

Aus der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie

Universitätsklinikum Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. Arndt Borkhardt

Untersuchung der leukämischen Plastizität durch Exom-Analyse
der Leukämiezellen eines Patienten mit multiplen Rezidiven

Dissertation

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

Vorgelegt von

Ines Willim

2023

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Roland Meisel

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Thomas Beez

Für meinen Ehemann und meine Familie, die mich immer unterstützt haben

I. Zusammenfassung

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter. Dank einer hocheffizienten Kombination chemotherapeutischer und in Einzelfällen radiotherapeutischer Behandlungen sowie dem zunehmenden Einsatz immunologischer Therapien erreichen mehr als 90% der Kinder eine vollständige Remission. Im Falle eines Rückfalls - insbesondere nach allogener Stammzelltransplantation - ist die Behandlung jedoch weitaus weniger erfolgsversprechend, sodass zunehmend patienten-individualisierte Therapiemaßnahmen verfolgt werden, die auf genetischen Analysen der Leukämiezellen basieren. Im Rahmen dieser Arbeit wird der zeitliche Verlauf der genetischen Veränderungen einer Leukämieerkrankung durch die Analyse aller kodierenden Bereiche des Genoms, des sogenannten Exoms, mittels moderner Hochdurchsatzsequenzierung detailliert untersucht. Über einen Erkrankungszeitraum von sechs Jahren erlitt der ALL-Patient nach seiner Ersterkrankung insgesamt 3 Rezidive. Zu jedem Erkrankungszeitpunkt wurden leukämische Blasten sowie Zellen aus dem Stroma-Kompartiment des Knochenmarks, sogenannte mesenchymale Stammzellen (MSCs), isoliert und umfassend genetisch charakterisiert.

Die vorliegende Arbeit zeichnet anhand der Ganzexom-Sequenzierung multipler Rezidive eines ALL-Patienten die hohe Plastizität genetischer Veränderungen von Leukämiezellen im zeitlichen Verlauf nach. Diese Beobachtung ist für die Entwicklung zielgerichteter, individualisierter Therapiekonzepte von zentraler Bedeutung, da für Therapieentscheidungen somit stets die genetische Analyse des jeweils aktuellsten Erkrankungsstadiums zu Grunde gelegt werden muss. Darüber hinaus vergleicht diese Arbeit erstmalig systematisch genetische Veränderungen des gesamten Exoms von Leukämiezellen mit denen von Stromazellen eines Patienten. Hierbei konnten keine identischen Mutationen nachgewiesen werden, so daß sich aus der vorliegenden Arbeit kein direkter Hinweis für eine Rolle des Stromas in der Pathogenese der kindlichen ALL ergibt.

II. Zusammenfassung (Englisch)

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) represents the most common malignant disease of childhood. Based on a highly effective combination of chemotherapeutic and, in individual cases, radiotherapeutic treatments, more than 90% of children achieve complete remission. This is further aided by the growing use of immunological therapies. In case of relapse - especially after allogeneic stem cell transplantation - treatment is far less promising. To overcome this issue, the integration of personalized therapeutic approaches based on genetic analyses of the leukemia cells is increasingly being employed. In the framework of the present work, the progression of genetic changes in one particular case of leukemia is studied in detail by analyzing all coding regions of the genome, the so-called exome, using modern high throughput sequencing. Over a time frame of six years, the studied ALL patient suffered a total of three relapses. At the time of initial diagnosis and each relapse, leukemic blasts as well as cells from the stromal compartment of the bone marrow, so-called mesenchymal stem cells (MSC), were isolated and comprehensively genetically characterized.

The present work demonstrates high plasticity of genetic changes in leukemic cells over time, using whole exome sequencing of multiple relapses of an ALL patient. This observation is of central importance for the development of targeted, individualized therapy concepts, as it demonstrates that therapeutics decisions have always to be aligned with the genetic analysis of the most recent stage of the disease. Furthermore, this work is the first to systematically compare genetic alterations of the entire exome of leukemia and stromal cells from the same patient. As no identical mutations could be identified the current work does not support a direct role of stromal cells in pathogenesis of childhood ALL.

III. Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
Abb.	Abbildung
Allo-SZT	allogene Stammzelltransplantation
BAF	b-Allel-Frequenz
Bp	<i>base pair</i>
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i>
cDNA	<i>complementary Desoxyribonucleic acid</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
HPC	<i>haematopoetic progenitor cells</i>
HSC	<i>haematopoetic stem cells</i>
kB	<i>kilo base</i>
MDS	myelo dysplastisches Syndrom
MSC	mesenchymale Stammzelle
MRD	<i>minimal residual disease</i>
OG	Onkogenom
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SNV	<i>single nucleotid variant</i>
WES	<i>whole exome sequencing</i>

IV. Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das hämatopoetische System.....	1
1.2	Leukämie	2
1.2.1	Epidemiologische Daten, Therapie und Prognose.....	4
1.2.2	Besonderheiten des Rückfalls nach Stammzelltransplantation	7
1.3	Next generation sequencing und sein Einsatz in der Onkologie.....	7
1.4	Klonale Evolution von Blastenzellen.....	8
1.5	Mesenchymale Stammzellen	8
1.5.1	MSC und die physiologische Stammzellnische	10
1.5.2	MSC und ihre Rolle in der Entstehung maligner hämatologischer Neoplasien	10
1.6	Ziel dieser Arbeit.....	11
2	Material und Methoden.....	12
2.1	Ethikvotum	12
2.2	Material	12
2.2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	12
2.2.2	Kits	13
2.2.3	Chemikalien.....	14
2.2.4	Oligonukleotide.....	15
2.2.5	Restriktionsenzyme	16
2.3	Methoden	17
2.3.1	Präparation der Exoms und <i>next generation sequencing</i>	17
2.3.2	Amplifikation des gesamten Genoms	17
2.3.3	Bioinformatische Analysen.....	17
2.3.4	<i>Polymerase chain reaction</i> (PCR)	19
2.3.5	Messung der Konzentrationen und Reinheit von DNA und RNA.....	20
2.3.6	Sanger Sequenzierung	20
2.3.7	Aufbereitung der Proben	20
2.3.8	RNA Isolierung.....	21
2.3.9	Synthese von cDNA	22
2.3.10	Restriktion der DNA.....	22
2.3.11	Mutagenese.....	23
2.3.12	Zellkultur	24
3	Ergebnisse.....	26

3.1	Patient.....	26
3.2	Berechnung von vier Onkogenomen	28
3.2.1	Betrachtung der Mutationsspektren über vier Leukämie-Onkogenome..... hinweg.	30
3.3	Bildung von Mutations- <i>Clustern</i> zur Beschreibung der klonalen Dynamik der Leukämie	35
3.4	Klinisch relevante Mutationen.....	40
3.5	Sequenzierung mesenchymaler Stammzellen und Berechnung von Onkogenomen	42
3.6	Mutationen in MUC16 als Überschneidung zwischen Stroma- und	46
	Leukämie-Onkogenomen	
3.7	Sanger-Sequenzierung zur Validierung ausgewählter Gene.....	48
3.8	Vorbereitung zur Klonierung sowie weiterer funktioneller Analysen.....	49
3.8.1	Isolation des MET Gens aus cDNA und anschließender	50
	Restriktionsverdau des Plasmids	
3.8.2	Mutagenese und Einbringen in BAF/3 Zellen	51
4	Diskussion	52
4.1	Hohe genetische Variabilität in den einzelnen Erkrankungsstadien.....	52
4.2	Mutations-Cluster bilden die Dynamik der kindlichen Leukämie ab.....	53
4.3	Welche Rolle spielen die MSC in der Entstehung von ALL Rezidiven?.....	53
4.4	Es existieren Ähnlichkeiten zwischen Leukämiezellen und MSC auf	54
	Genebene	
4.5	Entstehen späte ALL-Rezidive aus frühen Vorläufer-Zellen mit bi.....	55
	lineärem, mesenchymalen und hämatopoetischem Differenzierungspotential?	
5	Literaturverzeichnis	57

1 Einleitung

1.1 Das hämatopoetische System

Um eine kontinuierliche Versorgung des Körpers mit Blutzellen zu sichern findet in der Knochenmark der komplexe Prozess der Blutbildung (Hämatopoese) statt.

Diese geht von hämatopoetischen Stammzellen (HPC „hämatopoetische Progenitorzelle“) aus. Diese besitzen die Eigenschaft, sich sowohl in einen identischen Nachkommen zu teilen als auch in sämtliche reifere Zellen des hämatopoetischen Systems differenzieren zu können (1). Damit garantieren diese Stammzellen über das gesamte Leben eines Individuums hinweg die Aufrechterhaltung des blutbildenden Systems, welches insgesamt betrachtet das Organsystem mit der höchsten Proliferationsrate des menschlichen Organismus darstellt.

Ausgehend von der hämatopoetischen Stammzelle erfolgt eine erste Differenzierung in eine myeloide oder lymphoide Progenitorzelle. Aus den Zellen der Myelopoese entstehen dann Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten sowie Monozyten. Aus der lymphoiden Zellreihe entwickeln sich B- und T-Lymphozyten sowie Plasmazellen und natürliche Killerzellen (2,3). (Abb. 1)

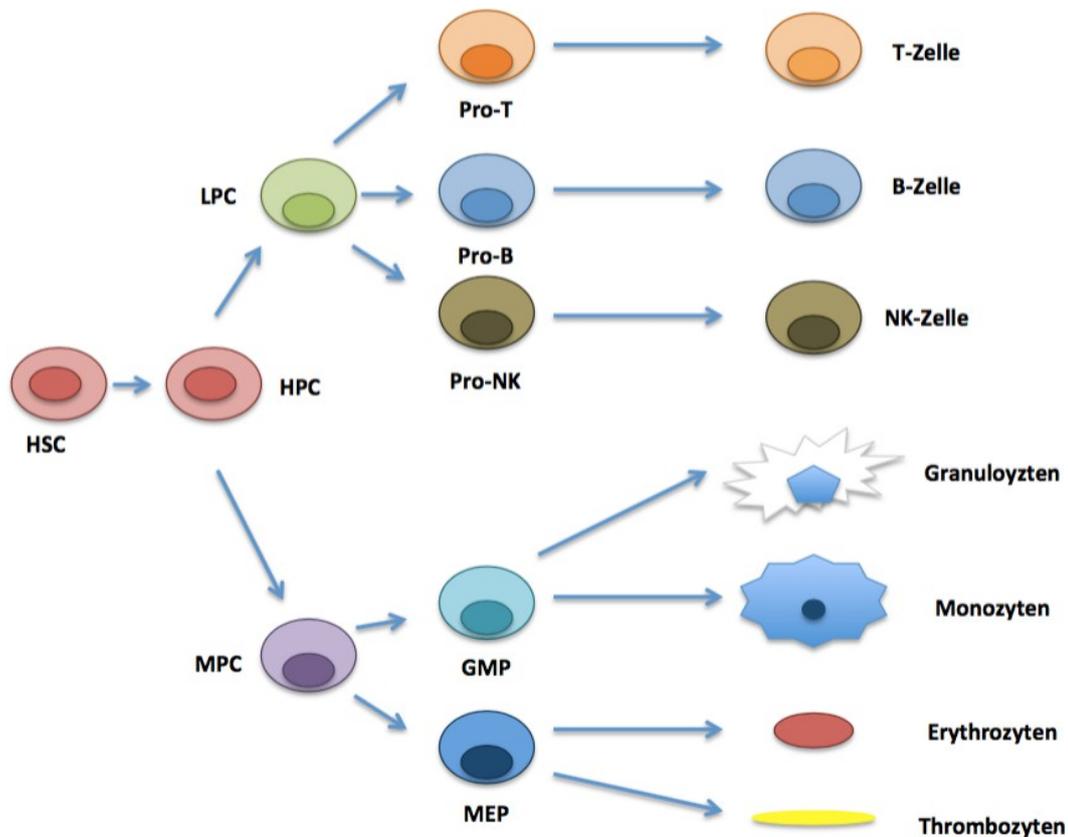


Abb. 1: Schematische Darstellung des hämatopoetischen Systems.

Die hämatopoetische Stammzelle ist in der Lage, sich selbst zu erneuern und alle anderen Bestandteile des blutbildenden Systems zu generieren. HPC: hämatopoetische Progenitorzelle; LPC: lymphoide Progenitorzelle; MPC: myeloide Progenitorzelle; GMP: Granulozyten-Monozyten Progenitorzelle; MEP: Megakaryozyten-Erythrozyten Progenitorzelle (adaptiert nach (4))

Zur Differenzierung der einzelnen Vorläufer- bzw. ausgereiften Zellen dienen bestimmte Expressionsmuster von Oberflächenantigenen (*cluster of differentiation, CD*). Dabei spielt CD34 als Marker der Stamm- und Progenitorzellen eine wesentliche Rolle bei der Differenzierung (5).

1.2 Leukämie

Das Wort Leukämie setzt sich aus den beiden altgriechischen Begriffen *leukos* (weiß) und *haima* (Blut) zusammen, bedeutet also wörtlich übersetzt „Weißblütigkeit“. Genauer betrachtet bezieht sich dieser Begriff auf die weiße Leukozytensäule (*buffy coat*), die sich beim Zentrifugieren von leukozytenreichem Blut auf der Erythrozytensäule bildet. Erstmals beschrieben wurde der Begriff „Leukämie“ von

Robert Virchow im Jahre 1845. Paul Ehrlich konnte dann mit der Erfindung von Färbetechniken in Blutaussstrichen im Jahre 1891 wesentlich zur Entdeckung von Zellmorphologien und somit zur Differenzierung von myeloischen und lymphatischen Leukämien beitragen (6).

Alle Leukämien zeichnen sich durch die Eigenschaft der malignen Entartung einer bestimmten Zellreihe des blutbildenden Systems aus. Bei der akuten Leukämie spricht man dabei von einer starken und unkontrollierten Vermehrung von leukozytären Vorstufen, sogenannten Blasten, und der anschließend durch sie stattfindenden Verdrängung der gesunden Zellen aus dem Knochenmark. Bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) handelt es sich um Zellen der lymphatischen Reihe, während bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) Zellen der myeloischen Reihe entarten.

Die ALL repräsentiert typischerweise eine maligne Proliferation von B- oder T-Vorläuferzellen im Knochenmark. Diese akkumulieren im Verlauf sowohl im Knochenmark als auch im Blut und lymphatischen System und haben die Fähigkeit, auch nicht-lymphatische Organsysteme wie z.B. Hirnhäute, Knochen oder das Rückenmark zu infiltrieren. Schließlich kommt es zur Verdrängung der physiologischen Hämatopoese und somit zu Störungen von Erythro-, Thrombo-, Lympho- und Myelopoese sowie im weiteren Verlauf teilweise zu extramedullären leukämischen Infiltrationen in Folge derer u.a. eine Hepatosplenomegalie oder eine generalisierte Lymphknotenschwellung auftreten können.

Im Gegensatz zur AML, die durch die *French-American-British* (FAB) Klassifikation primär aufgrund morphologischer Kriterien eingeteilt wird, richtete sich die Klassifikation der ALL längere Zeit nach der *European Group for the Immunological Characterization of Leukemias* (EGIL). Entscheidend war hier die Immunphänotypisierung der durch Durchflusszytometrie (FACS) analysierten Leukämiezellen (7,8). Seit der Veröffentlichung der neuen Klassifikation der *world health organisation* (WHO) von 2016 spielen jedoch vermehrt zyto- und molekulargenetische Faktoren eine Rolle bei der Einteilung der ALL Subtypen (7). Diese sind - neben der Zugehörigkeit zur T-Zell- oder B-Zell-Linie - zunehmend in der Therapie- bzw. Risikostratifizierung von Bedeutung. (Abb. 2)

Lymphatische Leukämien/Lymphome der B-Zell-Reihe	
Lymphatische Leukämien/Lymphome der B-Zell-Reihe, nicht näher klassifizierbar	
Lymphatische Leukämien/Lymphome der B-Zell-Reihe mit rekurrenten genetischen Veränderungen	
•	Lymphatische Leukämien/Lymphome der B-Zell-Reihe mit Hypodiploidie
•	Lymphatische Leukämien/Lymphome der B-Zell-Reihe mit Hyperdiploidie
•	Lymphatische Leukämien/Lymphome der B-Zell-Reihe mit t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1
•	Lymphatische Leukämien/Lymphome der B-Zell-Reihe mit t(v;11q23); MLL-Rearrangement
•	Lymphatische Leukämien/Lymphome der B-Zell-Reihe mit t(12;21)(p13;q22); ETV6-RUNX1
•	Lymphatische Leukämien/Lymphome der B-Zell-Reihe mit t(1;19)(q23;p13.3); TCF3-PBX1
•	Lymphatische Leukämien/Lymphome der B-Zell-Reihe mit Hypodiploidie
•	Lymphatische Leukämien/Lymphome der B-Zell-Reihe mit t(5;14)(q31;q32); IL3-IGH
•	Provisorische Entität: Lymphatische Leukämien/Lymphome der B-Zell-Reihe mit intrachromosomaler Amplifikation von Chromosom 21 (iAMP21)
•	Provisorische Entität: Lymphatische Leukämien/Lymphome der B-Zell-Reihe mit Translokationen im Bereich von Tyrosinkinasen oder Zytokinrezeptoren (BCR-ABL 1-like ALL)
Lymphatische Leukämien/Lymphome der T-Zellreihe	
•	Provisorische Entität: Frühe T-Zell-Vorläufer lymphatische Leukämie
•	Provisorische Entität: Nurtürliche-Killerzell (NK) lymphoblastische Leukämie/Lymphome

Abb. 2: WHO-Klassifikation der akuten lymphatischen Leukämien. Adaptiert nach (9).

1.2.1 Epidemiologische Daten, Therapie und Prognose

Die akute lymphoblastische Leukämie ist die häufigste maligne Erkrankung des Kindesalters. Die aktuelle Therapie der ALL basiert auf den Ergebnissen großer prospektiver und überwiegend randomisierter Studien, die in den letzten Jahrzehnten von verschiedenen internationalen Studiengruppen durchgeführt wurden. Gemäß des im deutschsprachigen Raum am breitesten eingesetzten ALL-BFM Protokolls folgen auf sechs bis neun Monate intensiverer Polychemotherapie weitere 15-18 Monate

Erhaltungstherapie bis zu einer Gesamttherapiedauer von 24 Monaten. Kommt es in diesem Zeitraum nicht zu einem Rückfall der Erkrankung liegt die mittlere fünf-Jahres-Überlebensdauer der Patienten bei annähernd 90% (10). Um die Leukämie-Therapie so effizient wie möglich, aber gleichzeitig die Toxizität so gering wie möglich zu halten, wird die Therapie risikostratifiziert. Als Risikoprädiktoren gelten zum einen statische Kriterien wie z.B. die Leukozytenzahl oder das Vorliegen bestimmter o.g. genetischer Faktoren wie z.B. das Fusionsgen BCR-ABL1 (11). Zum anderen existieren dynamische Risikofaktoren wie die minimale Resterkrankung („*minimal residual disease*“, MRD). Diese ist definiert als die Zahl mit hochsensitiven Methoden detektierbarer Leukämiezellen im Knochenmark und seltener im peripheren Blut zu bestimmten Zeitpunkten der Therapie. Die Methode der Wahl zur MRD-Bestimmung stellt der Nachweis von klonotypischen IGH/TCR-*rearrangements* dar (12,13).

Jedoch existiert eine Gruppe von ALL-Patienten bei denen die initiale Therapie nicht ideal anschlägt, das heißt, dass es entweder bereits initial nicht zu einer vollständigen Remission kommt oder ein Rückfall der Erkrankung auftritt. In diesen Fällen ist eine wesentliche kurative Therapieoption die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (allo-SZT). Hierbei werden nach einer hochdosierten Chemotherapie, in vielen Fällen kombiniert mit einer Ganzkörperbestrahlung, hämatopoetische Stammzellen eines bezüglich der wesentlichen Gewebemerkmale im HLA-System passenden Spenders auf den ALL-Patienten übertragen. Dies ermöglicht zum einen die Regeneration des blutbildenden Systems, zum anderen richten sich die gesunden Spenderzellen gegen die malignen Zellen des Empfängers (Graft-versus-Leukemia-Reaktion) (14,15).

Die Ergebnisse aktueller Studien zeigen, dass die Überlebensrate für Patienten mit einer humanen Leukozyten-Antigen (HLA)-identisch verwandten oder eine HLA-angepassten unverwandten allo-SZT bei 70-75% liegen (16). Trotz aggressiver medikamentöser Konditionierungsschemata und optimierten Behandlungsstrategien ist das zweite Leukämie-Rezidiv immer noch die Hauptursache für das Versagen dieser Therapie. Die kumulative Inzidenz liegt hier bei aktuell 20-25%, abhängig vom Risikoprofil sowie vom Remissionsstatus vor der SZT (16–18). Tritt ein Rezidiv nach allo-SZT auf, existieren keine etablierten einheitlichen Therapieoptionen, sondern jede Therapie ist eine individuelle Fallentscheidung, die die Aggressivität der Leukämieerkrankung, erhaltene Vortherapien und den Zustand des Patienten,

insbesondere die bereits aufgetretenen Therapie-Nebenwirkungen, berücksichtigen muss. Bei ALL-Rezidiven der B-Zell-Reihe sind Immuntherapien mit dem gegen CD19/CD3-gerichteten, bispezifischen Antikörper Blinatumomab oder CD19-spezifische *chimeric antigen specific* T-Zellen (CAR-T) in ihrer Wirksamkeit belegt und kommen regelmäßig zum Einsatz, sowohl vor als auch (wenn zuvor noch nicht erhalten) nach einer Stammzelltransplantation (19) (Abb. 3). Bei ALL-Rezidiven der T-Zell-Reihe sind die therapeutischen Optionen deutlich begrenzter. In vielen Fällen wird nach Erzielen einer erneuten Remission eine zweite allo-SZT zur Konsolidierung angestrebt, sofern der Patientenzustand dies zulässt. Dadurch ist im besten Falle eine krankheitsfreie 3-Jahres-Überlebensdauer von 43% zu erreichen, wobei sich andeutet, dass die Dauer der vollständigen Remission nach erster SZT der wichtigste Prognosefaktor ist (17).

