

Aus der Klinik für Kinder-Onkologie,-Hämatologie und klinische Immunologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Arndt Borkhardt

Analyse genetischer Variationen bei Kindern mit hoch hyperdiploider akuter lymphatischer Leukämie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von Daniela Brandenburg
2017

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Arndt Borkhardt

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALL	Akute lymphatische Leukämie
ALK	<i>Anaplastic Lymphoma Receptor Tyrosine Kinase</i>
AML	Akute myeloische Leukämie
BCR	<i>Breakpoint Cluster Region</i>
BLM	<i>Bloom Syndrome</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFU-F	<i>Colony forming unit fibroblasts</i>
CML	Chronische myeloische Leukämie
CREBBP	<i>CREB Binding Protein</i>
CREB3L1	<i>CAMP Responsive Element Binding Protein 3 like 1</i>
CREB3L2	<i>CAMP Responsive Element Binding Protein 3 like 2</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGIL	<i>European Group for the Immunological Characterization of Leukemias</i>
EB	<i>Elution Buffer</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EZH2	<i>Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit</i>
FAB	<i>French-American-British</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FLT3	<i>Fms-Related Tyrosine Kinase 3</i>
GMAF	<i>General minor allele frequency</i>
GvHD	<i>Graft-versus-Host-Disease</i>
HBS	<i>HEPES Buffered Saline</i>
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
Ig	Immunglobulin
IL21R	<i>Interleukin 21 Receptor</i>
IL6ST	<i>Interleukin 6 Signal Transducer</i>
JAK3	<i>Janus Kinase 3</i>

KRAS	<i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
MAML2	<i>Mastermind-Like 2</i>
MEN1	<i>Multiple Endocrine Neoplasia 1</i>
MLL3	<i>Mixed Lineage Leukemia Protein 3</i>
MNC	mononukleäre Zellen
MSC	mesenchymale Stammzellen
NACA	<i>Nascent Polypeptide-Associated Complex Alpha Subunit</i>
NF1	Neurofibromin 1
NK	natürliche Killerzellen
NOD/SCID	<i>Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RET	<i>Ret Proto-Oncogene</i>
SMO	<i>Smoothened Frizzled Class Receptor</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SNuPy	<i>Single Nucleotide Polymorphism Database</i>
SOX2	<i>SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2</i>
SUFU	<i>Suppressor Of Fused Homolog</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TET2	<i>Tet Methylcytosine Dioxygenase 2</i>

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Akute lymphatische Leukämie (ALL).....	1
1.1.1	Inzidenz der pädiatrischen ALL.....	1
1.1.2	Einteilung der ALL.....	2
1.1.3	Behandlung der ALL.....	13
1.2	Mesenchymale Stammzellen (MSC).....	15
1.2.1	Biologie.....	15
1.2.2	Regeneratives Potenzial.....	18
1.2.3	Immunmodulation	19
1.2.4	Mesenchymale Stammzellen in der Pathogenese der ALL.....	19
1.3	Zielsetzung	24
2	MATERIAL UND METHODEN	25
2.1	Chemikalien.....	25
2.2	Patientenkollektiv und Proben	25
2.3	Zellbiologische Methoden.....	27
2.3.1	Gewinnung von MSCs und MNCs aus dem Knochenmark	27
2.3.2	Differenzierung und Färbung der MSC.....	29
2.3.3	Gewinnung von Fibroblasten aus Hautbiopsien.....	30
2.3.4	Durchflusszytometrie.....	30
2.3.5	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	32
2.4	Isolierung und Bestimmung der Reinheit und Konzentration der DNA.....	33
2.5	DNA Scheren und Library Herstellung.....	33
2.6	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	34
2.7	Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Gelextraktion.....	35
2.8	Sequenzierung	36
2.9	Datenanalyse.....	37
3	ERGEBNISSE	39
3.1	Qualitätskontrolle	40
3.1.1	Expression von charakteristischen MSC-Oberflächenmarkern auf den isolierten Stromazellen	40
3.1.2	Multipotentes Differenzierungspotential der isolierten Stromazellen.....	44
3.2	Vorbereitung der Libraries für die Sequenzierung	46
3.2.1	Bestimmung der DNA Reinheit und DNA Konzentration.....	46
3.2.2	DNA Scheren und Library Vorbereitung	47
3.2.3	PCR und DNA Quantifizierung	48

3.3	Sequenzierung und Sequenzierungsdaten	52
3.3.1	Mutationen in der Keimbahn.....	55
3.3.2	Mutationen in der Leukämie.....	56
3.3.3	Mutationen im Stroma.....	56
3.3.4	Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den Vorläuferzellen	57
3.3.5	Konservierung der Nukleotidsequenz bei ausgewählten Genen	57
4	DISKUSSION	59
5	ZUSAMMENFASSUNG	69
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	70
7	ANHANG.....	81
	DANKSAGUNG.....	88
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	89

1 Einleitung

1.1 Akute lymphatische Leukämie (ALL)

1.1.1 Inzidenz der pädiatrischen ALL

Leukämien sind mit etwa 34% aller bösartigen Neubildungen die häufigste Krebserkrankung, die bei Kindern auftritt. Die höchste Inzidenz liegt zwischen dem zweiten bis fünften Lebensjahr. Unter den Leukämien im Kindesalter herrscht die akute lymphatische Leukämie (ALL) mit etwa 80% vor [1]. Das Auftreten der ALL hängt wahrscheinlich von verschiedenen Faktoren ab. Hierzu gehören exogene und endogene Faktoren, genetische Dispositionen sowie ungeklärte Faktoren. Ein erhöhtes Risiko besteht bei Kindern mit vererbten oder erworbenen Immundefekten oder mit bestimmten Chromosomenveränderungen [2]. Darüber hinaus konnten Martín-Lorenzo und seine Kollegen kürzlich anhand einer Studie an Mäusen zeigen, dass Infektionen zu einer klonalen Evolution von präleukämischen B-Zell Klonen führen können [3]. Durch eine gestörte Differenzierung, eine unkontrollierte Proliferation oder durch Inhibierung des physiologischen Zelltodes der Lymphozyten, kann die akute lymphatische Leukämie als eine bösartige Erkrankung des blutbildenden Systems entstehen. Die malignen unreifen Lymphozyten verdrängen zunehmend die normale Blutbildung. Somit können Anämien, Infektionen und erhöhte Blutungsneigung die Folge und zugleich das erste Anzeichen einer Leukämie sein [4]. Es existieren verschiedene Therapieschemata für Kinder, die an der ALL erkrankt sind. Diese sind heutzutage grundsätzlich als sehr erfolgreich zu bewerten. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei neudiagnostizierten ALL-Fällen ca. 85%. Jedoch erleiden ca. 15% der Patienten einen Krankheitsrückfall, ein sogenanntes Rezidiv. Die Heilungsaussichten sind bei Rezidiven im Allgemeinen ungünstiger als bei Ersterkrankungen und die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 35-40% [5], [6], [7]. Bei der ALL können verschiedene Subtypen je nach Immunophänotyp, Morphologie und genetischer Aberration klassifiziert werden. Dies ist für die Einteilung der Patienten in Risikogruppen klinisch sinnvoll.

1.1.2 Einteilung der ALL

Immunphänotyp

Durch die Benutzung monoklonaler Antikörper gegen bestimmte Antigene (Oberflächenmarker, CD-Marker), ist die Klassifikation der Leukämiezellen nach ihrem Immunphänotyp möglich. Bei den CD-Molekülen (*Cluster of Differentiation*) handelt es sich um Oberflächenmoleküle (meistens Glykoproteine) von Zellen. Anhand des Expressionsmusters verschiedener Antigene wird zum Beispiel die Zuordnung zur B- oder T-Zellreihe ermöglicht. Abbildung 1 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Blutzelltypen.

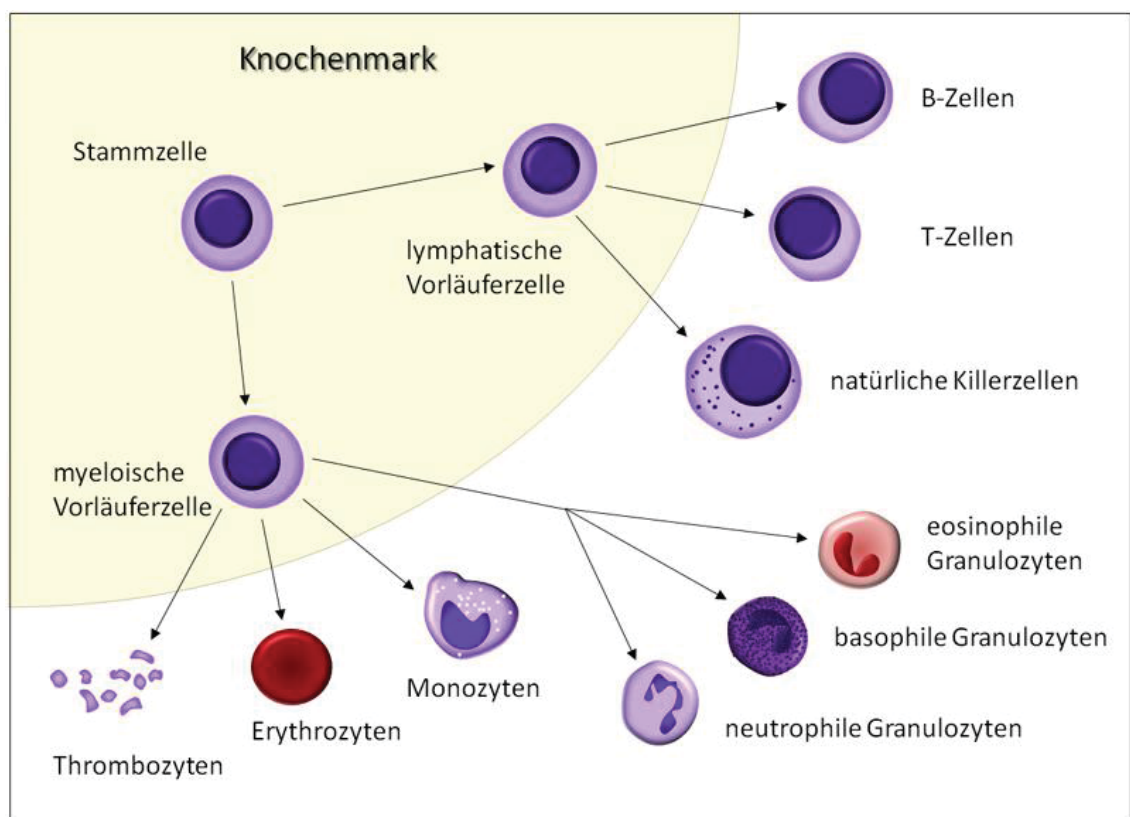


Abb. 1: Übersicht über die verschiedenen Blutzelltypen [8]. Aus den Stammzellen im Knochenmark gehen durch Teilung die reifen Blutzellen hervor. Hierbei entstehen zunächst die myeloischen und lymphatischen Vorläuferzellen. Die myeloischen Vorläuferzellen differenzieren sich weiter in Thrombozyten, Erythrozyten, Monozyten und Granulozyten. Aus den lymphatischen Vorläuferzellen entstehen durch weitere Differenzierung die B- und T-Zellen sowie die natürlichen Killerzellen.

Ungefähr 70-80% der ALL im Kindesalter haben ihren Ursprung in der B-Zellreihe, 15-17% stammen aus der T-Zellreihe. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Kinder mit hoch

hyperdiploider ALL untersucht. Diese Form der ALL entstammt der B-Zellreihe. Daher wird im Folgenden auf die Leukämie der B-Zellreihe genauer eingegangen.

Die B-Zellen durchlaufen mehrere Reifestadien, wobei die Pro-B-Zelle die erste Zellpopulation in der Entwicklungslinie darstellt. Durch Reifungsprozesse entsteht anschließend die Prä-B-Zelle, gefolgt von der unreifen und der reifen B-Zelle.

Die Einteilung der akuten lymphatischen Leukämie der B-Zellreihe erfolgt anhand des Oberflächen-Antigenmusters nach der EGIL-Klassifikation (*European Group for the Immunological Characterization of Leukemias*), siehe Tabelle 1. Bei der ALL der B-Zellreihe sind die leukämischen Klone meist CD34, CD19, CD10 und cCD79 positiv. Das heißt, dass die Zellen diese Antigene auf ihrer Oberfläche exprimieren. Immunglobuline (sIg –*surface* Immunglobulin) befinden sich hingegen bei den meisten Typen nicht auf der Zelloberfläche, diese sind nur bei der reifen B-ALL zu finden. Die Prä-B-ALL weist die schweren zytoplasmatischen μ -Ketten (μ H) auf. Insgesamt werden vier Subtypen der B-Zell-ALL anhand des Immunphänotyps unterschieden (Tabelle 1). Die Einteilung erfolgt hier in die reife B-ALL und die B-Vorläufer-ALL. Zur B-Vorläufer-ALL zählen die Pro-B-ALL, die Common-ALL sowie die Prä-B-ALL. Die Common-ALL macht insgesamt 2/3 aller ALL-Formen im Kindesalter aus, woraus sich auch der Name erklärt. Die schlechteste Prognose haben Pro-B-ALL Patienten [9], [10].

Immunphänotyp Marker	Pro-B-ALL	Common ALL	Prä-B-ALL	B-ALL
	B-Vorläufer-ALL			reife B-ALL
CD34	+	+	+	+
CD19	+	+	+	+
CD10	-	+	-	±
TdT	+	+	+	+
cCD79	+	+	+	+
μ H	-	-	+	+
sIg	-	-	-	+

Tab. 1: Einteilung der B-Zell-ALL Subtypen anhand bestimmter Oberflächenmarker. In Anlehnung an [9], [10]. + bedeutet, dass der entsprechende Marker exprimiert wird, - bedeutet, dass der entsprechende Marker nicht exprimiert wird. Bei den verschiedenen B-ALL-Formen werden unterschiedliche Oberflächenmarker exprimiert.

Morphologie

Die Diagnose einer ALL kann mittels einer mikroskopischen Untersuchung des Knochenmarks gestellt werden. Für die Klassifikation der ALL kann die FAB-Klassifikation (*French-American-British*) herangezogen werden. Hierbei wird

zwischen drei verschiedenen Morphologien unterschieden: L1, L2, L3 (siehe Tabelle 2). FAB L1 ist die häufigste Form mit 84% und tritt vor allem bei Kindern auf. FAB L2 liegt in 15% vor und tritt vor allem bei Erwachsenen auf. FAB L3 liegt nur in 1% vor und entspricht der reifen B-ALL. Die Klassifikation bezieht sich nur auf morphologische Kriterien. 85-89% der Kinder, die an der ALL erkrankt sind, weisen den FAB L1 Subtyp auf [11].

FAB-Klassifikation	Charakteristika
FAB L1	Kleine Zellen mit einheitlicher Größe, gleichförmiges Chromatin, regelmäßig vorfindbare Nucleoli, leichte Basophilie, sehr wenig Zytoplasma
FAB L2	Große Zellen mit unterschiedlicher Größe, ungleichförmiges Chromatin, Zellkern mit unregelmäßigen Spalten und Kerben, große Nucleoli, starke Basophilie, variables Zytoplasma
FAB L3	Große Zellen mit einheitlicher Größe, gleichförmig fein gesprenkeltes Chromatin, ovaler bis runder Zellkern, viel Zytoplasma, sehr starke Basophilie, viele Vakuolen im Zytoplasma

Tab. 2: FAB-Klassifikation der ALL anhand mikroskopischer Untersuchung [12]. Dabei weisen die unterschiedlichen FAB-Klassifikationen L1, L2, L3 verschiedene morphologische Charakteristika auf.

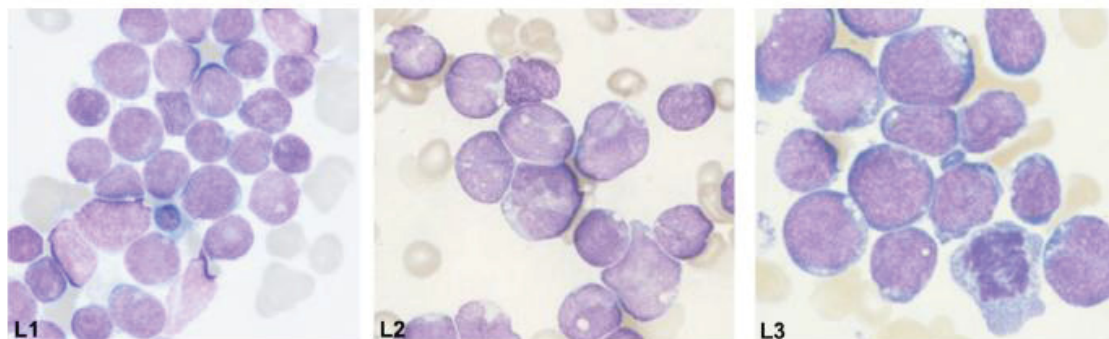


Abb. 2: Knochenmarkaspirat von Patienten mit Wright-Giemsa-Färbung [12]. Typische Morphologie der in Tab. 2 beschriebenen FAB-Subtypen im lichtmikroskopischen Bild. L1: Knochenmarkaspirat von einem Patienten mit ALL. Es zeigen sich kleine Zellen mit einheitlicher Größe, gleichförmiges Chromatin, regelmäßig vorfindbare Nucleoli, sehr wenig Zytoplasma. L2: Knochenmarkaspirat von einem Patienten mit ALL. Es zeigen sich große Zellen mit unterschiedlicher Größe, ungleichförmiges Chromatin, der Zellkern zeigt sich mit unregelmäßigen Spalten und Kerben, große Nucleoli, variables Zytoplasma. L3: Knochenmarkaspirat von einem Patienten mit Burkitt-Lymphom. Es zeigen sich große Zellen mit einheitlicher Größe, gleichförmig fein gesprenkeltes Chromatin, ovaler bis runder Zellkern, sehr starke Basophilie, viele Vakuolen im Zytoplasma.

Genetische Aberrationen

Leukämiezellen weisen häufig zyto- und molekulargenetische Veränderungen auf (Abbildung 3). Im Allgemeinen werden strukturelle und numerische Veränderungen unterschieden. Zu den strukturellen Veränderungen gehören Deletionen, Insertionen, Inversionen und Translokationen. Bei Deletionen kommt es zu einem Verlust, bei Insertionen zu einem Zugewinn von Nukleotiden. Inversionen sind durch die Drehung eines DNA-Abschnitts gekennzeichnet. Translokationen führen zu einem Austausch von Genabschnitten zwischen zwei Chromosomen. Bei den typischen ALL-assoziierten Translokationen entsteht in der Regel ein neues Gen, ein sogenanntes Fusionsgen. Zu den numerischen Veränderungen gehören Hypo- und Hyperdiploidien. Diese sind durch den Verlust beziehungsweise den Zugewinn ganzer Chromosomen gekennzeichnet. Darüber hinaus ist eine Aufteilung der akuten lymphatischen Leukämie anhand submikroskopischer genetischer Veränderungen möglich. Diese genetischen Veränderungen tragen zur Entstehung der Leukämie bei, indem zelluläre Funktionen verändert werden [13].

Die Patienten, die im Rahmen dieser experimentellen Studie untersucht wurden, weisen einen hoch hyperdiploiden Chromosomensatz auf. In dieser Patientengruppe sind nur wenige Fälle bekannt, die typische Leukämie assoziierte Translokationen, wie zum Beispiel *BCR-ABL1/t(9;22)(q34;q11)*, *ETV6-RUNX1/t(12;21)(p13;q21)* oder *TCF3-PBX/t(1;19)(q23;p13)* aufweisen [14], [15]. Da das Ziel dieser Arbeit lautet, genetische submikroskopische Variationen bei Kindern mit hoch hyperdiploider ALL nachzuweisen, werden im Folgenden die numerischen und submikroskopischen Veränderungen erläutert.

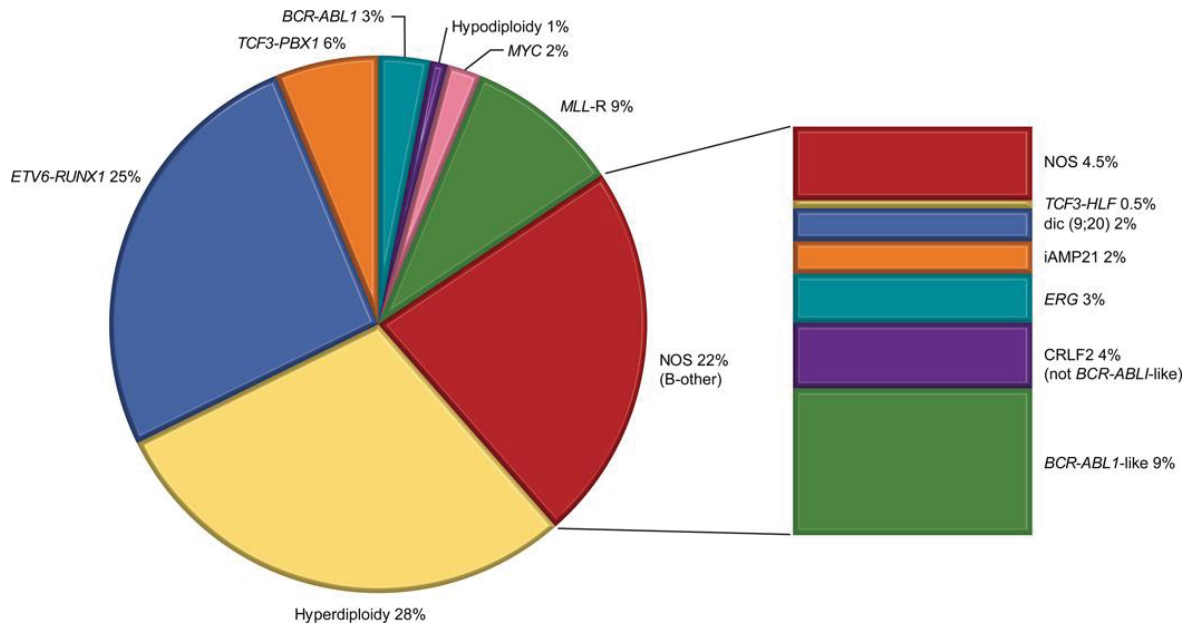


Abb. 3: Zyto- und molekulargenetische Veränderungen bei der pädiatrischen B-ALL [16]. Das Diagramm zeigt die Häufigkeit aller wesentlichen Subtypen der B-ALL. Hierbei ist zu erkennen, dass t(12;21) mit 25% die häufigste chromosomale Translokation in der B-ALL darstellt. Hierdurch entsteht das Fusionsgen *ETV6-RUNX1*. Zu den weiteren Translokationen, die zu einer B-ALL führen können, zählen zum Beispiel *BCR-ABL1*, *TCF3-PBX1* und *MLL*-Rearrangierungen. Mit 28% ist die Hyperdiploidie die zweithäufigste genetische Veränderung in der B-ALL. Hypodiploidie macht nur ca. 1% aus. Im Jahre 2004 waren 22% der Subtypen unbekannt (als *B-other* im linken Diagramm gekennzeichnet). Seitdem sind verschiedene Subtypen klassifiziert worden, die in dem Balkendiagramm rechts dargestellt sind. NOS (*not otherwise specified*), nicht näher bezeichnet.

Hypodiploidie

Als hypodiploid bezeichnet man eine akute lymphatische Leukämie mit einer Chromosomenzahl von weniger als 44 Chromosomen. Diese liegt in ca. 1% der Fälle vor, bei denen Kinder an der ALL erkrankt sind. Die hypodiploide akute lymphatische Leukämie ist durch ein schlechtes Ansprechen auf die Therapie gekennzeichnet [17]. Man kann die Hypodiploidie weiterhin aufteilen in die fast-haploide (24-31 Chromosomen) und in die niedrig-haploide Hypodiploidie (32-44 Chromosomen). Die niedrig-haploide ALL ist mit Deletionen und Sequenzmutationen, die den RAS Signalweg aktivieren, assoziiert. Veränderungen im RAS Signalweg können zu einer erhöhten Proliferation der Tumorzellen führen. Niedrig-haploide und fast-haploide ALL sind häufig begleitet von inaktivierenden Veränderungen der *IKAROS* Gene *IKZF2* und *IKZF3* [18]. Diese sind an der B-Zell-Differenzierung beteiligt. Außerdem sind bei der niedrig-haploiden ALL häufig Mutationen in den Tumorsuppressoren *TP53* (codiert p53) und *RBI* anzutreffen, die zu einem Funktionsverlust dieser Gene führen [13]. Die genannten Veränderungen in den

IKAROS Genen *IKZF 2* und *3* und den Tumorsuppressoren sind spezifisch für die Hypodiploidie, da diese Mutationen ansonsten selten in der B-ALL vorkommen.

Hyperdiploidie

Als Hyperdiploidie bezeichnet man eine akute lymphatische Leukämie mit einer Chromosomenzahl von 51-67 Chromosomen. Diese ist die häufigste numerische Veränderung in der B-Vorläufer-ALL bei Kindern. Sie tritt mit einer Häufigkeit von 25-30% auf [14], [19], [20]. Die hoch hyperdiploide ALL wurde das erste Mal in den frühen achtziger Jahren von Kaneko et al. (1981) beschrieben. Hierbei wurde beschrieben, dass diese Form der Leukämie nur bei Kindern auftritt und diese meistens das vierte Lebensjahr noch nicht erreicht haben. Außerdem zeichnete sie sich durch ein gutes Therapieansprechen und eine lange Remission aus [21]. Diese Erkenntnis wurde bereits 1967 von Fritz Lampert beschrieben, der einen Zusammenhang zwischen der vermehrten DNA in den Zellen und der erfolgreichen Chemotherapie vermutete [22]. Es besteht allerdings in 15% der Fälle eine Neigung zu Rezidiven mit schlechter Prognose [20,23], [24]. Die hoch hyperdiploide ALL ist im Allgemeinen durch eine niedrige Zahl der weißen Blutkörperchen gekennzeichnet. Der Median liegt bei $<10^{10}/l$ in den meisten Studien. Die meisten Patienten weisen bei Diagnosestellung eine Anämie auf mit einem durchschnittlichen Hämoglobingehalt von 60 bis 70 g/l. Darüber hinaus leiden sie oft an einer Thrombozytopenie [20]. Des Weiteren ist die Hyperdiploidie durch eine Vervielfachung bestimmter Chromosomen in mehr als der Hälfte der Fälle gekennzeichnet. Dazu zählen die Chromosomen X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 und 21. Die Chromosomen 8 beziehungsweise 5 sind in 40% beziehungsweise in 30% vervielfacht. Die restlichen Chromosomen sind nur in ca. 10-20% vervielfacht. Am häufigsten wird das Chromosom 21 vervielfacht. Es lassen sich in über 90% der Fälle drei oder mehr Kopien des Chromosoms finden. Das Chromosom 21 liegt meist als Tetrasomie und sogar manchmal als Pentasomie vor [20]. Die restlichen Chromosomen sind meist in dreifacher Ausführung vorhanden, es kommen aber auch Tetrasomien vor, vor allem bei den Chromosomen 14, 18 und X [25]. Abbildung 4 verdeutlicht die beschriebenen Vervielfachungen.

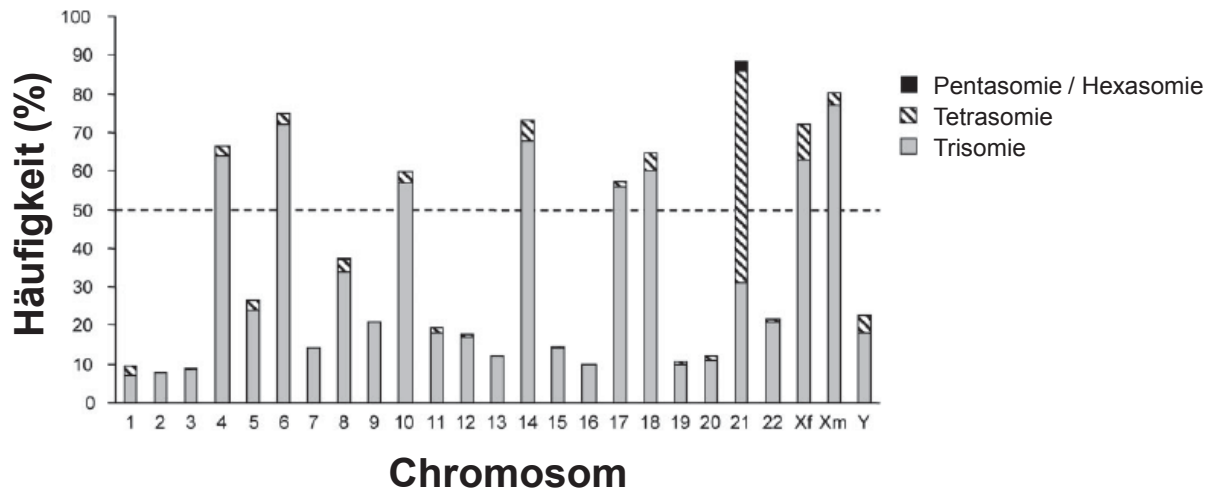


Abb. 4: Vervielfachung spezifischer Chromosomen bei der hoch hyperdiploiden ALL. In Anlehnung an [20]. Auf der x-Achse sind die Chromosomen dargestellt, die vervielfacht vorliegen. Die y-Achse zeigt die Häufigkeit in %, mit der die vervielfachten Chromosomen auftreten. Dabei sind vor allem die Chromosomen X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 und 21 vervielfacht. Am häufigsten wird das Chromosom 21 vervielfacht. Es liegt dabei meist als Tetrasomie vor, Pentasomien kommen aber auch vor. Die restlichen Chromosomen sind meist in dreifacher Ausführung vorhanden.

Eine interessante Frage ist, wie die Zellen hoch hyperdiploid werden. Theoretisch sind vier Ansätze möglich, wie Abbildung 5 verdeutlicht.

