Leukämiezell-DNA eines Patienten. Die minimale überlappende Region der CNA wird durch die gestrichelte Linie dargestellt. Die Pfeile zeigen Start und Ende der CNA jenseits des dargestellten Bereichs an.

Die statistische Auswertung der klinischen Daten der fünf Patienten (siehe Tabelle 8), in deren Leukämiezell-DNA ein Kopienzahlverlust des GR-Gens detektiert wurde, ergab ein signifikant schlechteres molekulares Ansprechen auf die Therapie (P = 0,004) und eine signifikant spätere morphologische Response (P = 0,009). Da bei zwei der fünf Patienten kein MRD-Befund vom Ende der Induktionstherapie verfügbar war, wurde bei

diesen Patienten die morphologische Response zum selben Zeitpunkt untersucht. Hier zeigte sich, dass keiner der beiden Patienten nach Ende der Induktionstherapie eine morphologische Remission erreicht hatte und >5 % bzw. >25 % Blasten im KM nachweisbar waren. Da bei diesen morphologischen Befunden eine residuelle molekulare Leukämiezellast von mehr als einer Zelle in 1000 gesunden Zellen anzunehmen ist, wurden die Patienten für die statistische Auswertung als molekulare "poor responder" klassifiziert.

Hinsichtlich des Krankheitsverlaufs der fünf Rezidivpatienten mit Deletionen von *NR3C1* (siehe Tabelle 8) zeigte sich, dass einer der Patienten an einem Folgerezidiv verstarb. Vier der fünf Patienten erhielten aufgrund der hohen residuellen Leukämiezelllast am Ende der Induktionstherapie eine SZT. Bei zwei Patienten wurde die SZT von einem unverwandten Spender (*matched unrelated donor*, MUD-SZT) durchgeführt. Diese beiden Patienten verstarben an einem Folgerezidiv nach SZT. Die beiden übrigen Patienten erhielten eine SZT von einem verwandten Familienspender (*matched sibling donor*, MSD-SZT) und befinden sich seit sieben bzw. acht Jahren in CCR (Tabelle 8).

Kliniscl	Klinische und genetische Parameter der ALL-Rezidive mit Verlust von 5q31.3												
Patient /Probe	Klinische Dat	en	Genomische Position, Größe und Gene innerhalb der Deletionen										
ID	Therapie- ansprechen ¹	Krankheitsverlauf	Start (Mb)	Ende (Mb)	Größe (Mb)	Deletierte Gene							
P19	poor ²	Folgerezidiv, verstorben	142.706	143.652	0,95	<i>NR3C1</i> (Exon 1,2), 3 weitere							
P26	poor ²	Folgerezidiv nach MUD-SZT, verstorben	140.643	145.578	4,93	NR3C1 und weitere							
P41	poor ²	Folgerezidiv nach MUD-SZT, 3. Rezidiv, verstorben	142.629	143.119	0,48	NR3C1							
P44	poor ²	in CCR nach MSD-SZT	142.629	143.179	0,55	<i>NR3C1</i> und 1 weiteres							
P46	poor ²	in CCR nach MSD-SZT	138.368	170.518	32.15	<i>NR3C1</i> und weitere							

Tabelle 8: Klinische und genetische Parameter der ALL-Rezidive mit Verlust von 5q31.3. Abkürzungen: SZT, Stammzelltransplantation; MUD-SZT, matched unrelated donor-SZT (SZT vom unverwandten Spender); MSD-SZT, matched sibling donor-SZT (SZT vom verwandten Spender); CCR, continuous complete remission (anhaltende komplette Remission); ¹Ansprechen auf die Therapie nach dem 2. Induktionsblock F2 beurteilt gemäß MRD (P19, P44, P46) bzw. entsprechend der morphologischen Remission (P26, P41). ²poor, mehr als eine residuelle Leukämiezelle in 1000 normalen Zellen bzw. 5-25 % (P26) und mehr als 25 % (P41) leukämische Zellen im KM nach der Induktionstherapie.

4.3.8 Verifizierung der CNA auf Chromosom 5q31.3 durch Interphase FISH

Um mittels array CGH auf Chromosom 5g31.3 identifizierten die DNA-Kopienzahlverluste zu verifizieren und um den Allelstatus des auf 5q31.3 lokalisierten und von den Kopienzahlverlusten betroffenen NR3C1-Gens zu untersuchen, wurden KM-Ausstriche der fünf Patienten vom Zeitpunkt der Rezidivdiagnose mittels Interphase-FISH analysiert. Wie in 3.3.9 beschrieben, wurden durch Nick Translation fluoreszenzmarkierte BAC-Klone als Sonden für die FISH verwendet. Das NR3C1-Gen wird auf dem für die Studie verwendeten BAC array durch zwei Klone repräsentiert (RP11-722H2 und RP11-614D16, siehe auch Abbildung 17). Für die FISH wurde der BAC-Klon RP11-614D16 (genomische Position 142.706911-142.910614) ausgewählt, da dieser die in den fünf Rezidivproben identifizierte minimale überlappende Region der DNA-Kopienzahlverluste und damit auch die von der Deletion betroffenen Abschnitte von NR3C1 am besten abdeckte (siehe Abbildung 17) und innerhalb der von Mullighan et al.¹²⁸ identifizierten MOR der *NR3C1*-Deletionen lag. Da für das Chromosom 5 eine Zentromersonde kommerziell nicht verfügbar ist, wurde für die zusätzliche Referenzmarkierung von Chromosom 5 für die FISH ebenfalls ein BAC-Klon als Sonde verwendet. Hierfür wurde der BAC-Klon RP11-773M18 (genomische Position 568397-760486) ausgewählt, der einen Bereich von 5p13.33 repräsentiert. In dieser Region hatten sich in der array CGH bei den untersuchten Rezidivproben keine CNA gezeigt.



Abbildung 17: Auswahl des für die Interphase FISH verwendeten BAC-Klons auf Chromosom 5q31.3. Dargestellt ist die das *NR3C1*-Gen enthaltende Region von Chromosom 5q31.3 (Mb 142,6-143,2). Zusätzlich zum *NR3C1*-Gen werden die zwei BAC-Klone RP11-722H2 und RP11-614D16 sowie die Position der minimalen überlappenden Region (MOR) der Deletion in den fünf Rezidivproben gezeigt. Modifizierter Screenshot aus dem UCSC Genome Browser, HG17.

Die Ergebnisse der FISH-Analyse bestätigten Deletionen des GR-Gens auf Chromosom 5q31.3 in allen fünf untersuchten Rezidivproben. Der Anteil an Zellkernen, in denen

Deletionen nachgewiesen werden konnten, lag zwischen 38 und 74 %. Insgesamt waren heterozygote Deletionen des GR-Gens häufiger, bei drei Rezidiven wurden jedoch in 5 bis 17 % der Zellkerne homozygote Deletionen nachgewiesen (siehe Tabelle 9).

FISH-Analyse der 5 Rezidive mit DNA-Kopienzahlverlust von Chromosom 5q31.3												
Probe	Blastenzahl (%) ¹	Anzahl analysierter Zellkerne	Heterozygote Deletion (%)	Homozygote Deletion (%)	Zellkerne ohne Deletion (%)	Gesamtanteil Zellkerne mit Deletion (%)						
P19	81	252	33.8	5.2	58.9	39						
P26	79	318	56.3	17.3	22.3	73.6						
P41	97	312	42	14.7	39.4	56.7						
P44	93	316	37.7	0	53.5	37.7						
P46	84	309	54.7	0	42.1	54.7						

Tabelle 9: FISH-Analyse der 5 Rezidive mit DNA-Kopienzahlverlust von Chromosom 5q31.3. ¹Prozentuale Anzahl von Blasten im KM vor Anreicherung der mononukleären Zellen durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation.

Abbildung 18 zeigt die Position der als FISH-Sonden verwendeten BAC-Klone auf Chromosom 5 sowie verschiedene Signalkombinationen am Beispiel der untersuchten Patientenproben P26.



Abbildung 18: Interphase FISH-Analyse von Chromosom 5 zur Validierung der auf Chromosom 5q31.3 identifizierten Veränderungen

a: Position der beiden für die FISH als Sonden verwendeten BAC-Klone. BAC-Klon RP11-614D16, Chromosom 5q31.3, wurde mit SpectrumOrange[™] (rotes Signal) fluoreszenzmarkiert. BAC-Klon RP11-773M18, Chromosom 5p15.33, wurde mit FITC (grünes Signal) fluoreszenzmarkiert.

B: Interphase-FISH eines normalen Zellkerns mit jeweils zwei Signalen für die beiden markierten Regionen von Chromosom 5.

C: Heterozygote Deletion von 5q31.3. Eines der beiden roten Signale fehlt.

D: Homozygote Deletion von 5q31.3. Beide roten Signale fehlen.

4.3.9 CNA von Genen der B-Zell-Differenzierung und B-Zell-Reifung

Kopienzahlveränderungen von Genen, die für die normale B-Zell-Differenzierung und B-Zell-Reifung von Bedeutung sind, waren zusammengerechnet in 53 % (27/51) der *ETV6/RUNX1*-positiven ALL-Rezidive nachweisbar. Kopienzahlverluste der Region 7p12.2 zeigten sich in 8 % (4/51). Die minimale überlappende Region der Verluste umfasste 1 Mb (genomische Position Mb 49,87-50,39) und enthielt sechs Gene, darunter das *IKZF1*-Gen. Verluste von 5q33.3 wurden in drei Rezidiven detektiert (6 %). Innerhalb der kleinsten gemeinsamen Region dieser CNA war *EBF1* als einziges Gen enthalten. CNA der Region 9p13.2, die das PAX5-Gen enthalten, wurden bei vier Rezidivproben (8 %) nachgewiesen. Der B-Zell-Differenzierungs-Regulator *SLP*-65
Ergebnisse

(*BLNK*) auf Chromosom 10q24.1, war in fünf Rezidivproben (10 %) deletiert. Keine der untersuchten Leukämiezellproben zeigte CNA von *E2A* (*TCF3*), *RAG1* oder *RAG2*.

4.3.10 Kopienzahlzugewinne in ETV6/RUNX1-positiven ALL-Rezidiven

Wie bereits beschrieben (siehe 4.2.1), waren Kopienzahlzugewinne und insbesondere Zugewinne von submikroskopischer Größe, in den untersuchten Rezidiven eindeutig seltener vorhanden als Verluste. Zu den rekurrent nachgewiesenen Kopienzahlzugewinnen zählten neben Amplifikation von Xq (siehe 4.3.6) und 3p21 (siehe 4.3.4), Zugewinne im Bereich der beiden in die Translokation t(12;21) involvierten Chromosomen 12p und 21q. Wie in der Einleitung beschrieben, gehören Amplifikationen von RUNX1 sowie Duplikationen des derivativen Chromosoms 21 (der(21)t(12;21)) zu den häufigen zusätzlichen Veränderungen bei ETV6/RUNX1positiver ALL.

In den untersuchten Rezidiven waren Zugewinne von 21q unter Beteiligung der Region 21q22, in der das *RUNX1*-Gen liegt, in 33 % (17/51) nachweisbar.

Zugewinne von 12p wurden in 22 % (11/51) der Rezidive identifiziert. Die chromosomalen Zugewinne waren, im Vergleich mit den Deletionen von 12p (siehe Tabelle 5), deutlich größer (7-12 Mb). In allen untersuchten Proben schlossen die Zugewinne das distale Ende (Telomer) von Chromosom 12 ein. In 7 der 11 Rezidive (14 %) lag das proximale Ende der Zugewinne im Bereich 12p13.2 (genomische Position 12,00 Mb) und schloss *ETV6* oder Teile des Gens ein. Zugewinne von 12p waren immer in Kombination mit Zugewinnen des Chromosoms 21q nachweisbar. Eine mögliche Erklärung hierfür ist das Vorliegen einer zusätzlichen Kopie des derivativen Chromosom 21 aus der Translokation t(12;21). Zugewinne von 12p waren mit jüngerem Alter bei Rezidivdiagnose assoziiert (P = 0,037).

4.4 Kombinierter Nachweis rekurrenter CNA

Bei der Auswertung der array CGH-Daten fiel auf, dass einige der rekurrenten CNA wiederholt in Kombination vorlagen. Dies zeigte sich beispielsweise für Verluste von 6q21, die häufig zusammen mit Deletionen von Chromosom 12p13 vorlagen (siehe 4.3.2).

67

Ergebnisse

Aufgrund der Tatsache, dass mit zunehmender Häufigkeit des Nachweises einer Veränderung auch die Wahrscheinlichkeit zunimmt, dass diese mit anderen Veränderungen gemeinsam vorkommt, könnte sich das rekurrent kombinierte Vorliegen von Veränderungen allein durch deren Häufigkeit erklären. So gehörten beispielsweise Verluste von 6q21 und von *CDKN1B* zu den insgesamt am häufigsten nachgewiesenen CNA. Abbildung 19 zeigt in der Übersicht, welche der rekurrent nachweisbaren CNA wie häufig in Kombination vorlagen. Um zu untersuchen, ob die Kombination von CNA allein durch deren Häufigkeit erklärt werden kann oder ob es unabhängig von deren Häufigkeit Veränderungen gibt, die signifikant häufig oder selten gemeinsam auftreten, wurden alle rekurrenten Veränderungen mittels Exaktem Test nach Fisher in Kreuztabellen gegeneinander geprüft. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Kombinierte C	P ³								
CNA 1	n	CNA 2	n	Häufigkeit Kombination					
Kombinierte Kopienzahlzugewinne									
12p gain	11	WCG 10	7	5	0,003				
ETV6 gain	7	WCG 10	7	3	0,045				
12p gain	11	16q22.1 gain	8	4	0,055				
12p gain	11	RUNX1 gain	17	11	0,000				
ETV6 gain	7	<i>RUNX1</i> gain	17	7	0,000				
16q22.1 gain	8	WCG 10	7	3	0,068				
RUNX1 gain	17	WCG 10	7	5	0,034				
Kombinierte K	opienzahlverl	uste							
ETV6 loss	22	9p21.3 loss ¹	11	8	0,048				
9p21.3 loss ¹	11	CDKN1B loss ²	19	7	0,075				
6q21 loss	17	10q loss	7	0	0,080				
Kombinierte K	opienzahlzug	ewinne- und verl	uste						
RUNX1 gain	17	ETV6 loss	22	4	0,039				
12p gain	11	ETV6 loss	22	0	0,007				
RUNX1 gain	17	9p loss	13	1	0,038				
RUNX1 gain	17	9p21.3 loss ¹	11	1	0,075				
12p gain	11	9p21.3 loss ¹	11	0	0,093				

Tabelle 10: CNA die unabhängig von ihrer Häufigkeit besonders häufig oder selten in Kombination vorlagen. Dargestellt sind alle Kombinationen für die die Analyse mittels Exaktem Test nach Fisher einen *P*-Wert <0,1 ergab. ¹MOR 9p21.3 in der die Gene *CDKN2A, CDKN2B* und *MTAP* enthalten sind; ²MOR 12p13.2 in der *CDKN1B* enthalten ist; ³*P*-Wert Exakter Test nach Fisher;

		Ko	Kopienzahlverluste					Kopienzahlzugewinne													
		3p14.2 (<i>FHIT</i>)	3p21.21	3q26.32 (TBL1XR1)	5q31.3 (NR3C1)	6q21	7q34 (<i>TTC26</i>)	9p21 (CDKN2A/B, MTAP)	10q24.1 (BLNK)	12p13.2 (<i>ETV6</i>)	12p13.2 (CDKN1B)	15q15.1	19q13.1	WCL X	8q23.3 (<i>cMYC</i>)	9p13.3	12p	16q22.1	21q22 (RUNX1)	Хq	WCG 10
	3p14.2 (<i>FHIT</i>)	6	2	2	1	1	1	1	0	3	3	1	0	1	0	0	1	0	3	0	2
	3p21.21		7	1	0	4	2	2	0	3	2	3	0	1	1	1	1	1	1	1	2
	3q26.32 (<i>TBL1XR1</i>)			6	0	0	2	2	1	1	2	2	0	2	1	0	1	0	2	0	0
	5q31.3 <i>(NR3C1)</i>				5	0	1	1	1	2	1	0	1	2	0	1	0	1	1	0	0
	6q21					17	1	6	0	10	8	5	2	3	2	1	2	1	3	2	1
	7q34 (<i>TTC26</i>)						7	1	1	4	2	2	2	1	0	2	1	1	2	2	1
	9p21 (<i>CDKN2A/B, MTAP</i>)							11	3	8	7	3	0	3	2	0	0	1	1	2	0
a	10q24.1 (<i>BLNK</i>)								5	2	1	2	0	2	1	0	1	0	2	1	0
lust	12p13.2 (<i>ETV6</i>)									22	17	5	4	4	4	2	0	2	3	2	2
Iver	12p13.2 (<i>CDKN1B</i>)										19	5	3	4	5	2	2	1	5	1	2
Izah	15q15.1											11	3	1	1	0	1	0	4	1	2
pier	19q13.1												6	0	0	1	0	0	2	1	2
х У	WCL X													9	2	0	0	1	2	0	0
	8q23.3 (<i>cMYC</i>)														5	1	0	0	1	0	0
nne	9p13.3															5	0	2	0	2	1
gewi	12p																11	4	11	2	5
juzi	16q22.1																	8	4	2	3
Izah	21q22 (<i>RUNX1</i>)																		17	2	5
pier	Xq																			7	1
Хo	WCG 10																				6

Abbildung 19: Darstellung der rekurrenten CNA und deren kombinierter Nachweis.