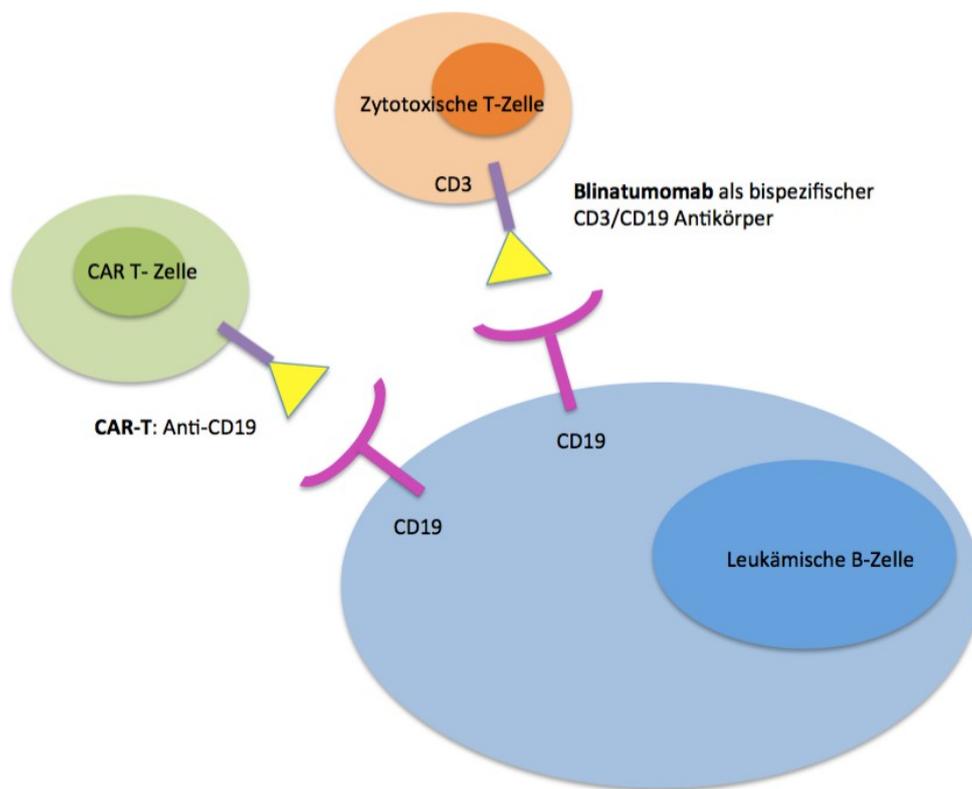


Abb. 3: Immunmodulatorische und antikörperbasierte Therapie der ALL

Der bispezifische CD3/CD19 Antikörper Blinatumomab sowie CAR T-Zellen stellen eine Möglichkeit der individuellen Antikörpertherapie einer ALL im Falle eines Rückfalls nach SZT dar. CAR-T: chimärer antigen Rezeptor; (adaptiert nach (20,21))

1.2.2 Besonderheiten des Rückfalls nach Stammzelltransplantation

Nicht nur klinisch und therapeutisch stellt ein Rückfall nach SZT eine große Herausforderung dar. Auch genetisch zeigt sich eine komplexe Situation. Diese soll im nächsten Abschnitt genauer betrachtet werden.

Bei einem Rückfall nach allogener Stammzelltransplantation finden sich im Knochenmark eines Patienten neben den von Patienten-Zellen abstammenden Leukämiezellen in aller Regel auch gesunde Immunzellen des Spenders und ggf. auch gesunde hämatopoetische Zellen des Patienten. Um in genetischen Untersuchungen die für die Leukämie spezifischen Veränderungen identifizieren zu können, müssen zwingend die zahlreichen, in allen Körperzellen des Patienten bzw. Spenders vorkommenden, nicht mit einer Krankheit verbundenen genetischen Varianten, sogenannten Keimbahnvarianten, berücksichtigt werden. Dies bedeutet, dass für die genetische Analyse von Leukämie-Rezidiven nach allo-SZT Keimbahnvarianten des Patienten und des Spenders umfassend identifiziert werden müssen. Diese Zwei-Keimbahn Herausforderung führt zu oben genannter Komplexität.

Allerdings sind Leukämie rezidive nach allogener Stammzelltransplantation bisher nicht umfänglich analysiert worden. Dies liegt insbesondere an der komplexen genetischen Situation, die vor allem die bioinformatische Auswertung vor große Herausforderungen stellen kann.

1.3 Next generation sequencing und sein Einsatz in der Onkologie

Um Patienten, deren Tumorerkrankungen mit konventionellen Therapieformen eine schlechte Prognose aufweisen, in Zukunft ein noch stärker patienten-individualisiertes Therapiekonzept anbieten zu können ist es wichtig, die genetischen Ursachen der individuellen Erkrankung genau zu analysieren. Eine Pilotphase der Studie für individualisierte Therapie rückfallbedingter maligner Erkrankungen im Kindesalter (INFORM) konnte zeigen, dass das Entschlüsseln des Genoms bei 50% aller Kinder mit therapierefraktärer oder therapieresistenter Krebserkrankung eine potentiell therapierelevante genetische Läsion identifizieren konnte, und somit arzneimittelrelevante Veränderungen erkennt, die zur Entwicklung einer individuellen Therapie genutzt werden kann (22). Hierfür wurde unter anderem das sogenannte *whole exome sequencing* (WES) genutzt. Dabei werden mittels Hochdurchsatzsequenzierung

alle für Proteine kodierenden Bereiche eines Genoms, sogenannte Exome, sequenziert. Dabei lassen sich unter anderem Veränderungen in einzelnen Basenpaaren, sogenannte „*single nucleotide variants*“ (SNV), darstellen.

WES Datensätze dienen dazu, Therapie-Resistenzen sowie die Plastizität der Erkrankung besser zu verstehen und somit potentielle Therapiekonzepte zu entwickeln.

1.4 Klonale Evolution von Blastenzellen

Unter der klonalen Evolution von leukämischen Blastenzellen versteht man die Veränderung der einzelnen Blastenzellen im Verlauf der Erkrankung. Von der Ersterkrankung zum Rückfall verändert sich das Mutationsspektrum innerhalb der Zellen. Zudem trägt nach aktueller Datenlage häufig nicht nur ein Leukämie-Klon, sondern verschiedene Subklone zur Erkrankung bei. Das bedeutet, dass in jedem neuen Erkrankungsstadium andere Subklone proliferieren, zum neuen Hauptklon werden und somit ursächlich für einen Rückfall sein können (23). Die klonale Evolution der Leukämie und damit das Mutationsspektrum in Rezidiven kann wesentlich von der verabreichten antineoplastischen Therapie beeinflusst werden. Hierzu konnten Tzoneva et al. bereits anhand spezifischer, nur in der Rezidivsituation auftretender Mutationen im NT5C2 Gen, eine selektive Resistenz gegen 6-Mercaptopurin zeigen (24).

1.5 Mesenchymale Stammzellen

Das Knochenmark und seine Mikroumgebung spielen eine wesentliche Rolle in der Entstehung verschiedenster maligner Erkrankungen, insbesondere der Leukämien. Daher ist die zelluläre Zusammensetzung des Knochenmarkes von besonderem Interesse. Schon in sehr frühen Arbeiten wurde erkannt, dass das Knochenmark neben den hämatopoetischen Stammzellen (HSC) noch andere Arten nicht-hämatopoetischer Stamm- oder Vorläuferzellen enthält (25).

Der Begriff der mesenchymalen Stammzelle (MSC) wurde von Caplan et al. eingeführt, nachdem erkannt wurde, dass MSC integrale Vorläuferzellen für alle reifen Zellen mesenchymalen Ursprungs darstellen können (26). Für viele MSC-Populationen kann experimentell jedoch nicht nachgewiesen werden kann, dass sie sich asymmetrisch teilen und tatsächlich in alle Zelltypen mesenchymaler Gewebe differenzieren können.

Da für MSC häufig nicht alle Stammzeleigenschaften erfüllt werden, hat sich in der Vergangenheit im Verlauf der Begriff der multipotenten, mesenchymalen Stromazelle geprägt (27).

In der aktuellen Literatur werden die Begriffe der mesenchymalen Stammzelle und der multipotenten, mesenchymalen Stromazelle oftmals synonym verwendet.

Eine grundlegende Arbeit zur Charakterisierung der MSC stammt von Dominici et al aus dem Jahr 2006. Sie definierten die MSC als adhärente, fibroblastoide Zelle, die die Oberflächenmoleküle CD90, CD105 und CD73, jedoch nicht CD45, CD34, CD14, CD11b, CD49alpha oder CD19 exprimiert. Des Weiteren sind sie negativ für den Haupthistokompatibilitätskomplex II (*major histocompatibility complex class II*, MHC II, HLA-DR) und müssen *in vitro* ein chondrogenes, osteogenes und adipogenes Differenzierungspotential aufweisen (28). Durch diese Eigenschaft spielen sie eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung und Regeneration verschiedenster Gewebe. (Abb. 4)

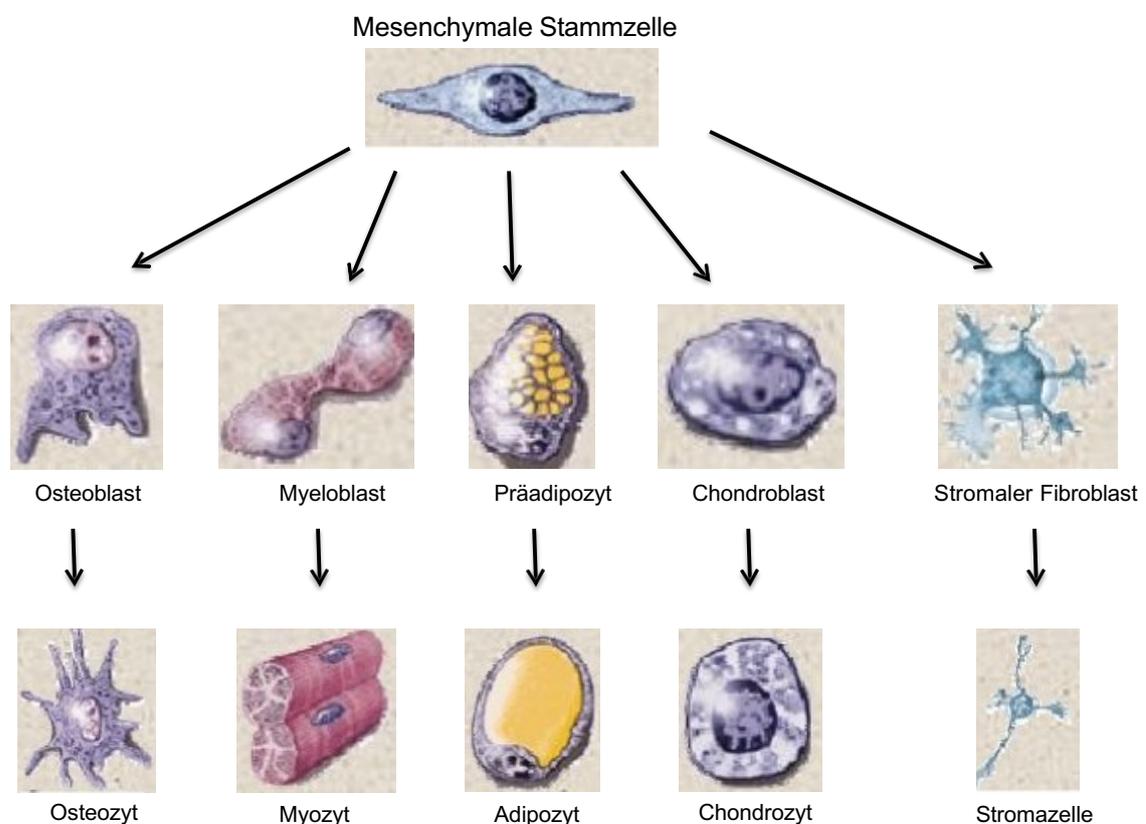


Abb. 4: Differenzierungspotential von mesenchymalen Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen können sich in verschiedene Zellarten differenzieren wie Osteozyten, Myozyten, Adipozytenm Chondrozyten aber auch Stromazellen. (adaptiert nach: Mesenchymal stem cells

of human adult bone marrow. Pittenger Mark und Marshak Daniel in: Stem cell biology. Marshak Daniel, Gardner Richard und Gottlieb Daniel, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001)

1.5.1 MSC und die physiologische Stammzellnische

MSC sind ein wesentlicher Bestandteil der physiologischen hämatopoetischen Stammzellnische und tragen damit wesentlich zum Überleben, zur Proliferation und zur Differenzierung der HSC im Knochenmark und somit zur Aufrechterhaltung des hämatopoetischen Systems bei (29). Dabei konnten Studien zeigen, dass MSC über das Adhäsionsmolekül CXCL12 bzw. die CXCL12/CXCR4-Achse den entscheidenden Faktor zur Adhäsion der HSC im Knochenmark leisten und somit die Zahl der MSC im Knochenmark direkt mit der Zahl der HSC korreliert (30). Auch konnte gezeigt werden, dass veränderte und somit dysfunktionale MSC eine Bedeutung in der Entstehung von Knochenmarkerkrankungen spielen (31). Welche Rolle nach neueren Daten die MSC in der Entstehung von Leukämien spielen könnten, soll im nächsten Abschnitt erläutert werden.

1.5.2 MSC und ihre Rolle in der Entstehung maligner hämatologischer Neoplasien

Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben ist die Bedeutung der MSC in der physiologischen Stammzellnische schon längere Zeit bekannt. Viel diskutiert ist jedoch auch die Bedeutung der MSC in der Entstehung maligner hämatologischer Erkrankungen.

Ausgewählte Daten könnten auf eine Bedeutung von Stromazellen für die Entstehung und Aufrechterhaltung myeloischer Neoplasien wie der AML und myelodysplastischer Syndrome (MDS) hinweisen. So konnten in Einzelfällen leukämie-spezifische genetische Aberrationen wie FLT3 und NPM1 sowohl in AML/MDS Blasten als auch in MSC Zellen detektiert werden (32).

In Mausmodellen konnte zudem nachgewiesen werden, dass das spezifische Einbringen von Mutationen bekannter Syndrome mit Prädisposition für myeloische Neoplasien (hier: Schwachman-Bodian-Diamond-Syndrom; SBDS) ausschließlich in mesenchymale Zellen (hier: Osteoblasten) die Entstehung eines MDS induzieren kann. Diese Arbeiten weisen eine instruktive Rolle des Stromas für myeloische Erkrankungen nach (31).

Andersherum können Leukämiezellen die Funktion von Stromazellen beeinflussen und so z.B. zu einer Suppression der gesunden Hämatopoese führen oder in der hämatopoetischen Nische Resistenzen von Leukämiezellen gegen Chemotherapien vermitteln (33,34).

Für die vorliegende Promotionsarbeit entscheidender ist jedoch die Frage, inwieweit die MSC auch in der Entwicklung der ALL im Kindes- und Jugendalter eine Rolle spielen. Zu dieser Fragestellung sind die Ergebnisse zweier Arbeitsgruppen bemerkenswert hervorzuheben

Shalpour et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass leukämiespezifische Translokationen wie MLL-Rearrangements oder klonotypische IGH/TCR-Umlagerungen nicht nur in leukämischen Blasten bei Kindern mit ALL zu finden, sondern auch in MSC detektierbar sind (35). Erstaunlich ist hierbei, dass das proportionale Auftreten der Marker zwischen 10% und 54% je nach Zeitpunkt der Messung variierte und auch nach hochdosierter Chemotherapie nach SZT noch in den MSC nachzuweisen war (35). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass in einer Gruppe von vier Kindern mit einer ALL, die das MLL/AF4 Fusionsgen trug, dieses Gen auch in 4-8% aller MSC gefunden werden konnte (36).

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass MSC auf verschiedenen Ebenen in der Entstehung maligner hämatologischer Erkrankungen eingebunden sein können und dies auch für die pädiatrische ALL gilt.

1.6 Ziel dieser Arbeit

Erstes Ziel dieser Arbeit ist es, die leukämische Plastizität anhand von Exom-Analysen von multiplen, seriellen Rezidiven eines einzelnen Patienten darzustellen. Anhand dessen soll die Mutations-Dynamik und das Mutations-Spektrum der Leukämie vor allem im Hinblick auf die Situation des Rückfalls nach zweiter SZT genauer charakterisiert und mögliche therapeutische Angriffspunkte identifiziert werden.

Zudem sollen durch Vergleich der Mutations-Spektren von Leukämiezellen und MSC, die zu verschiedenen Leukämiezeitpunkten aus dem Knochenmark des Patienten gewonnen wurden, untersucht werden, ob auf Exom-Ebene Veränderung gefunden werden, die in beiden Zellkompartimenten vorhanden sind.

2 Material und Methoden

2.1 Ethikvotum

Im Rahmen des deutschlandweiten Forschungsverbundes INFORM (*Individualized Therapy For Relapsed Malignancies in Childhood*) werden Ersterkrankungs- und Rezidivproben bestimmter Tumorerkrankungen nach Einwilligung der Patienten bzw. Ihrer Sorgeberechtigten gesammelt und umfassend genetisch analysiert. Die Kinderonkologie in Düsseldorf beteiligt sich an diesem Projekt bei der Analyse der Leukämie rezidive nach allo SZT. Die durchgeführte Arbeit fällt unter das Ethikvotum der INFORM-Studie (NCT-2013-0220, Studiennummer 4951) sowie unter das Votum für Begleitforschung von mesenchymalen Stammzellen (Studiennummer 3432), in die die Sorgeberechtigten des in dieser Arbeit untersuchten Patienten eingewilligt haben.

2.2 Material

2.2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Um die folgenden Analysen durchführen zu können, wurden sämtliche u.g. Geräte und Verbrauchsmaterialien genutzt (Tabelle 1).

Zum Pipettieren der einzelnen Komponenten wurden Pipetten (2ml, 5ml, 10ml, 25ml), sowie dazugehörige Filtersysteme (0.22 µm: 150 ml, 250 mL, 500ml) von der Firma Corning (New York, USA) verwendet.

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Cycler TGradient	Analytik Jena, Jena, Germany
Thermocycler GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Germany
Centrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg, Germany
3-1810 Mini- Centrifuge	Neolab, Heidelberg, Germany
Allegra X-12 R Centrifuge	Beckman Coulter, Brea, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Germany
Rolling Shaker SRT6	Stuart equipments, Staffordshire, UK

Thermal Shaker	Eppendorf, Hamburg, Germany
VF2. Vortex mixer	IKA, Staufen, Germany
Certomat BS-T	Sartorius AG, Göttingen, Germany
Multifuge Heraeus 3S R+	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
<i>Imager</i>	INTAS, Göttingen, Germany
Herolab UVT 2035 UV-lamp	Herolab, Wiesloch, Germany
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg, Germany
Biometra Standart Power Pack P25	Biometra GmbH, Göttingen, Germany
Sub-Cell GT Cell	BioRAD, München, Germany
<i>Safe-lock tubes 1,5 ml (G173275L)</i>	Eppendorf, Hamburg, Germany
<i>PCR Tube stripes 0,2ml (951010022)</i>	Eppendorf, Hamburg, Germany
500ml Filter (430776)	ThermoScientific, Massachusetts, USA
<i>CellStar greiner bio-one suspension plates</i>	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
<i>Cell culture flasks</i>	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Mikroskop (Axio Observer)	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany
Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab, Erlangen, Germany
Shaking Incubator Certomat BS-T	Sartorius B. Braun, Wolf Laboratories, Pocklington, York, UK
Bacteria Incubator Heraeus	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Milli-Q® Integral System	Millipore, Darmstadt, Germany
Ice System	Scotsman, Milan, Italy
Waage	Kern, Balingen-Frommern, Germany
Small reaction tubes (verschiedene Größen)	Eppendorf, Hamburg, Germany
Skalpelle	Feather, Osaka, Japan.

Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Geräte und ihr Hersteller sind in o.g. Liste aufgeführt.

2.2.2 Kits

Um den Mutationsstatus ausgewählter Gene mittels Sanger-Sequenzierung zu validieren sowie die anschließende Mutagenese des MET Gens in chemokompetenten *escherichia coli* Zellen durchzuführen, wurden die nachfolgenden Kits verwendet. Diese sind in Tabelle 2 dargestellt.