Der erste mögliche Weg führt über einen fast-haploiden Chromosomensatz (24-31 Chromosomen). Seit 1970 ist bekannt, dass fast-haploide Fälle häufig zwei Klone besitzen, einen fast-haploiden und einen hoch hyperdiploiden Karyotypen [26]. So zeigte Harrison et al. (2004), dass dies bei 65% der Fälle vorliegt [17]. Somit besteht die Möglichkeit, dass die hoch hyperdiploiden Fälle aus fast-haploiden entstehen, indem es zu einer Verdopplung des Chromosomensatzes und anschließendem Verlust der ursprünglichen Stammzelllinie kommt, siehe auch Abbildung 5 [27]. Dies würde allerdings bedeuten, dass vor allem Disomien oder Tetrasomien vorliegen. Des Weiteren würden alle Disomien aus zwei exakt identischen Chromosomen bestehen, es lägen also uniparentale Disomien vor. Bei allen Tetrasomien wäre ein 2:2 Verhältnis vorhanden [20]. In FISH Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass fast-haploide Klone in hoch hyperdiploiden Fällen vorkommen [28], [29]. Somit entsteht ein Teil der hoch hyperdiploiden Fälle aus einem fast-haploiden Chromosomensatz. Diese ALL zeichnet sich, im Gegensatz zu der Mehrheit der hoch hyperdiploiden Fälle, durch eine schlechte Prognose aus. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in der vollständigen Penetranz schädlicher homozygoter Mutationen [30]. Für den größten Teil trifft dieser Weg über den fast-haploiden Chromosomensatz allerdings nicht zu, da bei der hoch hyperdiploiden ALL meist ein

heterozygoter Chromosomensatz vorliegt und häufig Trisomien vorkommen. Dies spricht demnach gegen diesen Ursprung [20].

Eine andere Möglichkeit ist die Entstehung über eine Tetraploidie mit anschließendem Verlust von Chromosomen. Bei der Tetrasomie besteht ein 2:2 Verhältnis, da die homologen Chromosomen verdoppelt wurden. Werden nun die vier Chromosomen wieder zu zwei Chromosomen reduziert, entstehen in einigen Fällen zwei identische homologe Chromosomen, siehe auch Abbildung 5 [20]. In der Tat besteht bei der hoch hyperdiploiden ALL bei einem tetrasomen Chromosomensatz immer ein 2:2 Verhältnis [31], [32]. Des Weiteren wiesen diverse Studien mit 52 hoch hyperdiploiden Fällen 30% der Disomien identisch homologe Chromosomen auf [32], [33], [34]. Auch wenn diese Frequenz nicht notwendigerweise der reellen entspricht, spricht dieses Ergebnis trotzdem für den beschriebenen möglichen Ursprung der Hyperdiploidie.

Ein weiterer möglicher Weg zur Hyperdiploidie ist der sequentielle Zuwachs von Chromosomen in aufeinander folgenden Zellteilungen. Dieser Weg kann allerdings für die meisten Fälle ausgeschlossen werden, da ein 3:1 Verhältnis der Chromosomen vorliegen müsste, siehe auch Abbildung 5. Es würde nämlich zur Verdreifachung des einen homologen Chromosoms kommen, bei Retention des anderen [20].

Der letzte mögliche Mechanismus ist der simultane Zuwachs aller zusätzlichen Chromosomen während einer Zellteilung. Dieser Mechanismus ist für die meisten Fälle der Hyperdiploidie der wahrscheinlichste. Es würde bei Tetrasomien ein 2:2 Verhältnis der Chromosomen vorliegen und es würden keine zwei identischen homologen Chromosomen bestehen, siehe auch Abbildung 5 [20]. Dies ist in den meisten hoch hyperdiploiden Fällen der Fall [31], [32], [33], [34]. Demnach entsteht die Hyperdiploidie entweder über den tetraploiden Weg (30%) oder über den simultanen Zuwachs (70%) [20].

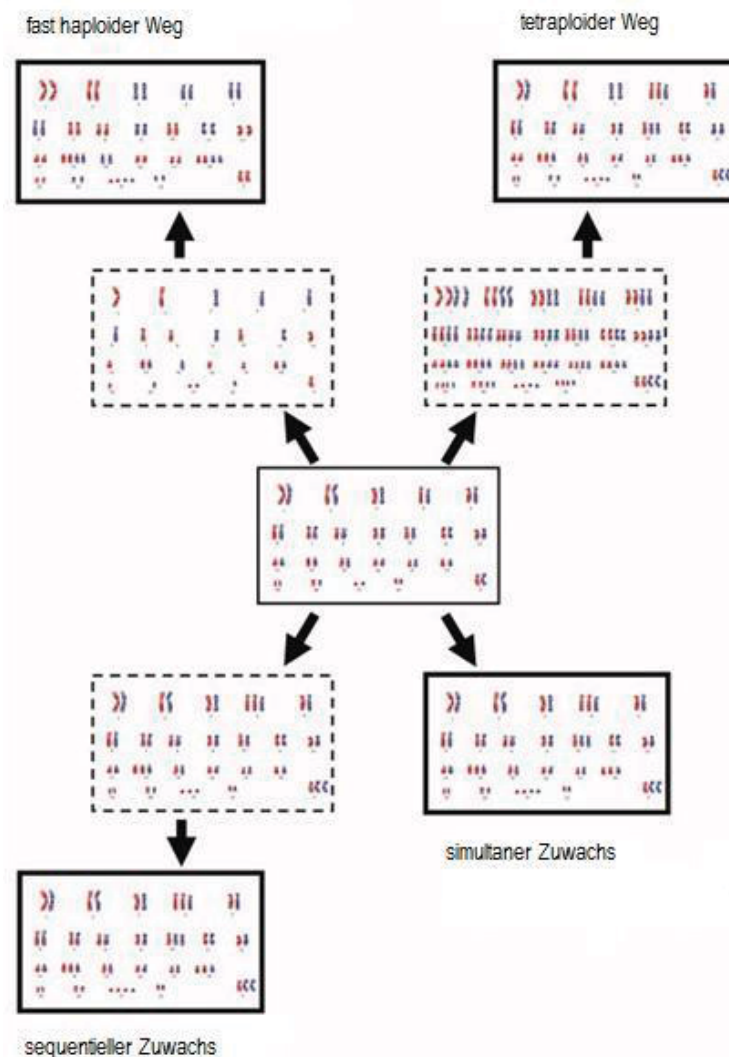


Abb. 5: Die vier möglichen Wege zur Entstehung des hoch hyperdiploiden Chromosomensatzes. In Anlehnung an [20]. Dabei kann der hyperdiploide Chromosomensatz entweder über den fast-haploiden Weg oder den tetraploiden Weg entstehen. Ebenso ist die Entstehung aus einem sequentiellen oder einem simultanen Zuwachs möglich.

Obwohl diese Form der ALL die häufigste im Kindesalter ist, ist sehr wenig zu ihrer Ätiologie bekannt. Bis jetzt wurden keine spezifischen Risikofaktoren seitens der Eltern identifiziert, die direkt mit der hoch hyperdiploiden ALL assoziiert sind. Allerdings wurde ein Zusammenhang zwischen dem elterlichen Konsum von Amphetaminen, Marihuana oder Kokain und RAS Mutationen beim Kind festgestellt [35]. Diese RAS Mutationen sind vor allem bei Kindern, die an der hoch hyperdiploiden ALL erkrankt sind, vermehrt zu finden. Demnach kann man indirekt darauf schließen, dass der Gebrauch dieser Drogen das kindliche Risiko an einer hoch hyperdiploiden ALL zu erkranken erhöht [36], [37]. Darüber hinaus beschrieb Hjalgrim et al. (2004), dass Kinder mit einem Geburtsgewicht von mehr als 4000 Gramm ein erhöhtes Risiko haben. Der genaue Mechanismus ist bis

jetzt unbekannt [38]. Ein vermindertes Risiko für ein Kind an einer ALL zu erkranken liegt allerdings nach Wiemels et al. (2005) vor, wenn das Kind pränatal Nikotinrauch ausgesetzt wurde. Man nimmt an, dass die toxischen Stoffe des Rauches dem hyperdiploiden Klon schaden. Allerdings sind weitere Studien nötig, um diese These zu bestätigen [36].

Die Hyperdiploidie entsteht mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit bereits im Uterus. Dies konnte unter anderem an Zwillingen gezeigt werden, die an der hoch hyperdiploiden ALL erkrankt waren. Des Weiteren konnte dies auch durch das Vorhandensein von Trisomien in Nabelschnurblutzellen dargelegt werden [39], [40], [41].

Da die meisten Kinder aber erst im Verlauf ihres Lebens erkranken, liegt der Verdacht nahe, dass die Hyperdiploidie alleine nicht ausreicht, um eine Leukämie auszulösen. Hierfür sind zusätzliche Ereignisse, wie zum Beispiel submikroskopische genetische Veränderungen, nötig [20], [34], [42], [43], [44].

Submikroskopische Genetische Veränderungen bei der hoch hyperdiploiden ALL

Paulsson et al. zeigten, dass eine Korrelation zwischen dem chromosomalen Zuwachs und einer vermehrten Genexpression bei der hoch hyperdiploiden ALL besteht. Weiterhin beschrieben sie, dass der vermutlich erste pathogenetische Schritt in der Entwicklung einer Leukämie die hoch Hyperdiploidie selbst ist [42]. Allerdings machten auch sie, neben anderen Publikationen deutlich, dass noch weitere genetische Veränderungen zur Entstehung der Leukämie nötig sind [34], [42], [43], [44], [45]. Dabei handelt es sich vor allem um Mutationen, die den RAS-Signalweg oder Gene betreffen, die für die Histonmodifikation verantwortlich sind [37], [42], [43], [44], [45]. Tabelle 3 zeigt eine Auswahl besonders häufig vorkommender Mutationen und ihre Konsequenz in der hoch hyperdiploiden ALL.

Gen	Mutation	Konsequenz der Mutation	Referenz
<i>KRAS</i>	Punktmutation mit Aminosäureaustausch in den Codons 12,13,61,117 und 146	KRAS besitzt eine intrinsische GTPase Aktivität. Die Mutation führt zur Daueraktivierung und damit zur unkontrollierten Proliferation der Zellen	[36], [37], [42], [43], [44], [45], [46], [47]
<i>NRAS</i>	Punktmutation mit Aminosäureaustausch in den Codons 12,13 und 61	NRAS besitzt eine intrinsische GTPase Aktivität. Die Mutation führt zur Daueraktivierung und damit zur unkontrollierten Proliferation der Zellen	[36], [37], [42], [43], [44], [45]
<i>FLT3</i>	Punktmutation mit Aminosäureaustausch in den Codons 835 und 836	Daueraktivierung der Rezeptor Tyrosinkinase führt zur Aktivierung von zahlreichen Effektormolekülen, die eine Rolle in der Differenzierung, Proliferation und Apoptose von hämatopoetischen Zellen spielen	[37], [42], [43], [44], [45], [48], [49], [50]
<i>IKZF1</i>	Fokale Deletion oder Sequenz Mutation	Transkriptionsfaktor für die Entwicklung der hämatopoetischen Stammzelle in die lymphatische Vorläuferzelle. Die Mutation führt zu einem Funktionsverlust	[13], [34], [42], [44]
<i>CREBBP</i>	Fokale Deletion und Sequenzmutation	Abschwächung der Funktion des kodierten Proteins führt zu einer geringeren Acetylierung von Histon- und nicht Histon Proteinen sowie einer geringeren Bindung von Substraten	[13], [42], [43], [44], [45]

Tab. 3: Häufige submikroskopische genetische Mutationen bei der hoch hyperdiploiden akuten lymphatischen Leukämie.

1.1.3 Behandlung der ALL

In Deutschland existieren zwei Therapieoptimierungsstudien auf Basis derer die Behandlung von Kindern, die an ALL erkrankt sind, durchgeführt wird. Diese Studien nennen sich AIEOP-ALL BFM 2009 und COALL-07-03 (aktuell COALL-08-09).

Die ALL-Patienten dieser Arbeit wurden nach den Therapieplänen der COALL-07-03-Studie behandelt. Hierbei handelt es sich um eine multizentrische Therapieoptimierungsstudie, die prospektiv durchgeführt wird [51]. Sie soll die Prognose von Kindern, die an der akuten lymphatischen Leukämie erkrankt sind, verbessern. Die Patienten werden hierbei zunächst einem Niedrig- (*low risk*) oder einem Hochrisikozweig (*high risk*) zugeordnet. Bei Hochrisiko-Patienten besteht eine Indikation zur Stammzelltransplantation. Die Kriterien zur Einteilung sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Kriterien	Low Risk	High Risk
Leukozyten im peripheren Blut bei Diagnose	< 25/nl	> 25/nl
Alter	>1 bis < 10 Jahre	>= 10 Jahre
ALL Subtyp	Common ALL oder Prä-B-ALL	Pro-B-ALL oder T-ALL
Remission	Komplette Remission an Tag 29	Keine Remission an Tag 29
Translokation	keine Translokation 4/11	Translokation 4/11

Tab. 4: Kriterien zur Einteilung in den Niedrig- (*low risk*) und den Hochrisikozweig (*high-risk*) der akuten lymphatischen Leukämie [51]. Dabei spielen die Leukozytenzahl bei Diagnose, das Alter der betroffenen Kinder, der ALL- Subtyp, das Erreichen der Remission nach 29 Tagen sowie vorhandene Translokationen eine Rolle.

Eine zweite Stratifizierung erfolgt für die *Low Risk* Patienten anhand des *in vitro* Resistenzprofils. Hierbei wird die Empfindlichkeit der Leukämiezellen gegenüber bestimmter Medikamente (Prednisolon, Vincristin, Asparaginase) geprüft. Daraus ergibt sich der sogenannte PVA Score, anhand dessen die Therapie angepasst wird. Die Patienten erhalten randomisiert entweder Daunorubicin (DNR) oder Adriamycin (ADR) in der Vorphase, um anhand des Therapieansprechens die Äquivalenz der Medikamente zu testen. [51]

Die stationäre Chemotherapie gliedert sich in verschiedene Phasen, die sich in Dauer, Art und Intensität der Chemotherapie unterscheiden und eine vollständige Heilung des

Patienten erreichen sollen: Die Vorphase, die Induktionstherapie, die Intensivphase und die Reinduktionstherapie. Nach einer Therapiepause von zwei Wochen beginnt die Dauertherapie, die der Patient bis zum Ablauf von zwei Jahren zu Hause durchführen kann. Die folgenden Abschnitte sind in Anlehnung an [1] erstellt worden.

Die Vorphase besteht aus einer maximal einwöchigen Chemotherapie mit Daunorubicin (DNR) oder Adriamycin (ADR) und Methotrexat (MTX). Mit dieser Phase wird die Therapie der ALL eingeleitet und dient der Reduktion der Leukämiezellen. Durch die allmähliche Reduktion der Leukämiezellen, wird die Gefahr eines Tumorlyse-Syndroms reduziert. Dieses kann dann entstehen, wenn eine hohe Zahl von Leukämiezellen in kurzer Zeit zerstört wird. Aus den toten Leukämiezellen erfolgt eine Freisetzung von Stoffwechselprodukten. Fällt eine große Menge dieser Stoffwechselprodukte an, führt dies zu einer Schädigung des Organismus.

Die Induktionsphase besteht aus einer intensiven Chemotherapie. Hier werden mehrere Medikamente (zum Beispiel Prednison, Vincristin, Daunorubicin, L-Asparaginase, Methotrexat, Cyclophosphamid, Cytarabin, 6-Mercaptopurin) eingesetzt. Diese Phase verfolgt das Ziel, dass ein Großteil der Leukämiezellen zerstört wird. Wird dieses Ziel erreicht, spricht man von einer Remission. Eine Remission ist erreicht, wenn die Zahl der Leukämiezellen im Knochenmark unter 5% beträgt. Des Weiteren muss das Blut wieder auf normale Art und Weise gebildet werden. Die Dauer der Induktionsphase liegt bei ca. fünf bis acht Wochen und bei etwa 98% der Kinder kann eine Remission erzielt werden.

Auf die Induktionsphase folgt die Intensivphase. Dieser Abschnitt der Therapie dauert ca. zwei bis vier Monate. Diese Phase hat zum einen das Ziel weitere Leukämiezellen zu töten und zum anderen dient sie der Erhaltung der Remission. Hierzu werden andere Medikamentenkombinationen angewendet. Diese Medikamentenkombination besteht meist aus 6-Mercaptopurin und Methotrexat. Darüber hinaus beinhaltet diese Phase, dass das zentrale Nervensystem präventiv behandelt wird. Dies soll vor der Ansiedlung oder Ausbreitung der leukämischen Zellen im Gehirn oder Rückenmark schützen. Hierbei wird durch eine Lumbalpunktion Methotrexat in den Liquor gegeben.

Bei der Reinduktionstherapie werden ebenfalls Zytostatika Kombinationen in hoher Dosis verabreicht (zum Beispiel Vincristin, Adriamycin, L-Asparaginase, Thioguanin,

Dexamethason). Diese Therapie soll bewirken, dass die leukämischen Zellen gänzlich vernichtet werden und sie soll das Risiko an einem Rezidiv zu erkranken minimieren.

Nach einer Therapiepause schließt sich die Dauertherapie an. Diese Therapie ist eine mildere Chemotherapie mit 6-Mercaptopurin und Methotrexat. In der Regel dauert diese Phase der ALL Therapie zwei Jahre und kann ambulant durchgeführt werden. Das Ziel hierbei ist es, auch die bis jetzt überlebenden Leukämiezellen zu töten.

Die ereignisfreie 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei Kindern mit ALL liegt bei der COALL-07-03-Studie bei 75%. Im Rahmen dieser Behandlung sind Knochenmarkspunktionen aus klinischen Gründen zu verschiedenen Zeitpunkten erforderlich (zum Beispiel zum Zeitpunkt der Diagnose, in der Remission und gegebenenfalls beim Auftreten eines Rezidivs).

In einigen Fällen wird eine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt, zum Beispiel wenn der Patient schlecht auf eine Chemotherapie anspricht, die Rezidivgefahr erhöht ist oder der Patient bereits ein Rezidiv erlitten hat. [1]

1.2 Mesenchymale Stammzellen (MSC)

1.2.1 Biologie

Im Knochenmark liegen zwei Stammzelltypen vor. Zum einen die hämatopoetischen Stammzellen, die für die Blutbildung verantwortlich sind, zum anderen die mesenchymalen Stammzellen (MSC). Die erste Beschreibung der mesenchymalen Stammzellen erfolgte 1968 durch Friedenstein et al.. Hierbei wurden die mesenchymalen Stammzellen als eine anhaftende, spindelförmige und den Fibroblasten ähnliche Zellpopulation beschrieben. Sie fungieren als Vorläuferzellen für die Knochenbildung [52]. Des Weiteren besitzen mesenchymale Stammzellen das Vermögen sich *in vitro* zu Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten zu differenzieren (Abbildung 6). Sie fungieren somit als Vorläuferzellen für unter anderem Fettgewebe, Knorpel und Knochen [53], [54]. Ebenfalls konnte *in vitro* eine Transdifferenzierung in Zellen des Ektoderms sowie des Endoderms erreicht werden (Abbildung 6) [55], [56], [57]. Die mesenchymalen Zellen besitzen ein hohes Proliferationspotenzial. So können aus wenigen Millilitern Knochenmarkaspirat innerhalb von 4-6 Wochen Zellmengen von 10^8 - 10^9 mesenchymaler Stammzellen erzeugt werden [58]. Die Zellen bilden Kolonien, sobald sie mit einer

geringen Dichte kultiviert werden (colony-forming unit fibroblasts-CFU-F), wodurch sich ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung zeigt [59].

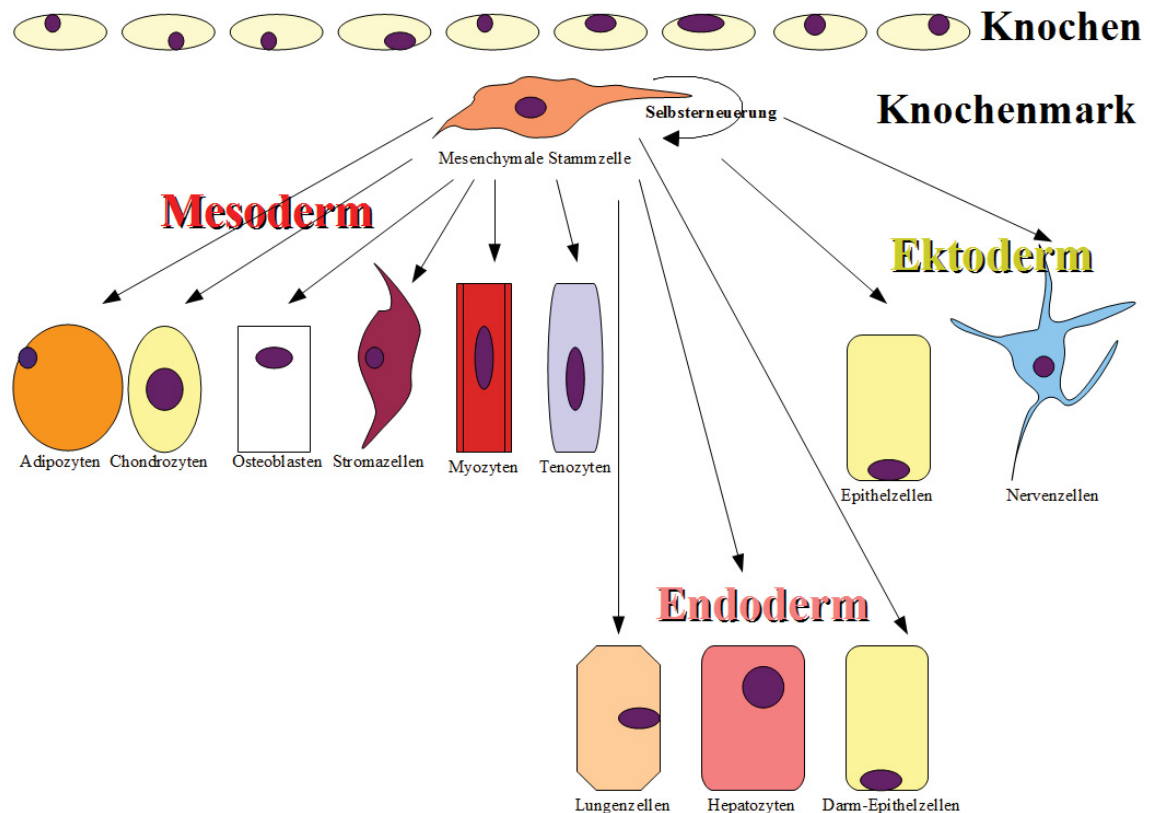


Abb. 6: Differenzierung mesenchymaler Stammzellen. Abbildung nach [60], modifiziert von [61]. Mesenchymale Stammzellen sind neben der Selbsterneuerung dazu fähig, sich in Zellen des Mesoderms, des Endoderms sowie des Ektoderms zu entwickeln.

Die Isolation mesenchymaler Stammzellen kann, neben dem Knochenmark, auch aus anderen Geweben, wie zum Beispiel der Plazenta, Nabelschnurblut oder aus anderen Organen (zum Beispiel Lunge, Leber, Milz) erfolgen [62]. Ein spezifischer Marker für die mesenchymalen Stammzellen existiert nicht. Deshalb erfolgt die Identifikation von mesenchymalen Stammzellen anhand mehrerer Charakteristiken: Mesenchymale Stammzellen besitzen einen den Fibroblasten ähnlichen Phänotyp, proliferieren in Kultur (sie formen dabei, wie oben beschrieben, CFU-F), heften an Zellkulturmaterial und können sich in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten entwickeln. Tabelle 5 zeigt ferner bestimmte Oberflächenmarker, für die die mesenchymalen Stammzellen positiv beziehungsweise negativ sind [53]. Diese können für die Charakterisierung mittels der durchflusszytometrischen Messung genutzt werden.

Oberflächenmarker	Positiv/Negativ
CD3	-
CD11a,b	-
CD13	+
CD14	-
CD18 Integrin $\beta 2$	-
CD20	-
CD29	+
CD31 PECAM	-
CD34	-
CD44	+
CD45	-*
CD49b Integrin $\alpha 2$	+
CD49d Integrin $\alpha 4$	-
CD49e Integrin $\alpha 5$	+
CD50 ICAM3	-
CD54 ICAM1	+
CD62E E-Selectin	-
CD71 Transferrin Rec	+
CD73 SH3	+
CD90 Thy-1	+
CD105 Endoglin	+
CD106 VCAM	+
CD117	-
CD133	-
CD166 ALCAM	+
Nestin	+
p75 LNGR	+
HLA ABC	+
HLA DR	induzierbar durch IFN
SSEA 3,4	+
TRK (ABC)	+

Tab. 5: Oberflächenmarker bei mesenchymalen Stammzellen. In Anlehnung an [63]. Dabei weisen die mesenchymalen Stammzellen die mit + markierten Oberflächenmarker auf. Die mit – markierten Oberflächenmarker werden hingegen von den mesenchymalen Stammzellen nicht exprimiert. Die Markierung -* steht für eine Expression des Oberflächenmarkers bei Isolierung, in Kultur wurde dieser jedoch nicht exprimiert.

Mesenchymale Stammzellen können für die Langzeitkultur von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen eingesetzt werden. Sie machen es möglich, dass diese Zellen *in vitro* expandieren können [58]. Auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen das Anwachsen hämatopoetischer Stammzelltransplantate verbessern. Dieser Effekt wurde in immundefizienten NOD/SCID Mäusen untersucht. Diesen Mäusen fehlen T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Daher stoßen sie die

Transplantate nicht ab. Nach subletaler Bestrahlung wachsen hämatopoetische Stammzellen von Menschen im Knochenmark der Mäuse an, proliferieren und differenzieren sich in myeloische und lymphatische Zellen. Bei gleichzeitiger Transplantation von mesenchymalen Stammzellen konnte außerdem das Anwachsen von humanen CD45-positiven Leukozyten in NOD/SCID Mäusen, bei denen hämatopoetische Stammzellen transplantiert worden waren, verbessert werden [64].

Des Weiteren bilden sie die „Nische“ für hämatopoetische Stammzellen *in vivo*. Somit kommt ihnen die Rolle eines kritischen Regulators für die gesamte Blutbildung zu [65].

1.2.2 Regeneratives Potenzial

Mesenchymale Stammzellen besitzen die Fähigkeit, die körpereigene oder endogene Regeneration bei Gewebeschäden zu stimulieren und somit die Regeneration in erheblichem Maße zu fördern. Dies konnte in mehreren Geweben und Organen (unter anderem Nervengewebe, Herzmuskelgewebe, Lebergewebe) nachgewiesen werden [66]. Auch in Tierexperimenten konnte das regenerative Potenzial der mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden. Zum einen wurden intrauterin mesenchymale Stammzellen in Mäuse mit Glasknochenerkrankung (Osteogenesis imperfecta) transplantiert. Dies reduzierte die Rate an spontanen Knochenbrüchen [67]. Klinisch kamen mesenchymale Stammzellen 1999 in diesem Zusammenhang zum Einsatz. Hierbei wurden Knochenmark und mesenchymale Stammzellen bei Kindern mit der Glasknochenerkrankung transplantiert. Auch hier konnte eine Verringerung der Knochenbrüche sowie ein schnelleres Knochenwachstum beobachtet werden [68]. Des Weiteren erhielten an Diabetes erkrankte Mäuse Infusionen mit mesenchymalen Stammzellen. Dies bewirkte eine Zunahme der Anzahl derjenigen β -Zellen, die Insulin produzieren, indem die Regeneration gefördert wurde. Daraus resultierte eine Senkung des Blutzuckers und eine Verbesserung der Diabeteserkrankung [69].

Auch bei avaskulären Nekrosen des Knochens bei Kindern nach steroidhaltiger Chemotherapie erhöhte der Einsatz von mesenchymalen Stammzellen bei der Therapie die Erfolgsraten.

Es ist wahrscheinlich, dass für die Regeneration in den meisten Fällen nicht primär die Plastizität der mesenchymalen Stammzellen verantwortlich ist, sondern die von ihnen sezernierten Signalmoleküle. Diese bewirken dann eine Geweberegeneration [58].

1.2.3 Immunmodulation

Eine weitere wichtige Eigenschaft der mesenchymalen Stammzellen ist die Hemmung der Proliferation und Funktion von Zelltypen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Dabei sind unter anderem Monozyten, natürliche Killerzellen, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Dendritische Zellen betroffen [70]. Dieser Mechanismus trifft vor allem auf die allogene Immunantwort zu. Diese ist T-Zell vermittelt und entsteht bei der Abstoßung von Organen nach Transplantationen oder bei der nach Stammzelltransplantation entstehenden Spender-Gegen-Empfänger-Erkrankung (*graft versus host disease*-GvHD). Eine wichtige Rolle spielt hierbei das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO). Dieses Enzym wird durch inflammatorische Zytokine stimuliert und in den mesenchymalen Stammzellen exprimiert. Es ist ein Tryptophan katabolisierendes Enzym, wodurch die Konzentration des Tryptophans verringert wird. Diese Tryptophanverarmung des Milieus führt zur Hemmung der T-Lymphozyten Proliferation, da T-Zellen Tryptophan für ihr Wachstum brauchen. Die dadurch erzielte immunsuppressive Wirkung der MSC tritt allerdings nur ein, wenn die Funktion durch inflammatorische Zytokine (zum Beispiel Interferon γ) aktiviert wird. Dies bedeutet, dass die Immunsuppression nur lokal stattfindet, was möglicherweise therapeutisch genutzt werden kann [71]. Auch *in vivo* konnte die immunsuppressive Eigenschaft der mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden. Bei Pavianen konnte gezeigt werden, dass durch Infusionen von mesenchymalen Stammzellen die Überlebenszeit von allogenen Hauttransplantaten verlängert werden konnte [72]. Des Weiteren konnte in NOD/SCID-Mäusen gezeigt werden, dass die wöchentliche Injektion von mesenchymalen Stammzellen eine GvHD verhindern kann. Hierzu injizierte man humane periphere Blutleukozyten, die ohne die zusätzliche Injektion von mesenchymalen Stammzellen eine GvHD auslösten [73].

