

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

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. Arndt Borkhardt

**Identifikation potentiell tumorprädisponierender
struktureller Varianten in der Keimbahn von an Krebs
erkrankten Kindern**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Marie Chantal Jung

2026

Angabe der Gutachter*innen

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

gez.:

Dekan*in: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter*in: Prof. Dr. Arndt Borkhardt

Zweitgutachter*in: Prof. Dr. Tobias Marschall

Für Leon und für Matthias

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Rabea Wagener, Danielle Brandes, Marie Jung, Maxim A Huetzen, Anke K Bergmann, Stephanie Panier, Daniel Picard, Ute Fischer, Ron D Jachimowicz, Arndt Borkhardt, Triantafyllia Brozou (2023), „*Optical genome mapping identifies structural variants in potentially new cancer predisposition candidate genes in pediatric cancer patients*“, International Journal of Cancer, (Volume 154), Seite 607-614

Zusammenfassung

Krebserkrankungen zählen zu den häufigsten Todesursachen im Kindesalter. Während bei Erwachsenen Faktoren des allgemeinen Lebensstils wesentlich zur Tumorentstehung beitragen, spielen sie bei Kindern eine deutlich geringere Rolle. Frühere Studien zeigten bei 5–10% der pädiatrischen Patient*innen eine pathogene oder wahrscheinlich pathogene Keimbahnveränderung auf Einzelnukleotid-Ebene. Die Bedeutung von strukturellen Varianten (SVs) in diesem Kontext blieb bisher unklar.

In dieser Arbeit wurde mittels Optischer-Gesamt-Genomkartierung das Genom von 29 an Krebs erkrankten Kindern mit auffälligem klinischen Phänotyp oder auffälliger Anamnese, jedoch ohne nachweisbare pathogene Einzelnukleotidvariante (SNV) oder Insertion/Deletion von <50 bp Länge (indel) untersucht.

Soweit möglich, wurden auch Elternproben analysiert. Insgesamt wurden 67 Proben (7 Einzel-Analysen, 6 Duo-Analysen, 16 Trio-Analysen) ausgewertet, SVs mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Einzelnukleotidpolymorphismen-Array (SNP-Array) validiert und Genexpressionsanalysen durchgeführt.

Es wurden 1534 SVs identifiziert (im Mittel $53 \pm 21,8$ SVs pro Fall): 60,5% Deletionen, 35,4% Insertionen, 3,8% Duplikationen und 2 Inversionen. 90,9% waren heterozygote Varianten und 4 de novo entstanden. Die Mehrheit war intergenisch (54,2%) oder intronisch (19,7%) lokalisiert. 26,0% überlappten potentiell mit kodierenden Exonen. 13 SVs betrafen bekannte Krebsprädispositionsgene (KPG), ohne als pathogen eingestuft zu werden.

Bei einem Kind mit atypischem teratoiden/rhabdoiden Tumor (ATRT) und Fußmalformationen, passend zum klinischen Phänotyp des Rubinstein-Taybi-Syndroms, wurde eine Insertion im zweiten Intron des *CREBBP*-Gens identifiziert. Diese wurde nach weiterführenden Untersuchungen als wahrscheinlich benigne eingeschätzt.

Darüber hinaus wurden einige interessante SVs in Kandidatengenomen detektiert, die potentiell neuen KPGs entsprechen. Dazu zählen eine Deletion im *MSR1*-Gen im Genom von zwei Schwestern mit einem Astrozytom bzw. Hodgkin-Lymphom, eine Deletion eines *DKK1*-Enhancers bei einer Patientin, die an einem SHH-aktivierten Medulloblastom erkrankt war, sowie eine *SPRED1*-Enhancer-Deletion bei einem Kind mit Optikusgliom und Café-au-lait-Flecken. Dieses Projekt erweitert das Untersuchungsspektrum der prädisponierenden genetischen Keimbahnveränderungen um strukturelle Veränderungen und trägt somit zum Verständnis der genetischen Grundlage von Krebserkrankungen bei. Es wurden neue potentielle KPGs detektiert. Dies hat Relevanz für die zukünftige Diagnostik und Therapie von Krebserkrankungen im Kindes- und Jugendalter.

Abstract

Cancer is one of the most common causes of death in children. While environmental factors play a significant role in the development of tumors in adults, their role is less significant in children. Previous studies have shown that 5–10% of pediatric patients have a pathogenic or likely pathogenic germline mutation at the single nucleotide level. The significance of structural variants (SVs) in this context has remained unclear.

In this study, the genomes of 29 children with cancer and a striking clinical phenotype or medical history, but without detectable pathogenic single nucleotide variants (SNVs) or insertions/deletions (<50 bp in length, indels), were examined using Whole Genome Optical Mapping. Where possible, parental samples were also analyzed. A total of 67 samples (7 single, 6 duo and 16 trio analyses) were evaluated, SVs were validated using PCR and single nucleotide polymorphism arrays (SNP arrays), and gene expression analyses were performed. A total of 1534 SVs were identified (an average of 53 ± 21.8 SVs per case): 60.5% deletions, 35.4% insertions, 3.8% duplications, and 2 inversions. 90.9% were heterozygous variants and 4 were de novo. The majority were located intergenically (54.2%) or intronically (19.7%). 26.0% potentially overlapped with coding exons. 13 SVs affected known cancer predisposition genes (CPGs) without being classified as pathogenic.

In a child with atypical teratoid/rhabdoid tumor (ATRT) and foot malformations consistent with the clinical phenotype of Rubinstein-Taybi syndrome, an insertion was identified in the second intron of the *CREBBP* gene. Following further investigation, this was assessed as likely to be benign.

In addition, some interesting SVs were detected in candidate genes that potentially correspond to new CPGs. These include a deletion in the *MSR1* gene in two sisters with astrocytoma and Hodgkin's lymphoma, a deletion of an enhancer of the Wnt inhibitor *DKK1* in a patient with SHH-activated medulloblastoma, and a *SPRED1* enhancer deletion in a child with optic glioma and café-au-lait spots.

This project expands the range of investigations into predisposing genetic germline mutations to include structural variants, thereby contributing to our understanding of the genetic basis of cancer. New potential CPGs have been detected. This is relevant for the future diagnosis and treatment of cancer in children.

Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute myeloische Leukämie
B-ALL.....	Akute lymphatische Leukämie der B-Zellreihe
BMNC.....	Mononukleäre Zellen des Knochenmarks
CALM.....	Café-au-lait-Flecken
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CGH.....	vergleichende genomische Hybridisierung
CNV	Kopienanzahlvariante
Ct	Schwellenwertzyklus
DLE-1	<i>Direct Label</i> Enzym 1
DLS	Direct Label and Stain
DTT	Dithiothreitol
EDTA.....	Ethylendiamintetraessigsäure
FISH.....	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
HCC	hepatozelluläres Karzinom
hg19.....	GRCh37-Referenzgenom
hg38.....	GRCh38-Referenzgenom
HS	<i>High sensitivity</i>
indel	Insertion/Deletion mit einer Größe <50 bp
KPG	Krebsprädispositionsgen
KPS.....	Krebsprädispositionssyndrom
LBB	Lyse- und Bindungspuffer
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LRS.....	Long-Read-Sequenzierung
LS.....	Legius-Syndrom
MDS.....	Myelodysplastisches Syndrom
NF1	Neurofibromatose Typ 1
NGS.....	Next-Generation-Short-Read-Sequenzierung
PBMC.....	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS.....	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF.....	Phenylmethylsulfonylfluorid
qPCR.....	quantitative Polymerasekettenreaktion
RLT	<i>RNeasy Lysis</i>
RN-ase.....	Ribonuklease
ROMA.....	Representational Oligonucleotide Microarray Analysis
RSTS.....	Rubinstein-Taybi-Syndrom
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus
SNV	Einzelnukleotidvariante
SV	Strukturelle Variante
T2T.....	Telomere-to-Telomere- Projekt
TAD.....	topologisch assoziierte Domänen
T-ALL.....	Akute lymphatische Leukämie der T-Zellreihe
TAM.....	tumorassoziierte Makrophagen

Tm.....	Schmelzpunkt
UV	Ultraviolett
VUS	Variante unklarer Signifikanz
WES.....	Gesamtexomsequenzierung
WGOM	Optische Gesamt-Genomkartierung
WGS	Gesamtgenomsequenzierung
ZNS.....	Zentrales Nervensystem

Im Folgenden wird die Abkürzung KPG für Krebsprädispositionsgen und den Genitiv (eines Krebsprädispositionsgens) sowie KPGs für die Mehrzahl (Krebsprädispositionsgene) verwendet. Ebenso gilt KPS für Krebsprädispositionssyndrom, den Genitiv (eines Krebsprädispositionssyndroms) und KPSs für den Plural (Krebsprädispositionssyndrome). Für strukturelle Variante wurde die Abkürzung SV und für die Mehrzahl (strukturelle Varianten) SVs gewählt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Krebserkrankungen.....	1
1.1.1	Ursachen von Krebserkrankungen	2
1.1.2	Onkogene und Tumorsuppressorgene	5
1.1.3	<i>Hallmarks of Cancer</i>	6
1.2	Genetische Prädisposition für Krebserkrankungen im Kindes- und Jugendalter	8
1.2.1	Für Krebserkrankungen prädisponierende Syndrome	9
1.2.2	Kriterien, die auf eine genetische Krebsprädisposition hindeuten	10
1.3	Die Rolle struktureller Varianten in der Karzinogenese im Kindesalter	13
1.3.1	Einteilung struktureller Varianten	13
1.3.2	Genetische Varianten als Ursache von Krebserkrankungen im Kindesalter	14
1.4	Methoden zum Nachweis struktureller Varianten	16
1.5	Ziele der Arbeit.....	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.1.1	Die Kohorte der Patient*innen	20
2.1.2	Zelllinien für die Verifizierung der strukturellen Varianten	22
2.1.3	Primer für die Verifizierung der strukturellen Varianten	23
2.1.3.1	Primer für den Nachweis der Deletion in <i>MSR1</i>	23
2.1.3.2	Primer für den Nachweis der Deletion in <i>SPRED1</i>	24
2.1.3.3	Primer für die Echtzeit-Polymerasekettenreaktionen	24
2.1.4	Chemikalien und Reagenzien, Puffer und Lösungen	25
2.1.5	Kits.....	26
2.1.6	Instrumente und Ausstattung	26
2.1.7	Software	27
2.1.8	Online-Datenbanken	28
2.2	Methoden.....	29
2.2.1	Analyse von strukturellen Varianten durch optische Gesamt-Genomkartierung ..	29
2.2.1.1	Extraktion hochmolekularer DNA.....	29
2.2.1.2	Messung der DNA Konzentration durch Qubit dsDNA BR Assay	30
2.2.1.3	Markierung der hochmolekularen DNA.....	31

2.2.1.4	Beladung des Bionano Saphyr Chips	31
2.2.1.5	Qualitätskontrolle	32
2.2.1.6	Analyse der DNA und Prozessieren der Daten	33
2.2.1.7	Auswertung und Interpretation	35
2.2.2	Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion	40
2.2.2.1	RNA-Extraktion	40
2.2.2.2	Konzentrationsbestimmung der RNA	40
2.2.2.3	cDNA-Synthese	41
2.2.2.4	Polymerasekettenreaktionen	41
2.2.2.5	Touchdown-PCR	43
2.2.2.6	Long-range PCR	44
2.2.2.7	Agarose Gelelektrophorese	45
2.2.2.8	Aufreinigung der PCR-Produkte und Sanger-Sequenzierung	45
2.2.3	Analyse der Genexpression auf RNA-Ebene	47
2.2.3.1	Primer-Austestung	47
2.2.3.2	Quantitative Echtzeit-PCR	47
2.2.3.3	Austesten der Primer/Effizienzbestimmung	49
2.2.3.4	RNA-Sequenzierung	50
2.2.4	Gesamtexomsequenzierung	50
3	Ergebnisse	51
3.1	Klinik und Charakteristika der Patient*innen	51
3.1.1	Klinische Daten der Patient*innen	51
3.1.2	Charakteristika der Patient*innen als Hinweis auf das Vorliegen eines KPS	55
3.2	Übersicht über die detektierten strukturellen Varianten	57
3.2.1	Art, Zygote und Lokalisation der detektierten strukturellen Varianten	59
3.2.2	<i>De novo</i> entstandene strukturelle Varianten	60
3.3	Varianten, die für Krebserkrankungen prädisponierende Gene betreffen	64
3.3.1	Identifikation einer Insertion im Enhancer des <i>CREBBP</i> -Gens	71
3.4	Varianten, die Kandidatengene betreffen	74
3.4.1	Deletion des <i>MSR1</i> -Gensorts	74
3.4.2	Deletionen des <i>RASA4</i> - und <i>RASA4B</i> -Genlokus	78
3.4.3	Potentielle Deletion eines <i>DKK1</i> -Enhancers	83
3.4.4	Mögliche Deletion eines <i>SPRED1</i> -Enhancers	86
4	Diskussion	89

4.1	Klinische Merkmale und Charakteristika der Patient*innen.....	89
4.1.1	Geschlechtsspezifische Unterschiede der Inzidenz	89
4.1.2	Altersabhängige Unterschiede der Inzidenz	90
4.1.3	Inzidenz struktureller Varianten nach ethnischer Zugehörigkeit	92
4.1.4	Verteilung der Tumorarten in der Kohorte	93
4.1.5	Klinische Kriterien für das Vorliegen eines KPS.....	93
4.2	Gesamtübersicht der detektierten strukturellen Varianten	95
4.2.1	Strukturelle Varianten im Hinblick auf den Typ	95
4.2.2	Strukturelle Varianten in Bezug auf die Zygotie	96
4.2.3	Strukturelle Varianten im Kontext ihrer Lokalisation.....	96
4.2.4	Analyse der Gesamtheit der detektierten strukturellen Varianten.....	98
4.2.5	<i>De novo</i> entstandene strukturelle Varianten	99
4.3	Strukturelle Varianten, die KPGs betreffen	102
4.3.1	Eine Insertion im <i>MAP2K2</i> -Genlokus als Variante unklarer Signifikanz	102
4.3.2	Eine Deletion im <i>TP53</i> -Genort als benigne Variante	103
4.3.3	Eine Insertion im <i>CREBBP</i> -Genlokus als mögliche krebsprädisponierende Veränderung.....	103
4.3.4	Weitere intronische Varianten in Krebsprädispositionsgenen	105
4.3.5	Intergenisch lokalisierte Varianten, die Krebsprädispositionsgene betreffen können.....	108
4.4	Strukturelle Varianten, die Kandidatengene beeinflussen	109
4.4.1	Die potentiell krebsprädisponierende Wirkung einer Deletion im <i>MSR1</i> -Genlokus	109
4.4.2	Deletionen des <i>RASA4</i> - und <i>RASA4B</i> -Genlokus als mögliche krebsprädisponierende Veränderungen	112
4.4.3	Deletion eines <i>DKK1</i> -Enhancers mit potentieller Tumorprädisposition	115
4.4.4	Der mögliche krebsprädisponierende Effekt der Deletion eines <i>SPRED1</i> - Enhancers	117
4.5	Einordnung der optischen Gesamt-Genomkartierung und Ausblick	120

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Steuerung der Zellteilung durch Tumorsuppressor- und Proto-Onkogene.....	6
Abb. 2 Charakteristische Merkmale maligner Tumoren (<i>Hallmarks</i>)	8
Abb. 3 Kriterien, die das Vorliegen eines KPS wahrscheinlich machen.....	12
Abb. 4 Hochauflösende Untersuchung der DNA-Fragmente des gesamten Genoms.....	33
Abb. 5 Darstellung einer Deletion, Insertion, Duplikation und Inversion durch Bionano Genomics.....	34
Abb. 6 Lokalisation der Bruchpunkte am Beispiel einer Deletion auf Chr9 (q33.3) im ersten Intron des <i>PPP6C</i> -Gens	36
Abb. 7 Arbeitsschritte zur Überprüfung und Filterung der mittels WGOM detektierten SVs..	39
Abb. 8 Lineare Regression zur Berechnung der Primer-Effizienz	49
Abb. 9 Einteilung der Tumorentitäten der Patient*innen.....	53
Abb. 10 Positive klinische Charakteristika der Patient*innen	55
Abb. 11 Manuell überprüfte SVs.....	57
Abb. 12 Art der detektierten SVs	59
Abb. 13 Zygotie der detektierten SVs.....	60
Abb. 14 Lokalisation der detektierten SVs	60
Abb. 15 Vier <i>de novo</i> entstandene SVs in 16 Trio-Analysen.....	61
Abb. 16 <i>De novo</i> entstandene, ca. 4,8 kbp große Deletion auf Chr8 (p22) in dem Patienten P25, die Teile des <i>FGL1</i> -Gens umfasst.....	63
Abb. 17 Anzahl der mit einem KPG überlappenden SVs	64
Abb. 18 Lokalisation der mit einem KPG überlappenden SVs	64
Abb. 19 514 bp große Insertion auf Chr19 (p13.3) im Genom der Patientin P23, die potentiell mit dem ersten Exon des KPG <i>MAP2K2</i> überlappt.....	67
Abb. 20 WES-Abdeckung der Region um den Genlokus <i>MAP2K2</i> für die Patientin P23 und ihre Eltern	67
Abb. 21 >1,4 kbp große Deletion auf Chr17 (p13.1) in den Patienten P5 und P8, die einen Teil einer Transkriptvariante des KPG <i>TP53</i> umfasst	68
Abb. 22 3384 bp große Insertion auf Chr16 (p13.3) im Genom des Patienten P1, die im 2. Intron des KPG <i>CREBBP</i> lokalisiert ist	72
Abb. 23 Relative Expression der CREBBP-mRNA in Relation zu GUSB und HPRT1 in dem Patienten P1, dem ATRT-Gewebe und PBMC-Kontrollen	73
Abb. 24 Transformierte und normalisierte CREBBP-mRNA-Expressionsdaten in der ATRT-Probe des Patienten P1 und anderen ATRTs, untersucht durch mRNA-Sequenzierung	73
Abb. 25 Detektion einer >77,5 kbp Deletion auf Chr8 (p22) in den Patientinnen P9 und P10, die Teile des <i>MSR1</i> -Gens umfasst	75
Abb. 26 WES-Abdeckung der Region um das <i>MSR1</i> -Gen für die Patientinnen P9, P10 und deren Eltern	76

Abb. 27 Ergebnisse der Gel-Elektrophorese nach der Long-range PCR zur Identifikation des PCR-Produkts in den Proben der Patientinnen P9 und P10 mit der >77,5 kbp Deletion	77
Abb. 28 Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung zur Detektion der Bruchpunkte der Deletion, die Teile des <i>MSR1</i> -Gens umfasst, bei den Patientinnen P9 und P10.....	78
Abb. 29 98858 bp große Deletion auf Chr7 (q22.1) in dem Patienten P6, die das <i>RASA4B</i> -Gen umfasst	79
Abb. 30 Familienstammbaum des Patienten P16.....	80
Abb. 31 Ca. 96 kbp große Deletion auf Chr7(q22.1) in dem Patienten P16, die das <i>RASA4</i> -Gen umfasst	81
Abb. 32 Validierung der qPCR-Primer zur Expressionsanalyse von <i>RASA4</i> anhand von cDNA und gDNA aus Reh- und HEK293-Zellen	82
Abb. 33 555 bp große Deletion auf Chr10 (q21.1) in der Patientin P14 mit potentiellm Einfluss auf einen Enhancer des <i>DKK1</i> -Gens.....	83
Abb. 34 Relative Expression der <i>DKK1</i> -mRNA in Relation zu <i>GUSB</i> und <i>HPRT1</i> in der Patientin P14, ausgewählten Zelllinien, ihren Eltern und PBMC-Kontrollen	85
Abb. 35 2464 bp große Deletion auf Chr15 (q14) im Genom des Patienten P12 mit potentiellm Einfluss auf einen Enhancer des <i>SPRED1</i> -Gens	86
Abb. 36 Ergebnisse der Gel-Elektrophorese nach der Touchdown PCR zur Verifizierung der ca. 2,5 kbp großen Deletion in dem Patienten P12 und seiner Mutter (P12_M)	87
Abb. 37 Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung zur Detektion der Bruchpunkte der Deletion im Enhancer des <i>SPRED1</i> -Gens bei dem Patienten P12 und seiner Mutter (P12_M)	88
Abb. 38 <i>De novo</i> entstandene, mit einem KPG überlappende und andere detektierte SVs .	99
Abb. 39 In Populationsdatenbanken erfasste Deletionen in der untersuchten Region um den <i>MSR1</i> -Genlokus	111
Abb. 40 Funktion von <i>RASA4</i> und <i>RASA4B</i> als Ras-GTPase-aktivierendes Protein.....	113

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Patient*innen-Kohorte und die Analysearten	21
Tabelle 2 Zelllinien für die Verifizierung struktureller Varianten.....	22
Tabelle 3 <i>MSR1</i> -Primer	23
Tabelle 4 <i>SPRED1</i> -Primer.....	24
Tabelle 5 Primer für die qPCR.....	24
Tabelle 6 Chemikalien und Reagenzien, Puffer und Lösungen	25
Tabelle 7 Kits	26
Tabelle 8 Instrumente	26
Tabelle 9 Software	27
Tabelle 10 Online-Datenbanken und Algorithmen	28
Tabelle 11 Längen- und Konfidenzfilterkriterien.....	35
Tabelle 12 Reaktionsansatz zur Synthese von cDNA	41
Tabelle 13 Reaktionsansatz der PCR	42
Tabelle 14 Ablauf der PCR.....	42
Tabelle 15 Reaktionsansatz der Touchdown-PCR	43
Tabelle 16 Ablauf der Touchdown-PCR.....	43
Tabelle 17 Reaktionsansatz der Long-range PCR	44
Tabelle 18 Ablauf der Long-range PCR	44
Tabelle 19 Reaktionsansatz der BigDye Terminator Sequenzierung	46
Tabelle 20 Zyklusprogramm einer Sanger-Sequenzierung	46
Tabelle 21 Reaktionsansatz der quantitativen Echtzeit-PCR	48
Tabelle 22 Ablauf der quantitativen Echtzeit-PCR.....	48
Tabelle 23 Überblick über das Alter und Geschlecht der Patient*innen.....	51
Tabelle 24 Alter der Eltern zum Zeitpunkt der Geburt der Patient*innen	51
Tabelle 25 Anzahl der Geschwister der Patient*innen.....	52
Tabelle 26 Ethnische Herkunft der Eltern der Patient*innen	52
Tabelle 27 Tumorentitäten der Patient*innen.....	52
Tabelle 28 Überblick über Alter, Geschlecht, Tumorentität, Diagnose und Status der Patient*innen	54
Tabelle 29 kongenitale Anomalien, hämatologische und kutane Auffälligkeiten sowie Anomalien der Entwicklung und des Wachstums.....	56
Tabelle 30 Patient*innen mit Indikatortumoren für das Vorliegen eines KPS	57
Tabelle 31 Übersicht über die detektierten <i>de novo</i> entstandenen und mit einem KPG überlappenden SVs	58
Tabelle 32 Patient*innen mit <i>de novo</i> entstandenen SVs.....	61
Tabelle 33 <i>De novo</i> entstandene SVs.....	62
Tabelle 34 Mit einem KPG überlappende SVs.....	65

Tabelle 35 Patient*innen mit SVs, die mit KPGs überlappen	66
Tabelle 36 Übersicht über SVs mit Einfluss auf Kandidaten-KPGs.....	74
Tabelle 37 Die Patienten P6 und P16, bei denen Deletionen des <i>RASA4</i> - und <i>RASA4B</i> - Genlokus detektiert wurden.....	78
Tabelle 38 Auf ein KPS hinweisende Kriterien der Patient*innen	137
Tabelle 39 Qualitätskriterien und Referenzbereiche	138
Tabelle 40 Qualitätsdaten der WGOM-Ergebnisse der Patient*innen.....	139
Tabelle 41 Qualitätsdaten der WGOM-Ergebnisse der Mütter der Patient*innen	140
Tabelle 42 Qualitätsdaten der WGOM-Ergebnisse der Väter der Patient*innen	141
Tabelle 43 Anzahl der detektierten SVs vor bzw. nach manueller Überprüfung sowie Anzahl der SVs nach Typen	142
Tabelle 44 Zygotie der detektierten SVs	143
Tabelle 45 Lokalisation der SVs	144

1 Einleitung

1.1 Krebserkrankungen

Krebserkrankungen sind durch ein abnormales Wachstum und die unkontrollierte Proliferation transformierter Zellen definiert und von der Akkumulation multipler genetischer und epigenetischer Veränderungen geprägt. Solide Tumore können in umgebendes Gewebe infiltrieren und in andere Bereiche des Körpers streuen. Unbehandelt verlaufen sie letal (1, 2). Kapitel 1.1.3 beleuchtet die Mechanismen, durch die sich Krebszellen von gewöhnlichen Zellen unterscheiden.

Krebserkrankungen von Erwachsenen und Kindern unterscheiden sich in ihren Ursachen, ihrer Biologie und ihren Behandlungsansätzen. Während bei Kindern eine genetische Veranlagung naheliegt und die Tumore häufig aus sich falsch entwickelnden Geweben entstehen, sind Krebserkrankungen von Erwachsenen mit dem Alter, Lebensstil und Umwelteinflüssen assoziiert. Man geht u. a. davon aus, dass Tumorzellen im Kindesalter durch eine Blockade der normalen Entwicklungsreife in einem unreifen, undifferenzierten Zustand verharren, was sie resistenter gegenüber herkömmlichen Therapien macht. Im Gegensatz dazu entsteht Krebs bei Erwachsenen eher durch die Anhäufung genetischer Schäden in alternden Zellen (3, 4).

Weltweit erkranken ca. 430000 Kinder und Jugendliche im Alter von 0 bis 19 Jahren jährlich an Krebs (5). Die altersstandardisierte Inzidenzrate der 0–14-Jährigen lag 2020 global bei 10,5 und in Nationen mit hohem Einkommen höher als in Ländern mit mittlerem oder niedrigem Einkommen (6). Die Seltenheit maligner Erkrankung in diesen Altersgruppen bestätigt die bestehenden Erklärungsansätze der Karzinogenese bei Erwachsenen. Demnach akkumulieren genetische Veränderungen im Laufe der Zeit in Abhängigkeit von Umweltfaktoren (7). Die kumulative 5-Jahres-Überlebensrate aller Kinder und Jugendlichen mit Krebserkrankungen liegt in Ländern mit hohem Einkommen bei >80%, während sie in Nationen mit mittlerem oder niedrigem mittleren Einkommen <30% ist. Ziel der Weltgesundheitsorganisation bis 2030 ist ein 5-Jahres-Überleben von 60% für alle Kinder weltweit (5, 8).

In der Behandlung von Krebserkrankungen des Kindesalters muss auf eine Optimierung der Dosierung geachtet werden (4). Es stehen weniger etablierte Therapeutika zur Verfügung (7). Darüber hinaus stellt sich bei jungen Menschen die Frage nach Langzeitkomplikationen der Therapie. Sekundäre maligne Erkrankungen treten in 8–10% der Kinder auf, die aufgrund einer Krebserkrankung behandelt wurden (9, 10). Außerdem können die Nebenwirkungen, z. B. kognitive Einschränkungen, endokrinologische Störungen oder Verlust des Hörvermögens nach Radiatio bei ZNS-Tumoren, die Lebensqualität langfristig beeinflussen. Merchant et al. beschreiben eine höherer Sensitivität von Hirntumoren des Kindesalters gegenüber Strahlen- und Chemotherapie, wobei auch ein erhöhtes Risiko für langfristige Folgen beobachtet wird (11). Bei Erwachsenen kann das Risiko sekundärer maligner Erkrankungen und anderer Folgeerscheinungen in einigen Fällen zu vernachlässigen sein (7).

1.1.1 Ursachen von Krebserkrankungen

Es existieren verschiedene Einflüsse, die zu einer Krebsentstehung beitragen. Unterschieden werden elterliche Expositionen und Umweltbedingungen von diversen Faktoren des Kindes, zu denen u. a. Genetik und Epigenetik, aber auch persönliche und verhaltensbezogene Faktoren sowie Folgen medizinischer Behandlungen zählen. Die Akkumulation dadurch entstehender genetischer und epigenetischer Veränderungen führt zu genetischer Instabilität und damit zur Karzinogenese (1).

Keimbahnmutationen in KPGs sind bei Kindern im Vergleich zu Tumoren im Erwachsenenalter von großer Bedeutung. Relevant sind insbesondere Krebsprädispositionssyndrome (KPSs) des Kindesalters. Bei Patient*innen mit einem KPS konnte eine erbliche, pathogene Keimbahnvariante identifiziert werden. Für einen geringeren Anteil an Krebserkrankungen bei Kindern und Jugendlichen sind KPSs des Erwachsenenalters verantwortlich (12). Im Gegensatz zu Krebserkrankungen bei Erwachsenen zeigen sich in malignen Erkrankungen des Kindesalters weniger somatische Mutationen. Zuletzt wurden zudem immer mehr Erkenntnisse über die Rolle der Epigenetik in der Krebsprädisposition publiziert (13).

Im Erwachsenenalter bedingen exogene Faktoren 80–90% der malignen Erkrankungen, die meist durch bestimmte Verhaltensweisen der betroffenen Personen entstehen. Dazu zählen beispielsweise Rauchen, exzessiver Alkoholkonsum, Ernährung oder ein Risikoverhalten in Bezug auf Infektionen. Chemische Einflüsse, wie Tabak- und Alkoholkonsum, zählen zu den stärksten Risikofaktoren für Krebserkrankungen (14). Das Rauchen von Zigaretten ist mit der Entstehung mindestens 16 verschiedener Krebsentitäten assoziiert. Kinder von Müttern, die während der Schwangerschaft Zigaretten rauchten oder dem Zigarettenrauch von Familienmitgliedern ausgesetzt waren, hatten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ein erhöhtes Risiko, an einem malignen Tumor, insbesondere des ZNS, zu erkranken (14, 15). Ca. 4% der Krebserkrankungen weltweit werden durch Alkoholkonsum verursacht. Es handelt sich insbesondere um maligne Tumoren des Mundes, Halses, Larynx, Ösophagus, Kolons, Rektums, der Mammae und der Leber (16).

Adipositas und ein Mangel an Bewegung sind mit der Entstehung diverser Krebsentitäten des Erwachsenenalters, beispielsweise kolorektaler und Mamma-Karzinome, assoziiert (14). Übergewicht führt zu erhöhten Hormonspiegeln von Östrogen, Androgenen, Insulin und *Insulin-like-Growth-Factor*, die das Wachstum von Zellen, auch Tumorzellen, bedingen. Außerdem führen sie zu chronischen, leichten Entzündungsprozessen und oxidativem Stress (17).