Kit	Hersteller
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase Kit	ThermoScientific, Massachusetts,USA
Superscript® II Reverse Transcriptase	ThermoScientific, Massachusetts, USA
Rapid DNA Ligation Kit	Roche

Taq DNA Polymerase Kit	Quiagen, Hilden, Germany
PCR Purification Kit	Quiagen, Hilden, Germany
QIAquick® Gel Extraction Kit	Quiagen, Hilden, Germany
REPLI-g® UltraFast Mini Kit	Quiagen, Hilden, Germany
Monarch® Plasmid Miniprep Kit	New England Biolabs, Massachusetts, USA
QIAshredder™	Quiagen, Hilden, Germany
AllPrep® DNA/RNA/miRNA Universal Kit	Quiagen, Hilden, Germany
Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit	New England Biolabs, Massachusetts, USA
One Shot TOP100 Competent cells	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA
miRNeasy® Mini Kit	Quiagen, Hilden, Germany
NucleoBond® Xtra Maxi EF	Machery-Nagel, Düren, Germany

Tabelle 2: Kits

Alle für die experimentellen Arbeiten verwendeten Kits sind in o.g. Tabelle aufgelistet

2.2.3 Chemikalien

Alle in der vorliegenden Promotionsarbeit (außer solchen, die Bestandteil von Kits [siehe Kapitel 2.2.2.] waren) verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Chemikalien	Hersteller
Bioenzym LE-Argarose	Biozym Trading GmbH, Wien, Österreich
50x TAE Buffer	BioRAD, München, Germany
Ethidumbromid Lösung 10mg/ml	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Germany
Ampicillin	Thermo Scientific Rockford, IL, USA
Isopropanol	VWR, Radnor, USA
Gibco RPM Medium 1640 +GlutaMax	ThermoScientific, Massachusetts, USA
Gibco, Recombinant mouse IL-3 lyophilized, 10ug	ThermoScientific, Massachusetts, USA
Gentamicin 10mg/ml	ThermoScientific, Massachusetts, USA
FBS heat inactivated, South America original	Biowest, Nuaille, France
6X DNA Loading Dye	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
GeneRuler 1kb ladder	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Gel Pilot 100bp ladder	Quiagen, Hilden, Germany
LB-Medium (Lennox)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
LB-Agar (Lennox)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Nuclease-free Water	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA

Tabelle 3: Chemikalien

Aufgelistet sind alle Chemikalien, die außerhalb der in Tabelle 2 benannten Kits verwendet wurden.

2.2.4 Oligonukleotide

Alle in der vorliegenden Promotionsarbeit verwendeten Oligonukleotide sind in den Tabellen 4-6 aufgelistet. Sämtliche Primer wurden mit dem Programm Primer 3 (v. 0.4.0) designt und bei MWG Biotech (Ebersberg, Germany) hergestellt (37).

Name	Anzahl der Nukleotide	Nukleotidsequenz
FLT3_for	21	5'-TAGCTAGCCCAAGGACAGATG-3
FLT3_rev	18	5'-ATCATCATGGCCGCTCAC-3
ACLY_for	24	5'-GGGGAAAGGTTAAAGTAAGAAAGG-3
ACLY_rev	23	5'-GTTGATTTTTGTTGTTTCCTCCA-3
TRAAP_for	20	5'-ATCCAGCTGGCTCTGATAGG-3
TRAAP_rev	20	5'-CATAACACACAGGGGTGCTG-3
BCAS1_for	20	5'-GCACGTCTTTCAAGCTTTCC-3
BCAS1_rev	20	5'-GGTTGCACATGTGTTTGGAG-3
BMP5_for	20	5'-CAGCCCGAGTTTCCTGACTA-3
BMP5_rev	20	5'-AAAGGGTGTGGGGAAGATAA-3
ROBO2_for	24	5'-GCCAAAGGATTACAATGTACAACA-3
ROBO2_rev	23	5'-CATTACCAGTCTCTTTTCAGA-3
MET_for	20	5'-TAGAAGAGCCCAGCCAGTGT-3'
MET_rev	20	5'-TCAGGCTGGCTCCTATTTGT-3'

Tabelle 4: Primer zur Validierung mittels Sanger-Sequenzierung.

Aufgeführt werden sämtliche verwendete Oligonukleotide, die für die Sanger-Sequenzierung verwendet wurden.

Name	Anzahl der Nukleotide	Nukleotidsequenz
MET_muta_f	21	5'-TACTTCTTGA T GGTCCAAAGG-3'
MET_muta_r	22	5'-AATAAAATTGTTGCTTTCAAAG-3'
MET_actmut_f	23	5'-GTGAAGTGGAC C GGCTTTGGAAAG-3'
MET_actmut_r	18	5'-TGGCAGCTTTGCACCTGT-3'
MET_actmut_b3_f	22	5'-

		GTAAGCCCAA T TACAGAAATGG-3'
MET_actmut_b3_r	18	5'-ACTTCGGGCACTTACAAG-3'
MET-Seq1	20	5'-ACATGGCTCTAGTTGTCGAC-3
MET_Seq2	20	5'-TACATTGATGTTTTACCTGA-3
MET_Seq3	20	5'-GCCAGATTCTGCCGAACCAA-3
MET_Seq4	20	5'-TTTCTCGATCAGGACCATCA-3
MET_Seq5	20	5'-TGTGGCTGGGACTTTGGATT-3
MET_Seq6	20	5'-AAGTGTGTCAAACAGTATTC-3
MET_Seq7	20	5'-TCTGTTGTACCACTCCTTCC-3
MET_Seq8	20	5'-TCTTCAACCGTCCTTGAAA-3
MET_Seq9	20	5'-CCCCATCCTAACTAGTGGGG-3
MET_Seq10	20	5'-GTGAAGGGTCTCCGCTGGTG-3
MET_Seq11	20	5'-GTGTGGTCCTTTGGCGTGCT-3
MET_Seq12	20	5'-ACCAGCCTCCTTCTGGGAGA-3

Tabelle 5: Primer für die Mutagenese.

Aufgeführt sind sämtliche Oligonukleotide, die für die Mutagenese verwendet wurden. Das veränderte Nukleotid ist hier in rot dargestellt.

Primer	Oligonukleotidsequenz
MET_klon_f	5'- ACGCAAGCTTGCCACC ATGAAGGCCCCGCTGTG -3'
MET_klon_rev	5'- ACGCACGCGT TGATGICTCCCAGAAGGA -3'

Tabelle 6: Primer um ein relevantes Gen aus cDNA zu amplifizieren.

In rot sind hier die Adhäsionsstellen für die Restriktionsenzyme dargestellt, in grün die Pallindrom-Sequenz zur Erkennung der Schnittstelle, blau die Kozak-Sequenz und der gelbe Bereich zeigt Anfang und Ende des Gens an.

2.2.5 Restriktionsenzyme

Alle in der vorliegenden Promotionsarbeit verwendeten Restriktionsenzyme gehören der Klasse der *fast-digesting enzymes* an und wurden von der Firma Thermo Scientific (Rockford, IL, USA) hergestellt. Sie sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Gen	Enzym	Pallindrom-Sequenz
MET	Mlu I	5'-A [^] CGCGT-3'
	Hind III	5'-A [^] AGCTT-3'

Tabelle 7: Restriktionsenzyme

Die aufgelisteten Restriktionsenzyme wurden genutzt um den klonierten Vektor zu schneiden.

2.3 Methoden

2.3.1 Präparation der Exoms und *next generation sequencing*

Um die u.g. bioinformatischen Analysen durchzuführen und auszuwerten wurden bereits im Vorfeld dieses Projektes Exome aufgearbeitet und mittels Hochfrequenzsequenzierung sequenziert.

Die Vorbereitung der Exom Bibliothek sowie das *next generation sequencing* wurden wie in Hoell et al., 2019 [(38)] beschrieben durchgeführt. Dieses erfolgte bereits vor dem Start der in dieser Arbeit aufgeführten Versuche. Mit einem Index von sechs bp wurde mit einer Tiefe von zwei x 100 bp gelesen. Hierfür wurde TruSeq™ SBS Kit v5+UTR on the HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, California, USA) verwendet.

2.3.2 Amplifikation des gesamten Genoms

Die Amplifikation des Genoms erfolgte durch das REPLI-g® UltraFast Mini Kit (Quiagen). Die genaue Durchführung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers.

2.3.3 Bioinformatische Analysen

Um die Exom-Bibliothek auswerten zu können und anschließend Onkogenome zu berechnen waren umfassende bioinformatische Analysen notwendig.

Diese wurden wie in Hoell et al., 2019 (38) beschrieben durchgeführt. Die Ausführung und Präparation der Datenbanken erfolgte initial durch Dr. Sebastian Ginzel (Klinik für pädiatrische Onkologie- Hämatologie- und klinische Immunologie; Heinrich-Heine Universität Düsseldorf; Deutsches Konsortium für translationale Krebsforschung (DKTK); Department of Computer Science, Hochschule Bonn-Rhein-Sieg, Sankt-Augustin; Fraunhofer Institut für Intelligente Analyse und Informationssysteme, Schloss Birlinghoven, St. Augustin,).

Fastq-Dateien wurden mit BcltoFastq 1.8.4 (Illumina) erstellt. Um die Sequenzdaten an das humane Referenzgenom (GRCh37) anzupassen wurde BWA Version 0.6.1-r104 (39) mit Standardparametern verwendet. Die Konvertierungsschritte wurden mit Samtools (39) durchgeführt, gefolgt vom Entfernen doppelter Lesevorgänge [(40,41)]. Die lokale Neuausrichtung der Daten, Annotation und Neukalibrierung wurde durch GATK ermöglicht (42). Für die Neukalibrierung wurden die vom Broad Institute bereitgestellten HapMap-, OmniArray- und dbSNP135-Datensätze verwendet. Um die Datenanalyse und Abstimmung durch komplexe Datenbankanalysen zu erleichtern, wurden die aus den o.g. Verfahren resultierenden Datensätze durch Variant Effect Predictor (43) und unter Mithilfe der Ensembl-Datenbank (v70) bearbeitet und in eine interne MySQL-Datenbank importiert.

Der Verlust der Funktionsvorhersagewerte für PolyPhen2 (44) und SIFT (45) wurde aus derselben Ensemble-Version extrahiert. Die entstandenen Datenbanken wurden dann in Rahmen des vorliegenden Projektes aufgearbeitet, interpretiert und für die nachfolgenden Analysen genutzt.

2.3.3.1 Sequenzierung von Patientenproben

Um die seriellen Rezidive des Patienten in die Tiefe zu analysieren, wurden zu nachfolgenden Erkrankungsstadien Material gewonnen und mittels WES sequenziert: Initiale Leukämie (INIT), MRD-negative erste Remission (REMI), erster Rückfall (RLPS), zweite Remission (RREMI), Zeitpunkt nach erster SZT (TRANS), vollständige Remission nach SZT (TREMI: vollständige Keimbahn des Spenders), zweiter Rückfall (TRLPS), Probe nach zweiter SZT (TTRANS) sowie dritten Rückfall nach zweiter SZT (TTRLPS).

Hierfür wurden die beiden Programme MuTect und VarScan2 verwendet [(46,47)]. Die hierbei identifizierten *single nucleotide variations* (SNV) wurden nur in die weiteren Analysen einbezogen, wenn sie die folgenden Kriterien erfüllten: Eine minimale Frequenz von 1% in der Sequenzierung und mindestens zehnfache Abdeckung/Sequenzierung des Sequenzareals in allen Proben des Patienten. Anschließend wurden diese SNV in den folgenden Analysen weiter untersucht.

2.3.4 Polymerase chain reaction (PCR)

Ausgewählte SNV wurden mittels *polymerase chain reaction* (PCR) amplifiziert auf einem Argarosegel aufgetrennt, aufgereinigt und anschließend mittels Sanger-Sequenzierung validiert.

Um einzelne DNA Fragmente aufzutrennen, wurde eine PCR durchgeführt. Hierfür wurde die Fusion Hight-fidelity DNA Polymerase (ThermoScientific, Massachusetts, USA) benutzt. Alle genutzten Primer sind in der oben genannten Tabelle vier aufgeführt. Der PCR Ansatz bestehend aus 50 µl setzte sich wie folgt zusammen:

DNA (gDNA/cDNA):	50-250ng
5x Phusion HF Buffer:	10µl
10 mM dNTPs:	1µl
Forward Primer (10pM/µl):	2,5 ul
Reverse Primer (10 pM/µl):	2,5 µl
Phusion DNA Polymerase:	0.5µl
H2O:	auf 50µl

Für die Durchführung der PCR wurde ein Thermocycler Gerät vom Typ Cycler TGradient (ThermoScientific, Massachusetts, USA) benutzt. Folgendes Programm wurde zur Amplifikation der Gene eingestellt:

- 1) 98°C 30sek
- 2) 98°C 5-10sek
- 3) 55°-65° C, 30sek
- 4) 30sek/kb (gDNA)
- 5) 72° 5-10min
- 6) 4°C

2.3.4.1 Gelelektrophorese

Zur elektrochemischen Auftrennung der DNA Produkte wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde ein 1%-iges Argarosegel mit BioenzymLE Argarose (Biozym Trading GmbH, Wien, Österreich) gegossen. Zur Färbung der DNA wurde in

einem Verhältnis 1:1000 Ethidium-Bromid (Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Deutschland) in das Gel gegeben (5µl von Ethidiumbromid 10mg/ml in 50ml Argarose). Die Proben wurden mit 6x *Loading Dye* (Quiagen, Hilden, Deutschland) beladen. Anschließend wurden die Proben aufgetragen und unter einer kontinuierlichen Spannung von 120mV im Gel aufgetrennt. Zur Größenbestimmung der DNA Fragmente wurde ein Größenvergleich (ladder) mitgeführt. Hierzu wurde abhängig von der Größe des gesuchten Fragments der 100bp DNA ladder (Invitrogen) oder ein 1kb plus DNA ladder (ThermoScientific, Massachusetts, USA) benutzt. Anschließend wurden die Fragmente mit Hilfe einer UV-Lampe UVT 2035 der Firma HeroLab sichtbar gemacht und die korrekte Bande ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA erfolgte mit dem Gel Extraction Kit der Firma Quiagen.

2.3.5 Messung der Konzentrationen und Reinheit von DNA und RNA

Um die Konzentration und die Reinheit der RNA oder DNA in einer Probe zu messen wurde ein NanoDrop® ND-1000 Spectrophometer (Thermo Scientific) verwendet. Hierfür wurde 1µl der Probe verwendet und anschließend mittels Absorptionswellen von 260nm gemessen. In einem Absorptionsspektrum von 220-350nm werden hier alle Komponenten wie Lösungsmittel und Proteinkomponenten nachgewiesen und dargestellt. Dabei wird ein Absorbierungsquotient A_{260}/A_{280} berechnet, dieser sollte bei reiner RNA oder DNA zwischen 1,9 und 2,1 liegen.

2.3.6 Sanger Sequenzierung

Alle Sanger Sequenzierungen im Zuge dieses Projektes wurden im biologisch medizinischem Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

2.3.7 Aufbereitung der Proben

Um DNA aus dem gewonnenen Patientenmaterial zu gewinnen und damit diese anschließend für die Mutagenese zu nutzen, wurde das DNA/RNA/miRNA Kit der Firma Quiagen benutzt. Die Durchführung erfolgte hierbei nach Herstellerangaben. Um aus dieser DNA die gesuchten Produkte zu amplifizieren, wurde eine Touch-Down PCR

durchgeführt. Hierfür wurde die Taq-Polymerase (Quiagen, Hilden, Germany) benutzt und folgender Ansatz aus 25µl hergestellt:

10x Tag Puffer:	2,5µl
dNTP 10mM:	0,5µl
Primer forward 10nM:	0,5µl
Primer reverse 10nM:	0,5µl
Taq-Polymerase:	0,1µl
gDNA:	20ng
Nuklease freies H ₂ O	auf 25 µl

Es wurde im Anschluss folgendes Thermocycler Programm gewählt:

- 1) 94°C, 2min
- 2) 94°C, 30 sek
- 3) 1-65°C, 30sek
- 4) 72°C, 30sek
- 5) 10 Wiederholungen Schritt 2-4
- 6) 94°C, 30sek
- 7) 55°C, 30sek
- 8) 72°C, 30sek
- 9) 24 Wiederholungen Schritt 6-8
- 10) 4°C

Das Auftragen der Proben auf ein Argarosegel sowie die anschließende Aufreinigung erfolgte wie oben beschrieben.

2.3.8 RNA Isolierung

Anschließend wurde aus dem gewonnenen Material RNA extrahiert. Hierfür wurde das All Prep DNA/RNA/miRNA universal Kit (Quiagen) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben, anschließend wurde das Material in 30µl nukleasefreiem Wasser gelöst und bei -80°C gelagert.

2.3.9 Synthese von cDNA

Aus der isolierten RNA wurde durch das Superscript II (Invitrogen) cDNA synthetisiert. Dabei wurde folgender Ansatz gewählt:

50µM Oligo(dT) ₂₀ Primer	1µl
10nM dNTP	1µl
RNA	1µg
Nuklease freies Wasser	bis 13µl

Dieser Ansatz wurde für 5 Minuten auf 60°C gelagert und anschließend eine Minute auf Eis gelegt. Folgende Komponenten wurden dann hinzugefügt, und anschließend für 60 Minuten auf 50 °C und für 15 Minuten auf 70°C inkubiert.

5x First-Strand Buffer	4µl
0,1 M DTT	1µl
RNase Out (40 U/µl)	1µl

2.3.10 Restriktion der DNA

Zur weiteren Vorbereitung der Mutagenese erfolgte eine Restriktion sowohl der cDNA als auch des genutzten Plasmids. Hierfür wurden *Fast-Digesting enzyme* (New England Biolabs) verwendet. Der Ansatz (bestehend aus 20µl) setzt sich folgendermaßen zusammen.

10x fast digest green buffer:	2µl
DNA:	0,2-1µg
Enzym 1	1µl
Enzym 2	1µl
Nuklease-freies Wasser:	bis 20µl

Die Komponenten wurden bei 37°C für 5 Minuten inkubiert.

2.3.11 Mutagenese

Nach Restriktion der cDNA und des Plasmids wurden diese mittels PCR amplifiziert. Anschließend erfolgte die Ligation der Fragmente um diesen modifizierten Vektor zu transformieren.

Die Mutagenese wurde mit den Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs) durchgeführt. Die Ansätze wurden wie folgt bearbeitet:

Q5 Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix	12,5µl
Primer 1 (10pm/µl)	1,25µl
Primer 2 (10pm/µl)	1,25µl
DNA	1-25ng
Nuklease freies Wasser	bis 25µl

Folgendes PCR Programm wurde zur Vervielfältigung genutzt:

- 1) 98° C, 30 sek
- 2) 98° C, 10 sek
- 3) 56-64° C. 30sek/kb
- 4) 24 Wiederholungen von Schritt 2-4
- 5) 72° C, 2 min
- 6) 4° C

Der Ansatz für die Ligation des Produktes setzte sich folgendermaßen zusammen:

PCR Product	1µl
KDL reaction Puffer	5µl
KDL Enzym (10x)	1µl
Nuklease freies Wasser	bis 10µl

Dieser Ansatz wurde 5min bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurden 5µl für die Transformation in *Escherischia coli* (E.coli) genutzt.

2.3.11.1 Präparation des Plasmids

Zur Präparation von Plasmiden wurde das Monarch Plasmid MiniPrep Kit (New England BioLabs, Massachusetts, USA) bzw. das NucleoBond Xtra Plasmid purification Kit (Roche) benutzt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Alle Proben wurden zur Überprüfung der eingebauten Mutationen durch das BMFZ der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf sequenziert.

2.3.11.2 Transformation chemokompetender E.coli Zellen

Die Transformation des Plasmids erfolgte in chemokompetente *E.coli* Zellen. Hierfür wurde das One Shot Top100 competent cells Kit (Thermoscientific, Massachusetts, USA) benutzt. 5µl der Ligationsreaktion wurden in 50µl OneShot kompetenten *E.coli* Zellen überführt. Diese wurden anschließend für 30 Minuten auf Eis gestellt und dann für 30 Sekunden auf 42 °C erhitzt. Danach wurden die Zellen in 250µl vorgewärmtes S.O.C. Medium aufgenommen und eine Stunde bei 37°C und 225 *rounds per minute* (rpm) in einem Thermomixer (Thermomixer5436, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. 100-300µl konnten auf ampicillinhaltige Platten ausplattiert werden und für 8-12 Stunden bei 37°C inkubiert werden. Die Inkubation erfolgte in einem Inkubator Heraeus B6030 (Thermoscientific, Massachusetts, USA). Hochgewachsene Kolonien konnten nun in der Zellkultur weiter kultiviert werden.

2.3.12 Zellkultur

Kultivierungsbedingungen

Die verwendeten Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ Gehalt in einem Brutschrank kultiviert.

Kulturmedien

Es wurden LB-Agar-Platten (Lennox) sowie LB-medium (Lennox) verwendet. Zur Selektion der Bakterien wurde Ampicillin (100µg/ml) oder Gentamicin (10mg/ml) verwendet.

2.3.12.1 Verwendete Zelllinien

BA/F3 Zellen

Die BA/F3 Zelllinie ist eine IL-3 abhängige B-Zell Reihe. Die Zellen wachsen in Suspension und werden in Kulturflaschen in einer Konzentration von $1-2 \times 10^6$ Zellen pro ml gehalten. Alle 3 Tage werden die Zellen 1:10 gesplittet.