In den Zeilen und Spalten sind jeweils die rekurrent nachweisbaren CNA einzeln aufgetragen. In der Diagonale (blau hinterlegt) ergibt sich daraus die Häufigkeit der einzelnen rekurrenten CNA. Die Häufigkeit mit der rekurrente CNA in Kombination nachweisbar waren, lässt sich aus der Zeile und der entsprechenden Spalte ablesen. Kombinationen die mit einer Häufigkeit \geq 2 bis \leq 4 nachweisbar waren sind grün, \geq 5 bis \leq 9 lila und \geq 10 orange hinterlegt.

Die Prüfung zur Häufigkeit eines kombinierten Nachweises von CNA ergab für einige der Kombinationen eine statistische Signifikanz (*P*<0,05). Bei den rekurrent nachgewiesenen Kopienzahlzugewinnen zählten dazu Zugewinne von Chromosom 12p bzw. des *ETV6*-Gens in Kombination mit Zugewinnen des *RUNX1*-Gens. Wie in Abschnitt 4.3.10 bereits beschrieben, waren Zugewinne von 12p in allen Fällen mit Zugewinnen von 21q bzw. *RUNX* kombiniert, was sich möglicherweise durch eine Duplikation des derivativen Chromosoms 21 erklärt.

Weiterhin signifikant häufig kombiniert waren Zugewinne des gesamten Chromosom 10 (WCG 10) mit Zugewinnen des Chromosom 12p bzw. des *ETV6*-Gens (P = 0,003 bzw. 0,045) sowie mit Zugewinnen von *RUNX1* (P = 0,034). Für die Kombination von WCG 10 sowie Zugewinn von 12p mit Zugewinn von Chromosom 16q22.1 ergaben sich grenzwertig signifikante Assoziationen (P = 0,068 bzw. 0,055).

Für das kombinierte Vorliegen von Verlusten war ausschließlich die Kombination von Deletionen von *ETV6* mit Deletionen der Region 9p21.3 (*CDKN2A/B, MTAP*) signifikant häufig (P = 0,048), während die Kombination von Verlusten von *CDKN1B* mit Chromosom 9p21.3 sowie von Chromosom 6q21 mit Chromosom 10q, die in keinem Rezidiv gemeinsam nachgewiesen wurden, nur eine Tendenz für eine statistische Signifikanz zeigten (P = 0,075 bzw. 0,08).

Kopienzahlverluste des *ETV6*-Gens schlossen sich mit Zugewinnen von 12p gegenseitig aus (P = 0,07), obwohl wie in 4.3.10 beschrieben nur bei sieben der elf Rezidive mit Zugewinn von 12p das *ETV6*-Gen bzw. Teile des Gens in die amplifizierten Regionen eingeschlossen war. Die Kombination aus *ETV6*-Verlust und Zugewinn von *RUNX1* war ebenfalls signifikant selten nachweisbar (P = 0,039). Ferner war die Kombination von Verlusten von 9p21.3 (*CDKN2A/B, MTAP*) mit Zugewinnen von 12p in keinem Rezidiv nachweisbar (P = 0,093) und von Verlusten von 9p21.3 (*CDKN2A/B, MTAP*) mit Zugewinnen des *RUNX1*-Gens nur in einem Rezidiv nachweisbar (P = 0,075).

Für die oben genannte häufige Kombination von Verlusten von Chromosom 6q21 mit 12p13.2 (*CDKN1B*) konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

Die *ETV6/RUNX1*-Fusion charakterisiert den gegenwärtig häufigsten genetisch definierten leukämischen Subtyp im Kindesalter. Die Fusion wird als auslösendes Ereignis für diese Leukämieform angesehen, ist jedoch allein nicht in der Lage, die leukämogene Transformation der Zelle zu verursachen. Infolgedessen sind aus gegenwärtiger Sicht zusätzliche genetische Veränderungen für die definitive leukämogene Transformation erforderlich. Mithilfe hochauflösender gesamtgenomischer Untersuchungsansätze konnten für die ALL-Ersterkrankung in den letzten fünf Jahren zahlreiche zusätzliche submikroskopische Veränderungen in *ETV6/RUNX1*-positiven Leukämiezellen identifiziert werden. Zu Beginn dieser Studie lagen keine Daten zu deren Häufigkeit bei *ETV6/RUNX1*-positiven ALL-Rezidiven vor.

Zusätzliche Kopienzahlveränderungen tragen möglicherweise nicht nur zur leukämogenen Transformation präleukämischer Klone bei, sondern beeinflussen darüber hinaus auch das Ansprechen auf die Therapie, den Krankheitsverlauf und den Ausgang der Erkrankung bei der ETV6/RUNX1-positiven ALL. Bisher existieren keine möglichen umfassenden Daten bezüglich einer prognostischen Relevanz nachgewiesener Veränderungen.

In der hier vorliegenden Arbeit sollte die Häufigkeit zusätzlicher Kopienzahlveränderungen in 51 *ETV6/RUNX1*-positiven Erstrezidiven einer ALL mittels hochauflösender gesamtgenomischer array CGH ermittelt werden und identifizierte CNA anschließend durch Korrelation mit allen bekannten klinischen Daten der Patienten systematisch hinsichtlich einer prognostischen Relevanz analysiert werden.

5.1 Häufigkeit von CNA in ETV6/RUNX1-positiven ALL-Rezidiven

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden mit Daten bereits publizierter Studien verglichen, die ebenfalls gesamtgenomisch hochauflösend die Häufigkeit von DNA-Kopienzahlveränderungen bei *ETV6/RUNX1*-positiver ALL untersucht hatten. Für einen Vergleich zur Verfügung standen vier Studien, in denen CNA in *ETV6/RUNX1*-positiven ALL-Ersterkrankungen untersucht worden waren¹²⁶⁻¹²⁹ sowie eine Studie, die CNA bei *ETV6/RUNX1*-positiver ALL sowohl zum Zeitpunkt der Ersterkrankung als auch beim Rezidiv paarweise analysiert hatte¹³¹. Zwei weitere Studien, die die Häufigkeit von CNA

bei ALL-Ersterkrankungen untersucht hatten^{124,125} sowie drei Arbeiten, die CNA bei Ersterkrankung und Rezidiv untersucht hatten¹³²⁻¹³⁴, waren für einen Vergleich von Häufigkeiten ungeeignet, da *ETV6/RUNX1*-positive ALL zwar untersucht, jedoch nicht als einzelne Subgruppe, sondern unabhängig vom genetischen Subtyp in der Gesamtgruppe der BCP-ALL dargestellt worden waren. Tabelle 11 gibt einen Überblick über die Studien, die für einen Vergleich zur Verfügung standen.

Studie	Zeitpun	kt	Methode	Auflösung	Probenzahl
Tsuzuki et al. , Cancer Science 2007 ¹²⁹	initial		array CGH	Ca. 1,3 Mb	24
Mullighan et al. , Nature 2007 ¹²⁸	initial		SNP-Array	250k+50k	47
Lilljebjörn et al. , Leukemia 2007 ¹²⁶	initial		array CGH	Ca. 300 Kb	17
Lilljebjörn et al. *, Human Molecular Genetics 2010 ¹²⁷	initial		SNP-Array	500k	24*
Kuster et al., Blood 2011 ¹³¹	initial Rezidiv	und	SNP-Array	500k	14 Paare
Vorliegende Arbeit	Rezidiv		array CGH	Ca. 150 Kb	51

Tabelle 11: Publizierte Studien, in denen hochauflösend gesamtgenomisch *ETV6/RUNX1*-positive ALL-Ersterkrankungen bzw. ALL-Rezidive untersucht wurden, die für einen Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zur Verfügung standen.

¹²⁷*Diese Studie untersuchte 24 *ETV6/RUNX1*-positive ALL-Ersterkrankungen, von denen 17 bereits zuvor mittels array CGH mit niedrigerer Auflösung analysiert worden waren¹²⁶. Darüber hinaus wurde der Datensatz durch die 47 *ETV6/RUNX1*-positiven Proben von Mullighan et al.¹²⁸ und durch 93 *ETV6/RUNX1*-positive Proben, die zuvor von Kawamata et al.¹²⁴ publiziert worden waren, erweitert. Um Überlappungen zu vermeiden wurden bei dieser Literaturquelle für den Vergleich nur die Häufigkeiten in den 24 von Lilljebjörn et al.¹²⁷ analysierten Proben berücksichtigt.

In allen 51 untersuchten Rezidivproben konnten CNA identifiziert werden. Die durchschnittliche Anzahl von CNA pro untersuchte Rezidivprobe lag bei sieben Veränderungen. Dabei zeigte sich, dass chromosomale Verluste wesentlich häufiger als chromosomale Zugewinne waren (2,5:1). Grundsätzlich stimmen die in der vorliegenden Studie nachgewiesenen Häufigkeiten mit den in der Literatur beschriebenen überein, die ebenfalls Kopienzahlverluste sehr viel häufiger als Zugewinne identifizierten. Für den Vergleich der absoluten Häufigkeiten ist zu berücksichtigen, dass für die einzelnen Studien Plattformen mit unterschiedlich hoher Auflösung angewendet wurden (siehe Tabelle 11) und ein entsprechender Vergleich nur eingeschränkt möglich ist. Weiterhin könnten die unterschiedliche Größe der untersuchten Patientenkollektive sowie die Auswahl der Patienten einen Einfluss haben.

Ein Vergleich, der in den oben genannten Studien beschriebenen Häufigkeiten mit den in der hier vorliegenden Arbeit identifizierten Häufigkeiten für die rekurrenten CNA, ist in Tabelle 12 dargestellt.

Ein wesentliches Ergebnis der hochauflösenden Studien zum Nachweis zusätzlicher Veränderungen ist, dass die ETV6/RUNX1-Fusion im Vergleich mit anderen genetisch definierten Subgruppen der ALL im Kindesalter durch eine besonders hohe Prävalenz zusätzlicher CNA charakterisiert wird. So beobachteten Mullighan et al. In ihrem Kollektiv im Mittel sechs zusätzliche Deletionen in ETV6/RUNX1-positiven ALL im Gegensatz zu beispielsweise nur einer zusätzlichen Deletion in MLL-positiven ALL-Ersterkrankungen pro untersuchter Probe¹²⁸. Für diese im Säuglingsalter häufigste mit einer sehr ungünstigen Prognose assoziierte Leukämieform wird im Gegensatz zur ETV6/RUNX1-Fusion angenommen, dass das onkogene Potential der MLL-Fusion für die leukämogene Transformation der Zelle suffizient sein könnte. Dafür sprechen das typischerweise junge Erkrankungsalter und die damit verbundene kurze Latenz zwischen der bereits intrauterin nachweisbaren Genfusion und der Leukämieentstehung¹⁵³⁻¹⁵⁵, die hohe Konkordanzrate in monozygoten Zwillingen¹⁵⁴⁻¹⁵⁶, die Tatsache, dass im Mausmodell MLL-rearrangement positive Mäuse mit einer hohen Wahrscheinlichkeit eine Leukämie entwickelten¹⁵⁷ und letztlich auch der Nachweis nur weniger oder sogar das Fehlen zusätzlicher CNA in dieser Subgruppe^{128,158}.

5.2 Rekurrente CNA in *ETV6/RUNX1*-positiven ALL-Rezidiven

Einige der in der vorliegenden Studie als rekurrent identifizierten Veränderungen waren fokale Deletionen, deren minimale überlappende Regionen nur ein einziges Gen enthielten. Dazu gehörten *FHIT* auf Chromosom 3p14.2, *TBL1XR1* auf 3q26.3, *NR3C1* auf 5q31.3, *TTC26* auf 7q34 und *ETV6* auf Chromosom 12p13.2.

Am häufigsten nachgewiesen wurden CNA der Region 12p13 (49 %). Als einziges Gen enthielt die MOR den Transkriptionsfaktor *ETV6*. Deletionen von *ETV6* gehören zu den rekurrenten Veränderungen, die häufig mit der *ETV6/RUNX1*-Fusion assoziiert sind (siehe auch 1.6). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit werden *ETV6*-Deletionen mit einer Häufigkeit von 42-70 % für die Ersterkrankung^{127,128,131} und 52-57 % für das Rezidiv^{118,131} beschrieben.

Weitere potentielle Kandidatengene der Region 12p13 waren BCL2L14 (BCL2-like 14 isoform 1), das für ein pro-apoptotisches Mitglied der BCL-2 Familie kodiert¹⁵⁹ und CDKN1B, das für einen zyklinabhängigen Kinaseinhibitor kodiert und als negativer Regulator der Zellzyklusprogression von der G1 zur S-Phase funktioniert¹⁶⁰. Chromosomale Verluste, die CDKN1B einschlossen, waren in 37 % der Rezidive nachweisbar. Die Korrelation mit den klinischen Daten der Patienten ergab, dass das Rezidiv Patienten mit dieser Aberration in die bei Bezug auf Ersterkrankungsbehandlung zu einem signifikant früheren Zeitpunkt auftrat (P = 0,009) und das pEFS signifikant niedriger war (P = 0,001) (siehe Abbildung 11) sowie eine Assoziation mit einem c-ALL-Immunphänotyp bestand (P = 0,018). Die multivariate Analyse der Assoziation von pEFS und CDKN1B-Verlust unter Einbeziehung der Einflussfaktoren Zeitpunkt des Rezidivs sowie Immunphänotyp zeigte allerdings, dass die Assoziation mit dem pEFS der Patienten durch die Assoziation mit dem Zeitpunkt des Rezidivs beeinflusst wird (siehe Tabelle 7) und die CDKN1B-Deletionen keinen unabhängigen prognostischen Faktor darstellen. Heterozygote Deletionen von CDKN1B gehören zu den bekannten häufig nachweisbaren Veränderungen bei der ALL-Ersterkrankung und werden in 36 % (5/14) ETV6/RUNX1-positiver Ersterkrankungen und Rezidive beobachtet¹³¹. Obwohl eine Assoziation mit einer ungünstigen Prognose für die ALL bisher nicht beschrieben wurde, ist die Korrelation einer erniedrigten Expression von CDKN1B mit einer schlechten Prognose in soliden Tumoren nachgewiesen worden^{161,162}.