Klinisch konnten mesenchymale Stammzellen unter anderem bei steroidrefraktärer GvHD bei Kindern eingesetzt werden. Es resultierte ein therapeutisches Ansprechen von bis zu 50% [58].

1.2.4 Mesenchymale Stammzellen in der Pathogenese der ALL

In einer Studie von Shalapour et al., wurde bei Kindern, die an einer ALL erkrankt waren, das Vorhandensein von Leukämie spezifischen Fusionsgenen wie zum Beispiel *ETV6-RUNX1* und *MLL*-Translokationen nicht nur in Leukämiezellen, sondern auch in

mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen. Dies war auch für *Ig-Gen Rearrangements* in mesenchymalen Stammzellen der Fall [74]. Dies zeigt, dass Leukämiezellen und mesenchymale Stammzellen gemeinsame genetische Veränderungen aufwiesen. Da sich sowohl leukämiespezifische Veränderungen und *Ig-Gen Rearrangements* in mesenchymalen Stammzellen nachweisen ließen, deutet dies darauf hin, dass sie in der Pathogenese und in der Pathophysiologie der Leukämie eine Bedeutung haben. Die genetischen Veränderungen blieben in den mesenchymalen Stammzellen bestehen, auch wenn die Kinder bereits Chemotherapien und Stammzelltransplantationen erhalten haben und klinisch wieder gesund waren. Demnach konnte weder eine Chemotherapie noch eine Stammzelltransplantation diese Zellen effektiv eliminieren. Somit ist eine Beteiligung an der Entstehung von Rezidiven möglich [74], [75]. Auch in anderen Studien wurde den MSC eine Rolle in der Pathogenese und in der Pathophysiologie der Leukämie zugesprochen [76], [77], [78]. Menendez et al. zeigten, dass die mesenchymalen Stammzellen von Kindern, die an einer MLL-AF4⁺ B-ALL erkrankt waren, das MLL-AF4 Fusionsgen besaßen und exprimierten [76]. Raaijmakers et al. demonstrierten durch eine Deletion der RNaseIII Endonuklease *Dicer1* in mesenchymalen Zellen bei Mäusen die Entwicklung eines Myelodysplastischen Syndroms und einer daraus hervorgehenden AML. *Dicer1* wird für die Biogenese der mikroRNA benötigt. Die mikroRNA determiniert das Schicksal hämatopoetischer Zellen und die *Dicer1*-abhängige Verminderung der mikroRNA bewirkt eine tumorartige Proliferation der Zellen [77]. Blau et al. wiesen chromosomale Aberrationen in 16% der mesenchymalen Stammzellen bei Patienten mit Myelodysplastischen Syndrom oder AML nach. Im Gegensatz dazu wurden bei gesunden Patienten keine chromosomale Aberrationen in den MSC gefunden [78].

Mögliche Mechanismen zur Erklärung der Entstehung aberranter mesenchymaler Stammzellen und Rezidiven zeigt Abbildung 7. Hierbei entsteht die erste genetische Aberration (hier *TEL/AML1=ETV6-RUNX1*) in einer prä-hämatopoetischen Vorläuferzelle. Es folgt eine Differenzierung entlang der hämatopoetischen (HSC) oder der mesenchymalen (MSC) Stammzelllinie. Durch die Differenzierung maligner Hämangioblasten oder durch die Transdifferenzierung hämatopoetischer Stammzellen zu mesenchymalen Stammzelle, könnte es zu einer Entstehung eines dynamischen Reservoirs von mesenchymalen Stammzellen kommen. Zu diesem dynamischen Reservoir könnten des Weiteren B-Vorläuferzellen beitragen, die sich in mesenchymale Stammzellen dedifferenzieren. Diese Dedifferenzierung könnte als eine Reaktion auf den

Selektionsdruck durch die Chemotherapie entstehen. Einige von diesen mesenchymalen Stammzellen wären durch das Vorhandensein des Fusionsgens und (aufgrund der Dedifferenzierung) des *Ig-Gen Rearrangements* charakterisiert (Abbildung 7). Durch weitere genetische Aberrationen in den präleukämischen Klonen entsteht ein *Pool* an heterogenen Leukämiezellen zum Diagnosezeitpunkt. Der die Chemotherapie überlebende Zellklon könnte von verschiedenen Zelle abstammen: Von einem leukämischen Klon, von einem präleukämischen Klon oder von den mesenchymalen Stammzellen. Abschnitt in Anlehnung an [75].

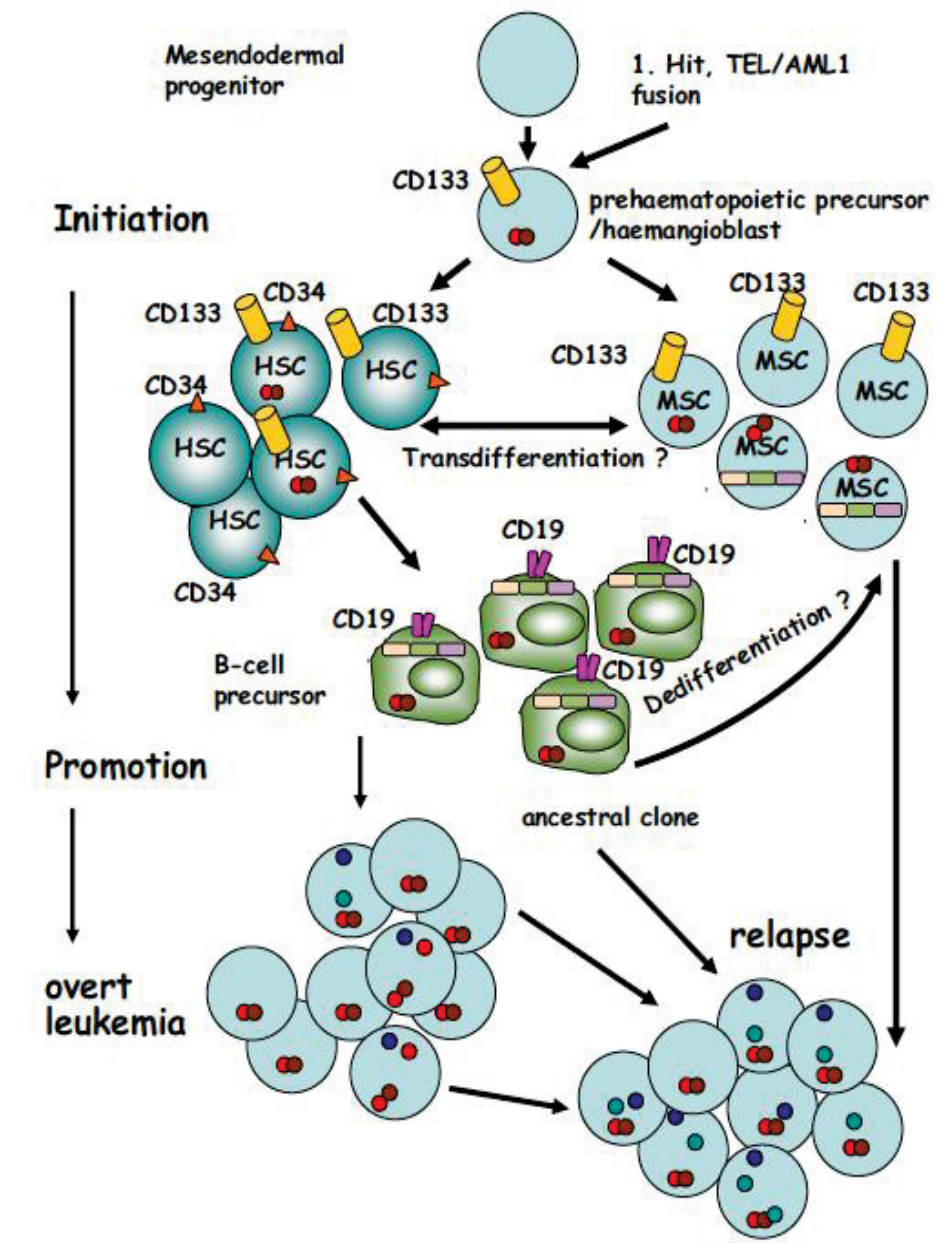


Abb. 7: Hypothetisches Modell zum zellulären Ursprung leukämischer Rezidive [75]. Hierbei entsteht die erste genetische Aberration (hier *TEL/AML1=ETV6-RUNX1*) in einer prä-hämatopoetischen Vorläuferzelle. Es folgt eine Differenzierung entlang der hämatopoetischen (HSC) oder der mesenchymalen (MSC) Stammzelllinie. Durch die Differenzierung maligner Hämatopoetischen, die Transdifferenzierung hämatopoetischer Stammzellen oder die Dedifferenzierung der B-Vorläuferzellen zu mesenchymalen Stammzellen, enthalten diese das Fusionsgen und sogar *Ig-Gen Rearrangements* (in der Abbildung als Kästchen in MSCs und B-Vorläuferzellen dargestellt). Durch weitere genetische Aberrationen in den präleukämischen Klonen entsteht ein *Pool* an heterogenen Leukämiezellen zum Diagnosezeitpunkt. Der die Chemotherapie überlebende Zellklon könnte von verschiedenen Zellen abstammen: Von einem leukämischen Klon, von einem präleukämischen Klon oder von den mesenchymalen Stammzellen.

Gesunde mesenchymalen Stammzellen können, wie in Kapitel 1.2.3 beschrieben, die T-Zell Funktion unterdrücken und über verschiedene Mechanismen eine Immunsuppression herbeiführen. Des Weiteren können sie die Funktion von Monozyten, natürliche Killerzellen, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Dendritische Zellen beeinflussen [70]. Somit könnten aberrante mesenchymale Stammzellen die physiologische Immunmodulation stören. Außerdem nehmen mesenchymale Stammzellen im Knochenmark Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung und Erhaltung von hämatopoetischen Zellen als Teil der regulatorischen Nische. Daher könnten mesenchymalen Stammzellen einen Beitrag leisten, eine „onkogene“ Nische auszubilden [77].

1.3 Zielsetzung

Die Hyperdiploidie (Chromosomensatz mit >51 Chromosomen) ist die häufigste numerische Aberration in der Prä-B-ALL. Diese Aberration allein ist jedoch nicht ausreichend, um eine Leukämieerkrankung zu verursachen. Dafür sind weitere sekundäre Veränderungen nötig. Alternativ zu Veränderungen in den Leukämiezellen, könnten auch Veränderungen in den mesenchymalen Stammzellen (MSC), die einen Bestandteil der hämatologischen Nische bilden, oder Keimbahnveränderungen hierbei eine Rolle spielen.

Um sekundäre Veränderungen in den Leukämiezellen, Veränderungen in den MSCs sowie eine mögliche Prädisposition der Patienten durch Keimbahnveränderungen zu untersuchen, sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Methode etabliert werden, die es erlaubt, genetische Veränderungen in verschiedenen Zelltypen von vier Patienten, die an einer hoch hyperdiploiden ALL erkrankt sind, zu untersuchen. Dazu sollten im Rahmen der ärztlichen Versorgung von jedem Patienten zunächst drei verschiedene Proben gewonnen werden: (1) eine Probe mononukleärer Zellen des Knochenmarks zum Diagnosezeitpunkt, (2) eine Hautbiopsie bei Einsetzen des Katheters, (3) eine Probe mononukleärer Zellen des Knochenmarks zum Zeitpunkt der Remission. Aus (1) sollten die leukämischen Blasten sowie durch Kultivierung die mesenchymalen Stammzellen der Patienten gewonnen werden. Die Hautbiopsie (2) sollte zur Kultivierung von Fibroblasten genutzt werden. Die Remissionsprobe (3) sollte als Kontrolle zu den leukämischen Zellen verwendet werden. Dazu sollten zunächst Kulturbedingungen und Qualitätskontrollen für MSCs und Fibroblasten etabliert werden. Aus den genannten vier Proben sollte DNA isoliert und Libraries für die Ganzgenomsequenzierung hergestellt werden. Über einen intra-individuellen Vergleich der Sequenzdaten sollten genomische Variationen in der Keimbahn, der Leukämie und im Stroma der Patienten analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen.

2.2 Patientenkollektiv und Proben

Die lokale Ethikkommission hat der Studie zugestimmt (Referenznummer 3432, 08.11.2010) und es liegt eine freiwillige Einwilligungserklärung der Erziehungsberechtigten der Patienten zur Teilnahme vor. Die Proben wurden ausschließlich im Rahmen der notwendigen ärztlichen Versorgung gesammelt und die Daten unterliegen dem Datenschutz. Tabelle 6 zeigt das Patientenkollektiv dieser Studie.

Pat.	Geschlecht	Alter bei Diagnose	ALL-Subtyp	Karyotyp	Translokationen (<i>BCR-ABL1</i> -, <i>ETV6-RUNX1</i> -, <i>MLL</i> -Translokationen)
1	männlich	2 Jahre	c-ALL	52,XY,+X,+6,+14,+17,+21,+21	keine
2	weiblich	1 Jahr	Prä-B-ALL	54,XX,+4,+7,+10,+11,+12,+17,+21,+21	keine
3	männlich	2 Jahre	Prä-B-ALL	52,XY,+11,+12,+21,+21,+22,+22	keine
4	männlich	2 Jahre	c-ALL	54~55,XY,+X,+4,+6,+14,+17,+18,+21,+21,+mar[cp3]	keine

Tab. 6: Das untersuchte Patientenkollektiv. Das Kollektiv besteht aus vier Patienten, darunter drei männliche und ein weiblicher Patient. Alle sind an einer B-ALL erkrankt, davon zwei Patienten an der c-ALL und zwei Patienten an der Prä-B-ALL. Sie weisen einen hoch hyperdiploiden Karyotyp auf. Das Alter der Kinder bei der Erstdiagnose lag zwischen 1-2 Jahren. Eine Untersuchung der Leukämieproben auf *BCR-ABL1*-, *ETV6-RUNX1*- und *MLL*-Translokationen wurde von Dr. Silja Röttgers durchgeführt und war für alle Patienten negativ.

Für die hier vorgestellte Studie wurden bei klinisch notwendigen Punktionen zusätzlich einige Milliliter Knochenmark der Patienten gewonnen, aus diesem konnten dann MNCs und MSCs isoliert werden. Die Leukämiebehandlung erfordert über einen längeren Zeitraum regelmäßige Zytostatikagaben. Dies erfolgt bei den meisten Patienten über einen

implantierten zentralvenösen Katheter. Bei der Implantierung dieses Katheters wurde eine Hautbiopsie entnommen.

Die Probenentnahme ist in der Abbildung 8 anhand des Behandlungsplans der Patienten, die nach dem COALL-07-03-Protokoll behandelt wurden, dargestellt.

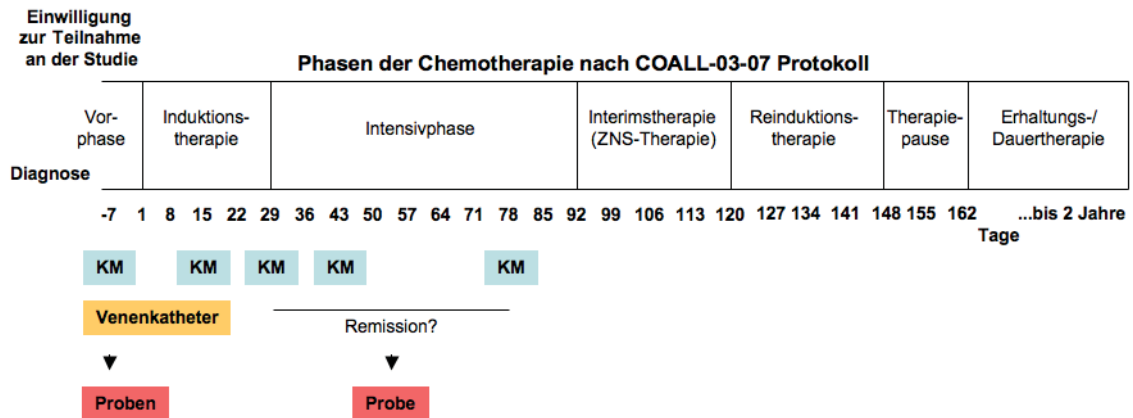


Abb. 8: Übersicht zur im Rahmen der vorgestellten Studie geplanten Probenentnahme. Abbildung überlassen von Dr. Ute Fischer, Klinik für Kinder- Onkologie, -Hämatologie und klinische Immunologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die Proben sollten zu verschiedenen Zeitpunkten der Therapie entnommen werden. Die Fibroblasten wurden hierbei durch Kultivierung aus Hautbiopsien, die bei der Implantierung eines zentralvenösen Katheters entnommen wurden, gewonnen. Im Rahmen von klinisch notwendigen Knochenmarkspunktionen (KM), wurden zu den verschiedenen Zeitpunkten der Therapie (am Diagnosetag „Tag -7“ sowie in der Remission) zusätzlich einige Milliliter Knochenmark entnommen.

Von einem Patienten wurden im Verlauf der Therapie die folgenden Proben asserviert:

1. Fibroblasten kultiviert aus Hautbiopsien
2. MSC kultiviert aus dem Knochenmark zum Diagnosezeitpunkt
3. MNC kultiviert aus dem Knochenmark zum Diagnosezeitpunkt
4. MNC kultiviert aus dem Knochenmark in der Remission

Abbildung 9 zeigt den Ablauf der Probenverarbeitung.

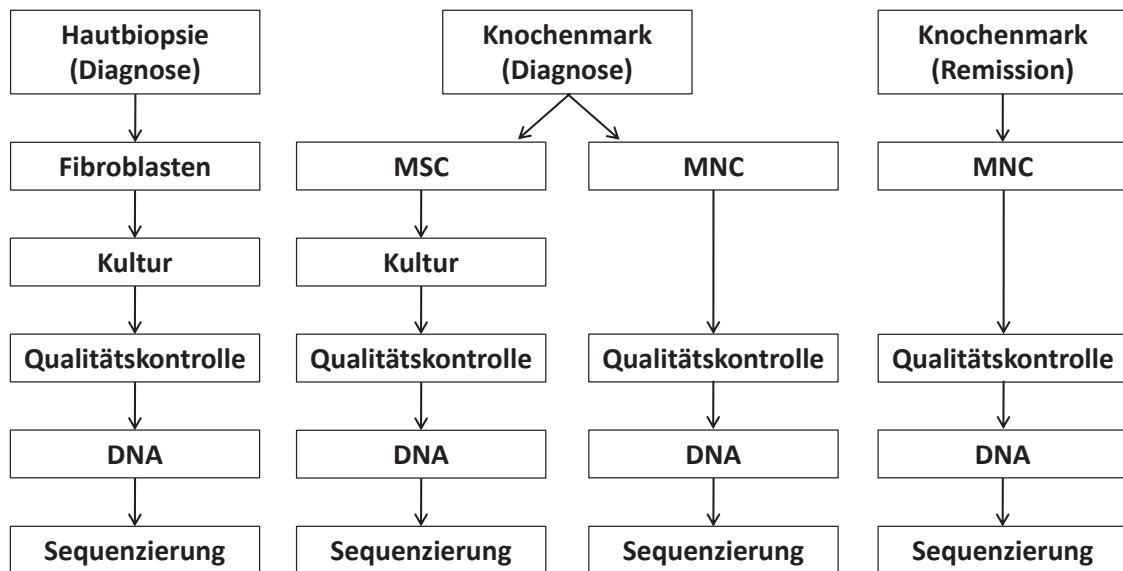


Abb. 9: Ablauf der Probenverarbeitung [126]. Nach Entnahme der Hautbiopsie zum Diagnosezeitpunkt, wurden die Fibroblasten in Kultur genommen. Nach dem Absolvieren einer durchflusszytometrischen Qualitätskontrolle, wurde die DNA aus den Fibroblasten isoliert und schließlich die Sequenzierung durchgeführt. Die aus dem Knochenmark gewonnenen mesenchymalen Stammzellen, durchliefen mindestens vier Passagen in der Zellkultur. Nach einer durchflusszytometrischen Qualitätskontrolle, absolvierten sie noch eine weitere Qualitätskontrolle, die Differenzierung. Anschließend wurde auch hier eine DNA Isolierung und die Sequenzierung durchgeführt. Die MNCs, die ebenfalls aus dem Knochenmark bei Diagnose und in der Remission gewonnen wurden, durchliefen zunächst eine klinische Routine-Qualitätskontrolle. Anschließend wurde die DNA isoliert und die Sequenzierung durchgeführt.

2.3 Zellbiologische Methoden

Die zellbiologische Arbeit wurde in einer Sicherheitsbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.3.1 Gewinnung von MSCs und MNCs aus dem Knochenmark

Zur mesenchymalen Stammzellgewinnung aus dem Knochenmark wurden die Knochenmarkaspirate (1-2 ml) der Patienten in 50 ml Probenröhrchen überführt. Dann wurde das doppelte Volumen Erythrozyten-Lysepuffer (Ammoniumchloridlösung; 8,29 g NH_4Cl , 1 g KHCO_3 , 0,0375 g $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, ddH_2O ad 1000 ml) hinzugefügt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Probenröhrchen auf 50 ml mit *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS, Lonza, Basel, Schweiz) aufgefüllt und fünf Minuten bei 400 g (Heraeus Multifuge 4KR, Thermo Scientific) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und dieser Vorgang zweimal wiederholt. Danach wurden

die Zellen in 15 ml Medium (DMEM (Sigma-Aldrich) ergänzt mit 50 ml Thrombozytenkonzentrat, 2 mM Glutamin, 10% Penicillin-Streptomycin, 50 µl Heparin) aufgenommen und in eine 75 cm²-Zellkulturflasche ausplattiert. Diese Zellkulturflaschen wurden bei 37°C/5% CO₂ in einem Inkubator (Thermo Forma 3110 Series II Water Jacket CO₂ Incubator, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) kultiviert. Durch das Anhaften an die Plastikoberfläche der Zellkulturflasche können die MSCs angereichert und expandiert werden.

Die MNCs aus dem Überstand (hauptsächlich leukämische Blasten) wurden am Folgetag abgenommen und in einem Proberöhrchen 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurden die pelletierten Zellen nochmals 15 Minuten bei 400 g zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5417 R Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten MNCs bis zur DNA Isolierung bei -80°C gelagert. Die MSCs wurden mit neuem Medium weiter kultiviert. Ist die Maximaldichte der MSC erreicht, sinkt die Proliferationsrate und die Zellen können seneszent werden oder sterben. Daher müssen diese vorher passagiert werden. Dies geschieht bei einer Konfluenz von 80-90%. Zunächst wurde das Medium abgenommen. Danach wurden 5 ml TrypLE Select 1X (GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) hinzugefügt und die Zellen für 5 Minuten trypsiniert. Dies diente dem Ablösen der adhärenenten Zellen von der Plastikoberfläche. Nach dem Ablösen der Zellen, wurden diese in gewünschter Verdünnung (1:3-1:5) in eine neue Zellkulturflasche mit neuem Medium überführt. Der Rest der Zellen wurde in ein Probenröhrchen mit 5 ml HBSS gegeben und 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Diese Zellen wurden kryokonserviert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, wurden die MSC in einer Lösung von 87,5% humanem Serum Albumin (Albunorm 5% Humanalbumin, Octapharma, Langenfeld) und 12,5% Dimethylsulphoxid (DMSO HYBRI-Max, Sigma-Aldrich) in ein Kryoröhrchen (Corning, New York, USA) aufgenommen. DMSO ist ein Gefrierschuttmittel und verhindert, dass sich Eiskristalle beim Einfrieren bilden und die Zellen schädigen. Die Kryoröhrchen werden anschließend in einen Kryocontainer (Cryo 1°C Freezing Container, Nalgene®labware, New York, USA) gelegt, der eine Kühlrate von 1°C/min garantiert, und bei -80°C aufbewahrt. Am Folgetag konnten die Kryoröhrchen aus dem Kryocontainer entfernt und bei -80°C gelagert werden.

2.3.2 Differenzierung und Färbung der MSC

MSC besitzen die Fähigkeit, sich in Adipozyten und Osteoblasten zu differenzieren. Diese Eigenschaft kann man zur Qualitätskontrolle nutzen. Zur Differenzierung in Adipozyten wurde ein Medium (Stem MACS AdipoDiff Media human, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) genutzt, dass die MSC zur Differenzierung und Reifung stimuliert. Hierzu wurden die Zellen in das Medium aufgenommen und verdünnt, bis eine finale Konzentration von 5×10^4 Zellen/ml erreicht wurde. Anschließend wurden 1,5 ml der Suspension auf eine 24-Loch-Zellkulturplatte transferiert. Die Zellen wurden bei $37^\circ\text{C}/5\% \text{ CO}_2$ inkubiert. Alle drei Tage wurde das Medium erneuert. Nach ca. drei Wochen bildeten sich große Vakuolen. Diese Vakuolen zeigten sich mit Lipiden gefüllt, die von den Adipozyten produziert werden.

Vor der Färbung der Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS (Phosphate buffered Saline, Dulbecco's PBS ohne Ca^{2+} & Mg^{2+} , Lonza) gewaschen und mit 4% (v/v) Formaldehyd für eine Stunde bei 4°C fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS, wurden die Vakuolen anschließend mittels 0,5% (w/v) Oil Red-O (Sigma-Aldrich) gefärbt. Dafür wurde aus der 0,5% (w/v) Oil Red-O Stocklösung eine Gebrauchslösung aus 6 ml der Stammlösung und 4 ml destilliertem Wasser hergestellt. Anschließend wurden nicht gelöste Pulverbestandteile durch Filtrierung entfernt. Die Zellen wurden mit der Lösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen mit destilliertem Wasser gewaschen und feucht gehalten. Die gefärbten Zellen wurden unter dem Mikroskop betrachtet und ein Foto wurde zur Dokumentation angefertigt.

Zur Differenzierung in Osteoblasten wurde als Medium das Stem MACS OsteoDiff Media human (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) benutzt. Die Zellen wurden in dem Medium aufgenommen und verdünnt, bis eine finale Konzentration von 3×10^4 Zellen/ml erreicht wurde. Anschließend wurden 1,5 ml der Suspension auf eine 24-Loch-Zellkulturplatte transferiert. Die Zellen wurden bei $37^\circ\text{C}/5\% \text{ CO}_2$ gelagert. Alle drei Tage wurde das Medium erneuert. Nach ca. 10 Tagen konnten die Osteoblasten mit ihrem kubischen Erscheinungsbild identifiziert werden.

Vor der Färbung wurde zunächst das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 100% (v/v) Ethanol für 15 Minuten bei -20°C fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS, wurden die Zellen mit 40 mM Alizarin-Rot (pH 4,1) (Alfa Aesar GmbH, Karlsruhe) für 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Osteoblasten bilden extrazelluläre

Matrixproteine, in die sich Calciumphosphat einlagert. Mit Alizarin-Rot können diese Einlagerungen sichtbar gemacht werden. Nach der Färbung wurden die Zellen mit destilliertem Wasser gewaschen und feucht gehalten. Die gefärbten Zellen wurden unter dem Mikroskop betrachtet und ein Foto wurde zur Dokumentation angefertigt.

2.3.3 Gewinnung von Fibroblasten aus Hautbiopsien

Die Hautbiopsien wurden zunächst mit einem sterilen Skalpell zerkleinert und mit HBSS gewaschen. Danach wurden die Hautstückchen in ein 15 ml Proberöhrchen mit 15 ml HBSS transferiert. Dieses wurde fünf Minuten bei 400 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und 1,5 ml Kollagenase Typ II (GIBCO/Invitrogen, 10 mg/ml in PBS) der Biopsie hinzugefügt. Dies diente der enzymatischen Gewebezerkleinerung der Probe. Nach Inkubation für 30 Minuten im Wasserbad (37°C), wurde die Probe mit HBSS gewaschen. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert und zum Schluss das Pellet in 7 ml Medium aufgenommen. Die Inkubation erfolgte in einer 25 cm²-Zellkulturflasche bei 37°C/5% CO₂. Bei Erreichen einer Konfluenz wurde die in 2.3.1 beschriebene Methode angewandt und ebenfalls eine Kryokonservierung durchgeführt.

2.3.4 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Analysen wurden mit dem BD FACSCalibur Flow Cytometer und der Software CellQuestTMPro (BD Biosciences) durchgeführt. Mittels der Durchflusszytometrie ist es möglich bestimmte molekulare und physikalische Eigenschaften von Zellen zu analysieren. Es wird eine Antigen-Antikörper-Reaktion mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpern durchgeführt. Dies ermöglicht, dass die spezifischen Oberflächenmarker bestimmt werden können. Die Zellen passieren durch hydrodynamische Fokussierung einzeln einen gebündelten Laserstrahl, der eine bestimmte Wellenlänge (488 nm) besitzt. Hierbei werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes angeregt und fallen wieder auf ein niedrigeres Energieniveau, indem sie Energie in Form von Licht abgeben. Ein Detektor (Photomultiplier) erfasst die optischen Signale. Die Anzahl der Photonen, die durch den Vorgang bestimmt wird, entspricht dabei der Anzahl der Antikörper, die an eine Zelle gebunden haben. Auf diese Weise werden die Zellen entdeckt, die spezifische Oberflächenmarker exprimieren. Darüber hinaus kann mithilfe der Lichtstreuung ermittelt werden, wie groß die Zellen sind und welche Granularität sie aufweisen. Dabei misst der *Forward Scatter* (Vorwärts-Streulicht) die Beugung des Lichtes im flachen Winkel und hängt somit von dem Volumen der Zelle ab. Der

Sideward Scatter (Seitwärts-Streulicht) wird von der Granularität der Zelle beeinflusst, weil er die Brechung des Lichts im rechten Winkel misst.

Die optischen Signale der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe werden in verschiedenen Detektoren gemessen. Da die meisten Fluoreszenzfarbstoffe jedoch kein monochromatisches Licht sondern ein ganzes Spektrum strahlen, erzeugen sie auch in anderen Detektoren einen schwachen Impuls. Deshalb muss eine Kompensation durchgeführt werden, sobald mehrere Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz kommen. Diese rechnerische Korrektur erfolgt auf Grundlage von Einzelfärbungen und trägt dazu bei, dass die Ergebnisse dadurch nicht beeinträchtigt werden.