Die Zellen werden in folgendem Medium, angesetzt in 500 ml, kultiviert:

450 RPMI+Glu (ThermoFisher)

50 FBS-Medium

10ng/ml mouse IL-3 (Invitrogen)

2,5 ml Gentamycin (Invitrogen)

E.coli

Zur Vervielfältigung der verwendeten Plasmide wurde mit chemokompetenten E.coli (*Escherichia coli*) Bakterienstämmen (Invitrogen) gearbeitet.

2.3.12.2 Nukleofektion

Das Einbringen der Plasmide in die BA/F3 Zellen erfolgte durch Elektroporation mit dem Nucleofektor 2b (Lonza, Basel, Switzerland).

Zuerst wurden 3ml Medium in ein 6well gegeben und anschließend bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurden fünf Millionen Zellen pro durchzuführende Transfektion fünf Minuten bei 400G zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 100µl *Nucleofector solution* resuspendiert und zusammen mit 5µg Plasmid DNA in die vom Hersteller gelieferten Küvetten gegeben. An dem Gerät wurde nun das Programm X-01 gewählt und die Nukleofektion durchgeführt. Anschließend wurden 500µl des vorgewärmten Mediums genutzt, um die transformierten Zellen in die vorbereiteten 6well Platten zu überführen.

Nach 48 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Selektion der Zellen wurde begonnen. Dafür wurden zu dem oben genannten Medium 600ng/µl des Antibiotikums Hygromycin gegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Patient

In der vorliegenden Promotionsarbeit werden die genetischen Veränderungen eines Kindes mit rezidivierender cALL über einen mehrjährigen zeitlichen Verlauf charakterisiert. Der Patient erkrankte im Alter von knapp 3 Jahren an einer c-ALL. Daraufhin wurde eine Therapie gemäß Hochrisikogruppe des CoALL 08/09 Chemotherapie-Protokolls eingeleitet. Mit dieser konnte eine vollständige Remission erreicht werden.

Im Alter von 5,9 Jahren trat ein spätes isoliertes Knochenmark-Rezidiv ohne ZNS-Beteiligung auf. Daraufhin wurde eine Chemotherapie nach dem ALL-REZ-BFM Protokoll eingeleitet, dieses wurde bei Blastenpersistenz im Protokoll II/IDA abgebrochen, durch einen individuellen HAM-Block intensiviert und hierdurch eine Remission erreicht. Da somit die Indikation zur Stammzelltransplantation gegeben war wurde eine haploidente TCRA/β-depletierte allo-SZT durchgeführt. Die Konditionierung erfolgte mit den Substanzen Fludarabin, Melphalan, Thiopeta und ATG.

Bei ansteigender MRD-Last - einem molekularen Rezidiv entsprechend - 1,2 Jahre nach erster allo-SZT wurde eine Anti-CD19 Antikörpertherapie initiiert. Trotz dieser Therapie kam es zu einem offenen Rezidiv, sodass nach individueller Nutzen-/Risiko-Abwägung ein Therapieversuch mit dem bispezifischen CD19/CD3-Antikörper Blinatumomab begonnen wurde. Da der Patient im Rahmen seines c-ALL Rezidivs nach erster allo-SZT in das INFORM-Projekt aufgenommen wurde erfolgte eine molekulargenetische Untersuchung der Blasten. Nach Identifikation einer FLT3-Mutation wurde die Therapie um den FLT3-Inhibitor Sorafenib ergänzt und bei weiterhin refraktärer Erkrankung der CD52-Antikörper Alemtuzumab eingesetzt. Nach diesem Therapiezyklus waren bei nicht bestimmbarer molekularer MRD-Last nur noch 0,1% Blasten im Knochenmark nachweisbar, sodass formal eine vollständige Remission erreicht werden konnte.

Im Alter von 7,9 Jahren wurde somit die Entscheidung zur erneuten TCR a/β-depletierten allo-SZT, diesmal von einem unverwandten Stammzellspender, getroffen. Auch nach Durchführung der zweiten allo-SZT konnte leider keine dauerhafte

Remission erreicht werden. Der Patient verstarb im Alter von knapp 9 Jahren.(Tabelle 8).

Patienten ID	337
Geschlecht	m
Alter bei Erstdiagnose	2,8
Immunphänotyp	cALL
Chromosomale Veränderungen bei Ersterkrankung	52,XY+X+6+14+17+21+21[12]/46,XY[6]
Molekulare Zytogenetik	Keine Translokation
ZNS-Status	ZNS negativ
Alter bei erstem Rezidiv	5,9 Jahre
Zeit bis zum ersten Rezidiv	3,1 Jahre
Chromosomale Veränderungen bei erstem Rezidiv	52,XY+X,t(2,10)(p12;q25)+6,i(7)(q10),+14+17+21+21[7/14]
Molekulare Zytogenetik	Keine leukämietypischen Translokationen
Immunphänotyp	cALL
ZNS-Status	ZNS negativ
Alter bei SZT	6,3 Jahre
Remissionsstatus vor 1. SZT	Komplette Remission, MRD $<1 \times 10^{-4}$
Transplantationsstudie	TCRalpha/beta-Haplo2010
Konditionierungsregime	Flu/Thio/Mel/ATG
Art der Transplantation	haplo
Zeit bis zum Rezidiv nach SZT	1,2 Jahre
Chromosomale Veränderungen bei Rezidiv nach SZT	52,XY+X,t(2,10)(p12;q25)+6,i(7)(q10),+14+17+21+21[2/20]
Molekulare Zytogenetik	keine leukämietypischen Translokationen
Immunphänotyp	cALL
ZNS-Status	ZNS negativ
Alter bei 2. SZT	7,9 Jahre

Remissionsstatus vor 2. SZT	Komplette Remission, MRD nicht bestimmbar
Art der 2. SZT	allogen-unverwandt
Alter bei Rezidiv nach 2. SZT	8,9 Jahre
Zeit bis zum Rezidiv nach 2 SZT	0,4 Jahre
Überlebensstatus	verstorben

Tabelle 8: Verlauf der Erkrankung des Patienten 337.

M =männlich, KM=Knochenmark, neg=negativ, ZNS=zentrales Nervensystem

3.2 Berechnung von vier Onkogenomen

Im Rahmen des deutschlandweiten Forschungsverbundes INFORM (*Individualized Therapy For Relapsed Malignancies in Childhood*) werden Ersterkrankungs- und Rezidivproben bestimmter Tumorerkrankungen gesammelt und umfassend genetisch analysiert. Durch den Einschluss des Patienten in dieses Projekt wurden bereits im Vorfeld der hier vorliegenden Arbeiten molekulargenetische Daten aus Hochdurchsatzsequenzierungen zu den unterschiedlichen Erkrankungszeitpunkten erhoben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden aus den gewonnenen Proben ebenfalls Hochdurchsatzsequenzierungen durchgeführt

Um das gesamte Spektrum spezifischer genetischer Veränderungen für die Leukämie-Zellen einer Erkrankungsmanifestation bestmöglich betrachten zu können, wurden aus den vorliegenden umfassenden molekulargenetischen Charakterisierungen aller vier Leukämie-Manifestationen vier individuelle Onkogenome (OG) berechnet. Dabei definierten wir OG1 - OG4 als die Summe aller spezifischen, genetischen Veränderungen der initialen Leukämie (OG1) bzw. des ersten (OG2), zweiten (OG3) und dritten (OG3) Rezidivs. Die genaue Berechnung der Onkogenome unter Berücksichtigung von Remissionsmaterial (= Keimbahnreferenz) vor bzw. nach der allo-SZT ist Abbildung 5 zu entnehmen.

Wie bereits in Hoell et al. beschrieben ist es zur korrekten Identifizierung der leukämie-spezifischen Mutationen nach stattgehabter Transplantation unbedingt notwendig, die in allen Zellen eines Patienten bzw. Spenders vorhandenen Keimbahnmutationen von den in den Leukämieproben detektierten Mutationen „abzuziehen“. In unserem seltenen Fall eines Rückfalls nach zweiter SZT müssen somit drei Keimbahnen, also die des ALL-

Patienten, des Spenders der ersten sowie des Spenders der zweiten SZT berücksichtigt werden. Nur auf diese Weise können ausschließlich leukämie-spezifische somatische Mutationen sicher identifiziert werden.

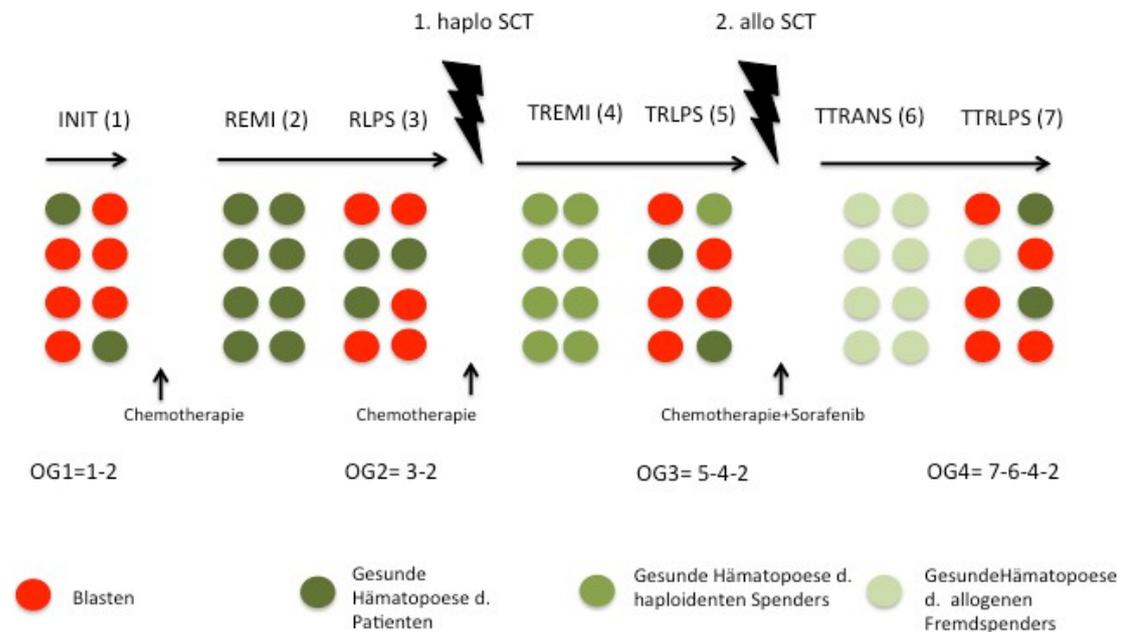


Abb. 5: Berechnung von Onkogenomen zur Darstellung Erkrankungs-spezifischer Veränderungen

INIT: Initialerkrankung; REMI: Erste Remission; RLPS: Erster Rückfall; TREMI: Remission nach erster SZT; TRLPS: Rückfall nach erster SZT; TTRANS: Remission nach zweiter SZT; TTRLPS: Rückfall nach zweiter SZT (Adaptiert nach (38))

Da in dieser Arbeit durch Untersuchung der Mutations-Spektren von Leukämiezellen und Stromazellen Veränderungen auf beiden Exom-Ebenen verglichen werden sollen, wurden synonym Onkogenome des mesenchymalen Stromas berechnet: StromaOG1 (= Founder - CGRML), StromaOG2 (= Refounder - CGRML) und StromaOG3 (= Trefounder - CGRML). Dabei bezeichnet Founder, Refounder und TRefounder jeweils die Stromazellreihe zum Zeitpunkt der Ersterkrankung sowie des ersten und zweiten Rückfalls während CGRML jeweils die davon abgezogene Keimbahn, bestimmt aus kultivierten Haut-Fibroblasten, beschreibt. So konnten wir diejenigen Mutationen herausfiltern, die spezifisch für die MSC zum jeweiligen Erkrankungszeitpunkt sind. Alle SNV in den berechneten Onkogenomen, die oben genannte Kriterien erfüllten, wurden des Weiteren *in silico* validiert. Dies erfolgte durch manuelle Überprüfung aller identifizierten SNV, durch Auswertung ausreichender Sequenzierungstiefen in allen

Patientenproben und durch Vergleich der B-Allelfrequenzen (BAF) in den mutierten gegenüber den nicht mutierten Proben.

3.2.1 Betrachtung der Mutationsspektren über vier Leukämie-Onkogenome hinweg.

Um die Plastizität der Leukämie insbesondere im Fall serieller Rezidive besser verstehen zu können und dies für die Identifizierung möglicher individueller therapeutischer Angriffspunkte nutzen zu können, sollen im folgenden Abschnitt die Leukämie-Onkogenome genauer charakterisiert und untersucht werden.

Insgesamt konnten in allen vier OG 147 verschiedene Mutationen gefunden werden. Für die weiteren Vergleichsanalysen ist zum einen die Summe der Mutationen eines gesamten OG interessant. Dies wird in Abbildung 6 dargestellt.

Die Anzahl der Mutationen nimmt dabei im Verlauf der Erkrankung stetig zu und ist zum Zeitpunkt des dritten Rezidives nach zweiter SZT 4,2-mal höher als zum Zeitpunkt der Initialerkrankung.

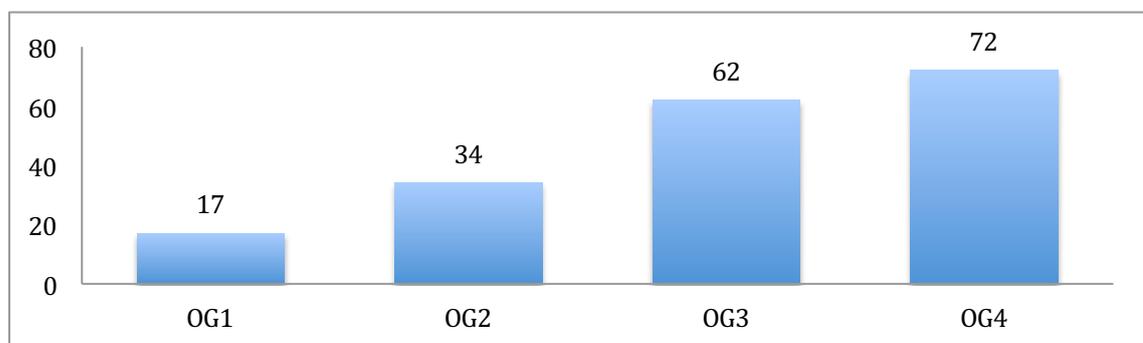


Abb. 6: Darstellung der in OG1-4 detektierten Mutationen (SNVs)

SNV, die in OG1 bis OG4 auftreten. Dabei sind auf der horizontalen Achse die einzelnen OG aufgeführt, auf der vertikalen die absolute Anzahl der Mutationen.

Um die Mutations-Dynamik im Falle multipler Rezidive zu untersuchen und das Therapieansprechen im zeitlichen Verlauf der Erkrankung verstehen zu können sollen im folgenden nicht nur die Summe aller Mutationen innerhalb eines OG betrachtet werden. Von besonderem Interesse sind neben den isolierten Mutationen, also Mutationen, die spezifisch nur in einem OG auftreten, auch die Überschneidungen mit

anderen OG. Um diese Zusammenhänge übersichtlich darzustellen wird daher auf die Abbildungsform des Venn-Diagramms zurückgegriffen. (Abb. 7)

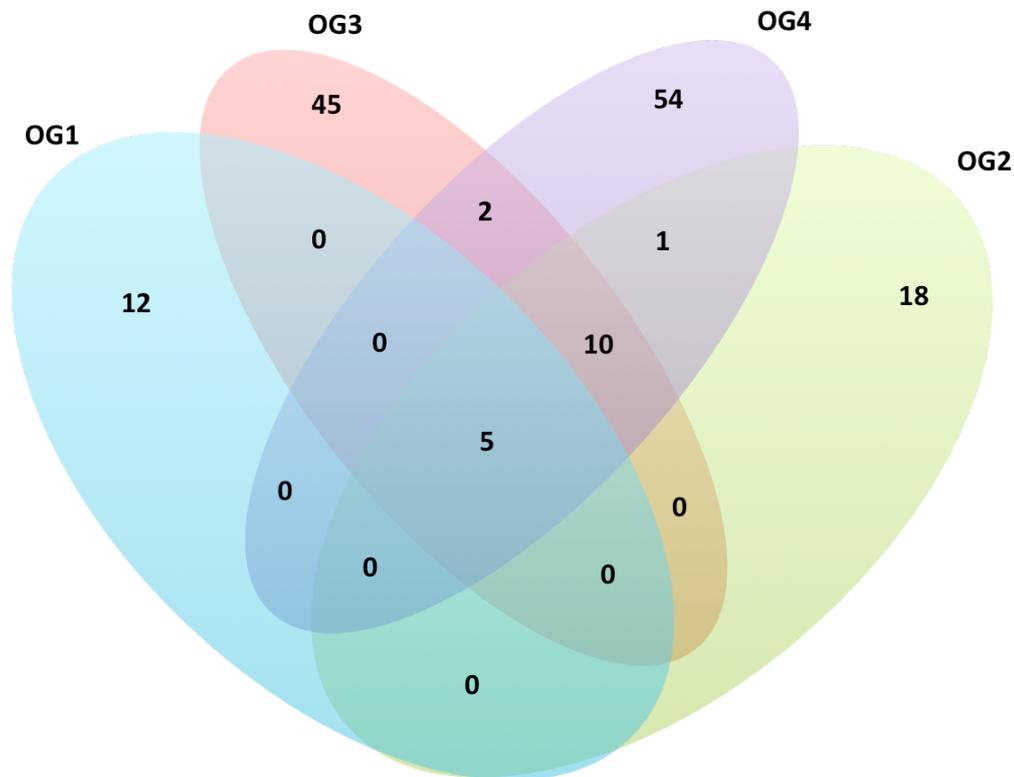


Abb. 7: Venn-Diagramm zur Darstellung von OG 1-4.

Die Zahlen zeigen die Anzahl der detektierten Mutationen in den jeweiligen Teil- und Schnittmengen an. OG1 ist in blau dargestellt, OG2 in grün, OG3 in rot und OG4 in violett. Die Schnittstellen der Ellipsen veranschaulichen die Schnittmengen der OG

Die aufgezeigten Relationen sollen im Folgenden detaillierter betrachtet werden.

Die größte Anzahl der Mutationen treten isoliert = ausschließlich in einem OG auf und können im nächsten darauf folgenden OG nicht mehr gefunden werden. Wir sehen 12 isolierte Mutationen in OG1, 18 in OG2, 45 in OG3 und 54 isolierte Mutationen in OG4. Den Hauptteil der leukämie-spezifischen Mutationen innerhalb eines OG findet man also isoliert nur in dem jeweiligen Erkrankungsstadium.

Es existieren keine Mutationen die in OG1 und OG2 aber in keinem anderen OG auftreten. Ebenfalls finden sich keine Mutationen, die nur in OG2 und OG3 und nicht in OG1 und OG4 zu finden sind.

Zwischen OG3 und OG4 sind zwei überschneidende Mutationen beschrieben die nur in diesem beiden OG und nicht in OG1 und OG2 vorkommen (Gennamen: *NMRAL1*, *ZFYVE20*). (Abb. 8)

Grafisch dargestellt sind im Folgenden die Mutationen immer mit ihrer zugehörigen B-Allel Frequenz. Diese zeigt die Intensität der Mutation des mutierten gegenüber des nicht mutierten Gens an. „1“ (entsprechend 100%) steht für in allen Sequenzierungsdurchgängen (*Reads*) ausschließlich mutiert detektierte Allele.