Weiterhin besteht ein Zusammenhang zwischen Ernährung und Krebsentstehung. Es konnte gezeigt werden, dass der Konsum kalziumreicher Vollkorn- und Milchprodukte einen protektiven Effekt in Bezug auf die Genese kolorektaler Karzinome aufweist. Rotes oder verarbeitetes Fleisch, Eier und gesüßte Getränke zählen hingegen zu den Lebensmitteln, die mit einem hohen Risiko für kolorektale Karzinome einhergehen (18). Ein Mangel an Vitamin A und Eisen ist mit einer erhöhten Inzidenz von Mundhöhlenkarzinomen assoziiert (14).

Diskutiert wird auch der Zusammenhang von Ernährung und Krebsentstehung bei Kindern. Für Kinder, die länger als sechs Monate gestillt wurden, konnte ein um 20% reduziertes Risiko für Leukämien festgestellt werden. Amitay et al. legten dar, dass der Konsum verarbeiteter Lebensmittel und der Verzicht auf Gemüse mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung hämatologischer maligner Erkrankungen bei Kindern verbunden ist (19). Ein besonders niedriges und besonders hohes Geburtsgewicht sind mit dem häufigeren Auftreten von Krebserkrankungen bei Kindern assoziiert (20). Belegt ist, dass Adipositas im Kindes- und Jugendalter mit einer erhöhten Inzidenz und Mortalität maligner Erkrankungen im Erwachsenenalter einhergeht (21). Unklar bleibt jedoch, ob dieser Zusammenhang auch für Krebserkrankungen im Kindes- und Jugendalter besteht. Außerdem wird der Effekt bestimmter Ernährungskomponenten auf epigenetische Modifikationen, die wiederum auf für Krebserkrankungen prädisponierende Gene einwirken, untersucht. Diese Mechanismen umfassen DNA-Methylierung, RNA-Interferenz und die Modifikationen von Histonen. Sie sind vererbbar und potentiell reversibel (13).

Auch Infektionen können zur Karzinogenese beitragen. Ein typisches Beispiel stellen Typ-B-Gastritiden durch *Helicobacter pylori* dar, die für Magenkarzinome prädisponieren. Persistierende Infektionen mit sexuell übertragbaren humanen Papillomaviren können zu Karzinomen des Oropharynx und der Anogenitalregion führen. Hepatitis-B- und -C-Viren sind mit Hepatozellulären Karzinomen assoziiert (22). Für Kinder, die gegen karzinogene Viren geimpft sind, ist ein vermindertes Krebsrisiko belegt. Es scheint zudem einen generellen, protektiven Effekt von Vakzinen jeglicher Art im Kontext von Krebserkrankungen zu geben (23).

Die frühe Exposition gegenüber mikrobiellen Erregern scheint, wie auch Impfungen, einen generellen protektiven Effekt in Bezug auf die Krebsentstehung bei Kindern und Jugendlichen zu haben. Bleiben diese Einflüsse jedoch aus, können spätere Infektionen zur Genese maligner Erkrankungen bei Kindern beitragen. Ein Modell zur Erklärung der Genese akuter lymphatischer Leukämien ist die Zwei-Treffer-Hypothese. Dabei wird ein pränataler erster Treffer, der durch genetische Prozesse zu einem präleukämischen Klon führt, durch ein späteres Ereignis, z. B. eine Infektion, ergänzt (24).

Darüber hinaus bedingen physikalische Faktoren die Genese von Krebserkrankungen. Insbesondere die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung erhöht das Risiko, eine hämatologische oder solide Krebserkrankung zu entwickeln. Computertomographische Untersuchungen im Kindesalter gehen mit einem gesteigerten Risiko einher, an Leukämien und Hirntumoren zu erkranken (25).

Einen weiteren bedeutsamen Risikofaktor stellt UV-Strahlung dar. Die Exposition gegenüber Sonnenlicht wird mit der Genese von Melanomen und weiteren Hautkrebsentitäten auch bei Kindern und Jugendlichen in Verbindung gebracht (14).

Betrachtet man elterliche Faktoren, fallen – neben dem o. g. aktiven oder passiven Rauchverhalten der Mutter während der Schwangerschaft – weitere Merkmale auf. Ein

fortgeschrittenes mütterliches Alter steht im Zusammenhang mit akuten lymphatischen Leukämien und diversen soliden Tumoren des Kindesalters. Auch Chromosomenanomalien treten gehäuft bei Kindern älterer Mütter auf. Einige Studien konnten eine Korrelation zwischen väterlichem Alter und Non-Hodgkin-Lymphomen herausstellen. Es ist bekannt, dass mit zunehmendem väterlichen Alter auch die Anzahl der vererbten Keimbahnvarianten steigt (26). Diskutiert werden außerdem die Einflüsse durch Ernährungsgewohnheiten, Koffeinkonsum, Medikamenten- und Vitamineinnahme der Mutter während der Schwangerschaft sowie ihre Exposition gegenüber Pestiziden auf die Krebsentstehung bei Kindern (20). Eine Studie zu Hirntumoren bei Kindern zeigte eine mögliche protektive Wirkung der Vitaminsubstitution (26). Bekannt ist, dass die Nutzung von Diethylstilbestrol, einem synthetischen Östrogenderivat, durch die Mutter mit einem erhöhten Risiko für Vagina- und Zervixkarzinome bei ihren Töchtern assoziiert ist. Hinsichtlich des Effekts von Alkoholkonsum und beruflichen Expositionen der Eltern auf eine Krebsentstehung bei Kindern divergieren die Studienergebnisse (15).

In verschiedenen Studien zeigte sich ein Einfluss des sozioökonomischen Status auf die Krebsentstehung uneindeutig. Der Bildungsgrad der Mutter korrelierte positiv mit der Inzidenz von ALL, ZNS-Tumoren und Neuroblastomen (27).

Der Einfluss diverser Umweltfaktoren auf die Krebsentstehung bei Kindern wird diskutiert, darunter Luftverschmutzung, die Exposition gegenüber chemischen Stoffen, Strahlung und der Wohnort. Für die Auswirkungen von Luftverschmutzung, z. B. durch Benzol oder Verkehrsemissionen, sowie elektromagnetischer Felder ist die Studienlage heterogen, sodass diesbezüglich aktuell keine Schlussfolgerungen gezogen werden können. Eine Assoziation zwischen dem Wohnort in der Nähe eines Kernkraftwerks und dem Einfluss auf die Krebsinzidenz von Kindern wurde nur durch eine französische Studie bestätigt. Weitere Forschungsgruppen konnten diesen nicht reproduzieren. Ein Zusammenhang zwischen Chemikalien, die durch Renovierungsarbeiten frei werden, und Leukämien bei Kindern wurde beschrieben. Darüber hinaus werden einige Pestizide mit malignen Erkrankungen bei Kindern in Verbindung gebracht (28). Die Exposition von Kindern gegenüber bestimmten Kunststoffen scheint mit einem erhöhten Risiko für Krebserkrankungen assoziiert zu sein. Dies wurde bei Bewohner*innen von Gemeinden untersucht, die an Kunststoffproduktions- und Abfallentsorgungsanlagen grenzen. Auch bei Kindern mit Wohnsitz in der Umgebung von Fracking-Anlagen zeigte sich eine erhöhte Inzidenz maligner Erkrankungen, vor allem von Leukämien (29). Studien einer spanischen Forschungsgruppe ergaben eine erhöhte Inzidenz diverser Krebsentitäten bei Kindern, die in der Nähe unterschiedlicher Industriestandorte leben (28).

Die Identifikation klar ursächlicher Umweltfaktoren ist häufig nur bedingt möglich, da Korrelationen mit den bisher verfügbaren Fall-Kontroll-Studien nur schwer erhoben werden können. Hilfreich wären prospektive Studienmodelle, die jedoch eine sehr große Kohorte umfassen müssten, um signifikante Aussagen treffen zu können (20).

Insgesamt erkranken Jungen häufiger als Mädchen und Säuglinge häufiger als ältere Kinder an Krebs (20).

Für die überwiegende Anzahl an Krebserkrankungen des Erwachsenenalters sind exogene Risikofaktoren verantwortlich. Auch im Kindesalter konnten nicht-genetische Einflüsse ausgemacht werden, die eine Krebsentstehung begünstigen und weiterer Forschung bedürfen (20). Sie spielen allerdings eine untergeordnete Rolle. Dies legt die Vermutung genetischer Ursachen nahe (20, 30).

1.1.2 Onkogene und Tumorsuppressorgene

Durch Transkription und Translation entstehen aus Genen Proteine. Gene steuern daher die Regulation u. a. des physiologischen Zellwachstums, der Apoptose und der Angiogenese auf unterschiedliche Art und Weise. Treten Veränderungen der Zellregulation auf, können diese Funktionen eingeschränkt oder verstärkt sein (31, 32).

Proto-Onkogene, z. B. *RAS*, stimulieren auf physiologischer Ebene die Zellteilung, das -Überleben, die -Invasion und das -Wachstum. Sie umfassen Wachstumsfaktoren, Transduktoren zellulärer Signale sowie nukleare Transkriptionsfaktoren. Sind Proto-Onkogene von einer Funktion-verstärkenden Mutation (*Gain of function*), z. B. *KRAS*, betroffen oder werden sie durch Varianten im Signalweg vorgeschalteter Gene aktiviert, werden sie als Onkogene bezeichnet, fördern eine unkontrollierte Proliferation und damit die Karzinogenese. Zu den ursächlichen Varianten zählen chromosomale Translokationen, Punktmutationen und Gen-Amplifikationen, welche entweder zu einer veränderten Proteinstruktur oder einer gesteigerten Expression führen (32).

Tumorsuppressorgene, z. B. *RB1* und *TP53*, kontrollieren das Zellwachstum und aktivieren Reparaturmechanismen der DNA, sind in den Zellzyklus und programmierten Zelltod involviert. Damit verhindern sie die Entstehung von Neoplasien. Kommt es zu einem Funktionsverlust (*Loss of function*) z. B. durch *Missense*- oder trunkierende Mutationen beider Allele eines Tumorsuppressorgens, kann eine maligne Zelle überleben und proliferieren (vgl. Abb. 1). Diese Inaktivierung kann weiterhin durch *Silencing* des Promotors des Gens erfolgen. Menschen mit KPSs tragen in allen Zellen des Körpers eine Keimbahnvariante auf einem Allel eines Tumorsuppressorgens (31).

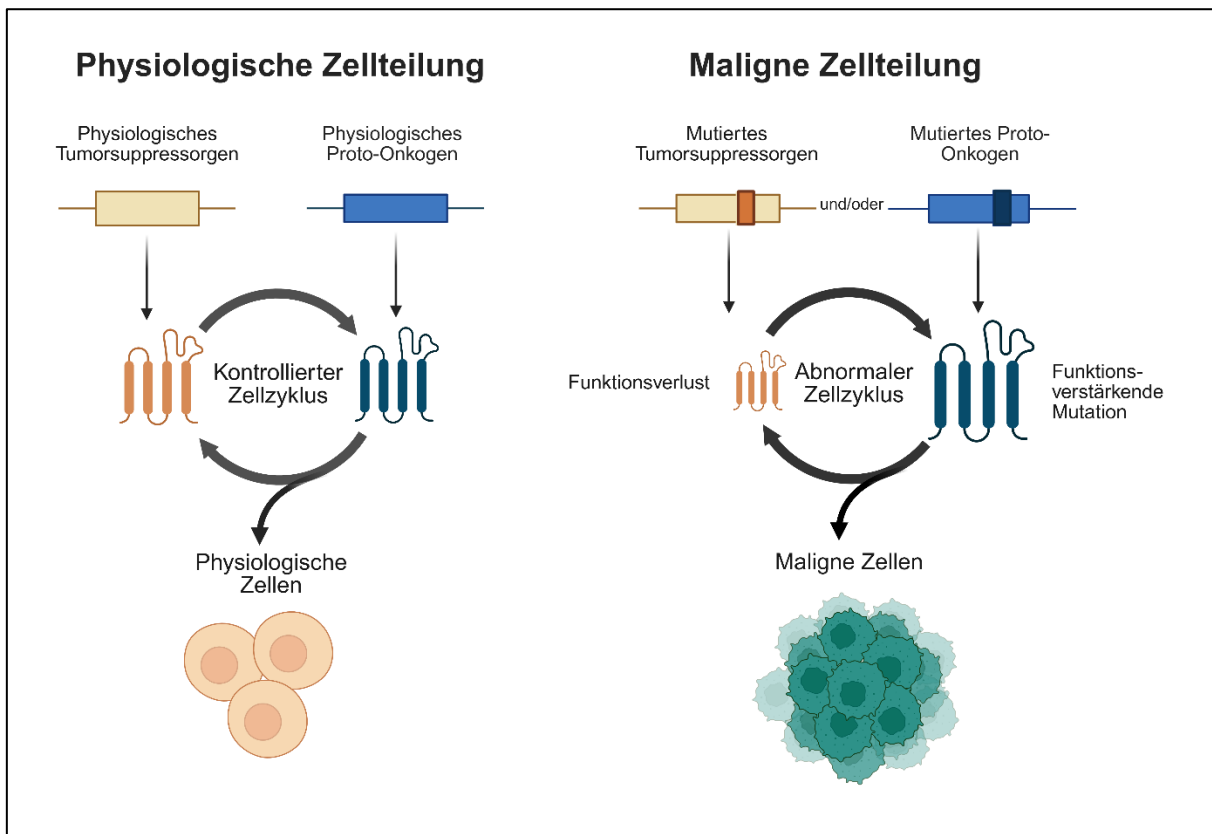


Abb. 1 Steuerung der Zellteilung durch Tumorsuppressor- und Proto-Onkogene

Gegenübergestellt sind die physiologische und die maligne Zellteilung in Abhängigkeit von der physiologischen bzw. durch Mutationen beeinflussten Tumorsuppressor- bzw. Proto-Onkogene. Kommt es durch eine Mutation zu einem Funktionsverlust eines Tumorsuppressorgens oder einer Funktionsverstärkung eines Proto-Onkogens, verläuft die Zellteilung unkontrolliert und eine Krebserkrankung kann sich entwickeln. Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt. Die Nutzung erfolgt im Einklang mit der akademischen Lizenzvereinbarung von BioRender.

1.1.3 Hallmarks of Cancer

Die *Hallmarks of Cancer* beschreiben ein Modell der Karzinogenese zugrunde liegender Prinzipien, die bei verschiedensten Krebserkrankungen beobachtet werden (vgl. Abb. 2) (2).

Tumorzellen erhalten proliferative Signalwege aufrecht. Sie generieren eigene Wachstumssignale und sind dadurch unabhängig von externer Stimulation. Sie sind in der Lage, extrazelluläre Wachstumssignale, deren transzelluläre Transduktion sowie die intrazellulären darauffolgenden Signalwege zu verändern. Diese Fähigkeit entspricht dem ersten im Jahr 2000 durch Hanahan und Weinberg publizierten *Hallmark* (1). Außerdem sind Tumorzellen unempfindlicher gegenüber Wachstums-inhibierenden Signalen z. B. in der G1-Phase des Zellzyklus (2) und apoptotischen Signalen, die physiologisch den programmierten Zelltod auslösen würden (3) (33).

Physiologische Zellen besitzen ein endliches replikatives Potential, da in jedem Zellzyklus genetisches Material an den Enden der Chromosomen, den Telomeren, verloren geht. Tumorzellen können diesem Prozess entgegenwirken. Sie regulieren z. B. die Expression von Telomerasen verglichen mit nicht-immortalisierten Zellen herauf. Telomerasen bezeichnen

Enzyme, die Hexanukleotid-Wiederholungen an die Enden der Chromosomen anlagern (4) (33, 34).

Maligne Zellen sind darüber hinaus in der Lage, Angiogenese zu induzieren (5), um die Sauer- und Nährstoffversorgung für die Tumorprogression zu optimieren. Kennzeichnend ist zudem die Fähigkeit zur Gewebeinvasion und Metastasierung (6) (33). Außerdem kann in Tumorzellen eine Umprogrammierung des Energiestoffwechsels hin zu „aerober Glykolyse“ erfolgen (7) (2). Maligne Zellen entwickeln weiterhin Mechanismen, die sie vor einer Detektion und Zerstörung durch das Immunsystem schützen (8) (34).

Zu den ermöglichenden Umständen einer Karzinogenese zählt die genomische Instabilität, welche durch eine Fehlfunktion der „Wächter des Genoms“, insbesondere *TP53* und der DNA-Reparaturgene, gegeben ist (2). Entzündungsreaktionen im Umfeld eines Tumors werden begünstigt, wodurch die o. g. *Hallmarks* durch z. B. proliferative und angiogenetische Signale verstärkt werden. Außerdem spielt die Tumor-Mikroumgebung mit den Interaktionen aus Tumor- und Tumorstromazellen eine entscheidende Rolle (34, 35).

2022 veröffentlichte Hanahan eine Erweiterung der bis dato bekannten acht *Hallmarks*, um die komplexe Pathogenese von Krebserkrankungen treffender beschreiben zu können.

Zu diesen potentiellen *Hallmarks* zählt demnach eine phänotypische Plastizität. Diese kann durch Dedifferenzierung bereits differenzierter Zellen in Progenitorzellen durch die verminderte Expression für die Differenzierung bedeutsamer Faktoren erreicht werden. Außerdem können inkomplett differenzierte Progenitorzellen an ihrer weiteren Differenzierung gehindert werden oder Merkmale anderer Gewebe im Sinne einer Transdifferenzierung annehmen (2). Neben genetischen Veränderungen beeinflussen auch epigenetische Modifikationen und regulatorische Mikro-RNAs die Krebsentstehung und -progression in Tumorzellen und in den Tumor umgebenden Stromazellen (2, 34). Weiterhin können lebens-, aber nicht mehr teilungsfähige seneszente Zellen des Tumors in der seiner Mikroumgebung sowie das lokale Mikrobiom von protektiver Bedeutung oder schädlichem Effekt für die Krebsentstehung, -progression und das Therapieverhalten sein (2).

Menschen mit einer Krebsprädisposition können Veränderungen in Genen aufweisen, die zu den *Hallmarks of Cancer* und damit zur Krebs-Entstehung und -Progression bereits in jungem Alter beitragen. Außerdem stellen die *Hallmarks* mögliche Angriffspunkte für Therapien dar (2, 33, 36).

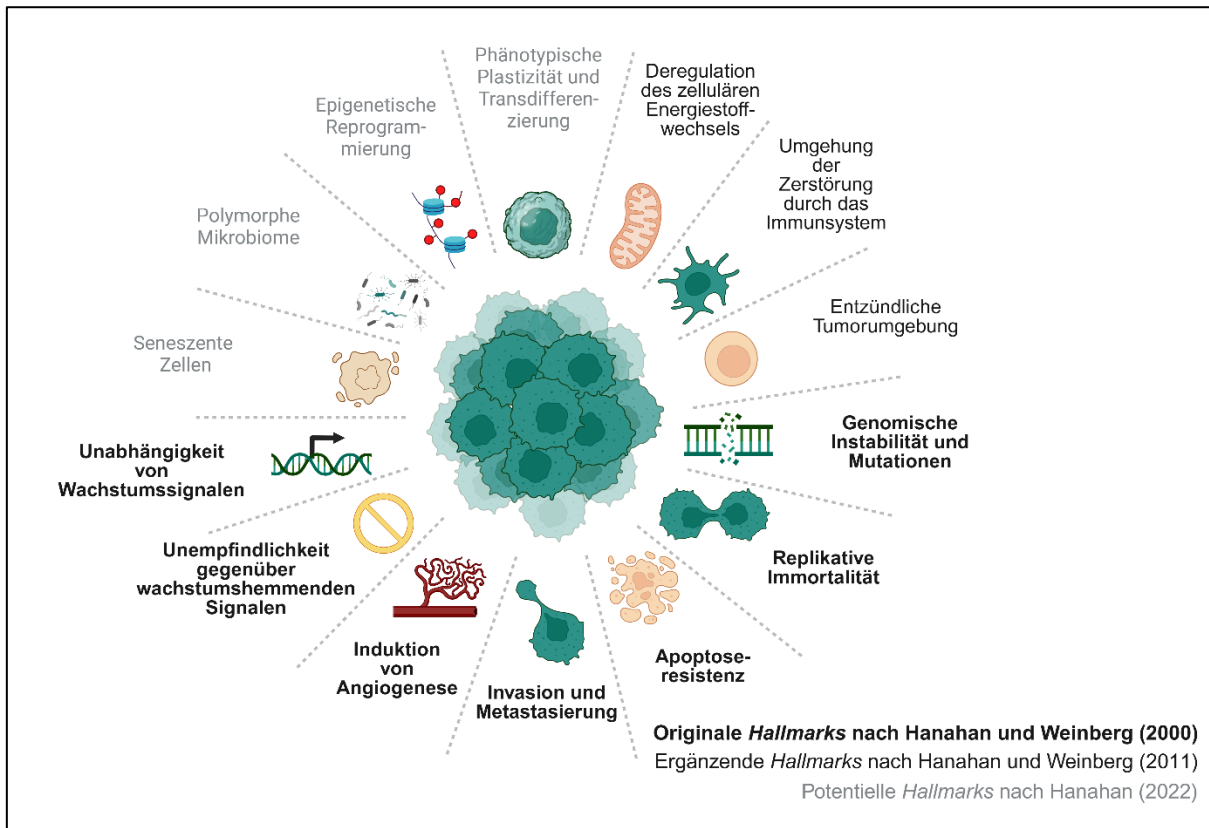


Abb. 2 Charakteristische Merkmale maligner Tumoren (*Hallmarks*)

Übersicht der charakteristischen Merkmale maligner Tumoren (*Hallmarks of Cancer*) nach dem erweiterten Modell von Hanahan. Dargestellt sind die ursprünglichen sechs Hallmarks, ergänzende Merkmale sowie unterstützende Eigenschaften der Tumorentwicklung. Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt und nach Hanahan 2022 modifiziert (2). Die Nutzung erfolgt im Einklang mit der akademischen Lizenzvereinbarung von BioRender.

1.2 Genetische Prädisposition für Krebserkrankungen im Kindes- und Jugendalter

Wie in 1.1.1 beschrieben sind die Ursachen von Krebserkrankungen vielfältig. Da für Kinder jedoch viele der im Erwachsenenalter bedeutsamen Lebensstil-assoziierten Faktoren nur eine untergeordnete Rolle spielen, liegt die Annahme einer genetischen Ursache nahe. Diese genetische Krebsprädisposition kann im Rahmen eines KPS mit weiteren phänotypischen Merkmalen einhergehen oder klinisch unauffällig sein. Nur sehr selten werden Krebserkrankungen auch im Kindesalter durch Infektionen, Radio-, Chemo-, oder immunsuppressive Therapie ausgelöst (12, 37-39).

In Studien konnte in 8–10% der Kinder, die unter einer Krebserkrankung litten, eine ursächliche Keimbahnvariante identifiziert werden. Diese Varianten umfassen SNVs, indels sowie einfache Kopienanzahlvarianten (CNV) in bekannten KPGs (12, 40-42). Jedoch zeigen viele Kinder, bei denen keine pathogene prädisponierende Variante detektiert werden konnte, klinische oder anamnestische Auffälligkeiten, die eine genetische Prädisposition nahelegen.

1.2.1 Für Krebserkrankungen prädisponierende Syndrome

Bei KPSs handelt es sich um genetische Erkrankungen, die das Risiko einer Person erhöhen, an Krebs zu erkranken. Verursacht werden sie durch Veränderungen von KPGs, welche Einfluss auf insbesondere zwei bedeutsame *Hallmarks of Cancer* nehmen. Sie fördern eine genomische Instabilität und/oder eine Dysregulation der Zellproliferation, wodurch es zu einer Akkumulation von Mutationen in der Zelle kommt. Am häufigsten beeinflusst werden Tumorsuppressorgene, welche die DNA-Reparatur oder den Zellzyklus steuern (34, 43).

Die *American Association for Cancer Research* teilte die fast 100 bis zum 20. Lebensjahr bedeutsamsten KPSs in neun Gruppen ein. Hierzu zählen (I) das Li-Fraumeni-Syndrom, (II) RASopathien und Neurofibromatose-Syndrome, (III) Syndrome, die mit Hochwuchs und Wilmstumoren einhergehen, (IV) Nervenzelltumore, (V) neuroendokrine Tumorsyndrome, (VI) gastrointestinale KPSs und Reparatur-Defizienz-Syndrome, (VII) Leukämie-Prädispositionen, (VIII) Syndrome, die mit einer Mikrosatelliteninstabilität assoziiert sind sowie (IX) Sonstige (44). Das Li-Fraumeni-Syndrom wird autosomal-dominant vererbt und zeichnet sich durch eine Keimbahnmutation des Gens *TP53* aus, welche zu einem Funktionsverlust des Proteins p53 führt, das als „Wächter des Genoms“ bezeichnet wird. Es ist in der Lage, auf interne und externe Stressoren zu reagieren, daraufhin den Zellzyklus zu stoppen und damit die Möglichkeit zur DNA-Reparatur zu verschaffen oder den programmierten Zelltod einzuleiten. Mit dem Syndrom geht ein erhöhtes Risiko einher, u. a. an Sarkomen, Brustkrebs, Hirntumoren und adrenokortikalen Karzinomen zu erkranken. (45, 46). Das Li-Fraumeni-Syndrom gibt ein Beispiel für eine direkte therapeutische Konsequenz aus dem Wissen um ein KPS. Um das Risiko von Sekundärtumoren zu reduzieren, soll bei Betroffenen auf eine Bestrahlung verzichtet werden (47). Mehr als 1% der Krebserkrankungen im Kindesalter können auf eine pathogene Keimbahnvariante von *TP53* zurückgeführt werden. Jedoch konnte in ca. 20–30% der Patient*innen mit Li-Fraumeni-Syndrom bisher keine ursächliche Keimbahnvariante gefunden werden (12, 48, 49).

Die zweite Gruppe umfasst u. a. RASopathien wie das Noonan-Syndrom, Neurofibromatose Typ 1 (NF1) und Typ 2 (44). Letztere sind durch die Entwicklung von Tumoren des peripheren und zentralen Nervensystems gekennzeichnet. Patient*innen mit einer pathogenen Mutation des Tumorsuppressorgens *NF1* leiden unter NF1. *NF1* kodiert für das Protein Neurofibromin, welches den RAS/MAPK- und den PI3K/mTOR-Signalweg negativ reguliert. Neben der Tumoprädisposition u. a. für juvenile myelomonozytäre Leukämien, Rhabdomyosarkome, pilozytische Astrozytome und Optikusgliome ist das Auftreten von Café-au-lait-Flecken (CALM), einer axillären und inguinalen Hyperpigmentierung, von Lisch-Knötchen, multipler Neurofibrome sowie einer neurokognitiven Beeinträchtigung bereits im Kindesalter typisch (44, 50, 51).

Die Syndrome der Gruppe III gehen mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung embryonaler Tumore einher. Hierzu zählt das Beckwith-Wiedemann-Syndrom, das durch eine *Imprinting*-Störung, die Gene auf Chromosom 11 betrifft, hervorgerufen wird und dessen Betroffene durch eine konnatale Makrosomie mit vergrößerten Organen auffallen. Zudem können eine Makroglossie, Bauchwanddefekte, ein Naevus flammeus neonatorum und ein Hyperinsulinismus auftreten. Kinder, die unter einem Beckwith-Wiedemann-Syndrom leiden, entwickeln Wilms-Tumore und Hepatoblastome mit erhöhter Wahrscheinlichkeit (44, 52).

Zu Tumorsyndromen der Nervenzellen zählen das hereditäre Retinoblastom und Neuroblastom, das Nävoid-Basalzell-Karzinom-Syndrom und das Syndrom maligner rhabdoider Tumore. Letzteres wird autosomal dominant vererbt und durch Keimbahnmutationen der Gene *SMARCB1* oder *SMARCA4* ausgelöst, die die Genexpression durch ihren Einfluss auf das Chromatin-*Remodeling* verändern (53, 54).

Die häufigste maligne Erkrankung des Kindesalters ist die akute lymphatische Leukämie. Auch für dieses Krankheitsbild ist das Wissen um ein mögliches zugrundeliegendes KPS essentiell. Bekannt sind aktuell 13 Syndrome, die für die Entwicklung einer akuten lymphatischen Leukämie prädisponieren. Stoltze et al. thematisieren für diese eine Potenzierung der karzinogenen Wirkung der ALL-Therapie durch Gen-Umwelt-Interaktionen. Für Trisomie 21-Patient*innen werden bereits seit längerer Zeit spezialisierte Behandlungsprotokolle genutzt. Auch für Kinder mit Bloom-Syndrom wird, da sekundäre maligne Erkrankungen wahrscheinlich sind, eine reduzierte Chemotherapie empfohlen. Insbesondere vor dem Hintergrund der Entwicklung weniger toxischer und DNA-schädigender Immun- und Antikörpertherapien plädieren die Autor*innen für einen kritischen Einsatz traditioneller Chemotherapie bei ALL-Patient*innen mit KPSs und die Auseinandersetzung mit individuell auf das Risikoprofil der Patient*innen angepassten Behandlungsansätzen (55).

In der klinischen Praxis bleiben zugrunde liegende KPSs häufig unerkannt. Ein Grund dafür ist die Heterogenität des phänotypischen Spektrums (56).

1.2.2 Kriterien, die auf eine genetische Krebsprädisposition hindeuten

Für die pädiatrischen Patient*innen und ihre Familien ist das Wissen um eine potentielle Krebsprädisposition von großer Relevanz. Mit einem KPS können Therapieresistenz oder gesteigerte Toxizität als Reaktion auf die Behandlung einhergehen. Daher bedingt das Vorliegen eines KPS die Auswahl und Anpassung der Therapie. Darüber hinaus können besondere Überwachungs- und Nachsorgemaßnahmen erforderlich sein, um ein mögliches Rezidiv oder einen weiteren malignen Tumor frühzeitig identifizieren zu können (57). Durch Screenings können Tumoren in früheren Stadien detektiert werden, sodass weniger intensive Therapien notwendig sind, was zu geringerer Toxizität und besseren Ergebnissen führt. Für das Li-Fraumeni-Syndrom wurde gezeigt, dass durch Überwachungsmaßnahmen das 5-Jahres-Überleben von 60% auf 89% gesteigert werden kann (44). Auch Familienmitglieder der Patient*innen mit KPSs haben mit dem Wissen um eine Krebsprädisposition die Möglichkeit,

an Vorsorge- und Früherkennungsuntersuchungen teilzunehmen. Auch für Fragen der reproduktionsmedizinischen Beratung und pränatalen Diagnostik ist die Information bedeutsam (57).