Die Reinheit der aus dem Knochenmark isolierten MSC und der aus der Hautbiopsie isolierten Fibroblasten wurde mittels der Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei sollten diese Zellen die Oberflächenproteine CD73 und CD105 aufweisen. Negativ sollten sie für die hämatopoetisch-spezifischen Marker CD3, CD45 und CD20 sein. Mithilfe der Isotypkontrolle wurde eine unspezifische Färbung der Zellen gemessen. Zunächst wurden die Zellen durch Trypsinierung gelöst. Die gelösten Zellen wurden anschließend bei 400 g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes, wurden die Zellen in 1,5 ml PBS (Phosphate buffered Saline, Dulbecco's PBS ohne Ca^{2+} & Mg^{2+} , Lonza) resuspendiert. Danach wurden die Zellen gezählt. Pro Messung wurden 5×10^5 Zellen eingesetzt. Es wurden eine Isotypkontrolle, eine Kontrolle für die hämatopoetischen Marker sowie eine Kontrolle für die MSC/Fibroblasten Marker in separaten Ansätzen gemessen (siehe Tabelle 7). Die Antikörper wurden zu den Zellen gegeben und anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal gewaschen und in jeweils 200 μl PBS gelöst. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

Ansatz	Antikörper
Isotypkontrolle	IgG1-FITC / IgG1-PE (Beckman Coulter) IgG1-PerCP (Beckman Coulter)
hämatopoetisch-spezifisch	CD45-FITC (Beckman Coulter) CD3-PE (Beckman Coulter) CD20-PerCP (BD Biosciences)
MSC/Fibroblasten	CD105-FITC (BD Biosciences) CD73-PE (AbD Serotec, Puchheim)

Tab. 7: Für die durchflusszytometrische Untersuchung verwendete Antikörper. Dabei ist der Antikörper CD45 spezifisch für die Leukozyten, der Antikörper CD3 spezifisch für die T-Lymphozyten und CD20 spezifisch für die B-Lymphozyten.

2.3.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Mit dieser Methode können bestimmte Zielsequenzen in einer Zelle nachgewiesen werden. Dies erfolgt mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden. Es können mehrere Zielsequenzen mit unterschiedlich markierten Sonden gleichzeitig analysiert werden.

Zunächst wurde der Mitosehemmstoff Demecolcin (10 µg/ml, ColcemidTM, GIBCO Invitrogen) den mesenchymalen Stammzellen in der Zellkulturflasche hinzugefügt und für vier Stunden bei 37°C/10% CO₂ kultiviert. Danach wurden die Zellen fünfmal mit HBSS gewaschen, anschließend wurden sie trypsinisiert und für 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml HBSS resuspendiert. Danach wurden 9 ml KCl (2,8 g/l) langsam hinzugegeben und die Zellen im Wasserbad bei 37°C 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde 0,5 ml Fixierungsmittel (1:3 (v/v) Essigsäure/Methanol; auf -20°C gekühlt und frisch angesetzt) hinzugefügt und die Zellen mehrfach invertiert. Nachdem die Suspension für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde, wurde diese erneut für 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml Fixierungsmittel aufgenommen, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde viermal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen bei -20°C gelagert.

Die Proben wurden an das Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin Gießen und Marburg geschickt und von Frau Dr. Silja Röttgers bearbeitet. Zum Nachweis der Hyperdiploide wurden bei den Patienten die Anzahl der Kopien bestimmter Chromosome in den Zellen bestimmt. Da am häufigsten das Chromosom 21 in der Hyperdiploidie

vervielfältigt ist, wurde bei den Patienten dieser Arbeit vor allem die Anzahl der Kopien dieses Chromosoms mittels FISH analysiert. Des Weiteren wurden die Zellen auf die Translokationen *BCR-ABL*, *TEL-AML1* und *MLL* Translokationen untersucht.

2.4 Isolierung und Bestimmung der Reinheit und Konzentration der DNA

Die Isolierung der DNA erfolgte für die MSCs, die MNCs und die Fibroblasten mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Hierfür kamen jeweils maximal 5×10^6 Zellen zum Einsatz. Bei den MSCs und bei den Fibroblasten wurde die vierte Passage zur Isolierung der DNA verwendet. Die isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Anschließend wurden die Reinheit und die Konzentration der DNA mittels des NanoDrop-Spektralphotometers (NanoDrop ND 1000, peqlab biotechnology, Erlangen, Deutschland) spektrophotometrisch bestimmt. Die maximale UV-Absorption von Nukleinsäuren liegt bei etwa 260 nm (A260). Dies ist auf den Gehalt an aromatischen Nukleinsäuren zurückzuführen. Für den Proteingehalt ist der A280-Wert maßgebend. Aufgrund der aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin liegt das Absorptionsmaximum der Proteine bei etwa 280 nm. Das Verhältnis der beiden Werte A260/A280 gibt Information darüber, wie rein die DNA Lösung ist. Der optimale Wert liegt zwischen 1,8 und 2,0.

2.5 DNA Scheren und Library Herstellung

Das sogenannte DNA Scheren wurde mit dem CovarisTM S220 Focused-ultrasonicator (für microTUBEs) ausgeführt. Hierbei wurde die DNA in Fragmente von 500 Basenpaaren mittels Ultraschall zerkleinert. Die Proben mit einer DNA-Menge von 2 µg wurden zunächst mit EB (Elution Buffer, 10mM Tris-Cl, pH 8,5, Qiagen) zu einem Volumen von 130 µl aufgefüllt. Danach folgte das DNA Scheren gemäß des Protokolls (Programm: Target Base Pair 500). Die gescherte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Die anschließende Library Herstellung wurde anhand des Protokolls mit dem SPRIworks Fragment Library Kit I (für Illumina Genome Analyzer) und dem SPRIworks System I for Illumina Genome Analyzer (Beckman Coulter) durchgeführt (Illumina, San Diego, USA). Hierbei wurden mithilfe des Gerätes DNA Bibliotheken hergestellt. Die fragmentierte

DNA wurde zunächst gereinigt, und anschließend wurde Adenin der DNA angehängt. Darauf wurde sie erneut gereinigt und die Adapter für die Sequenzierung der DNA hinzugefügt. Anschließend wurde nochmals eine Größenselektion durchgeführt. Der Vorgang wird durch die folgende Abbildung 10 verdeutlicht.

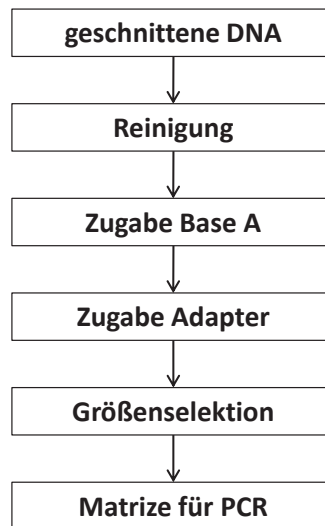


Abb. 10: Ablauf zur Herstellung der DNA Bibliotheken [126]. Die fragmentierte DNA wurde zunächst gereinigt. Im nächsten Schritt wurde Adenin der DNA angehängt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Adapters für die Sequenzierung. Nachdem eine Größenselektion durchgeführt wurde, entstand die fertige Matrize für die PCR.

2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mithilfe der PCR wird ein definierter DNA-Abschnitt amplifiziert. Die PCR diente der Vervielfältigung der DNA Bibliotheken für die spätere Sequenzierung.

Die DNA wird zunächst durch Erhitzen in zwei Einzelstränge getrennt. Darauf binden die komplementären Primer sequenzspezifisch an die DNA. Für diese Reaktion ist das Abkühlen der Temperatur erforderlich. Die DNA Polymerase synthetisiert von den Primern aus die komplementären Stränge zur DNA. Somit wird der gewünschte DNA Abschnitt verdoppelt. Dieser Ablauf wird einige Male wiederholt, sodass es letztlich zu einer vielfachen Amplifikation einer definierten DNA Sequenz kommt.

Im Rahmen der Arbeit wurde die Finnzymes' Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase ist eine Kombination aus der Pfu-Polymerase (Pyrococcus Enzym mit Korrekturlese-Funktion) und einer prozessivitätssteigernden Domäne. Diese Polymerase arbeitet in der 5'-3' Polymerase Aktivität sowie in der 3'-5' Exonuklease Aktivität und ist

der Taq-Polymerase, die klassischerweise für die PCR verwendet wird, hinsichtlich der Fehlerfreiheit und der Genauigkeit überlegen.

Für alle PCR Reaktionen wurden jeweils 5 µl mit einer DNA Menge von 2 µg verwendet und mit 45 µl Reaktionsmix gemischt. Dieser Reaktionsmix bestand aus:

- 18 µl Nuklease-freies ddH₂O
- 1 µl Primer PE 1.0
- 1 µl Primer PE 2.0
- 25 µl Phusion Master Mix mit HF Buffer

Für die PCR Reaktionen wurde ein Thermocycler (GeneAmp PCR system 2700, Applied Biosystems, Kalifornien, USA) eingesetzt. Die PCR Reaktionen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt (Tabelle 8):

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
Initialisierung	98°C	30 sec.
Denaturierung	98°C	40 sec.
Hybridisierung	65°C	30 sec.
Elongation	72°C	45 sec.
Finale Elongation	72°C	5 min
Ende	4°C	∞

} 12 Zyklen

Tab. 8: Ablauf der PCR mit einzelnen Schritten. Zuerst erfolgte eine Initialisierung von 30 Sekunden bei einer Temperatur von 98°C. Dies diente der Sicherstellung, dass die DNA Stränge und die Primer getrennt voneinander vorliegen. Im Anschluss wurde die Denaturierung für 40 Sekunden bei derselben Temperatur durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C für 30 Sekunden, die anschließende Elongation bei 72°C für 45 Sekunden. Die letzten drei Schritte wurden für 12 Zyklen durchgeführt. Danach folgte die finale Elongation bei 72°C für 5 Minuten. Bei einer Temperatur von 4°C endeten die PCR Reaktionen.

2.7 Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Gelextraktion

Die Agarose-Gelelektrophorese erlaubt eine Auftrennung der in der PCR erzeugten DNA-Fragmente sowie eine Untersuchung ihrer Größe.

Es wurde eine Konzentration von 2% Agarose (Biozym LE, Hessisch Oldendorf) in 1× TAE (Tris-Acetat-EDTA, BIO-RAD, München) verwendet. Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich) wurde in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zu der 2%igen-Agarose-Lösung hinzugegeben. Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren zwischen die Basen der DNA und

können durch UV-Licht angeregt und die DNA dadurch sichtbar gemacht werden. Als Elektrophoresepuffer wurde 1× TAE und als Ladepuffer/Blaumarker wurde die 6X Orange Loading Dye Solution (Fermentas, Waltham, USA) verwendet. Das Niedersinken der Proben in die Taschen des Agarosegels wird durch den Ladepuffer gewährleistet. Für das Sichtbarwerden des Verlaufes der Gelelektrophorese, ist der Blaumarker verantwortlich. Als Größenstandard wurde die GeneRuler™ 100 bp ladder (Fermentas) benutzt.

Zur Auftrennung der DNA Fragmente wurde eine Spannung von 70 V über 90 Minuten angelegt. Danach wurden die aufgetrennten DNA Fragmente mit dem UV-Transilluminators (Gel iX Imager, intas, Göttingen) visualisiert und dokumentiert. Die Libraries wurden mit einer Größe von 450-500 Basenpaaren ausgeschnitten.

Die DNA Extraktion erfolgte anschließend mit dem QIAquickGel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Die Quantitäts- sowie die Qualitätsbestimmung der DNA erfolgte mit dem Agilent High Sensitivity DNA Kit.

2.8 Sequenzierung

Bevor der eigentliche Sequenziervorgang gestartet wurde, wurden zunächst die DNA Bibliotheken auf eine Flusszelle (*Flow Cell*) geladen. Dies erfolgte mit Hilfe eines cBot (Illumina). Hierbei wurden zunächst die zu sequenzierenden DNA-Stücke durch Hybridisierung mit auf der Flusszelle immobilisierten Oligonukleotiden eingefangen. Danach wurde ein antiparalleler Strang des zu sequenzierenden DNA Moleküls synthetisiert. Als Primer hierfür diente das Oligonukleotid auf der Flusszelle. Diese erste Kopie wurde danach als Matrize für die weiteren Amplifikationsschritte genutzt, das Original wurde denaturiert. Die DNA Kopie wurde durch isothermale Brücken-Amplifikation amplifiziert. Durch die Vervielfältigung entstand auf diese Weise eine Vielzahl von DNA-Ansammlungen mit identischen DNA-Fragmenten, sogenannte Cluster. Die DNA-Brücken wurden anschließend denaturiert, der komplementäre Strang entfernt und das freie Ende des DNA-Stranges sowie das Ende des (an der Flusszelle gebundenen) Oligonukleotids blockiert. Anschließend erfolgte die Bindung des Sequenzier-Primers an die komplementäre Sequenz der DNA.

Für den Sequenziervorgang wurde eine DNA Polymerase und fluoreszenzmarkierte Nukleotide benutzt. Pro Sequenzierungszyklus konnte nur eine Base eingebaut werden, weil die Nukleotide als 3'-Terminatoren fungierten. Die eingebaute Base wurde für jeden Zyklus und jeden Cluster mittels Fluoreszenz-Mikroskopie bestimmt und jeweils mit einer

Kamera festgehalten. Darauf wurde der Farbstoff von den eingebauten Nukleotiden abgetrennt, sodass die nächste Base eingebaut werden konnte. Auf diese Weise konnte die Nukleotid-Abfolge der DNA bestimmt und gespeichert werden.

Die Sequenzierung wurde mit Illumina HiSeq 2000 durchgeführt. Die Rohdaten der Sequenzierung wurden mithilfe des *Burrows-Wheeler Alignment Tool* gegen das humane Referenzgenom hg19 (GRCh 37) aligniert [30].

2.9 Datenanalyse

Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mithilfe der *Single Nucleotide Polymorphism Database* (SNUPy) verarbeitet. Dies ist eine, von Sebastian Ginzl entwickelte, web-basierte Plattform, die es ermöglicht, die Ergebnisse der Sequenzierung abzufragen. Hierbei können verschiedene Filter ausgewählt werden, um eine Eingrenzung der Ergebnisse zu erzielen. Die Abbildung 11 beschreibt die Arbeitsschritte der SNUPy Plattform.

Mithilfe von Genecards (www.genecards.org), OMIM (www.ncbi.nlm.nih.gov/omim) und PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) wurden die gefundenen Gene weiter analysiert.

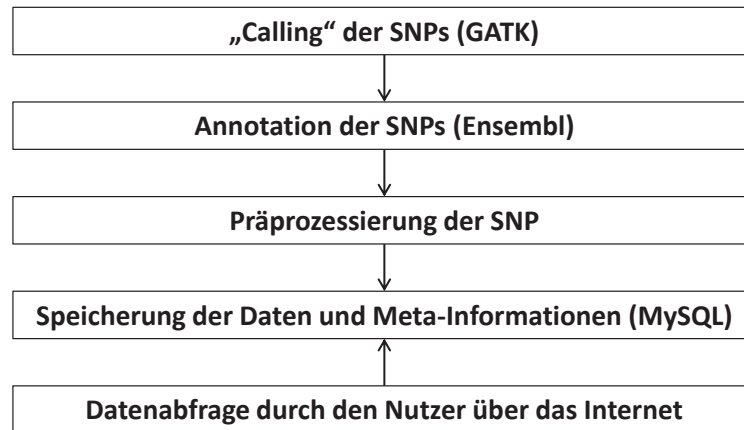


Abb. 11: Die SNUPy-Plattform. Abbildung modifiziert nach B.Sc. Sebastian Ginzel, Klinik für Kinder- Onkologie, -Hämatologie und klinische Immunologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Durch die Software GATK, die vom Broad-Institut (Cambridge, MA, USA) entwickelt wurde, werden Einzel-Nukleotid-Variationen identifiziert (ge-„called“). Es erfolgt eine Annotation dieser Einzel-Nukleotid-Variationen, auch SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) genannt, mithilfe der Ensembl Datenbank v70. Die Ensembl Datenbank ist ein Projekt von EMBL-EBI, Hinxton, Großbritannien und dem Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Großbritannien. In einer MySQL Datenbank werden die gefundenen SNPs gespeichert. Der Nutzer kann die SNPs über das Internet abfragen und zusätzlich filtern. Hierbei können die Gene, die Transkripte und die Proteine angezeigt werden, die Mutationen beinhalten. Zusätzlich kann die genaue Art der Mutation, zum Beispiel Verschiebung des Leserasters durch Insertion einer Base, bestimmt werden. Durch die Benutzung weiterer Softwaretools (SIFT, PolyPhen) kann auch die Konsequenz der Mutation für das Protein berechnet werden. Es besteht darüber hinaus eine Verbindung zu Datenbanken (HapMap (www.hapmap.org); 1000 Genomes (www.1000genomes.org)), die es erlauben, eine Aussage über die Häufigkeit der Mutation zu machen.

3 Ergebnisse

Es konnten von allen vier Patienten jeweils mononukleäre Zellen (MNC), mesenchymale Stammzellen (MSC) und Fibroblasten im Verlauf der Therapie gewonnen werden.

Die MNCs konnten aus dem Knochenmark zum Diagnosezeitpunkt der Leukämie und in der Remission isoliert werden. Die MSCs wurden ebenfalls aus dem Knochenmark gewonnen und durchliefen vier Passagen der Zellkultur. Dieser Prozess gewährleistete die Reinheit der MSCs durch ihren Selektionsvorteil, der durch die Adhärenz an Plastik gekennzeichnet ist. Des Weiteren sorgte das Durchlaufen mehrerer Passagen für das Absterben von hämatopoetischen Zellen, da diese nur kurz in der Kultur überleben können. Die Fibroblasten wurden im Rahmen der Katheter-Implantation entnommen und durchliefen ebenfalls vier Passagen der Zellkultur. Bei diesen Zellen ist das Durchlaufen mehrerer Passagen für die Reinheit der Zellen von geringerer Bedeutung, da eine Verunreinigung durch hämatopoetische Zellen selten ist. Trotzdem wurde dies durchgeführt, um eine gleiche Behandlung zu den MSCs zu gewährleisten.

Abbildung 12 zeigt die durchgeführten Arbeitsschritte, die auf die Isolierung und Kultur der Zellen folgten.

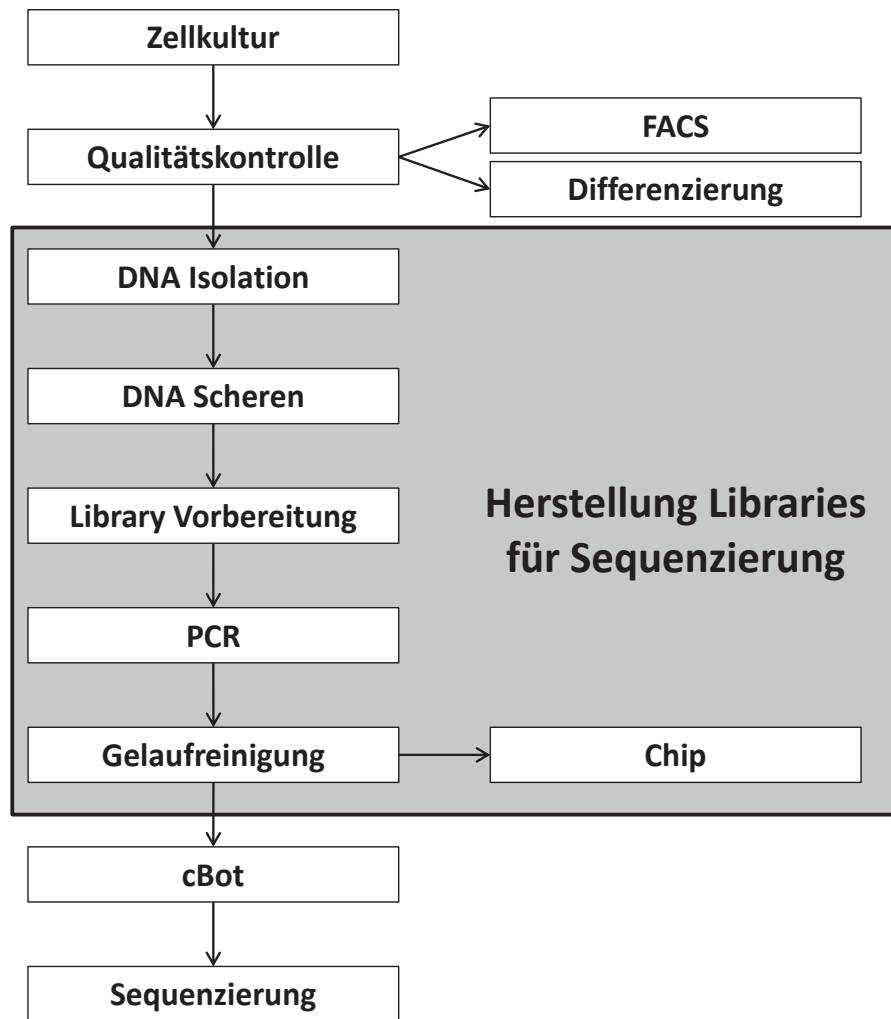


Abb. 12: Arbeitsschritte bis zur Sequenzierung [126]. Nach dem Durchlaufen der Zellkultur, erfolgte zunächst eine Qualitätskontrolle der Zellen. Diese bestand aus einer durchflusszytometrischen Untersuchung sowie aus der Differenzierung der Zellen. Darauf schloss sich die Herstellung der Libraries für die Sequenzierung an: Nachdem die DNA aus den Zellen isoliert wurde, erfolgte eine Zerkleinerung der DNA, gefolgt von der Library Vorbereitung. Durch PCR wurden die Libraries vervielfältigt, anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen, bei 450-500 Basenpaaren ausgeschnitten, die DNA isoliert und eine Größen-, Quantitäts- sowie die Qualitätsbestimmung durchgeführt. Nach der Ladung der DNA Bibliotheken auf eine Flusszelle (*Flow Cell*), erfolgte die Sequenzierung.

3.1 Qualitätskontrolle

3.1.1 Expression von charakteristischen MSC-Oberflächenmarkern auf den isolierten Stromazellen

Die bekannten Eigenschaften der mesenchymalen Stammzellen basieren vor allem auf Analysen von kultivierten Zellen. *In-vitro* ist eine Identifizierung der mesenchymalen Stammzellen aufgrund ihres Selbsterneuerungs- und ihres Differenzierungspotentials möglich [53], [79]. Da bis heute kein spezifischer Marker für die mesenchymalen

Stammzellen bekannt ist, der es ermöglicht, die Zellen direkt zu identifizieren und zu isolieren, musste dies auf andere Weise geschehen. Mesenchymale Stammzellen zeichnen sich durch die Eigenschaft aus, an Plastik zu adhären. Dies ermöglicht eine Unterscheidung zu anderen Zellen. Durch diese Eigenschaft und die gewählten Kulturbedingungen konnten die mesenchymalen Stammzellen nach Durchlaufen von mindestens vier Passagen in der Zellkultur identifiziert und isoliert werden. Zur Charakteristik der mesenchymalen Stammzellen gehört ihre spezielle phänotypische Morphologie, die in 1.2.1 beschrieben wurde [53]. Diese wurde regelmäßig während der Kultivierung über einen Zeitraum von ca. 12 Wochen analysiert. Hierzu wurden die Zellen unter dem Mikroskop beurteilt.

Des Weiteren wurde anschließend mithilfe der Durchflusszytometrie eine Qualitätskontrolle durchgeführt. Hierbei wurde die Reinheit der mesenchymalen Stammzellen und der Fibroblasten, die zuvor isoliert wurden, analysiert. Die Durchflusszytometrie erlaubte die Identifizierung der Zellen anhand spezifischer Oberflächenmarker.

Zur Kontrolle der unspezifischen Färbung der Zellen wurden Isotypantikörper verwendet. Diese Isotypkontrollen helfen dabei, die spezifische Bindung der Fluorochrom-markierten Antikörper von der unspezifischen Bindung zu unterscheiden. Abbildung 13 zeigt ein repräsentatives Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse von mesenchymalen Stammzellen eines Patienten nach vier Passagen in der Zellkultur. Hierbei wurden die Quadranten der Isotypkontrollen (IgG₁-PE/IgG₁-FITC und IgG₁-PERCP/IgG₁-FITC) so gewählt, dass 99,12% der Zellen im unteren linken Quadranten lagen (Abbildung 13A,B). Dies entspricht einem negativen Ergebnis. Abbildung 13C zeigt, dass 0% der Zellen das CD3-Antigen exprimierten. Dieses Antigen weisen vor allem T-Lymphozyten auf. Auch das CD20-Antigen wurde von 0% der Zellen exprimiert (Abbildung 13D). Das CD20-Antigen ist spezifisch für B-Lymphozyten. Somit lag keine Verunreinigung der MSC durch T- oder B-Lymphozyten vor. Letztere sind von besonderer Bedeutung, da die Patienten an einer B-ALL erkrankt sind. Sowohl Abbildung 13C als auch Abbildung 13D zeigen, dass der Anteil an Leukozyten bei ca. 0,16% lag, da Leukozyten charakteristischerweise das Antigen CD45 aufweisen. Die isolierten mesenchymalen Stammzellen und die Fibroblasten sollten die Antigene CD73 [80] und CD105 [81] aufweisen. Abbildung 13E verdeutlicht, dass 97,6% der Zellen die Oberflächenproteine CD73 und CD105

exprimierten. Tote Zellen wurden anhand ihrer kleinen Größe (FSC) und der geringen Seitwärtsstreuung des Lichts (SSC) von der Analyse ausgeschlossen (Abbildung 13F).

Bei allen MSC und Fibroblasten Kulturen ab Passage 4 ergaben sich eine Reinheit von >99% laut der durchflusszytometrischen Messung. Somit konnten aus allen Patienten sowohl mesenchymale Stammzellen als auch Fibroblasten zum Diagnosezeitpunkt isoliert werden. Dabei ist der Anteil der hämatopoetischen Zellen vor der vierten Passage der MSCs größer. Diese können aber, wie zu Beginn des Kapitels 3 beschrieben, nur kurz in der Zellkultur überleben. Fibroblasten wurden wie die MSCs behandelt, obwohl sie weniger Verunreinigungsprobleme aufweisen, damit ein späterer Vergleich zwischen Fibroblasten und MSCs möglich ist.

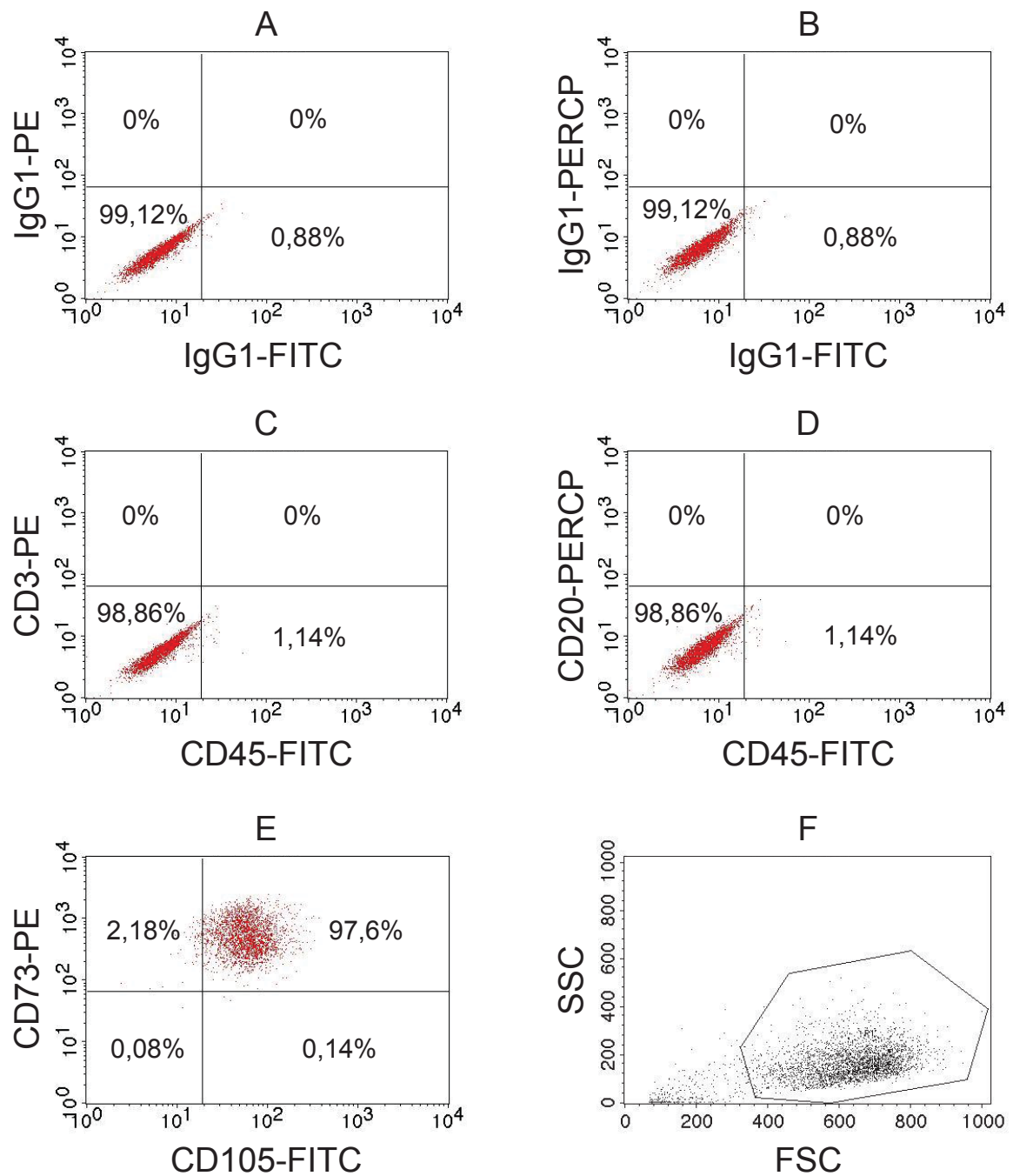


Abb. 13: Durchflusszytometrische Analyse von MSC (Passage 4) von Patient 1 [126]. (A) zeigt die Isotypkontrollen IgG1-PE und IgG1-FITC. (B) zeigt die Isotypkontrollen IgG1-PERCP und IgG1-FITC. Die Quadranten der Isotypkontrollen wurden so gewählt, dass 99,12% der Zellen im unteren linken Quadranten lagen und somit negativ waren. (C) zeigt, dass der hämatopoetische Marker CD3 bei 0% der Zellen exprimiert wurde. CD3 ist spezifisch für T-Lymphozyten. (D) zeigt, dass auch der hämatopoetische Marker CD20 bei 0% der Zellen exprimiert wurde. CD20 ist spezifisch für B-Lymphozyten. Der Anteil der Leukozyten liegt bei ca. 0,16% (C und D). (E) zeigt, dass die Oberflächenmarker CD73 und CD105 bei 97,6% der Zellen exprimiert wurden. (F) zeigt, dass tote Zellen durch *Gating* im Forward- Sideward Scatter von der Analyse ausgeschlossen wurden. Tote Zellen sind durch eine geringe Größe (FCS) und eine geringe Seitwärtsstreuung des Lichts (SSC) gekennzeichnet.