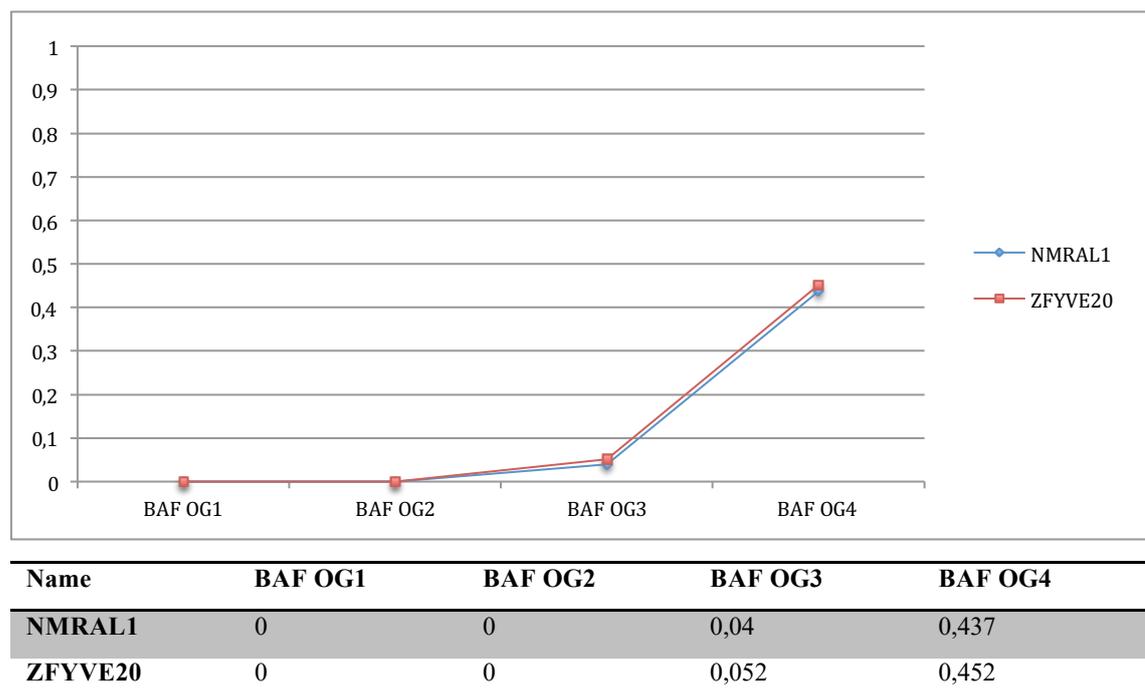
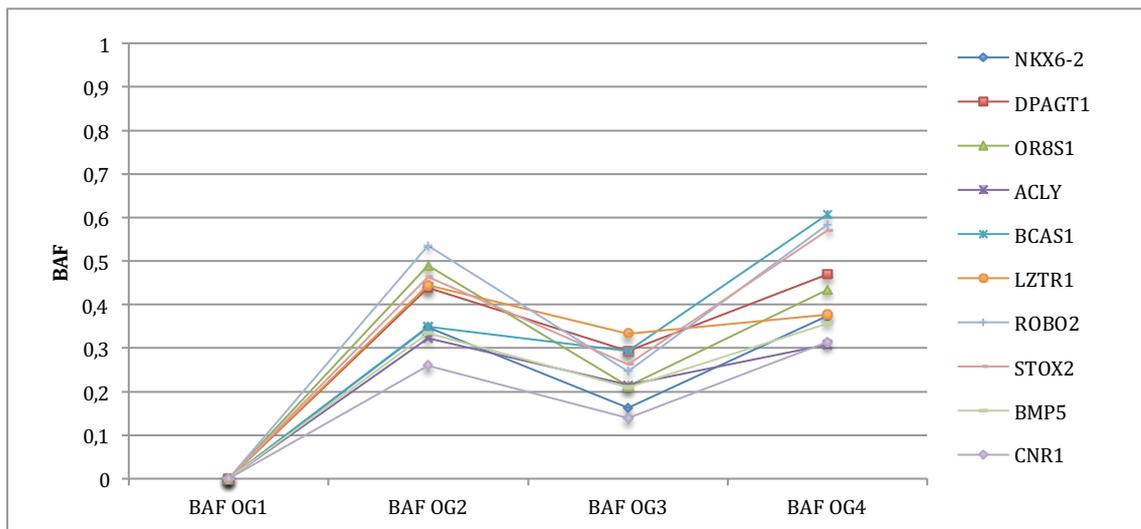


Abb. 8: Mutationen, die nur in OG3 und OG4, nicht in OG1-OG2 auftreten

Die Gene sind mit farbigen Kurven aufgeführt, darunter tabellarisch die zugehörigen B-Allel-Frequenzen. BAF= B-Allel-Frequenz, OG1-4= Onkogenom 1-4

Zu erwähnen ist hier, dass beide mutierten Gene in OG3 deutlich niedrigerfrequenter auftreten als in OG4. Dieses Phänomen lässt sich übertragen auf die 10 Mutationen, die die Schnittmenge zwischen OG2, OG3 und OG4 bilden, das heißt im ersten Rückfall auftreten, dann bis zum Rückfall nach zweiter SZT bestehen bleiben aber nicht in der Initialerkrankungen zu finden sind. Es ist zu sehen, dass die BAFs aller Mutationen in OG3 niedriger sind als in OG2 und dann in OG4 wieder zunehmen. (Abb. 9)



Name	BAF OG1	BAF OG2	BAF OG3	BAF OG4
NKX6-2	0	0,347	0,163	0,374
DPAGT1	0	0,439	0,293	0,47
OR8S1	0	0,49	0,212	0,434
ACLY	0	0,322	0,216	0,308
BCAS1	0	0,349	0,293	0,607
LZTR1	0	0,444	0,333	0,377
ROBO2	0	0,536	0,246	0,584
STOX2	0	0,463	0,262	0,571
BMP5	0	0,335	0,209	0,356
CNR1	0	0,26	0,139	0,314

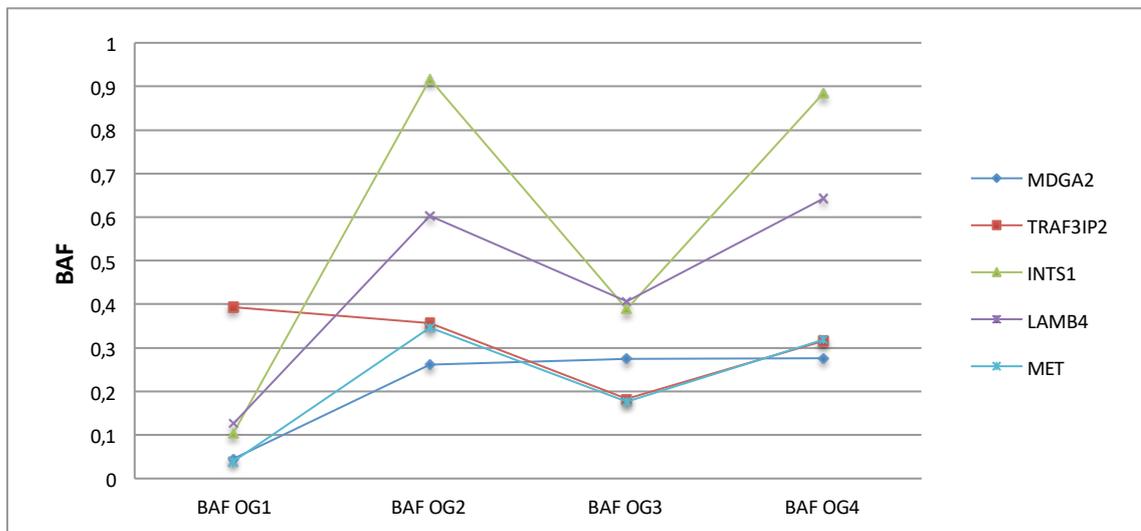
Abb. 9: Mutationen die erst in OG2 auftreten und bis OG4 bestehen bleiben

Der Verlauf der Gene ist mit farbigen Kurven dargestellt. Darunter sind die B-Allel Frequenzen tabellarisch aufgeführt

Des Weiteren ist in beiden Abbildungen sichtbar, dass der Kurvenverlauf der einzelnen Gene sehr ähnlich ist. Die Dynamik der B-Allel Frequenzen der einzelnen Gene ist also vergleichbar. Dieser Aspekt wird im späteren Verlauf dieser Arbeit noch einmal genauer betrachtet werden.

Betrachtet man die zentrale Schnittmenge des Venn-Diagramms (Abb. 7) finden sich fünf Mutationen, die in allen vier Onkogenomen vorhanden sind (*INTS1*, *LAMB4*, *MET*, *MDGA2*, *TRAF3IP2*). Diese sind über alle Erkrankungsstadien des Patienten zu finden. Man erkennt hier einen insgesamt heterogenen Verlauf der B-Allelfrequenzen über die

Zeit. Allerdings fällt ein paralleler Verlauf der Gene MET und TRAF3IP2 von OG2 bis OG4 auf. (Abb. 10)



Name	BAF OG1	BAF OG2	BAF OG3	BAF OG4
MDGA2	0,045	0,262	0,275	0,276
TRAF3IP2	0,394	0,356	0,183	0,316
INTS1	0,103	0,917	0,389	0,885
LAMB4	0,125	0,603	0,407	0,643
MET	0,038	0,347	0,177	0,319

Abb. 10: Darstellung der fünf Gene und ihrer B-Allel Frequenzen, die über alle vier Onkogenome vorhanden sind.

Der Verlauf der Gene ist mittels farbiger Kurven, sowie tabellarisch mit den dazugehörigen B-Allel-Frequenzen dargestellt.

Zuletzt soll diejenige Mutation erwähnt werden (*ZNF462*), die in OG2 auftritt, in OG3 verschwindet und erst in OG4 wieder nachweisbar ist. Sie erscheint zum Zeitpunkt des ersten Rückfalls verschwindet nach Erlangen des vollständigen genetischen Chimärismus nach erster SZT, ist auch im Rückfall nach erster SZT nicht detektierbar und tritt erst im Rückfall nach zweiter SZT wieder auf. (Abb. 11)

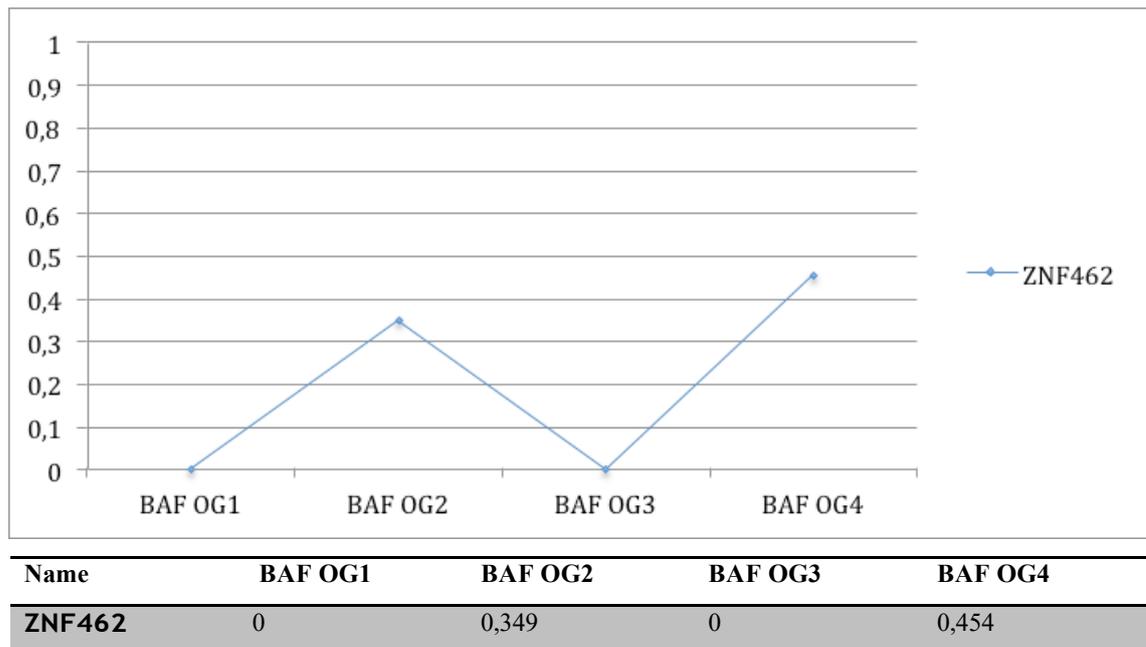


Abb. 11: Darstellung des Gens und seine B-Allel Frequenzen, welches nur in OG2 und OG4 nachweisbar ist

Der Verlauf des Gene farbige dargestellt, sowie tabellarisch die dazugehörigen B-Allel-Frequenzen

Zusammenfassend bleibt also festzuhalten, dass nur eine geringe Anzahl von fünf Mutationen in OG1-OG4 nachweisbar ist und somit kontinuierlich zu allen vier Erkrankungszeitpunkten des Patienten existiert. Einige weitere Mutationen bilden Überschneidungen zwischen den OG, sind jedoch nicht kontinuierlich vorhanden. Die mit Abstand größte Gruppe bilden jedoch die isolierten Mutationen, die nur in einem OG auftreten.

Zudem deuten die Abbildungen 8 und 9 an, dass es Zusammenhänge zwischen Mutationsverläufen verschiedener Gene geben könnte. Dies soll im nächsten Abschnitt näher untersucht werden.

3.3 Bildung von Mutations-Clustern zur Beschreibung der klonalen Dynamik der Leukämie

Im vorherigen Teil der vorliegenden Promotionsarbeit konnte die Mutations-Dynamik im Falle serieller Rezidive dargestellt werden. Da nur eine Minderheit von 5 Mutationen in allen vier Onkogenomen detektierbar ist und deren Frequenz über die Zeit zudem erheblich variiert (Abb. 10) ist eine erhebliche klonale Dynamik der leukämischen Blasten zu vermuten. Um die Entwicklung der Leukämie-Klonalität im Laufe der Zeit näher untersuchen und beschreiben zu können wurden alle Mutationen eines OG, auch

diejenigen, die nur mit niedriger Frequenz, also subklonal detektiert wurden, nach ihrer Frequenztiefe geordnet und Mutationen mit ähnlichen Frequenziefen einem Cluster zugeordnet. So konnten einzelne Mutationen in sogenannten *Mutations-Clustern* als Surrogate für Leukämie-Klone zusammengefasst werden. (Abb. 12)

Im Folgenden soll nun die klonale Dynamik der multiplen Rezidive anhand der *Mutations-Cluster* untersucht werden, um die genetische Plastizität sowie die Entstehung und Therapie einer Leukämie besser verstehen zu können.

Die Anzahl der identifizierbaren *Mutations-Cluster* nimmt von OG1 (n=9) über OG2 (n=13), OG3 (n=15) bis hin zu OG4 (n=17) stetig zu (Abb. 12, rechte Abbildungsspalte). Die *Mutations-Cluster* werden dabei im Verlauf deutlich größer, das heisst die Anzahl der sich in ihnen befindlichen Mutationen nimmt zu. (Tabellen 9 - 12)

Um die Ursache von Leukämie-Rückfällen besser verstehen zu können sind vor allem die klonale Evolution der Blastenzellen sowie die Bedeutung einzelner expandierender Subklone zu späteren Erkrankungszeitpunkten von zentralem Interesse.

Innerhalb von OG4 kann mit Klon#13 ein Klon identifiziert werden, der niederfrequent in OG1 gefunden wird (BAF= 0,0144), und dann erst in OG4 mit einer signifikant höheren BAF von 0,250 wieder nachweisbar wird. Es handelt sich also um einen Klon, der in der initialen Leukämie zwar aufgetreten war, aber nicht wesentlich zur Haupt-Leukämiezellmasse beitrug, im ersten und zweiten Rezidiv nicht nachweisbar ist, und erst nach zweiter SZT wieder zu Tage tritt, dann aber mit deutlich höherer Frequenz (Tabelle 12, Abb. 12).

Außerdem können Klon#15 und Klon#16 aus OG4 jeweils nur in OG2 und OG4 detektiert werden. In OG2 liegen die Frequenziefen mit 0,009 und 0,026 im deutlich subklonalen Bereich, während sich in OG4 mit 0,150 und 0,609 Werte im deutlich höher frequenten, klonalen Bereich zeigen. (Abb. 12, Tabelle 10-12)

Mit diesen Ergebnissen können wir anhand ausgewählter Daten zeigen, dass es im Verlauf der Leukämie im Rahmen der klonalen Plastizität von Blastenzellen zu einer Expansion initial extrem niedrig-frequenter Klone in späteren Erkrankungsstadien kommen kann. Dies könnte hinweisend für die Entstehung von therapieresistenten, späten Rezidiven sein und somit die Bedeutung patienten-individueller Therapie-Ansätze in späteren Erkrankungszeitpunkten aufzeigen.



Abb. 12: Mutationen (links) mit ähnlichen Frequenziefen in einem OG werden zu *Mutations-Clustern* (rechts) zusammengefasst

Dargestellt sind die *Mutations-Cluster* von OG1 bis OG4. Dabei sind die BAF über die Zeiträume OG1 bis OG4 aufgetragen. Vergleichend sieht man auf der linken Seite jeweils die einzelnen Mutationen der zugehörigen OGs.

OG1	OG2	OG3	OG4	cluster	Gene
0,245	0,006	0	0	Klon#1(1)	RYR2
0,402	0,339	0,198	0,309	Klon#2(1)	TRAF3IP2
0,168428571	0	0	0	Klon#3(7)	COL24A1;EYA2; FLT3 ;N4BP2L1;RITA1; TSPAN19;VIPAS39
0,187	0	0	0,009	Klon#4(1)	LAMTOR2
0,235	0	0,017	0	Klon#5(1)	TRRAP
0,053	0,025	0	0,017	Klon#6(1)	DPY19L2
0,1315	0,749	0,397	0,7745	Klon#7(2)	INTS1;LAMB4
0,046	0,297	0,2225	0,2885	Klon#8(2)	MDGA2; MET
0,038	0,005	0	0,004	Klon#9(1)	HIST1H2BI

Tabelle 9: Gene des Mutations-Cluster OG1 mit ihren zugehörigen BAF

Aufgeführt sind die *Mutations-Cluster* von OG1 mit ihren zugehörigen Genen. Fett hinterlegt sind die BAF der Klone in OG1. In Rot dargestellt sind die Gene die bereits als *druggable* beschrieben sind. Die Zahl in Klammern hinter dem Klon beschreibt die Anzahl der Gene, die in diesem Cluster enthalten sind.

OG1	OG2	OG3	OG4	cluster	Gene
0,035	0,193	0,09	0,108	Klon#1(2)	L3MBTL2;STOML3
0,402	0,339	0,198	0,309	Klon#2(1)	TRAF3IP2
0,068	0,1115	0,065	0,0365	Klon#3(2)	KIR3DL1; MST1
0,12	0,129	0,09	0,118	Klon#4(1)	PCNT
0,029	0,406	0,221	0,411	Klon#5(6)	BMP5;MDGA2; MET ; OR8S1 ; ROBO2;STOX2
0	0,111	0	0	Klon#6(8)	AP3D1;CAMTA1;FLG2; MICAL2 ; NRP2;PCDH12; PTPN14 ;VPS41
0	0,363	0,236	0,4035	Klon#7(6)	ACLY;BCAS1; CNR1 ;DPAGT1;LZT R1;NKX6-2
0,1315	0,749	0,397	0,7745	Klon#8(2)	INTS1;LAMB4
0	0,338	0,029	0,43	Klon#9(1)	ZNF462
0	0,048	0,011	0,004	Klon#10(1)	SRSF7
0	0,048	0,010	0	Klon#11(3)	ADCY8 ;NAGLU;RBFOX1
0,006	0,0595	0,0105	0	Klon#12(2)	GPR50 ;LRRC48
0,026	0,105	0	0	Klon#13(1)	USP5

Tabelle 10: Gene des Mutations-Cluster OG2 mit ihren zugehörigen BAF

Aufgeführt sind die *Mutations-Cluster* von OG2 mit ihren zugehörigen Genen. Fett hinterlegt sind die BAF der Klone in OG2. In Rot dargestellt sind die Gene die bereits als *druggable* beschrieben sind. Die Zahl in Klammern hinter dem Klon beschreibt die Anzahl der Gene, die in diesem Cluster enthalten sind.

OG1	OG2	OG3	OG4	cluster	Gene
0,402	0,339	0,198	0,309	Klon#1(1)	TRAF3IP2
0,09875	0,29	0,261	0,295	Klon#2(11)	BMP5;HEATR5B;HEATR5B;LNX1 ;MDGA2; MET ; OR8S1 ;PLEKHN1; ROBO2;STOX2;TMEM179
0	0	0,119	0	Klon#3(30)	AKAP6;APC2;ARHGAP21;C8orf44 ;SGK3;CAV1;CLASP1; CPN2 ;EFHD 2;ETS1;FLII;KIAA1024;KIF4B; LH CGR ;LPCAT2;LRGUK; LYN ; MOK ; PCMTD2;PHACTR3;PIANP; PLCB1 ; SGK3 ;SH3BP4;SLITRK2;TDRD15; TNS3 ;TPPP3;ZDBF2;ZNF558;ZNF7 17
0,028	0,013	0,13	0,044	Klon#4(1)	ZNF275
0	0,3631	0,236	0,403	Klon#5(6)	ACLY;BCAS1; CNR1 ;DPAGT1;LZT R1;NKX6-2
0,1315	0,749	0,397	0,774	Klon#6(2)	INTS1;LAMB4
0,005	0	0,115	0	Klon#7(3)	CLUH; OR1N2 ;PDS5B AL136218.1;CLVS2;FILIP1; KCNH2
0	0	0,085	0,006	Klon#8(7)	;KRT81;PRR14L;STRIP2
0,008	0	0,137	0,003	Klon#9(1)	SLC27A4
0	0,015	0,124	0	Klon#10(1)	ZXDA
0	0,01	0,044	0,44	Klon#11(1)	ZFYVE20
0,004	0,004	0,075	0	Klon#12(1)	THBS2
0,051	0,054	0,155	0,043	Klon#13(1)	NDUFA9
0,018	0,085	0,157	0,093	Klon#14(1)	SORD
0,008	0,006	0,042	0,461	Klon#15(1)	NMRAL1

Tabelle 11: Gene des Mutations-Cluster OG3 mit ihren zugehörigen BAF

Aufgeführt sind die *Mutations-Cluster* von OG3 mit ihren zugehörigen Genen. Fett hinterlegt sind die BAF der Klone in OG3. In Rot dargestellt sind die Gene die bereits als *druggable* beschrieben sind. Die Zahl in Klammern hinter dem Klon beschreibt die Anzahl der Gene, die in diesem Cluster enthalten sind.