Numerische sowie strukturelle Aberrationen der Region 6q gehören zu den rekurrenten Veränderungen bei der ALL im Kindesalter¹⁶³. Bei der *ETV6/RUNX1*-positiven ALL-Ersterkrankung gehören Deletionen der Region 6q21 zu den häufigen zusätzlichen Aberrationen und werden mit einer Häufigkeit von 7 bis 18 % beschrieben^{126,128,129,131}. Beim Rezidiv wurden sie in 7 % (1/14) der untersuchten Proben identifiziert¹³¹. In der vorliegenden Arbeit waren Verluste von 6q21 mit 33 % deutlich häufiger.

In Übereinstimmung mit bisher publizierten Daten zu Deletionen von 6q21 und klinischen Parametern bei der ALL-Ersterkrankung^{163,164}, zeigte sich in der statistischen Auswertung keine prognostische Relevanz für die Rezidivkohorte. Auffällig war allerdings das gehäufte gemeinsame Vorkommen von Kopienzahlverlusten der Regionen 12p13 unter Beteiligung des *CDKN1B*-Gens und 6q21 (16 %; 8/51) in den hier untersuchten Rezidiven. Weil der Anteil von Folgerezidiven in dieser Gruppe

überproportional hoch war im Vergleich mit den Patienten ohne Nachweis dieser Aberrationen (63 % versus 24 %), erfolgte eine Analyse der klinischen Daten, die eine grenzgradige Signifikanz für ein schlechteres Outcome (P = 0.047) und ein niedrigeres pEFS ergab (P = 0.045) (siehe auch Abbildung 12). Aufgrund der Tatsache, dass die identifizierten MOR vergleichsweise groß sind (3,2 Mb für 6g21 und 1,26 Mb für 12p13/CDKN1B) und entsprechend mehrere Gene enthalten, ist eine Interpretation der beobachteten Assoziation mit einer Tendenz zu einer ungünstigen Prognose schwierig. Die Analyse der auf Chromosom 6q21 involvierten Gene identifizierte FOXO3A als ein putatives Kandidatengen. FOXO3A ist ein Transkriptionsfaktor, der in verschiedene zelluläre Prozesse involviert ist wie Proliferation und Apoptose und für die Induktion der CDKN1B-Gentranskription von Bedeutung ist^{150,165}. Eine mögliche Co-Inaktivierung von CDKN1B und FOXO3A infolge Deletion könnte einen ungünstigen prognostischen Einfluss ausüben. Die statistische Prüfung der Häufigkeit des kombinierten Nachweises von CNA (siehe 4.4) ergab für Deletionen von Chromosom 6q21 mit Deletionen von 12p13.2 (CDKN1B) keine statistische Signifikanz, sodass angenommen werden muss, dass der häufigen Kombination dieser Veränderungen in dem untersuchten Kollektiv eher keine funktionelle Ursache zugrunde liegt. Ebenso könnte sich die Assoziation mit einer Tendenz zu einem schlechteren Outcome bzw. niedrigeren pEFS für diese Kombination von CNA allein durch die signifikante Assoziation von CDKN1B-Deletionen mit einem niedrigeren pEFS erklären (s. o.).

Deletionen von 9p21.3 wurden in 22 % der untersuchten Rezidive beobachtet und enthielten die Gene *CDKN2A, MTAP* und *CDKN2B*. Die in der Literatur beschriebene Häufigkeit für 9p21.3 Deletionen wird für *ETV6/RUNX1*-positive ALL-Ersterkrankungen mit 12 bis 29 % angegeben¹²⁷⁻¹²⁹, für das Rezidiv der Erkrankung mit 33 %¹³¹. In unserem Rezidivkollektiv zeigte sich eine Assoziation mit signifikant höheren Leukozyten- und Blutblastenzahlen sowie mit höherem Alter zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose.

75

Rekurrente CNA in <i>ETV6/RUNX1</i> -positiver ALL im Kindesalter – vergleich der Haufigkeiten									
	Referenz	Tsuzuki et al. ¹²⁹	Mullighan et al. ¹²⁸	Lilljebjörn et al. ¹²⁶	Lilljebjörn et al. ¹²⁷	Kuster et al. ¹³¹	Kuster et al. ¹³¹	Vorliegende Arbeit	
		_	_	_	_	_	div	div	
	Untersuchungszeitpunkt	nitia	nitia	nitia	nitia	nitia	Rezi	Rezi	
	Probenzahl	n=24	n=47	n=17	n=24	n=14	n=14	n=51	
Region	Gene	Rekurr	ente CN	A (%)					
Verluste									
3p14.2	FHIT	~	9	8	21	∞	∞	12	
3p21.21	SMARCC1	21	∞	∞	∞	∞	~	14	
3q13.2	CD200, BTLA	∞	15	∞	21	36	29	0	
3q26.32	TBL1XR1	∞	13	∞	21	29	21	12	
4q31.23	NR3C2	17	11	∞	8	0	14	4 (8)	
5q31.3	NR3C1	∞	13	∞	13	0	21	10	
5q33.3	EBF1	∞	11	∞	4	0	14	6	
6q21	ARMC2, SESN1,	17	15	18	25	7	7	33	
7p12.2	IKZF1	∞	0	∞	0	0	7	8	
7q34	TTC26	∞	∞	∞	∞	∞	∞	14	
9p13.2	PAX5	25	28	∞	25	21	21	8	
9p21.3	variabel	29	26	12	17	∞	∞	22	
9p21.3	MTAP	∞	∞	∞	∞	14	21	22	
9p21.3	CDKN2A	∞	25	12	17	21	29	22	
9p21.3	CDKN2B	∞	∞	∞	17	21	21	18	
10q24.1	BLNK	∞	2	∞	0	∞	∞	10	
12p13.2	ETV6	87	70	18	42	57	57	43	
12p13.2	BCL2L14	∞	∞	18	∞	36	36	45	
12p13.2	CDKN1B	∞	∞	18	∞	36	36	37	
12q21.33	BTG1	25	13	∞	4	21	0	0	
15q15.1	BMF	∞	0	∞	8	14	14	16	
19q13.11	GPI, PDCD2L	13	∞	∞	0	∞	∞	12	
21q22.12	RUNX1	25	6	∞	4	14	14	1	
22q11.22	VPREB1	∞	68	∞	∞	57	71	0	
Zugewinne									
12p13.2	ETV6	∞	∞	35	∞	∞	∞	16	
16q22.1	HSF4, E24F, CTCF	∞	∞	∞	∞	∞	∞	10	
21q22	RUNX1	25	4	35	25	36	29	33	
Xq27.3-28	SPANX1, HMGB3	~	∞	35	25	∞	∞	14	
WCG 10		17	6	∞	∞	∞	∞	12	
WCG 16		~	œ	12	13	~	∞	6	

Rekurrente CNA in ETV6/RUNX1-positiver ALL im Kindesalter – Vergleich der Häufigkeiten

Tabelle 12: Häufigkeiten rekurrenter CNA bei der *ETV6/RUNX1*-positiven ALL bzw. ALL-Rezidiv im Kindesalter. Vergleich der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Häufigkeiten mit den Häufigkeiten publizierter Studien.

.∞, keine Angabe zu Häufigkeit in den Publikationen und nicht als rekurrent nachweisbar beschrieben.

In Übereinstimmung mit vorherigen Studien, die diesen Zusammenhang bei BCP-ALL im Kindesalter untersuchten^{166,167},wurden in der hier vorliegenden Arbeit keine Korrelation von 9p21.3-Deletionen und dem Outcome der Patienten beobachtet.

5.3 Beteiligung von Genen der B-Zell-Differenzierung und B-Zell-Reifung

Ein wesentliches Ergebnis, über das in kürzlich publizierten Studien zum Nachweis zusätzlicher Veränderungen in BCP-ALL-Ersterkrankungenund Rezidiven übereinstimmend berichtet wurde, ist die überproportional häufige Involvierung von Genen, die für die B-Zell-Differenzierung und B-Zell-Reifung von Bedeutung sind^{125,128,132-134}. Die Differenzierung und Reifung von B-Lymphozyten unterliegt einem Netzwerk komplexer Regulationsmechanismen, für die die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren eine zentrale Rolle spielt^{168,169}. Durch die oben genannten hochauflösenden Studien konnte gezeigt werden, dass bei der ALL Kopienzahlverluste in Genen, die für B-Zell-Transkriptionsfaktoren kodieren, häufig nachweisbar sind. Dazu zählen PAX5 (paired box domain 5), das in verschiedenen Stadien der B-Zell-Entwicklung von Bedeutung ist¹⁷⁰, EBF1 (early B-cell factor) und E2A (TCF3, transcription factor 3), die für die B-Zellreihen-Spezifizierung erforderlich sind¹⁷¹ sowie IKZF1 (Ikaros), das ebenfalls an der Regulation der B-Zellreihen-Differenzierung- und Spezifizierung beteiligt ist¹⁷². Weiterhin waren Gene mit anderen wichtigen Funktionen für die B-Zell-Entwicklung, wie die Tyrosinkinase FYN sowie RAG1 und RAG2 (recombination activating enzyme 1 und 2), die für die Initiierung der V(D)J-Rekombination bei der B-Zell-Entwicklung von Bedeutung sind¹⁷³, rekurrent von CNA betroffen.

Veränderungen des PAX5 - Gens (Chromosom 9p13.2) sind bei der BCP-ALL als besonders häufig (30 %)¹²⁸ beschrieben und umfassen neben partiellen und kompletten Punktmutationen Deletionen auch sowie die Involvierung des Gens in Translokationen^{128,174}. Bei der ETV6/RUNX1-positiven ALL-Ersterkrankungen konnten PAX5-Deletionen in bis zu 27 % (13/47, 27 %¹²⁸, Supplementärdaten und 6/24, 25 %¹²⁷) der Proben identifiziert werden, beim Rezidiv der Erkrankung in 21 % (3/14)¹³¹. In dem hier untersuchten ETV6/RUNX1-positiven Rezidivkollektiv waren Deletionen von PAX5 deutlich seltener (4/51, 8 %) nachweisbar (siehe auch Tabelle 12).

Diese Diskrepanz könnte einerseits durch die niedrigere Auflösung der array CGH-Plattform, die für die vorliegende Arbeit verwendet wurde, erklärt werden. Die Ausdehnung der hier identifizierten 9p13.2-Deletionen unter Beteiligung des PAX5-Gens, waren in drei der vier betroffenen Rezidive vergleichsweise klein und wurden im array CGH-Profil nur durch zwei bzw. drei überlappende aberrante BAC-Klone repräsentiert. Entsprechend der angewendeten Auswertungskriterien für die array CGH (siehe 3.3.4) waren diese PAX5-Deletionen nahe der Auflösungsgrenze der Plattform. Eine andere Einflussmöglichkeit könnte jedoch auch die unterschiedliche Größe und Selektion der untersuchten Patientenkollektive darstellen. So detektierten Tsuzuki et al.¹²⁹ PAX5-Deletionen in 25 % (6/24) der analysierten ETV6/RUNX1-positiven ALL-Ersterkrankungen. Ihre Untersuchungen erfolgten auf einer array CGH-Plattform mit einer Auflösung von 1,3 Mb, die somit deutlich niedriger war als die in der hier vorliegenden Studie verwendete. Zwei kürzlich publizierte Arbeiten verglichen die Häufigkeit von CNA in gepaarten Ersterkrankungs- und Rezidivproben der BCP-ALL allgemein¹³³ bzw. der ETV6/RUNX1-positiven ALL¹³¹. PAX5-Deletionen wurden in konstanter Anzahl in beiden Erkrankungsstadien (in 35 %¹³³ bzw. in 21 %¹³¹ der Proben) identifiziert.

In ihrer vergleichenden Analyse von Ersterkrankung und Rezidiv berichten Kuster et al.¹³¹ von im Rezidiv neu erworbenen Kopienzahlverlusten der Gene *EBF1* (2/14) und *IKZF1* (1/14). In dem hier untersuchten größeren Rezidivkollektiv zeigten sich Deletionen dieser Gene in 6 % (3/51) bzw. 8 % (4/51) und waren damit vergleichbar häufig. Im Gegensatz dazu wurden Deletionen von *IKZF1* bei der *ETV6/RUNX1*-positiven ALL-Ersterkrankung bisher nicht nachgewiesen^{127,128}, zeigten sich aber als häufige zusätzliche Veränderungen in *BCR-ABL*-positiven und anderen Hochrisiko-ALL-Subtypen^{175,176}. Vorherige Studien beschreiben *EBF1*-Deletionen bei 4 bzw. 11 % der *ETV6/RUNX1*-positiven ALL-Ersterkrankung^{127,128} sowie eine Häufung bei diesem ALL-Subtyp¹²⁸.

Das *FYN*-Gen (Chromosom 6q21), das für eine Protein-Tyrosinkinase kodiert, war in den hier untersuchten Rezidiven häufig von Kopienzahlverlusten betroffen (31 %). Die Verluste im Bereich von Chromosom 6q umfassten vergleichsweise große Abschnitte, so dass neben *FYN* in allen Rezidiven auch weitere Gene betroffen waren. *FYN* gehört zur Familie der Src-Tyrosinkinasen, die in der frühen B-Zell-Entwicklung eine wichtige Rolle spielen¹⁷⁷.

BLNK (*B-cell-linker*, Chromosom 10q24.1) war in 10 % der Rezidive deletiert. *BLNK* kodiert ein Adapterprotein, das eine zentrale Funktion im B-Zellantigenrezeptor-Signalweg einnimmt. Die Bedeutung von *BLNK* für die normale B-Zellentwicklung konnte im Mausmodell gezeigt werden, in dem *BLNK*-defiziente^(-/-) Mäuse einen B-Zell-Differenzierungsblock sowie eine gesteigerte prä-B-Zell-Proliferation aufwiesen und in einigen Fällen eine prä-B-Zell-Leukämie entwickelten. Die Wiederherstellung der *BLNK*-Expression in den Mäusen führte zu einer Hemmung des Tumorwachstums, was für eine Funktion von *BLNK* als Tumorsuppressor spricht¹⁷⁸. Deletionen diese Gens scheinen bei der ALL-Ersterkrankung sehr selten zu sein. So identifizierten Mullighan et al.¹²⁸ Deletionen von *BLNK* in 1 % (2/192) der BCP-ALL und in 2 % (1/47) der *ETV6/RUNX1*-positiven ALL, Lilljebjörn et al.¹²⁷ detektierten keine Deletionen des Gens. Bisher existieren keine Daten zur Häufigkeit beim ALL-Rezidiv.