Da trotz ihrer großen Relevanz KPSs in der klinischen Praxis leicht übersehen werden können (58, 59), veröffentlichten Jongmans et al. und Ripperger et al. Kriterien, die das Vorliegen eines KPS bei pädiatrischen Patient*innen besonders wahrscheinlich machen (vgl. Abb. 3). Dazu zählen eine auffällige Familienanamnese in Bezug auf Krebserkrankungen, spezielle Krebsentitäten und -typen, die eng mit einem KPS assoziiert sind, multiple Primärtumoren, spezielle klinische Auffälligkeiten sowie eine gesteigerte Toxizität als Reaktion auf die Therapie.

Eine in Bezug auf Krebserkrankungen positive Familienhistorie ist das am besten bekannte Kriterium für den Hinweis auf eine genetische Prädisposition (56). Als auffällig gilt in diesem Zusammenhang eine Familienanamnese, wenn (I) bei ≥ 2 Familienmitgliedern im Alter von <18 Jahren Krebserkrankungen auftraten (Indexpatient*in eingeschlossen), (II) ein Elternteil oder Geschwisterkind eine Krebserkrankung vor dem 45. Lebensjahr entwickelte, (III) bei ≥ 2 erst- oder zweitgradig Verwandten vor dem 45. Lebensjahr eine Krebserkrankung diagnostiziert wurde oder (IV) die Eltern des*der Patient*in konsanguin sind (57, 60).

Zu Krebsentitäten, die eng mit einem KPS assoziiert sind, zählen Krebserkrankungen, die typischerweise im Erwachsenenalter auftreten und bei Kindern extrem selten vorkommen, wie beispielsweise kolorektale Karzinome (61), und maligne Erkrankungen oder spezifische Tumoreigenschaften, die im Zusammenhang mit genetischen Syndromen beschrieben wurden, wie z. B. choroidale Plexuskarzinome oder hypodiploide Karyotypen einer ALL bei Patient*innen mit Li-Fraumeni-Syndrom. Diese werden auch als Indikatortumore bezeichnet. (60).

Außerdem besteht der Verdacht auf ein KPS bei Kindern, die zwei oder mehr synchrone oder metachrone Neoplasien entwickeln. Dabei ist es wichtig, diese von Rückfällen der primären Krebserkrankung und von einer therapieassoziierten Genese zu differenzieren (57, 60). Nach Chemotherapie ist das Auftreten akuter Leukämien und myelodysplastischer Syndrome mit kurzer zeitlicher Latenz (ca. 3 Jahre) möglich. Solide Tumoren können im bestrahlten Areal mehr als 10 Jahre nach Radiotherapie entstehen (62). Demnach ist eine genetische Prädisposition denkbar bei Patient*innen mit sekundärer Leukämie ohne vorangegangene Chemotherapie, mit einem sekundären soliden Tumor ohne vorangegangene Radiotherapie und mit der Entwicklung multipler solider Neoplasien in kurzer zeitlicher Latenz zueinander (57).

Wenn zusätzlich zu einer Krebserkrankung bei einem*einer pädiatrischen Patient*in kongenitale oder im Laufe der Entwicklung entstandene Anomalien bestehen, sollte ebenfalls an ein KPS gedacht werden. Viele Signalwege, die für die Tumorentwicklung bedeutsam sind, spielen auch in der embryonalen Entwicklung eine Rolle. Jedoch konnte bisher aufgrund der geringen Kohortengröße in den untersuchenden Studien keine signifikante Korrelation zwischen spezifischen Krebsentitäten und individuellen Anomalien beobachtet werden. Für die

klinische Beurteilung können charakteristische faziale Dysmorphien und intellektuelle Beeinträchtigungen hinweisend sein (57).

Weiterhin ist Hochwuchs im Kindesalter mit einem gesteigerten Risiko insbesondere für embryonale Tumoren und eine Wachstumsretardierung mit KPSs assoziiert. Auch hypo- oder hyperpigmentierte Hautläsionen, zu denen beispielsweise CALM zählen, lassen Rückschlüsse auf das mögliche Vorliegen eines KPS zu. Darüber hinaus kann ein KPS mit Zytopenien und Immundefizienzen einhergehen (57).

Das letzte Kriterium besteht in einer gesteigerten Toxizität als Reaktion auf die Therapie. Bei Kindern mit KPSs können schwerere Nebenwirkungen und Komplikationen der Chemo- und Radiotherapien auftreten, sodass diese Hinweise auf das Vorliegen eines Syndroms sind. Grund dafür sind meist damit einhergehende Immundefizienzen oder DNA-Reparatur-Störungen, sodass sich normales Gewebe schlechter regenerieren kann (57, 60).

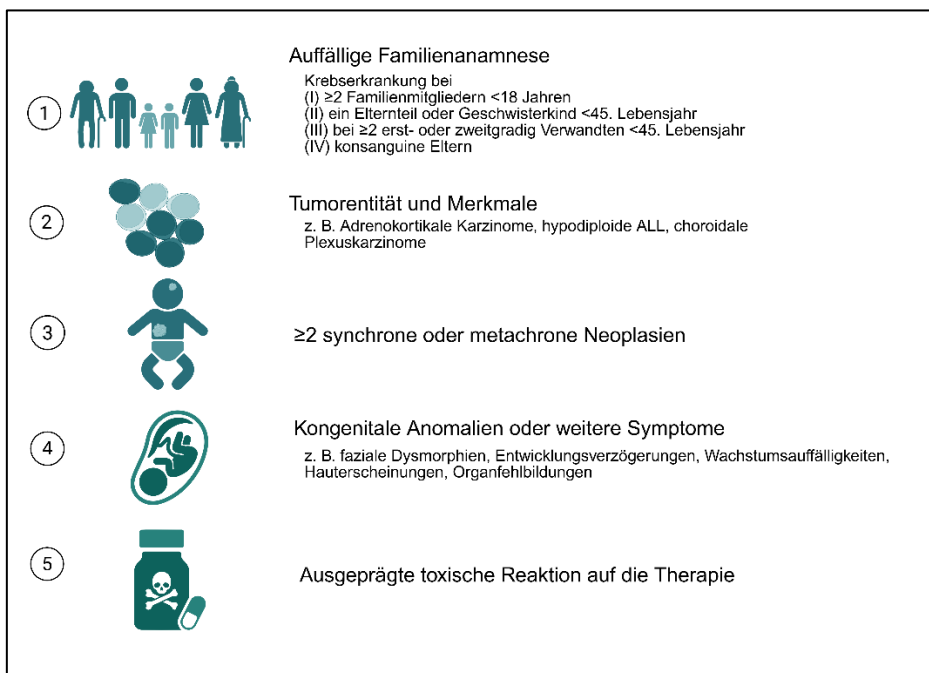


Abb. 3 Kriterien, die das Vorliegen eines KPS wahrscheinlich machen

Die Abbildung bietet eine Übersicht über die fünf Kriterien, die das Vorliegen eines KPS wahrscheinlich machen (57, 60). Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt. Die Nutzung erfolgt im Einklang mit der akademischen Lizenzvereinbarung von BioRender.

1.3 Die Rolle struktureller Varianten in der Karzinogenese im Kindesalter

Der Begriff der Variante vereint die häufig missverständlich gebrauchten Termini Mutation und Polymorphismus. Während eine Mutation eine permanente Veränderung der Nukleotidsequenz beschreibt, entspricht ein Polymorphismus einer Variante mit einer Frequenz >1% in der Normalbevölkerung.

SVs sind in der Lage, Einfluss auf die Genfunktion, -Expression und -Regulation zu nehmen. Dies kann potentiell zu Veränderungen des Phänotyps sowie zur Prädisposition von Erkrankungen führen. Neben SNVs und indels tragen sie auch zur phänotypischen Diversität der Menschen bei und können für die Entstehung von Krebserkrankungen ursächlich sein (63-65). Cosenza et al. zeigten, dass der Großteil (55%) der Treibermutationen in der Karzinogenese der meisten Krebserkrankungen auf SVs zurückgeht (66). Eine SV stellt im ursprünglichen Sinne eine Veränderung der DNA >1 Base dar. Heute werden meist Varianten >50 bp bis Megabasenpaare als SVs bezeichnet. Sie umfassen unbalancierte CNVs wie Deletionen, Duplikationen und Insertionen sowie balancierte Rearrangements wie Inversionen, inter- und intrachromosomale Translokationen. Außerdem können komplexe Kombinationen der genannten SV-Typen, beispielsweise im Rahmen segmentaler Duplikationen, auftreten (67, 68).

SVs nehmen Einfluss auf molekulare und zelluläre Prozesse, regulatorische Funktionen, die räumliche Struktur der DNA und die Transkription. Sie können in jedem menschlichen Genom detektiert werden (69).

1.3.1 Einteilung struktureller Varianten

Um die Interpretation detektierter Varianten in der genetischen Testung zu standardisieren, veröffentlichte das American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) ein Schema. Dieses teilt genetische Varianten anhand ihrer möglichen Pathogenität in fünf Kategorien ein, die sich aus der Kombination verschiedener Kriterien ergeben. Starken Anhalt auf eine (I) pathogene Variante geben ein Mutationsmechanismus und ein Vererbungsmuster, welche bereits für die Erkrankung bekannt sind. Beispielsweise durch *Nonsense*-Varianten oder Varianten mit Leserasterverschiebung kann ein nicht funktionelles Allel entstehen. Diese sogenannten Null-Varianten in einem Gen, dessen Funktionsverlust als Ursache der zu untersuchenden Erkrankung bekannt ist, besitzen sehr starke Evidenz für Pathogenität (67).

Weiterhin deutet eine *de novo* entstandene Variante bei einem*iner Patient*in mit unauffälliger Familienanamnese darauf hin. *In vitro* oder *in vivo* durchgeführte funktionelle Untersuchungen, die einen das Gen oder Protein zerstörenden Effekt zeigen, geben weitere Hinweise auf Pathogenität. Ein weiteres Beispiel stellt der Austausch von Nukleotiden dar, der zu einem, als Mechanismus bereits bekannten, Austausch einer Aminosäure führt (67).

Als (II) wahrscheinlich pathogen werden Varianten bezeichnet, welche mit mehr als 90%-iger Wahrscheinlichkeit ursächlich für die Erkrankung sind. Bei dieser Klassifikation muss beachtet werden, dass für die quantitative Einordnung der Wahrscheinlichkeit der meisten Varianten jedoch kaum Daten vorliegen. Die dritte Kategorie umfasst (III) Varianten unklarer Signifikanz (VUS). Als (IV) wahrscheinlich benigne gelten Varianten, welche mit mehr als 90%-iger Wahrscheinlichkeit nicht ursächlich für die betreffende Erkrankung sind. Auf (V) benigne Varianten weist z. B. eine Prävalenz der Variante von mehr als 5% in der Allgemeinbevölkerung hin.

Anhand von Kontrollpopulationen ist es möglich, die Verbreitung einer SV und damit ihr pathogenes Potential einzuschätzen. Besonders hilfreich ist dies bei Erkrankungen mit frühem Erkrankungsbeginn. Dafür stehen verschiedene Datenbanken, die u. a. auch Informationen zur Prävalenz einer Variante in unterschiedlichen ethnischen Gruppen beinhalten, zur Verfügung. Hierzu zählen u. a. die dbVar Datenbank des *National Center of Biotechnology Information NCBI* und die *Database of Genomic Variants*, (DGV). Ist die Allelfrequenz in der Kontrollpopulation höher als die in der erkrankten Gruppe, besteht ein deutlicher Hinweis auf eine benigne Variante. Dagegen spricht das Fehlen der Variante in einer großen Kontrollkohorte, die der ethnischen Zugehörigkeit der*des Patient*in entspricht, eher für Pathogenität. Darüber hinaus besteht Anhalt für Benignität beim Nachweis einer Variante bei einem gesunden Erwachsenen, wenn eine Erkrankung mit vollständiger Penetranz bereits in jungem Alter untersucht wird (67, 70, 71).

1.3.2 Genetische Varianten als Ursache von Krebserkrankungen im Kindesalter

Wie in 1.2 umrissen, stellen genetische Varianten eine wichtige Ursache für Krebserkrankungen von Kindern und Jugendlichen dar. Obwohl bereits zahlreiche KPSs bekannt sind, liegt die Vermutung nahe, dass für viele weitere pädiatrische Patient*innen Varianten in KPGs noch nicht detektiert oder mögliche KPGs noch nicht als solche identifiziert wurden (60).

Diverse Studien haben die Prävalenz pathogener und wahrscheinlich pathogener Varianten in der Keimbahn an Krebs erkrankter Kinder und Jugendlicher untersucht.

Zhang et al. detektierten 2015 in 8,5% der untersuchten Patient*innen, die jünger als 20 Jahre und an Krebs erkrankt waren, eine pathogene oder wahrscheinlich pathogene Keimbahnvariante durch Gesamtexomsequenzierung (WES) und/oder Gesamtgenomsequenzierung (WGS). In Relation dazu wurden im Rahmen des 1000 Genomes Projects in nur 1,1% solche Varianten identifiziert. Das 1000 Genomes Project umfasste mehr als 2500 Individuen aus 26 Populationen, deren Genom sequenziert wurde, um eine Referenz der genetischen Vielfalt zu repräsentieren. Kinder, die an soliden Tumoren außerhalb des ZNS, z. B. adrenokortikalen Karzinomen, erkrankt waren, stellten darunter die größte Gruppe dar (16,7%). 8,6% litten unter Tumoren des ZNS, z. B. an Gliomen, 4,4% an

Leukämien. Die am häufigsten betroffenen Gene waren *TP53*, *APC*, *BRCA2*, *NF1*, *PMS2*, *RB1* sowie *RUNX1* (12).

Wagener et al. führten im Rahmen der Keimbahnstudie am Universitätsklinikum Düsseldorf Trio-WES durch und identifizierten pathogene Varianten in 11 von 160 Patient*innen (6,9%) sowie VUS in weiteren 11 Patient*innen (41). Weitere Studien detektierten pathogene oder wahrscheinlich pathogene Varianten in 7,6% (40) und 14,6% (72). Bei Kindern und Jugendlichen, die unter soliden Tumoren leiden, wurden in 12% pathogene oder wahrscheinlich pathogene Keimbahnvarianten gefunden (42). In einer nach klinischen und familienanamnestischen Kriterien selektierten Kohorte von 40 an Krebs erkrankten Kindern und Jugendlichen identifizierte man bei 8 eine pathogene oder wahrscheinlich pathogene Variante durch WES (56).

In ca. 90% aller Patient*innen und ca. 80% der Patient*innen mit klinischen Zeichen eines KPS verbleibt unklar, ob keine genetische Prädisposition besteht oder aber diese durch die verwendete Methodik nicht identifiziert werden konnte (12, 40, 41, 56, 72).

Die o. g. Studien untersuchten die Kohorten mittels WES oder WGS und einem zuvor definierten Genpanel. Es umfasst für Zhang et al. etablierte autosomal dominant vererbte KPGs und RASopathie-Gene, autosomal rezessiv vererbte KPGs, Tyrosinkinase-Gene, Tumorsuppressorgene und eine Gruppe weiterer, mit Krebs-assoziiierter Gene (12). Es besteht die Möglichkeit, dass Varianten in Genen, welche noch nicht durch die Genpanels erfasst wurden, eine Krebsprädisposition durch bisher unbekannte Mechanismen bedingen.

WES und WGS zählen zu den Methoden der Next-Generation-Short-Read-Sequenzierung (NGS). Hierbei erfolgt die Sequenzierung von 250–800bp langen klonal amplifizierten DNA Molekülen (73). Für die Detektion von SVs bestehen jedoch eine geringe Sensitivität und eine hohe Rate falsch positiver Ergebnisse. Die Untersuchung komplexer und repetitiver genomischer Regionen, in denen sich häufig Bruchpunkte von SVs befinden, ist nur sehr begrenzt möglich (74).

SNVs sind die am häufigsten auftretenden DNA-Sequenz-Varianten. Jedoch beeinflussen SVs die Genexpression 30-mal häufiger (75). In den o. g. Studien wurde sich zumeist auf die Detektion von SNVs, indels und kleinen SVs (<1kbp) fokussiert (12, 40, 41, 56, 72). Die Identifikation längerer SVs war jedoch nicht möglich.

In einigen Untersuchungen wurde sich außerdem auf die Analyse kodierender Regionen beschränkt (42, 56). Genetische Varianten treten aber auch in den nicht kodierenden Bereichen des Genoms auf und können dort z. B. regulatorische Elemente, die Auswirkungen auf die Genexpression haben, beeinflussen. Enhancer sind in der Lage die Expression eines Gens zu steigern, während die häufig weniger erforschten Silencer die Expression supprimieren können (76, 77).

Außerdem können Syndrome, bei denen epigenetische Veränderungen zur Krebsentstehung führen, beispielsweise das Beckwith-Wiedemann-Syndrom, durch WES und WGS nicht nachgewiesen werden. Um diese zu detektieren, wären Untersuchungen der DNA-Methylierung notwendig (78).

Es gibt also zahlreiche Gründe, anzunehmen, dass die tatsächliche Anzahl der KPSs bei den untersuchten Kindern und Jugendlichen höher liegt als die bisherigen Studien zeigen. Viele Kinder und Jugendliche aus den Untersuchungen erfüllen klinische oder anamnestische Kriterien, die auf ein KPS hindeuten. Es konnte aber keine verursachende Keimbahnvariante gefunden werden (53, 79).

1.4 Methoden zum Nachweis struktureller Varianten

Die ersten SVs wurden bereits 1959 durch Karyotypisierung detektiert. Mit einer Länge von >3 Mbp waren sie unter dem Mikroskop sichtbar und in den meisten Fällen mit Krankheiten, z. B. dem Klinefelter- oder dem Down-Syndrom assoziiert (80). Es handelte sich um seltene Fälle, sodass die Ursache genetischer Variabilität Mitte bis Ende des 20. Jahrhunderts v. a. SNVs und indels zugeschrieben wurde (81).

Gegen Ende der 1980er Jahre wurde eine Methode entwickelt, die spezifische DNA-Sequenzen auf Chromosomen mithilfe fluoreszierender Sonden sichtbar macht, die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH). Dadurch können bekannte Chromosomenanomalien und genetische Umlagerungen gezielt und schnell nachgewiesen werden. Insbesondere submikroskopische, kleine Deletionen, Duplikationen und Mikrotranslokationen werden erkannt, was einen Fortschritt zur Karyotypisierung darstellt. Verwendet man verschiedene Fluorochrome, können mehrere Zielregionen gleichzeitig visualisiert werden. Jedoch ist die Anwendung auf spezifische Zielregionen limitiert. Das gesamte Genom kann nicht abgedeckt und bislang unbekannte SVs können nicht identifiziert werden. Unspezifische Bindungen der Sonden oder mangelnde Hybridisierung können zu falschen Ergebnissen führen. Weiterhin hängt die Interpretation der Ergebnisse stark von der Qualität und Intensität der Fluoreszenzsignale ab (82).

Seit 2004 können mit Hilfe neuer Technologien SVs, welche in der Karyotypisierung nicht sichtbar sind, in phänotypisch auffälligen und unauffälligen Individuen nachgewiesen werden. Erstmals konnte das Genom mit einer Auflösung von 50 kbp auf unbalancierte SVs untersucht werden. Genutzt wurden u. a. Array-basierte CGH (*Comparative Genomic Hybridisation*) und ROMA (*Representational Oligonucleotide Microarray Analysis*), bei welchen DNA-Proben der zu untersuchenden Person sowie der Referenz auf einem Mikroarray hybridisiert und Abschnitte gezielt verglichen werden. Eine absolute Kopienzahl kann aber nicht angegeben werden. Diese Methoden decken außerdem einige Regionen, insbesondere repetitive DNA-Sequenzen, nicht ab. Eine weitere Limitation stellt die Identifikation balancierter SVs, z. B. Inversionen, dar. Im Folgenden wurden SNP-Arrays entwickelt, welche Rückschlüsse auf einige balancierte SVs erlauben (81).

Einen deutlichen Fortschritt erbrachte die Nutzung der NGS. Das Verfahren bietet eine umfassende und detaillierte Analyse des Genoms, die heute sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die klinische Praxis elementar ist. Durch die Sequenzierung des gesamten Genoms (WGS) bzw. Exoms (WES) in 100–150 bp Fragmenten können Abweichungen auf Nukleotidebene festgestellt werden. Erfasst werden somatische- und Keimbahnmutationen, SVs und CNVs. Vorteilhaft ist insbesondere die Detektion kleiner CNVs und balancierter SVs, die mittels der o. g. Methoden nicht identifiziert werden können.

In somatischen Proben können mittels WGS die genomische Instabilität untersucht und komplexe, für Krebs charakteristische SVs erkannt werden. Hierzu zählen Chromothripsis, wobei es durch ein einmaliges Ereignis zu zahlreichen Umlagerungen von Chromosomenabschnitten durch inakkurate DNA-Reparatur kommt, oder Enhancer-*Hijacking*, die genetischen Umlagerung regulatorischer Elemente. Spezifische Mutationssignaturen, die Aufschluss über die Krebsentstehung z. B. durch exogene Faktoren wie Rauchen geben, und virale und bakterielle DNA, die in Krebs, z. B. bei Cervixkarzinomen, integriert ist, können detektiert werden. Im Gegensatz zu WES deckt WGS auch nicht-kodierende Regionen wie Introns und intergenische Bereiche ab, die Promotoren und Enhancer enthalten können. Diese können wichtige regulatorische Funktionen haben und zur Krebsentstehung beitragen (81, 83). Verschiedene Algorithmen werden im Rahmen des WGS oder WES genutzt, um SVs zu detektieren. (1) Mit Hilfe der Lesetiefe kann die Anzahl der Kopien, die einem bestimmten Abschnitt der Referenz entsprechen, bestimmt und somit CNVs, wie Deletionen oder Duplikationen, erkannt werden. (2) Die Betrachtung von Lokalisation und Distanz abnormal zugeordneter *Reads* im Vergleich zur Referenz kann Rückschlüsse auf Bruchpunkte und darauf geben, ob es sich um eine Insertion, Deletion oder Translokation handelt. (3) Weitere Verfahren sind in der Lage, die Bruchpunkte von SVs mit einer Auflösung von 1–10 bp zu identifizieren. (4) Darüber hinaus können durch *De novo*-Assemblierung *Reads* zu längeren Sequenzen zusammengefügt werden, was den Vergleich mit einem Referenzgenom und damit die Detektion von SVs ermöglicht (81).

Es existieren jedoch diverse technische Limitationen der NGS. Durch die kurze Lese-Länge von 100–150 bp ist die Erkennung längerer SVs nicht möglich. Außerdem bestehen Schwierigkeiten in der Sequenzierung repetitiver und komplexer Regionen der DNA, zu denen bis zu 50% des menschlichen Genoms zählen. GC- und AT-reiche Areale bereiten Schwierigkeiten. Für zuverlässige und exakte Ergebnisse sind eine hohe Sequenztiefe sowie eine ausreichende Abdeckung der DNA-Region erforderlich. Durch verschiedene Analyseschemata kann es zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen, was insbesondere bei seltenen und komplexen Varianten der Fall ist. Verglichen mit den bis dato üblichen Methoden werden durch WGS und WES sehr große Datenmengen erzeugt, die umfangreiche Speicherkapazitäten und Rechenressourcen erfordern.

WES ist WGS insofern unterlegen, als dass durch WES lediglich <2% des Genoms, der kodierende Anteil, betrachtet werden. Nicht-kodierende Regionen, die intronischen und intergenischen Areale, machen >98% des Genoms aus und werden durch WGS, aber nicht durch WES abgebildet. Hier bestehen Limitationen in der Interpretation der Daten. Der Einfluss von Varianten, die dort lokalisiert sind, ist nur unzureichend verstanden. Darüber hinaus sind große SVs wie Inversionen oder Translokationen häufig schwer zu interpretieren. Außerdem ist der funktionelle oder klinische Effekt vieler identifizierter Varianten unklar. Auch der Einfluss auf regulatorische Elemente und epigenetische Defekte kann nicht erfasst werden (56, 83).

Während der letzten beiden Jahrzehnte wurde außerdem eine Methode entwickelt, die die konventionellen Sequenziermethoden ergänzt. Long-Read-Sequenzierung (LRS) ermöglicht die Sequenzierung langer DNA-Abschnitte >10 kbp. Das Verfahren bietet eine höhere Auflösung komplexer genomischer Strukturen im Vergleich zu NGS, da repetitive Regionen überspannt und GC-reiche Regionen durch einen *Read* abgedeckt werden. So können darin lokalisierte SVs leichter identifiziert werden (84, 85). Durch Konsensus-*Reads* ist eine SV-Detektion mittlerweile mit einer Genauigkeit von bis zu 99,9% sehr präzise möglich (86). Durch die Analyse nicht-kodierender Regionen können Varianten in regulatorischen Elementen sowie DNA-Methylierungen und andere epigenetische Modifikationen erkannt werden. Eine Überlegenheit der LRS gegenüber NGS zeigte sich insbesondere bei der Detektion von SVs intermediärer Größe (50 bp–2 kbp) (84, 85). LRS erfordert erhebliche Rechenressourcen und ist aktuell sehr teuer, sodass es im Moment für den breiten Einsatz nicht geeignet ist. Bioinformatische Tools zur standardisierten Analyse befinden sich in der Entwicklung (87).

In der Gegenüberstellung von Karyotypisierung und Sequenziertechnologien fällt auf, dass die geringe Auflösung von 3–10 Mbp der Karyotypisierung einen bedeutenden Nachteil darstellt. Mit Hilfe der Methode der optischen Gesamt-Genomkartierung (WGOM), die über eine sehr hohe Auflösung verfügt, konnte dieser Nachteil überwunden werden. Im Kapitel 2.2.1 wird der Ablauf des Verfahrens erläutert. Im Gegensatz zu Array-basierten Verfahren erlaubt WGOM die Erfassung balancierter Varianten wie Inversionen oder balancierter Translokationen. Insbesondere für SVs >1 kbp ist die Visualisierung und Analyse mittels WGOM Sequenziertechnologien überlegen. Die Abdeckung großer, repetitiver DNA-Regionen, wie z. B. segmentaler Duplikationen, ist vorteilhaft. Durch dieses Verfahren ist eine umfassende Untersuchung der DNA auf verschiedenste SVs möglich. Durch die Analyse längerer DNA-Fragmente und die direkte Visualisierung bietet WGOM eine Reduktion von Artefakten im Vergleich zu NGS (88). In vorausgegangenen Studien durch uns und andere Forschungsgruppen hat sich WGOM bereits als hilfreich erwiesen, um SVs in Keimbahnproben zu detektieren (79, 89). In einer Arbeit wurde WGOM mit aktuellen Standardmethoden zur Diagnostik von 627 Patient*innen mit körperlichen Störungen verglichen, darunter kongenitale Anomalien und neurologische Entwicklungsstörungen. Es zeigte sich eine hohe Konkordanz (98,6%) der Ergebnisse (89).

Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe belegen bereits, dass potentiell pathogene SVs, welche durch WES nicht erkannt werden, durch WGOM detektiert werden. Dies wurde bereits für Deletionen in bekannten KPGs sowie für Duplikationen in Kandidatengenomen gezeigt (79, 90).

1.5 Ziele der Arbeit

Die Ursache von Krebserkrankungen im Kindesalter ist in vielen Fällen bis heute unklar. Ein genetischer Hintergrund liegt nahe, konnte aber bei der Mehrzahl der an Krebs erkrankten Kinder mit den bisher verwendeten Methoden nicht nachgewiesen werden. Dabei wurden u. a. große SVs und solche in komplexen Regionen der DNA kaum untersucht (12, 40, 41, 56). Mit Hilfe der WGOM sollen jene nun besser erfasst werden.

Durch die in 1.2.2 genannten Publikationen wurden Kriterien zusammengestellt, die das Vorliegen eines KPS besonders wahrscheinlich machen. Im Rahmen der Arbeit soll von 29 pädiatrischen Patient*innen, auf die jene Kriterien zutreffen, sowie, je nach Verfügbarkeit des Materials, deren Eltern hochmolekulare DNA aus PBMCs bzw. Fibroblasten extrahiert werden. Im Folgenden sollen Markierungen an bestimmten DNA-Sequenzen eingebracht und die DNA in einer Flusszelle in Nanokanälen linearisiert werden. Das detektierte Fluoreszenzmuster soll mit einem Referenzgenom verglichen werden, um Abweichungen als mögliche SVs zu registrieren. Manuell soll jede SV ausgewertet und auf den möglichen Zusammenhang mit einem KPS, beispielsweise durch die Lokalisation in einem KPG, überprüft werden. Liegen Trio-Analysen vor, ist ein Vergleich mit dem Genom der Eltern möglich. Hierbei soll auf *de novo* entstandene SVs und insbesondere bei für Krebserkrankungen auffälliger Familienanamnese auf vererbte SVs geachtet werden.

Die mögliche Pathogenität oder Benignität der SVs soll mittels umfangreicher Analyse und Literaturrecherche beurteilt werden. Um ausgewählte SVs zu validieren und ihren Effekt zu verifizieren, sollen passende Verfahren, u. a. PCR, quantitative PCR (qPCR) und SNP-Array angewandt werden.