OG1	OG2	OG3	OG4	cluster	Gene
0,402	0,339	0,198	0,309	Klon#1(1)	TRAF3IP2
0,071	0,012	0,056	0,103	Klon#2(1)	OR1D5
0,029	0,406	0,221	0,411	Klon#3(6)	BMP5;MDGA2; MET ; OR8S1 ;ROBO2 ;STOX2
0	0,3631	0,236	0,403	Klon#4(6)	ACLY;BCAS1; CNR1 ;DPAGT1;LZT R1;NKX6-2
0,1315	0,749	0,397	0,774	Klon#5(2)	INTS1;LAMB4

0	0,338	0,029	0,43	Klon#6(1)	ZNF462
0,006	0,005	0,032	0,507	Klon#7(3)	DCTN3;DNHD1;NMRAL1
0	0,017	0,029	0,352	Klon#8(3)	C14orf37;NDUFB11;ZFYVE20
0	0	0,0295 3	0,400	Klon#9(14)	ARMCX4;AWAT1;DACT3; DCLK1 ; DYNC2H1;FBN1;FBN1;KIF1C;LPP R4; MUC16 ;PUS1RP11766F14.2; VIP R2 ; VWA3A ;ZNF736
0	0	0	0,265	Klon#10(24)	ABCA10 ;BAHD1;BHMT2;C9orf92; CACNA1I ;CLCF1;COMP;CUBN;EX OSC10;FAM131A;ITPKA;MACF1;N ELFCD;NKAP; OR1S2 ;P4HA2;PSD2; PTCHD4;RNF2;S100A3;SHISA6;TS NAXIP1;UBTF; VIPR2
0,013	0	0,045	0,373	Klon#11(1)	AP2A1
0,004	0,004	0	0,149	Klon#12(1)	NACA2
0,014	0	0	0,250	Klon#13(5)	ADPRM;MCC;MYCBP2;NRG2;VHL
0,04	0,038	0,019	0,19	Klon#14(1)	VHL
0	0,009	0	0,150	Klon#15(3)	MAP3K5 ;PEX1;STRN4
0	0,026	0	0,609	Klon#16(1)	TNC
0	0,006	0,011	0,295	Klon#17(1)	OR4K15

Tabelle 12: Gene des Mutations-Cluster OG4 mit ihren zugehörigen BAF

Aufgeführt sind die *Mutations-Cluster* von OG3 mit ihren zugehörigen Genen. Fett hinterlegt sind die BAF der Klone in OG3. In Rot dargestellt sind die Gene die bereits als *druggable* beschrieben sind. Die Zahl in Klammern hinter dem Klon beschreibt die Anzahl der Gene, die in diesem Cluster enthalten sind.

3.4 Klinisch relevante Mutationen

Um in Zukunft umfassende genetische Analysen dafür zu nutzen, um patientenindividuelle Therapiekonzepte zu entwickeln und so die Prognose der Patienten mit Rückfällen nach SZT zu verbessern, sind solche Mutationen, die bereits als klinisch relevant beschrieben wurden, von besonderem Interesse. Als klinisch relevant sind insbesondere solche Mutationen einzustufen, die a) für die Leukämie-Entstehung oder –Unterhaltung eine potentielle pathogenetische Rolle spielen und b) für die es gleichzeitig spezifische Medikamente gibt, die die aus den Mutationen resultierenden molekularen Alterationen der Leukämiezelle therapeutisch beeinflussen können. Solche Mutationen werden als *druggable* bezeichnet.

Wie in den Tabellen 9 – 12 dargestellt und in rot hervorgehoben konnten wir insgesamt 34 Mutationen in Genen identifizieren, die bereits in vorherigen Arbeiten als klinisch relevant = *druggable* beschrieben wurden. Im Folgenden soll detailliert auf zwei spezifische Mutationen eingegangen werden, die solche Frequenztiefen aufweisen, dass sie in den Onkogenomen erfasst werden *druggable* sind, sowie im *cancer gene census* (CGC) als *cancer genes* gelistet sind (Tabelle 13). Im CGC werden solche in Tumorproben mutierte Gene aufgeführt die in Kausalität mit der Entstehung verschiedener maligner Erkrankungen gesetzt werden und auf Grund der entstehenden Dysfunktion verschiedenster Signalwege als pathogenetisch relevant angesehen werden werden.

Gen	Lokalisation	Tumor	Therapie
FLT3 <i>fms related tyrosin kinase 3</i>	13:28003274- 28100592	AML; ALL	Sorafenib, CX-5461; Elesclomol, Linifanib, Cabozantinib, Quizartinib, Veliparib, TW 37,
MET <i>met protoonkogene</i>	7:116672405- 116796342	Papillär, Renal; Plattenepithelkarzinome	Foretinib, BIBF-1120, Savolitinib, Brivanib, BMS-540215, Crizotinib, Carbozatinib

Tabelle 13: Mutierte Gene des untersuchten Patienten, die Teil des CGC und druggable sind.

Ausgeführt sind die Lokalisation innerhalb des Gens sowie Tumorkommen und die aktuellen Therapiemöglichkeiten.

Zum einen konnte bei dem in dieser Arbeit untersuchten ALL-Patienten eine aktivierende Mutation innerhalb der Tyrosinkinase FLT3 gefunden werden. Daher wurde ein Therapieversuch mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenib während des zweiten Rezidivs durchgeführt. Diese Mutation konnte retrospektiv bereits in der initialen Leukämie = OG1 detektiert werden, aber erst in einem späteren Rezidiv wurde gezielt nach SNV gefahndet, so dass die Therapie mit Sorafenib erst ab diesem Zeitpunkt erfolgen konnte. Zu den späteren Erkrankungsstadien wurde FLT3 jedoch nur in einem subklonalen Bereich detektiert. (Abb. 13)

Bei MET handelt es sich ebenfalls um ein für eine Tyrosinkinase kodierendes Gen. Dieses kann über alle vier OG hinweg mutiert gefunden werden und ist somit auch im zweiten Rückfall nach SZT zu finden. (Abb.13) Mutationen im MET Gen können mit direkten Tyrosinkinaseinhibitoren wie z.B. Crizotinib und Carbozatinib therapiert

werden. Diese Therapieoption wird aktuell in einer Phase II Studie zur AML im Kinder- und Jugendalter evaluiert (NCT02638428).

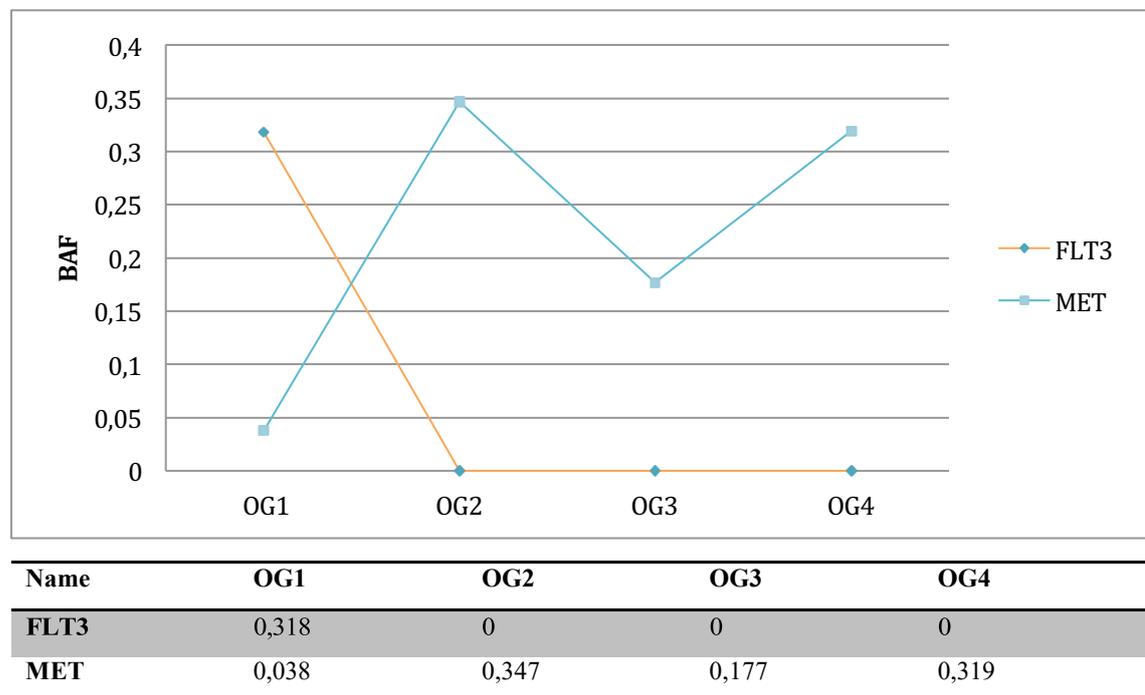


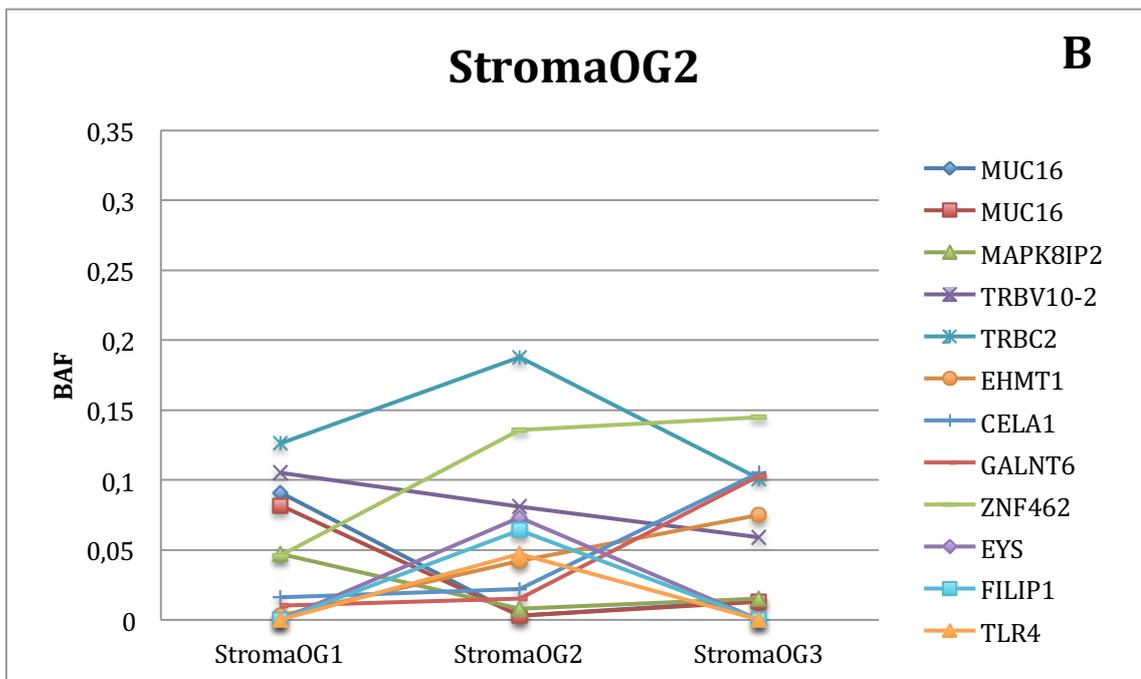
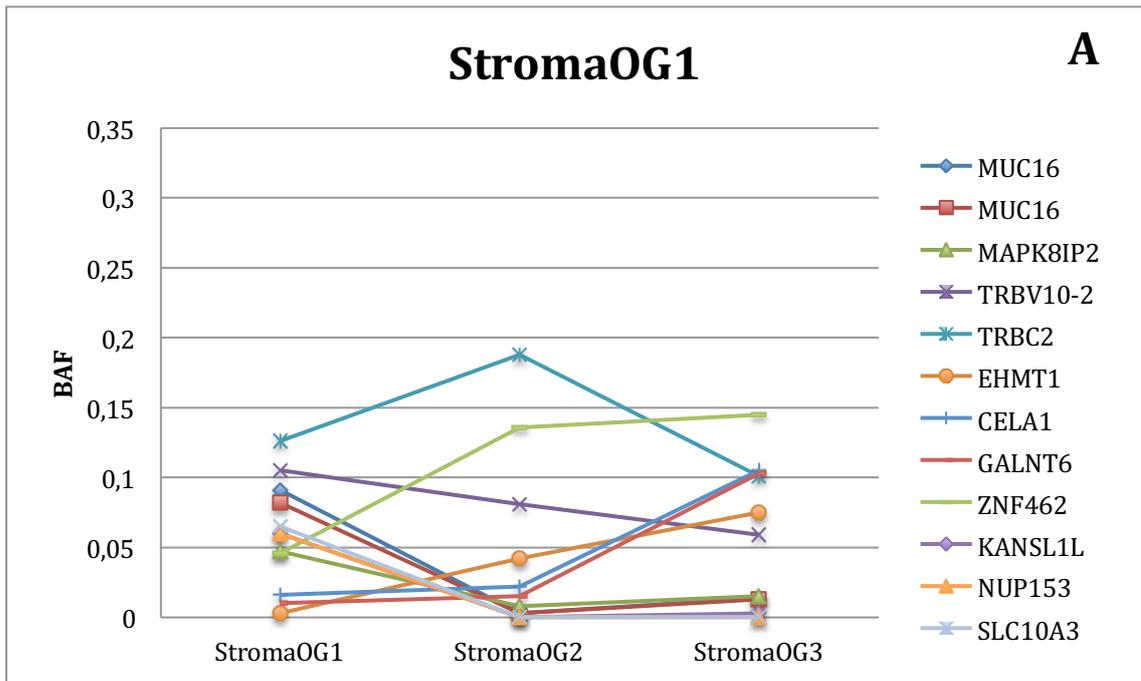
Abb. 13: Verlauf der Gene FLT3 und MET

Das Gen FLT3 ist in orange dargestellt, MET in blau. Darunter sind die B-Allel-Frequenzen tabellarisch aufgeführt.

3.5 Sequenzierung mesenchymaler Stammzellen und Berechnung von Onkogenomen

Das zweite Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit ist neben den Leukämiezellen auch MSC aus dem leukämischen Knochenmark auf Exom-Ebene zu untersuchen, um anschließend die Mutationsspektren zwischen Stroma- und Leukämiezellen vergleichen zu können. Daher wurden zum Zeitpunkt der Erkrankung des ersten Rezidivs sowie des zweiten Rezidivs MSC aus dem Knochenmark isoliert, expandiert und einer WES-Analyse unterzogen.

Anschließend wurden aus diesen Daten wie unter Abschnitt 3.2 beschrieben Onkogenome berechnet, sodass neben den Leukämie-Onkogenomen OG1 bis OG4 nun auch die Stroma-Onkogenome StromaOG1 bis StromaOG3 betrachtet werden können. Diese sind in Abbildung 17 A-C dargestellt.



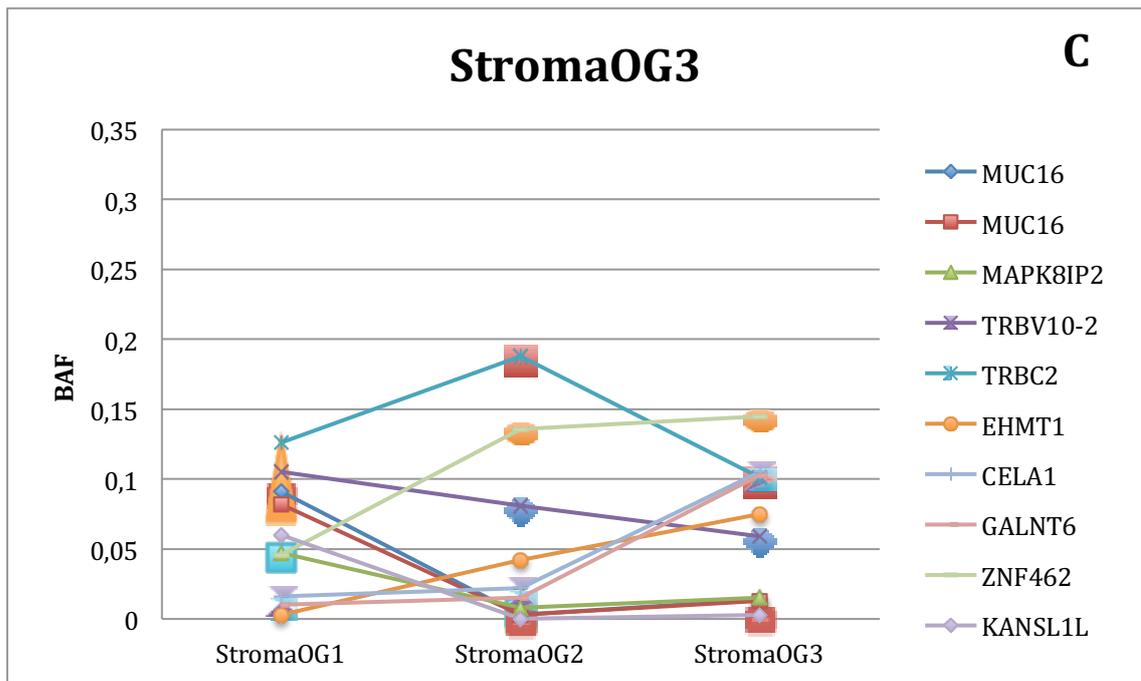


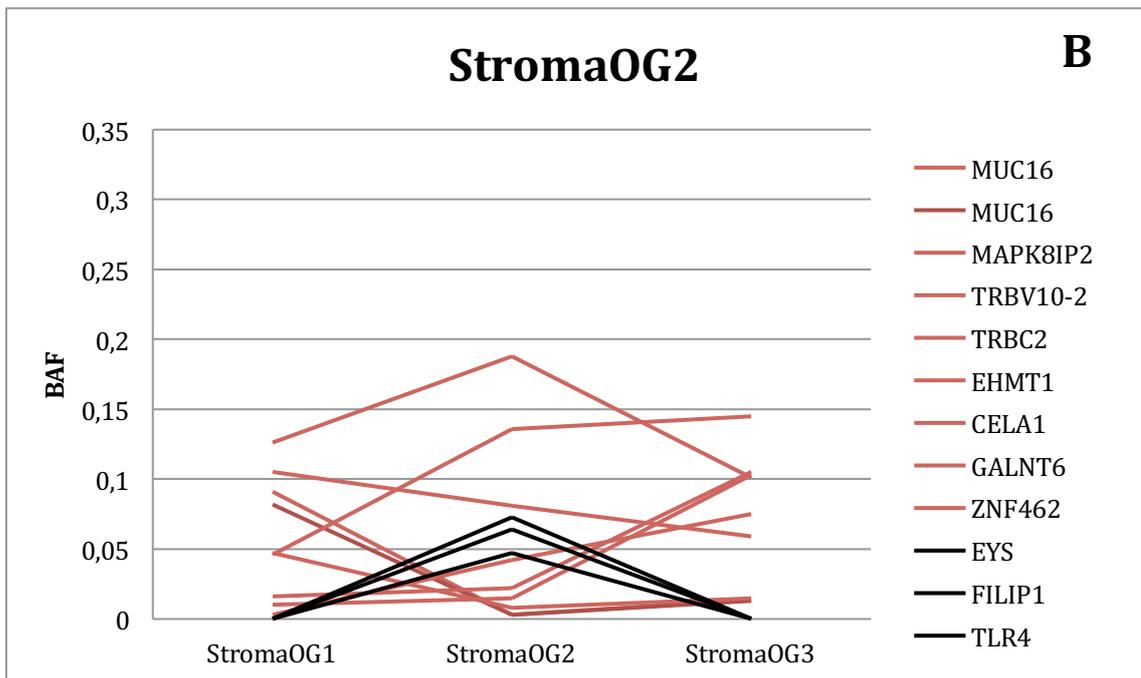
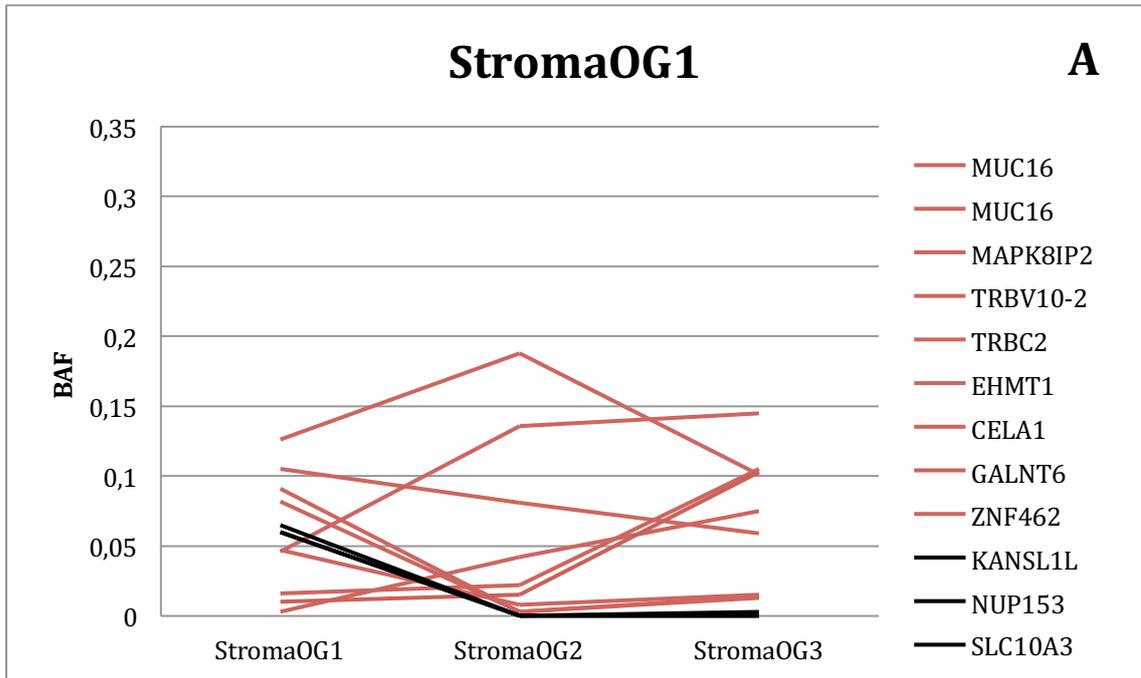
Abb. 17 A-C: Grafische Darstellung StromaOG 1-3

Auf der X-Achse sind StromaOG1 bis StromaOG3 dargestellt. Auf der Y-Achse sieht man die dazugehörige B-Allel Frequenz der einzelnen mutierten Gene. Die Gene sind hier zur besseren Unterscheidung in der Legende farbig dargestellt.