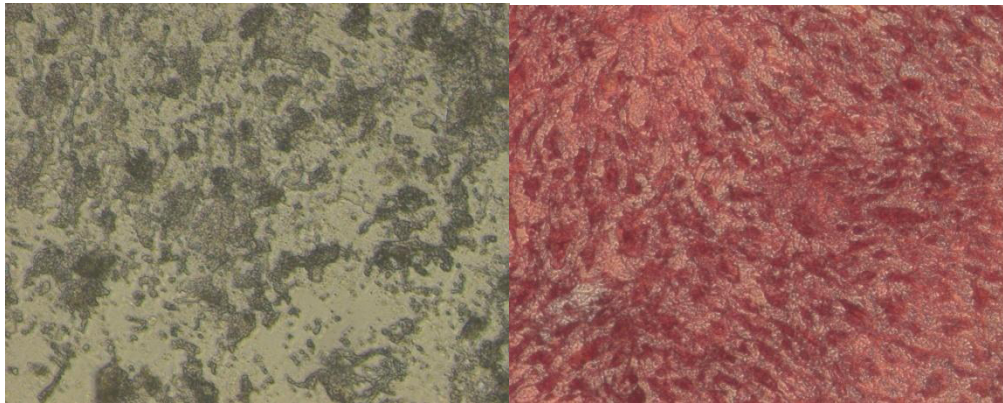
3.1.2 Multipotentes Differenzierungspotential der isolierten Stromazellen

Die Multipotenz der mesenchymalen Stammzellen konnte mit der Differenzierung in Osteoblasten und Adipozyten gezeigt werden (Abbildung 14).

Die Differenzierung der Zellen in Osteoblasten wurde zunächst ohne Färbung betrachtet. Anschließend wurden die Osteoblasten mit Alizarin-Rot gefärbt. Osteoblasten bilden extrazelluläre Matrixproteine, in die sich Calciumphosphat einlagert. Mit Alizarin-Rot können diese Einlagerungen sichtbar gemacht werden. Die Osteoblasten zeigten sich in einer kubischen Form. Es sind basophile Zellen, die für die Knochenbildung verantwortlich sind. Ihr Kern ist groß und hell. Untereinander stehen Osteoblasten über mehrere Nexus in Verbindung.

Die Differenzierung in Adipozyten begann mit der Bildung von Vakuolen. Diese Vakuolen zeigten sich mit Lipiden gefüllt, die von den Adipozyten produziert werden. Mittels Oil-Red-O wurden die Vakuolen gefärbt. Abbildung 14 zeigt, dass die Adipozyten in Gruppen dicht beieinander liegen. Diese Gruppen werden durch Fasern aus Bindegewebe zusammengehalten. Durch den großen Fetteinschluss werden der Zellkern und das Zytoplasma an den Zellrand geschoben.

A



B

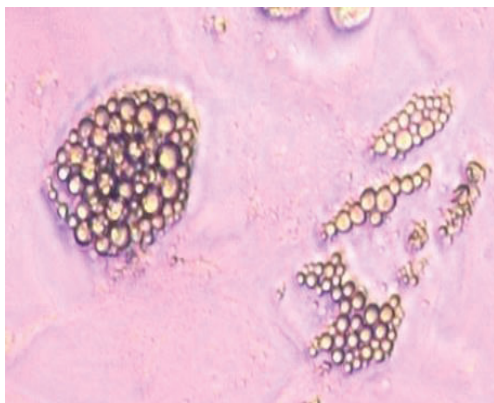


Abb. 14: Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen in Osteoblasten und Adipozyten, exemplarisch an den Zellen eines Patienten [126]. (A) Mesenchymale Stammzellen nach Differenzierung in Osteoblasten ohne Färbung (links) und mit Alizarin-Rot (rechts) in 100facher Vergrößerung. Osteoblasten sind basophile Zellen, die für die Knochenbildung verantwortlich sind. Osteoblasten bilden extrazelluläre Matrixproteine, in die sich Calciumphosphat einlagert. Mit Alizarin-Rot können diese Einlagerungen sichtbar gemacht werden. (B) Mesenchymale Stammzellen nach Differenzierung in Adipozyten mit Oil-Red-O Färbung in 400facher Vergrößerung. Mittels Oil-Red-O wurden die Vakuolen gefärbt, die mit Lipiden gefüllt sind. Die Adipozyten liegen in Gruppen dicht beieinander. Die Zellen besitzen einen großen Fetteinschluss.

Nur diejenigen Zellen, die die typische Morphologie der MSCs und Fibroblasten in der lichtmikroskopischen Kontrolle besaßen, wurden durchflusszytometrisch untersucht. Davon wurden nur diejenigen Zellen, die die entsprechenden Oberflächenmarker in der Durchflusszytometrie exprimierten, nach den unter 2.3.2 beschriebenen Methoden differenziert. Die Zellen, die sich schließlich in Adipozyten und Osteoblasten differenzierten, wurden zum Schluss als MSC klassifiziert. So konnten von allen vier Patienten erfolgreich MSC zum Diagnosezeitpunkt isoliert werden.

3.2 Vorbereitung der Libraries für die Sequenzierung

Die Vorbereitung der Libraries für die Sequenzierung beinhaltete mehrere Schritte, siehe auch Abbildung 12.

3.2.1 Bestimmung der DNA Reinheit und DNA Konzentration

Die Isolierung der DNA wurde erfolgreich mit dem DNeasy Blood& Tissue Kit (Qiagen) durchgeführt. Anschließend wurden die Reinheit und die Konzentration der DNA mittels des NanoDrop-Spektralphotometers (NanoDrop ND 1000, peqlab biotechnology, Erlangen, Deutschland) photometrisch bestimmt.

Hierbei wurde eine ausreichende Menge und Qualität der DNA erreicht. Tabelle 9 zeigt die DNA Konzentration in ng/μl. Die Reinheit wird anhand des A 260/280 Wertes angegeben.

Pat.	Zellen	Zeitpunkt	Gesamt DNA in µg	DNA-Konzentration in ng/µl	A 260/280 (Reinheit)
1	MSC	Diagnose	24,50	61,26	2,05
	MNC	Diagnose	2,22	11,09	1,94
	MNC	Remission	0,93	4,63	1,45
	Fibro- blasten	Diagnose	7,60	38,00	2,18
2	MSC	Diagnose	8,35	41,74	1,97
	MNC	Diagnose	6,04	30,21	1,68
	MNC	Remission	2,74	13,71	1,95
	Fibro- blasten	Diagnose	12,89	64,44	1,99
3	MSC	Diagnose	2,84	14,20	2,07
	MNC	Diagnose	8,31	41,56	1,79
	MNC	Remission	3,93	19,68	1,64
	Fibro- blasten	Diagnose	17,49	87,45	1,90
4	MSC	Diagnose	18,11	90,57	2,01
	MNC	Diagnose	13,76	68,82	1,79
	MNC	Remission	8,83	44,13	1,88
	Fibro- blasten	Diagnose	40,23	201,13	2,04

Tab. 9: Konzentration und Reinheit der isolierten DNA. Die Gesamtmenge der DNA, die DNA-Konzentration sowie die Reinheit der isolierten DNA sind jeweils für die verschiedenen Proben pro Patient angegeben.

3.2.2 DNA Scheren und Library Vorbereitung

Die isolierte DNA wurde mit dem Covaris™ S220 Focused-ultrasonicator durch Ultraschall in Fragmente von ca. 500 Basenpaaren zerkleinert. Anschließend wurde die Library-Herstellung durch den SPRIworks System I for Illumina Genome Analyzer (Beckman Coulter) durchgeführt.

3.2.3 PCR und DNA Quantifizierung

Die DNA Libraries wurden mittels PCR amplifiziert und auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Die Agarose-Gelelektrophorese erlaubt, DNA Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen. Mithilfe eines 100 Basenpaar-Markers kann die Größe der DNA-Fragmente bestimmt werden.

Nachdem eine Spannung von 70V über 90 Minuten angelegt wurde, konnte man die Auftrennung der DNA unter UV-Licht sichtbar machen und dies fotografisch festhalten (Abbildung 15). Die Auftrennung der DNA der verschiedenen Zellproben eines Patienten ist in Abbildung 15A exemplarisch dargestellt. Es wurden Gelstücke mit der DNA gewünschter Größe (ca. 450-500 Basenpaaren) ausgeschnitten und somit die Libraries extrahiert. Im Anschluss wurde nochmal ein Foto angefertigt, das den herausgeschnittenen Bereich zeigt (Abbildung 15B).

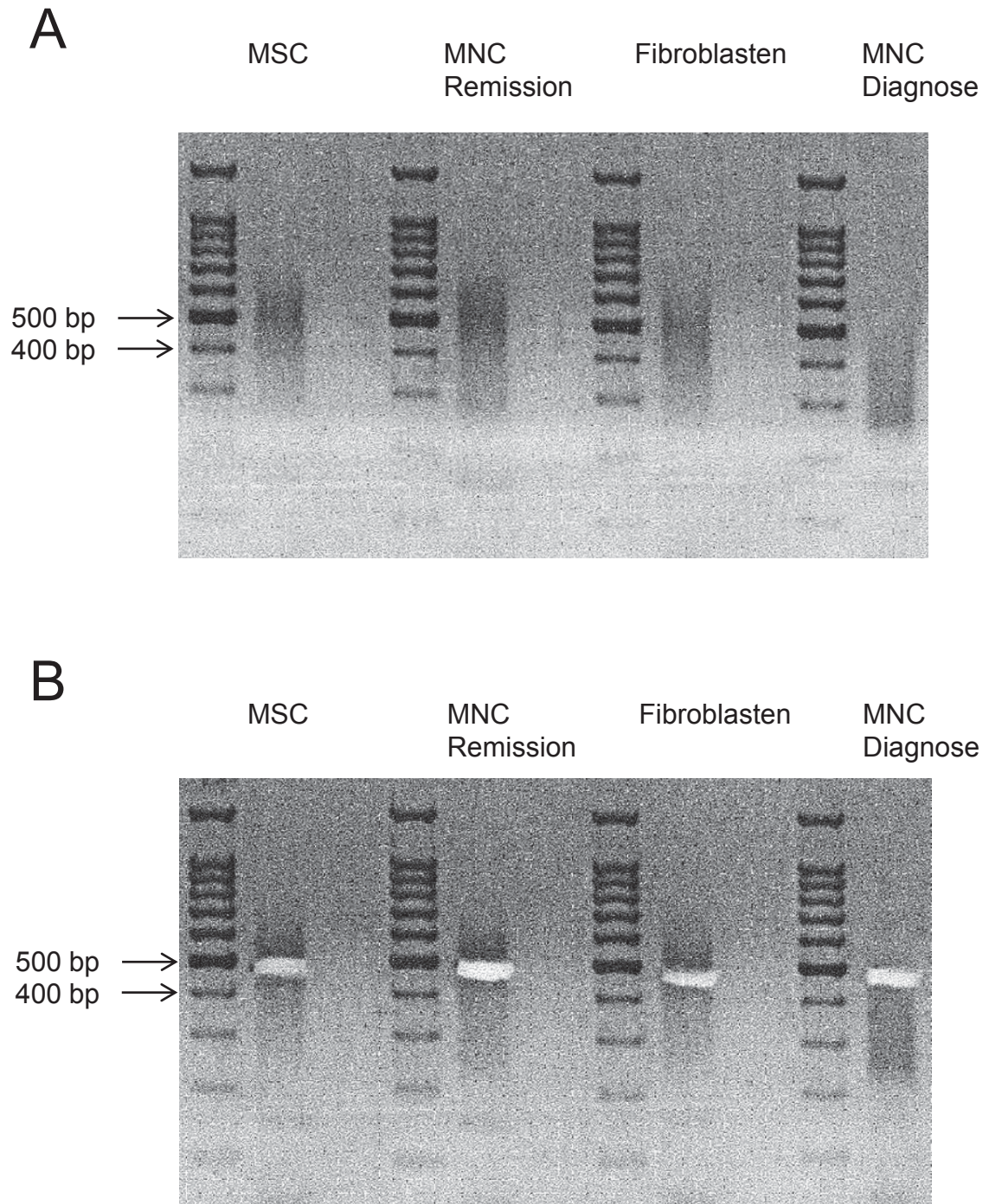
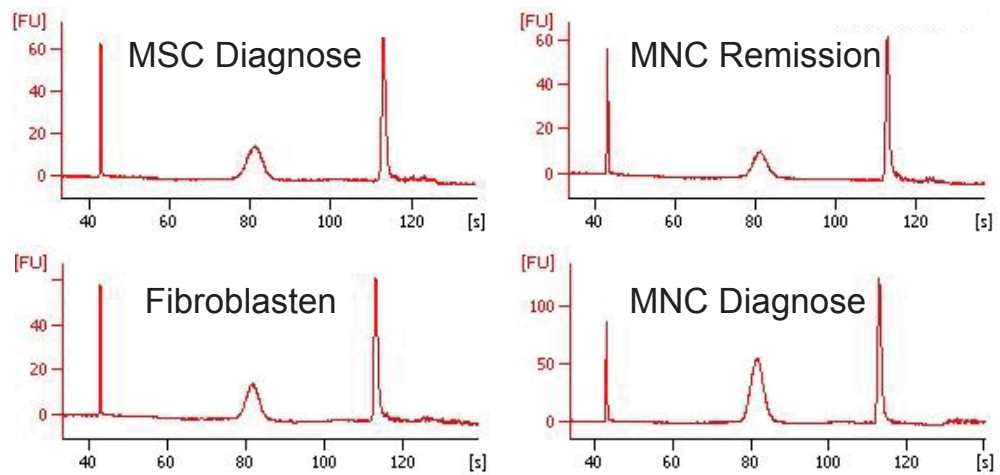


Abb. 15: Auftrennung der DNA mittels Gelelektrophorese [126]. Die Auftrennung der Zellproben eines Patienten ist repräsentativ dargestellt. Diese zeigt die DNA der verschiedenen Zellen (MSC Diagnose, MNC Diagnose, MNC Remission und Fibroblasten). Ein 100 Basenpaar-Marker erlaubt die Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente. (A) zeigt die Auftrennung der DNA auf dem Agarosegel vor dem Herausschneiden mithilfe eines Stanzers. (B) zeigt das Agarosegel nach dem Herausschneiden der Libraries bei ca. 450-500 Basenpaaren.

Die DNA konnte anschließend erfolgreich mit dem QIAquickGel Extraction Kit extrahiert werden. Die Größen-, Quantitäts- sowie die Qualitätsbestimmung der DNA erfolgte mit

dem Agilent DNA 1000 High Sensitivity Kit und dem Agilent 2100 Bioanalyzer. Das Prinzip entspricht der klassischen Gelelektrophorese. Gemessen wird die Migrationszeit gegen die Fluoreszenzeinheit. Anhand der Zeit, die das fluoreszenzmarkierte DNA Molekül für die zurückgelegte Strecke gebraucht hat, kann auf die Fragmentgröße der DNA zurück geschlossen werden. Fragmente unterschiedlicher Größe besitzen eine andere Migrationszeit. Kleine Fragmente wandern schneller. Anhand von Markern, die Fragmente bekannter Größe abbilden, kann die genaue Fragmentgröße der DNA bestimmt werden. Es werden zusätzlich zwei Marker genutzt, die den messbaren Bereich markieren. Anhand dieser Marker kann außerdem auf die Konzentration der DNA geschlossen werden. Abbildung 16 zeigt repräsentativ das Ergebnis mit den vier Proben eines Patienten. Hierbei stellt sich die fragmentierte DNA sowohl im Elektropherogramm (Abbildung 16A) als auch in der densitometrischen Darstellung (Abbildung 16B) bei ca. 80 Sekunden dar. Dies entspricht 450-500 Basenpaaren.

A



B

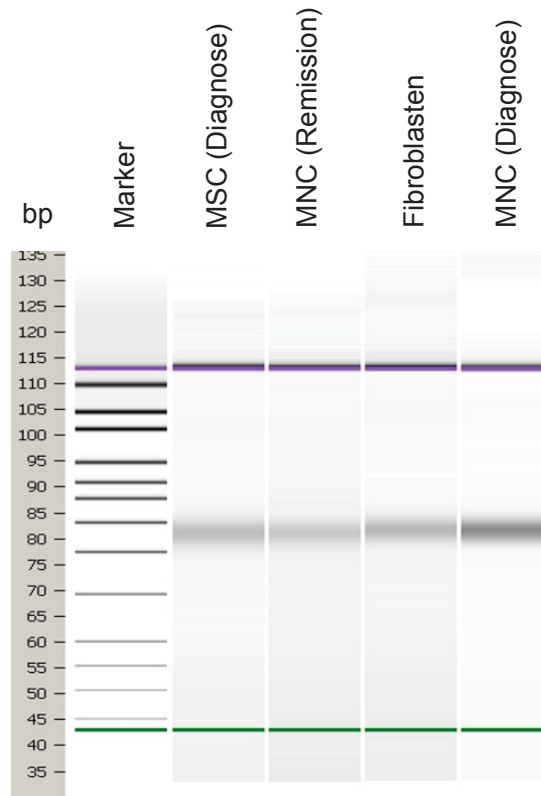


Abb. 16: Größen- und Quantitätsbestimmung der DNA-Fragmente mit Agilent 2100 Bioanalyzer [126]. (A) zeigt ein Elektropherogramm (x =Migrationszeit gegen y =Fluoreszenzeinheit) mit Darstellung der fragmentierten DNA bei ca. 80 Sekunden (entspricht 450-500 Basenpaare). Des Weiteren zeigt (A) die beiden standardisierten Markern, die den messbaren Bereich kennzeichnen. (B) zeigt die densitometrische Darstellung der DNA bei ca. 80 Sekunden (entspricht 450-500 Basenpaare). Die verschiedenen Marker bilden Fragmente bekannter Größe ab. Die Marker (in grün beziehungsweise violett) kennzeichnen den messbaren Bereich.

3.3 Sequenzierung und Sequenzierungsdaten

Die amplifizierten DNA Bibliotheken wurden mithilfe eines cBots (Illumina) auf eine Flusszelle (*Flow Cell*) geladen. Danach wurde die Sequenzierung mit dem Illumina HiSeq 2000 durchgeführt.

Mithilfe der *Single Nucleotide Polymorphism Database* (SNuPy) wurden die Ergebnisse der Sequenzierung bearbeitet. Tabelle 10 zeigt die Sequenzierungsstatistik.

Patient	Probe	Zeitpunkt	Gesamtanzahl der Variationen	Homozygote Variationen	Heterozygote Variationen
1	MSC	Diagnose	29659	12605	17054
1	MNC	Diagnose	29257	12438	16819
1	Fibroblasten	Diagnose	29444	12464	16980
1	MNC	Remission	29439	12202	17237
2	MSC	Diagnose	15722	8189	7533
2	MNC	Diagnose	29553	12442	17111
2	Fibroblasten	Diagnose	29282	12079	17203
2	MNC	Remission	28954	12210	16744
3	MSC	Diagnose	23844	10900	12944
3	MNC	Diagnose	26928	11933	14995
3	Fibroblasten	Diagnose	25410	10994	14416
3	MNC	Remission	27549	11538	16011
4	MSC	Diagnose	28621	12119	16502
4	MNC	Diagnose	27040	11745	15295
4	Fibroblasten	Diagnose	25592	11313	14279
4	MNC	Remission	27507	11736	15771

Tab. 10: Anzahl der gesamten, der homozygoten und der heterozygoten genetischen Variationen, die mit Hilfe der Sequenzierung ermittelt wurden. Die Variationen sind dabei nach Patient und der jeweiligen Probe (MSC am Diagnosetag, MNC am Diagnosetag, Fibroblasten am Diagnosetag sowie MNC in Remission) aufgeteilt.

Hierbei wurden, wie im Folgenden beschrieben, verschiedene Abfragen vorgenommen, und bestimmte Filter zur Eingrenzung der Ergebnisse ausgewählt. Zur Beurteilung der genetischen Variationen zum Zeitpunkt der Leukämiediagnose, wurde die Nukleotidsequenz der MNC bei Diagnose mit den Nukleotidsequenzen der Fibroblasten und der MNC in Remission verglichen. Ebenso wurden genetische Variationen in den mesenchymalen Stammzellen bei Diagnose bestimmt. Zur Beurteilung möglicher Keimbahn-Mutationen, wurde nach genetischen Variationen gefiltert, die in allen Proben eines Patienten vorkamen. Bei diesen Abfragen wurden weitere Filter ausgewählt. Die gefundenen genetischen Variationen wurden anhand der Häufigkeit ihres Vorkommens in

der Bevölkerung, ihrer Sequenzierungsqualität sowie ihrer Konsequenz beurteilt. Somit wurden diejenigen Variationen aussortiert, die häufig vorkommen, die geringe Auswirkungen haben und deren Nukleotidsequenzen unzureichend während des Sequenziervorgangs abgelesen wurden. Hierbei wurde eine Lesetiefe (*Read depth*) von 5 gewählt. Dies bedeutet, dass die untersuchte Position im Genom mindestens von fünf sequenzierten DNA-Fragmenten abgedeckt wurde. Des Weiteren wurde eine *variation call quality* von mindestens 30 gewählt. Dies bezeichnet die Sequenzierqualität und bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit einer falsch abgelesenen Base bei ≤ 1 zu 1000 liegt. Außerdem wurden nur diejenigen Mutationen ausgewählt, die in den codierenden Regionen waren und zu einem Aminosäureaustausch führten oder auf andere Weise eine Konsequenz auf das Protein hatten. Des Weiteren wurden nur diejenigen Gene ausgewählt, die in der Liste des *Cancer Gene Census* vorkommen [82]. Dies ist ein Katalog von Genen, die kausal mit einer Krebserkrankung assoziiert sind. Darüber hinaus wurden die *Softwaretools* Sift (*Sorting Intolerant from Tolerant*) [83] und PolyPhen (*Polymorphism Phenotyping*) [84] genutzt. Beide Programme geben eine Prognose darüber ab, inwiefern Aminosäureaustausche die Proteinfunktion beeinflussen. Dies geschieht anhand der Protein-Struktur sowie evolutiven Erkenntnissen. Diese Programme sind allerdings noch in der Entwicklung, da viele Strukturen von Proteinen noch nicht bekannt sind. Daher führten ihre Ergebnisse nicht zu einem Ausschluss der Gene.

Daraus ergaben sich für jeden Patienten drei Datensätze („Leukämie“, „Stroma“, „Keimbahn“), die hinsichtlich ihrer genetischen Veränderungen verglichen werden konnten. Des Weiteren konnten die Patienten untereinander verglichen werden. Das Ergebnis wird von Tabelle 11 zusammengefasst und zeigt die identifizierten genetischen Veränderungen verschiedener Gene. Diese Variationen sind eine selektierte Auswahl interessanter Kandidaten, die aufgrund der GMAF (*general minor allele frequency*) $<1\%$ sowie anhand von Publikationen getroffen wurde. Die GMAF beschreibt die Häufigkeit, mit der ein Allel, das am seltensten vorkommt, in der Population auftritt. Die kompletten Listen der veränderten Gene befinden sich im Anhang.

Patient	1			2			3			4			
Probe	L	S	K	L	S	K	L	S	K	L	S	K	
CREB3L1			Insertion	Insertion				Insertion				Insertion	Epigenetischer Signalweg
CREB3L2			Deletion									Deletion	
NACA											Basenaustausch		
EZH2							Basenaustausch						
SOX2								Basenaustausch					
CREBBP												Basenaustausch	
SMO			Basenaustausch										
MLL3			Insertion									Insertion	
SUFU												Basenaustausch	
TET2						Basenaustausch						Basenaustausch	
MAML2				Deletion			Deletion			Deletion			Differenzierung
JAK3			Basenaustausch										
RET								Basenaustausch					
IL21R								Basenaustausch					
BLM				Deletion									DNA Reparatur
MEN1			Basenaustausch										
FLT3								Basenaustausch		Basenaustausch			RAS Signalweg
NF1			Basenaustausch							Basenaustausch			
BCR							Basenaustausch						Sonstige
IL6ST										Basenaustausch			
ALK						Basenaustausch							
Legende: Basenaustausch Insertion Deletion L S K Leukämie Stroma Keimbahn													

Tab. 11: Genetische Veränderungen in der untersuchten Patientenkohorte von vier Patienten mit hoch hyperdiploider ALL. Die genetisch veränderten Gene sind dabei jeweils in Gruppen eingeordnet, die ihrer Funktion entsprechen. Pro Patient ist eingeteilt, wo das veränderte Gen gefunden wurde. Dabei wird zwischen der Leukämie (Unterschiede zwischen der Nukleotid-Sequenz der MNC bei Diagnose und der Nukleotid-Sequenzen der Fibroblasten und der MNC in Remission), dem Stroma (Nukleotid-Sequenz in den MSC bei Diagnose) und der Keimbahn (Übereinstimmungen in der Nukleotid-Abfolge der MSC bei Diagnose, der MNC bei Diagnose, der MNC in Remission sowie der Fibroblasten) eines Patienten unterschieden. Die farbliche Unterscheidung macht deutlich, um welche Mutation es sich handelt.

3.3.1 Mutationen in der Keimbahn

Bei den Mutationen in der Keimbahn wurde nach genetischen Variationen gesucht, die in allen Proben eines Patienten vorkamen. Insgesamt wurden hierbei 82 Mutationen gefunden. Davon entfielen 28 Keimbahnmutationen auf Patient 1, 12 Keimbahnmutationen auf Patient 2, 19 Keimbahnmutationen auf Patient 3 und 23 Keimbahnmutationen auf Patient 4. Wie aus Tabelle 11 und den oben aufgeführten Angaben ersichtlich wird, zeigten sich die meisten Mutationen in der Keimbahn bei Patient 1.

Hierbei kam es zu Insertionen im *CREB3L1* (*CAMP Responsive Element Binding Protein 3 like 1*) Gen (p.Asp509GlyfsX156). Dieses Gen war auch bei Patient 3 (p.Asp509GlyfsX156) und bei Patient 4 (p.Asp509GlyfsX156) in der Keimbahn mutiert. Eine weitere Insertion mit identischem Aminosäureaustausch fand bei Patient 1 und 4 im *MLL3* (*Mixed Lineage Leukemia Protein 3*) Gen an zwei Stellen (p.Tyr12X, p.Tyr816X) statt.

Eine Deletion mit identischem Aminosäureaustausch fand sich im *CREB3L2* (*CAMP Responsive Element Binding Protein 3 like 2*) Gen an drei Stellen (p.Pro34del, p.Thr37del, p.Thr100del) in der Keimbahn von Patient 1 und Patient 4.

Basenaustausch-Mutationen fanden sich bei Patient 1 in den Genen *SMO* (*Smoothed Frizzled Class Receptor*) (p.Pro647Ser), *JAK3* (*Janus Kinase 3*) (p.Met598Ile), *MEN1* (*Multiple Endocrine Neoplasia 1*) (p.Arg176Gln, p.Arg171Gln) sowie *NF1* (*Neurofibromin 1*) (p.His55Arg, p.His389Arg, p.His423Arg). Bei Patient 2 fand ein Basenaustausch in den Genen *TET2* (*Tet Methylcytosine Dioxygenase 2*) (p.Met1701Ile, p.Met1722Ile) und *ALK* (*Anaplastic Lymphoma Receptor Tyrosine Kinase*) (p.Thr680Ile) statt, bei Patient 3 in den Genen *SOX2* (*SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2*) (p.Met276Ile), *RET* (*Ret Proto-Oncogene*) (p.Val412Met) und *IL21R* (*Interleukin 21 Receptor*) (p.Pro515His). In den Genen *CREBBP* (*CREB Binding Protein*) (p.Val238Leu), *TET2* (p.Leu1721Trp, p.Leu1742Trp) und *SUFU* (*Suppressor Of Fused Homolog*) (p.Ala340Ser) von Patient 4 wurden ebenfalls Basen ausgetauscht.

Vergleicht man die genetischen Veränderungen in der Keimbahn aller vier Patienten, so waren die Gene *MLL3*, *CREB3L2* und *TET2* bei zwei Patienten genetisch verändert. Bei *MLL3* und *CREB3L2* handelte es sich um eine identische Mutation, bei *TET2* handelte es sich allerdings um verschiedene Mutationen (Patient 1: p.Met1701Ile, p.Met1722Ile; Patient 4: p.Leu1721Trp, p.Leu1742Trp). *CREB3L1* wies in drei Patienten die identische Mutation auf. Die anderen oben erwähnten Gene *CREBBP*, *SMO*, *SUFU*, *JAK3*, *RET*,

IL21R, *MEN1*, *NF1* und *ALK* wiesen jeweils nur bei einem Patienten Mutationen in der Keimbahn auf. Siehe auch Tabellen im Anhang.