Durch diese Arbeit soll das Untersuchungsspektrum der prädisponierenden genetischen Keimbahnveränderungen um strukturelle Varianten erweitert werden. Sie soll zum Verständnis der genetischen Grundlage von Krebserkrankungen bei Kindern und Jugendlichen beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Die Kohorte der Patient*innen

Im Rahmen der seit 2015 bestehenden Keimbahnstudie der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf wurde den hier in Behandlung befindlichen, an Krebs erkrankten Kindern und deren Eltern die Teilnahme an der Studie angeboten, in deren Rahmen die Untersuchungen dieser Arbeit erfolgten (Ethikvotum 4886R, Studienregistrierungsnummer 2014112933, vorgelegt von Prof. Dr. Arndt Borkhardt). Dabei wurden ihnen das Ziel und der Nutzen der Arbeit sowie die Möglichkeit, zu jedem Zeitpunkt ihr Einverständnis zurückziehen zu können, erklärt. In die Kohorte der Keimbahnstudie eingeschlossen wurden Kinder, die im Alter von 0 bis 19 Jahren die Diagnose einer Krebserkrankung erhielten und deren Sorgeberechtigte ihr Einverständnis zur Teilnahme gaben. Auch die Kinder >6 Jahre wurden um ihre Einwilligung gebeten. Im Folgenden wurden, wie in Brozou et al. (39) beschreiben, unter standardisierten Bedingungen umfassende klinische Daten der Patient*innen erhoben, eine Phänotypisierung, eine präzise Analyse und Beschreibung phänotypischer Anomalien, vorgenommen und ein Drei-Generationen-Stammbaum hinsichtlich Tumorerkrankungen erstellt. Dafür wurde eine ausführliche Anamnese mit intensiver Betrachtung der demographischen Daten und der medizinischen Vorgeschichte der Patient*innen durch Pädiater*innen erhoben und eine körperliche Untersuchung durchgeführt. Ermittelt wurden u. a. Informationen bezüglich des Schwangerschaftsverlaufs der Mutter, der Geburt, Anpassung und Entwicklung in der frühen Kindheit. Besondere Betrachtung fanden Zeichen, die auf ein zugrundeliegendes KPS hindeuten und kongenitale Anomalien sowie der Grad der Toxizität im Verlauf der Therapie. Die Daten wurden anhand der durch Jongmans et al. und Ripperger et al. publizierten Kriterien evaluiert (39, 57, 60). Außerdem wurde mittels WES die Keimbahn der Kinder auf für Krebserkrankungen prädisponierende SNVs und indels untersucht. Die Ergebnisse der klinischen Phänotypisierung und der WES waren im Vorfeld dieser Arbeit erhoben worden und standen der Verfasserin dieser Arbeit zur Verfügung. Aus der gesamten Kohorte wurden für diese Arbeit 29 Patient*innen ausgewählt, (1) die mindestens eins der klinischen und anamnestischen Kriterien aufwiesen, die auf ein zugrundeliegendes KPS hindeuten, (2) bei denen in der Keimbahn keine für Krebserkrankungen prädisponierende oder wahrscheinlich prädisponierende pathogene SNV oder indels mittels WES detektiert werden konnte und (3) von denen ausreichend zu untersuchendes Material zur Verfügung stand. Als Ausgangsmaterial dienten periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC), mononukleäre Zellen des Knochenmarks (BMNC) und, im Fall von Leukämie-Patient*innen, Fibroblasten der pädiatrischen Patient*innen und PBMCs deren Eltern. Die Tabelle 1 gibt einen Überblick über die hier untersuchten Patient*innen.

Tabelle 1 Patient*innen-Kohorte und die Analysearten

ID=Identifikationsnummer, ATRT=atypischer teratoider/rhabdoider Tumor, HCC=Hepatozelluläres Karzinom, T-ALL=akute, lymphatische Leukämie der T-Zellreihe, B-ALL=akute, lymphatische Leukämie der B-Zellreihe, AML=akute myeloische Leukämie, ALCL=anaplastisches großzelliges Lymphom, BPDCN=blastische plasmazytoide dendritische Zellneoplasie, MDS=myelodysplastisches Syndrom, Art der Analyse=Single-Analyse bei ausschließlicher Verfügbarkeit des Materials des Kindes, Duo-Analyse beim Vergleich des Materials des Kindes mit einem Elternteil, Trio-Analyse beim Vergleich des Materials des Kindes mit beiden Eltern

ID	Diagnose	Alter bei Erstdiagnose (in Jahren)	Geschlecht	Material	Art der Analyse
P1	ATRT	1,3	männlich	PBMC	Einzel-Analyse
P2	Medulloblastom	4,3	männlich	PBMC	Einzel-Analyse
P3	HCC	9,4	männlich	PBMC	Trio-Analyse
P4	Gliom	0,0	männlich	PBMC	Einzel-Analyse
P5	Nephroblastom	3,0	männlich	PBMC	Trio-Analyse
P6	T-ALL	13,2	männlich	Fibroblasten	Duo-Analyse
P7	AML	3,6	männlich	Fibroblasten	Einzel-Analyse
P8	B-ALL	5,8	männlich	PBMC	Trio-Analyse
P9	pilozytisches Astrozytom	10,1	weiblich	PBMC	Duo-Analyse mit Schwester
P10	Hodgkin-Lymphom	18,5	weiblich	PBMC	Duo-Analyse mit Schwester
P11	T-ALL	3,3	männlich	Fibroblasten	Duo-Analyse
P12	Optikus-Gliom	1,0	männlich	PBMC	Trio-Analyse
P13	AML	16,1	weiblich	Fibroblasten	Trio-Analyse
P14	Medulloblastom & Astrozytom	3,1	weiblich	PBMC	Trio-Analyse
P15	B-ALL	5,6	weiblich	PBMC	Duo-Analyse
P16	AML	2,4	männlich	PBMC	Trio-Analyse
P17	Keimzelltumor	1,2	weiblich	PBMC	Trio-Analyse
P18	B-ALL	1,9	weiblich	PBMC	Trio-Analyse
P19	AML	15,3	männlich	Fibroblasten	Trio-Analyse
P20	T-ALL	3,2	männlich	PBMC	Trio-Analyse
P21	ALCL	13,0	männlich	PBMC	Duo-Analyse
P22	Medulloblastom	2,1	männlich	PBMC	Trio-Analyse
P23	Medulloblastom	9,3	weiblich	PBMC	Trio-Analyse
P24	Myelosarkom	5,3	weiblich	PBMC	Trio-Analyse
P25	T-ALL	11,8	männlich	Fibroblasten	Trio-Analyse
P26	AML	14,8	männlich	Fibroblasten	Trio-Analyse
P27	BPDCN	5,5	männlich	PBMC	Duo-Analyse
P28	MDS	13,4	männlich	Fibroblasten	Trio-Analyse
P29	Rhabdomyosarkom	10,3	weiblich	PBMC	Duo-Analyse

In der vorliegenden Arbeit werden Patient*innen anhand ihrer selbstberichteten oder aus dem klinischen Kontext abgeleiteten Abstammung (Ethnie) sowie ihres Geschlechts gruppiert, um mögliche Unterschiede in z. B. der Anzahl der detektierten SVs zu untersuchen. Diese Gruppierung dient ausschließlich wissenschaftlichen und medizinischen Zwecken und

beabsichtigt keine Diskriminierung oder Stigmatisierung von Personen oder Gruppen. Die verwendeten Begriffe und Kategorien stellen eine Vereinfachung der tatsächlichen, komplexen genetischen, soziokulturellen und geschlechtsspezifischen Vielfalt dar und spiegeln nicht zwangsläufig die individuelle Identität wider. Das arithmetische Mittel wird stets als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben.

2.1.2 Zelllinien für die Verifizierung der strukturellen Varianten

Für die Verifizierung mittels WGOM detektierter SVs wurden PCRs und zur Expressionsanalyse qPCRs durchgeführt. Dabei dienten diverse Zelllinien mit bekannter Expression des zu überprüfenden Gens als Referenz. Neben den Zelllinien HEK-293 und U2OS wurden maligne B-Zelllinien und Hirntumorzelllinien verwendet. Von Patient P1 wurden im Vorfeld dieser Arbeit ATRT-Tumorzellen isoliert und kultiviert, sodass sie als Zelllinie genutzt werden konnten. Darüber hinaus wurden von sechs gesunden Kontrollpersonen PBMCs isoliert.

Tabelle 2 Zelllinien für die Verifizierung struktureller Varianten

Zelllinie	Diagnose
HEK-293	humane embryonale Nierenzelle
Reh	B-Zell-Vorläufer-lymphoblastische Leukämie
RC-K8	B-Zell-Lymphom
U2OS	humane Osteosarkomzelle
U-138-GBM	Glioblastom
UW-228-2	Medulloblastom
Daoy	Medulloblastom
MEB-MED-8a	Medulloblastom
D425 Med	Medulloblastom

2.1.3 Primer für die Verifizierung der strukturellen Varianten

Zum Designen der Primer-Paare dienten die genomischen Sequenzen der *UCSC Genome Bioinformatics* Plattform (<http://genome.ucsc.edu/>). Angestrebt wurde dabei eine Primer-Länge von 18–20 bp, wobei der Gehalt von Guanin- und Cytosin-Basen bei 45–60% liegen sollte. Außerdem sollten in der Region keine Wiederholungen einzelner Basen oder Sequenzen vorliegen. Des Weiteren war erforderlich, dass die Primersequenz nur einmal im menschlichen Genom vorkommt. Dies wurde mit Hilfe der BLAT Analyse anhand des GRCh37-Referenzgenoms überprüft (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>). Die verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins bereitgestellt, in Nuklease-freiem Wasser gelöst und zu einer Konzentration von 1:10 verdünnt. Für das Umschreiben von mRNA zu komplementärer DNA (cDNA) der Proben wurden Oligo(dT)-Primer von der Firma Eurofins (Eurofins MWG Genomics) genutzt. Diese Oligo(dT)-Nukleotide binden, da sie ausschließlich die Base Thymin enthalten, an den Poly-A-Schwanz der mRNA und ermöglichen so einen Ausgangspunkt der Reversen Transkriptase. Im Rahmen der quantitativen Echtzeit-PCR wurde für die *Housekeeping* Gene *HPRT1* und *GUSB* je ein QuantiTect Primermix von QIAGEN (QIAGEN, Hilden, Deutschland) verwendet.

2.1.3.1 Primer für den Nachweis der Deletion in *MSR1*

In Tabelle 3 ist das verwendete Primer-Paar für die Verifizierung einer Deletion des *MSR1*-Gens im Genom der Patientinnen P9 und P10 dargestellt, welche mittels Long-range PCR erfolgte. Für das Wildtyp-Allel war eine Länge des PCR-Produkts von 91366 bp zu erwarten. Auf dem Allel, welches die Deletion trägt, erwarteten wir ein Produkt <15566 bp. Die darunter aufgeführten Primer dienten zur Verifizierung der SV mittels Sanger-Sequenzierung.

Tabelle 3 *MSR1*-Primer

Primer-Name	Primer-Sequenz (5'...3')	Hybridisierungs-Temperatur
MSR1_DEL_F	CGTACAGAGCTAGATCAGCTC	65°C
MSR1_DEL_R	CCATCCAAGTCTCGTCTC	
MSR1_DEL_Seq1	CCTGCAGAGACCATGGAATG	61,6°C
MSR1_DEL_Seq2	CTGGTGGTAGCATGTGGAG	57,6°C

2.1.3.2 Primer für den Nachweis der Deletion in *SPRED1*

Tabelle 4 zeigt das genutzte Primer-Paar für die Verifizierung einer Deletion des *SPRED1*-Gens mittels Touchdown-PCR bei Patient P12. Das PCR-Produkt des Wildtypallels besitzt dabei eine Länge von 3095 bp, während das Produkt des die Variante tragenden Allels 635 bp aufwies.

Tabelle 4 *SPRED1*-Primer

Primer-Name	Primer-Sequenz	Hybridisierungs-Temperatur
SPRED1_PCR_F	GTGCACATGTCAGGAGGC	60°C und 57°C
SPRED1_PCR_R	CATGCCACATTTGAGC	

2.1.3.3 Primer für die Echtzeit-Polymerasekettenreaktionen

Die folgenden Primer wurden für die qPCR-Analysen verwendet. Dazu zählen die Expressionsanalysen von CREBBP für den Patienten P1 und von DKK1 für die Patientin P14. Die Länge der Wildtyp-PCR-Produkte betrug ca. 8800 bp bzw. 1346 bp, während die PCR-Produkte des SV-tragenden Allels 115 bzw. 137 bp lang waren. Für die Expressionsanalyse von RASA4 wurden drei verschiedene Primerpaare designt. Das dritte Paar (RASA4_qPCR_F3, RASA4_qPCR_R3) entspricht dem durch Malone et al. publiziertem (91).

Tabelle 5 Primer für die qPCR

Primer-Name	Primer-Sequenz	Hybridisierungs-Temperatur
CREBBP_qPCR_F	AGTAACGGCACAGCCTCTCAGT	60°C
CREBBP_qPCR_R	CCTGTCGATACAGTGCTTCTAGG	
DKK1_qPCR_F	CGTCACGCTATGTGCTG	60°C
DKK1_qPCR_R	GTTTCCTCAATTTCTCCTCGG	
RASA4_qPCR_F1	GAGATCCACCTGCGGCTG	63°C
RASA4_qPCR_R1	GATGTGCCATTGCGGTCC	
RASA4_qPCR_F2	CTACGCTGCTCTGTGCTG	56°C
RASA4_qPCR_R2	GGTAGCATGACTTCTTCACG	
RASA4_qPCR_F3	AGCGCAGCTCGCTGTACATC	62°C
RASA4_qPCR_R3	GAGTACCAAGTGACACCTGCC	

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien, Puffer und Lösungen

In der folgenden Tabelle 6 werden alle Chemikalien und Reagenzien sowie deren Hersteller aufgelistet, die in dieser Arbeit genutzt wurden. Standard-Chemikalien werden nicht gesondert aufgelistet.

Tabelle 6 Chemikalien und Reagenzien, Puffer und Lösungen

Name der Chemikalie	Hersteller
1M DTT	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
50XTris-Acetat-EDTA	Bio-Rad, München, Deutschland
Agarose für die Gelelektrophorese	Biozym LE, Hessisch Oldendorf, Deutschland
CoralLoad PCR Puffer, 10x	QIAGEN, Hilden, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DNase I	QIAGEN, Hilden, Deutschland
dNTP Mix, 10mM	Promega, Madison, WI, USA
Ethanol	VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
GeneRuler 1kb Plus Ladder (100)	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gel Loading Dye, Purple (6X)	New England BioLabs, Ipswich, MA, USA
GelPilot 1 kb Ladder	QIAGEN, Hilden, Deutschland
GelPilot 1 kb Plus Ladder	QIAGEN, Hilden, Deutschland
GoTaq qPCR Master Mix	Promega, Madison, WI, USA
Histopaque-1077 (Ficoll)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropanol	VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
LongAmp Hot Start Taq 2X Master Mix	New England BioLabs, Ipswich, MA, USA
MgCl ₂	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Midori Grün Advance DNA Stain	NIPPON Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Madison, WI, USA
M-MLV RT 5X Puffer	Promega, Madison, WI, USA
Nuklease-freies Wasser	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung ohne CaCl ₂ und MgCl ₂	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Precision Blue Real-Time PCR Dye (200x)	Bio-Rad, München, Deutschland
QIAGEN 10x concentrated PCR Puffer	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Quick-Load 100bp DNA Ladder	New England BioLabs, Ipswich, MA, USA
Random Primer Mix	Promega, Madison, WI, USA
RDD Puffer	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Recombination Rnasin Ribonuclease Inhibitor	Promega, Madison, WI, USA
Rnasin Ribonuklease Inhibitor	Promega, Madison, WI, USA
Taq DNA Polymerase	QIAGEN, Hilden, Deutschland

2.1.5 Kits

Für diese Arbeit wurden die in Tabelle 7 genannten Kits genutzt.

Tabelle 7 Kits

Name des Kits	Hersteller
BigDye Terminator Version 3.1 Zyklus-Sequenzierungs-kit	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Bionano Prep DLS Labeling Kit	Bionano Genomics, San Diego, CA, USA
SP Bionano Prep Blood and Cell Culture DNA Isolation Kit	Bionano Genomics, San Diego, CA, USA
Bionano SAPHYR CHIP G2.3	Bionano Genomics, San Diego, CA, USA
DyeEx 2.0 Spin Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
SureSelect Human All Exon V5+UTR Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
TruSeq Total RNA Sample Preparation Kit	Illumina, Inc., San Diego, CA, USA
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
QuantiTect Primer Assay	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Qubit dsDNA Broad Range Assay Kit	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland

2.1.6 Instrumente und Ausstattung

Die folgende Tabelle 8 stellt die für diese Arbeit verwendeten Instrumente dar. Dabei werden Standardinstrumente nicht aufgeführt.

Tabelle 8 Instrumente

Name des Instruments	Hersteller
ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Biometra Standard Power Pack P25	Biometra, Analytik Jena, Jena, Deutschland
Bionano Saphyr Optical Genome Mapping Instrument	Bionano Genomics, San Diego, CA, USA
CFX284 Touch Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad, München, Deutschland
Gel iX20 Imager	intrac, Göttingen, Deutschland
HiSeq2500 Sequencing System	Illumina, San Diego, CA, USA
Mini-Zentrifuge Spectralfuge 3-1810	neoLab, Heidelberg, Deutschland
NanoDrop ND 1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Präzisionswaage 824	Kern & Sohn, Balingen, Deutschland
Qubit 2.0 Fluorometer	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Rotator Intelli-Mixer RM-2M	ELMI, Riga, Lettland
Thermocycler T-Gradient Thermoblock	Biometra, Analytik Jena, Jena, Deutschland
ThermoMixer C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vi-CELL BLU Cell Viability Analyzer	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA

2.1.7 Software

Die verwendete Software ist in Tabelle 9 aufgelistet. Dabei wird Standardsoftware nicht genannt.

Tabelle 9 Software

Software	Hersteller
bamstats04	Babraham Bioinformatics, Cambridge, UK
bcl2Fastq v2.19.0	Illumina, San Diego, CA, USA
bedtools v2.16.2	Quinlan Lab, Salt Lake City, UT, USA
Bionano Access Version 1.5.2	Bionano Genomics, San Diego, CA, USA
Bionano Solve Version 3.5.1	Bionano Genomics, San Diego, CA, USA
BioRender Version 2025	BioRender, Toronto, Kanada
CFX Maestro Software	Bio-Rad, München, Deutschland
Chromas Version 2.6.6	Technelysium DNA Sequencing Software, South Brisbane, Australien
GATK v4.1.4.1	Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA, USA
GEL iX20 Imager	Intas, Göttingen, Deutschland
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
NanoDrop 1000	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
platypus v0.8.1	Wellcome Trust Centre for Human Genetics, Oxford, UK
Sequencing Analysis Software	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
trimmomatic v0.33	Usadel Lab, RWTH Aachen, Deutschland
VarScan2 v2.3.9	The Genome Institute, St. Louis, MO, USA

2.1.8 Online-Datenbanken

Genutzte Online-Datenbanken und Algorithmen werden in Tabelle 10 aufgeführt. Durch die kontinuierliche Verwendung der Datenbanken zwischen 03/2021 und 12/2021, kann kein exklusives Datum des Zugriffs genannt werden. Sollten Daten zu einem bestimmten Zeitpunkt extrahiert worden sein, wird dies beschrieben.

Tabelle 10 Online-Datenbanken und Algorithmen

Name	URL
BLAT	http://www.genome.ucsc.edu/cg-bin/hgBlat?hgsid=1518308415_D3BKQjbqbRNEZISpi4o87N810ASI&command=start
Bloodspot	https://www.fobinf.com/
Blueprint	https://www.blueprint-epigenome.eu/
ClinVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/ , heruntergeladen am 12.02.2019
COSMIC	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/ , heruntergeladen am 25.03.2019
dbVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar
DGV	http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home
GeneCards	https://www.genecards.org/
GeneHancer Version 5.0	https://genehancer-staging.azurewebsites.net/
HPO	https://hpo.jax.org/app/
IARC-TP53	https://tp53.cancer.gov/
KEGG Pathway Database	https://www.genome.jp/kegg/pathway.html
LOVD	https://www.lovd.nl/
MalaCards	https://www.malacards.org/
Proteinatlas	https://www.proteinatlas.org/
PubMed	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/
Silencer DB	https://health.tsinghua.edu.cn/
UCSC Genome Browser	http://genome.ucsc.edu/
venny	https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/

2.2 Methoden

Im Folgenden werden die für diese Arbeit angewandten Methoden beschrieben. Dazu zählen WGOM und die Methoden zur Verifizierung der identifizierten SVs.

2.2.1 Analyse von strukturellen Varianten durch optische Gesamt-Genomkartierung

WGOM ermöglicht eine Detektion von SVs (92). Dabei wird, im Unterschied zu zum Beispiel NGS, keine exakte Basensequenz ermittelt, sondern bestimmte DNA-Sequenzen markiert, die in ihrer Gesamtheit eine hochauflösende Karte über das Genom bilden. So ist es möglich, lange, mittels NGS nicht detektierbare strukturelle Varianten auch in repetitiven und hochkomplexen DNA-Regionen zu erfassen. Im ersten Schritt muss dafür intakte, hochmolekulare DNA (>150 kbp) aus Blut oder Fibroblasten des erkrankten Kindes bzw. dessen Eltern isoliert werden. Im weiteren Verlauf werden Markierungen mithilfe des *Direct Label* Enzyms 1 (DLE-1) an ein sechs Basenpaare langes Sequenz-Motiv der DNA eingebracht. Schließlich wird die DNA auf eine Flusszelle geladen und eine Spannung angelegt, durch die die DNA zunächst linearisiert wird und dann durch Nanokanäle läuft, wo die Fluoreszenzsignale aufgenommen werden. Im Vergleich zu einem Referenzgenom werden dann die detektierten Fluoreszenzmuster der einzelnen DNA-Moleküle den verschiedenen Chromosomenabschnitten zugeordnet. Dabei stellt eine Diskrepanz ein Anzeichen für eine strukturelle Variante dar (92). Im Folgenden werden die einzelnen Schritte des WGOM ausführlich beschrieben.

2.2.1.1 Extraktion hochmolekularer DNA

Im Rahmen der Studie standen PBMCs der Patient*innen und deren Eltern zur Verfügung, welche durch eine Mitarbeiterin des Labors vorbereitet und für diese Arbeit genutzt wurden. Die Isolation von PBMCs aus dem Blut erfolgte mit Hilfe des Ficoll-Verfahrens, basierend auf Dichtegradientenzentrifugation. Dieser Schritt wurde gemäß dem etablierten Protokoll in unserer Arbeitsgruppe (Stand 20.01.2020) durchgeführt. Nach der Zentrifugation wurden die mononukleären Zellen an der Grenzfläche zwischen Plasma und Ficoll-Paque entnommen, gewaschen und in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline ohne CaCl_2 und MgCl_2) resuspendiert (93).

Für die Extraktion hochmolekularer DNA wurde das Bionano Prep SP DNA Isolation Kit von Bionano Genomics nach Herstellerangaben (Bionano Prep SP Frozen Human Blood DNA Isolation Protocol) verwendet (94). Zunächst wurde die Zellzahl der Probe, bestehend aus kryokonservierten PBMCs, BMNCs oder Fibroblasten, bestimmt. Dazu wurden die Zellen zunächst in 5 ml PBS aufgetaut und mit Hilfe des Vi-CELL BLU Cell Viability Analyzer (Beckman Coulter) gezählt. Der Zellsuspension wurden 1,5 Mio. viable Zellen für die DNA-Extraktion entnommen und durch Zentrifugieren bei 600 xg und Raumtemperatur (RT) pelletiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Zellpellet vorsichtig in 40 µl DNA-stabilisierenden Puffer,

bestehend aus dem durch Bionano Genomics zur Verfügung gestellten Zell-Puffer und DNA-Stabilisator, resuspendiert und in ein Protein LoBind Reaktionsgefäß übertragen. Zu den Zellen wurde 50 µl Proteinase K und 20 µl Ribonuklease A (RN-ase) gegeben und das Gemisch bei RT für drei Minuten inkubiert. Als nächstes wurden 225 µl Lyse- und Bindungspuffer (LBB) zugefügt und die Probe bei 10 rpm auf dem Intelli-Mixer bei RT für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 10 µl einer 100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid-Lösung (PMSF) hinzugegeben, die Probe fünfmal vorsichtig invertiert und für zehn Minuten bei RT inkubiert. Um die DNA zu fällen, wurden eine Nanobind Disk und 340 µl >99% Isopropanol in jedes Reaktionsgefäß hinzugefügt. Nach fünfmaligem Invertieren des Reaktionsgefäßes und Inkubation bei 10 rpm und RT auf dem Intelli Mixer wurde die Probe für 15 Minuten bei RT inkubiert. Durch Zugabe des Isopropanols wurde die hochmolekulare DNA gefällt, welche sich dann um die Nanodisk winden konnte und als farbloser-weißlicher Faden sichtbar wurde. Um die DNA zu waschen, wurde die durchsichtige Reagenzgefäßhalterung auf dem Kopf stehend mit ihrer magnetischen Basis verbunden und langsam aufgerichtet, sodass die Disk mit der DNA am Magneten gebunden blieb und der Überstand abgenommen werden konnte. Dieser Vorgang wurde nach jedem Waschschrift mit einmal 700 µl Waschpuffer 1 (Ethanol-Konzentration im Waschpuffer 60,61%) und zweimal 500 µl Waschpuffer 2 (Ethanol-Konzentration im Waschpuffer 60%) wiederholt. Anschließend wurde die Disk mit der daran gebundenen DNA mit einem magnetischen Stab in ein frisches Protein LoBind Reaktionsgefäß transferiert, bei bis zu 2000 xg und RT für 5 Sekunden zentrifugiert und die überschüssige Flüssigkeit entfernt. Um die DNA von der Nanodisk zu eluieren, wurde diese für 20 Minuten in 110 µl Elutionspuffer inkubiert. Die DNA-Lösung wurde mit einer breiten Pipettenspitze vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 10 rpm und RT für 1 Stunde und 15 Minuten auf dem Intelli-Mixer homogenisiert. Die hochmolekulare DNA wurde für mindestens 24 Stunden bei 4°C homogenisiert und später bei dieser Temperatur gelagert (94).

2.2.1.2 Messung der DNA Konzentration durch Qubit dsDNA BR Assay

Für die Bestimmung der Konzentration der hochmolekularen DNA wurden das dsDNA Broad Range Assay Kit und das Qubit 2.0 Fluorometer verwendet (95). Aufgrund der hohen Viskosität der DNA-Lösung wurden zur Konzentrationsbestimmung je Probe drei Messungen durchgeführt, wobei DNA-Lösung von drei unterschiedlichen Positionen im Reaktionsgefäß entnommen wurde und der Mittelwert aus den drei Messwerten für die weiteren Analysen genutzt wurde. Die Entnahme der DNA-Probe erfolgte mit Hilfe einer Direktverdrängungspipette und Kapillarkolbenspitzen, die besonders präzise Ergebnisse beim Pipettieren visköser Flüssigkeiten erlauben. Zunächst wurde für die Arbeitslösung das Qubit dsDNA Broad Range Reagenz 1:200 im Qubit dsDNA Broad Range Puffer verdünnt. Dann wurden die Proben vorbereitet. Für die Standardkontrollen wurden von der fertigen Lösung je 10 µl des Qubit Standards 1 bzw. 2 in die jeweiligen Reaktionsgefäße vorgelegt und 190 µl Arbeitslösung hinzugefügt. Von den zu messenden Proben wurde 2 µl DNA-Lösung, wie oben beschrieben, entnommen und

198 µl Arbeitslösung hinzugefügt. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei RT wurden zunächst die Standardkontrollen 1 und 2 am Qubit 2.0 Fluorometer gemessen, um eine Standardkurve zu erhalten anhand derer die Konzentration der Proben bestimmt wurde. Danach wurden die DNA-Proben gemessen. Nur Proben, bei denen die mittlere DNA-Konzentration zwischen 36 und 150 ng/µl lag und die Variantenkoeffizienz $<0,25$ zwischen den 3 Messwerten betrug, konnten für die weiterführenden Untersuchungen genutzt werden.

2.2.1.3 Markierung der hochmolekularen DNA

Um die DNA zu markieren, wurden das Bionano Prep Direct Label and Stain (DLS)-Kit nach Herstellerangaben (Bionano Prep Direct Label and Stain (DLS) Protocol) verwendet (96). Die Durchführung wird im Folgenden kurz erläutert. Das Enzym DLE-1 lagert dabei das Fluorophor DL-Grün kovalent an ein spezifisches, 6 Basenpaare langes Sequenzmotiv der DNA an, ohne deren Struktur zu zerstören. Auf einer Länge von 100 kbp finden sich dann 8–15 Markierungen. Zunächst wurden 750 ng der hochmolekularen DNA in ein Reaktionsgefäß gegeben und für ein finales Reaktionsvolum von 21 µl ggf. mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt. Dann wurden 6 µl 5x DLE-1 Puffer, 1,5 µl 20x DL-Grün und 1,5 µl 20x DLE-1 Enzym hinzugegeben und die Probe bei 37°C für zwei Stunden vor Licht-Exposition geschützt inkubiert. Anschließend wurde ein Proteinase K-Verdau durchgeführt. Dazu wurde 5 µl Proteinase K hinzugefügt und die Probe bei 50°C für 30 Minuten inkubiert. Zur Aufreinigung der DNA, wurden zunächst 25 µl 1x DLE-1-Puffer ins Zentrum einer Vertiefung einer DLS-Mikroplatte gegeben und mit Hilfe einer Pinzette eine DLS-Membran darüber platziert. Auf die Membran wurde daraufhin die gesamte markierte DNA pipettiert. Im Folgenden wurde die Mikroplatte verschlossen und für eine Stunde vor Licht geschützt bei RT gelagert. Dieser Schritt wurde mit einer neuen Membran wiederholt, wobei die Inkubationszeit 30 Minuten betrug. Das gesamte Volumen, ca. 35 µl, der DNA-Lösung wurden von dem Membran-Überstand in eines der DLS Rund-Boden-Reaktionsgefäße transferiert. Zum Anfärben der gesamten DNA wurden 15 µl 4x Flow-Puffer, 6 µl 1M Dithiothreitol, 3,5 µl DNA-Färbelösung und 15,5 µl Nuklease-freies Wasser zur DNA-Suspension gegeben und die Proben auf einem Intelli-Mixer bei 5 rpm und RT für eine Stunde inkubiert. Zum Schluss wurde erneut die Konzentration der nun markierten DNA mit Hilfe des Qubit 2.0 Fluorometers wie oben beschrieben bestimmt. In diesem Schritt wurde an Stelle des Broad Range-, das Hoch-Sensitivitäts- (HS) Assay Kit (ThermoFisher Scientific) verwendet mit HS Standards, dem HS Lösungs-Puffer und dem HS-Programm des Fluorometers (97). Nach der Färbung sollte die DNA-Konzentration 412 ng/µl bei einem Variationskoeffizienten von $<0,25$ betragen, damit sie für weiterführende Analysen genutzt werden kann. Die gefärbte DNA wurde bei 4°C vor Licht geschützt gelagert (96).

2.2.1.4 Beladung des Bionano Saphyr Chips

Die markierte und angefärbte DNA wurde mit Hilfe des Bionano Saphyr Optical Genome Mapping Geräts analysiert. Dazu wurden 8,5 µl der markierten, hochmolekularen DNA auf eine

Flusszelle des Saphyr Chips G2.3 geladen. Nach zwei Minuten wurden 11 µl der DNA-Probe in die Ausflussöffnungen gegeben, so dass sich die von den Öffnungen ausgehenden Kanäle der Flusszelle vollständig füllten. Außerdem wurden 5 µl Nuklease-freies Wasser in das Hydrations-Reservoir auf der Seite der Ausflussöffnung und, bis eine flache Oberfläche gegeben war, in die Ein- und Ausflussöffnungen pipettiert. Daraufhin wurde die Flusszelle vorsichtig verschlossen. Nach vollständigem Beladen des Saphyr Chips wurde dieser in den Bionano Saphyr eingespannt und die Analyse mit einem Ziel-Durchsatz von 420 Gbp und einer angestrebten minimalen Abdeckung von 80x gestartet (98).