Wir können zeigen, dass die mesenchymalen Onkogenome mit 12/12/10 Mutationen in den Stroma-OG1/2/3 um ein vielfaches kleiner sind als die zuvor beschriebenen Onkogenome der Leukämiezellen. Außerdem zeigt sich die Variabilität der Anzahl von Mutationen innerhalb der Stroma-Onkogenome deutlich geringer ausgeprägt als in den Leukämie-Onkogenomen. So können in den Leukämie-Zellen in OG1 17 Mutationen und in OG3 bereits 62 mutierte Gene dargestellt werden, während die Stromazell-Onkogenome mit zwölf Mutationen in StromaOG1 und zehn Mutationen in StromaOG3 keine deutliche Variabilität aufweisen. Passend dazu finden wir, dass die Anzahl von neun kontinuierlichen Mutationen, die in StromaOG1 - StromaOG3 vorkommen, weitaus höher ist als die Anzahl von 3/3/0 nur in einem StromaOG isoliert zu detektierenden Mutationen. (Abb. 18 A-C) Auch dies steht im Kontrast zu dem Leukämie-Onkogenomen wo die weitaus größte Zahl von Mutationen isoliert in einem einzelnen Onkogenom auftritt (Abb. 7).

Zudem konnten die genetischen Veränderungen des Stromas ausschließlich in niedrigen Mutations-Frequenzen detektiert werden. Sie weisen eine maximale B-Allel Frequenz

von 0,188 im TRBC2-Gen aus. Die übrigen Mutationen befinden sich im niederfrequenten Bereich von 0,003 bis 0,15.



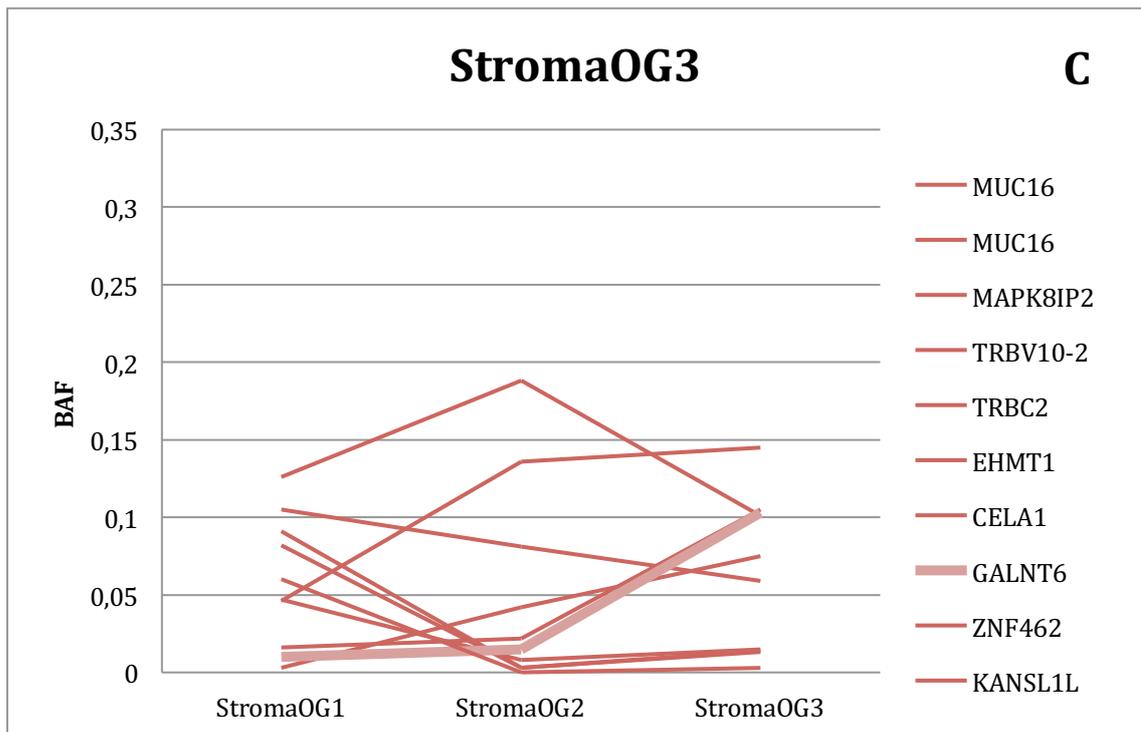


Abb. 18A-C: Darstellung der Gene, die kontinuierlich vs. isoliert in StromaOG 1-3 vorkommen

Auf der X-Achse sind StromaOG1 bis StromaOG3 dargestellt. Auf der Y-Achse sieht man die dazugehörige B-Allel Frequenz der einzelnen mutierten Gene. Die kontinuierlich-mutierten Gene sind in rot, die isoliert mutierten Gene in schwarz dargestellt.

3.6 Mutationen in MUC16 als Überschneidung zwischen Stroma- und Leukämie-Onkogenomen

Vorherige Daten weisen bereits darauf hin, dass Stromazellen eine multifaktorielle Rolle in der Entstehung einer kindlichen ALL spielen könnten. Von besonderem Interesse ist hier vor allem die Entstehung eines Rückfalls zu späteren Zeitpunkten der Erkrankung.

Daher sind in der vorliegenden Arbeit vor allem solche Mutationen von Interesse, die in Stromazell-Onkogenomen auftreten und dann zu einem späteren Zeitpunkt der Erkrankung in Leukämie-Onkogenomen vorzufinden sind.

In unseren vergleichenden WES-Datenanalysen konnten wir mit MUC16 tatsächlich ein Gen identifizieren, welches sowohl in StromaOG1-3 als auch in OG4 Mutationen aufweist (Abb. 19, Tabelle 14).

Gen	Chromosom	Start	Stop	Base ref.	Base mut.	OG
MUC16	19	9088943	9088943	C	A	OG4
MUC16	19	9000195	9000195	T	C	StromaB OG1-3
MUC16	19	9000210	9000210	C	T	StromaB OG1-3

Tabelle 14: Drei kodierende Mutationen im MUC16 Gen

Tabellarische Darstellung der drei kodierenden Mutationen im MUC16 Gen auf Chromosom 19. Die Mutationen sind jeweils mit ihrer genauen Position sowie des genauen Basenaustausches dargestellt. Base ref.= ursprüngliche Base; Base mut.= mutierte Base

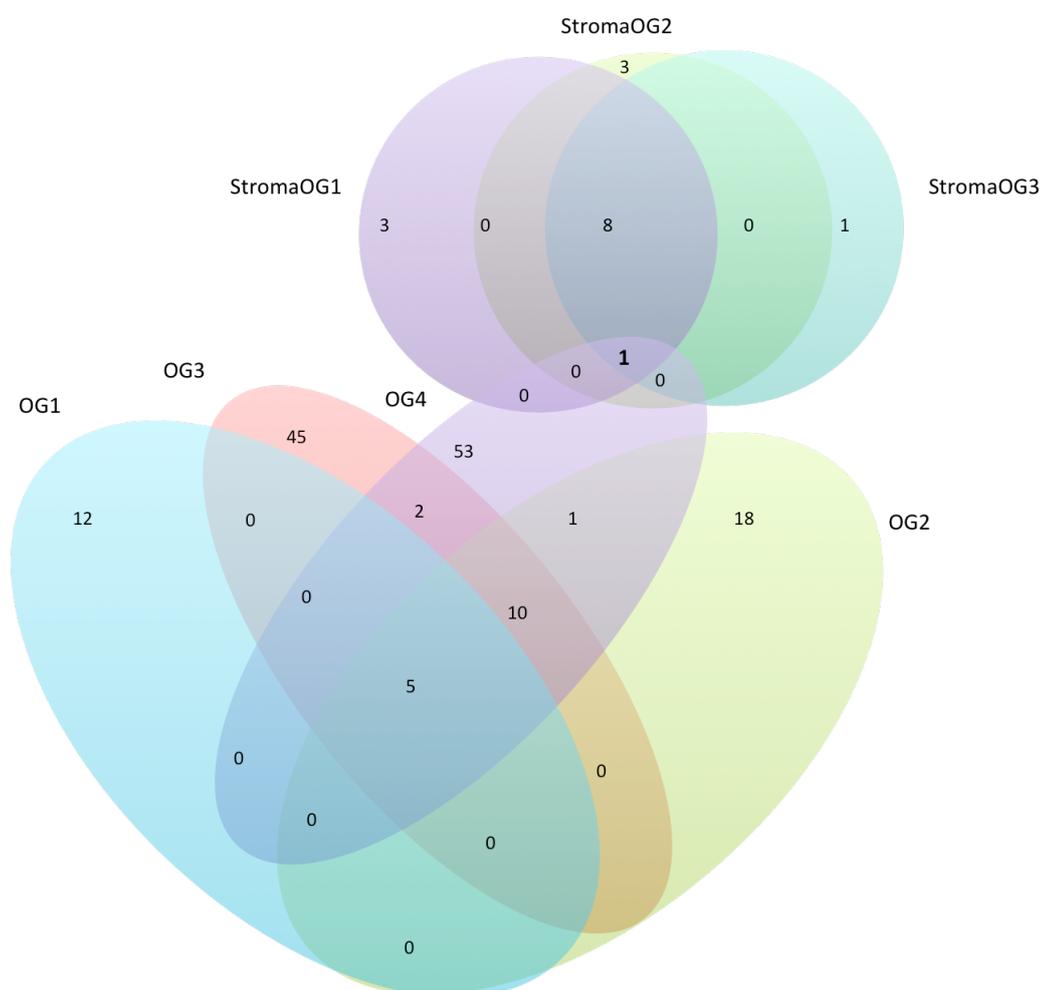


Abb. 19: Darstellung der Schnittmenge zwischen OG4 und StromaB OG1-3

Durch ein Venn-Diagramm werden die einzelnen Onkogenome und ihre Schnittmengen grafisch dargestellt. Die Zahlen geben hier die Anzahl der SNV innerhalb des jeweiligen Onkogenomes an.

Bei den detektierten SNVs handelt es sich um drei molekular verschiedene, somatische Mutationen innerhalb des bereits als *cancer gene* vorbeschriebenen MUC16 Gens. Die SNVs auf Position 9000195 und 9000210 erscheinen in allen drei Stroma-Onkogenomen, während die dritte Mutation (Position 9088943) isoliert in OG4 der Leukämiezellen, also im Rezidiv nach zweiter allo-SZT detektierbar ist. Zusammenfassend finden wir in unseren Daten somit keine gemeinsame, molekular identische Mutation zwischen Leukämie- und Stroma-Onkogenomen.

3.7 Sanger-Sequenzierung zur Validierung ausgewählter Gene

Neben den zuvor dargestellten bioinformatischen Analysen wurden weitergehende experimentelle Arbeiten durchgeführt. Um die Präsenz einzelner Mutationen im Patientenmaterial *in vitro* zu validieren wurden ausgewählte Gene aus den Proben nach zweiter allo-SZT = OG3 mittels Sanger-Sequenzierung untersucht. Hierzu wurde zum einen das Gen *MET* gewählt, zum anderen wurden die beiden weiteren *druggable genes* *NRG2* und *VHL* mit möglichst großer Frequenztiefe genutzt. Alle ausgewählten Mutationen konnten erfolgreich experimentell validiert werden. (Abb.14)

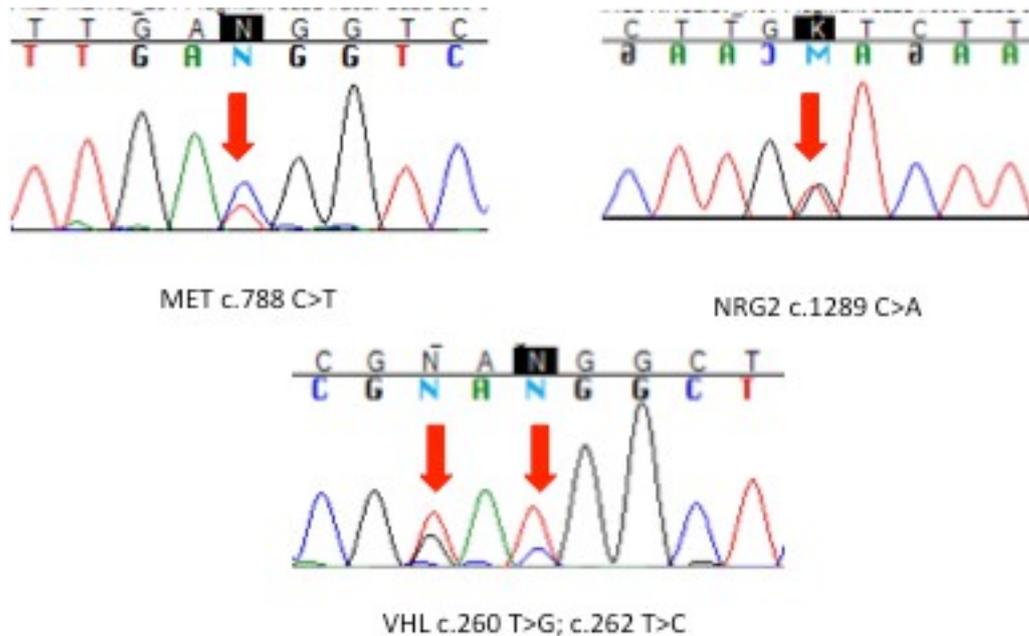


Abb. 14: Validierung ausgewählter Gene durch Sanger-Sequenzierung

Ausgewählte Mutationen wurden durch Sanger-Sequenzierung validiert. In der Abbildung werden die genauen Positionen der Basenpaare in den mutierten Genen gezeigt. Dabei werden Tyrosin in rot, Guanin in schwarz, Cytosin in blau und Adenosin in grün dargestellt.

3.8 Vorbereitung zur Klonierung sowie weiterer funktioneller Analysen

Nach der erfolgreichen experimentellen Validierung einzelner Mutationen sollte nun ein ausgewähltes, beim Patienten mutiertes *druggable gene* mittels funktioneller Analysen weitergehend charakterisiert werden. Hierfür wurde die bereits als krankheitsrelevant beschriebene Tyrosinkinase MET ausgewählt. Um eine potentielle proliferations-aktivierende Funktion des mutierten MET-Gens unseres Patienten zu untersuchen, wurde dieses zunächst isoliert, die patienten-spezifische Mutation eingebracht und dann in BAF/3-Zellen transferiert. Hierbei handelt es sich um murine IL-3 abhängige prä-B Zellen, die bei experimenteller Einbringung mutierter, proliferations-aktivierender Gene ihre IL-3 Abhängigkeit verlieren und sich daher besonders gut für die Analyse von Onkogenen eignen (48).

3.8.1 Isolation des MET Gens aus cDNA und anschließender Restriktionsverdau des Plasmids

Um das MET-Gen in ein PMC3-Transfer-Plasmid einzubringen und anschließend über eine Mutagenese aktivierende Mutationen in die BAF/3 Zellen zu überführen, isolierten wir RNA aus HEK Zellen und stellten über reverse Transkription cDNA her. Aus dieser cDNA konnte anschließend die kodierende Sequenz des MET-Gens, bestehend aus 4250 Basenpaaren, extrahiert werden. (Abb. 15)

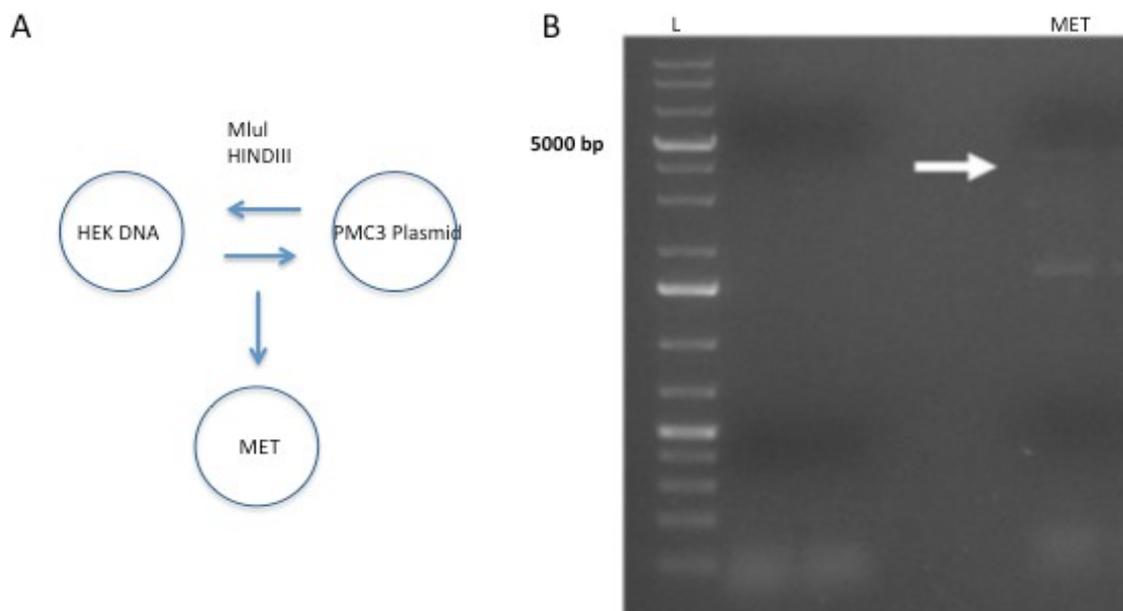


Abb. 15 A/B: Isolation des MET Gens aus cDNA

A; Aus HEK Zellen wurde RNA gewonnen und über eine reverse Transkription cDNA hergestellt. Diese wurde mit spezifischen Restriktionsenzymen MluI und HindIII geschnitten und die kodierende MET Sequenz extrahiert. B: Die kodierende Sequenz wird auf einem 1%-igen Argarosegel aufgetragen.

Über Restriktionsendonukleasen wurden die DNA-Moleküle sequenzspezifisch geschnitten. Das gewonnene DNA-Fragment konnte dann über eine Ligation in das PMC3-Plasmid eingebaut werden, um den Transfektionsvektor im nächsten Schritt über eine Mutagenese in die BAF/3 Zellen einbringen zu können. (Abb. 16A)

Um den erfolgreichen Einbau des Gens in das PMC3-Plasmid nachzuweisen, wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt und die Fragmente anschließend auf einem Argarosegel aufgetragen. (Abb. 16B). Des Weiteren wurde der Transfektionsvektor anschließend per Sanger-Sequenzierung validiert.

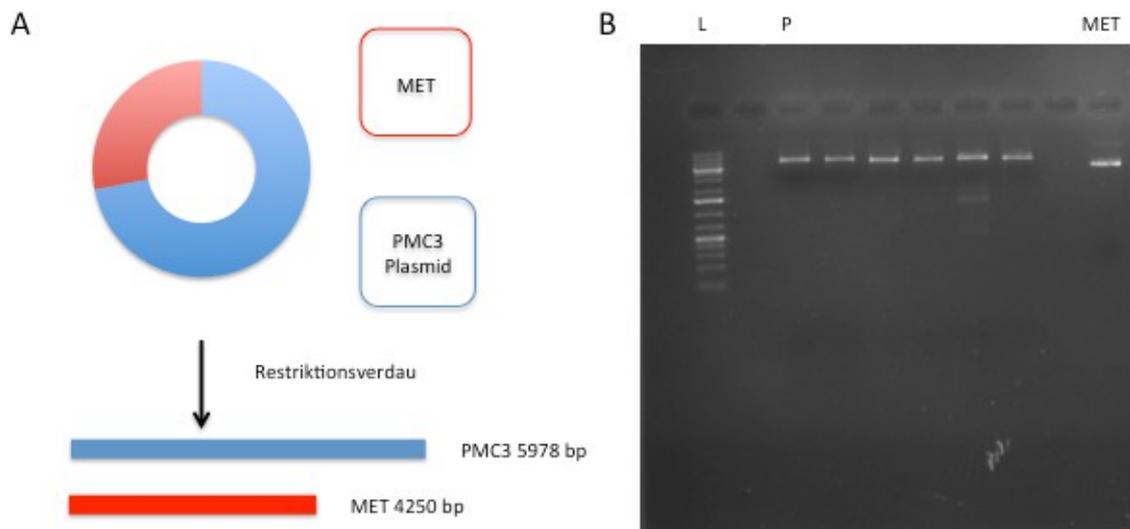


Abb. 16 A/B: Einbau des Gens in das Plasmid und anschließender Restriktionsverdau

A: Schematische Darstellung der Kontrolle des Restriktionsverbaus von MET und dem PMC3 Plasmid. Nach Verdau mit den Restriktionsenzymen MluI und HindIII ist das Fragment für MET 4250 bp und das Plasmid 5978 bp lang. B: Alle Fragmente wurden auf ein 1%-iges Argarosegel aufgetragen und aufgetrennt. L: Marker, MET, P: Plasmid

3.8.2 Mutagenese und Einbringen in BAF/3 Zellen

Um die spezifische MET-Mutation des untersuchten Patienten in den PMC3-Transfervektor einzubauen, wurden spezifische Primer hergestellt, die die gewünschten Mutationen enthalten. Diese wurden dann nach o.g. Methoden (Isolation, Restriktionsverdau und anschließende Ligation mit dem Vektor) über eine Mutagenese in den Vektor eingebracht. Die resultierenden Vektoren konnten mittels Sanger-Sequenzierung validiert werden.