3.3.2 Mutationen in der Leukämie

Bei den Mutationen in der Leukämie wurde die Nukleotidsequenz der MNC bei Diagnose mit den Nukleotidsequenzen der Fibroblasten und der MNC in Remission verglichen. Hierbei wurden insgesamt 19 Mutationen gefunden, wovon Patient 1 zwei Mutationen, Patient 2 sechs Mutationen, Patient 3 fünf Mutationen und Patient 4 sechs Mutationen aufwies.

Die genetischen Veränderungen in der Leukämie zeigten sich als eine Insertion in dem Gen *CREB3L1* (p.Asp509GlyfsX156) bei Patient 2.

Deletionen fanden sich in den Genen *MAML2* (*Mastermind-Like 2*) bei Patient 2 (p.Gln607del), Patient 3 (p.Gln605_Gln607del) und Patient 4 (p.Gln605_Gln607del). Darüber hinaus wies das *BLM* (*Bloom Syndrome*) Gen (p.Ser312del) eine Deletion bei Patient 2 auf.

Ein Basenaustausch fand bei Patient 3 im Gen *EZH2* (*Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit*) an fünf Stellen (p.Ser681Leu, p.Ser639Leu, p.Ser695Leu, p.Ser690Leu, p.Ser651Leu) statt. Des Weiteren wurde eine Base im *BCR* (*Breakpoint Cluster Region*) Gen (p.Ala152Val) ausgetauscht. Bei Patient 4 fand ein Basenaustausch in den Genen *IL6ST* (*Interleukin 6 Signal Transducer*) (p.Leu8Val) und *FLT3* (*Fms-Related Tyrosine Kinase 3*) (p.Asn676Lys) statt.

Vergleicht man die genetischen Veränderungen in der Leukämie aller vier Patienten, so trat eine identische Mutation des *MAML2* Gens bei den Patienten 3 und 4 auf. Patient 2 wies, neben der Deletion von Glutamin an Stelle 607, auch eine Deletion an Stelle 605 auf. Die anderen oben erwähnten Gene wiesen jeweils nur bei einem Patienten Mutationen in der Leukämie auf. Siehe auch Tabellen im Anhang.

3.3.3 Mutationen im Stroma

Bei den Mutationen im Stroma wurde nach genetischen Variationen in den mesenchymalen Stammzellen gesucht. Es wurden insgesamt 19 Mutationen gefunden. Patient 1 wies dabei drei Mutationen, Patient 3 sechs Mutationen und Patient 4 zehn Mutationen im Stroma auf. Bei Patient 2 wurden keine Mutationen gefunden.

Ein Basenaustausch lag bei Patient 3 im *FLT3* Gen (p.Asp324Asn), sowie bei Patient 4 im *NACA* (*Nascent Polypeptide-Associated Complex Alpha Subunit*) Gen (p.Pro1259Ser) vor.

Eine Deletion lag bei Patient 4 im *MAML2* Gen (p.Gln605_Gln607del) vor.

Die oben erwähnten Gene wiesen jeweils nur bei einem Patienten Mutationen im Stroma auf. Siehe auch Tabellen im Anhang.

3.3.4 Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den Vorläuferzellen

Hinsichtlich der Annahme, dass die Leukämiezellen und die mesenchymalen Stammzellen einen gemeinsamen Vorläufer besitzen, wurden Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den beiden Zellen analysiert.

Das Gen *MAML2* wies in zwei Patienten (Patient 2 und 3) Deletionen in der Leukämie auf. Bei Patient 4 zeigte es identische genetische Veränderungen in der Leukämie und im Stroma. Die Gene *BLM* (Patient 2), *EZH2* (Patient 3), *BCR* (Patient 3) und *IL6ST* (Patient 4) zeigten sich nur in der Leukämie bei jeweils einem Patienten genetisch verändert. *NACA* wies hingegen nur im Stroma bei einem Patienten (Patient 4) Veränderungen auf. *FLT3* war im Stroma von Patient 3 und in der Leukämie von Patient 4 genetisch verändert. Es handelte sich allerdings um unterschiedliche Mutationen.

3.3.5 Konservierung der Nukleotidsequenz bei ausgewählten Genen

Es wurde in einigen ausgewählten Genen, bei denen die gefundenen Mutationen nicht in bekannten funktionellen Domänen auftraten, eine Untersuchung der Konservierung der Nukleotidsequenz durchgeführt. Tabelle 12 zeigt die konservierten Nukleotidsequenzen der verschiedenen Mutationen bei sieben Primaten.

Gen	Primat	Nukleotidsequenz
ALK	Mensch	ACCCTTACCTGTAGGGTCAAA
ALK	Schimpanse	ACCCTTACCTGTAGGGTCAAA
ALK	Gorilla	ACCCTTACCTGTAGGGTCAAA
ALK	Orang-Utan	GCCCTTACCTGTAGGGTCGAA
ALK	Vervet-Affe	GCCCTTACCTGTAGGGTCGAA
ALK	Anubispavian	GCCCTTACCTGTAGGGTCAAA
ALK	Seidenaffe	GCCCTTACCTGTAGGGTCAAA
FLT3	Mensch	TATCCGGTGTGTTTCTTGCC
FLT3	Schimpanse	TATCCGGTGTGTTTCTTGCC
FLT3	Gorilla	TATCCGGTGTGTTTCTTGCC
FLT3	Orang-Utan	TATCCGGTGTGTTTCTTGCC
FLT3	Vervet-Affe	TATCCGGTGTGTTTCTTGCC
FLT3	Anubispavian	TATCCCGTGTGTTTCTTGCC
FLT3	Seidenaffe	TATCCAGTGTGTTTCTTCCC
CREBBP	Mensch	TCAGCCAGCACGCTGCTCGAG
CREBBP	Schimpanse	TCAGCCAGCACGCTGCTCGAG
CREBBP	Gorilla	TCAGCCAGCACGCTGCTCGTG
CREBBP	Orang-Utan	TCAGCCAGCACGATGCTTG TG
CREBBP	Vervet-Affe	TCAGCCAGCACGCTGCTCGTG
CREBBP	Anubispavian	TCAGCCAGCACGCTGCTCGTG
CREBBP	Seidenaffe	TCAGCCAGCACGCTGCTCGTG
CREB3L2	Mensch	AAGCTGTCACTGGTGGTAATGTG
CREB3L2	Schimpanse	AAGCTGTCACTGGTGGTAATGTG
CREB3L2	Gorilla	AAGCTGTCACTGGTGGTAATGTG
CREB3L2	Orang-Utan	AAGCTGTCACTGGTGGTAATGTG
CREB3L2	Vervet-Affe	AAGCTGTCACTGGTGGTAACGTG
CREB3L2	Anubispavian	AAGCTGTCACTGGTGGTAACGTG
CREB3L2	Seidenaffe	AAGCTGTCACTGGTGGTAACGTG

Tab. 12: Nukleotidsequenzen ausgewählter Gene bei 7 Primaten. Die rot markierten Basen wurden jeweils durch andere Basen ausgetauscht oder diese wurden deletiert. Bei allen Genen ist zu erkennen, dass sich die gefundenen Mutationen in konservierten Nukleotidsequenzen befanden. Im *ALK* Gen wurde die Base G durch die Base A in der Keimbahn ausgetauscht. Dies resultierte in dem Aminosäureaustausch Thr680Ile. Im *FLT3* Gen wurde die Base C durch die Base T im Stroma ausgetauscht. Dies resultierte in dem Aminosäureaustausch Asp324Asn. Im *CREBBP* Gen wurde die Base C durch die Base G in der Keimbahn ausgetauscht. Dies resultierte in dem Aminosäureaustausch Val238Leu. Im *CREB3L2* Gen wurden die Basen TGG in der Keimbahn deletiert. Es resultierte die Deletion folgender Aminosäuren: Pro34, Thr37, Thr100.

4 Diskussion

Es wurden Mutationen in Genen gefunden, deren Vorkommen im *Cancer Gene Census* eine Rolle in Krebserkrankungen bei den hier analysierten Patienten nahelegen.

Verschiedene Fehlerquellen könnten zu einem falsch positiven Ergebnis in der Sequenzierung führen.

Zum einen könnte die Anpassung an die Zellkulturbedingungen Mutationen in den Zellen zur Folge haben. Allerdings zeigten Bernardo et al., dass das Kultivieren von mesenchymalen Stammzellen bis zur Passage 25 nicht zu genetischen Veränderungen führte [85]. Eine Verunreinigung durch andere Zellen könnte ebenfalls falsche Ergebnisse bedingen. Deshalb ist das Durchlaufen der Zellkultur über mindestens vier Passagen nötig, um die mesenchymalen Stammzellen zu identifizieren und zu isolieren, da kein spezifischer Marker für sie bekannt ist. Sie zeichnen sich über ihre Adhäsion an Plastik sowie ihre fibroblastoide Morphologie aus. Durch diese Adhäsion, Mikroskopie und die Wahl der Kulturbedingungen war eine Selektion und eine Expansion möglich.

Darüber hinaus lag in der durchflusszytometrischen Untersuchung der Anteil an Leukozyten bei ca. 0,16%. Dies bedeutet, dass in der Sequenzierung 1 Leukämie Mutation in 1000 MSC-*Reads* möglich ist und damit ist dies vernachlässigbar.

Weitere mögliche Fehlerquellen für falsch positive Mutationen könnten die PCR (durch fehlerhafte Amplifikation) oder die Sequenzierung selbst sein.

Falsch negative Mutationen könnten durch eine zu niedrig gewählte Sequenzierungstiefe hervorgerufen werden. Diese liegt üblicherweise in Genom Analysen höher als, zum Beispiel, in Exom-Sequenzierungen. Des Weiteren könnten die genetischen Mutationen in Bereichen liegen, die noch nicht annotiert worden sind. Somit wären diese genetischen Veränderungen der Analyse entgangen.

Die gefundenen Variationen könnten, um Fehler noch weiter zu minimieren, in einem nächsten Schritt mittels PCR und Sanger Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft werden. Dies konnte allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Durch das strenge Filtern von Genen, zum einen durch die in Kapitel 3.5 beschriebenen Kriterien in der *Single Nucleotide Polymorphism Database* (SNuPy), als auch durch die $GMAF < 1\%$, ist es möglich, dass auch Gene verloren gegangen sind, die eine Rolle in der Entwicklung der Leukämie spielen. Andererseits wird durch die Auswahl von weniger

strengen Filtern, wie zum Beispiel einer geringeren Sequenzierqualität, auch die Zahl der falsch positiven Ergebnisse erhöht.

Auf die Funktion von einigen ausgewählten Genen wird im Folgenden genauer eingegangen.

Wie in den Ergebnissen beschrieben, konnten Mutationen in Genen gefunden werden, die für die Bildung, Proliferation und Differenzierung von Zellen eine Rolle spielen. Dazu gehören *MAML2*, *JAK3*, *RET* und *IL21R*.

Das Gen *MAML2* reguliert den Notch-Signalweg. Dieser ist sowohl für die Zell-Zell-Kommunikation als auch für das Wachstum, die Proliferation und die Differenzierung von Stammzellen essentiell. Eine Assoziation besteht zwischen Mutationen in diesem Gen und B-Zell-Lymphomen. [86]

Das Gen *MAML2* war in drei Patienten mutiert. Bei einem Patienten lagen identische Mutationen (p.Gln605_Gln607del) sowohl in der Leukämie als auch im Stroma vor. Dies bestätigt die Ergebnisse vorheriger Studien, die feststellten, dass Leukämiezellen und mesenchymale Stammzellen gemeinsame genetische Veränderungen aufweisen können und dass den mesenchymalen Stammzellen höchstwahrscheinlich eine Rolle in der Pathogenese der Leukämie zukommt [74], [76], [77], [78]. Eine Erklärung hierfür ist in der Einleitung in Kapitel 1.2.4 beschrieben worden. Die dort beschriebene Annahme, dass genetische Aberrationen bereits in prä-hämatopoetischen Vorläuferzellen entstehen, die sich dann entlang der hämatopoetischen oder der mesenchymalen Stammzelllinien weiterdifferenzieren [75], wurde auch in einer neuen Studie von Garcia-Montero et al. unterstützt [87]. In dieser Studie wurde bei 22 von 83 Patienten, die an einer indolenten Mastozytose (ISM) erkrankt waren, die zuständige Punktmutation des KIT Gens, ein Wachstumsfaktor-Rezeptor aus der Familie der Tyrosinkinasen, sowohl in den HSCs als auch in den MSCs gefunden. Dies war mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf und einer schlechteren Prognose assoziiert. Insgesamt konnte allerdings im Rahmen dieser Arbeit kein signifikantes Muster zwischen Veränderungen in mesenchymalen Stammzellen und Leukämiezellen gezeigt werden, da nur ein Gen genetische Veränderungen sowohl im Stroma als auch in der Leukämie aufwies. Dies kann jedoch auch durch die kleine Patientenkohorte begründet sein.

Das Gen *JAK3* codiert für eine Tyrosinkinase und spielt eine entscheidende Rolle in der Hämatopoese von Stammzellen. Diese Tyrosinkinase übermittelt Signale von Zytokin- und Interferonrezeptoren auf hämatopoetischen Stammzellen [88]. Dabei ist die Expression des *JAK3* Proteins auf die hämatopoetischen Stammzellen beschränkt [89]. Mutationen in diesem Gen sind bereits im Zusammenhang mit der T-ALL beschrieben worden [90]. *JAK3* wies Veränderungen in der Keimbahn von Patient 1 auf (p.Met598Ile).

Auch das *RET* Gen ist eine Tyrosinkinase, die für Zellwachstum und Zelldifferenzierung verantwortlich ist [91].

In diesem Gen zeigte sich eine Mutation in der Keimbahn von Patient 3 (p.Val412Met).

IL21R ist ein Interleukin Rezeptor für das Interleukin 21. Der Rezeptor übermittelt ein wachstumsanregendes Signal von IL21. Dies ist wichtig für die Proliferation und Differenzierung von T-, B- und Natürlichen Killer-Zellen. Das Binden des Liganden an den Rezeptor führt darüber hinaus zur Aktivierung von Signalmolekülen (zum Beispiel *JAK1* und 3) [92]. Mutationen in diesen Genen können zu einer Störung ihrer Funktion führen. Ist die Differenzierung von Zellen gestört, können sich diese zum einen nicht mehr zu funktionstüchtigen Zellen entwickeln und des Weiteren kann es zu einer unkontrollierten Vermehrung kommen. Dies ist eine mögliche Ursache für die Entstehung einer Leukämie [4].

IL21R war in der Keimbahn von Patient 3 genetisch verändert (p.Pro515His).

Ebenso wurden Mutationen in Genen gefunden, die wichtig für die DNA Replikation und Reparatur sind. Dazu gehören die Gene *BLM* und *MEN1*.

BLM kodiert für das DNA Reparatur Enzym RecQL3 Helicase, das in der DNA-Doppelstrang Reparatur eine Rolle spielt. Des Weiteren verhindert es den Schwesterchromatidaustausch von fehlerhafter DNA. Ohne einen gut funktionierenden Reparaturmechanismus kann es zu einer genetischen Instabilität kommen, die wiederum zu Krebserkrankungen, unter anderem einer Leukämie, führen kann [93].

BLM wies in der Leukämie eines Patienten eine Mutation auf, wodurch es zu einer Deletion einer Aminosäure kam (p.Ser312del).

MENI ist ebenfalls für die DNA Reparatur verantwortlich [94]. Außerdem kann *MENI* direkt an das *MLL* (*mixed lineage leukemia*) Gen binden. Chromosomale Translokationen, die das *MLL* Gen betreffen, führen zu *MLL* Fusionsproteinen. Diese Fusionsproteine führen häufig zu sehr aggressiven Formen der akuten Leukämie. *Menin* ist als ein wichtiger onkogenetischer Kofaktor für die Entwicklung einer Leukämie im Zusammenhang mit *MLL* Fusionsproteinen beschrieben worden [95].

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten, wiesen keine *MLL* Rearrangierungen auf. Genetische Veränderungen in dem *MENI* Gen lagen jedoch vor. Hierbei handelte es sich um einen Basenaustausch (C→T) mit einem damit verbundenen Aminosäureaustausch an zwei Stellen (p.Arg176Gln, p.Arg171Gln). Diese Mutation lag in einer konservierten Nukleotidsequenz vor und ließ sich evolutiv bis zur Ratte zurückführen. Durch die genetischen Veränderungen in DNA-Reparaturgenen, kann die Reparatur beeinträchtigt werden. Schädigungen der DNA sind ein sehr häufiges Ereignis. Durch die Akkumulation von Schäden durch extrinsische Faktoren (zum Beispiel UV-Strahlung) oder Replikationsfehler, kann es zu genetischen Veränderungen kommen, die durch, zum Beispiel, das Inaktivieren von Tumorsuppressoren oder das Aktivieren von Protoonkogenen zur Entstehung einer Leukämie beitragen können [96].

Darüber hinaus wurden Mutationen im *ALK* Gen gefunden. *ALK* gehört zu den Tyrosinkinase-Rezeptoren, die zu der Insulinrezeptor-Superfamilie gehören. Punktmutationen in diesem Gen wurden kürzlich bei einem Kind, das an der B-Zell-ALL erkrankt war, festgestellt. Diese Mutation A348D befand sich in einer extrazellulären Domäne, der Domäne MAM1 [97]. In der genannten Studie ist des Weiteren gezeigt worden, dass diese Mutation ein onkogenes Potential besaß und empfindlich auf *ALK* Inhibitoren reagierte. Allerdings ist diese Mutation nicht alleine fähig eine Leukämie auszulösen [97].

Bei den im Rahmen dieser Studie untersuchten Patienten wurde eine *ALK* Mutation in der Keimbahn eines Patienten (Patient 2) festgestellt. Aufgrund eines Basenaustausches (G→A) wurde die Aminosäure Threonin durch Isoleucin (p.Thr680Ile) ausgetauscht. Es handelte sich hierbei um eine Mutation in einer konservierten Nukleotidsequenz (siehe auch Tabelle 12 in Kapitel 3.3.5). Die MAM1 Domäne war allerdings nicht betroffen. Die genauen Auswirkungen dieser Mutationen und mögliche Therapieansätze mit *ALK* Inhibitoren müssten daher in aufbauenden Studien untersucht werden.

Auch Gene des RAS-Signalwegs waren von Mutationen betroffen. Hierzu gehörten *NF1* und *FLT3*.

NF1 scheint eine Rolle als negativer Regulator im RAS-Signalweg zu spielen. So konnten Mutationen in *NF1* unter anderem mit der juvenilen myelomonozytären Leukämie (JMML) in Verbindung gebracht werden. Die genaue Rolle des Gens ist allerdings noch nicht geklärt [98].

NF1 war in der Keimbahn eines Patienten mutiert, wodurch es zu einem Aminosäureaustausch an drei Stellen kam (p.His55Arg, p.His389Arg, p.His423Arg).

FLT3 codiert für eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die durch fünf Immunglobulin-ähnliche Domänen, eine Juxtamembran und zwei Tyrosinkinase-Domänen, die durch eine Interkinase Domäne getrennt sind, charakterisiert ist [99], [100]. Die Rezeptor-Tyrosinkinase wird vor allem an der Zelloberfläche von hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert. Nachdem der Rezeptor durch einen Liganden aktiviert wird, aktiviert dieser zytoplasmatische Effektormoleküle in Signalwegen, die in der Apoptose, Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen involviert sind. Mutationen des *FLT3* Gens können zu einer Daueraktivierung des Rezeptors führen [101]. Die Folge ist zum einen eine unkontrollierte Zellproliferation sowie eine Resistenz gegenüber der Apoptose. Mutationen im *FLT3* Gen wurden bereits in mehreren Publikationen im Zusammenhang mit akuten Leukämien, insbesondere der hoch hyperdiploiden ALL, beschrieben [37], [42], [43], [44], [45], [48], [49], [50].

Es wurden Mutationen gefunden, die vor allem bei Erwachsenen, die an der akuten myeloischen Leukämie (AML) erkrankt waren, auftraten. Hierbei handelte es sich um interne Tandemduplikationen (ITD) oder aktivierende Punktmutationen in der zweiten Domäne der Tyrosinkinase (ATKD) [102], [103], [104], [105]. Dahingegen war die Zahl dieser Mutationen bei Kindern, die an der AML erkrankt waren, deutlich geringer [106]. Im Vergleich dazu wurden bei Kindern mit einer B-Zell-ALL weniger ITD, dafür aber mehr ATKD Mutationen gefunden [48], [106]. Diese ATKD Mutationen wurden auch in weiteren Studien vor allem bei Kindern mit einem hoch hyperdiploiden Chromosomensatz nachgewiesen [37], [42], [43], [44], [45], [48], [49], [50]. Hierbei handelte es sich weitestgehend um aktivierende Punktmutationen, die die Codons 835 und 836 und somit

die Aminosäuren Asparaginsäure und Isoleucin betrafen. In späteren, nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, wurde im Rezidiv eines Patienten (Patient 1) eine Mutation im Codon 836 (p.Ile836del) gefunden. Andersson et al. untersuchten des Weiteren, ob es einen Zusammenhang zwischen anderen Genen und der Aktivierung von *FLT3* gibt. Hierbei konnten 42 Gene identifiziert werden. Dies legte die Überlegung nahe, dass *FLT3* auch durch andere Mechanismen als die genannten Mutationen aktiviert werden kann [50].

In dieser Arbeit handelte sich zum einen um einen Basenaustausch (C→T) im Codon 324 des *FLT3* Gens, wodurch die Aminosäure Asparaginsäure mit Asparagin ausgetauscht wurde p.Asp324Asn. Hiervon betroffen war die Domäne *Ig-like C2 type*. Hierbei handelt es sich um eine Immunglobulin-ähnliche Domäne. Diese Mutation wurde erstmals von Ley et al. 2003 beschrieben [107]. In einer weiteren Studie wurde eine detaillierte Analyse dieser Variation durchgeführt, woraufhin die Mutation als ein funktionsstiller Polymorphismus deklariert wurde [108]. Allerdings war in dieser Studie die Zahl der Mutationsträger bei AML und CML Patienten deutlich höher als in der Kontrollgruppe. Polymorphismen in Protoonkogenen, die keine sichtbare Konsequenz haben, wurden bereits mit dem Auftreten von Krebserkrankungen in Verbindung gebracht [109]. Demnach spricht auch das vermehrte Auftreten dieser *FLT3* Mutation bei Leukämiepatienten für eine hierdurch hervorgerufene Neigung zu Leukämien [108]. Diese Neigung zur Entwicklung von Leukämien könnte zum Beispiel durch einen, noch nicht bekannten, aktivierenden Einfluss der Mutation auf die Tyrosinkinase hervorgerufen werden. Darüber hinaus könnte diese Mutation mit weiteren SNPs assoziiert sein, die zu einer abnormen Wechselwirkung mit anderen Signalmolekülen führen könnten [108]. Weiterhin handelte es sich hierbei um eine Mutation in einer konservierten Nukleotidsequenz (siehe auch Tabelle 12 in Kapitel 3.3.5).

Die beschriebene Mutation fand sich bei einem der vier Patienten im Stroma. Es war demnach bei einem Patienten nur in den mesenchymalen Stammzellen zum Diagnosezeitpunkt mutiert, nicht aber in der Leukämie, in der Remission und in der gesunden Kontrolle (Fibroblasten). Mesenchymale Stammzellen beeinflussen, wie in der Einleitung (Kapitel 1.2.4) beschrieben, im Knochenmark die Proliferation, Differenzierung und Erhaltung von hämatopoetischen Zellen als Teil der regulatorischen Nische und sind wohlmöglich an der Ausbildung einer onkogenen Nische beteiligt [77]. Außerdem wurde schon in Studien gezeigt, dass sich leukämiespezifische Veränderungen in mesenchymalen

Stammzellen nachweisen lassen und sie in der Pathogenese und in der Pathophysiologie der Leukämie höchstwahrscheinlich eine Rolle spielen [74], [76], [77], [78]. Da noch nicht alle Mechanismen bekannt sind, die zu einer Aktivierung des Rezeptors und somit zu einer Entstehung einer Leukämie beitragen, ist es möglich, dass auch die hier gefundene Mutation eine Rolle in der Pathogenese der ALL spielt. Um dies zu klären, müssten weitere Studien betreffend des *FLT3* Gens durchgeführt werden.

Zum anderen befand sich eine Mutation im *FLT3* Gen in der Leukämie eines Patienten (Patient 4) im Codon 676. Hier wurde ebenfalls eine Base ausgetauscht (G→T), wodurch es zu einem Aminosäureaustausch (Asparagin→Lysin) kam (p.Asn676Lys). Diese genetische Veränderung befand sich, entsprechend der in den vorherigen Studien beschriebenen Mutationen, in der Domäne der Tyrosinkinase. Die bei der Datenanalyse verwendeten *Softwaretools*, SIFT und PolyPhen, die die Konsequenz der Mutation für die Proteinfunktion vorhersagen, kennzeichneten die Mutation beide als schädlich (SIFT: „*deleterious*“; PolyPhen: „*probably damaging*“, siehe auch Tabellen im Anhang). Die genauen funktionellen Auswirkungen der gefundenen Mutation und die Frage, ob es sich um eine aktivierende Punktmutation handelt, müssten jedoch *in vitro* in aufbauenden Studien geklärt werden. Dafür könnte die IL3 abhängige Zelllinie BA/F3 benutzt werden. In diese werden Expressionskonstrukte, die für den Wildtyp des *FLT3* Gens sowie der zu untersuchende Mutante codieren, transfiziert. Darauf wird ein Test auf IL3-unabhängiges Wachstum durchgeführt. Diese Methode ist geeignet um die transformierenden Funktionen von Protoonkogenen wie *FLT3* zu bestimmen. Mithilfe dieser Methode sind bereits aktivierende Mutationen der Rezeptor-Tyrosinkinase detektiert worden [110], [111], [112].

In der Patientenkohorte wurden Veränderungen in wichtigen epigenetischen Genregulatoren gefunden, unter anderem in den Genen *CREBBP*, *EZH2*, *MLL3* und *CREB3L1/CREB3L2*.

Das *CREBBP* Gen ist an der Histonmodifikation von Proteinen beteiligt und fungiert als ein Koaktivator der Transkription. Mutationen in diesem Gen befinden sich meistens in der Domäne der Histon-Acetyltransferase. Dies führt zu einer Abschwächung der Funktion des kodierten Proteins und somit zu einer geringeren Acetylierung von Histon- und nicht-Histon-Proteinen sowie einer geringeren Bindung von Substraten [45]. Bei *CREBBP*

Mutationen ist in Studien festgestellt worden, dass dieses Gen im Rezidiv bei Kindern mit hoch hyperdiploider ALL deutlich häufiger mutiert war als bei Kindern mit normalem Chromosomensatz. Auch im Allgemeinen war bei dieser Form der ALL eine höhere Rate an Mutationen im *CREBBP* Gen zu verzeichnen [42], [43], [44], [45], [113]. Die Mutationen traten hierbei, wie oben beschrieben, vor allem in der Domäne der Histon-Acetyltransferase (HAT) an verschiedenen Stellen auf, meist jedoch bei R1446. An dieser Stelle führen die Mutationen zu einer Zerstörung der Enzymfunktion sowie zu einer Reduktion der Proliferation [43]. Da die Mutationen im *CREBBP* Gen besonders häufig bei Rezidiven in der hoch hyperdiploiden ALL vorkommen, beschrieben Inthal et al., dass das *CREBBP* Gen ein wichtiger Parameter zur Einschätzung der Wahrscheinlichkeit der Entwicklung eines Rezidives sein könnte [113].

In dieser Arbeit war das *CREBBP* Gen an der Position 238 mutiert (Basenaustausch C→G), wo es zu einem Aminosäureaustausch von Valin zu Leucin führte (p.Val238Leu). Die HAT-Domäne war nicht betroffen. Allerdings war eine Domäne betroffen, die zu einer Interaktion mit SRCAP (Snf2-Related CREBBP Activator Protein) führt. SRCAP fungiert als Koaktivator für die *CREB*-vermittelte Transkription [114]. Auch hier handelte es sich um eine konservierte Nukleotidsequenz, in der die Mutation auftrat (siehe auch Tabelle 12 in Kapitel 3.3.5). Die beschriebene Mutation trat in der Keimbahn eines Patienten (Patient 4) auf. Dies bedeutet, dass das Gen in allen vier untersuchten Zellreihen Veränderungen aufwies.

Im *EZH2* Gen, das zu den wichtigen epigenetischen Regulatoren gehört, wurde eine Mutation identifiziert. *EZH2* ist ein Bestandteil der Polycomb Familie und fungiert als Histonmethyltransferase. Es ist unerlässlich für die Hämatopoese, hierbei vor allem für die Entwicklung von Stammzellen [115]. *EZH2* ist für die Regulierung der Repression der Transkription verantwortlich. Wiederkehrende Mutationen ließen sich bereits in der T-ALL feststellen [116]. Auch in anderen Studien, die sich mit der hoch hyperdiploiden ALL beschäftigten, konnten genetische Veränderungen im *EZH2* Gen nachgewiesen werden [42], [44]. In einer der Studien (Chen et al.) waren die Veränderungen allerdings auf das Rezidiv beschränkt. Die Mutation betraf die SET Domäne, die für die Methylierung von Lysin-9 in dem Histon H3 notwendig ist [44].

EZH2 war im Rahmen dieser Arbeit in der Leukämie eines Patienten genetisch verändert und betraf ebenfalls die SET Domäne (p.Ser681Leu, p.Ser639Leu, p.Ser695Leu,

p.Ser690Leu, p.Ser651Leu). In der Remission waren diese Veränderungen nicht mehr aufzufinden. Eine mögliche Erklärung wäre das Ansprechen der, die Veränderung tragenden, Blasten auf die verabreichte Chemotherapie. Da sowohl in dieser Studie, als auch in den oben genannten Studien zur hoch hyperdiploiden akuten lymphatischen Leukämie, genetische Veränderungen im *EZH2* Gen bei einer Leukämieerkrankung auftraten, könnte dem Gen *EZH2* eine wichtige Rolle in der Leukämogenese zukommen. Um diese Aussage bekräftigen zu können, müssten noch weitere Studien mit größeren Patientenkohorten durchgeführt werden.