Obwohl die genannten Gene mit Einfluss auf B-Zell-Differenzierung und B-Zell-Entwicklung nicht zu den am häufigsten veränderten Genen in den hier untersuchten *ETV6/RUNX1*-positiven ALL-Rezidiven gehörten, so zeigten doch 53 % (27/51) der untersuchten Proben Kopienzahlverluste in mindestens einem der erwähnten und in anderen Studien häufig deletierten Gene.

5.4 Geschlechtsspezifische Veränderungen des X-Chromosoms

Kopienzahlveränderungen des X-Chromosoms zeigten eine geschlechtsspezifische Verteilung bei den hier untersuchten *ETV6/RUNX1*-positiven ALL-Rezidiven.

WCL X war die am häufigsten identifizierte Aneuploidie (18 % bezogen auf die gesamte Kohorte), ausschließlich bei weiblichen Patienten nachweisbar (9/20 Mädchen, 45 %) und mit höherem Alter bei Diagnose von Ersterkrankung und Rezidiv assoziiert. Vorherige zytogenetische Studien beschreiben eine niedrigere Häufigkeit dieser Veränderung bei der ALL-Ersterkrankung (3-8 %), beobachteten jedoch ebenfalls eine Assoziation mit weiblichem Geschlecht sowie dem Nachweis von *ETV6/RUNX1*^{105,179}.

Zugewinne von Xq wurden in 14 % der untersuchten Rezidive identifiziert und waren ausschließlich bei männlichen Patienten nachweisbar (13/31 Jungen, 42 %). Zugewinne von Xq wurden in einer kürzlich publizierten Studie als insgesamt häufigste zusätzliche Veränderung von *ETV6/RUNX1*-positiven ALL-Ersterkrankungen beschrieben und spezifisch bei Jungen nachgewiesen (6/17, 35 %)¹²⁶. In einer zweiten Studie derselben

Arbeitsgruppe, in der das Patientenkollektiv erweitert wurde, korrigierte sich zwar der Anteil von Xq-Verlusten auf 25 %¹²⁷, siehe auch Tabelle 12, blieb jedoch weiterhin eine der am häufigsten detektierten Veränderungen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit schlossen die Zugewinne das Telomer von Xq ein, während die zentromerwärts gelegenen Bruchpunkte variable Regionen von Xq betrafen. Kawamata et al.¹²⁴ beschreiben Zugewinne von Xq als rekurrente Veränderungen in den von ihnen untersuchten ALL-Ersterkrankungen. Die Analyse ihrer Supplementärdaten zeigt, dass 2 % (8/399) ihrer Proben Zugewinne von Xq aufweisen. Über deren Häufigkeit innerhalb der Subgruppe der *ETV6/RUNX1*-positiven ALL existieren keine Angaben. In vorherigen, vornehmlich konventionellen zytogenetischen Studien zu zusätzlichen chromosomalen Veränderungen bei der ALL, waren Duplikationen von Xq nur in Einzelfällen beschrieben worden^{117,180-182} und insbesondere bei der *ETV6/RUNX1*positiven ALL nicht rekurrent nachweisbar¹⁰⁵.

Lilliebjörn et al.¹²⁶ konnten durch Metaphase-FISH-Analysen an drei der sechs Xq-Zugewinne zeigen, dass diesen unbalanzierte Translokationen zugrunde lagen. Involviert in die Translokationen waren die Chromosomen 6 (zweimal) und 11. Die von Arbeitsgruppe durchgeführte Korrelation der array CGH-Ergebnisse der mit Genexpressionsdaten zeigte, dass mehrere der im minimalen überlappenden Bereich der Xq-Amplifikationen lokalisierten Gene bei den untersuchten Patientenproben eine Überexpression zeigten, darunter SPANXB (Xq27.1, Funktion bisher nicht bekannt, in HMGB3 normalerweise nur Spermatozoen exprimiert) und (Xq28, Transkriptionsfaktor). Als ein mögliches Kandidatengen wurde SPANXB identifiziert, da dieses Gen auch in externen Genexpressions-Datensets eine für ETV6/RUNX1-positive ALL-spezifische Überexpression zeigte und daher eine mögliche Bedeutung für die Leukämogenese angenommen wurde. Ein weiteres Kandidatengen innerhalb der Xg-Zugewinne ist HMGB3, das kürzlich als Fusionspartner von NUP98 durch eine Translokation t(X;11) (q28;p15) bei einer therapieassoziierten AML M4 nachgewiesen werden konnte¹⁸³. Im Mausmodell zeigte sich, dass Mäuse, denen HMGB3/NUP98transduzierte Zellen transplantiert worden waren, infolge Anämie, Thrombopenie und Hyperleukozytose verstarben¹⁸⁴. *HMGB3* war eines der Gene innerhalb der MOR der in dieser Arbeit identifizierten Xq-Zugewinne, SPANXB war in 6/7 der betroffenen Proben amplifiziert.

Bezüglich der Geschlechtsspezifität der Xq-Zugewinne folgern Lilljebjörn et al., dass die Auswirkungen, die Amplifikationen von Xq bei Jungen möglicherweise auf die Leukämogenese haben, bei Mädchen nicht durch Amplifikation, sondern durch die Reaktivierung einzelner Gene auf dem inaktiven X-Chromosom zustande kommen könnten. Dies könnte die Überexpression der oben genannten Gene erklären, die in *ETV6/RUNX1*-positiver ALL sowohl bei Jungen als auch bei Mädchen vorlag¹²⁶.

Umgekehrt könnte die Existenz von zwei X-Chromosomen in normalen weiblichen Zellen, von denen eines inaktiviert ist^{185,186}, zu der Annahme führen, dass numerische Aberrationen des X-Chromosoms in den Leukämiezellen von Mädchen pathogenetisch weniger relevant sein könnten. So haben Aneuploidien der Geschlechtschromosomen beim Menschen wesentlich mildere Auswirkungen als Aneuploidien von Autosomen. Während autosomale Monosomien bereits im frühen Embryonalstadium letal sind, hat die Monosomie X (Turner-Syndrom) bei Mädchen vergleichsweise weniger gravierende Konsequenzen. Dies erklärt sich durch den Mechanismus der X-Inaktivierung, der in menschlichen Zellen die Aufrechterhaltung der normalen Funktion, unabhängig von der Anzahl der X-Chromosomen, kontrolliert¹⁸⁶. Andererseits stellt der Verlust des inaktiven X-Chromosoms, in Kombination mit oder gefolgt von Zugewinnen bzw. Amplifikationen einzelner Gene des aktiven X-Chromosoms oder deren Überexpression, eine rekurrente Veränderung bei bestimmten aggressiven (basal-like)-Mammakarzinomen und beim Ovarialkarzinom dar¹⁸⁷⁻¹⁸⁹.

In den hier untersuchten ALL-Rezidiven ergab sich keine signifikante Assoziation mit der Prognose. Für die Xq-Zugewinne bei Jungen zeigte sich zwar, dass die Dauer der Erstremission länger war (P = 0,032) und alle Patienten in CCR waren, jedoch war die Assoziation mit dem Outcome nur grenzgradig signifikant (P=0,084).

5.5 Deletionen des Glukokortikoidrezeptorgens NR3C1

Kopienzahlverluste von Chromosom 5q31.3, die in 10 % (5/51) der *ETV6/RUNX1*positiven ALL-Rezidive identifiziert wurden, waren mit einem schlechten morphologischen und molekularen Ansprechen auf die Therapie assoziiert (P = 0,009 bzw. 0,004). Das *NR3C1*-Gen, das für den humanen Glukokortikoidrezeptor (GR) kodiert, war das einzige Gen innerhalb der MOR der Deletionen. Die Ergebnisse der array CGH konnten durch BAC-Klon basierte Interphase-FISH auf KM-Ausstrichen in

allen fünf Patienten bestätigt werden. Dabei wurden sowohl heterozygote als auch homozygote Deletionen detektiert (siehe Tabelle 9).

Glukokortikoide (GC) haben aufgrund ihrer Fähigkeit spezifisch in unreifen Lymphoblasten Apoptose zu induzieren, eine Schlüsselfunktion für die Behandlung der ALL und sind ein Hauptbestandteil aller ALL-Behandlungsprotokolle²². Die Wirkung von GC wird über den GR vermittelt, der als ligandenaktivierter nukleärer Rezeptor aus 3 funktionellen Einheiten (N-terminalen Domäne, DNA-bindende Domäne, Ligandenbindende Domäne) besteht (siehe auch Abbildung 16). Durch Bindung von GC an den Rezeptor transloziert dieser aus dem Zytosol zum Zellkern und moduliert dort die Transkriptionsaktivität verschiedener Zielgene¹⁹⁰.

Bei der ALL-Ersterkrankung ist die Wirksamkeit der initialen Prednison-Monotherapie signifikant mit der Prognose assoziiert. Bei etwa 10 % der Patienten werden an Therapietag 8 >1000 Blasten/µl Blut nachgewiesen, was einem schlechten Ansprechen auf Prednison (prednisone poor response, PPR) entspricht und mit einem hohen Rezidivrisiko assoziiert ist. Das pEFS liegt für diese Gruppe bei 46 % nach fünf Jahren im Vergleich zu 76 % für Patienten mit prednisone good response (PGR). PPR-Patienten werden daher im Hochrisikoarm der ALL-BFM Protokolle behandelt^{6,191}. Die ALL-Rezidivtherapie gemäß ALL-REZ BFM beinhaltet ebenfalls eine einwöchige zytoreduktive Vorphase, in der Dexamethason als Monotherapie appliziert wird, zusätzlich ist Dexamethason Bestandteil aller weiteren Therapieblöcke. Prednison gehört zu den intrathekal verabreichten Medikamenten. Die Therapieresponse auf die zytoreduktive Vorphase stellt im ALL-REZ BFM Protokoll iedoch kein Stratifizierungskriterium dar¹².

In vitro Resistenztestungen konnten nachweisen, dass Leukämiezellen von ALL-Rezidiven insgesamt und insbesondere gegenüber GC vielfach resistenter sind als Leukämiezellen der ALL-Ersterkrankung¹⁸. Unklar ist, durch welche Mechanismen und zu welchem Zeitpunkt die Empfindlichkeit von Leukämiezellen gegenüber GC verloren geht. Aufgrund der Bedeutung von GC für die ALL-Behandlung und der beobachteten Resistenzen in vitro sowie klinisch, wurden zahlreiche Studien zur Klärung möglicher Ursachen einer Resistenz gegenüber GC bei ALL und ALL-Rezidiv durchgeführt.

Hillmann et al.¹⁹² konnten in der GC-resistenten Zelllinie CCRF-CEM die somatische Mutation L753F nachweisen, die in einer funktionellen Heterozygotie des GR resultiert.

Es stellte sich heraus, dass diese Mutation in Subklonen ebenfalls in konserviertem Material des Patienten mit T-ALL nachweisbar war, von dem die Zelllinie abstammte. Dies war der erste in-vivo Nachweis einer somatischen GR-Genmutation bei einer ALL. Irving et al.¹⁹³ untersuchten 50 ALL-Rezidive auf Mutationen des GR-Gens und detektierten lediglich in der Leukämiezell-DNA eines Patienten eine homozygote Deletion, die klinisch mit einer GC-Resistenz assoziiert war. Analysen zur Rückverfolgung der Mutation ergaben, dass diese bereits an Tag 28 der Ersterkrankungsbehandlung in einem Subklon vorlag und Jahre später in dem das Rezidiv verursachenden Hauptklon wieder auftrat.

Die von Irving et al.¹⁹³ beobachtete niedrige Häufigkeit von Veränderungen des GR-Gens in ALL-Rezidiven steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit, in der Deletionen des GR-Gens als rekurrente Veränderung in ETV6/RUNX1positiven ALL-Rezidiven identifiziert wurden. Mullighan et al.¹²⁸ detektierten NR3C1-13 % der analysierten ETV6/RUNX1-positiven initialen ALL. Deletionen in Bemerkenswerterweise zeigte sich zudem, dass GR-Gendeletionen in den übrigen genetisch definierten BCP-ALL-Subgruppen weitaus seltener waren. So wurden in 192 BCP-ALL insgesamt neun Deletionen des Gens nachgewiesen, davon sechs in ETV6/RUNX1-positiver ALL (Supplementärdaten)¹²⁸. Eine ähnliche Häufung zeigte sich in einer zweiten Studie dieser Arbeitsgruppe an 61 gepaarten ALL-Proben. Darunter waren fünf ETV6/RUNX1-positive ALL. Von insgesamt 4 identifizierten GR-Gendeletionen waren zwei in ETV6/RUNX1-positiven Proben nachweisbar, bei einer der Proben in beiden Erkrankungsstadien, bei der zweiten zum Rezidiv hinzugewonnen (Supplementärdaten). Eine Korrelation mit der molekularen Response konnte nicht durchgeführt werden, da von zu wenigen Patienten MRD-Daten vorhanden waren (Supplementärdaten)¹³². Eine Studie von 14 gepaarten *ETV6/RUNX1*-positiven Proben von Ersterkrankung und Rezidiv beschreibt Deletionen von NR3C1 als rekurrent und im Gegensatz zu Mullighan et al. Als fast ausschließlich im Rezidivmaterial nachweisbar. In dieser Studie zeigten sich NR3C1 Deletionen bei 5/14 (36 %) Rezidivproben¹³¹.

Hinsichtlich einer möglichen prognostischen Relevanz ergaben die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit eine signifikante Assoziation von GR-Gendeletionen mit einem schlechten molekularen Ansprechen auf die Therapie. Systematische Untersuchungen der MRD-Response von Patienten mit *NR3C1*-Deletion sind bisher leider in keiner weiteren Studie erfolgt. Angedeutet wird eine derartige Assoziation von Kuster et al.¹³¹.

83

Von fünf Patienten mit *NR3C1*-Deletion im Rezidivmaterial waren in dieser Studie MRDoder Response-Daten von der Erstdiagnose von zwei Patienten verfügbar. Diese beiden Patienten wurden beim Rezidiv in der intermediären Risikogruppe behandelt. Einer dieser beiden Patienten erhielt eine SCT, sodass eine schlechte molekulare Therapieresponse anzunehmen ist. Ein weiterer Patient mit *NR3C1*-Deletion, bei dem die MRD-Daten nicht verfügbar waren, erhielt ebenfalls eine SCT, sodass hier ebenfalls ein schlechtes Ansprechen auf die Therapie angenommen werden kann. Zwar erklären die Autoren, dass alle identifizierten *NR3C1*-Deletionen mit einem schlechten Ansprechen auf die Therapie assoziiert gewesen seien, Daten die diese Schlussfolgerung belegen wurden bedauerlicherweise jedoch nicht gezeigt.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Assoziation von klinisch schlechter Response und Deletionen des GR-Gens legen die Vermutung nahe, dass das schlechte Ansprechen auf die Therapie bei den fünf Patienten mit Verlust von 5q31.3 möglicherweise durch die nachgewiesenen Deletionen mitverursacht sein könnte. Da die betroffenen Patienten auf die Rezidivtherapie insgesamt schlecht angesprochenhaben, ist der Phänotyp vermutlich nicht einzig auf die GR-Gendeletionen zurückzuführen. Bereits auf chromosomaler Ebene zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass bei allen fünf Patienten mit GR-Gendeletionen weitere Veränderungen nachweisbar waren (siehe Tabelle 13). Zwar lag die Häufigkeit mit durchschnittlich fünf Veränderungen pro Rezidiv etwas unter dem Durchschnitt für die Gesamtkohorte (7 pro Rezidiv), jedoch waren 1 bis 9 zusätzliche Veränderungen in den fünf Rezidiven vorhanden.