2.2.1.5 Qualitätskontrolle

Sobald die Datenerhebung der Proben am Bionano Saphyr abgeschlossen war, wurde eine erste Qualitätskontrolle durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Parameter der einzelnen Proben überprüft, die im Folgenden kurz vorgestellt werden (99). In Tabelle 40, Tabelle 41 und Tabelle 42 im Anhang dieser Arbeit sind die einzelnen Qualitätsparameter aller untersuchten Patient*innen und deren Eltern aufgelistet. Der N50-Wert beschreibt ein Kontinuitätsmaß der Längenverteilung. Um ihn zu berechnen werden die längsten Moleküle der Untersuchung addiert, bis 50% der Gesamtlänge aller Moleküle erreicht sind. Die letzte dafür addierte Moleküllänge entspricht dem N50-Wert. Idealerweise sollte der N50-Wert aller Moleküle ≥ 150 kbp, in dieser Untersuchung >230 kbp liegen. Die durchschnittliche *Map Rate*, der Anteil der Moleküle ≥ 150 kbp, die zum humanen GRCh38-Referenzgenom (hg38) aligniert werden konnten, sollte zwischen 70% und 90% betragen. Die durchschnittliche Markierungs-Dichte (*label density*) pro 100 kbp der DNA-Fragmente sollte 14–17 betragen. Außerdem wird direkt nach Fertigstellung der Datenerhebung ein ungefährender Wert der effektiven genomischen Abdeckung angegeben, welcher $\geq 80x$ bei Keimbahnproben sein sollte. Weitere Qualitätsmerkmale stellen die durchschnittliche positive und negative Markierungs-Varianz dar, welche den Anteil der Markierungen der untersuchten DNA, die von der Referenz abweichen (positiv–mehr als in der Referenz, negativ–weniger als in der Referenz) beschreiben. Die positive Markierungs-Varianz sollte 3–10% betragen, während die negative Markierungs-Varianz zwischen 6% und 15% liegen sollte (99).

Entsprach eine der Proben nicht diesen Qualitätsparametern, wurde diese von weiterführenden Untersuchungen ausgeschlossen. Von besonderer Relevanz waren dabei qualitativ hochwertige Daten der Indexpatient*innen. Falls es noch Restmaterial gab, wurde die Analyse mit dem Bionano Saphyr wiederholt. Bei manchen Proben existierte jedoch nicht genug Restmaterial, so dass eine Wiederholung nicht möglich war. In diesem Fall wurden geringe Abweichungen von den Qualitätsparametern, beispielsweise der Proben der Eltern, geduldet. Dies traf auf drei Proben, je eines Elternteils von P8, P17 und P20 zu.

2.2.1.6 Analyse der DNA und Prozessieren der Daten

Abb. 4 zeigt das Verfahren des WGOM. Mit Hilfe des Bionano Saphyrs ist es möglich, einzelne, markierte DNA-Fragmente darzustellen. Dabei wird über ein Spannungsfeld die Bewegung der DNA in der Flusszelle gesteuert, wodurch sie zunächst durch einen Gradienten aus Mikro- und Nanostrukturen geleitet wird. Hier wird die hochmolekulare DNA linearisiert, um dann in die Nanokanäle eingefädelt zu werden. Sobald in einem Nanokanal ein einzelnes, linearisiertes DNA-Molekül vorliegt, wird dieses mit der hochauflösenden Saphyr Kamera aufgenommen. Dabei wird, wie im zweiten und vierten Schritt in Abb. 4 gezeigt ist, die DNA als Faden mit Markierungen durch das DLE-1 Enzym sichtbar.

So können mehr als 25 Gbp pro Stunde und Flusszelle abgebildet werden.

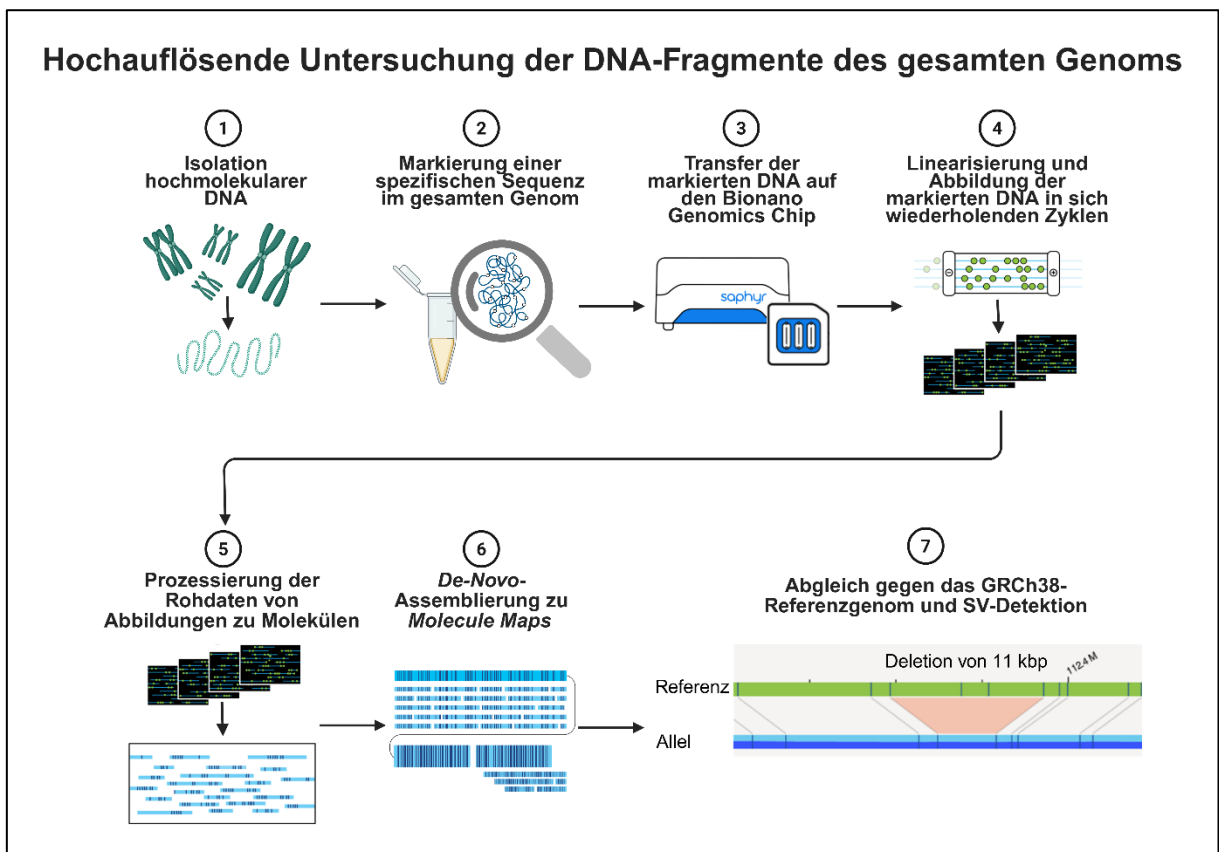


Abb. 4 Hochauflösende Untersuchung der DNA-Fragmente des gesamten Genoms

Schematische Darstellung der typischen Arbeitsschritte der Bionano Genomics Optischen Gesamt-Genomkartierung, einschließlich DNA-Isolation, fluoreszenter Markierung spezifischer Sequenzmotive, Nanokanalanalyse zur Erfassung langer DNA-Moleküle, Assemblierung der optischen Karten, Vergleich mit einer Referenzsequenz und Detektion von SVs. Hiermit erfolgt eine hochauflösende Untersuchung der DNA-Fragmente des gesamten Genoms. Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt und nach Bionano Genomics modifiziert (100). Die Nutzung erfolgt im Einklang mit der akademischen Lizenzvereinbarung von BioRender.

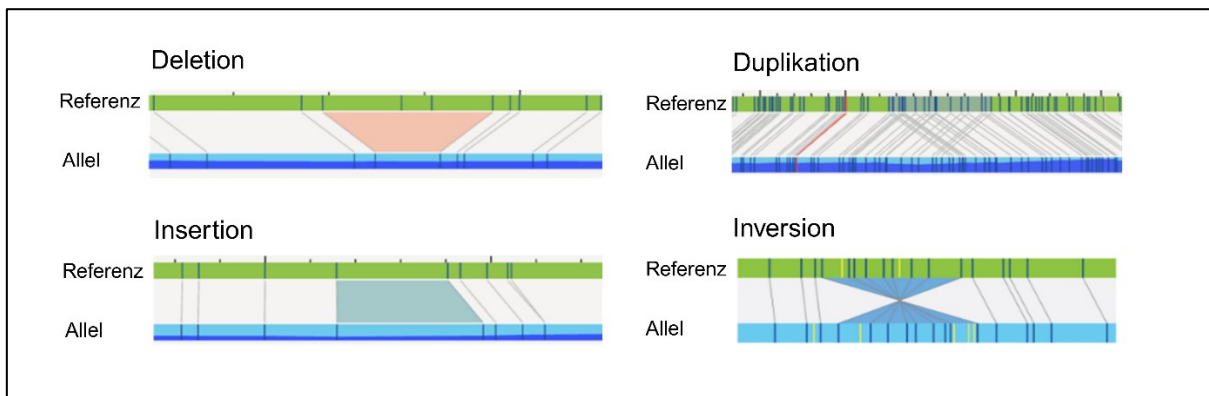


Abb. 5 Darstellung einer Deletion, Insertion, Duplikation und Inversion durch Bionano Genomics

In jedem der vier Teile der Abbildung entspricht der obere Balken dem GRCh38-Referenzgenom (hg38) und der untere dem durch die SV betroffenen Allel. Die vertikalen Striche auf diesen Balken entsprechen den durch WGOM eingefügten Markierungen. Im oberen linken Teil der Abbildung ist der Abstand zwischen zwei Markierungen auf dem Allel im Vergleich zur Referenz verringert. Zudem fehlt eine dazwischen liegende Markierung. Dies spricht für eine Deletion genetischen Materials.

Im unteren linken Teil der Abbildung besteht ein Zugewinn genetischen Materials, der sich durch einen vergrößerten Abstand zwischen zwei Markierungen auf dem Allel im Vergleich zur Referenz zeigt. Dies ist bei einer Insertion der Fall. Im oberen rechten Teil der Abbildung ist eine Verdopplung von Markierungen auf dem Allel im Vergleich zur Referenz gezeigt, was für eine Duplikation spricht. Der untere rechte Teil der Abbildung zeigt eine Umkehr von Markierungen auf dem Allel im Vergleich zur Referenz. Dies entspricht einer Inversion. Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt. Die Nutzung erfolgt im Einklang mit der akademischen Lizenzvereinbarung von BioRender.

Anhand der einzelnen Moleküle kann mit Hilfe der Motiv-spezifischen Markierungsmuster der Gesamt-Genom-Aufbau rekonstruiert werden. Zum Prozessieren der Rohdaten wurde die Bionano Solve Software (v. 3.5.1) genutzt, welche auf dem Rechencluster der Heinrich-Heine Universität verwendet wird.

Zur Visualisierung und Auswertung wurde die Bionano Access Software (v. 1.5.2) genutzt (101). Die Prozessierung der Rohdaten erfolgte in zwei Schritten anhand der Standardeinstellungen. Zunächst wurden die Moleküle mit Hilfe des De Novo Algorithmus zu sogenannten *Molecule Maps* angeordnet, die dann im nächsten Schritt gegen das GRCh38-Referenzgenom abgeglichen wurden. Im Folgenden wurden anhand dieser *Molecule Maps* Abweichung zur Referenz detektiert, die strukturelle Varianten, wie Deletionen (≥ 500 bp), Insertionen (≥ 500 bp), Duplikationen, Inversionen und Translokationen, darstellen (102).

Dabei handelt es sich um eine Insertion, wenn, wie in Abb. 5 gezeigt ist, zusätzliche Markierungen oder eine größere Distanz zwischen zwei Markierungen im Vergleich zum Referenzgenom detektiert werden. Hierbei ist zu beachten, dass eine Insertion auch u. U. eine Duplikation sein kann, die jedoch aufgrund der Auflösung nicht als solche detektiert werden kann. Duplikationen stellen sich, wie auf der rechten Seite zeigt, als Wiederholungen von vorhandenen Markierungsmustern dar. Ist die Anzahl der Markierungen oder die Distanz zwischen zwei Markierungen reduziert, handelt es sich um eine Deletion. Von Inversionen spricht man bei einer Umkehr des Markierungsmusters der Proben-DNA im Vergleich zur Referenz, was im unteren, rechten Abschnitt der Abb. 5 zu erkennen ist. Als Translokationen werden solche

Muster bezeichnet, bei denen die Markierungen auf zwei unterschiedlichen Chromosomen liegen oder mehr als 5 Mbp voneinander getrennt vorliegen, wobei es sich bei Letzteren eher um intrachromosomale Deletionen handelt (101).

Außerdem ist es möglich, mit dem De novo (*alignment*) Algorithmus, nicht vererbte, *de novo* entstandene SVs zu detektieren, indem die bei den Patient*innen identifizierten SVs in den Bionano Genomen der Eltern abgeglichen werden (Trio Analyse). Dies war jedoch nur möglich für die Proband*innen, bei denen beide Elternteile analysiert werden konnten. Neben dieser Sequenz-basierten SV-Detektion, enthält der De Novo Algorithmus noch den Kopienzahl-basierten Algorithmus. Hier werden anhand der Abdeckung der Genomregion unbalancierte Kopienzahlveränderungen wie Zugewinne und Verluste detektiert, die ≥ 500 kbp sind (102).

Mit Hilfe des Varianten Annotations Algorithmus, werden die detektierten SVs annotiert und gefiltert. In die für diese Arbeit durchgeführten Analysen wurden Insertionen und Deletionen mit einer minimalen Länge von 500 bp einbezogen. Varianten wurden inkludiert, wenn ≥ 5 Moleküle sie unterstützten. Hierbei wurde für die Fälle, bei denen ein oder beide Elternteile analysiert wurden, die Duo oder Trio-Annotation ausgewählt. Dazu werden die bei der*dem Indexpatient*in identifizierten SVs mit denen der Eltern abgeglichen. So erhält man die Information, ob eine SV von einem der Elternteile vererbt wurde oder *de novo* entstanden ist (103).

2.2.1.7 Auswertung und Interpretation

Im nächsten Schritt wurden nun die Daten ausgewertet und die identifizierten SVs bewertet. Zunächst wurden dazu Filterkriterien angewandt, um falsch-positive SVs, Polymorphismen sowie Artefakte zu exkludieren. Der Längen- und Konfidenzfilter wurde wie folgt angewandt:

Tabelle 11 Längen- und Konfidenzfilterkriterien

SV-Typ	Minimale Länge	Konfidenzscore
Insertion	500 bp	0,1
Deletion	500 bp	0,1
Duplikation		-1
Inversion		0,1
Translokation		0,1

Als Nächstes wurden die SVs inkludiert, die in weniger als 1% der von Bionano Genomics zur Verfügung gestellten Kontrollen vorkamen. Diese umfassen Proben von nicht verwandten, offenbar gesunden Personen (103). Um weitere Polymorphismen zu filtern, wurden die detektierten Varianten mit der dbVar Datenbank des National Center of Biotechnology Information NCBI für Varianten >50 bp, und der Database of Genomic Variants, (DGV)-abgeglichen (70). Die Datenbanken geben Rückschluss auf das Vorkommen von u. a. SVs (Deletionen, Duplikationen, Inversionen) in der Normalbevölkerung und ermöglichen so die Differenzierung zwischen selteneren SVs und Polymorphismen ($\geq 1\%$ der Normalbevölkerung). Bei der Betrachtung wurde auf eine Überlappung der detektierten SV mit der in den Datenbanken beschriebenen SV geachtet. Es wurde geprüft, ob die SV-Typen einander entsprechen und ob eine

vergleichbare Basenpaar-Länge vorliegt. Im nächsten Schritt wurden die verbliebenen SVs manuell analysiert, indem deren Plausibilität anhand der Betrachtung der einzelnen Karten geprüft wurde. Dabei wurde auf das Fehlen (Deletion) oder das zusätzliche Vorkommen (Insertion, Duplikation) sowie die korrekte Verknüpfung der Markierungen (Inversion, Translokation) zwischen den einzelnen Karten geachtet. Varianten wurden, wenn sie in Regionen mit zahlreichen Molekülabbrüchen lokalisiert waren, exkludiert. Außerdem wurden die SVs ausgeschlossen, die in Zentromer- und Telomer-Regionen sowie in segmentalen Duplikationen oder Genomischen Lücken (Gaps) vorkommen, basierend auf der Bionano Genomics hg38 DLE-1 mask Information.

Im nächsten Schritt wurden zu den SVs verschiedene genetische und biologische Informationen mit Hilfe von verschiedenen Datenbanken annotiert. Zunächst wurde überprüft, ob die SVs mit Genen überlappen. Hierzu dienten die durch Bionano Genomics zur Verfügung gestellten Informationen der hg38 RefSeq Curated Regions, die mit einer Präzision von 20 kbp die Überlappung mit Genen angeben (104). Zusätzlich wurde jede Region manuell im UCSC Genome Browser überprüft, wobei die Datenbank NCBI RefSeq and Ensembl transcripts from the MANE Project (v1.0) genutzt wurde (105). Mit Hilfe dieser Daten konnte die genaue Lokalisation der SVs differenziert werden: Gen-betreffend (intronisch und exonisch) und nicht Gen-betreffend (intergenisch). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Bruchpunkte der SVs, die die Bionano Genomics Software ausgibt, keine exakten genomischen Angaben sind, sondern vielmehr einen Bereich angeben, in dem die SV lokalisiert ist.

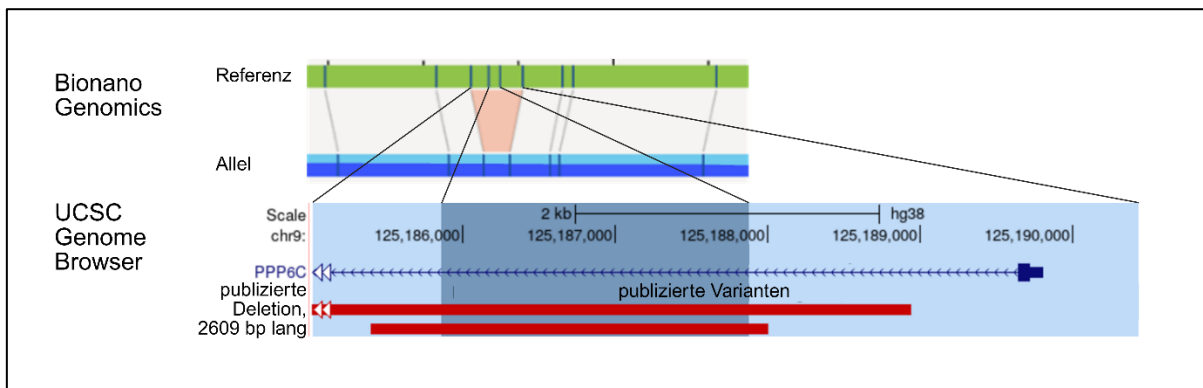


Abb. 6 Lokalisation der Bruchpunkte am Beispiel einer Deletion auf Chr9 (q33.3) im ersten Intron des PPP6C-Gens

Im oberen Teil der Abbildung ist die optische Genomkartierung des Patienten P12 im Bereich Chr9:125,185,009–125,190,453 bp (hg38) dargestellt. Der oberste, grüne Balken entspricht der Kartierung des GRCh38-Referenzgenoms und der darunter gezeigte, blaue der Kartierung des von der Deletion betroffenen Allels. Deutlich wird, dass zwei Markierungen auf dem Allel im Vergleich zur Referenz fehlen und der Abstand zwischen den verbleibenden Markierungen verkürzt ist. Dies entspricht einer ca. 2650 bp großen Deletion.

Der untere Teil der Abbildung zeigt in hellblau die durch WGOM erfasste Region, die das erste Exon und erste Intron des PPP6C-Gens umfasst. Anhand der Lokalisation der im WGOM fehlenden Markierungen kann geschlussfolgert werden, dass der dunkelblau markierte Bereich sicher deletiert ist. Außerdem sind bereits in der Literatur beschriebene SVs in der Region angezeigt, die durch die roten Balken ganz unten repräsentiert werden. Darunter ist eine 2609 bp große Deletion, um die es sich möglicherweise bei der im Patienten P12 detektierten Deletion handelt. Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt. Die Nutzung erfolgt im Einklang mit der akademischen Lizenzvereinbarung von BioRender.

Für Deletionen wird die genomische Position der äußeren Markierungen angegeben, zwischen denen sich die SV befindet. Für Duplikationen wird die Lokalisation der äußeren duplizierten Markierungen angegeben, wobei die tatsächlichen Bruchpunkte meist über diese Region hinausreichen. Daher ist oftmals nicht eindeutig, ob eine SV tatsächlich mit einem Exon überlappt, um dies kenntlich zu machen wird in dieser Arbeit der Begriff „potentiell exonisch“ verwendet. Abb. 6 gibt ein Beispiel für eine Deletion auf Chr9 (q33.3). Der hellblau markierte Bereich entspricht der ca. 5,5 kbp langen Region zwischen den äußeren, erhaltenen Markierungen, in welchem das erste Exon sowie das erste Intron des Gens *PPP6C* lokalisiert sind.

In dieser Region befindet sich die ca. 2,7 kbp lange Deletion. Die auf dem Allel im Vergleich zur Referenz fehlenden Markierungen ermöglichen einen Rückschluss auf den deletierten Bereich. Die Region zwischen den fehlenden Markierungen ist dunkelblau gefärbt. Sie ist sicher deletiert. Die tatsächlichen Bruchpunkte der Deletion befinden sich also zwischen den äußeren, erhaltenen Markierungen und den inneren, fehlenden Markierungen. Im in Abb. 6 gezeigten Beispiel konnte diese Annahme durch eine von Conrad et al. publizierte Variante bestätigt werden (106).

Außerdem wurde überprüft, ob die SVs mit bekannten regulatorischen Elemente überlappen. Dies wurde mit Hilfe der GeneHancer (Version 5.7) Datenbank im UCSC Genome Browser untersucht (107). GeneHancer fasst die bisher durch die Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE), die Ensembl Datenbank (Version 82), die functional annotation of the mammalian genome (FANTOM) Datenbank und den VISTA Enhancer Browser beschriebenen regulatorische Elemente zusammen und stellt auch die Verbindung zu beeinflussten Genen her (76). Bedeutsam ist zudem der gewebespezifische Effekt regulatorischer Einheiten. Für diese Arbeit waren Enhancer und Promoter interessant, die auf die Genexpression im Ausgangsgewebe der Tumorerkrankung einwirkten. Für Kinder, die an hämatologischen Krebserkrankungen litten, wurden außerdem epigenetische BLUEPRINT Daten in die Analysen einbezogen (108).

Nach der Annotation der SVs wurden zunächst jene näher betrachtet, die mit bekannten KPGs überlappen. Die Liste der untersuchten Gene umfasste solche KPGs, die von Zhang et al. als ursächlich für autosomal-dominant und autosomal-rezessiv vererbte KPSs und als Tumorsuppressor-Gene beschrieben wurden. Zudem wurden Gene, die mit RASopathien assoziiert sind, einbezogen (Gruppe I) (12, 109-111). Darüber hinaus wurden Gene inkludiert, die in verschiedenen anderen Keimbahnstudien oder durch ihre Kodierung für diverse Kinasen eine Assoziation zu Krebs-Prädisposition aufwiesen (Gruppe II). Weiterhin wurden Gene aufgelistet, in denen wahrscheinlich Krebs-prädisponierende Keimbahnvarianten beschrieben wurden (Gruppe III) (12, 40, 56, 111). Im nächsten Schritt wurde für jede potentiell exonisch oder intronisch lokalisierte SV, die nicht mit einem KPG überlappt, eine umfangreiche Recherche zur Funktion und möglicher Krankheitsassoziation des Gens durchgeführt. Die Plattform GeneCards (Version 5.10.0) nutzt dafür Daten von z. B. UniProtKB oder der Entrez Molecular Se-

quence Database, welche u. a. Aufschluss über die Proteinstruktur und -funktion, die Expression in verschiedenen Geweben und die Auswirkung von Varianten in den Genen geben (112-114). MalaCards (Version 5.10.0.601) beschreibt detailliert Syndrome und Krankheitsbilder sowie damit assoziierte Gene (115). Um die Expression der betroffenen Gene im Ausgangsgewebe der Tumorerkrankung bzw. in Leukämien zu erfassen, wurden die Plattformen The Human Protein Atlas (Version 21.1) und Bloodspot verwendet (116, 117). Die Rolle von Genen innerhalb für Krebserkrankungen relevanter Signalwege wurde mit Hilfe der KEGG Pathway Datenbank ermittelt (118). Da viele Patient*innen zusätzlich zur Tumorerkrankung phänotypische Auffälligkeiten zeigten, wurde die Assoziation dieser zu potentiell betroffenen Genen mittels Human Phenotype Ontology (hpoweb@1.7.15) ermittelt (119). Alle übergeordneten wie auch detaillierten Fragestellungen u. a. zu der Funktion der Proteine, deren Zusammenwirken in Bezug auf Tumorerkrankungen, den Auswirkungen veränderter Expression und der Publikation von Keimbahn- und somatischen Varianten sowie deren Wirkung wurden zudem mittels PubMed der National Library of Medicine recherchiert (120).

Abb. 7 zeigt eine zusammenfassende Übersicht über den Arbeitsablauf des Filterns der durch WGOM detektierten SVs. Nachdem die Qualitätskontrolle der Daten u. a. anhand des N50 der Moleküllänge, der Dichte der Markierungen und der Abdeckung vorgenommen wurde, konnte je nach Verfügbarkeit des Materials der Eltern eine Trio-, Duo- oder Singelanalyse durchgeführt werden. Mehrere Tausend SVs wurden in jedem Patienten und jeder Patientin identifiziert. Diese wurden u. a. nach den auf der rechten Seite in Abb. 7 ersichtlichen Kriterien gefiltert, was die mittlere Anzahl der SVs pro Patient*in auf $64 \pm 24,2$ verringerte. Nach der manuellen Exklusion von Artefakten verblieben im Mittel $53 \pm 21,8$ zu untersuchende SVs pro Patient*in. Diese konnten anschließend in *de novo* entstandene, mit einem KPG überlappende und alle weiteren SVs differenziert werden.

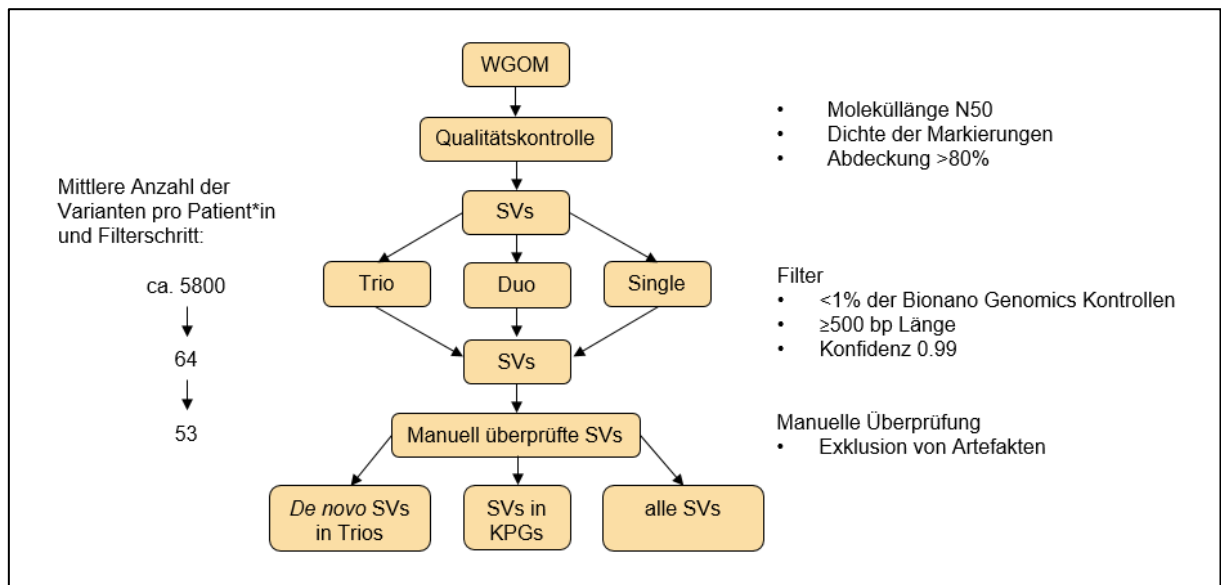


Abb. 7 Arbeitsschritte zur Überprüfung und Filterung der mittels WGOM detektierten SVs

Gezeigt sind die Arbeitsschritte, die zu einer Filterung und Überprüfung der durch WGOM detektierten SVs beitragen. Es erfolgt zunächst eine Qualitätskontrolle nach den in 2.2.1.5 erläuterten Kriterien. Je nach Verfügbarkeit genetischen Materials der Eltern können Trio- (Material der Patient*innen und beider Elternteile), Duo- (Material der Patient*innen und eines Elternteils) und Single-Analysen (Material der Patient*innen) erfolgen. Vor Anwendung der in 2.2.1.7 erklärten Filterschritte betrug, wie links gezeigt ist, die mittlere Anzahl der SVs pro Patient*in ca. 5800. Durch die Filterkriterien konnte diese auf 64 reduziert werden. Nach Exklusion von Artefakten wurden im Mittel 53 SVs pro Patient*in ausgewertet. In Trio-Analysen konnten *de novo* entstandene SVs identifiziert werden. Weiterhin wurden SVs in KPGs betrachtet sowie alle weiteren SVs.

2.2.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion

Für die PCRs wurde einerseits die durch das Bionano Prep Blood and Cell Culture DNA Isolation Kit extrahierte DNA verwendet. Diese wurde, um die Komplexität der hochmolekularen DNA zu verringern, mit Hilfe des Vortex Genie 2 zerkleinert.

Andererseits wurde, wie in den folgenden Kapiteln beschrieben ist, RNA extrahiert und daraus cDNA synthetisiert, die in den PCR-Versuchen genutzt wurde.