Auch das *MLL3* Gen, ein epigenetischer Regulator, wies Mutationen auf. *MLL3* ist ein homologes Gen von *MLL*. Es befindet sich in der Region 7q36 und ist in myeloischen Leukämien häufig mutiert [117]. *MLL3* ist eine H3K4-Histon-Methyltransferase, die die Gen-Expression über FYR und SET Domänen reguliert [118]. Studien legen nahe, dass *MLL3* eine wichtige Rolle in der Kontrolle der normalen Differenzierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen inne hat [119]. Bis jetzt ist *MLL3* noch nicht mit der hoch hyperdiploiden ALL, allerdings bereits mit soliden Tumoren und der AML, in Verbindung gebracht worden [120], [121].

Im Rahmen dieser Arbeit war das Gen bei zwei Patienten (Patient 1 und 4) in der Keimbahn identisch genetisch verändert (p.Tyr12X, p.Tyr816X). Es handelt sich hierbei um Funktionsverlustmutationen. Diese führten unter anderem zu einem frühen Protein-Abbruch vor der SET Domäne. Chen et al. zeigten, dass *MLL3* als ein haploinsuffizienter Tumorsuppressor fungiert und dass ein Verlust von *MLL3* zu einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika führt [119]. Obwohl *MLL3* zu den am häufigsten mutierten Genen bei Krebserkrankungen gehört, ist noch wenig über die biologische Signifikanz des Genes bekannt [122], [123]. Da jedoch gezeigt wurde, dass Leukämien mit einem Verlust von *MLL3* sensibel auf den BET Inhibitoren JQ1 reagieren [119], wären weitere Studien zu diesem Gen, auch für mögliche neue Therapieansätze, interessant.

Mellor et al. konnten zeigen, dass das Gen *CREB3L1* als ein wichtiger Tumorsuppressor fungiert. *CREB3L1* ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von Genen unterdrückt, die an der Angiogenese und dem Überleben von Krebszellen beteiligt sind [124]. *CREB3L1* zeigte genetische Veränderungen in allen vier Patienten (p.Asp509GlyfsX156).

Dabei war das Gen bei einem Patienten in der Leukämie (Patient 2) und bei drei Patienten (Patient 1, 3 und 4) in der Keimbahn mutiert.

Ebenso zeigte das Gen *CREB3L2* Mutationen in der Keimbahn von zwei Patienten (Patient 1 und 4). Dies führte zu Deletionen mehrerer Aminosäuren (p.Pro34del, p.Thr37del, p.Thr100del). Genau wie *CREB3L1* fungiert es als Transkriptionsfaktor [125]. Die gefundenen Mutationen traten in einer konservierten Nukleotidsequenz auf (siehe auch Tabelle 12 in Kapitel 3.3.5).

Auffallend bei den im Rahmen dieser Arbeit gefundenen genetischen Variationen ist, dass sie zu einem großen Teil epigenetische Signalwege betreffen. Hierbei sind vor allem Gene betroffen, die in der Histonmodifikation eine Rolle spielen. Dies geht mit dem Ergebnis anderer Studien einher [42], [44]. Epigenetische Regulatoren weisen offenbar eine zentrale Rolle in der Entwicklung von Leukämien und Rezidiven auf. Demnach könnten diese auch für neue Therapieansätze in der hoch hyperdiploiden akuten lymphatischen Leukämie interessant sein.

Es sind verschiedene Mutationen in Genen gefunden worden, die eine Rolle bei der Entstehung der hoch hyperdiploiden akuten lymphatischen Leukämie spielen könnten. Weitere Studien mit größeren Patienten-Kohorten sind allerdings nötig, um den Zusammenhang und die spezifische Rolle der Gene in der Pathogenese der Leukämie weiter zu klären.

5 Zusammenfassung

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist, mit 80% der Fälle, die häufigste Leukämie im Kindesalter. Leukämiezellen zeigen häufig chromosomale Veränderungen. In ca. 20% der Fälle weisen Kinder, die an der akuten B-Zell-lymphatischen Leukämie erkrankt sind, einen hoch hyperdiploiden (>51 Chromosomen) Chromosomensatz auf. Diese numerische Aberration allein ist jedoch nicht ausreichend, um eine Leukämieerkrankung zu verursachen. Dafür sind weitere sekundäre Veränderungen nötig. Alternativ zu Veränderungen in den Leukämiezellen, könnten auch Veränderungen in den MSC, die einen Bestandteil der hämatologischen Nische bilden, hierbei eine Rolle spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von vier Patienten, die an einer hoch hyperdiploiden ALL (>51 Chromosomen) erkrankt sind, die mononukleäre Zellen (MNC), mesenchymale Stammzellen (MSC) und Fibroblasten hinsichtlich genomischer Veränderungen vergleichend untersucht. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Therapie (Fibroblasten nach Biopsie; MSC am Diagnosetag, MNC am Diagnosetag sowie in der Remission) gewonnen. Die isolierten Zellen durchliefen Qualitätskontrollen. Im Rahmen dieser Kontrollen differenzierten sich die mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten und Adipozyten. Die Reinheit der mesenchymalen Stammzellen, Fibroblasten und leukämischer Blasten wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Anschließend wurde aus den Zellen DNA isoliert und daraus Libraries für die Ganzgenomsequenzierung hergestellt. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mithilfe einer, im Haus etablierten, web-basierten Plattform verarbeitet. Es konnten bei allen vier untersuchten Patienten genetische Veränderungen identifiziert werden. Dabei wurde nur eine Mutation gefunden, die sowohl in der Leukämie als auch im Stroma und nicht in der Keimbahn auftrat. Von den genetischen Veränderungen waren unter anderem Gene betroffen, die bei der Bildung, Proliferation und Differenzierung von Zellen eine Rolle spielen (*MAML2*, *JAK3*, *RET*, *IL21R*). Des Weiteren konnten genetische Veränderungen in Genen nachgewiesen werden, die für die DNA-Replikation und -Reparatur verantwortlich sind (*BLM*, *MEN1*). Besonders hervorzuheben sind Mutationen im RAS-Signalweg (*NF1*, *FLT3*) sowie in epigenetischen Genregulatoren (unter anderem *CREBBP*, *EZH2*, *MLL3*). Die Variationen in den betroffenen Genen sind bereits im Rahmen bestehender Forschungsarbeiten im Zusammenhang mit einer Krebserkrankung, manche sogar im Zusammenhang mit hoch hyperdiploiden Leukämien, beschrieben worden. Ihre Veränderungen tragen vermutlich zu der Entstehung einer Leukämie bei. Um den genauen Einfluss dieser Gene in der Pathogenese der akuten lymphatischen Leukämie zu klären, sind weitere Studien mit größeren Patientenkohorten nötig.

6 Literaturverzeichnis

- 1 *Yiallourous M.* Akute lymphoblastische Leukämie (ALL). Berlin: Pediatric Oncology and Hematology Publications; 2006
- 2 *Inaba H, Greaves M, Mullighan CG.* Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* (London, England) 2013; 381: 1943–1955
- 3 *Martín-Lorenzo A, Hauer J, Vicente-Dueñas C et al.* Infection Exposure Is a Causal Factor in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia as a Result of Pax5-Inherited Susceptibility. *Cancer discovery* 2015; 5: 1328–1343
- 4 *Pui C, Relling MV, Downing JR.* Acute lymphoblastic leukemia. *The New England journal of medicine* 2004; 350: 1535–1548
- 5 *Gaynon PS.* Childhood acute lymphoblastic leukaemia and relapse. *British journal of haematology* 2005; 131: 579–587
- 6 *Nguyen K, Devidas M, Cheng S et al.* Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Leukemia* 2008; 22: 2142–2150
- 7 *Malempati S, Gaynon PS, Sather H et al.* Outcome after relapse among children with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: Children's Oncology Group study CCG-1952. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007; 25: 5800–5807
- 8 *Hehn.* Blut und Blutbildung. Online: http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/patienten/leukaemien/blut_und_blutbildung/ letzter Zugriff: 10.02.2016
- 9 *Bene MC, Bernier M, Castoldi G et al.* Impact of immunophenotyping on management of acute leukemias. *Haematologica* 1999; 84: 1024–1034
- 10 *Bene MC, Castoldi G, Knapp W et al.* Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995; 9: 1783–1786
- 11 *Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al.* Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British journal of haematology* 1976; 33: 451–458

- 12 *Child JA, Jack AS, Morgan GJ.* Lymphoproliferative disorders. Handbook of diagnosis, investigation, and management. London, New York: Chapman & Hall; 1998
- 13 *Mullighan CG.* Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of clinical investigation* 2012; 122: 3407–3415
- 14 *Moorman AV, Richards SM, Martineau M et al.* Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2003; 102: 2756–2762
- 15 *Paulsson K, Harrison CJ, Andersen MK et al.* Distinct patterns of gained chromosomes in high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia with t(1;19)(q23;p13), t(9;22)(q34;q22) or MLL rearrangements. *Leukemia* 2013; 27: 974–977
- 16 *Bhojwani D, Yang JJ, Pui C.* Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric clinics of North America* 2015; 62: 47–60
- 17 *Harrison CJ, Moorman AV, Broadfield ZJ et al.* Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology* 2004; 125: 552–559
- 18 *Holmfeldt, Linda, et al.* Genome-wide analysis of genetic alterations in hypodiploid acute lymphoblastic leukemia identifies a high frequency of mutations targeting the IKAROS gene family and Ras signaling. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2010
- 19 *Forestier E, Johansson B, Borgström G et al.* Cytogenetic findings in a population-based series of 787 childhood acute lymphoblastic leukemias from the Nordic countries. The NOPHO Leukemia Cytogenetic Study Group. *European journal of haematology* 2000; 64: 194–200
- 20 *Paulsson K, Johansson B.* High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosom. Cancer* 2009; 48: 637–660
- 21 *Kaneko Y, Hayashi Y, Sakurai M.* Chromosomal findings and their correlation to prognosis in acute lymphocytic leukemia. *Cancer genetics and cytogenetics* 1981; 4: 227–235
- 22 *Lampert F.* Cellulärer DNS-Gehalt und Chromosomenzahl bei der akuten Leukämie im Kindesalter und ihre Bedeutung für Chemotherapie und Prognose. *Klinische Wochenschrift* 1967; 45: 763–768

- 23 *Moorman AV, Ensor HM, Richards SM et al.* Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *The Lancet. Oncology* 2010; 11: 429–438
- 24 *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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010; 28: 2339–2347
- 25 *Heerema NA, Raimondi SC, Anderson JR et al.* Specific extra chromosomes occur in a modal number dependent pattern in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genes, chromosomes & cancer* 2007; 46: 684–693
- 26 *Oshimura M, Freeman AI, Sandberg AA.* Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. XXIII. Near-haploidy in acute leukemia. *Cancer* 1977; 40: 1143–1148
- 27 *Onodera N, McCabe NR, Nachman JB et al.* Hyperdiploidy arising from near-haploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes, chromosomes & cancer* 1992; 4: 331–336
- 28 *Ma SK, Chan GC, Wan TS et al.* Near-haploid common acute lymphoblastic leukaemia of childhood with a second hyperdiploid line: a DNA ploidy and fluorescence in-situ hybridization study. *British journal of haematology* 1998; 103: 750–755
- 29 *Stark B, Jeison M, Gobuzov R et al.* Near haploid childhood acute lymphoblastic leukemia masked by hyperdiploid line: detection by fluorescence in situ hybridization. *Cancer genetics and cytogenetics* 2001; 128: 108–113
- 30 *Chen C, Bartenhagen C, Gombert M et al.* Next-generation-sequencing-based risk stratification and identification of new genes involved in structural and sequence variations in near haploid lymphoblastic leukemia. *Genes, chromosomes & cancer* 2013; 52: 564–579
- 31 *Onodera N, McCabe NR, Rubin CM.* Formation of a hyperdiploid karyotype in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1992; 80: 203–208

- 32 *Paulsson K, Möirse H, Fioretos T et al.* Evidence for a single-step mechanism in the origin of hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes, chromosomes & cancer* 2005; 44: 113–122
- 33 *Irving JAE, Bloodworth L, Bown NP et al.* Loss of heterozygosity in childhood acute lymphoblastic leukemia detected by genome-wide microarray single nucleotide polymorphism analysis. *Cancer research* 2005; 65: 3053–3058
- 34 *Mullighan CG, Goorha S, Radtke I et al.* Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007; 446: 758–764
- 35 *Shu XO, Perentesis JP, Wen W et al.* Parental exposure to medications and hydrocarbons and ras mutations in children with acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2004; 13: 1230–1235
- 36 *Wiemels JL, Zhang Y, Chang J et al.* RAS mutation is associated with hyperdiploidy and parental characteristics in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2005; 19: 415–419
- 37 *Paulsson K, Horvat A, Strömbeck B et al.* Mutations of FLT3, NRAS, KRAS, and PTPN11 are frequent and possibly mutually exclusive in high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes, chromosomes & cancer* 2008; 47: 26–33
- 38 *Hjalgrim LL, Rostgaard K, Hjalgrim H et al.* Birth weight and risk for childhood leukemia in Denmark, Sweden, Norway, and Iceland. *Journal of the National Cancer Institute* 2004; 96: 1549–1556
- 39 *Maia AT, van der Velden, V H J, Harrison CJ et al.* Prenatal origin of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in identical twins. *Leukemia* 2003; 17: 2202–2206
- 40 *Taub JW.* High frequency of leukemic clones in newborn screening blood samples of children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 99: 2992–2996
- 41 *Panzer-Grümayer ER, Fasching K, Panzer S et al.* Nondisjunction of chromosomes leading to hyperdiploid childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia is an early event during leukemogenesis. *Blood* 2002; 100: 347–349

- 42 *Paulsson K, Lilljebjörn H, Biloglav A et al.* The genomic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics* 2015; 47: 672–676
- 43 *Malinowska-Ozdowy K, Frech C, Schönegger A et al.* KRAS and CREBBP mutations: a relapse-linked malicious liaison in childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2015; 29: 1656–1667
- 44 *Chen C, Bartenhagen C, Gombert M et al.* Next-generation-sequencing of recurrent childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia reveals mutations typically associated with high risk patients. *Leukemia research* 2015; 39: 990–1001
- 45 *Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH et al.* CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2011; 471: 235–239
- 46 *Yang MH, Nickerson S, Kim ET et al.* Regulation of RAS oncogenicity by acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012; 109: 10843–10848
- 47 *Zimmermann G, Papke B, Ismail S et al.* Small molecule inhibition of the KRAS-PDE δ interaction impairs oncogenic KRAS signalling. *Nature* 2013; 497: 638–642
- 48 *Taketani T, Taki T, Sugita K et al.* FLT3 mutations in the activation loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant ALL with MLL rearrangements and pediatric ALL with hyperdiploidy. *Blood* 2004; 103: 1085–1088
- 49 *Armstrong SA, Mabon ME, Silverman LB et al.* FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004; 103: 3544–3546
- 50 *Andersson A, Paulsson K, Lilljebjörn H et al.* FLT3 mutations in a 10 year consecutive series of 177 childhood acute leukemias and their impact on global gene expression patterns. *Genes, chromosomes & cancer* 2008; 47: 64–70
- 51 *Deutsche Krebsgesellschaft e.V.* StudienID 385. Online: <http://www.studien.de/PDF/385.pdf> letzter Zugriff: 12.02.2016
- 52 *Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI et al.* Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; 6: 230–247
- 53 *Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)* 1999; 284: 143–147
- 54 *Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ.* Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal

- cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98: 7841–7845
- 55 *Antonitsis P, Ioannidou-Papagiannaki E, Kaidoglou A et al.* In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery* 2007; 6: 593–597
- 56 *Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ et al.* Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of neuroscience research* 2000; 61: 364–370
- 57 *Lee K, Kuo TK, Whang-Peng J et al.* In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2004; 40: 1275–1284
- 58 *Meisel R, Kuci S, Müller I.* Mesenchymale Stammzellen. *Monatsschr Kinderheilkd* 2010; 158: 240–245
- 59 *Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV et al.* Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 1974; 17: 331–340
- 60 *Nagasawa T.* Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nature reviews. Immunology* 2006; 6: 107–116
- 61 *Schafiq Nabhani.* Rolle des Tel-AML-1- Fusionsprotein in mesenchymalen Stammzellen von Kindern mit hämatologischen Neoplasien [Diplomarbeit]. Düsseldorf: *Heinrich-Heine- Universität*; 08/2011
- 62 *Gimble JM, Guilak F, Nuttall ME et al.* In vitro Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* 2008; 35: 228–238
- 63 *Prockop DJ, Phinney DG, Bunnell BA.* Methods and protocols. Preface. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2008; 449: v–vii
- 64 *Kuçi S, Kuçi Z, Kreyenberg H et al.* CD271 antigen defines a subset of multipotent stromal cells with immunosuppressive and lymphohematopoietic engraftment-promoting properties. *Haematologica* 2010; 95: 651–659
- 65 *Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW et al.* Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003; 425: 841–846

- 66 *Phinney DG, Prockop DJ*. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2007; 25: 2896–2902
- 67 *Guillot PV, Abass O, Bassett JHD et al*. Intrauterine transplantation of human fetal mesenchymal stem cells from first-trimester blood repairs bone and reduces fractures in osteogenesis imperfecta mice. *Blood* 2008; 111: 1717–1725
- 68 *Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA et al*. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature medicine* 1999; 5: 309–313
- 69 *Lee RH, Seo MJ, Reger RL et al*. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103: 17438–17443
- 70 *Nauta AJ, Fibbe WE*. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007; 110: 3499–3506
- 71 *Meisel R, Zibert A, Laryea M et al*. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004; 103: 4619–4621
- 72 *Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M et al*. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental hematology* 2002; 30: 42–48
- 73 *Tisato V, Naresh K, Girdlestone J et al*. Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. *Leukemia* 2007; 21: 1992–1999
- 74 *Shalapour S, Eckert C, Seeger K et al*. Leukemia-associated genetic aberrations in mesenchymal stem cells of children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 2010; 88: 249–265
- 75 *Borkhardt A*. Where do the leukaemia relapses come from? *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 2010; 88: 219–222
- 76 *Menendez P, Catalina P, Rodríguez R et al*. Bone marrow mesenchymal stem cells from infants with MLL-AF4+ acute leukemia harbor and express the MLL-AF4 fusion gene. *The Journal of experimental medicine* 2009; 206: 3131–3141

- 77 *Raaijmakers, Marc H G P, Mukherjee S, Guo S et al.* Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature* 2010; 464: 852–857
- 78 *Blau O, Baldus CD, Hofmann W et al.* Mesenchymal stromal cells of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients have distinct genetic abnormalities compared with leukemic blasts. *Blood* 2011; 118: 5583–5592
- 79 *Takashima Y, Era T, Nakao K et al.* Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell* 2007; 129: 1377–1388
- 80 *Barry F, Boynton R, Murphy M et al.* The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2001; 289: 519–524
- 81 *Arufe MC, La Fuente A de, Fuentes-Boquete I et al.* Differentiation of synovial CD-105(+) human mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells through spheroid formation. *Journal of cellular biochemistry* 2009; 108: 145–155
- 82 *Wellcome Trust Sanger Institute.* COSMIC: Cancer Gene census. Online: <http://cancer.sanger.ac.uk/census/> letzter Zugriff: 25.01.2016
- 83 *Sim N, Kumar P, Hu J et al.* SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic acids research* 2012; 40: W452-7
- 84 *Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR.* Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Current protocols in human genetics* / editorial board, Jonathan L. Haines et al. 2013; Chapter 7: Unit7.20
- 85 *Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F et al.* Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer research* 2007; 67: 9142–9149
- 86 *Weizmann Institute of Science.* MAML2 Gene. Online: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=maml2> letzter Zugriff: 15.01.2016
- 87 *Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Alvarez-Twose I et al.* KIT D816V-mutated bone marrow mesenchymal stem cells in indolent systemic mastocytosis are associated with disease progression. *Blood* 2016; 127: 761–768
- 88 *Leonard WJ, O'Shea JJ.* Jaks and STATs: biological implications. *Annual review of immunology* 1998; 16: 293–322

- 89 *Rane SG, Reddy EP.* JAK3: a novel JAK kinase associated with terminal differentiation of hematopoietic cells. *Oncogene* 1994; 9: 2415–2423
- 90 *Bains T, Heinrich MC, Loriaux MM et al.* Newly described activating JAK3 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2012; 26: 2144–2146
- 91 *Weizmann Institute of Science.* RET Gene. Online: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RET&keywords=RET> letzter Zugriff: 15.01.2016
- 92 *Weizmann Institute of Science.* IL21R Gene. Online: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL21R&keywords=IL21R> letzter Zugriff: 15.01.2016
- 93 *Arora H, Chacon AH, Choudhary S et al.* Bloom syndrome. *International journal of dermatology* 2014; 53: 798–802
- 94 *Weizmann Institute of Science.* MEN1 Gene. Online: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MEN1&keywords=MEN1> letzter Zugriff: 15.01.2016
- 95 *Yokoyama A, Somervaille TCP, Smith KS et al.* The menin tumor suppressor protein is an essential oncogenic cofactor for MLL-associated leukemogenesis. *Cell* 2005; 123: 207–218
- 96 *Hoeijmakers JH.* Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001; 411: 366–374
- 97 *Maxson JE, Davare MA, Luty SB et al.* Therapeutically Targetable ALK Mutations in Leukemia. *Cancer research* 2015; 75: 2146–2150
- 98 *Weizmann Institute of Science.* NF1 Gene. Online: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NF1&keywords=NF1> letzter Zugriff: 15.01.2016
- 99 *Hubbard SR, Till JH.* Protein tyrosine kinase structure and function. *Annual review of biochemistry* 2000; 69: 373–398
- 100 *Blume-Jensen P, Hunter T.* Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001; 411: 355–365
- 101 *Weizmann Institute of Science.* FLT3 Gene. Online: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FLT3&keywords=FLT3> letzter Zugriff: 15.01.2016
- 102 *Nakao M, Yokota S, Iwai T et al.* Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; 10: 1911–1918
- 103 *Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA et al.* Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology* 2001; 113: 983–988

- 104 *Schnittger S, Schoch C, Dugas M et al.* Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 2002; 100: 59–66
- 105 *Andersson A, Johansson B, Lassen C et al.* Clinical impact of internal tandem duplications and activating point mutations in FLT3 in acute myeloid leukemia in elderly patients. *European journal of haematology* 2004; 72: 307–313
- 106 *Meshinchi S, Alonzo TA, Stirewalt DL et al.* Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. *Blood* 2006; 108: 3654–3661
- 107 *Ley TJ, Minx PJ, Walter MJ et al.* A pilot study of high-throughput, sequence-based mutational profiling of primary human acute myeloid leukemia cell genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100: 14275–14280
- 108 *Schnittger S, Kohl TM, Leopold N et al.* D324N single-nucleotide polymorphism in the FLT3 gene is associated with higher risk of myeloid leukemias. *Genes, chromosomes & cancer* 2006; 45: 332–337
- 109 *Elisei R, Cosci B, Romei C et al.* RET exon 11 (G691S) polymorphism is significantly more frequent in sporadic medullary thyroid carcinoma than in the general population. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2004; 89: 3579–3584
- 110 *Spiekermann K, Dirschinger RJ, Schwab R et al.* The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits FLT3 and induces growth arrest and apoptosis in AML-derived cell lines expressing a constitutively activated FLT3. *Blood* 2003; 101: 1494–1504
- 111 *Tse KF, Mukherjee G, Small D.* Constitutive activation of FLT3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation. *Leukemia* 2000; 14: 1766–1776
- 112 *Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H et al.* Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene* 2000; 19: 624–631
- 113 *Inthal A, Zeithofer P, Zeginigg M et al.* CREBBP HAT domain mutations prevail in relapse cases of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2012; 26: 1797–1803

- 114 *Weizmann Institute of Science*. SRCAP Gene. Online:
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SRCAP> letzter Zugriff:
 25.01.2016
- 115 *Lund K, Adams PD, Copland M*. EZH2 in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia* 2014; 28: 44–49
- 116 *Ntziachristos P, Tsirigos A, van Vlierberghe P et al*. Genetic inactivation of the polycomb repressive complex 2 in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature medicine* 2012; 18: 298–301
- 117 *Ruault M, Brun ME, Ventura M et al*. MLL3, a new human member of the TRX/MLL gene family, maps to 7q36, a chromosome region frequently deleted in myeloid leukaemia. *Gene* 2002; 284: 73–81
- 118 *Tenney K, Shilatifard A*. A COMPASS in the voyage of defining the role of trithorax/MLL-containing complexes: linking leukemogenesis to covalent modifications of chromatin. *Journal of cellular biochemistry* 2005; 95: 429–436
- 119 *Chen C, Liu Y, Rappaport AR et al*. MLL3 is a haploinsufficient 7q tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Cancer cell* 2014; 25: 652–665
- 120 *Balakrishnan A, Bleeker FE, Lamba S et al*. Novel somatic and germline mutations in cancer candidate genes in glioblastoma, melanoma, and pancreatic carcinoma. *Cancer research* 2007; 67: 3545–3550
- 121 *Dolnik A, Engelmann JC, Scharfenberger-Schmeer M et al*. Commonly altered genomic regions in acute myeloid leukemia are enriched for somatic mutations involved in chromatin remodeling and splicing. *Blood* 2012; 120: e83-92
- 122 *Kandoth C, McLellan MD, Vandin F et al*. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 2013; 502: 333–339
- 123 *Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH et al*. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 2014; 505: 495–501
- 124 *Mellor P, Deibert L, Calvert B et al*. CREB3L1 is a metastasis suppressor that represses expression of genes regulating metastasis, invasion, and angiogenesis. *Molecular and cellular biology* 2013; 33: 4985–4995
- 125 *Weizmann Institute of Science*. CREB3L2 Gene. Online:
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CREB3L2&keywords=CREB3L2> letzter Zugriff: 15.01.2016
- 126 *Eigene Darstellung*

7 Anhang

Ergebnisse der Sequenzierung zur Ermittlung der SNPs und Indels in der Keimbahn von hoch hyperdiploiden Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie

Pat.	Region	Ref.	Alt.	Name	Konsequenz	GMAF	Annotation	Polyphen	Sift	Aminosäureaustausch	Reads	Ref-Reads	Var-Reads	cDNA Basenaustausch
1	1:156737969	C	T	PRCC	missense	T:0.1360	rs11264542	unknown	tol.	p.Pro136Ser	29, 24, 14, 18	20, 14, 9, 8	9, 10, 5	c.406C>T
1	3:149238595-149238599	C	CTTAA	WWTR1	frameshift	na	rs112399999	na	na	p.X401X	21, 17, 19	0	19, 14, 20, 18	c.1199_1200insTTAA
1	6:35430686	G	A	FANCE	missense	A:0.1401	rs9462088	benign	tol.	p.Ala502Thr	39, 66, 22, 36	17, 44, 6, 16	20, 22, 15	c.1504G>A
1	7:73474825	G	C	ELN	missense	C:0.0472	rs17855988	unknown	del.	p.Gly587Arg, p.Gly552Arg, p.Gly581Arg, p.Gly557Arg, p.Gly567Arg, p.Gly616Arg, p.Gly445Arg, p.Gly581Arg, p.Gly520Arg, p.Gly571Arg, p.Gly586Arg, p.Gly533Arg, p.Gly562Arg, p.Gly581Arg, p.Gly500Arg	42, 76, 26, 27	20, 41, 14, 16	22, 35, 12, 11	c.1759G>C, c.1654G>C, c.1741G>C, c.1669G>C, c.1846G>C, c.1684G>C, c.1333G>C, c.1558G>C, c.1756G>C, c.1597G>C, c.1711G>C, c.1498G>C
1	7:91708898	A	G	AKAP9	missense	G:0.0668	rs35759833	benign	tol.	p.Lys2496Arg, p.Lys330Arg, p.Lys2484Arg	17, 19, 20, 24	8, 11, 10	9, 8, 14	c.989A>G, c.7487A>G, c.7451A>G
1	7:116340262	A	G	MET	missense	G:0.0211	---\n- rs33917957\	benign	tol.	p.Asn375Ser	20, 31, 23, 13	10, 15, 12, 8	10, 16, 11, 5	c.1124A>G
1	7:128851867	C	T	SMO	missense	T:0.0032	rs34545616	prob. dam.	del.	p.Pro647Ser	23, 13, 14, 10	14, 5	9, 8, 5	c.1939C>T
1	7:137612913-137612916	CTGG	C	CREB3L2	inframe deletion	na	rs66593747	na	na	p.Thr100del, p.Pro34del, p.Thr37del	25, 43	17, 5, 24, 16	8, 20, 19, 9	c.299_301delCCA, c.100_102delCCA, c.110_112delCCA
1	7:148525904	C	G	EZH2	missense	G:0.0737	rs2302427	benign,	del.	p.Asp176His, p.Asp185His, p.Asp146His, p.Asp76His	18, 21, 17, 22	13, 12, 6, 15	5, 9, 11, 7	c.526G>C, c.553G>C, c.436G>C, c.226G>C
1	7:151945071-151945072	G	GT	MILL3	frameshift	na	---\n- COSM289943\	na	na	p.Tyr816X, p.Tyr12X	30, 63, 50	32, 62, 43, 54	7, 13, 11, 15	c.2447dupA, c.33dupA
1	8:17867185	A	T	PCM1	missense	T:0.0174	---\n- COSM50292\	benign	tol.	p.Ile1644Leu, p.Ile1698Leu, p.Ile397Leu, p.Ile1690Leu, p.Ile438Leu	10, 16, 17, 15	6, 10, 11, 7	4, 6, 8	c.4930A>T, c.5092A>T, c.1189A>T, c.5068A>T, c.1311A>T
1	11:46342259-46342260	A	AG	CREB3L1	frameshift, splice acceptor	na	rs79068197	na	na	p.Asp509GlyfsX156	51, 19, 29, 27	4, 1, 0, 2	47, 17, 29, 25	c.1524-1_1524insG, c.1525-2_1525-1insG
1	11:64575505	C	T	MEN1	missense	T:0.0078	---\n- rs607969\	benign	tol.	p.Arg176Gln, p.Arg171Gln	36, 41, 81, 24	19, 23, 44, 7	16, 18, 37, 17	c.527G>A, c.512G>A
1	12:677069-6777072	TTGC	T	ZNF384	inframe deletion	na	rs3835029	na	na	p.Gln399del, p.Gln454del, p.Gln515del, p.Gln515del, p.Gln438del	35, 42, 20, 24	22, 26, 11, 16	13, 15, 8	c.1194_1196delGCA, c.1311_1313delGCA, c.1359_1361delGCA, c.1542_1544delGCA
1	14:81422178	C	A	TSHR	missense	A:0.0339	---\n- rs2234919\	benign	tol.	p.Pro52Thr	94, 17, 28	50, 8, 12, 14	44, 9, 16, 14	c.154C>A
1	15:74328206	G	C	PML	missense	C:0.1181	rs743582	benign,	tol.	p.Ala754Pro, p.Ala802Pro	14, 16, 15, 21	7, 9, 8, 10	7, 11	c.2260G>C, c.2404G>C
1	15:91172481	G	A	CRTC3	missense	na	na	pos. dam.	tol.	p.Arg328Gln	21, 16, 25, 20	9, 8, 11	12, 8, 14	c.983G>A
1	16:56969148	G	A	HERPUD1	missense	A:0.1172	---\n- rs2217332\	benign	del.	p.Arg8His, p.Arg50His	21, 17, 26, 25	13, 6, 14, 11	8, 10, 12, 14	c.23G>A, c.149G>A
1	16:88964557	C	G	CBFA2T3	missense	G:0.0389	rs61734177	benign	del.	p.Arg42Pro, p.Arg103Pro	20, 31, 14, 26	11, 16, 7, 14	9, 15, 7, 12	c.125G>C, c.308G>C
1	16:89805914	T	C	FANCA	missense	C:0.0833	rs9282681	benign	tol.	p.Thr1328Ala, p.Thr62Ala, p.Thr45Ala, p.Thr105Ala	57, 23, 35, 74	31, 10, 19, 35	26, 13, 16, 39	c.3982A>G, c.183A>G, c.133A>G, c.312A>G
1	16:89839766	G	C	FANCA	missense	C:0.0870	rs17329210	benign	tol.	p.Pro11Ala, p.Pro643Ala	36, 13, 29, 22	16, 7, 17	20, 6, 12, 15	c.29C>G, c.1927C>G
1	16:89857935	G	A	FANCA	missense	A:0.0824	rs11646374	pos. dam.,	tol.	p.Ala412Val	41, 32, 115, 19	22, 18, 60, 9	18, 14, 54, 10	c.1235C>T
1	17:5033733	A	C	USP6	missense	na	TMP_ESP_17_5033733	unknown,	del.	p.Lys24Thr	40, 34, 17, 81	20, 17, 9, 40	20, 17, 8, 41	c.71A>C
1	17:29528158	A	G	NF1	missense	na	rs149739570	benign	tol.	p.His55Arg, p.His389Arg, p.His423Arg	11, 18, 16	3, 7, 12, 8	8, 11, 4, 10	c.164A>G, c.1166A>G, c.1268A>G