Zusätzliche CNA bei ETV6/RUNX1-positiven Rezidiven mit Nachweis einer NR3C1-Deletion									
Rezidiv- probe #	19	26	41	44	46				
CNA gesamt	3	6	5	2	10				
loss	5q31.3 (<i>NR3C1)</i>	5q31.3 (<i>NR3C1)</i>	5q31.3 (<i>NR3C1)</i>	5q31.3 (<i>NR3C1)</i>	5q31.3 (<i>NR3C1)</i>				
		12p13.2 (<i>ETV6,</i> <i>BCL2L14,</i> <i>CDKN1B</i>), 3p14.2 (<i>FHIT</i>), 3p21, 2p21 WCL X	9p21.3 (<i>CDKN2A/B, MTAP</i>), 10q24.1 (<i>BLNK</i>), 15q21.3, WCLX	9p13.2 (<i>PAX5</i>)	12p13.2 (<i>ETV6, BCL2L14</i>), 2p11.2, 4q31.3, 6q25, 7q34, 8q13.2, 13q31.1, 19q13.11				
gain	9p13.3, 16q22.1				21q RUNX1				

Tabelle 13: Zusätzliche CNA, die bei den 5 Patienten mit Nachweis von GR-Gendeletionen detektiert wurden. Alle 5 Rezidive wiesen zusätzliche Veränderungen der Leukämiezellen auf.

Die durch den Nachweis der *NR3C1*-Deletion definierte Subgruppe repräsentiert in jedem Fall eine Gruppe von Rezidiven, die sich in ihren klinischen Eigenschaften eindeutig von der Mehrheit der *ETV6/RUNX1*-positiven Rezidive unterscheidet. So erreichte keiner der fünf Patienten durch die Induktionstherapie eine molekulare Remission. In Anbetracht des Krankheitsverlaufs zeigt sich für diese Gruppe auch der eindeutige Nutzen einer weiteren Therapieintensivierung durch SZT, der insgesamt für die Subgruppe der *ETV6/RUNX1*-positiven Rezidive kontrovers diskutiert wird.

5.6 Einordnung der Ergebnisse und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die molekulargenetische Charakterisierung ETV6/RUNX1positiver ALL-Rezidive im Kindesalter hinsichtlich der Häufigkeit und prognostischen zusätzlicher Relevanz chromosomaler Veränderungen. Hierfür wurden 51 **ALL-Rezidive** mittels CGH ETV6/RUNX1-positive arrav hochauflösend gesamtgenomisch analysiert. Dabei zeigte sich, dass CNA in dieser Subgruppe häufig sind, in bestimmten Regionen und Genen rekurrent vorliegen und darüber hinaus in einem Teil der Fälle eine prognostische Relevanz besitzen. Bezüglich der Häufigkeit und Rekurrenz bestätigen die hier erhobenen Daten die Ergebnisse vorheriger Studien, die für diese Subgruppe ebenfalls zeigen konnten, dass CNA für ETV6/RUNX1-positive ALL im Vergleich mit anderen genetisch definierten Subgruppen charakteristisch sind

und sich in bestimmten Regionen oder Genen häufen. Diese Ergebnisse beruhen fast ausschließlich auf Untersuchungen von *ETV6/RUNX1*-positiven ALL-Ersterkrankungen. Sehr viel weniger Daten existieren zum Rezidiv der Erkrankung. In Hinblick auf eine Assoziation rekurrenter CNA mit prognostischen Daten existieren zum jetzigen Zeitpunkt keine Studien, die dieser Frage systematisch nachgegangen sind und für einen Vergleich zur Verfügung standen.

Zwar stellt die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Patientenzahl die größte Gruppe von Rezidiven mit Nachweis von *ETV6/RUNX1* dar, die bisher hochauflösend auf das Vorhandensein zusätzlicher Veränderungen hin untersucht wurde, jedoch zeigt sich in der Auswertung der durch spezifische CNA definierten Subgruppen deutlich, dass für eine Validierung der Ergebnisse die Untersuchung einer größeren Patientenzahl erforderlich ist. So war die Anzahl von Rezidiven, in denen einzelne CNA rekurrent nachgewiesen werden konnten, in einigen Fällen zu klein, um eine statistische Korrelation mit klinisch/prognostischen Daten der Patienten durchführen zu können. Dies gilt beispielsweise für Deletionen von *IKZF1*, deren Existenz bisher mit Hochrisiko-Subtypen der BCP-ALL assoziiert wurden und deren Detektion in *ETV6/RUNX1*-positiven ALL unerwartet war. Ob *IKZF1*-Mutationen bei *ETV6/RUNX1*-positiven Merkmalen korrelieren, ist durch zukünftige Studien zu klären.

Ein zentrales Ergebnis der Arbeit besteht in der Identifizierung rekurrenter *NR3C1*-Deletionen und deren Assoziation mit einer schlechten molekularen Therapieresponse. Trotz einer Vielzahl von Studien, die zum Nachweis genetischer Veränderungen des GR-Gens durchgeführt wurden, schien ein Zusammenhang zwischen Veränderungen des Gens und der nachgewiesenen GC-Resistenz von ALL-Zellen in vitro sowie klinisch lange Zeit als unwahrscheinlich. Erst durch hochauflösende gesamtgenomische Untersuchungsansätze konnten *NR3C1*-Deletionen rekurrent nachgewiesen werden. Die Assoziation mit der schlechten molekularen Therapieresponse wurde bisher, abgesehen von der hier vorliegenden Arbeit, nicht systematisch untersucht. Die Ergebnisse einer weiteren Studie weisen in eine ähnliche Richtung.

Für eine weitere Klärung eines möglichen Zusammenhangs sind zusätzliche Untersuchungen erforderlich. Dadurch könnte an einer größeren Patientenzahl der Frage nachgegangen werden, ob GR-Gendeletionen spezifisch in *ETV6/RUNX1*-positiver ALL bzw. ALL-Rezidiven ein häufiges zusätzliches Ereignis darstellen und ob

sich die beobachtete Assoziation mit einem schlechten Ansprechen auf die Therapie bestätigen lässt. Wenn dies der Fall ist, wäre es wichtig herauszufinden, zu welchem Zeitpunkt diese Deletionen auftreten. Diesbezüglich sind die in der Literatur verfügbaren Daten widersprüchlich. Während einige Studien deren Existenz bereits bei der Ersterkrankungsdiagnose beschreiben, identifizierte eine andere Studie an gepaarten Proben NR3C1-Deletionen ausschließlich beim Rezidiv, was für eine durch die Ersterkrankungsbehandlung erworbene Resistenz sprechen könnte. Darüber hinaus ist zu untersuchen, inwieweit sich die Deletionen auf die Expression des Gens auswirken und worin sich die Genexpressionsprofile von Patienten mit Deletion des Gens und schlechtem Ansprechen auf die Behandlung zu denen ohne Nachweis der Deletion unterscheiden. Die funktionelle Auswirkung der GR-Gendeletionen könnte weiterhin durch Resistenztestungen an Leukämiezellen von Patienten, bei denen klinisch eine Therapieresistenz vorliegt und in deren DNA Deletionen des GR-Gens nachgewiesen werden konnten, untersucht werden. Insbesondere auch hinsichtlich der Frage, ob die Zellen spezifisch gegenüber GC eine schlechte Response aufweisen, oder ob dies gegenüber weiteren in der Therapie applizierten Zytostatika der Fall ist.

Zusammenfassung

6 Zusammenfassung

Die chromosomale Translokation t(12;21), aus der das Fusionsgen *ETV6/RUNX1* entsteht, ist die häufigste interchromosomale Veränderung bei der B-Vorläuferzell- (B-cell precursor, BCP-) ALL im Kindesalter und findet sich in den Leukämiezellen von 20-25 % der ALL-Ersterkrankungen und in ca. 20 % der BCP-ALL Rezidive. Die Translokation resultiert in der Fusion der Gene für die Transkriptionsfaktoren *ETV6* und *RUNX1*, deren Bedeutung für die Hämatopoese essenziell ist. Während die *ETV6/RUNX1*-Genfusion ein grundlegendes Ereignis in der Leukämieentstehung darstellt, wird angenommen, dass zusätzliche genetische Veränderungen für die leukämogene Transformation der Zelle erforderlich sind.

Die klinische Heterogenität innerhalb der *ETV6/RUNX1* positiven ALL legt die Vermutung nahe, dass zusätzliche genetische Veränderungen in den Leukämiezellen dieses ALL-Subtyps von prognostischer Relevanz sind und zu Unterschieden im Krankheitsverlauf der Patienten beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Häufigkeit zusätzlicher chromosomaler Veränderungen zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose mittels hochauflösender gesamtgenomischer tiling-path bacterial artificial chromosome (BAC) array CGH ermittelt. Analysiert wurde die Leukämiezell-DNA von 51 *ETV6/RUNX1* positiven ALL-Rezidiven zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose. Die untersuchten Patienten wurden einheitlich gemäß der ALL-REZ BFM Therapieoptimierungsstudien behandelt und stellen eine repräsentative Stichprobe der Studienpopulation dar. Eine statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde durchgeführt, um einen möglichen Zusammenhang zwischen gefundenen numerischen chromosomalen Veränderungen und prognostisch relevanten klinischen Parametern der Patienten zu untersuchen.

Kopienzahlveränderungen (copy number aberrations, CNA) wurden in der Leukämiezell-DNA von allen 51 *ETV6/RUNX1* positiven ALL-Rezidiven nachgewiesen. Durchschnittlich wurden 7 CNA pro Leukämiezellprobe identifiziert. Chromosomale Verluste waren etwa 2,5 mal häufiger als Zugewinne. Eine große Anzahl von CNA wurde in Regionen detektiert, die wiederholt von Veränderungen betroffen waren. Am häufigsten wurden Verluste im Bereich der chromosomalen Banden 12p13, 6q21, 15q15.1, 9p21, 5q und 3p14.2 sowie Zugewinne im Bereich von 21q22 und 12p identifiziert. Die Auswertung der klinischen Daten der Patienten ergab eine signifikante

89

klinische und prognostische Relevanz für einige der rekurrent betroffenen Regionen. Verluste von 12p13.2, bei denen das *CDKN1B*-Gen betroffen war, zeigten eine Assoziation mit einer kürzeren Dauer der Erstremission (P = 0,009) sowie einer geringeren Wahrscheinlichkeit eines ereignisfreien Überlebens (pEFS, P = 0,001). Deletionen von 9p21.3 (*CDKN2A*, *CDKN2B*, *MTAP*) waren mit höheren Leukozytenund peripheren Blastenzahlen (P = 0,0012 bzw. 0,011) und höherem Lebensalter (P = 0,0005) bei Rezidivdiagnose assoziiert.

Kopienzahlveränderungen des X-Chromosoms zeigten eine geschlechtsspezifische Verteilung. Der Kopienzahlverlust des gesamten X-Chromosoms wurde ausschließlich bei Mädchen beobachtet, während ein Zugewinn von Xq nur bei Jungen vorkam. Deletionen des Glukokortikoidrezeptorgens *NR3C1* (5q31.3) waren in 10 % der Rezidive nachweisbar und mit einem schlechten molekularen Ansprechen auf die Therapie verbunden (P = 0,003).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass zusätzliche chromosomale Veränderungen ein häufiges Merkmal *ETV6/RUNX1*-positiver ALL-Rezidive sind. Für einige der identifizierten Kopienzahlveränderungen zeigten sich Zusammenhänge mit klinischen und prognostischen Daten der Patienten. Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass zusätzliche genetische Veränderungen für den Prozess der malignen Transformation bei der *ETV6/RUNX1*-positiven ALL erforderlich sind und darüber hinaus den Behandlungserfolg beeinflussen können.

7 Literaturverzeichnis

- 1. Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J. Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Heidelberg, Germany: Springer Verlag; 2006.
- 2. Deutsches Kinderkrebsregister Jahresbericht 2006/07: Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informatik, Universität Mainz; 2009.
- 3. Foon KA, Gale RP. Immunologic classification of lymphoma and lymphoid leukemia. Blood Rev. 1987;1:77-88.
- 4. Ludwig WD, Harbott J, Bartram CR, et al. Incidence and prognostic significance of immunophenotypic subgroups in childhood acute lymphoblastic leukemia: experience of the BFM study 86. Recent Results Cancer Res. 1993;131:269-282.
- 5. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. Lancet Oncol. 2009;10:147-156.
- 6. Moricke A, Zimmermann M, Reiter A, et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. Leukemia;24:265-284.
- 7. Cave H, van der Werff ten Bosch J, Suciu S, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group. N Engl J Med. 1998;339:591-598.
- 8. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. Lancet. 1998;352:1731-1738.
- 9. Moricke A, Zimmermann M, Reiter A, et al. Prognostic impact of age in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia: data from the trials ALL-BFM 86, 90, and 95. Klin Padiatr. 2005;217:310-320.
- 10. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet. 2008;371:1030-1043.
- 11. Henze G, Von Stackelberg A. Relapsed acute lymphoblastic leukemia. In: Pui CH, ed.; 2006.
- 12. Tallen G, Ratei R, Mann G, et al. Long-Term Outcome in Children With Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia After Time-Point and Site-of-Relapse Stratification and Intensified Short-Course Multidrug Chemotherapy: Results of Trial ALL-REZ BFM 90. J Clin Oncol.
- Gaynon PS, Qu RP, Chappell RJ, et al. Survival after relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: impact of site and time to first relapse--the Children's Cancer Group Experience. Cancer. 1998;82:1387-1395.
- 14. Buhrer C, Hartmann R, Fengler R, et al. Superior prognosis in combined compared to isolated bone marrow relapses in salvage therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia. Med Pediatr Oncol. 1993;21:470-476.
- 15. Henze G, Fengler R, Hartmann R, et al. Chemotherapy for bone marrow relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer Chemother Pharmacol. 1989;24 Suppl 1:S16-19.
- 16. Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. Lancet. 1998;351:550-554.
- 17. Eckert C, Biondi A, Seeger K, et al. Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. Lancet. 2001;358:1239-1241.
- 18. Klumper E, Pieters R, Veerman AJ, et al. In vitro cellular drug resistance in children with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. Blood. 1995;86:3861-3868.
- 19. Chessells JM. Relapsed lymphoblastic leukaemia in children: a continuing challenge. Br J Haematol. 1998;102:423-438.
- 20. Dopfer R, Henze G, Bender-Gotze C, et al. Allogeneic bone marrow transplantation for childhood acute lymphoblastic leukemia in second remission after intensive primary and relapse therapy according to the BFM- and CoALL-protocols: results of the German Cooperative Study. Blood. 1991;78:2780-2784.
- 21. Buhrer C, Hartmann R, Fengler R, et al. Importance of effective central nervous system therapy in isolated bone marrow relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. BFM (Berlin-Frankfurt-Munster) Relapse Study Group. Blood. 1994;83:3468-3472.