2.2.2.1 RNA-Extraktion

RNA wurde mit Hilfe des QIAGEN RNeasy Mini Kits nach Herstellerangaben (121) aus diversen Zelllinien und peripheren kryokonservierten PBMCs der Patient*innen, deren Eltern und gesunder Kontrollen verwendet. Dafür wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, mit Hilfe des Vi-CELL BLU Cell Viability Analyzers gezählt und maximal $1 \cdot 10^7$ Zellen in RNeasy Lysis (RLT) Puffer, der mit 1M Dithiothreitol (DTT) versetzt wurde, lysiert. Um die Plasmamembranen zu zerstören, wurde die Lösung mehrfach mit Hilfe der Pipette vermischt. Die zugefügte Menge des RLT Puffers und des DTTs richtete sich dabei nach der eingesetzten Menge an Zellen. Im Folgenden war eine Homogenisierung des Lysats notwendig, um dessen Viskosität zu verringern. Dabei wurden die hochmolekularen Zellanteile getrennt, indem die Lösung in QIAshredder spin Säulen gegeben und für zwei Minuten bei RT und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert wurde. Das Lysat wurde in einem Reaktionsgefäß aufgefangen und mit einem Volumen 70-%igen Ethanol versetzt. Das Gemisch wurde in einer RNeasy spin Säule mit einem Auffanggefäß platziert und für 15 Sekunden bei RT und 8000 xg zentrifugiert, wobei der Durchfluss entfernt werden konnte. Im Folgenden wurde ein DNase Verdau vorgenommen, wozu zunächst eine Waschung mit 350 µl RW1 Puffer erfolgte. Danach wurde die Membran der Säule mit einem Gemisch aus 10 µl DNase I stock Lösung und 70 µl RDD Puffer für 15 Minuten bei RT inkubiert, bevor ein weiterer Waschschrift mit 350 µl RW1 Puffer folgte. Anschließend wurde die Membran der Säule in zwei Schritten mit jeweils 500 µl RPE Puffer gewaschen, um sicher zu stellen, dass keine Ethanolreste mehr vorhanden waren. Nachdem auch der RPE Puffer vollständig entfernt wurde, konnte die RNA durch die Zugabe von 30–50 µl Nuklease-freiem Wasser und das Zentrifugieren für eine Minute bei 8000 xg und RT eluiert werden (121).

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung der RNA

Im Anschluss wurde die RNA-Konzentration spektrophotometrisch nach Herstellerangaben mit Hilfe des NanoDrops bestimmt (122), wobei dieser aufgrund des gleichen Absorptionsmaximums keine Differenzierung zwischen RNA und DNA zulässt. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren entspricht ca. 260 nm (A_{260}), während Proteine ein Absorptionsmaximum von ca. 280 nm (A_{280}) aufweisen. Somit ist eine Differenzierung der beiden Absorptionsmaxima,

damit dieser Bestandteile der Lösung und eine Aussage über deren Reinheit möglich. Anzustreben ist ein Verhältnis A260/A280 von 1,8-2,0. Eine Restkontamination mit DNA ist jedoch mit dieser Methode aus den oben genannten Gründen nicht auszuschließen.

2.2.2.3 cDNA-Synthese

Im nächsten Schritt wurde die extrahierte RNA in komplementäre DNA (cDNA) mit Hilfe einer reversen Transkriptase umgeschrieben (vgl. Tabelle 12). Zur cDNA Synthese wurde das entsprechende Volumen für 1 µg RNA der jeweiligen Proben mit 0,92 µl Oligo(dT) und 0,5 µl Random Primer Mix vermischt und auf 25 µl Gesamtvolumen mit Wasser ausgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde zunächst für fünf Minuten bei 70°C inkubiert und anschließend für fünf Minuten auf Eis gekühlt. Nachfolgend wurden ein Mastermix aus 5 µl 5x M-MLV Puffer, 1,25 µl dNTP, 0,63 µl RNase Inhibitor und 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase hergestellt und zum RNA-Primermix hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde schließlich für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dem Syntheseprozess beinhaltet die Probe neben cDNA weiterhin RNA und Nukleotide, weshalb eine Konzentrationsbestimmung nicht erfolgte. Sie wurde bei -20°C gelagert.

Tabelle 12 Reaktionsansatz zur Synthese von cDNA

Komponente	1x Reaktionsansatz (RNA-Primer-Mix)
1,0 µg RNA	x
Oligo(dT)	0,92 µl
Random Primer Mix	0,5 µl
Nuklease-freies Wasser	25,0 µl–0,92 µl–0,5 µl
Gesamtvolumen	25,0 µl
Inkubation bei 70°C für 5 Minuten und anschließende Kühlung auf Eis für 5 Minuten	
Reaktionsansatz 1	25,0 µl
5x M-MLV Puffer	5,0 µl
dNTPs	1,25 µl
RNase Inhibitor	0,63 µl
M-MLV Reverse Transkriptase	1,0 µl
Gesamtvolumen	32,88 µl

2.2.2.4 Polymerasekettenreaktionen

Mit Hilfe einer PCR können DNA-Fragmente amplifiziert werden. Hierzu wird zunächst die DNA durch Aufspaltung der Wasserstoffbrücken zwischen den DNA-Strängen bei hohen Temperaturen (96°C) denaturiert. Im Folgenden hybridisieren die Primer komplementär an die spezifischen DNA-Fragmente unter sequenzspezifischen Hybridisierungstemperaturen. Im nächsten Schritt erfolgt die Elongation vom 3' Ende des Primers an in 5'–3'-Richtung durch die DNA-Polymerase, wobei die Elongationstemperatur spezifisch für die jeweiligen Polymerasen ist. Der Zyklus aus Denaturierung, Hybridisierung und Elongation wird 35–40x wiederholt (123).

Für die Elongation wurde die äußerst thermostabile *Thermus aquaticus* (Taq)-DNA-Polymerase verwendet, die bei 72°C eine Extensionsrate von 2–4 kbp pro Minute aufweist.

Durchgeführt wurden die PCR-Reaktionen in einem Thermozykler (Biometra Thermocycler T-Gradient ThermoBlock), wobei zwei unterschiedliche PCR-Programme angewandt wurden. Das erste Programm wurde bei ähnlichen Hybridisierungstemperaturen der Primer verwendet. Hierbei konnte in allen Zyklen die gleiche Hybridisierungstemperatur genutzt werden. Im zweiten Zyklusprogramm, welches als Touchdown-PCR bezeichnet wird, unterschieden sich die Hybridisierungstemperaturen der Primer um mindestens 3°C, sodass in den ersten 15 Zyklen die zum Primer mit der etwas höheren Hybridisierungstemperatur passende Temperatur genutzt und in den folgenden Zyklen um 3–5°C reduziert wurde.

Für die PCR-Reaktionen im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Ansatz mit einem Reaktionsvolumen von 25 µl gewählt. Dieser beinhaltete 2,5 µl des 10x PCR Puffers (QIAGEN 10x concentrated PCR Buffer, QIAGEN), 0,5 µl dNTPs (dNTP Mix, 10mM, Promega), 0,1 µl der Taq-Polymerase, je 0,5 µl des Vorwärts- und Rückwärts-Primers und 19,9 µl Nuklease-freies Wasser. Es wurde 1 µl, à 30 ng DNA eingesetzt (vgl. Tabelle 13 und Tabelle 14).

Tabelle 13 Reaktionsansatz der PCR

Komponente	1x Reaktionsansatz (Primermix)
10x PCR Puffer	2,5 µl
dNTPs	0,5 µl
Taq-Polymerase	0,1 µl
Vorwärts-Primer	0,5 µl
Rückwärts-Primer	0,5 µl
Nuklease-freies Wasser	19,9 µl
30ng DNA	1,0 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Tabelle 14 Ablauf der PCR

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	
initiale Denaturierung	98°C	2 Minuten	
Denaturierung	98°C	30 Sekunden	
Primer-Hybridisierung	58°C/60°C/63°C	30 Sekunden	35 Zyklen
Elongation	72°C	30 Sekunden	
finale Elongation	72°C	7 Minuten	
Ende	4°C	∞	

2.2.2.5 Touchdown-PCR

Die Touchdown-PCR bietet im Vergleich zur Standard-PCR die Möglichkeit einer sehr spezifischen und starken DNA-Amplifikation, wenn sich die Hybridisierungstemperaturen der Primer um mehr als 3°C unterscheiden. Dabei wird die Temperatur der Primer-Hybridisierung in den ersten 15 Zyklen entsprechend des Primers mit der höheren Hybridisierungstemperatur gewählt. In den folgenden Zyklen wird diese Temperatur um 3–5°C reduziert. Dadurch kann die Spezifität gesteigert werden. Bei schon zu Beginn der Reaktion niedrigeren Temperaturen würde der Primer mit der höheren Hybridisierungstemperatur vermehrt unspezifische Bindungen aufweisen (123).

Wir verwendeten einen Reaktionsansatz mit einem Volumen von 25 µl, welches sich aus 2,5 µl á 50 ng der zu untersuchenden DNA und 22,5 µl des Mastermixes zusammensetzte. Letzterer bestand aus 2,5 µl 10x PCR Puffer, 0,5 µl dNTPs, 0,5 µl MgCl₂, 0,1 µl Taq-Polymerase, je 0,5 µl Vorwärts- und Rückwärts-Primers und 17,9 µl Nuklease-freiem Wasser. In Tabelle 15 ist eine Übersicht der Komponenten des Reaktionsansatzes und in Tabelle 16 der Ablauf der PCR dargestellt.

Tabelle 15 Reaktionsansatz der Touchdown-PCR

Komponente	1x Reaktionsansatz (Primermix)
10x PCR Puffer	2,5 µl
dNTPs	0,5 µl
Taq-Polymerase	0,1 µl
Vorwärts-Primer	0,5 µl
Rückwärts-Primer	0,5 µl
MgCl ₂	0,5 µl
Nuklease-freies Wasser	17,9 µl
50 ng DNA	2,5 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Tabelle 16 Ablauf der Touchdown-PCR

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	
initiale Denaturierung	98°C	2 Minuten	
Denaturierung	98°C	30 Sekunden	
Primer-Hybridisierung	60°C	30 Sekunden	15 Zyklen
Elongation	72°C	3 Minuten	
Denaturierung	98°C	30 Sekunden	
Primer-Hybridisierung	57°C	30 Sekunden	20 Zyklen
Elongation	72°C	3 Minuten	
finale Elongation	72°C	7 Minuten	
Ende	4°C	∞	

2.2.2.6 Long-range PCR

In den routinemäßig angewandten PCR-Methoden können DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 3 kbp amplifiziert werden. Möchte man jedoch DNA-Regionen von mehreren kbp amplifizieren, steht das Verfahren der Long-range PCR zur Verfügung, mit dem Fragmente von über 30 kbp vervielfältigt werden können. Dabei wird eine spezielle DNA-Polymerase verwendet. Außerdem wird eine längere Elongationszeit benötigt, welche anhand der Größe des Templates berechnet werden kann. Für diese Arbeit nutzten wir 25 µl des LongAmp Taq 2X Master Mixes (LongAmp Taq 2X Master Mix, New England BioLabs). Diese DNA-Polymerase benötigt für die Elongation von 1 kbp 50 Sekunden. Zugegeben wurden jeweils 2,0 µl des Vorwärts- und Rückwärts-Primers, 17,0 µl Nuklease-freies Wasser und 100ng der zu untersuchenden DNA. Im Folgenden ist der Reaktionsansatz und -ablauf dargestellt.

Tabelle 17 Reaktionsansatz der Long-range PCR

Komponente	1x Reaktionsansatz (Primermix)
LongAmp Taq 2X Master Mix	25 µl
Vorwärts-Primer	2,0 µl
Rückwärts-Primer	2,0 µl
Nuklease-freies Wasser	17,0 µl
100 ng DNA	4,0 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 18 Ablauf der Long-range PCR

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	
initiale Denaturierung	94°C	30 Sekunden	
Denaturierung	94°C	30 Sekunden	
Primer-Hybridisierung	65°C	60 Sekunden	35 Zyklen
Elongation	65°C	50 Sekunden pro kbp	
finale Elongation	65°C	10 Minuten	
Ende	4°C	∞	

2.2.2.7 Agarose Gelelektrophorese

Im Anschluss an die PCR-Reaktionen wurden die PCR-Produkte auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Das Anlegen einer Spannung ermöglichte dann die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe. Je größer ein DNA-Molekül ist, desto langsamer wandert es durch das Gel zur Anode (123). Bei der Herstellung eines Gels mit einer Agarosekonzentration von 2% wurden 100ml Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) -Puffer, 2000mg Agarose und 6 µl des DNA-Farbstoffs Midori Grün verwendet. Verglichen mit dem traditionell genutzten DNA-Farbstoff Ethidiumbromid ist Midori Grün mit einem Anregungsmaximum von 490 nm und einer Emission bei 530 nm genauso sensitiv, jedoch weniger mutagen und nicht kanzerogen (124). Als Elektrophorese-Puffer diente TAE. Um die PCR-Produkte auf das Agarosegel zu laden, wurden diese mit 6X Gel Loading Dye Purple vermischt. Letzterer besteht aus einem roten und einem blauen Farbstoff und zeigt den Fortschritt der Elektrophorese bereits mit bloßem Auge an, hinterlässt aber keine Schatten unter ultravioletter (UV-) Belichtung. Um die Größenverhältnisse der DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde standardmäßig eine 100 bp Ladder aufgetragen. Bei einem PCR-Produkt mit einer Länge von 1 kbp bis 10 kbp bzw. bis 20 kbp, wurde die GelPilot 1 kb Plus Ladder bzw. die GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder genutzt. Um die Fragmente aufzutrennen, wurde durch ein Niederspannungsnetzgerät eine Spannung von 90 V über 60 bis 90 Minuten angelegt. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines UV-Transilluminators.

2.2.2.8 Aufreinigung der PCR-Produkte und Sanger-Sequenzierung

Für die Anwendung der Sanger-Sequenzierung, die auch als Didesoxymethode nach Sanger bezeichnet wird, muss ein Sequenzbereich des Moleküls bereits bekannt sein. An diesen hybridisiert nach der Denaturierung der doppelsträngigen DNA ein Oligodesoxynukleotid-Primer. Von hier aus synthetisiert eine DNA-Polymerase mit dNTPs und fluoreszenzmarkierten ddNTPs (2'-3'-Didesoxynukleotide) einen komplementären DNA-Strang. Beim Einbau eines ddNTPs kommt es zum Stopp der Synthese und Kettenabbruch. Da der Einbau zufällig erfolgt, entstehen innerhalb von ca. 30 Zyklen unterschiedlich lange DNA-Fragmente. Anhand einer Gelelektrophorese können die entstandenen DNA-Fragmente nach ihrer Länge aufgetrennt werden. Aus dem jeweiligen Fluoreszenzsignal der Abbruch-Nukleotide ergibt sich die komplementäre Basenabfolge der Matrize (123).

Um die PCR-Produkte zu sequenzieren, wurden diese aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers extrahiert (125). Zur Vervielfältigung der DNA-Fragmente wurde eine weitere PCR-Reaktion mit einem Reaktionsvolumen von 10 µl und das BigDye Terminator Sequenzierungskit (BigDye Terminator Version 3.1 Zyklus-Sequenzierungskit, ThermoFisher Scientific) unter einem Einsatz von 150 ng DNA und 3,2 pmol des Vorwärts- bzw. Rückwärts-Primers genutzt. In Tabelle 19 und Tabelle 20 sind der Reaktionsansatz und -ablauf dargestellt.

Tabelle 19 Reaktionsansatz der BigDye Terminator Sequenzierung

Komponente	1x Reaktionsansatz (vorwärts)	1x Reaktionsansatz (rückwärts)
BigDye Terminator 3.1 Ready Reaction Mix	4,0 µl	4,0 µl
Vorwärts-Primer	1,0 µl	-
Rückwärts-Primer	-	1,0 µl
Nuklease-freies Wasser	4,0 µl	4,0 µl
150 ng DNA	1,0 µl	1,0 µl
Gesamtvolumen	10,0 µl	10,0 µl

Tabelle 20 Zyklusprogramm einer Sanger-Sequenzierung

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	96°C	30 Sekunden	
Denaturierung	96°C	30 Sekunden	
Primer-Hybridisierung	55°C	30 Sekunden	27 Zyklen
Elongation	60°C	4 Minuten	
Finale Elongation	60°C	7 Minuten	
Ende	4°C	∞	

Im Anschluss wurde das Reaktionsprodukt von dem BigDye mit Hilfe des DyeEx 2.0 Spin Kits bereinigt. Die Sanger-Sequenzierung mit Hilfe des ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) wurde durch das Genomics & Transcriptomics Labor (GTL) des Biologisch-Medizinische Forschungszentrums (BMFZ) Düsseldorf durchgeführt. Die qualitative Analyse der Ergebnisse ermöglichte die Sequencing Analysis Software (Applied Biosystems). Durch das Programm Chromas (v.2.6.6) von Technelysium DNA Sequencing Software wurde das Elektropherogramm der Probe als graphische Darstellung der qualitativen Elektrophoreseresultate ersichtlich. Dabei wird die Verteilung der einzelnen Basen in ihrer Abfolge deutlich. In Referenz zu einer die Variante nicht tragenden Probe konnten die exakten Bruchpunkte als Abweichungen lokalisiert werden.

2.2.3 Analyse der Genexpression auf RNA-Ebene

Bei der quantitativen Echtzeit-PCR (hier im Folgenden qPCR genannt) wird nach jedem Amplifikationszyklus die Fluoreszenzintensität gemessen, welche mit zunehmender Menge an amplifizierter DNA zunimmt. Zugrunde liegt dem das Interkalieren des Fluorophors in die doppelsträngige DNA. Somit kann die Amplifikation der DNA-Abschnitte in Echtzeit mitverfolgt werden. Diese Methode wird u. a. eingesetzt, um die RNA-Expressionslevel von Genen zu bestimmen (126). Dabei wird die Expression der untersuchten Gene zu *Housekeeping* Genen, wie *HPRT1* und *GUSB*, analysiert. Dabei wurden die *Housekeeping*-Gene so ausgewählt, dass sie eine gleichmäßige Expression in verschiedenen Zelltypen aufweisen. Im Folgenden werden die Vorarbeiten, sowie die Vorgehensweise ausführlich beschrieben.

Die Extraktion der RNA erfolgte wie in 2.2.2.1 beschrieben. Ihre Konzentration wurde, wie in 2.2.2.2 erklärt ist, gemessen und daraus, wie in 2.2.2.3 dargestellt ist, cDNA synthetisiert.

2.2.3.1 Primer-Austestung

Bis auf die Primer für die *Housekeeping*-Gene wurden alle hier eingesetzten Primer für die qPCR selbst designt. Um die Spezifität der qPCR-Primer zu testen, wurde zunächst eine Standard-PCR durchgeführt. Hierzu wurden die Primer an cDNA von unterschiedlichen Kontrollen getestet, die das Gen, welches untersucht werden soll, exprimieren. Außerdem wurden die Primer an genomischer DNA getestet, um die Spezifität der Primer für cDNA zu überprüfen. Weiterhin wurde eine Wasserkontrolle mitgeführt. Die PCR wurde anhand des in 2.2.2 beschriebenen PCR-Protokolls durchgeführt. Im Anschluss wurden die Amplifikationsprodukte sowie eine DNA Ladder auf ein 2,0% Agarosegel, wie in 2.2.2.7 Agarose Gelelektrophorese erläutert, aufgetragen. Im Vergleich zur DNA Ladder wurde die Produktgröße evaluiert und mit der zu erwartenden Produktgröße abgeglichen. Falls in der genomischen DNA-Probe ebenfalls ein Produkt derselben Größe wie in der cDNA vorhanden war, zeigte dies eine Unspezifität der Primer zur Differenzierung zwischen cDNA und genomischer DNA an und die Primer wurden neu designt.

2.2.3.2 Quantitative Echtzeit-PCR

Für die quantitative Echtzeit PCR wurde das GoTaq Probe qPCR Kit verwendet. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Primer genutzt. Zum einen die selbstgemachten Primer, bestehend aus einem Vorwärts- und einem Rückwärts-Primer wie in 2.1.3 beschrieben, sowie einen QuantiTect Primermix für die *Housekeeping* Gene *GUSB* und *HPRT1*. Das Pipettierschema für den Reaktionsansatz ist in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 21 Reaktionsansatz der quantitativen Echtzeit-PCR

Komponente	1x Reaktionsansatz (Primermix der <i>Housekeeping</i> Gene)	1x Reaktionsansatz (Vorwärts- und Rückwärts-Primer)
GoTaq qPCR Master Mix	4,0 µl	4,0 µl
Vorwärts-Primer	-	0,32 µl
Rückwärts-Primer	-	0,32 µl
QuantiTect Primermix für HPRT1/GUSB	0,32 µl	-
Presision Blue Real-Time PCR Dye (200x)	0,03 µl	0,03 µl
Nuklease-freies Wasser	2,33 µl	2,65 µl
30ng cDNA	1,0 µl	1,0 µl
Gesamtvolumen	8,0 µl	8,0 µl

In einem Reaktionsgefäß einer 384-Well Platte wurde zunächst 1 µl cDNA der jeweiligen Probe vorgelegt. Je Mastermix wurden die Proben in Triplikaten analysiert. Das qPCR-Programm wurde mit dem CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System wie folgt durchgeführt:

Tabelle 22 Ablauf der quantitativen Echtzeit-PCR

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95°C	2 Minuten	
Denaturierung	95°C	15 Sekunden	
Primer-Hybridisierung und Elongation	60°C	1 Minute	40 Zyklen
Elongation	72°C	30 Sekunden	
Schmelzkurve	75°C–92°C	kontinuierlich	

Für eine reproduzierbare Aussagekraft wurden alle Versuche dreimal durchgeführt. Die Erfassung sowie die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der CFX Maestro Software (Bio-Rad Laboratories).

Zur Qualitätskontrolle wurde nach jeder PCR-Reaktion eine Schmelzkurve erstellt, womit die Entstehung spezifischer Produkte überprüft werden konnte. Der GoTaq qPCR Master Mix enthält zu diesem Zweck BRYT Grün, welches an doppelsträngige DNA bindet und Licht mit einer Wellenlänge von 439 nm absorbiert und bei 530 nm emittiert (127). Dieses fluoreszierende Signal konnte durch das CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System aufgefangen werden. Mit zunehmender Temperatur dissoziiert der Farbstoff aufgrund der Denaturierung der doppelsträngigen DNA ab und das Fluoreszenzsignal verringert sich. Die Schmelzkurve zeigt diese Veränderung an. Die Temperatur, bei der 50% der doppelsträngigen DNA denaturiert vorliegt, beschreibt den Schmelzpunkt (T_m). Dieser ist spezifisch für jedes qPCR Produkt und wird durch die Sequenzlänge und den GC-Gehalt des DNA-Fragments bestimmt (128). Entstanden unspezifische Produkte, zeigte die Schmelzkurve mehrere Schmelzpunkte. Deren Ergebnisse wurden aus den weiteren Analysen ausgeschlossen.

Als relatives Maß für die Konzentration des entstandenen qPCR-Produkts dient der Schwellenwertzyklus (C_t). Er ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit der Schwellenwertlinie der Hintergrund-Fluoreszenz und entspricht daher dem Zyklus, in dem das Signal

jene zum ersten Mal überschreitet (126). Es wurden Mittelwerte der zuvor auf ihre Ähnlichkeit überprüften Triplikate für die weitere Auswertung berechnet.

2.2.3.3 Austesten der Primer/Effizienzbestimmung

Um reproduzierbare qPCR-Ergebnisse zu gewährleisten, wurden die wie in 2.1.3 beschriebenen Primer hinsichtlich ihrer Amplifikations-Effizienz getestet. Dazu wurden zunächst serielle Verdünnungsreihen einer cDNA bestehend aus einer Mischung verschiedener Zelllinien hergestellt. Diese bestanden aus unverdünnter (entspricht 43,71 ng RNA), 1:2 (entspricht 21,85 ng RNA), 1:4 (entspricht 10,93 ng RNA), 1:8 (entspricht 5,46 ng RNA), 1:16 (entspricht 2,73 ng RNA), 1:32 (entspricht 1,37 ng RNA), 1:64 (entspricht 0,68 ng RNA) und 1:128 verdünnter cDNA (entspricht 0,34 ng RNA). Diese cDNA wurde in Triplikat in die in 2.2.8 beschriebene qPCR-Reaktion mit den jeweiligen zu testenden Primern eingesetzt. Zur Bestimmung der Effizienz wurde zunächst der Mittelwert der Ct-Werte für jede Probe bestimmt. Diese Mittelwerte wurden in einem Punktediagramm gegen die logarithmischen RNA-Mengen aufgetragen. Anhand einer linearen Regression wurde der Korrelationskoeffizient (R^2) bestimmt, der zeigt, wie gut die Daten miteinander korrelieren, wobei ein R^2 -Wert $>0,95$ eine sehr starke Korrelation anzeigt. Außerdem wurde anhand der Funktion $y=mx+b$ der Geraden die Steigung (m) angegeben, die für die Bestimmung der Effizienz genutzt wurde: $E = -1 + 10^{(-1/m)}$.

Die Effizienz der Primer sollte zwischen 90–110% liegen. Alle Primerpaare, die in dieser Arbeit für die qPCR (vgl. 2.1.3) eingesetzt wurden, zeigten eine Effizienz von $>95,8\%$, wodurch eine Vergleichbarkeit der generierten Daten gewährleistet werden kann. Beispielhaft ist in Abb. 8 die lineare Regression zur Berechnung der Primer-Effizienz für die Expressionsanalyse des *CREBBP*-Gens dargestellt. Die Punkte entsprechen logarithmisch aufgetragen den Ct-Mittelwerten bei einem unverdünnten bis zu 1:128 verdünnten RNA-Einsatz.

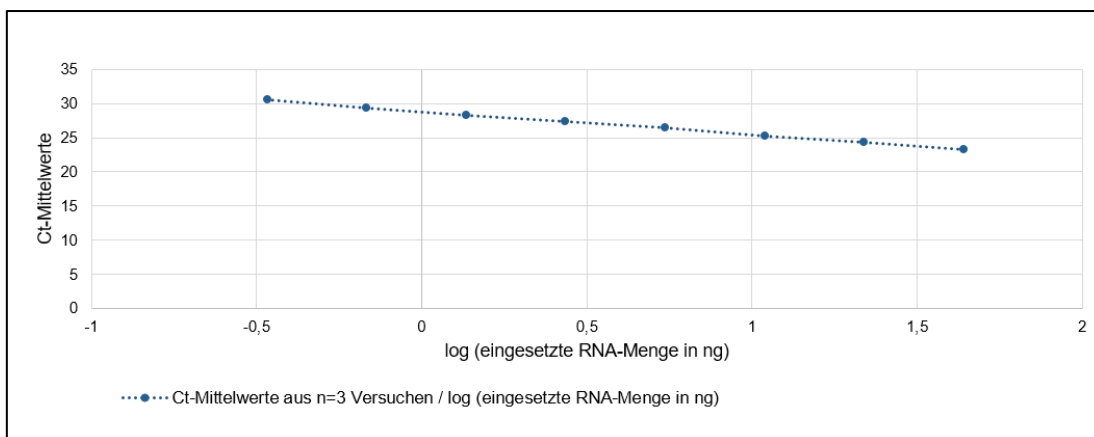


Abb. 8 Lineare Regression zur Berechnung der Primer-Effizienz

Die x-Achse zeigt den logarithmierten RNA-Konzentrationsfaktor aus RC-K8-Zellen, die y-Achse die gemessenen Ct-Mittelwerte in $n=3$ unabhängigen Experimenten. Die lineare Regression wird zur Berechnung der Steigung verwendet, aus der die PCR-Effizienz nach der Formel $E=(10^{-1/\text{Steigung}}-1)*100$ bestimmt wird. Eine ideale Steigung von $-3,32$ entspricht einer Effizienz von 100%.

2.2.3.4 RNA-Sequenzierung

Um die Expression von CREBBP im Tumorgewebe von P1 in Relation zu anderen ATRTs zu evaluieren, wurden RNA-Sequenzierungsdaten ausgewertet. Mit dieser Methode können Rückschlüsse auf die Transkription der mRNA und damit auf die Genexpression gezogen werden. Gemessen wurde die Konzentration der mRNA in den verschiedenen Tumoren. Verwendet wurde dafür das TruSeq Total RNA sample preparation Kit (Illumina). Diese Methode wurde durch die Arbeitsgruppe pädiatrische Neuroonkologie der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie, und Klinische Immunologie Düsseldorf angewandt, die die Ergebnisse freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung stellte. Die bioinformatische Auswertung wurde von Dr. Daniel Picard, Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie, und Klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf, durchgeführt und die normalisierten Expressionsdaten für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt (129).

2.2.4 Gesamtexomsequenzierung

Für die Selektion der Patient*innen dieser Arbeit und die Verifizierung detektierter SVs in einigen Fällen erfolgte WES. Das Verfahren wird ausführlich durch Wagener et al. 2021 beschrieben (41). Nachdem DNA mit Hilfe des DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen) extrahiert wurde, wurde zur Durchführung der WES das SureSelect Human All Exon V5+UTR Kit (Agilent) genutzt. Zur Sequenzierung diente das Illumina HiSeq2500 Sequencing System oder Next-Seq550. Mit Hilfe der Software bcl2Fastq v2.19.0 konnten *Reads* extrahiert und mittels trimomatic v0.33 die Adapter getrimmt werden (130, 131). Eine Alignierung erfolgte zum GRCh37-Referenzgenom (132). Ziel war eine Abdeckung von $\geq 80\times$. Die Normalisierung der Daten erfolgte anhand der mittleren Abdeckung des untersuchten Chromosoms. Zur Analyse der Sequenzierungsdaten wurden bedtools v2.16.2 und bamstats04 verwendet (133, 134). SNVs und indels wurden durch GATK v4.1.4.1, VarScan2 v2.3.9 und platypus v0.8.1 identifiziert (135-137). Mit Hilfe des Ensembl Variant Effect Predictors v98.3 erfolgte die funktionelle Annotation (138). Genutzte Datenbanken waren die COSMIC-Datenbank (cancer.sanger.ac.uk, heruntergeladen am 25.03.2019), die ClinVar-Datenbank (heruntergeladen am 12.02.2019), die IARC-TP53-Keimbahndatenbank sowie die LOVD Datenbank (139-142).

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation potentiell tumorprädisponierender SVs in der Keimbahn an Krebs erkrankter Kinder, die Auffälligkeiten zeigten, welche auf ein mögliches KPS hinweisen können. Dabei wurden diverse Krebsentitäten betrachtet. Untersucht wurde das Genom der Kinder und ggf. deren Eltern durch WGOM.