Pat. Region	Ref.	Alt.	Name	Konsequenz	GVAF	Annotation	Polyphen	Sift	Aminosäurenaustausch	Reads	Ref.-Reads	Var.-Reads	cDNA Basenaustausch
1 17:41246481	T	C	BRCA1	missense	C:0.0279	---\n- rs1799950\ n- rs80357796\ n- CM014322\vn	prob. dam., pos. dam.	del.	p.Gln356Arg, p.Gln330Arg, p.Gln356Arg, p.Gln60Arg, p.Gln140Arg, p.Gln222Arg, p.Gln309Arg	25, 28, 24, 21	17, 15, 12, 9	8, 11, 12	c.1067A>G, c.989A>G, c.179A>G, c.418A>G, c.926A>G, c.664A>G
1 17:66519857-66519858	C	CT	PRKAR1A	frameshift	na	na	na	na	p.Ser119PhefsX2	25, 29, 24, 20	13, 14, 12, 8	11, 15, 12, 13	c.351_352insT
1 19:17946853	C	G	JAK3	missense	na	rs138143146	pos. dam.	tol.	p.Met598Ile	30, 54, 24, 32	17, 30, 11, 21	13, 24, 11	1794G>C
1 19:45284266	A	C	CBLC	missense	C:0.0691	rs35106910	prob. dam.	del.	p.Lys153Thr	27, 28, 47, 60	13, 15, 25, 18	14, 13, 22, 42	c.458A>C
2 2:29497967	G	A	ALK	missense	A:0.0096	rs35228363	benign	del.	p.Thr680Ile	9, 14, 5	5, 8, 2, 4	4, 6, 3, 5	c.2039C>T
2 2:209108317-209108317	C	T	IDH1	missense	T:0.0412	---\n- rs34218846\ n- COSM97131\vn	benign	tol.	p.Val178Ile	8, 11, 19	4, 7, 9	4, 9, 10	c.532G>A
2 3:10183534	G	C	VHL	initiator codon	na	COSM14367	unknown, benign	tol.	p.Met1?	15, 10, 16	6, 4, 5, 7	9, 6, 10	c.3G>C
2 4:55979558	C	T	KDR	missense	T:0.1310	---\n- rs2305948\ n- CM074307\vn	prob. dam.	tol.	p.Val297Ile	21, 12, 14, 7	9, 4, 8, 3	12, 8, 6, 4	c.889G>A
2 4:106196770	G	A	TET2	missense	A:0.0037	rs62623390	benign	del.	p.Met1701Ile, p.Met1722Ile	21, 33, 7, 31	9, 19, 3, 14	12, 14, 4, 17	c.5103G>A, c.5166G>A
2 7:148525904	C	G	EZH2	missense	G:0.0737	rs2302427	pos. dam., benign	del.	p.Asp146His, p.Asp185His, p.Asp176His, p.Asp76His	18, 11, 17, 6	6, 13, 3	12, 5, 4, 3	c.436G>C, c.553G>C, c.526G>C, c.226G>C
2 9:135786904	A	G	TSC1	missense	G:0.1369	rs1073123	benign	tol.	p.Met322Thr, p.Met201Thr, p.Met271Thr	5, 17, 29, 15	1, 10, 15, 8	4, 7, 14	c.965T>C, c.602T>C, c.812T>C
2 9:136030573	G	A	RALGDS	missense	A:0.0137	rs35039208	prob. dam.	tol.	p.Arg130Cys	14, 5, 31, 29	5, 2, 17, 11	9, 3, 14, 18	c.388C>T
2 14:93263982	C	G	GOLGA5	missense	G:0.1053	---\n- rs17128572\ n- CM065242\vn	prob. dam., pos. dam.	del.	p.Ala67Gly	23, 20, 8	10, 14, 11, 5	13, 9, 3	c.200C>G
2 16:89805914	T	C	FANCA	missense	C:0.0833	rs9282681	benign	tol.	p.Thr1328Ala, p.Thr105Ala, p.Thr45Ala, p.Thr62Ala	26, 30, 32, 9	0	26, 30, 32, 9	c.3982A>G, c.312A>G, c.133A>G, Ec.183A>G
2 16:89815152	G	A	FANCA	missense	A:0.0334	---\n- rs17233497\ n- CM992318\vn	benign, pos. dam.	del.	p.Ser1088Phe, p.Ser38Phe	6, 34, 39, 28	0	6, 34, 39, 28	c.3263C>T, c.1111C>T
2 16:89857935	G	A	FANCA	missense	A:0.0824	rs11646374	pos. dam., benign	tol.	p.Ala412Val	6, 32, 22, 34	0	6, 32, 22, 34	c.1235C>T
3 1:186316488	C	T	TPR	missense	T:0.1016	rs3753565	pos. dam.	del.	p.Ser960Asn	9, 16, 10	5, 7	4, 9, 3, 5	c.2879G>A
3 2:24262060	G	A	C2orf44	missense	A:0.0856	rs3731620	benign	tol.	p.Thr102Met	23, 18, 12	13, 9, 12, 6	10, 9, 11, 6	c.305C>T
3 3:12393125	C	G	PPARG	missense	G:0.0659	---\n- rs1801282\ n- CM981614\vn	unknown, benign	del.	p.Pro12Ala	14, 12, 8, 9	5, 8, 6	9, 4, 3	c.34C>G
3 7:91708898	A	G	AKAP9	missense	G:0.0668	rs35759833	benign	tol.,	p.Lys330Arg, p.Lys2496Arg, p.Lys2484Arg	11, 10, 17, 12	7, 2, 4	4, 8, 13, 5	c.989A>G, c.7487A>G, c.7451A>G
3 7:138556108	C	A	KIAA1549	missense	na	na	prob. dam.	del.	p.Gly1449Val, p.Gly1399Val	9, 13	4, 3, 5	5, 6, 4, 9	c.4346G>T, c.4196G>T
3 8:5078933	G	T	PIAG1	missense	T:0.1190	rs35883156	pos. dam.	tol.	p.Pro376Thr, p.Pro458Thr	13, 12, 7, 14	9, 4, 3	4, 8, 5	c.1126C>A, c.1372C>A
3 8:71039118	C	G	NCOA2	missense	G:0.0595	rs2228591	benign	tol.	p.Met383Ile, p.Met1282Ile, p.Met370Ile	14, 11, 15, 7	9, 7, 4	5, 4, 8, 3	c.1148G>C, c.3846G>C, c.1110G>C
3 10:43604649	G	A	RET	missense	na	na	pos. dam.	del.	p.Val412Met	19, 26, 16, 17	9, 14, 8, 12	10, 12, 8, 5	c.1234G>A
3 11:3700809	A	G	NUP98	missense	na	rs138664271	benign, pos. dam.	tol.,	p.Ile636Thr, p.Ile1683Thr, p.Ile1609Thr, p.Ile37Thr	18, 16, 7, 13	5, 8, 3	13, 8, 4, 5	c.1905T>C, c.5048T>C, c.4826T>C, c.109T>C
3 12:6777069-6777072	TTGC	T	ZNF384	inframe deletion	na	rs3835029	na	na	p.Gln395del, p.Gln515del, p.Gln438del, p.Gln454del	8, 14, 20	2, 7, 10	6, 7, 9, 10	c.1194_1196delGCA, c.1542_1544delGCA, c.1311_1313delGCA, c.1359_1361delGCA
3 16:11001691	C	T	CIITA	missense	T:0.0508	rs13330686	benign	tol.	p.Ser781Leu	15, 18, 9, 17	5, 10, 4	10, 7, 5	c.2342C>T
3 16:11001694	T	C	CIITA	missense	C:0.0508	rs13336804	benign	tol.	p.Val782Ala	18, 9, 16, 15	9, 4, 10, 6	7, 5, 6, 9	c.2345T>C
3 16:27460531	C	A	IL2IR	missense	na	na	prob. dam.	tol.	p.Pro515His	18, 15, 23, 8	9, 10, 4	9, 6, 13, 4	c.1544C>A
3 16:56969148	G	A	HERPUD1	missense	A:0.1172	---\n- rs2217332\ n- COSM148083\vn	benign	tol.,	p.Arg50His, p.Arg8His	16, 18, 12	8, 14, 6	8, 4, 6	c.149G>A, c.23G>A
3 16:88964557	C	G	CBFA2T3	missense	G:0.0389	rs61734177	benign	tol.,	p.Arg42Pro, p.Arg103Pro	19, 7, 12	11, 3, 5, 2	8, 4, 7, 5	c.125G>C, c.308G>C

Pat. Region	Ref.	Alt.	Name	Konsequenz	GMAF	Annotation	Polyphe	Sift	Aminosäurenaustausch	Reads	Ref.-Reads	Var.-Reads	cDNA Basenaustausch
3 16:89805914	T	C	FANCA	missense	C:0.0833	rs9282681	benign	tol.	p.Thr105Ala, p.Thr1328Ala, p.Thr62Ala, p.Thr45Ala	14, 15, 18, 25	5, 8, 16	9, 7, 12	c.312A>G, c.3982A>G, c.183A>G, c.133A>G
3 16:89857935	G	A	FANCA	missense	A:0.0824	rs11646374	pos. dam., benign	tol.	p.Ala412Val	21, 15, 20, 14	8, 10, 5	13, 5, 15, 4	c.1235C>T
3 11:46342259-46342260	A	AG	CREB3L1	frameshift, splice acceptor		rs79068197			p.Asp509GlyfsX156	7, 33, 19, 10	0, 2	7, 34, 17, 10	c.1524-1_1524insG, c.1525-2_1525-1insG
3 3:181430976	G	C	SOX2	missense	na	na	prob. dam.	del.	p.Met276Ile	16, 9, 11	7, 1, 4, 0	9, 8, 7	c.828G>C
4 2:24262060	G	A	C2orf44	missense	A:0.0856	rs3731620	benign	tol.	p.Thr102Met	24, 26, 31, 20	12, 14, 9	12, 14, 17, 11	c.305C>T
4 3:10183605	C	T	VHL	missense	na	---\n- rs35460768\	unknown, pos. dam.	del.	p.Pro25Leu	14, 10	5, 3, 8, 7	9, 7, 6, 3	c.74C>T
						n- CM981994\							
						n- COSM36211\							
4 4:106196829	T	G	TET2	missense	G:0.0920	---\n- rs34402524\	pos. dam.	del.	p.Leu1721Trp, p.Leu1742Trp	17, 32, 22	5, 10, 21, 16	11, 7, 6	c.5162T>G, c.5225T>G
4 5:38486065	C	T	LIFR	missense	T:0.1438	rs3110234	benign	tol.	p.Val785Ile	12, 17	5, 10, 4, 7	7, 8, 5	c.2353G>A
4 6:117724379	C	T	ROS1	missense	T:0.0614	rs2243380	benign	del.	p.Arg176Gln, p.Arg167Gln	15, 13, 7, 12	4, 8, 3, 2	11, 5, 4, 10	c.527G>A, c.500G>A
4 6:168297647	A	G	MLLT4	missense	G:0.0133	rs35140809	prob. dam., benign, pos. dam.	del.	p.Ile437Val, p.Ile438Val, p.Ile137Val, p.Ile422Val	17, 15, 12, 10	11, 9, 5	6, 5, 7	c.1309A>G, c.1312A>G, c.407A>G, c.1264A>G
4 7:73474825	G	C	ELN	missense	C:0.0472	rs17855988	unknown	del.	p.Gly552Arg, p.Gly500Arg, p.Gly581Arg	29, 16, 18, 17	17, 8, 11, 9	12, 8, 7	c.1654G>C, c.1498G>C, c.1741G>C, c.1699G>C, c.1846G>C, c.1597G>C, c.1333G>C, c.1558G>C
4 7:151945071-151945072	G	GT	MLL3	frameshift	na	---\n- COSM289943\	na	na	p.Tyr12X, p.Tyr816X	45, 38, 43	36, 37, 28, 35	12, 10, 11, 8	c.1711G>C, c.1756G>C
						n- COSM289942\							c.33dupA, c.2447dupA
4 9:36846910	C	T	PAX5	missense	T:0.0174	rs35469494	benign	tol.	p.Gly266Glu	8, 17, 14	4, 2, 12	4, 6, 5, 10	c.797G>A
4 9:132671178	A	G	FNBP1	missense	G:0.0041	rs7988508	benign	tol.	p.Met429Thr, p.Met400Thr, p.Met420Thr	18, 9, 15, 11	8, 5, 11, 7	10, 4	c.1286T>C, c.1199T>C, c.1707T>C, c.1141T>C, c.1259T>C
4 9:132740766	T	G	FNBP1	missense	na	na	benign, pos. dam.	del.	p.Met57Thr, p.Met381Thr	22, 15, 14, 10	9, 11, 7, 5	13, 4, 7, 5	c.208A>C, c.323A>C
4 10:104359297	G	T	SUFU	missense	T:0.0055	rs34135067	benign	tol.	p.Ala340Ser	30, 20, 9, 18	10, 8, 3	20, 12, 6, 10	c.1018G>T
4 11:46342259-46342260	A	AG	CREB3L1	splice acceptor, frameshift	na	rs79068197	na	na	p.Asp509GlyfsX156	19, 18, 13	0, 2	19, 18, 13, 17	c.1525-2_1525-1insG, c.1524-1_1524insG
4 12:6777069-6777072	TTGC	T	ZNF384	inframe deletion	na	rs3835029	na	na	p.Gln454del, p.Gln399del, p.Gln438del, p.Gln515del	15, 17	9, 5, 3	6, 11, 12	c.1359_1361delGCA, c.1194_1196delGCA, c.1311_1313delGCA, c.1542_1544delGCA
4 12:49445028	G	A	MLL2	missense	A:0.0256	rs75226229	unknown	na	p.Pro813Leu	16, 18, 19, 24	8, 10, 13, 11	8, 5, 13	c.248C>T
4 12:57114869	T	C	NACA	missense	C:0.0650	rs17118953	unknown	del.	p.Lys149Glu	16, 9, 13, 17	8, 4, 7	8, 5, 10	c.445A>G
4 16:3900384	C	G	CREBBP	missense	na	rs146887252	benign, prob. dam.	tol.	p.Val238Leu	10, 17, 22, 16	6, 10, 8	4, 7, 12, 8	c.712G>C
4 17:5042715	G	A	USP6	missense	A:0.1145	rs61740308	pos. dam.	del.	p.Cys415Tyr, p.Cys98Tyr	12, 18, 25	4, 8, 13, 11	8, 4, 5, 13	c.1244G>A, c.293G>A
4 17:5042837	C	T	USP6	missense	T:0.1145	---\n- rs61745111\	benign	del.	p.Arg456Trp, p.Arg139Trp	22, 9, 20, 17	7, 5, 8	15, 4, 12, 9	c.1366C>T, c.415C>T
						n- COSM25356\							
4 17:62496670	A	C	DDX5	missense	C:0.0403	---\n- rs1140409\	benign	tol.	p.Ser401Ala, p.Ser480Ala	18, 7, 36	10, 4, 14, 11	8, 3, 22, 7	c.1201T>G, c.1438T>G
						n- CM066777\							
4 X:1585079	C	T	P2RY8	missense	T:0.1342	---\n- rs28578016\	benign	tol.	p.Val125Ile	36, 45, 17, 23	18, 28, 9, 13	17, 17, 8, 10	c.373G>A
4 11:46342259-46342260	A	AG	CREB3L1	splice acceptor, frameshift	na	rs79068197	na	na	p.Asp509GlyfsX156	19, 18, 13	0, 2	19, 18, 13, 17	c.1525-2_1525-1insG, c.1524-1_1524insG

Pat.	Region	Ref.	Alt.	Name	Konsequenz	GMAF	Annotation	Polyphen	Sift	Aminosäurenaustausch	Reads	Ref.-Reads	Var.-Reads	cDNA Basenaustausch
4	7:137612913-137612916	CTGG	C	CREB3L2	inframe deletion	na	rs66593747	na	na	p.Pro34del, p.Thr37del, p.Thr100del, p.Thr100del	17, 15, 21	1, 2	16, 14, 15, 19	c.100_102delCCA, c.110_112delCCA, c.299_301delCCA

Legende:

Pot.

Ref.

Alt.

Ref.-Reads

Var.-Reads

na

tol.

del.

pos. dam.

prob. dam.

Patient

Referenzsequenz

Alteration

Zahl der sequenzierten Referenz-Reads

Zahl der sequenzierten Variation-Reads

not applies

tolerated

deleterious

possibly damaging

probably damaging

Ergebnisse der Sequenzierung zur Ermittlung der SNPs und Indels in der Leukämie von hoch hyperdiploiden Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie

Pat. Region	Ref.	Alt.	Name	Konsequenz	GMAF	Annotation	Polyphen	Sift	Aminosäurenaustausch	Reads	Ref.-Reads	Var.-Reads	cDNA Basenaustausch
1 12:6777069-6777072	TTGC	T	ZNF384	inframe deletion	na	rs3835029	na	na	p.Gln515del, p.Gln454del, p.Gln399del, p.Gln438del	42	26	15	c.1542_1544delGCA, c.1359_1361delGCA, c.1194_1196delGCA, c.1311_1313delGCA
1 X:48547112	T	C	WAS	missense	C:0.0060	---\n-rs2737799\nn- CM072118\n	benign	tol.	p.Val332Ala	7	0	7	c.995T>C
2 7:6026530	C	T	PMS2	missense	T:0.0147	rs1805324	benign	tol.	p.Met622Ile, p.Met516Ile, p.Met575Ile	12	7	5	c.1866G>A, c.1548G>A, c.1725G>A
2 11:46342259-46342260	A	AG	CREB3L1	frameshift, splice acceptor	na	rs79068197	na	na	p.Asp509GlyfsX156	25	1	24	c.1524_1_1524insG, c.1525-2_1525-1insG
2 11:95825374-95825377	TTGC	T	MAML2	inframe deletion	na	na	na	na	p.Gln607del	29	17	11	c.1818_1820delGCA
2 15:91295148-91295151	GCTT	G	BLM	inframe deletion	na	na	na	na	p.Ser312del	20	15	5	c.932_934delCTT
2 16:89839766-89839766	G	C	FANCA	missense	C:0.0870	rs17232910	benign	tol.	p.Pro643Ala, p.Pro11Ala	18	0	18	c.1927C>G, c.29C>G
2 17:76993476-76993477	A	AG	CANT1	frameshift, incomplete terminal codon	na	na	na	na	p.Trp77LeufsX13, p.X77fs	9	3	6	c.228dupC
3 7:148506428	G	A	EZH2	missense	na	na	prob. dam.	del.	p.Ser681Leu, p.Ser639Leu, p.Ser695Leu, p.Ser651Leu	12	7	5	c.2042C>T, c.1916C>T, c.2084C>T, c.2069C>T, c.1952C>T
3 11:3723781	G	C	NUP98	missense, frameshift	C:0.0623	rs35404087	benign	del., tol.	p.Gln356Glu, p.Gln1142Glu	14	0	14	c.101C>G, c.3424C>G
3 11:95825374-95825383	TTGCTGCTGC	T	MAML2	inframe deletion	na	rs141671766	na	na	p.Gln605_Gln607del	26	6	20	c.1812_1820delGCAGCAGCA
3 12:6777069-6777072	TTGC	T	ZNF384	inframe deletion	na	rs3835029	na	na	p.Gln454del, p.Gln399del, p.Gln438del, p.Gln515del	20	10	9	c.1359_1361delGCA, c.1194_1196delGCA, c.1311_1313delGCA, c.1542_1544delGCA
3 22:23523602	C	T	BCR	missense	T:0.0027	rs149933313	prob. dam.	del.	p.Ala152Val	15	7	6	c.455C>T
4 5:55272085	G	C	IL6ST	missense	C:0.0055	rs1063560	benign, pos. dam.	tol.	p.Leu8Val	6	3	3	c.22C>G
4 11:95825374-95825383	TTGCTGCTGC	T	MAML2	inframe deletion	na	rs141671766	na	na	p.Gln605_Gln607del	22	14	8	c.1812_1820delGCAGCAGCA
4 12:6777069-6777072	TTGC	T	ZNF384	inframe deletion	na	rs3835029	na	na	p.Gln515del, p.Gln399del, p.Gln454del, p.Gln438del	17	5	11	c.1542_1544delGCA, c.1194_1196delGCA, c.1311_1313delGCA, c.1359_1361delGCA
4 13:28602340	G	T	FLT3	missense	na	COSM303886	prob. dam.	del.	p.Asn676Lys	9	5	4	c.2028C>A
4 14:92505915	T	A	TRIP11	missense	A:0.0412	rs17127898	benign	tol.	p.Met39Leu	22	8	14	c.115A>T
4 X:48121222	T	G	SSX1	missense	G:0.0235	rs140029421	pos. dam.	tol.	p.Phe101Cys	11	0	11	c.302T>G

Legende:

Pat. Ref. Patient
 Ref. Referenzsequenz
 Alt. Alteration
 Ref.-Reads Zahl der sequenzierten Referenz-Reads
 Var.-Reads Zahl der sequenzierten Variation-Reads
 na not applies
 tol. tolerated
 del. deleterious
 pos. dam. possibly damaging
 prob. dam. probably damaging

Ergebnisse der Sequenzierung zur Ermittlung der SNPs und Indels in dem Stroma von hoch hyperdiploiden Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie

Pat. Region	Ref.	Alt.	Name	Konsequenz	GMAF	Annotation	Polyphen	Sift	Aminosäurenaustausch	Reads	Ref.-Reads	Var.-Reads	cDNA Basenaustausch
1 1:1486321242	C	T	TPR	missense	T:0.1094	---\n- rs61744267\	na	tol.	p.Val779Ile	13	7	6	c.2335G>A
1 3:149238595-149238599	C	CTTAA	VWTR1	frameshift	na	rs112399999	na	na	p.X401X	21	0	19	c.1199_1200insTTAA
1 12:6777069-6777072	TTGC	T	ZNF384	inframe deletion	na	rs3835029	na	na	p.Gln515del, p.Gln438del, p.Gln454del, p.Gln399del	24	16	8	c.1542_1544delGCA, c.1311_1313delGCA, c.1359_1361delGCA, c.1194_1196delGCA
3 3:149238595-149238599	C	CTTAA	VWTR1	frameshift	na	rs112399999	na	na	p.X401X	9	3	6	c.1199_1200insTTAA
3 11:3723781	G	C	NUP98	missense	C:0.0623	rs35404087	benign	tol., del.	p.Gln1142Glu, p.Gln35Glu	8	0	8	c.3424C>G, c.101C>G
3 12:6777069-6777072	TTGC	T	ZNF384	inframe deletion	na	rs3835029	na	na	p.Gln438del, p.Gln454del, p.Gln399del, p.Gln515del	14	7	7	c.1311_1313delGCA, c.1359_1361delGCA, c.1194_1196delGCA, c.1542_1544delGCA
3 13:28623587	C	T	FLT3	missense	T:0.0105	---\n- rs35602083\	benign	tol.	p.Asp324Asn	12	5	7	c.970G>A
3 16:88964557	C	G	CBFA2T3	missense	G:0.0389	rs61734177	benign	del., tol.	p.Arg103Pro, p.Arg42Pro	12	5	7	c.308G>C, c.125G>C
3 X:1314931	C	T	CRLF2	missense	T:0.0513	rs151218732	prob. dam.	del.	p.Val244Met	7	4	3	c.730G>A
4 3:14199908	C	T	XPC	missense	T:0.0284	---\n- rs2227999\	benign	tol.	p.Arg455His, p.Arg492His	9	0	9	c.1364G>A, c.1475G>A
4 7:91708898	A	G	AKAP9	missense	G:0.0668	rs35759833	benign	tol.	p.Lys2484Arg, p.Lys2496Arg, p.Lys330Arg	10	3	7	c.7451A>G, c.7487A>G, c.989A>G
4 9:36846910	C	T	PAX5	missense	T:0.0174	rs35469494	benign	tol.	p.Gly266Glu	14	4	10	c.797G>A
4 11:95825374-95825383	TTGCTGCTGC	T	MAML2	inframe deletion	na	rs141671766	na	na	p.Gln605_Gln607del	25	11	14	c.1812_1820delGCAGCAGCA
4 11:108175462	G	A	ATM	missense	A:0.0788	---\n- rs1801516\	benign	tol.	p.Asp244Asn, p.Asp1853Asn	8	5	3	c.69G>A, c.5557G>A
4 12:6777069-6777072	TTGC	T	ZNF384	inframe deletion	na	rs3835029	na	na	p.Gln515del, p.Gln438del, p.Gln454del, p.Gln399del	15	3	12	c.1542_1544delGCA, c.1311_1313delGCA, c.1359_1361delGCA, c.1194_1196delGCA
4 12:57111539	G	A	NACA	missense	na	rs200567357	unknown	na	p.Pro1259Ser	5	1	4	c.3775C>T
4 14:92505915	T	A	TRIP11	missense	A:0.0412	rs17127898	benign	tol.	p.Met39Leu	17	8	9	c.115A>T
4 17:5072333	T	G	USP6	missense	G:0.1126	rs3816913	benign	tol., del.	p.Ile1167Ser, p.Ile850Ser	14	7	7	c.3500T>G, c.2549T>G
4 X:48121222	T	G	SSX1	missense	G:0.0235	rs140029421	pos. dam.	tol.	p.Phe101Cys	7	0	7	c.302T>G

Legende:

Pat. Ref. Alt.	Patient Referenzsequenz
Ref.-Reads	Alteration
Var.-Reads	Zahl der sequenzierten Referenz-Reads
na	Zahl der sequenzierten Variation-Reads
tol.	not applies
del.	tolerated
pos. dam.	deleterious
prob. dam.	possibly damaging
	probably damaging

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Borkhardt für die Betreuung der Arbeit bedanken. Er hat mir die Möglichkeit gegeben, diese Arbeit in seiner Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und klinische Immunologie anzufertigen.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Ute Fischer, die mich in allen Phasen dieser Arbeit intensiv begleitet hat. Ich danke ihr für die Bereitstellung des Themas, ihren kompetenten Rat, ihre ständige Hilfsbereitschaft und die umfassende Unterstützung.

Weiterhin danke ich Olga Felda für die Einarbeitung und Hilfestellung im Labor.

Peter Husemann danke ich für die bioinformatische Hilfeleistung und Sebastian Ginzel danke ich für die Einarbeitung in die web-basierte Plattform SNUPy, die mir die Arbeit stark erleichtert hat.

Bei Alexander Sturm möchte ich mich für die großartige Unterstützung in der finalen Phase der Arbeit bedanken.

Zuletzt danke ich meinen wundervollen Eltern, die mir immer zur Seite gestanden haben, mir alles Erdenkliche ermöglicht haben und ohne die ich nicht zu dem geworden wäre, was ich bin. Ihnen ist deshalb diese Arbeit gewidmet.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Ort, Datum

Daniela Brandenburg