- 22. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med. 2004;350:1535-1548.
- 23. Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. Science. 1997;278:1059-1064.
- 24. Rowley JD. The critical role of chromosome translocations in human leukemias. Annu Rev Genet. 1998;32:495-519.
- 25. Morrow M, Horton S, Kioussis D, Brady HJ, Williams O. TEL-AML1 promotes development of specific hematopoietic lineages consistent with preleukemic activity. Blood. 2004;103:3890-3896.
- 26. Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Greaves M. The role of the MLL gene in infant leukemia. Int J Hematol. 2003;78:390-401.
- 27. Van Etten RA. Pathogenesis and treatment of Ph+ leukemia: recent insights from mouse models. Curr Opin Hematol. 2001;8:224-230.
- 28. Ross ME, Zhou X, Song G, et al. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. Blood. 2003;102:2951-2959.
- Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. Cancer Cell. 2002;1:133-143.
- 30. Kirschner-Schwabe R, Lottaz C, Todling J, et al. Expression of late cell cycle genes and an increased proliferative capacity characterize very early relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. Clin Cancer Res. 2006;12:4553-4561.
- 31. Marschalek R. Mechanisms of leukemogenesis by MLL fusion proteins. Br J Haematol;152:141-154.
- 32. Suryanarayan K, Hunger SP, Kohler S, et al. Consistent involvement of the bcr gene by 9;22 breakpoints in pediatric acute leukemias. Blood. 1991;77:324-330.
- 33. Chen CS, Sorensen PH, Domer PH, et al. Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. Blood. 1993;81:2386-2393.
- 34. Hunger SP, Raetz EA, Loh ML, Mullighan CG. Improving outcomes for high-risk ALL: translating new discoveries into clinical care. Pediatr Blood Cancer;56:984-993.
- 35. Beyermann B, Agthe AG, Adams HP, et al. Clinical features and outcome of children with first marrow relapse of acute lymphoblastic leukemia expressing BCR-ABL fusion transcripts. BFM Relapse Study Group. Blood. 1996;87:1532-1538.
- 36. Rubnitz JE, Wichlan D, Devidas M, et al. Prospective analysis of TEL gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. J Clin Oncol. 2008;26:2186-2191.
- 37. Loh ML, Goldwasser MA, Silverman LB, et al. Prospective analysis of TEL/AML1-positive patients treated on Dana-Farber Cancer Institute Consortium Protocol 95-01. Blood. 2006;107:4508-4513.
- 38. Harbott J, Viehmann S, Borkhardt A, Henze G, Lampert F. Incidence of TEL/AML1 fusion gene analyzed consecutively in children with acute lymphoblastic leukemia in relapse. Blood. 1997;90:4933-4937.
- 39. Seeger K, Adams HP, Buchwald D, et al. TEL-AML1 fusion transcript in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. The Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. Blood. 1998;91:1716-1722.
- 40. Seeger K, Buchwald D, Peter A, et al. TEL-AML1 fusion in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 1999;94:374-376.
- 41. Seeger K, Buchwald D, Taube T, et al. TEL-AML1 positivity in relapsed B cell precursor acute lymphoblastic leukemia in childhood. Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. Leukemia. 1999;13:1469-1470.
- 42. Shurtleff SA, Buijs A, Behm FG, et al. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. Leukemia. 1995;9:1985-1989.
- 43. Paulsson K, Johansson B. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. Genes Chromosomes Cancer. 2009;48:637-660.
- 44. Borkhardt A, Cazzaniga G, Viehmann S, et al. Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter

therapy trials. Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica and the Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. Blood. 1997;90:571-577.

- 45. Armstrong SA, Look AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol. 2005;23:6306-6315.
- 46. Wang Q, Stacy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA. Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93:3444-3449.
- 47. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. Cell. 1996;84:321-330.
- 48. Okada H, Watanabe T, Niki M, et al. AML1(-/-) embryos do not express certain hematopoiesisrelated gene transcripts including those of the PU.1 gene. Oncogene. 1998;17:2287-2293.
- 49. Baens M, Peeters P, Guo C, Aerssens J, Marynen P. Genomic organization of TEL: the human ETS-variant gene 6. Genome Res. 1996;6:404-413.
- 50. Wasylyk B, Hahn SL, Giovane A. The Ets family of transcription factors. Eur J Biochem. 1993;211:7-18.
- 51. Sharrocks AD, Brown AL, Ling Y, Yates PR. The ETS-domain transcription factor family. Int J Biochem Cell Biol. 1997;29:1371-1387.
- 52. Poirel H, Oury C, Carron C, et al. The TEL gene products: nuclear phosphoproteins with DNA binding properties. Oncogene. 1997;14:349-357.
- 53. Graves BJ, Petersen JM. Specificity within the ets family of transcription factors. Adv Cancer Res. 1998;75:1-55.
- 54. Rubnitz JE, Pui CH, Downing JR. The role of TEL fusion genes in pediatric leukemias. Leukemia. 1999;13:6-13.
- 55. Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. Cell. 1994;77:307-316.
- 56. McLean TW, Ringold S, Neuberg D, et al. TEL/AML-1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 1996;88:4252-4258.
- 57. Golub TR, Goga A, Barker GF, et al. Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the Ets protein TEL in human leukemia. Mol Cell Biol. 1996;16:4107-4116.
- Cazzaniga G, Tosi S, Aloisi A, et al. The tyrosine kinase abl-related gene ARG is fused to ETV6 in an AML-M4Eo patient with a t(1;12)(q25;p13): molecular cloning of both reciprocal transcripts. Blood. 1999;94:4370-4373.
- 59. Lacronique V, Boureux A, Valle VD, et al. A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. Science. 1997;278:1309-1312.
- 60. Golub TR, Barker GF, Bohlander SK, et al. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92:4917-4921.
- 61. Buijs A, Sherr S, van Baal S, et al. Translocation (12;22) (p13;q11) in myeloproliferative disorders results in fusion of the ETS-like TEL gene on 12p13 to the MN1 gene on 22q11. Oncogene. 1995;10:1511-1519.
- 62. Cools J, Bilhou-Nabera C, Wlodarska I, et al. Fusion of a novel gene, BTL, to ETV6 in acute myeloid leukemias with a t(4;12)(q11-q12;p13). Blood. 1999;94:1820-1824.
- 63. Chakrabarti SR, Nucifora G. The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A. Biochem Biophys Res Commun. 1999;264:871-877.
- 64. Wang LC, Kuo F, Fujiwara Y, Gilliland DG, Golub TR, Orkin SH. Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. Embo J. 1997;16:4374-4383.
- 65. Wang LC, Swat W, Fujiwara Y, et al. The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. Genes Dev. 1998;12:2392-2402.
- 66. Miyoshi H, Ohira M, Shimizu K, et al. Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia. Nucleic Acids Res. 1995;23:2762-2769.
- Meyers S, Downing JR, Hiebert SW. Identification of AML-1 and the (8;21) translocation protein (AML-1/ETO) as sequence-specific DNA-binding proteins: the runt homology domain is required for DNA binding and protein-protein interactions. Mol Cell Biol. 1993;13:6336-6345.

- Wang S, Wang Q, Crute BE, Melnikova IN, Keller SR, Speck NA. Cloning and characterization of subunits of the T-cell receptor and murine leukemia virus enhancer core-binding factor. Mol Cell Biol. 1993;13:3324-3339.
- 69. Levanon D, Negreanu V, Bernstein Y, Bar-Am I, Avivi L, Groner Y. AML1, AML2, and AML3, the human members of the runt domain gene-family: cDNA structure, expression, and chromosomal localization. Genomics. 1994;23:425-432.
- 70. Ogawa E, Maruyama M, Kagoshima H, et al. PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the Drosophila runt gene and the human AML1 gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90:6859-6863.
- 71. Erickson P, Gao J, Chang KS, et al. Identification of breakpoints in t(8;21) acute myelogenous leukemia and isolation of a fusion transcript, AML1/ETO, with similarity to Drosophila segmentation gene, runt. Blood. 1992;80:1825-1831.
- 72. Takahashi A, Satake M, Yamaguchi-Iwai Y, et al. Positive and negative regulation of granulocytemacrophage colony-stimulating factor promoter activity by AML1-related transcription factor, PEBP2. Blood. 1995;86:607-616.
- 73. Zhang DE, Fujioka K, Hetherington CJ, et al. Identification of a region which directs the monocytic activity of the colony-stimulating factor 1 (macrophage colony-stimulating factor) receptor promoter and binds PEBP2/CBF (AML1). Mol Cell Biol. 1994;14:8085-8095.
- 74. Nuchprayoon I, Meyers S, Scott LM, Suzow J, Hiebert S, Friedman AD. PEBP2/CBF, the murine homolog of the human myeloid AML1 and PEBP2 beta/CBF beta proto-oncoproteins, regulates the murine myeloperoxidase and neutrophil elastase genes in immature myeloid cells. Mol Cell Biol. 1994;14:5558-5568.
- 75. Shoemaker SG, Hromas R, Kaushansky K. Transcriptional regulation of interleukin 3 gene expression in T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87:9650-9654.
- 76. Redondo JM, Pfohl JL, Hernandez-Munain C, Wang S, Speck NA, Krangel MS. Indistinguishable nuclear factor binding to functional core sites of the T-cell receptor delta and murine leukemia virus enhancers. Mol Cell Biol. 1992;12:4817-4823.
- 77. Tanaka T, Tanaka K, Ogawa S, et al. An acute myeloid leukemia gene, AML1, regulates hemopoietic myeloid cell differentiation and transcriptional activation antagonistically by two alternative spliced forms. Embo J. 1995;14:341-350.
- 78. Bae SC, Ogawa E, Maruyama M, et al. PEBP2 alpha B/mouse AML1 consists of multiple isoforms that possess differential transactivation potentials. Mol Cell Biol. 1994;14:3242-3252.
- 79. Wong CW, Privalsky ML. Transcriptional repression by the SMRT-mSin3 corepressor: multiple interactions, multiple mechanisms, and a potential role for TFIIB. Mol Cell Biol. 1998;18:5500-5510.
- Miyoshi H, Shimizu K, Kozu T, Maseki N, Kaneko Y, Ohki M. t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88:10431-10434.
- 81. Miyoshi H, Kozu T, Shimizu K, et al. The t(8;21) translocation in acute myeloid leukemia results in production of an AML1-MTG8 fusion transcript. Embo J. 1993;12:2715-2721.
- 82. Nucifora G, Birn DJ, Espinosa R, 3rd, et al. Involvement of the AML1 gene in the t(3;21) in therapyrelated leukemia and in chronic myeloid leukemia in blast crisis. Blood. 1993;81:2728-2734.
- 83. Mitani K, Ogawa S, Tanaka T, et al. Generation of the AML1-EVI-1 fusion gene in the t(3;21)(q26;q22) causes blastic crisis in chronic myelocytic leukemia. Embo J. 1994;13:504-510.
- 84. Hiebert SW, Sun W, Davis JN, et al. The t(12;21) translocation converts AML-1B from an activator to a repressor of transcription. Mol Cell Biol. 1996;16:1349-1355.
- 85. Romana SP, Mauchauffe M, Le Coniat M, et al. The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. Blood. 1995;85:3662-3670.
- 86. Romana SP, Poirel H, Leconiat M, et al. High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. Blood. 1995;86:4263-4269.
- 87. Guidez F, Petrie K, Ford AM, et al. Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein. Blood. 2000;96:2557-2561.
- 88. Fenrick R, Amann JM, Lutterbach B, et al. Both TEL and AML-1 contribute repression domains to the t(12;21) fusion protein. Mol Cell Biol. 1999;19:6566-6574.

- 89. Fears S, Gavin M, Zhang DE, et al. Functional characterization of ETV6 and ETV6/CBFA2 in the regulation of the MCSFR proximal promoter. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94:1949-1954.
- 90. Nimer SD, Moore MA. Effects of the leukemia-associated AML1-ETO protein on hematopoietic stem and progenitor cells. Oncogene. 2004;23:4249-4254.
- 91. Zhang J, Kalkum M, Chait BT, Roeder RG. The N-CoR-HDAC3 nuclear receptor corepressor complex inhibits the JNK pathway through the integral subunit GPS2. Mol Cell. 2002;9:611-623.
- 92. Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. Nat Rev Cancer. 2002;2:502-513.
- 93. Fischer M, Schwieger M, Horn S, et al. Defining the oncogenic function of the TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) fusion protein in a mouse model. Oncogene. 2005;24:7579-7591.
- 94. Andreasson P, Schwaller J, Anastasiadou E, Aster J, Gilliland DG. The expression of ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) is not sufficient for the transformation of hematopoietic cell lines in vitro or the induction of hematologic disease in vivo. Cancer Genet Cytogenet. 2001;130:93-104.
- 95. Mori H, Colman SM, Xiao Z, et al. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:8242-8247.
- 96. Zuna J, Madzo J, Krejci O, et al. ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) is a frequent prenatal first hit in childhood leukemia. Blood;117:368-369; author reply 370-361.
- 97. Lausten-Thomsen U, Madsen HO, Vestergaard TR, Hjalgrim H, Nersting J, Schmiegelow K. Prevalence of t(12;21)[ETV6-RUNX1]-positive cells in healthy neonates. Blood;117:186-189.
- 98. Greaves M, Colman SM, Kearney L, Ford AM. Fusion genes in cord blood. Blood;117:369-370; author reply 370-361.
- 99. Ford AM, Bennett CA, Price CM, Bruin MC, Van Wering ER, Greaves M. Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:4584-4588.
- 100. Hong D, Gupta R, Ancliff P, et al. Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. Science. 2008;319:336-339.
- 101. Tsuzuki S, Seto M, Greaves M, Enver T. Modeling first-hit functions of the t(12;21) TEL-AML1 translocation in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:8443-8448.
- 102. Schindler JW, Van Buren D, Foudi A, et al. TEL-AML1 corrupts hematopoietic stem cells to persist in the bone marrow and initiate leukemia. Cell Stem Cell. 2009;5:43-53.
- 103. Castor A, Nilsson L, Astrand-Grundstrom I, et al. Distinct patterns of hematopoietic stem cell involvement in acute lymphoblastic leukemia. Nat Med. 2005;11:630-637.
- 104. Rubnitz JE, Downing JR, Pui CH, et al. TEL gene rearrangement in acute lymphoblastic leukemia: a new genetic marker with prognostic significance. J Clin Oncol. 1997;15:1150-1157.
- Forestier E, Andersen MK, Autio K, et al. Cytogenetic patterns in ETV6/RUNX1-positive pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: A Nordic series of 245 cases and review of the literature. Genes Chromosomes Cancer. 2007;46:440-450.
- 106. Seeger K, von Stackelberg A, Taube T, et al. Relapse of TEL-AML1--positive acute lymphoblastic leukemia in childhood: a matched-pair analysis. J Clin Oncol. 2001;19:3188-3193.
- Rubnitz JE, Behm FG, Wichlan D, et al. Low frequency of TEL-AML1 in relapsed acute lymphoblastic leukemia supports a favorable prognosis for this genetic subgroup. Leukemia. 1999;13:19-21.
- 108. Raynaud S, Cave H, Baens M, et al. The 12;21 translocation involving TEL and deletion of the other TEL allele: two frequently associated alterations found in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 1996;87:2891-2899.
- 109. Fears S, Vignon C, Bohlander SK, Smith S, Rowley JD, Nucifora G. Correlation between the ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) fusion gene and karyotypic abnormalities in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Genes Chromosomes Cancer. 1996;17:127-135.
- Kobayashi H, Satake N, Maseki N, Sakashita A, Kaneko Y. The der(21)t(12;21) chromosome is always formed in a 12;21 translocation associated with childhood acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol. 1996;94:105-111.
- 111. Andreasson P, Johansson B, Strombeck B, Donner M, Mitelman F, Hoglund M. Childhood acute lymphoblastic leukaemia with ider(21)(q10)t(12;21)(p12;q22): a new recurrent abnormality showing ETV6/CBFA2 fusion. Br J Haematol. 1997;98:216-218.