3.1 Klinik und Charakteristika der Patient*innen

3.1.1 Klinische Daten der Patient*innen

Die 29 in diese Arbeit eingeschlossenen Patient*innen waren bei Diagnosestellung im Mittel 7,2 Jahre alt. Dabei zeigte der jüngste Patient, P4, bereits zum Zeitpunkt seiner Geburt ein Gliom. Bei der ältesten untersuchten Patientin, P10, wurde im Alter von 18,5 Jahren ein Hodgkin Lymphom diagnostiziert. 17 Patient*innen (58,6%) waren bei Diagnosestellung jünger als 6 Jahre alt. In Tabelle 23 wird genauer auf das Alter und Geschlecht der Patient*innen eingegangen. Untersucht wurde das Genom von 19 Jungen (65,5%) und 10 Mädchen (34,5%). In der Gruppe der Kinder <5 Jahre waren 76,9% männlich und 23,1% weiblich. In den Altersgruppen zwischen 5 und 10 bzw. >15 Jahre bestand ein 1:1 Verhältnis der Geschlechter. Bei den 10–15-Jährigen waren 62,5% männlich und 37,5% weiblich.

Darüber hinaus werden das Alter der Eltern bei der Geburt und die Anzahl der Geschwister zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in Tabelle 24 und Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 23 Überblick über das Alter und Geschlecht der Patient*innen

Altersgruppe	Anzahl	Anteil	Geschlecht	Anzahl	Anteil
gesamt	29	100%	männlich	19	65,5%
			weiblich	10	34,5%
<5 Jahre	13	44,8%	männlich	10	76,9%
			weiblich	3	23,1%
5–10 Jahre	6	20,7%	männlich	3	50,0%
			weiblich	3	50,0%
10–15 Jahre	8	27,6%	männlich	5	62,5%
			weiblich	3	37,5%
>15 Jahre	2	6,9%	männlich	1	50,0%
			weiblich	1	50,0%

Tabelle 24 Alter der Eltern zum Zeitpunkt der Geburt der Patient*innen

Elternteil	Mittleres Alter bei Geburt des Kindes in Jahren	Spannweite in Jahren
Mutter	31,3	(19,7–37,7)
Vater	34,8	(19,7–54,2)

Tabelle 25 Anzahl der Geschwister der Patient*innen

Anzahl der Geschwister	Anzahl der Patient*innen	Anteil
Keine	8	27,6%
1–2	16	55,2%
≥3	5	17,2%

Tabelle 26 Ethnische Herkunft der Eltern der Patient*innen

Die Angaben zur ethnischen Herkunft basieren auf Selbstauskunft der Eltern. Angegeben ist zudem die mittlere Anzahl der SVs sowie die zugehörige Standardabweichung (SD).

Herkunft der Eltern	Anzahl der Patient*innen	Anteil	mittlere Anzahl der SVs ± SD
europäisch	23	79,3%	47,2 ± 10,1
westasiatisch	2	6,9%	55,5 ± 4,9
süd-/ostasiatisch	1	3,45%	76
gemischt afrikanisch und europäisch	2	6,9%	108 ± 58,7
türkisch	1	3,45%	44

Tabelle 27 Tumorentitäten der Patient*innen

Tumorentität	Anzahl	Anteil	Tumorentität	Anzahl	Anteil
Maligne hämatologische Erkrankungen	17	58,6%	AML	5	29,4%
			T-ALL	4	23,5%
			B-ALL	3	17,7%
			MDS	1	5,9%
			ALCL	1	5,9%
			Hodgkin-Lymphom	1	5,9%
			BPDCN	1	5,9%
			Myelosarkom	1	5,9%
ZNS- und Hirntumore	7	24,1%	Medulloblastome	3	57,1%
			Astrozytome	1	14,3%
			Gliome	2	28,6%
			Medulloblastom/Astrozytom	1	14,3%
Solide Tumore	3	10,3%	HCC	1	33,3%
			Keimzelltumor	1	33,3%
			Rhabdomyosarkom	1	33,3%
Embryonale Tumore	2	6,9%	ATRT	1	50,0%
			Nephroblastom	1	50,0%

Nach ethnischer Herkunft unterteilt wurden 23 Kinder (79,3%) mit Eltern europäischer Herkunft untersucht. Bei ihnen wurden im Mittel $47,2 \pm 10,1$ SVs detektiert. Bei der Patientin P18, deren Eltern beide aus der Türkei stammen, wurden 44 und damit weniger SVs identifiziert. Die Patient*innen P8 und P29, deren Eltern beide aus dem mittleren Osten stammen, zeigten 59 bzw. 52 SVs. Die Eltern des Patienten P22 sind europäischer bzw. nordafrikanischer Herkunft.

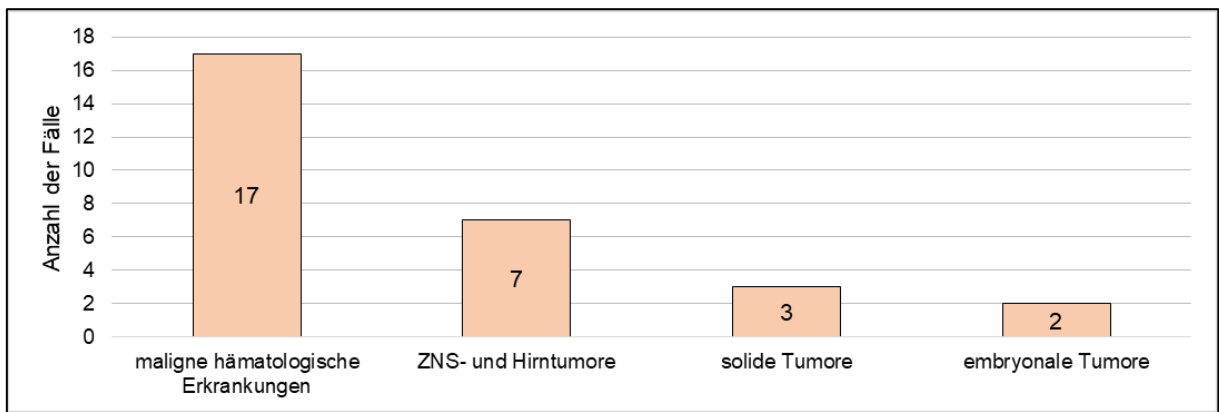


Abb. 9 Einteilung der Tumorentitäten der Patient*innen

Die Säulen entsprechen der absoluten Anzahl der Patient*innen, bei denen die jeweilige Tumorentität diagnostiziert wurde. Betrachtet wurden die Gruppen der malignen hämatologischen Erkrankungen, der ZNS- und Hirntumore, der soliden sowie der embryonalen Tumore.

Bei ihm wurden 67 SVs festgestellt. Der Patient P26 hat asiatische Wurzeln und wies 76 SVs auf.

Die meisten, 149 SVs, wurden bei dem Patienten P12, dessen Eltern europäischer bzw. ghanaischer Herkunft sind, erkannt (vgl. Tabelle 26). Eine Übersicht über die Tumorentitäten der untersuchten Patient*innen gewähren Tabelle 27 und Abb. 9. Tabelle 28 fasst Alter, Geschlecht, Tumorentität, Diagnose und Status (Stand 09/2021) der Patient*innen zusammen.

17 (58,6%) Patient*innen waren von einer malignen hämatologischen Erkrankung betroffen. Dazu zählen vorrangig Leukämien. Fünf (29,4%) Kinder litten an einer akuten myeloischen Leukämie (AML), vier (23,5%) an einer akuten lymphatischen Leukämie der T-Zellreihe (T-ALL) und drei (17,6%) an einer akuten lymphatischen Leukämie der B-Zellreihe (B-ALL). Drei Kinder (17,6%) entwickelten Lymphome, darunter ein anaplastisches großzelliges Lymphom (ALCL), ein Hodgkin Lymphom und eine blastische plasmazytoide dendritische Zellneoplasie (BPDCN). Weiterhin erkrankte die Patientin P24 an einem Myeloischen Sarkom, einem extramedullären, soliden Tumor der Vorstufen myeloischer Blutzellen, und der Patient P28 an einem Myelodysplastischen Syndrom (MDS).

Bei sieben (24,1%) Patient*innen wurden Tumore des Gehirns und des Zentralen Nervensystems (ZNS) diagnostiziert. Dazu zählen vier (57,1%) Medulloblastome, zwei (28,6%) Gliome und ein (14,3%) Astrozytom, wobei in dem Biopsat der Patientin P14 sowohl ein Medulloblastom als auch zu einem kleineren Teil ein Astrozytom nachgewiesen wurde.

Außerhalb des ZNS wurden bei drei Kindern solide Tumoren diagnostiziert. Der Patient P3 war an einem Hepatozellulären Karzinom, die Patientin P17 an einem Keimzelltumor und die Patientin P29 an einem Rhabdomyosarkom erkrankt.

Zwei Kinder (6,9%) waren an einem embryonalen Tumor erkrankt. Der Patient P1 entwickelte einen ATRT, und der Patient P5 ein Nephroblastom.

Tabelle 28 Überblick über Alter, Geschlecht, Tumorentität, Diagnose und Status der Patient*innen

Das Alter ist in Jahren angegeben. Ermittelt wurde der Status im September 2021.

ID	Alter	Geschlecht	Tumorentität	Diagnose	Status
P1	1,3	männlich	ZNS-/Hirntumor	ATRT	verstorben
P2	4,3	männlich	ZNS-/Hirntumor	Medulloblastom	unbekannt
P3	9,4	männlich	embryonaler Tumor	HCC	in Remission
P4	0,0	männlich	ZNS-/Hirntumor	Gliom	in Remission
P5	3,0	männlich	embryonaler Tumor	Nephroblastom	in Remission
P6	13,2	männlich	hämatologische maligne Erkrankung	T-ALL	verstorben
P7	3,6	männlich	hämatologische maligne Erkrankung	AML	in Remission
P8	5,8	männlich	hämatologische maligne Erkrankung	B-ALL	in Remission
P9	10,1	weiblich	ZNS-/Hirntumor	pilozytisches Astrozytom	unbekannt
P10	18,5	weiblich	hämatologische maligne Erkrankung	Hodgkin-Lymphom	unbekannt
P11	3,3	männlich	hämatologische maligne Erkrankung	T-ALL	in Remission
P12	1,0	männlich	ZNS-/Hirntumor	Optikus-Gliom	in Remission
P13	16,1	weiblich	hämatologische maligne Erkrankung	AML	verstorben
P14	3,1	weiblich	ZNS-/Hirntumor	Medulloblastom & Astrozytom	in Remission
P15	5,6	weiblich	hämatologische maligne Erkrankung	B-ALL	unbekannt
P16	2,4	männlich	hämatologische maligne Erkrankung	AML	in Remission
P17	1,2	weiblich	solider Tumor	Keimzelltumor	in Remission
P18	1,9	weiblich	hämatologische maligne Erkrankung	B-ALL	in Remission
P19	15,3	männlich	hämatologische maligne Erkrankung	AML	verstorben
P20	3,2	männlich	hämatologische maligne Erkrankung	T-ALL	in Remission
P21	13,0	männlich	hämatologische maligne Erkrankung	ALCL	in Remission
P22	2,1	männlich	ZNS-/Hirntumor	Medulloblastom	in Remission
P23	9,3	weiblich	ZNS-/Hirntumor	Medulloblastom	in Remission
P24	5,3	weiblich	hämatologische maligne Erkrankung	Myelosarkom	in Remission
P25	11,8	männlich	hämatologische maligne Erkrankung	T-ALL	in Remission
P26	14,8	männlich	hämatologische maligne Erkrankung	AML	in Remission
P27	5,5	männlich	hämatologische maligne Erkrankung	BPDCN	unbekannt
P28	13,4	männlich	hämatologische maligne Erkrankung	MDS	in Remission
P29	10,3	weiblich	solider Tumor	Rhabdomyosarkom	in Remission

3.1.2 Charakteristika der Patient*innen als Hinweis auf das Vorliegen eines KPS

Aus der gesamten Kohorte der Keimbahnstudie (39, 41) wurden 29 Patient*innen in das Projekt dieser Arbeit eingeschlossen. Diese Kinder wiesen in der in 1.2.2 und Brozou et al. beschriebenen Anamnese und körperlichen Untersuchung mindestens eines der durch Jongmans et al. und Ripperger et al. publizierten Kriterien auf, die das Vorliegen eines KPS wahrscheinlich machen (39, 57, 60). Abb. 10 stellt die Anzahl der Patient*innen dar, auf die die jeweiligen Kriterien zutreffen. Zudem zeigte sich in der WES keine für Krebserkrankungen prädisponierende oder wahrscheinlich prädisponierende pathogene SNV/indel. Der überwiegende Anteil, 58,6% (n=17), der Patient*innen wies zusätzlich zu einer Tumorerkrankung kongenitale Anomalien oder andere Auffälligkeiten beispielsweise der Haut oder Fazies auf, zeigte mentale- oder Entwicklungsretardierung, Immundefizienzen, hämatologische oder Wachstumsauffälligkeiten. Tabelle 29 stellt eine Übersicht aller kongenitalen Anomalien und Auffälligkeiten bei den Patient*innen dar.

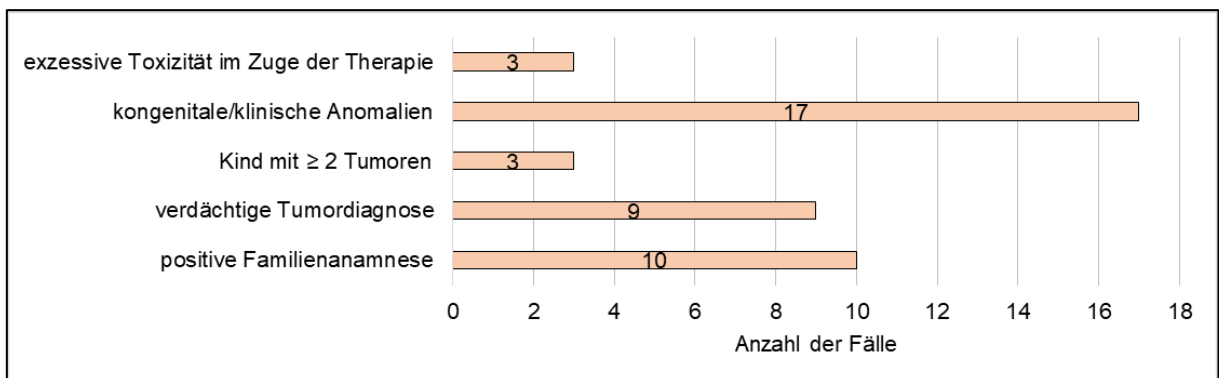


Abb. 10 Positive klinische Charakteristika der Patient*innen

Die Balken stellen die absolute Anzahl der Patient*innen dar, für die die durch Jongmans et al. und Ripperger et al. publizierten Kriterien, die das Vorliegen eines KPS wahrscheinlich machen, auffällig waren. Dabei ist es möglich, dass bei einem*r Patient*in mehrere Kriterien zutreffen (57, 60).

Tabelle 29 kongenitale Anomalien, hämatologische und kutane Auffälligkeiten sowie Anomalien der Entwicklung und des Wachstums

ID	Anomalien und Auffälligkeiten
P1	Fuß- und Schädelfehlbildungen
P2	Thrombozytopenie
P3	kardiale Fehlbildungen
P4	neuronale Fehlbildungen
P5	Hypospadie
P6	faziale Charakteristika, Fehlbildungen der Daumen
P7	Mikrozephalie
P8	Wachstumsstörung und Entwicklungsverzögerung
P11	Entwicklungsverzögerung, Hochwuchs
P12	Café-au-lait-Flecken
P13	Fehlbildungen der Daumen
P17	faziale Charakteristika
P19	Immunthrombozytopenie
P21	Fehlbildung der Daumen
P24	Autismus-Spektrum-Störung
P25	Mikrozephalie und Daumenfehlbildungen
P26	neuronale und kardiale Fehlbildungen

Bei 34,5% (n=10) der in dieser Arbeit eingeschlossenen Kinder berichteten die Eltern von einer für Krebserkrankungen auffälligen Familienanamnese. Als auffällig gilt die Anamnese dann, wenn in der Familie über 3 Generationen ≥ 2 Krebsdiagnosen vor dem 18. Geburtstag auftraten (einschließlich Indexpatient*in), wenn bei einer mit dem*der Indexpatient*in erstgradig verwandten Person oder ≥ 2 zweitgradig Verwandten einer Elternseite vor dem 45. Geburtstag eine Krebserkrankung diagnostiziert wurde oder es sich, wie bei der Patientin P18, um konsanguine Eltern handelt. Ein Beispiel für eine in Bezug auf Krebserkrankungen suspekte Familienanamnese zeigt der Fall des Patienten P16, der im Alter von 2,4 Jahren an einer AML erkrankte. Sein Vater und sein Großvater väterlicherseits erhielten vor Vollendung des 45. Lebensjahres die Diagnosen eines Ösophaguskarzinoms bzw. eines Kopf-Hals-Tumors.

31,0% (n=9) der Patient*innen entwickelten auf KPSs hinweisende Tumoren. Hierzu zählen u. a. ein ATRT, Gliome und SHH-aktivierte Medulloblastome. Eine Übersicht darüber gibt Tabelle 30.

Tabelle 30 Patient*innen mit Indikatortumoren für das Vorliegen eines KPS

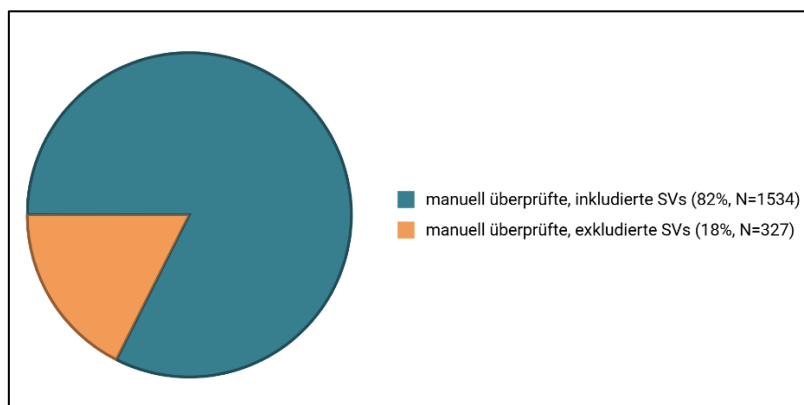
ID	Diagnose
P1	ATRT
P3	HCC
P4	Gliom
P12	Optikus-Gliom
P14	Medulloblastom und Astrozytom
P22	SHH-aktiviertes Medulloblastom
P24	Myeloides Sarkom
P27	blastische plasmazytoide dendritische Zellneoplasie
P28	MDS und Astrozytom

Als weiteres Kriterium gilt das Auftreten von mehreren primären Neoplasien, die zweizeitig, bilateral, multifokal oder metachron entstehen können (57, 60). Bei drei (10,3%) untersuchten Kindern war dies der Fall. Der Patient P2 entwickelte beispielsweise im Alter von 4,2 Jahren ein Medulloblastom. Zwölf Jahre später wurde bei ihm eine Metastase dieses Medulloblastoms detektiert und weitere vier Jahre später entwickelte der Patient ein Adenokarzinom. Die Patientin P14 erkrankte im Alter von 3,1 Jahren an einem Medulloblastom und einem Astrozytom. Bei dem Patienten P28 wurden ein MDS und ein Astrozytom festgestellt.

Darüber hinaus trat bei drei (10,3%) Patient*innen eine exzessive Toxizität in Folge der Therapie auf. Die Patienten P6, P25 und P26 zeigten eine starke Neurotoxizität, welche sich bei P25 mit starken Neuropathien und P26 mit Kopfschmerzen, Somnolenz und Nystagmus äußerte. Der Patient P6 entwickelte zudem starke Mukosiden. P25 und P26 litten unter schweren Infektionen.

3.2 Übersicht über die detektierten strukturellen Varianten

Nach der in 2.2.1.5 beschriebenen Qualitätskontrolle der durch den Bionano Saphyr generierten Daten wurden die in 2.2.1.7 erläuterten Filterschritte angewandt. Die danach verbleibende Anzahl an SVs betrug für die 29 Patient*innen insgesamt 1861, im Mittel $64 \pm 24,2$ SVs pro Fall (vgl. Abb. 11).

**Abb. 11 Manuell überprüfte SVs**

Dargestellt ist die absolute Anzahl an SVs, die nach der manuellen Überprüfung in die Analysen einbezogen wurden (blau) und die Anzahl derer, die exkludiert wurden (orange).

Nach einer weiteren manuellen Überprüfung auf deren Plausibilität wurden 326 (17,6%) SVs exkludiert, sodass eine finale Gesamtanzahl von 1534 (82,4%) SVs bestand. Dies entspricht im Mittel $53 \pm 21,8$ SVs pro Patient*in.

Tabelle 31 zeigt eine Übersicht über die detektierten *de novo* entstandenen SVs in Trio-Analysen. Single- und Duo-Analysen erlauben keine Aussage über eine mögliche *de novo* Entstehung von SVs und sind daher mit „-“ in der Tabelle gekennzeichnet. Angezeigt werden außerdem SVs, die mit einem KPG überlappten. Zudem sind der Name des Gens und die Lokalisation der SV angegeben.

Tabelle 31 Übersicht über die detektierten *de novo* entstandenen und mit einem KPG überlappenden SVs

ID	<i>de novo</i> SVs	SVs, die mit KPG überlappen	potentiell betroffene KPGs	Lokalisation
gesamt	4	13		
P1	-	2	<i>TCF7L2</i> <i>CREBBP</i>	intronisch intronisch
P2	-	0		
P3	0	0		
P4	-	1	<i>GPC3</i>	intronisch
P5	0	1	<i>TP53</i>	intronisch
P6	-	0		
P7	-	0		
P8	1	1	<i>TP53</i>	intronisch
P9	-	0		
P10	-	0		
P11	-	0		
P12	0	0		
P13	0	0		
P14	1	0		
P15	-	0		
P16	0	1	<i>FHIT</i>	intronisch
P17	0	0		
P18	1	1	<i>PRDM1</i>	intronisch
P19	0	0		
P20	0	0		
P21	-	0		
P22	0	2	<i>WT1</i> <i>ASXL1</i>	intergenisch intronisch
P23	0	1	<i>MAP2K2</i>	potentiell exonisch
P24	0	0		
P25	1	2	<i>BMPR1A</i> <i>RUNX1</i>	intronisch intergenisch
P26	-	0		
P27	-	0		
P28	0	1	<i>MSH6</i>	intergenisch
P29	-	0		

3.2.1 Art, Zygotie und Lokalisation der detektierten strukturellen Varianten

Dem Hauptanteil, 60,6% (n=930), der detektierten SVs entsprachen Deletionen (vgl. Abb. 12). Im Mittel wurden pro Patient*in $32 \pm 14,4$ Deletionen erkannt. Am zweithäufigsten, in 35,4% (n=543), traten Insertionen auf (im Mittel $19 \pm 8,0$ Insertionen pro Patient*in). 3,8% (n=59) der SVs waren Duplikationen (im Mittel $2 \pm 1,5$ Duplikationen pro Patient*in). Es konnten insgesamt zwei (0,13%) Inversionen detektiert werden.

90,5% (n=1389) der SVs traten heterozygot auf. 2,5% (n=38) der SVs wurden auf beiden Allelen eines Locus detektiert, waren also homozygot. 2,9% (n=45) der SVs wurden als hemizygot erkannt, da sie bei männlichen Patienten auf dem X-Chromosom lokalisiert waren. In 4,0% (n=62) konnte keine eindeutige Zygotie festgestellt werden (vgl. Abb. 13).

Die Lokalisation der SVs wird in Abb. 14 gezeigt. Mehr als die Hälfte, 54,2% (n=832), der SVs waren in ausschließlich intergenischen Abschnitten des Genoms lokalisiert. Pro Patient*in stellten sich im Mittel $29 \pm 13,4$ intergenisch lokalisierte SVs dar. 19,8% (n=303) der SVs konnten in intronischen Bereichen detektiert werden (im Mittel $10 \pm 4,9$ intronische SVs pro Patient*in). 26,0% (n=399) der SVs befanden sich in potentiell exonischen Abschnitten (im Mittel $14 \pm 5,2$ potentiell exonische SVs pro Patient*in). Als potentiell exonisch gelegen wurde eine SV bezeichnet, wenn der durch WGOM angegebene Bereich mit einem Exon eines Gens überlappte. Dabei ist eine intergenische oder intronische Lokalisation jedoch nicht ausgeschlossen.

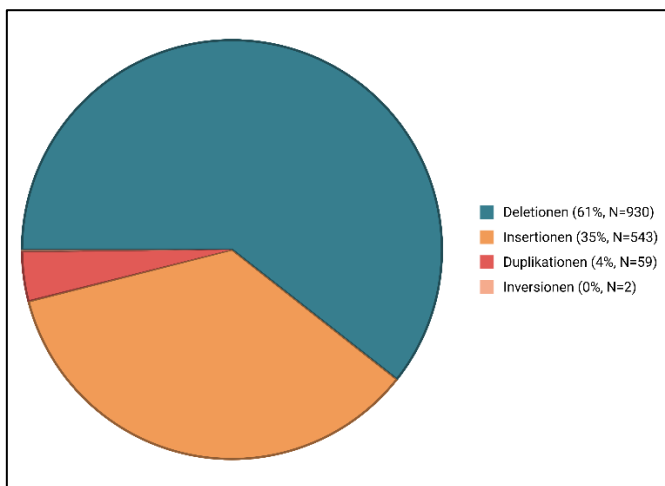


Abb. 12 Art der detektierten SVs

Dargestellt ist die absolute Anzahl der detektierten Deletionen (blau), Insertionen (orange), Duplikationen (rot) und Inversionen.

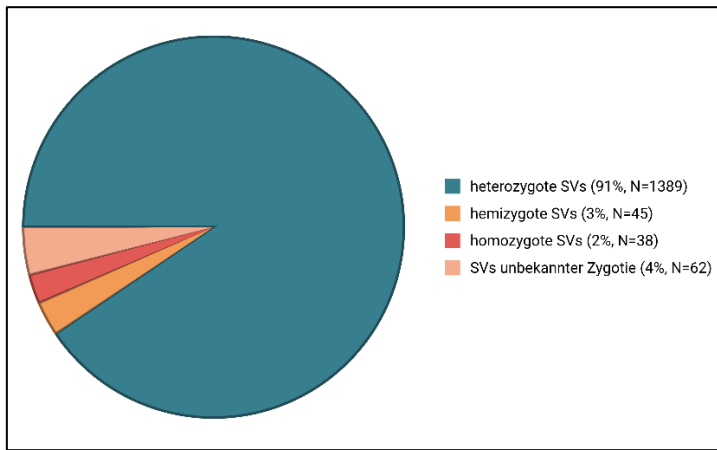


Abb. 13 Zygote der detektierten SVs

Dargestellt ist die absolute Anzahl der detektierten heterozygoten (blau), hemizygoten (orange), homozygoten (rot) und SVs unbekannter Zygote (hellorange).

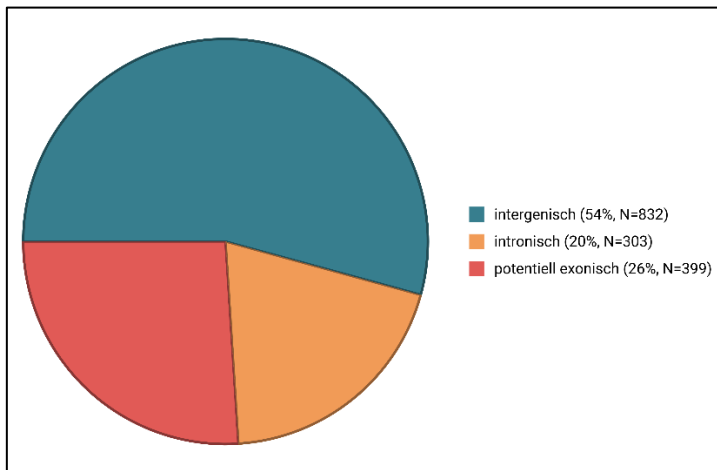


Abb. 14 Lokalisation der detektierten SVs

Dargestellt ist die absolute Anzahl der detektierten intergenisch (blau), intronisch (orange) und potentiell exonisch (rot) lokalisierten SVs.

3.2.2 *De novo* entstandene strukturelle Varianten

Aussagen über die Vererbung von SVs können nur durch die zusätzliche Untersuchung des Materials der Eltern getroffen werden. Wurden Trio-Analysen durchgeführt, war es zudem möglich, nicht vererbte Varianten zu identifizieren, die als *de novo* bezeichnet werden. Es wurden nach manueller Überprüfung vier *de novo* entstandene SVs in 16 Trio-Analysen identifiziert (vgl. Abb. 15). Die Patient*innen, in deren Genom diese SVs detektiert wurden, sind in Tabelle 32 dargestellt. Tabelle 33 zeigt die detektierten *de novo* entstandenen SVs detaillierter.

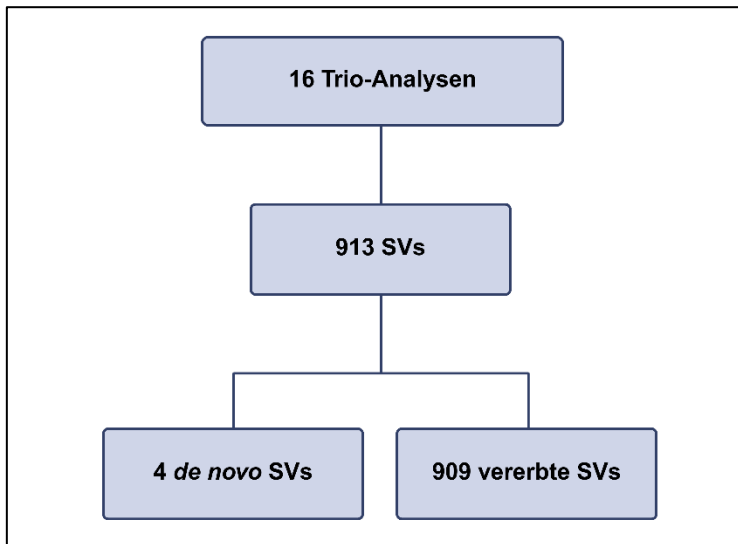


Abb. 15 Vier *de novo* entstandene SVs in 16 Trio-Analysen

Der Patient P8, der an einer B-ALL erkrankte und bei dem eine Entwicklungsverzögerung und Wachstumsstörung bekannt waren, wies neben 31 maternal und 27 paternal vererbten SVs eine *de novo* entstandene, 350 kbp lange, heterozygote Deletion auf Chr14 (q11.2) auf. In der durch WGOM angegebenen Region befinden sich die Gene *TRAV23DV6*, *TRDV1*, *TRAV24*, *TRAV25*, *TRAV26-1*, *TRAV8-7*, *TRAV27*, *TRAV29DV5*, *TRAV30*, *TRAV26-1*, *TRAV34*, *TRAV36DV7*, *TRAV38-1*, *TRAV38-2DV8*, *TRAV39*, *TRAV40*, *TRAV41*, *TRDV2*, *TRDD1*, *TRDD2*, *TRDD3* und *TRDJ1*. Es handelt sich um einen Bereich, in dem genetische Umlagerungen durch immunologische VDJ-Rekombination des T-Zell-Rezeptors stattfinden (143).