Die hergestellten Vektoren sollten nun in einem weiteren Schritt über eine Nukleofektion in die bereits kultivierten BAF/3 Zellen eingebracht werden, um diese für weitere funktionelle Analysen nutzen zu können. Im Zuge dieser Arbeit ist es jedoch trotz wiederholter Versuche nicht gelungen den Vektor erfolgreich einzubringen und die BAF/3 Zellen anschließend zu kultivieren.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine horizontale Analyse aller im Exom abgebildeten Genveränderungen einer kindlichen Leukämie über vier Erkrankungsstadien hinweg sowohl auf Ebene der Leukämiezellen als auch auf Ebene der Stromazellen MSC durchgeführt. Daraus ergeben sich Möglichkeiten, verschiedenste Aspekte mit Blick auf die Entstehung von Leukämie-Rezidiven zu diskutieren sowie Ansatzpunkte für weitergehende Forschung und individueller Therapiekonzepte zu finden.

4.1 Hohe genetische Variabilität in den einzelnen Erkrankungsstadien

Wie in der Literatur beschrieben, ist das Spektrum somatischer Mutationen verschiedener kindlicher Leukämien sehr variabel und vor allem äußerst patientenindividuell (38). Dieser Effekt zeigte sich bezogen auf den zeitlichen Verlauf auch bei dem hier untersuchten Patienten: Nur fünf der insgesamt 147 in den vier Leukämien-Onkogenomen identifizierten Mutationen waren im gesamten Krankheitsverlauf detektierbar, alle anderen gefundenen Mutationen waren nur in einer bzw. einem Teil der Leukämie-Manifestationen präsent. (Abb. 10) Dies unterstreicht in besonderer Weise die hohe Dynamik genetischer Veränderungen der kindlichen ALL. Die ALL wird aktuell auf molekularer Ebene vor allem durch ihre Zellabstammung (B-/oder T-Zelle) oder durch ihre spezifischen Translokationen oder Aberrationen definiert (49,50). Hoell et al. konnten bereits zeigen, dass in einer Kohorte von 10 Patienten die genetische Variabilität im Krankheitsverlauf bis zum Zeitpunkt eines ersten Rezidivs nach allo-SZT sehr hoch ist (38). In der vorliegenden Arbeit kann erstmalig ein zweites Rezidiv nach zweiter allo-SZT eines Patienten umfassend genetisch charakterisiert und mit den vorherigen drei Leukämie-Manifestationen verglichen werden (Abb. 7). Hier zeigte sich, dass auch die Leukämie eines Patienten von Initialerkrankung über jeweils zwei Rückfälle nach zwei allogenen Stammzelltransplantationen eine erhebliche genetische Vielfalt und Individualität aufweist. Bei einem Therapieansatz, der sich auf patienten-individuelle Therapien nach vorherigem *WES* konzentriert, ist also das jeweils aktuellste Erkrankungsstadium zu betrachten.

4.2 Mutations-Cluster bilden die Dynamik der kindlichen Leukämie ab

Aktuell werden sowohl in B-Zell als auch in T-Zell Leukämien vor allem einzelne mutierte Gene, wie zum Beispiel *NT5C2*, *FLT3* oder *TP53* als Grund für eine Inaktivierung der Chemotherapeutika und das schlechte Ansprechen der Therapie in der Rezidivsituation genannt (51,52). Allerdings gewinnt die Betrachtung der Klonalität von Leukämiezellen immer mehr an Bedeutung (38,53). Mit der Berechnung von *Mutations-Clustern* konnte in der vorliegenden Arbeit bis zum Zeitpunkt des zweiten Rezidivs nach zweiter SZT die klonale Evolution der Leukämiezellen beschrieben werden. Es gelingt somit, die klonale Dynamik über den gesamten Zeitraum der Erkrankung detailliert darzustellen. Ma et al. konnten bereits zeigen, dass die Dynamik einzelner Klone verantwortlich sein kann für das Auftreten späterer Rezidive (53). In der vorliegenden Promotionsarbeit können wir zeigen, dass einige *Mutations-Cluster* in frühen Krankheits-Zeitpunkten in sehr niedriger Frequenz, also subklonal auftreten, um dann später in deutlich höherer Frequenz wieder zu erscheinen (Abb. 12). Es treten also kleine Subklone aus der Ersterkrankung nach zwei SZTs trotz zwischenzeitlichem Erreichen einer vollständigen Remission im zweiten Rezidiv wieder auf. Eine subklonale Mutation entzieht sich somit der Transplantation mit der zugehörigen hochdosierten Chemo-Therapie sowie immunologischen Attacke durch das Spender-Immunsystem, um dann später als führender Klon wieder aufzutreten.

Schon Hoell et. al zeigten, dass es bei 10 unterschiedlichen Probanden einen sehr dynamischen Verlauf der einzelnen Leukämie-Klone gab (38). Wir können dieses Ergebnis für unseren Patienten bis zum Zeitpunkt des zweiten Rückfalls nach SZT ebenfalls nachvollziehen (Abb. 12, Tabelle 9-12).

4.3 Welche Rolle spielen die MSC in der Entstehung von ALL Rezidiven?

Neben der leukämischen Plastizität und der damit verbundenen klonalen Evolution der leukämischen Blasten existieren Arbeiten, die Stromazellen des Knochenmarkes einen wesentlichen Einfluss bei der Entstehung und Entwicklung einer Leukämie zuschreiben. Bisher wurden die leukämogene Rolle von MSC vor allem in Hinblick auf die AML und das MDS untersucht. Hier konnten konkrete Hinweise gefunden werden, dass die MSC maßgeblich an der malignen Entartung hämatopoetischer Zellen beteiligt sind (31,33). Lediglich zwei Arbeitsgruppen beschäftigten sich bis dato mit MSC und der

kindlichen ALL. *Menendez et al.* (36) zeigen, dass bei 38 untersuchten Patienten mit unterschiedlichen Leukämie-Typen in allen Proben mit MLL-AF4+ proB-ALL das entsprechende Fusions-Gen auch in MSC-Zellen des Knochenmarks nachgewiesen werden konnte. Bei gleichzeitig fehlenden monoklonalen Ig-Genumlagerungen in den untersuchten MSC konnte eine Dedifferenzierung von MLL-AF4+ Blasten hin zu MSCs nahezu ausgeschlossen werden. Diese Befunde lassen eine Entstehung der MLL-AF4-Translokation in einer Population von frühen Vorläufer-Zellen vermuten, die noch das Potential aufweisen zu mesenchymalen Stromazellen (MSC) sowie hämatopoetischen Zellen der proB-ALL zu differenzieren (36). *Shalpour et al.* konnten ebenfalls identische genetische Translokationen in Leukämiezellen und MSC von pädiatrischen ALL-Patienten finden (35).

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden nun erstmalig Knochenmark-MSCs mittels WES untersucht, um somit einen direkten Vergleich zwischen mesenchymaler und leukämischer Zellreihe auf Exom-Ebene herzustellen.

Mit den hier gezeigten Ergebnissen können also weitere mögliche Hinweise für eine Rolle der MSC in der Entstehung und Entwicklung der kindlichen ALL diskutiert werden. Vor allem kann in Zukunft die Untersuchung der beiden Zellreihen auf Exom-Ebene im Rahmen größerer Kohorten interessant sein.

4.4 Es existieren Ähnlichkeiten zwischen Leukämiezellen und MSC auf Genebene

Um die zuvor diskutierte Bedeutung der MSC im Knochenmark sowohl den Ursprung maligner Erkrankungen als auch der Entstehung von Rezidiven betreffend besser verstehen zu können wurden erstmals vergleichende Analysen zwischen Leukämieblasten- und Stromazellen auf Exomebene durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass deutliche Unterschiede zwischen den Mutations-Spektren in Stromazellen und Leukämiezellen im Verlauf einer ALL existieren. So sind in den drei Onkogenomen der MSC lediglich zehn (StromaOG3) bzw. zwölf (Stroma OG1-2) Mutationen zu detektieren (Abb. 17-18). Von diesen treten neun in allen drei Onkogenomen auf. Diese Mutationen sind alle niederfrequent mit einer maximalen B-Allel Frequenz von 0,003 bis 0,188 nachzuweisen, wohingegen die Frequenzen der Leukämie-Mutationen mit einer maximalen B-Allel Frequenz von 0,917 deutlich höher liegen. Außerdem ist die Anzahl der Mutationen, die isoliert nur in einem StromaOG

vorkommen mit $n=1-3$ deutlich kleiner als die kontinuierlich detektierten Mutationen ($n=9$; Abb. 18). Dies unterstreicht die deutlich niedrigere Heterogenität der MSC-Mutationen im Verlauf einer Erkrankung und lässt vermuten dass die MSC über die einzelnen Erkrankungszeitpunkte deutlich weniger mutagene Variabilität und Evolution erfahren. Auch wenn in dieser Arbeit mit einem Patienten selbstverständlich keine repräsentative Kohorte vorliegt, kann dies jedoch maßgebend für weitere Arbeiten und die Untersuchung größerer Patientenkohorten sein.

4.5 Entstehen späte ALL-Rezidive aus frühen Vorläufer-Zellen mit bilineärem, mesenchymalen und hämatopoetischem Differenzierungspotential?

Um nun möglicherweise die Bedeutung der Knochenmark-MSCs bei der Entstehung von ALL-Rezidiven besser verstehen zu können, sind besonders die Gemeinsamkeiten bzw. Überschneidungen zwischen StromaOG und Leukämie- OG von Interesse.

Hier konnte mit MUC16 ein Gen gefunden werden, welches sowohl in allen StromaOG als auch in OG4 in mutierter Form zu finden war.

Bei MUC16 handelt es sich um ein Gen aus der Familie der Mucine. Es befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 19, genauer p19 13.3. Erstmals beschrieben wurde es durch Yin et al. bei der ersten Sequenzierung eines cDNA-Klons des schon länger bekannten Glykoproteins CA-125 (54,55). Dieses Antigen wird (im Serum gemessen) als Tumormarker vor allem für Ovarialkarzinome genutzt. Es kann jedoch auch bei anderen intestinalen Malignomen erhöht sein. In neuen Studien konnten Li et al. zeigen, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen Mutationen innerhalb von MUC16 und der Tumormutationslast sowie klinischem *Outcome* in Adenokarzinomen des Magens besteht (56). Die wesentliche Funktion von MUC16 besteht in der Bildung einer Barriere innerhalb der Epithelzellen zur Abwehr von Krankheitserregern (57).

Alle drei in dieser Arbeit identifizierten MUC-Mutationen liegen in kodierenden Teilen innerhalb des MUC16 Gens. Es handelt sich jedoch bei den in den Stroma-Onkogenomen sowie dem Leukämie-Onkogenom identifizierten SNVs nicht um dieselben Mutationen (Tabelle 14). In der vorliegenden Arbeit konnte somit keine gemeinsame somatische Mutation in MSC und Leukämiezellen gefunden werden, die auf eine Rolle von MSCs bzw. einer frühen Vorläuferzelle mit bilineärem,

mesenchymalen und hämatopoetischen Differenzierungspotential in der Entstehung von Leukämie Rezidiven hinweist.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich das genetische Muster der MSC-Onkogenome und der Leukämie-Onkogenome deutlich voneinander unterscheidet. Es zeigt sich lediglich ein gemeinsames mutiertes Gen in beiden Zellreihen. Es bleibt somit für weitere Untersuchungen die Frage, ob es überhaupt Mutationen gibt, die sowohl die MSC- als auch die Leukämie-Zellreihe betreffen. Inhalt weiterer Untersuchungen könnte sein, inwieweit sich dieses Muster auch in größeren Patientenkohorten wiederfinden lässt.

Abschließend konnten wir in dieser Promotionsarbeit die leukämische Plastizität eines Patienten anhand umfassender Daten und Untersuchungen aufzeigen und vor allem die klonale Evolution der Blastenzellen und damit die Bedeutung der separaten Betrachtung jedes Erkrankungsstadiums für potentielle patienten-individuelle Therapien deutlich machen.

Schlussfolgernd können wir mit den vorliegenden Ergebnissen keine direkte Verbindung zwischen beiden Zellreihen auf Exom-Ebene zeigen, die passend zu vorherigen Arbeiten eine Rolle der MSC in der Entstehung später Leukämie-Rezidive vermuten lässt. Der Vergleich der Mutations-Spektren von Leukämie-Zellen und MSCs über verschiedenen Leukämie-Krankheitsmanifestationen erbrachte keinen Hinweis für die Beteiligung der MSC an der Entstehung einer kindlichen ALL, lässt jedoch Spielraum für weitere Untersuchungen in größeren Patienten-Kollektiven.

5 Literaturverzeichnis

1. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*. 7. Februar 1997;**88**(3):287–98.
2. Huguley CM. An Overview of the Hematopoietic System. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, Butterworths; 1990, Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK252/>
3. Till JE, McCULLOCH et al. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. Februar 1961;**14**:213–22.
4. Godin I. 8 - Ontogeny of the Hematopoietic System. In: Baldock R, Bard J, Davidson DR, Morriss-Kay G, Boston: Academic Press; 2016. S. 111–20. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128000434000087>
5. Civin CI et al. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol Baltim Md* 1950. Juli 1984;**133**(1):157–65.
6. Naegeli O. Ueber rothes Knochenmark und Myeloblasten. *DMW - Dtsch Med Wochenschr*. Mai 1900;**26**(18):287–90.
7. Assessment UENC for E. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2009. Verfügbar unter: https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference_id/786623
8. Bene MC et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. Oktober 1995;**9**(10):1783–6.
9. Arber DA et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;**127**(20):2391-2405. *Blood*. 21. Juli 2016;**128**(3):462–3.
10. Pui CH et al., Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20. September 2015;**33**(27):2938–48.
11. Den Boer ML et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol*. Februar 2009;**10**(2):125–34.
12. Szczepański T et al. Minimal residual disease in leukaemia patients. *Lancet Oncol*. Juli 2001;**2**(7):409–17.

13. van Dongen JJ et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet Lond Engl.* 28. November 1998;**352**(9142):1731–8.
14. Eckert C et al. Use of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation based on minimal residual disease response improves outcomes for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia in the intermediate-risk group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20. Juli 2013;**31**(21):2736–42.
15. Tallen G et al. Long-term outcome in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia after time-point and site-of-relapse stratification and intensified short-course multidrug chemotherapy: results of trial ALL-REZ BFM 90. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10. Mai 2010;**28**(14):2339–47.
16. Peters C, et al. Stem-cell transplantation in children with acute lymphoblastic leukemia: A prospective international multicenter trial comparing sibling donors with matched unrelated donors-The ALL-SCT-BFM-2003 trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10. April 2015;**33**(11):1265–74.
17. Kuhlen M et al. Outcome of relapse after allogeneic HSCT in children with ALL enrolled in the ALL-SCT 2003/2007 trial. *Br J Haematol.* Januar 2018;**180**(1):82–9.
18. Schrauder A et al. Superiority of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation compared with chemotherapy alone in high-risk childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: results from ALL-BFM 90 and 95. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20. Dezember 2006;**24**(36):5742–9.
19. Laetsch TW et al. Patient-reported quality of life after tisagenlecleucel infusion in children and young adults with relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukaemia: a global, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* Dezember 2019;**20**(12):1710–8.
20. U. Krug HS. Therapie der AML mit neuen Substanzen. 1. Juli 2008; Verfügbar unter: <https://www.onkodin.de/e2/e51675/e53188/e53305>
21. Was gibt es Neues bei akuten Leukämien im Kindesalter [Internet]. pädiatrie schweiz. 2020. Verfügbar unter: <https://www.paediatricschweiz.ch/was-gibt-es-neues-bei-akuten-leukaemien-im-kindesalter/>
22. Worst BC et al. Next-generation personalised medicine for high-risk paediatric cancer patients - The INFORM pilot study. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2016;**65**:91–101.
23. Greaves M et al. Clonal evolution in cancer. *Nature.* 18. Januar 2012;**481**(7381):306–13.
24. Tzoneva G et al. Clonal evolution mechanisms in NT5C2 mutant-relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature.* 25. Januar 2018;**553**(7689):511–4.

25. Tavassoli M, Crosby WH. Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science*. 5. Juli 1968;**161**(3836):54–6.
26. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. September 1991;**9**(5):641–50.
27. Pittenger MF et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*. 2. April 1999;**284**(5411):143–7.
28. Dominici M et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;**8**(4):315–7.
29. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 16. Januar 2014;**505**(7483):327–34.
30. Greenbaum A et al. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature*. 14. März 2013;**495**(7440):227
31. Raaijmakers MHGP et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature*. 8. April 2010;**464**(7290):852–7.
32. Blau O et al. Mesenchymal stromal cells of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients have distinct genetic abnormalities compared with leukemic blasts. *Blood*. 17. November 2011;**118**(20):5583–92.
33. Geyh S et al. Functional inhibition of mesenchymal stromal cells in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. März 2016;**30**(3):683–91.
34. Schroeder T et al. Mesenchymal stromal cells in myeloid malignancies. *Blood Res*. Dezember 2016;**51**(4):225–32.
35. Shalapour S, et al Leukemia-associated genetic aberrations in mesenchymal stem cells of children with acute lymphoblastic leukemia. *J Mol Med Berl Ger*. März 2010;**88**(3):249–65.
36. Menendez P et al. Bone marrow mesenchymal stem cells from infants with MLL-AF4+ acute leukemia harbor and express the MLL-AF4 fusion gene. *J Exp Med*. 7. Dezember 2009;**206**(13):3131–41.
37. Primer3 Input Verfügbar unter: <https://primer3.ut.ee/>
38. Hoell JI et al. Pediatric ALL relapses after allo-SCT show high individuality, clonal dynamics, selective pressure, and druggable targets. *Blood Adv*. 22 2019;**3**(20):3143–56.
39. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinforma Oxf Engl*. 1. März 2010;**26**(5):589–95.

40. Duraku LS et al. Re-innervation patterns by peptidergic Substance-P, non-peptidergic P2X3, and myelinated NF-200 nerve fibers in epidermis and dermis of rats with neuropathic pain. *Exp Neurol*. März 2013;**241**:13–24.
41. Gomes B, et al. Variations in the quality and costs of end-of-life care, preferences and palliative outcomes for cancer patients by place of death: the QUALYCARE study. *BMC Cancer*. 2. August 2010;**10**:400.
42. DePristo MA, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet*. Mai 2011;**43**(5):491–8.
43. McLaren W, et al. The consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. *Bioinforma Oxf Engl*. 15. August 2010;**26**(16):2069–70.
44. Adzhubei IA, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. April 2010;**7**(4):248–9.
45. Kumar P, et al. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;**4**(7):1073–81.
46. Cibulskis K, et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol*. März 2013;**31**(3):213–9.
47. Koboldt DC, et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res*. März 2012;**22**(3):568–76.
48. Warmuth M, et al. Ba/F3 cells and their use in kinase drug discovery. *Curr Opin Oncol*. Januar 2007;**19**(1):55–60.
49. Mullighan CG, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 12. April 2007;**446**(7137):758–64.
50. Fischer U, et al. Genomics and drug profiling of fatal TCF3-HLF-positive acute lymphoblastic leukemia identifies recurrent mutation patterns and therapeutic options. *Nat Genet*. September 2015;**47**(9):1020–9.
51. Tzoneva G, et al. Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL. *Nat Med*. März 2013;**19**(3):368–71.
52. Meyer JA, et al. Relapse specific mutations in NT5C2 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. März 2013;**45**(3):290–4.
53. Ma X, et al. Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun*. 19. März 2015;**6**:6604.
54. Yin BW, Lloyd KO. Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem*. 20. Juli 2001;**276**(29):27371–5.

55. Yin BWT, Dnistrian A, Lloyd KO. Ovarian cancer antigen CA125 is encoded by the MUC16 mucin gene. *Int J Cancer*. 10. April 2002;**98**(5):737–40.
56. Li X, Pasche B, Zhang W, Chen K. Association of MUC16 Mutation With Tumor Mutation Load and Outcomes in Patients With Gastric Cancer. *JAMA Oncol*. 1. Dezember 2018;**4**(12):1691–8.
57. Argüeso P, et al. Mucin characteristics of human corneal-limbal epithelial cells that exclude the rose bengal anionic dye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Januar 2006;**47**(1):113–9.

Danksagung

Diese Arbeit entstand in der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie. Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern, insbesondere den Mitgliedern des KMT-Labors für die Hilfe bei der Ausführung der praktischen Arbeiten.

Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Roland Meisel für die Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meiner Betreuerin PD Dr. med. Jessica Höll, die trotz der räumlichen Distanz einen wesentlichen Teil zur Ausführung und Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Ein besonderes Dankeschön gilt meiner Familie, Freunden und vor allem meinem Ehemann. Für Geduld, Verständnis und Motivation.