- 112. Cave H, Cacheux V, Raynaud S, et al. ETV6 is the target of chromosome 12p deletions in t(12;21) childhood acute lymphocytic leukemia. Leukemia. 1997;11:1459-1464.
- 113. Stams WA, Beverloo HB, den Boer ML, et al. Incidence of additional genetic changes in the TEL and AML1 genes in DCOG and COALL-treated t(12;21)-positive pediatric ALL, and their relation with drug sensitivity and clinical outcome. Leukemia. 2006;20:410-416.
- 114. Loncarevic IF, Roitzheim B, Ritterbach J, et al. Trisomy 21 is a recurrent secondary aberration in childhood acute lymphoblastic leukemia with TEL/AML1 gene fusion. Genes Chromosomes Cancer. 1999;24:272-277.
- 115. Attarbaschi A, Mann G, Konig M, et al. Incidence and relevance of secondary chromosome abnormalities in childhood TEL/AML1+ acute lymphoblastic leukemia: an interphase FISH analysis. Leukemia. 2004;18:1611-1616.
- 116. Raynaud SD, Dastugue N, Zoccola D, Shurtleff SA, Mathew S, Raimondi SC. Cytogenetic abnormalities associated with the t(12;21): a collaborative study of 169 children with t(12;21)-positive acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 1999;13:1325-1330.
- 117. Ma SK, Wan TS, Cheuk AT, et al. Characterization of additional genetic events in childhood acute lymphoblastic leukemia with TEL/AML1 gene fusion: a molecular cytogenetics study. Leukemia. 2001;15:1442-1447.
- 118. Peter A, Heiden T, Taube T, Korner G, Seeger K. Interphase FISH on TEL/AML1 positive acute lymphoblastic leukemia relapses--analysis of clinical relevance of additional TEL and AML1 copy number changes. Eur J Haematol. 2009;83:420-432.
- 119. Romana SP, Le Coniat M, Poirel H, Marynen P, Bernard O, Berger R. Deletion of the short arm of chromosome 12 is a secondary event in acute lymphoblastic leukemia with t(12;21). Leukemia. 1996;10:167-170.
- 120. Maia AT, Ford AM, Jalali GR, et al. Molecular tracking of leukemogenesis in a triplet pregnancy. Blood. 2001;98:478-482.
- 121. Ford AM, Fasching K, Panzer-Grumayer ER, Koenig M, Haas OA, Greaves MF. Origins of "late" relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia with TEL-AML1 fusion genes. Blood. 2001;98:558-564.
- 122. Zuna J, Ford AM, Peham M, et al. TEL deletion analysis supports a novel view of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. Clin Cancer Res. 2004;10:5355-5360.
- 123. Kempski H, Chalker J, Chessells J, et al. An investigation of the t(12;21) rearrangement in children with B-precursor acute lymphoblastic leukaemia using cytogenetic and molecular methods. Br J Haematol. 1999;105:684-689.
- 124. Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, et al. Molecular allelokaryotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. Blood. 2008;111:776-784.
- 125. Kuiper RP, Schoenmakers EF, van Reijmersdal SV, et al. High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. Leukemia. 2007;21:1258-1266.
- 126. Lilljebjorn H, Heidenblad M, Nilsson B, et al. Combined high-resolution array-based comparative genomic hybridization and expression profiling of ETV6/RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemias reveal a high incidence of cryptic Xq duplications and identify several putative target genes within the commonly gained region. Leukemia. 2007;21:2137-2144.
- Lilljebjorn H, Soneson C, Andersson A, et al. The correlation pattern of acquired copy number changes in 164 ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemias. Hum Mol Genet. 2010;19:3150-3158.
- 128. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. Nature. 2007;446:758-764.
- 129. Tsuzuki S, Karnan S, Horibe K, et al. Genetic abnormalities involved in t(12;21) TEL-AML1 acute lymphoblastic leukemia: analysis by means of array-based comparative genomic hybridization. Cancer Sci. 2007;98:698-706.
- Parker H, An Q, Barber K, et al. The complex genomic profile of ETV6-RUNX1 positive acute lymphoblastic leukemia highlights a recurrent deletion of TBL1XR1. Genes Chromosomes Cancer. 2008;47:1118-1125.

- Kuster L, Grausenburger R, Fuka G, et al. ETV6/RUNX1-positive relapses evolve from an ancestral clone and frequently acquire deletions of genes implicated in glucocorticoid signaling. Blood. 2011;117:2658-2667.
- 132. Mullighan CG, Phillips LA, Su X, et al. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. Science. 2008;322:1377-1380.
- 133. Yang JJ, Bhojwani D, Yang W, et al. Genome-wide copy number profiling reveals molecular evolution from diagnosis to relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2008.
- 134. Kawamata N, Ogawa S, Seeger K, et al. Molecular allelokaryotyping of relapsed pediatric acute lymphoblastic leukemia. Int J Oncol. 2009;34:1603-1612.
- 135. Pinkel D, Segraves R, Sudar D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. Nat Genet. 1998;20:207-211.
- 136. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. Genes Chromosomes Cancer. 1997;20:399-407.
- 137. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science. 1992;258:818-821.
- Kirchhoff M, Gerdes T, Maahr J, et al. Deletions below 10 megabasepairs are detected in comparative genomic hybridization by standard reference intervals. Genes Chromosomes Cancer. 1999;25:410-413.
- Shizuya H, Birren B, Kim UJ, et al. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89:8794-8797.
- 140. Krzywinski M, Bosdet I, Smailus D, et al. A set of BAC clones spanning the human genome. Nucleic Acids Res. 2004;32:3651-3660.
- 141. Ishkanian AS, Malloff CA, Watson SK, et al. A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. Nat Genet. 2004;36:299-303.
- Fiegler H, Carr P, Douglas EJ, et al. DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. Genes Chromosomes Cancer. 2003;36:361-374.
- 143. Chen W, Erdogan F, Ropers HH, Lenzner S, Ullmann R. CGHPRO -- a comprehensive data analysis tool for array CGH. BMC Bioinformatics. 2005;6:85.
- 144. Sorensen KM, Jespersgaard C, Vuust J, Hougaard D, Norgaard-Pedersen B, Andersen PS. Whole genome amplification on DNA from filter paper blood spot samples: an evaluation of selected systems. Genet Test. 2007;11:65-71.
- 145. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. Nat Rev Genet. 2006;7:85-97.
- 146. Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J Mol Biol. 1977;113:237-251.
- 147. Van Prooijen-Knegt AC, Van Hoek JF, Bauman JG, Van Duijn P, Wool IG, Van der Ploeg M. In situ hybridization of DNA sequences in human metaphase chromosomes visualized by an indirect fluorescent immunocytochemical procedure. Exp Cell Res. 1982;141:397-407.
- 148. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observation. J Am Stat Assoc. 1958;53:457-481.
- 149. Cox D. Regression Models and life tables. J R Stat Soc B. 1972;34:187-220.
- 150. Chandramohan V, Jeay S, Pianetti S, Sonenshein GE. Reciprocal control of Forkhead box O 3a and c-Myc via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway coordinately regulates p27Kip1 levels. J Immunol. 2004;172:5522-5527.
- 151. Ray ME, Wistow G, Su YA, Meltzer PS, Trent JM. AIM1, a novel non-lens member of the betagamma-crystallin superfamily, is associated with the control of tumorigenicity in human malignant melanoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94:3229-3234.
- 152. Budanov AV, Sablina AA, Feinstein E, Koonin EV, Chumakov PM. Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. Science. 2004;304:596-600.
- 153. Gale KB, Ford AM, Repp R, et al. Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94:13950-13954.

- 154. Gill Super HJ, Rothberg PG, Kobayashi H, Freeman AI, Diaz MO, Rowley JD. Clonal, nonconstitutional rearrangements of the MLL gene in infant twins with acute lymphoblastic leukemia: in utero chromosome rearrangement of 11q23. Blood. 1994;83:641-644.
- 155. Ford AM, Ridge SA, Cabrera ME, et al. In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. Nature. 1993;363:358-360.
- 156. Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM. Leukemia in twins: lessons in natural history. Blood. 2003;102:2321-2333.
- 157. Barabe F, Kennedy JA, Hope KJ, Dick JE. Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. Science. 2007;316:600-604.
- 158. Bardini M, Spinelli R, Bungaro S, et al. DNA copy-number abnormalities do not occur in infant ALL with t(4;11)/MLL-AF4. Leukemia;24:169-176.
- 159. Guo B, Godzik A, Reed JC. Bcl-G, a novel pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. J Biol Chem. 2001;276:2780-2785.
- 160. Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, et al. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. Cell. 1994;78:59-66.
- 161. Loda M, Cukor B, Tam SW, et al. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclindependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. Nat Med. 1997;3:231-234.
- 162. Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, et al. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. Nat Med. 1997;3:227-230.
- 163. Hayashi Y, Raimondi SC, Look AT, et al. Abnormalities of the long arm of chromosome 6 in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 1990;76:1626-1630.
- 164. Heerema NA, Sather HN, Sensel MG, et al. Clinical significance of deletions of chromosome arm 6q in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. Leuk Lymphoma. 2000;36:467-478.
- Chandramohan V, Mineva ND, Burke B, et al. c-Myc represses FOXO3a-mediated transcription of the gene encoding the p27(Kip1) cyclin dependent kinase inhibitor. J Cell Biochem. 2008;104:2091-2106.
- 166. Mirebeau D, Acquaviva C, Suciu S, et al. The prognostic significance of CDKN2A, CDKN2B and MTAP inactivation in B-lineage acute lymphoblastic leukemia of childhood. Results of the EORTC studies 58881 and 58951. Haematologica. 2006;91:881-885.
- 167. van Zutven LJ, van Drunen E, de Bont JM, et al. CDKN2 deletions have no prognostic value in childhood precursor-B acute lymphoblastic leukaemia. Leukemia. 2005;19:1281-1284.
- 168. Nutt SL, Kee BL. The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. Immunity. 2007;26:715-725.
- 169. Fuxa M, Skok JA. Transcriptional regulation in early B cell development. Curr Opin Immunol. 2007;19:129-136.
- 170. Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, Busslinger M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. Nat Immunol. 2007;8:463-470.
- 171. Ramirez J, Lukin K, Hagman J. From hematopoietic progenitors to B cells: mechanisms of lineage restriction and commitment. Curr Opin Immunol;22:177-184.
- 172. Molnar A, Georgopoulos K. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. Mol Cell Biol. 1994;14:8292-8303.
- 173. Oettinger MA. Activation of V(D)J recombination by RAG1 and RAG2. Trends Genet. 1992;8:413-416.
- 174. Nebral K, Denk D, Attarbaschi A, et al. Incidence and diversity of PAX5 fusion genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2009;23:134-143.
- 175. Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, et al. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. Nature. 2008;453:110-114.
- 176. Mullighan CG, Su X, Zhang J, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med. 2009;360:470-480.
- 177. Saijo K, Schmedt C, Su IH, et al. Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF-kappaB activation during B cell development. Nat Immunol. 2003;4:274-279.
- 178. Jumaa H, Bossaller L, Portugal K, et al. Deficiency of the adaptor SLP-65 in pre-B-cell acute lymphoblastic leukaemia. Nature. 2003;423:452-456.

- 179. Riesch M, Niggli FK, Leibundgut K, Caflisch U, Betts DR. Loss of X chromosome in childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genet Cytogenet. 2001;125:27-29.
- Nordgren A, Heyman M, Sahlen S, et al. Spectral karyotyping and interphase FISH reveal abnormalities not detected by conventional G-banding. Implications for treatment stratification of childhood acute lymphoblastic leukaemia: detailed analysis of 70 cases. Eur J Haematol. 2002;68:31-41.
- 181. Lu XY, Harris CP, Cooley L, et al. The utility of spectral karyotyping in the cytogenetic analysis of newly diagnosed pediatric acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2002;16:2222-2227.
- 182. Martineau M, Jalali GR, Barber KE, et al. ETV6/RUNX1 fusion at diagnosis and relapse: some prognostic indications. Genes Chromosomes Cancer. 2005;43:54-71.
- Romana SP, Radford-Weiss I, Ben Abdelali R, et al. NUP98 rearrangements in hematopoietic malignancies: a study of the Groupe Francophone de Cytogenetique Hematologique. Leukemia. 2006;20:696-706.
- 184. Petit A, Ragu C, Della-Valle V, et al. NUP98-HMGB3: a novel oncogenic fusion. Leukemia;24:654-658.
- 185. Spatz A, Borg C, Feunteun J. X-chromosome genetics and human cancer. Nat Rev Cancer. 2004;4:617-629.
- 186. Gartler SM, Goldman MA. Biology of the X chromosome. Curr Opin Pediatr. 2001;13:340-345.
- 187. Kawakami T, Zhang C, Taniguchi T, et al. Characterization of loss-of-inactive X in Klinefelter syndrome and female-derived cancer cells. Oncogene. 2004;23:6163-6169.
- 188. Richardson AL, Wang ZC, De Nicolo A, et al. X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. Cancer Cell. 2006;9:121-132.
- 189. Sirchia SM, Ramoscelli L, Grati FR, et al. Loss of the inactive X chromosome and replication of the active X in BRCA1-defective and wild-type breast cancer cells. Cancer Res. 2005;65:2139-2146.
- 190. Tissing WJ, Meijerink JP, den Boer ML, Pieters R. Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2003;17:17-25.
- Reiter A, Schrappe M, Ludwig WD, et al. Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. Blood. 1994;84:3122-3133.
- 192. Hillmann AG, Ramdas J, Multanen K, Norman MR, Harmon JM. Glucocorticoid receptor gene mutations in leukemic cells acquired in vitro and in vivo. Cancer Res. 2000;60:2056-2062.
- 193. Irving JA, Minto L, Bailey S, Hall AG. Loss of heterozygosity and somatic mutations of the glucocorticoid receptor gene are rarely found at relapse in pediatric acute lymphoblastic leukemia but may occur in a subpopulation early in the disease course. Cancer Res. 2005;65:9712-9718.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Behandlungsprotokoll der ALL-REZ BFM 2002 Studie.	7
Abbildung 2:	Häufigkeit der genetisch definierten Subgruppen bei der ALL-Ersterkrankung und beim ALL-Rezidiv. Dargestellt sind ausschließlich BCP-ALL. Der prozentuale Anteil der einzelnen Subgruppe ist für die Ersterkrankung entnommen aus Armstrong et al.45, die Häufigkeiten für das Rezidiv entstammen den aktuellen Ergebnissen der ALL-REZ BFM-Studie, persönliche Kommunikation Drs. Kirschner-Schwabe und Eckert.	9
Abbildung 3:	Schematische Darstellung von ETV6 und RUNX1 und dem aus der Fusion resultierenden Protein ETV6/RUNX1.	13
Abbildung 4:	Kaplan-Meier Analyse der Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (pEFS ± Standardabweichung, SE) in Abhängigkeit von der genetisch definierten Subgruppe.	17
Abbildung 5:	Kaplan-Meier Analyse der Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (pEFS ± Standardabweichung, SE) der ETV6/RUNX1-positiven Erstrezidive der intermediären Risikogruppe S2 in Abhängigkeit von der molekularen Therapieresponse (MRD) am Ende der Induktionstherapie.	17
Abbildung 6:	Prinzip der Mikroarray-basierten komparativen genomischen Hybridisierung (array CGH).	30
Abbildung 7:	Genomisches array CGH-Profil eines ALL-Rezidivs.	36
Abbildung 8:	Verteilung der identifizierten CNA auf die Chromosomen.	47
Abbildung 9:	Summationsdarstellung der Gesamtzahl identifizierter CNA in den 51 ETV6/RUNX1-positiven ALL-Rezidiven.	49
Abbildung 10:	CNA auf Chromosom 12p beim ETV6/RUNX1-positiven ALL-Erstrezidiv.	55
Abbildung 11:	Kaplan-Meier Analyse der Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (pEFS ± Standardabweichung, SE) in Abhängigkeit vom Nachweis einer Deletion von CDKN1B.	56
Abbildung 12:	Kaplan-Meier Analyse der Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (pEFS ± Standardabweichung, SE) in Abhängigkeit vom Nachweis des kombinierten Kopienzahlverlustes von 6q21 und CDKN1B.	58
Abbildung 13:	Boxplots für die Assoziation von Kopienzahlverlust der MOR von Chromosom 9p21.3(CDKN2A/B, MTAP) mit Leukozyten- und Blastenzahl sowie Alter bei Initial- und Rezidivdiagnose.	59
Abbildung 14:	Verteilung der X-chromosomalen CNA bei ETV6/RUNX1-positiven ALL- Erstrezidiven	61
Abbildung 15:	Boxplots für die Assoziation von Kopienzahlverlust des gesamten X-Chromosoms (WCL X) und dem Alter der Patienten bei Initial- und Rezidivdiagnose.	61
Abbildung 16:	DNA-Kopienzahlverluste von NR3C1	62
Abbildung 17:	Auswahl des für die Interphase FISH verwendeten BAC-Klons auf Chromosom 5q31.3.	64
Abbildung 18:	Interphase FISH-Analyse von Chromosom 5 zur Validierung der auf Chromosom 5q31.3 identifizierten Veränderungen	66
Abbildung 19:	Darstellung der rekurrenten CNA und deren kombinierter Nachweis.	69
9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Prognosefaktoren und deren prognostische Bedeutung bei ALL-Ersterkrankung nach Ergebnissen der ALL-BFM Studien6,9	3
Tabelle 2	ALL-Rezidiv Risikostratifizierung gemäß Protokoll ALL-REZ BFM 2002	4
Tabelle 3	Repräsentativität und klinische Charakteristika des mittels array CGH untersuchten Patientenkollektivs im Vergleich zur Gesamtheit der ALL-REZ BFM Studienpatienten mit ETV6/RUNX1-positivem BCP-ALL-Rezidiv und KM- Beteiligung.	45
Tabelle 4	DNA-Kopienzahlveränderungen gesamter Chromosomen bei ETV6/RUNX1- positiven ALL-Rezidiven	50
Tabelle 5	Rekurrente DNA-Kopienzahlveränderungen bei ETV6/RUNX1-positiven ALL- Rezidiven.	51
Tabelle 6	Häufigkeit der rekurrenten CNA pro untersuchtem Rezidiv.	52
Tabelle 7	Cox-Regressionsmodell für den Verlust von CDKN1B unter Einbeziehung von Zeitpunkt des Rezidivs und Immunphänotyp.	56
Tabelle 8	Klinische und genetische Parameter der ALL-Rezidive mit Verlust von 5q31.3.	63
Tabelle 9	FISH-Analyse der 5 Rezidive mit DNA-Kopienzahlverlust von Chromosom 5q31.3.	65
Tabelle 10	CNA die unabhängig von ihrer Häufigkeit besonders häufig oder selten in Kombination vorlagen. Dargestellt sind alle Kombinationen für die die Analyse mittels Exaktem Test nach Fisher einen P-Wert <0,1 ergab. 1MOR 9p21.3 in der die Gene CDKN2A, CDKN2B und MTAP enthalten sind; 2MOR 12p13.2 in der CDKN1B enthalten ist; 3P-Wert Exakter Test nach Fisher;	68
Tabelle 11	Publizierte Studien, in denen hochauflösend gesamtgenomisch ETV6/RUNX1- positive ALL-Ersterkrankungen bzw. ALL-Rezidive untersucht wurden, die für einen Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zur Verfügung standen.	72
Tabelle 12	Häufigkeiten rekurrenter CNA bei der ETV6/RUNX1-positiven ALL bzw. ALL- Rezidiv im Kindesalter. Vergleich der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Häufigkeiten mit den Häufigkeiten publizierter Studien.	76
Tabelle 13	Zusätzliche CNA, die bei den 5 Patienten mit Nachweis von GR-Gendeletionen detektiert wurden. Alle 5 Rezidive wiesen zusätzliche Veränderungen der Leukämiezellen auf.	85

10 Abkürzungsverzeichnis

ABL	Abelson-Gen
AF	Transaktivierungsdomäne
AF4	ALL1 fused gene from chromosome 4-Gen
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML1	Acute myeloid leukemia 1-Gen
array CGH	Array comparative genomic hybridization, Microarray-basierte omparative Genomhybridisierung
BAC	Bacterial artificial chromosome, künstliches Bakterienchromosom
B-ALL	B-Zell-ALL
BCL2L14	Bcl2-like 14-Gen
BCP-ALL	B-cell precursor ALL, B-Zell-Vorläufer-ALL
BCR	Breakpoint cluster region-Gen
BLNK	B-cell-linker-Gen
BM	Bone marrow, Knochenmark
BMF	Bcl2 modifying factor-Gen
bp	Basenpaare
BTL	Brx-like translocated in leukemia-Gen
CBF	Core binding factor
CCR	Continuous complete remission, anhaltende komplette Remission
CD	Cluster of differentiation, Zelloberflächenantigen
CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B-Gen
CDKN2A/B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B-Gen
cDNA	Complementary DNA, komplementäre DNA
CNA	Copy number aberration, DNA-Kopienzahlaberration
CNV	Copy number variant, DNA-Kopienzahlvariation
C-terminal	Carboxyterminal
Cy3/5	Carbocyanin 3/5
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
E2A	E2-alpha-Gen
EBF1	Early B-cell factor 1-Gen
ETS	E-twenty-six-specific
ETV6	ETV6-Gen (E twenty-six specific variant-Gen 6)
F1/F2	Chemotherapieblöcke der Induktionsbehandlung, ALL-REZ BFM 2002 Protokoll
FHIT	Fragile histidine triad-Gen
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FOXO3A	Forkhead box 3A-Gen
FYN	FYN ocncogene related to SRC, FGR, YES
gain	DNA-Kopienzahlzugewinn

GC	Glukokortikoide
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GR	Glukokortikoidrezeptogen, NR3C1
HDAC3	Histondeacetylase 3
HLH	Helix-loop-helix
HMGB3	High-mobility group box 3-Gen
IKZF1	IKAROS family zinc finger 1-Gen
IL-3	Interleukin 3
ΙΤΡΚΑ	Inositol-trisphosphate 3-kinase A-Gen
JAK2	Janus kinase 2-Gen
Kb	Kilobasenpaare
KM	Knochenmark
loss	DNA-Kopienzahlverlust
LTK	Leukocyte receptor tyrosine kinase-Gen
Mb	Megabasenpaare
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MgCl2	Magnesiumchlorid
min	Minute
MLH1	Human mutL homolog 1-Gen
MLL	Mixed lineage leukemia-Gen
mM	Millimol
MMR	Mismatch repair pathway
MN1	Meningioma 1-Gen
MOR	Minimal overlapping region (Minimale überlappende Region)
MRD	Minimal residual disease (minimale Restkrankheit)
MSD	Matched sibling donor, (verwandter (Geschwister-) Spender)
MSH2	Human mutS homolog 2-Gen
mSin3A	Transcriptional co-repressor Sin3A
MTAP	Methylthioadenosin Phosphorylase-Gen
MUD	Matched unrelated donor, unverwandter Spender
MYC	Myelocytomatosis viral oncogene
N-CoR	Nuclear receptor co-repressor
NOD/SCID	Severe combined immunodeficiency non-obese diabetic
NR3C1	Nuclear receptor subfamily 3 group C member 1-Gen (GR-Gen)
nt	Nukleotid
N-terminal	Aminoterminal
NUP98	Nucleoporin 98-Gen
PAX5	Paired box 5-Gen
PBC	Peripheral blast cell count, Blutblastenzahl
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatpuffer)
PBX	Pre-B-cell leukemia homeobox-Gen
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGFRB	Platelet-derived growth factor receptor ß-Gen
pEFS	Probability of event-free survival, (Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens)
PGR	Prednisone good response, (gutes Ansprechen auf die Prednisontherapie)
PN	Phosphat-Nonidet (-Puffer)

PPR	Prednisone poor response, (schlechtes Ansprechen auf die Prednisontherapie)
RAG1/2	Recombination activating enzyme 1/2-Gen
RHD	Runt Homologie Domäne
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RUNX1	Runt related transcription factor 1-Gen
SCT	Stem cell transplantation, Stammzelltransplantation
SE	Standard error, Standardabweichung
sec	Sekunde
SMRT	Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone repressor
SNP	Single nucleotide polymorphism
SPANXB	Sperm protein associated with the nucleus X chromosome family member B-Gen
SSC	Sodium saline citrate (Natrium-Citratpuffer)
SZT	Stammzelltransplantation
TAE	Tris-Acetat-EDTA
T-ALL	T-Zell-ALL
TBL1XR1	Transducin beta like x-linked receptor 1-Gen
TCF3	Transcription factor 3-Gen
TCF4	Transcription factor 4 isoform b-Gen
TEL	Translocation ets leukemia
TTC26	Tetratricopeptide repeat protein 26-Gen
TYRO3	Tyrosine-protein kinase receptor-Gen
Verlust	DNA-Kopienzahlverlust
WCG	<i>Whole chromosome gain</i> , (Kopienzahlzugewinn eines gesamten Chromosoms)
WCL	Whole chromosome loss, (Kopienzahlverlust eines gesamten Chromosoms)
WGA	Whole genome amplification
YAC	Yeast artificial chromosome (künstliches Hefechromosom)
ZNS	Zentrales Nervensystem
Zugewinn	DNA-Kopienzahlzugewinn

Lebenslauf

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

Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

<u>A. Giese</u>, R. Kirschner-Schwabe, L. Wronski, K. Blümchen, Shalapour S, Prada J, Driever PH, Brauer M, Schuelke M, Henze G, Seeger K (2007). Prenatal manifestation of Pancytopenia in Pearson marrow-pancreas syndrome caused by a mitochondrial DNA deletion. American Journal of Medical Genetics A 143(3): 285-288.

M. Lueth, L. Wronski, <u>A. Giese</u>, R. Kirschner-Schwabe, T. Pietsch, A. von Deimling, G. Henze, A. Kurtz, PH Driever (2009). Somatic mitochondrial mutations in pilocytic astrocytoma. Cancer Genetics Cytogenetics: 192(1):30-35.

Zur Publikation eingereicht

<u>A. Bokemeyer</u>, C. Eckert, F. Meyr, G. Körner, A. von Stackelberg, R. Ullmann, S. Türkmen, G. Henze, K. Seeger. Additional genomic alterations influence treatment response and outcome in relapsed childhood ETV6/RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemia.

Kongressbeiträge

XVII. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung 2004, Wilsede. <u>A. Giese</u>, L. Wronski, S. Shalapour, R. Kirschner, M. Schülke, K. Blümchen, G. Henze, K. Seeger. Prenatal Manifestation of Pancytopenia in Pearson marrow-pancreas Syndrome. Klin Pädiatr, 2004; 216.

XVIII. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung 2005, Wilsede. <u>A. Giese</u>, R. Kirschner-Schwabe, L. Wronski, S. Shalapour, C. Eckert, S. Wellmann, H. Thiele, G. Henze, K. Seeger. Mitochondrial DNA Mutations in Relapsed Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia. Klin Pädiatr 2005.

40th Congress of the International Society of Pediatric Oncology (SIOP) 2008, Berlin. <u>A. Giese</u>, R. Ullmann R, C. Eckert, S. Stabentheimer, M. Schubert, G. Henze G, K. Seeger. High Resolution Array Comparative Genomic Hybridization of Relapsed Childhood *ETV6/RUNX1*-positive Acute Lymphoblastic Leukemia Reveals Recurrent Genetic Alterations. Med Ped Oncol 2008.

50th Annual Meeting of the American Society of Hematology (ASH) 2008, San Francisco, USA. <u>A. Giese</u>, R. Ullmann, C. Eckert, R. Kirschner-Schwabe, G. Henze, K. Seeger. Genomic Profiling Helps to Predict Treatment Response and Outcome in Relapsed Childhood *ETV6/RUNX1*-positive Acute Lymphoblastic Leukemia. Blood Suppl, Dec. 2008.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. Karl Seeger danke ich herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas, für seine Betreuung und Förderung und für die stete Unterstützung. Ebenso danke ich ihm für die Einführung in die klinische Arbeit in der pädiatrischen Onkologie und Hämatologie.

Herrn Prof. Dr. Dr. Günter Henze danke ich für die Begleitung meines Promotionsvorhabens und für sein Interesse an dem Fortgang der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Cornelia Eckert für ihre hilfreiche und wegweisende Unterstützung, für wichtige Anregungen bei der Konzeption dieser Arbeit und ihre stets konstruktive Kritik. Die Weitergabe ihrer Erfahrung, ihr Vertrauen und ihre Begeisterung für die Wissenschaft waren für mich eine unersetzbare Motivation.

Frau Dr. Renate Kirschner-Schwabe danke ich für ihre kompetente Unterstützung insbesondere in der Anfangszeit im Labor.

Für die ausgesprochen herzliche Aufnahme in das Team, die Einarbeitung in grundlegende Labormethoden, die Hilfsbereitschaft und die gute freundschaftliche Arbeitsathmosphäre danke ich allen MTAs des molekulargenetischen Labors der Klinik für Pädiatrie m. S. Onkologie/Hämatologie, insbesondere Jutta Proba, Wilhelmine Keune, Silke Hollmann und Claudia Hanel. Gabriele Körner danke ich für ihre hervorragende Einarbeitung in die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und ihre Unterstützung bei deren Auswertung.

Herrn Dr. Reinhard Ullmann danke ich für die Unterstützung und Weitergabe seiner Erfahrung bei der Auswertung der array CGH-Daten. Ein herzlicher Dank auch an Hannelore Madle und alle anderen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Ullmann am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik Berlin, die mir ebenfalls mit Rat und Tat zur Seite standen und mich als Gast ihre Gerätschaften und Räumlichkeiten nutzen ließen.

Für die gute Zusammenarbeit, die schöne Zeit im Labor und zahlreiche Disskussionen danke ich meinen Mitdoktoranden Lena Wronski, Kerstin Hasse, Nikola Hagedorn und Franziska Meyr.

Der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung danke ich für das mir gewährte Promotionsstipendium.

Meinen Eltern danke ich für die Ermöglichung des Studiums und der Promotion, Anna und Arnd für ihre beständige Unterstützung meines Weges in dieser Zeit. Joachim danke ich für seine Begleitung auf diesem Weg, für seinen wertvollen Rat und für seine liebevolle Unterstützung.

Erklärung

Ich, Almut Bokemeyer, erkläre, dass ich die vorgelegte Disseration mit dem Titel

"Häufigkeit und prognostische Relevanz von zusätzlichen genetischen Veränderungen bei *ETV6/RUNX1*-positiven Rezidiven der akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter"

selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe dritter verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und – auch in Teilen – keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, im November 2012

Almut Bokemeyer