Die Patientin P14 war an einem SHH-aktivierten Medulloblastom und einem Astrozytom erkrankt und zeigte neben 19 maternal und 21 paternal vererbten SVs eine *de novo* entstandene, ca. 750 bp lange, heterozygote, intergenisch lokalisierte Insertion.

Tabelle 32 Patient*innen mit *de novo* entstandenen SVs

Das Alter der Patient*innen bei Diagnosestellung wird in Jahren angegeben. Die KPS-Kriterien beschreiben die in 1.2.2 erläuterten Kriterien, die auf ein KPS hinweisen und durch Jongmans et al. und Ripperger et al publiziert wurden (57, 60).

ID	Diagnose	Alter	KPS-Kriterium	Anzahl			Lokalisation der <i>de novo</i> SVs
				detektierte SVs	vererbte SVs	<i>de novo</i> SVs	
P8	B-ALL	5,8	kongenitale Anomalien	59	58	1	potentiell exonisch
P14	Medulloblastom, Astrozytom	3,1	Indikatortumor, ≥ 2 Tumoren	41	40	1	intergenisch
P18	B-ALL	1,9	auffällige Familienanamnese	44	43	1	intergenisch
P25	T-ALL	11,8	kongenitale Anomalien, exzessive Toxizität im Zuge der Therapie	49	48	1	potentiell exonisch

Tabelle 33 De novo entstandene SVs

Gezeigt wird, auf welchem Chromosom (Chr) die in den Trio-Analysen detektierten, *de novo* entstanden SVs lokalisiert sind. Die Koordinaten sind in bp angegeben. Zudem sind deren SV-Typ, die Größe und Lokalisation dargestellt. Alle identifizierten Varianten waren heterozygot. Keine überlappte mit einem durch die GeneHancer Datenbank beschriebenen regulatorischen Element. Die Spalte „bekannte SV/Polymorphismus“ gibt an, ob die Region, in der die SV detektiert wurde, mit einer bekannten CNV überlappt. Ist das der Fall, wurde angegeben, in welcher Datenbank die CNV beschrieben wurde sowie deren Größe und Allelfrequenz.

ID	Chr	Startposition	Endposition	SV-Typ	Größe in bp	Lokalisation	bekannte SV/ Polymorphismus
P8	14	22082444	22451049	Deletion	353569	potentiell exonisch	dbVar, 409546 bp, 1%
P14	5	70480957	70498473	Insertion	767	inter-genisch	keine
P18	3	176024845	176028018	Insertion	1471	inter-genisch	keine
P25	8	17881977	17894072	Deletion	4779	potentiell exonisch	keine

Die Eltern der Patientin P18, die im Alter von 1,9 Jahren eine B-ALL entwickelte, waren konsanguin. Zudem war bereits bei der Großmutter mütterlicherseits eine maligne hämatologische Erkrankung festgestellt worden. Durch die Mutter wurden 20 SVs an die Patientin P18 vererbt, durch den Vater 13. Bei zehn SVs kann durch das Verwandtschaftsverhältnis der Eltern nicht klar gesagt werden, durch wen die SVs vererbt wurden. Bei der Patientin wurde eine ca. 1,5 kbp lange, intergenisch lokalisierte, heterozygote, *de novo* entstandene Insertion detektiert.

Im Genom des Patienten P25, einem an einer T-ALL erkrankten Jungen, wurden 21 maternal und 27 paternal vererbte SVs festgestellt und eine ca. 4,8 kbp lange Deletion in der Region Chr8 (p22) nachgewiesen. Diese ist *de novo* entstanden und in Abb. 16 dargestellt. Sie betrifft potentiell das vierte und fünfte Exon sowie dritte und vierte Intron des *FGL1*-Gens. Betrachtet man die Größe der Deletion sowie der zwischen den Markierungen bestehenden Region (ca. 12 kbp) wird klar, dass sowohl eine rein intronische Lokalisation im dritten Intron möglich ist als auch die Deletion des vierten Exons oder des vierten und fünften Exons und vierten Introns. Dies könnte zu einem Funktionsverlust des Gens führen. Die Deletion hat eine Allelfrequenz von 49,4%, was auf das Vorliegen als heterozygote Veränderung hinweist. Die Familienanamnese des zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 11,8 Jahre alten Jungen war bis auf seine Großmutter väterlicherseits unauffällig. Die Großmutter habe im Alter von 55 Jahren ein Mammakarzinom entwickelt. Daher liegt nach den in 1.2.2 beschriebenen Kriterien keine auffällige Familienanamnese vor. Der Patient zeigte eine Mikrozephalie, eine Thenarhypotrophie beidseits, Adipositas und endokrinologische Störungen, sodass das Kriterium klinischer und kongenitaler Anomalien auf ihn zutrifft (57, 60). Darüber hinaus erfüllt er das Kriterium einer starken therapieassoziierten Toxizität, da er schwere Infektionen und eine Neuropathie entwickelte (57, 60).

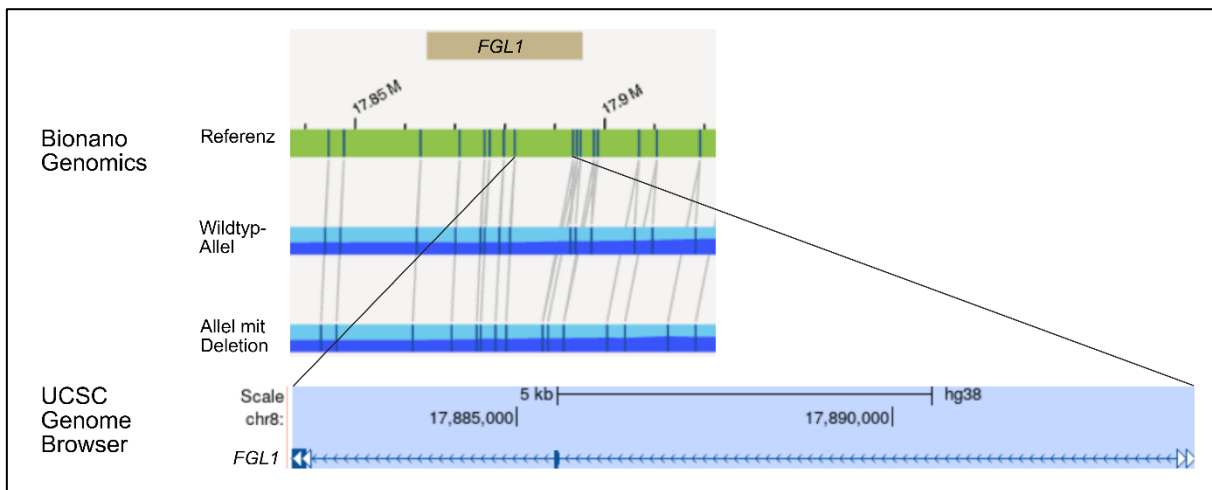


Abb. 16 *De novo* entstandene, ca. 4,8 kbp große Deletion auf Chr8 (p22) in dem Patienten P25, die Teile des *FGL1*-Gens umfasst

Im oberen Teil der Abbildung ist die optische Genomkartierung des Patienten P25 im Bereich Chr8:17,881,977–17,894,073 bp (hg38) dargestellt. Der oberste Balken entspricht dem KPG *FGL1*. Darunter werden die Kartierung des GRCh38-Referenzgenoms, des Wildtyp-Allels und des durch die Deletion betroffenen Allels gezeigt. Deutlich wird eine ca. 4,8 bp große Deletion.

Der untere Teil der Abbildung zeigt in hellblau die Region zwischen den oben dargestellten Markierungen, in der sich die Deletion befindet. Sie beinhaltet das vierte und fünfte Exon und dritte und vierte Intron des *FGL1*-Gens. Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt. Die Nutzung erfolgt im Einklang mit der akademischen Lizenzvereinbarung von BioRender.

Für die vier identifizierten, *de novo* entstandenen SVs konnte keine Überlappung mit einem KPG festgestellt werden. Es erfolgte eine ausführliche Literaturrecherche, deren Ergebnisse im Zusammenhang mit einem möglichen prädisponierenden Potential der SVs in 4.2.5 evaluiert werden.

3.3 Varianten, die für Krebserkrankungen prädisponierende Gene betreffen

Bei 10 der 29 Patient*innen konnten heterozygote SVs identifiziert werden, die mit einem KPG überlappen. Im Genom von P1, P22 und P25 konnten jeweils zwei mit einem KPG überlappende SVs nachgewiesen werden.

In Abb. 17 sind die Anzahl der SVs, die mit einem KPG überlappen, und die Anzahl der Patient*innen, bei denen diese SVs detektiert wurden, dargestellt. Tabelle 34 gibt einen Überblick über die detektierten SVs, die mit einem KPG überlappen. Tabelle 35 zeigt eine Übersicht über die Patient*innen, bei denen SVs detektiert wurden, die mit einem KPG überlappen. Abb. 18 stellt eine Übersicht der Lokalisationen der detektierten, mit einem KPG überlappenden SVs dar.

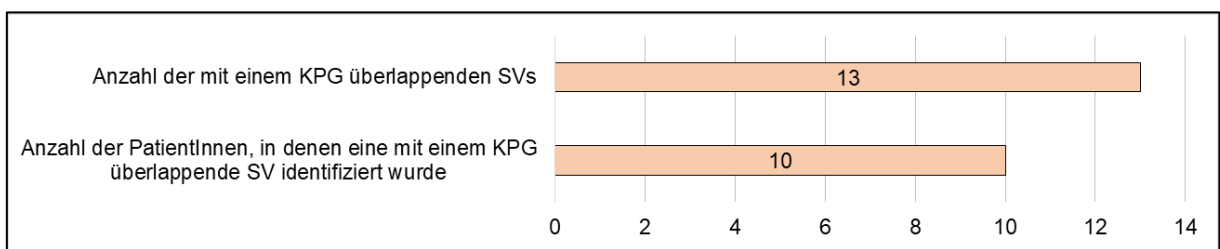


Abb. 17 Anzahl der mit einem KPG überlappenden SVs

Durch die Balken dargestellt ist die absolute Anzahl der SV, die mit einem KPG überlappen (13) sowie die Anzahl der Patient*innen, in denen eine mit einem KPG überlappende SV identifiziert wurde (10).

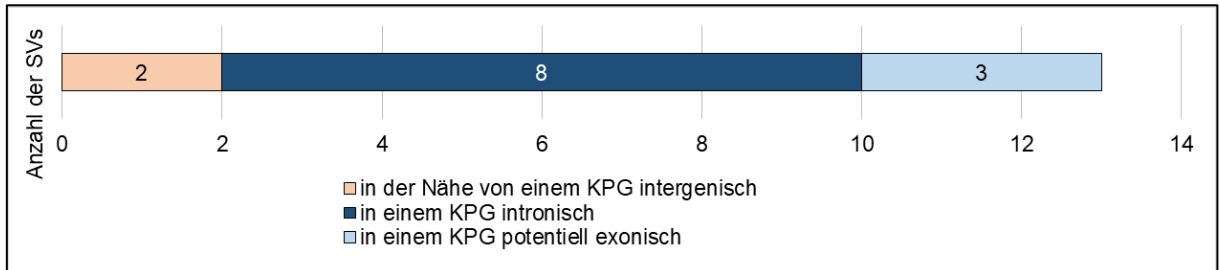


Abb. 18 Lokalisation der mit einem KPG überlappenden SVs

Gezeigt ist die Lokalisation der mit einem KPG überlappenden SVs (13). Drei waren potentiell exonisch lokalisiert (hellblau), acht in einem intronischen Bereich (dunkelblau) und zwei in der Nähe eines KPG in einer intergenischen Region (orange).

Tabelle 34 Mit einem KPG überlappende SVs

Die genomische Region aller mit einem KPG überlappenden SVs ist angegeben. Zudem sind deren SV-Typ, die Größe und Lokalisation dargestellt. Alle identifizierten Varianten waren heterozygot. Die Spalte „bekannte SV/Polymorphismus“ gibt an, ob die Region, in der die SV detektiert wurde, mit einer bekannten CNV überlappt. Ist das der Fall, wurde angegeben, in welcher Datenbank die CNV beschrieben wurde sowie deren Größe und Allelfrequenz.

ID	genomische Region (hg38)	SV-Typ	Größe in bp	KPG	Lokalisation	bekannte SV/Polymorphismus
P1	Chr10:113,066,076–113,079,257 bp	Deletion	4592	<i>TCF7L2</i>	intronisch	keine
	Chr16:3,815,321–3,818,623 bp	Insertion/Duplikation	3384	<i>CREBBP</i>	intronisch	keine
P4	ChrX:133,868,891–133,883,558 bp	Deletion	1445	<i>GPC3</i>	intronisch	Boomsma et al. 2014, 1626 bp, 0.13%
P5 P8	Chr17:7,642,059–7,684,753 bp	Deletion	1422 1407	<i>TP53</i>	potentiell exonisch	dbVar, 1585 bp, 4,5%
P16	Chr3:60,595,869–60,617,724 bp	Deletion	14397	<i>FHIT</i>	intronisch	Shaikh et al. 2009, 11644 bp, 0.05%
P18	Chr6:106,072,329–106,076,664 bp	Deletion	1820	<i>PRDM1</i>	intronisch	keine
P22	Chr11:32,446,682–32,464,829 bp	Deletion	1707	<i>WT1-AS</i>	potentiell exonisch	keine
	Chr20:32,374,512–32,378,566	Deletion	1867	<i>ASXL1</i>	intronisch	1000 Genomes Project Phase 3, 2105 bp, 0.52%
P23	Chr19:4,119,626–4,133,861 bp	Insertion	514	<i>MAP2K2</i>	potentiell exonisch	keine
P25	Chr10:86,880,898–86,884,181 bp	Deletion	542	<i>BMPRI1A</i>	intronisch	Boomsma et al. 2014, 579 bp, 0.13%
	Chr21:35,218,786–35,252,485 bp	Deletion	2112	Enhancer von <i>RUNX1</i>	intergenisch	dbVar, 1907 bp, 2.3%
P28	Chr2:47,679,044–47,695,086 bp	Deletion	1736	Enhancer von <i>MSH6</i>	intergenisch	keine

Tabelle 35 Patient*innen mit SVs, die mit KPGs überlappen

Das Alter der Patient*innen bei Diagnosestellung wird in Jahren angegeben. Die KPS-Kriterien beschreiben die in 1.2.2 erläuterten Kriterien, die auf ein KPS hinweisen und durch Jongmans et al. und Ripperger et al publiziert wurden (57, 60).

ID	Diagnose	Alter	KPS-Kriterium	Anzahl		KPG	Lokalisation der mit KPGs überlappenden SVs
				detektierte SVs	mit KPGs überlappende SVs		
P1	ATRT	1,3	Indikatortumor, kongenitale Anomalien	64	2	<i>TCF7L2</i>	intronisch
						<i>CREBBP</i>	intronisch
P4	Gliom	0,0	Indikatortumor, kongenitale Anomalien	45	1	<i>GPC3</i>	intronisch
P5	Nephroblastom	3,0	kongenitale Anomalien	38	1	<i>TP53</i>	potentiell exonisch
P8	B-ALL	5,8		59	1		
P16	AML	2,4	auffällige Familienanamnese	62	1	<i>FHIT</i>	intronisch
P18	B-ALL	1,9	auffällige Familienanamnese	44	1	<i>PRDM1</i>	intronisch
P22	Medulloblastom	2,1	Indikatortumor	67	2	<i>WT1</i>	intergenisch
						<i>ASXL1</i>	intronisch
P23	Medulloblastom	9,3	auffällige Familienanamnese	59	1	<i>MAP2K2</i>	potentiell exonisch
P25	T-ALL	11,8	kongenitale Anomalien, exzessive Toxizität im Zuge der Therapie	49	2	<i>BMPR1A</i>	intronisch
						<i>RUNX1</i>	intergenisch
P28	MDS	13,4	Indikatortumor, ≥ 2 Tumoren	49	1	<i>MSH6</i>	intergenisch

Drei SVs (23,1%) überlappten potentiell mit mindestens einem Exon eines KPG.

P23 war im Alter von 9,3 Jahren an einem Medulloblastom erkrankt. Die Mutter des Mädchens war bereits im Alter von 31 Jahren an einem Non-Hodgkin-Lymphom erkrankt, weshalb das Kriterium einer auffälligen Familienanamnese erfüllt war. Zudem litt der Großvater väterlicherseits an einem Bronchialkarzinom, wobei das Erkrankungsalter unbekannt ist.

Im Genom der Patientin wurden insgesamt 59 SVs detektiert, von denen 32 paternal und 27 maternal vererbt wurden und keine *de novo* entstanden war.

Hinsichtlich einer möglichen Krebsprädisposition der Patientin war eine 514 bp lange, paternal vererbte Insertion in der Region Chr19 (p13.3) interessant, da sie potentiell mit dem ersten Exon des KPG *MAP2K2* überlappte (vgl. Abb. 19). Die genauen Bruchpunkte der Insertion können mittels WGOM nicht bestimmt werden. Möglich ist ihre Lokalisation in einem ca. 14 kbp genomischen Bereich, in dem sich das erste Intron und erste Exon einer Transkriptvariante des KPG *MAP2K2* befinden. Somit sind eine Insertion in *MAP2K2* und eine damit einhergehende Unterbrechung des Leserasters denkbar. Zudem umfasst dieser Bereich einen Promo-

tor von *MAP2K2*, der in diversen Geweben aktiv und in der embryonalen Entwicklung bedeutsam ist (76). In der Normalbevölkerung wurden bislang keine Insertionen vergleichbarer Größe in der Region beschrieben. In den WES-Daten ist die Abdeckung des *MAP2K2*-Genlokus, insbesondere des potentiell durch die Insertion betroffenen ersten Exons, schwach (vgl. Abb. 20).

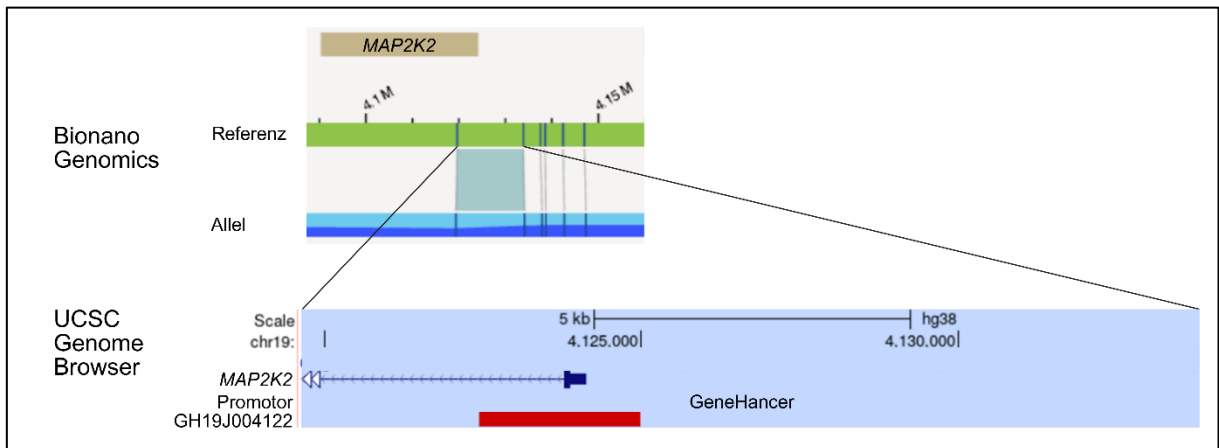


Abb. 19 514 bp große Insertion auf Chr19 (p13.3) im Genom der Patientin P23, die potentiell mit dem ersten Exon des KPG *MAP2K2* überlappt

Im oberen Teil der Abbildung ist die optische Genomkartierung der Patientin P23 im Bereich Chr19:4,119,626–4,133,861 bp (hg38) dargestellt. Der oberste, braune Balken entspricht dem KPG *MAP2K2*. Darunter werden die Kartierung des GRCh38-Referenzgenoms in grün und des durch die Insertion betroffenen Allels in blau gezeigt. Erkennbar ist, dass der Abstand zwischen den beiden Markierungen auf dem Allel länger ist als auf der Referenz, was für eine Insertion spricht. Der untere Teil der Abbildung zeigt in blau die Region zwischen den oben dargestellten Markierungen, in der sich die Insertion befindet. In diesem lokalisiert sind das erste Exon und erste Intron des KPG *MAP2K2* sowie der Promotor GH19J004122 (unterster Balken). Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt. Die Nutzung erfolgt im Einklang mit der akademischen Lizenzvereinbarung von BioRender.

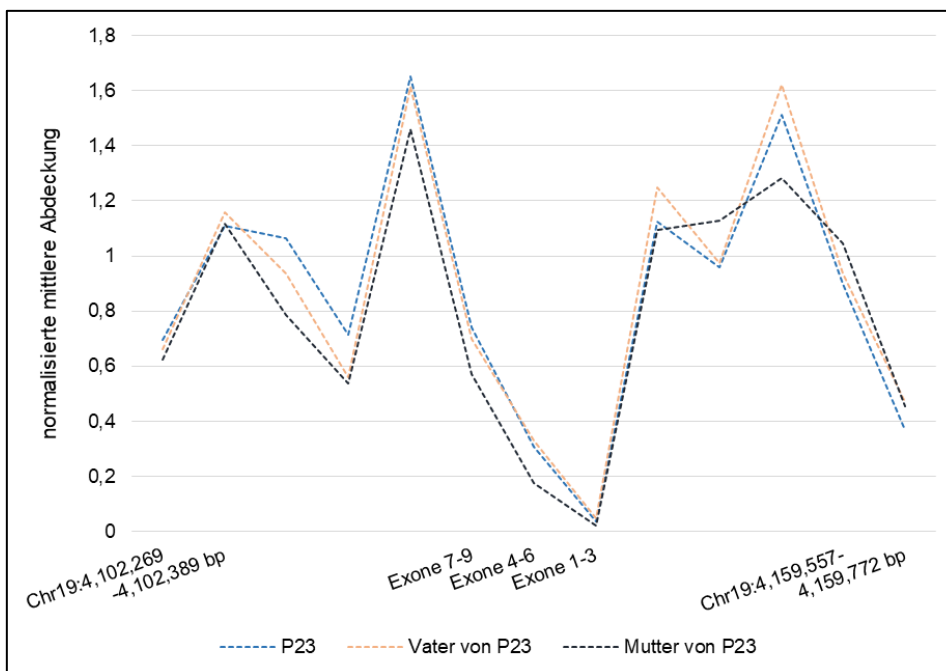


Abb. 20 WES-Abdeckung der Region um den Genlokus *MAP2K2* für die Patientin P23 und ihre Eltern

Gezeigt ist die zur mittleren Abdeckung von Chromosom 19 der Proben normalisierte mittlere Abdeckung im Bereich Chr19:4,102,269–4,159,772 bp (hg19) für die Patientin P23 in hellblau, den Vater in orange und die Mutter in dunkelblau. Deutlich ist die schwache Abdeckung der Exone des *MAP2K2*-Gens, insbesondere des potentiell durch die Insertion betroffenen ersten Exons, in allen Proben.

Der Patient P5 entwickelte im Alter von 3,0 Jahren ein Nephroblastom und wies zudem eine Hypospadie auf, weshalb er das Kriterium kongenitaler Anomalien erfüllte (57, 60). Darüber hinaus war sein Großvater väterlicherseits im Alter von 55 Jahren an einem Lymphom erkrankt. Im Genom von P5 wurden insgesamt 38 SVs identifiziert. Davon wurden 20 maternal und 18 paternal vererbt. Keine war *de novo* entstanden.

Bei dem Patienten P8 wurde im Alter von 5,8 Jahren eine B-ALL diagnostiziert. Auffällig waren bei dem Patienten außerdem eine Entwicklungsverzögerung und Wachstumsstörung. Insgesamt wurden bei ihm 59 SVs detektiert, von denen eine *de novo* entstanden war. 31 wurden von seiner Mutter, 27 von seinem Vater vererbt. Bei beiden Patienten, P5 und P8, wurde auf Chr17 (p13.1) eine >1,4 kbp lange Deletion identifiziert (vgl. Abb. 21). In der >42 kbp großen durch WGOM angegebenen Region befindet sich das Tumorsuppressorgen *TP53*.

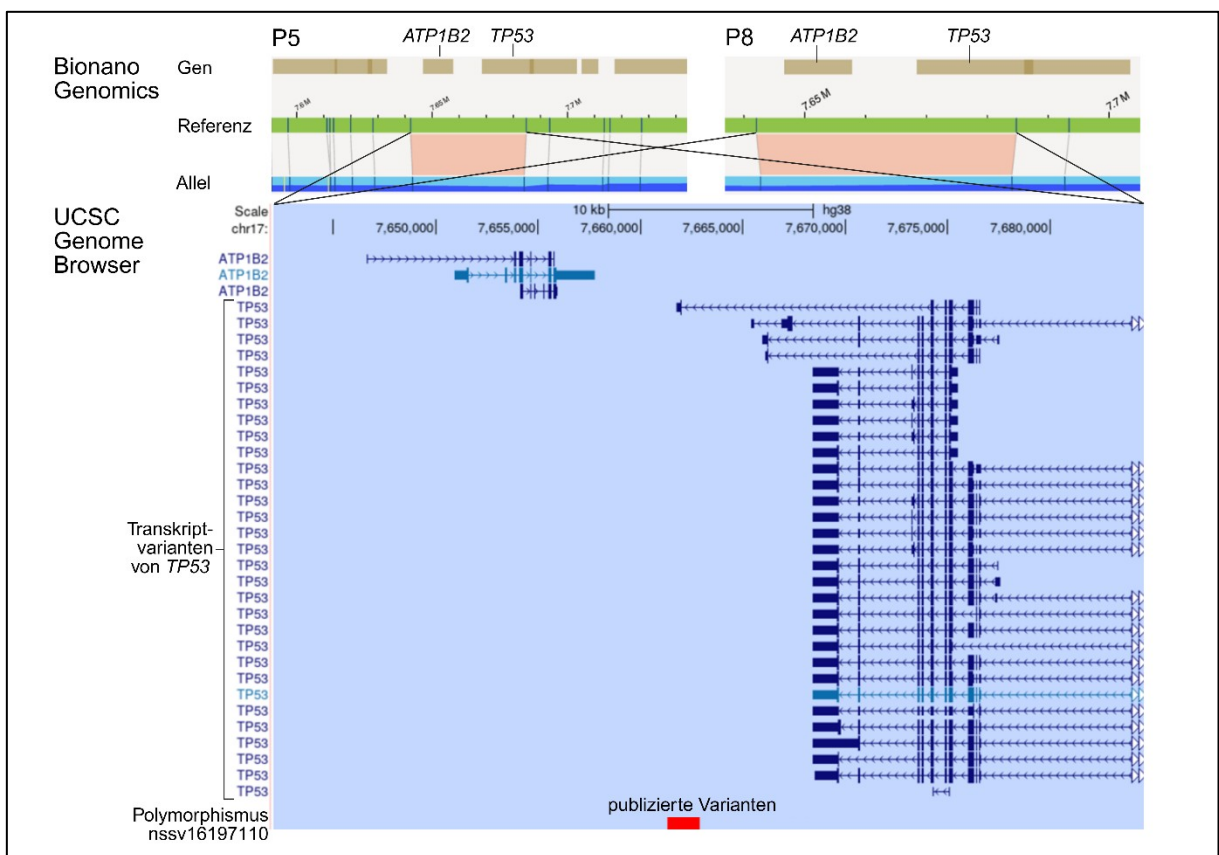


Abb. 21 >1,4 kbp große Deletion auf Chr17 (p13.1) in den Patienten P5 und P8, die einen Teil einer Transkriptvariante des KPG *TP53* umfasst

Im oberen Teil der Abbildung ist die optische Genomkartierung der Patienten P5 (links) und P8 (rechts) im Bereich Chr17:7,642,059–7,684,753 bp (hg38) dargestellt. Die oberen, braunen Balken entsprechen den in der Region lokalisierten Genen, u. a. *ATP1B2* und *TP53*. Darunter werden die Kartierung des GRCh38-Referenzgenoms in grün und des durch die Deletion betroffenen Allels in blau gezeigt. Erkennbar ist, dass der Abstand zwischen den beiden Markierungen auf dem Allel kürzer ist, als auf der Referenz, was für eine Deletion spricht. Der untere Teil der Abbildung zeigt in hellblau die Region zwischen den oben dargestellten Markierungen, in der sich die Deletion befindet, die das KPG *TP53* umfasst. Der untere, rote Balken zeigt einen bekannten Polymorphismus (nssv16197110), der zu 4,5% in der Normalbevölkerung auftritt und nur mit einer Transkriptvariante des *TP53*-Gens überlappt. Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt. Die Nutzung erfolgt im Einklang mit der akademischen Lizenzvereinbarung von BioRender.

Keimbahnvarianten in diesem Gen sind ursächlich für das in 1.2.1 beschriebene Li-Fraumeni-Syndrom, welches mit einem hohen Risiko einhergeht, diverse maligne Erkrankungen zu entwickeln und autosomal dominant vererbt wird (46). Die Variante wurde an den Patienten P5 durch seine Mutter und an P8 durch seinen Vater vererbt. Beide hatten eine unauffällige Anamnese in Bezug auf Krebserkrankungen. In der durch WGOM angegebenen Region ist die in der dbVar Datenbank beschriebene, 1585 bp große Deletion (nsv16197110) bekannt (Bruchpunkte Chr17:7,661,294–7,662,878 bp), welche mit dem siebten Exon und sechsten Intron einer Transkriptvariante von *TP53* überlappt. In der Allgemeinbevölkerung tritt diese Variante mit einer Häufigkeit von 4,5% auf. Daher zählt sie zu den Polymorphismen (70).

Der größte Teil, acht SVs (61,5%), war in intronischen Regionen eines KPG lokalisiert.

Bei dem Patienten P1, der im Alter von 1,3 Jahren an einem ATRT erkrankte und die in 3.3.1 erläuterten kongenitalen Anomalien aufwies, konnten insgesamt 64 SVs identifiziert und eine ca. 3,4 kbp lange Insertion in der Region Chr16 (p13.3) im zweiten Intron des KPG *CREBBP* nachgewiesen werden, die in Kapitel 3.3.1 betrachtet wird. Zudem wies dieser Patient eine ca. 4,6 kbp lange Deletion auf Chr10 (q25.2) im zweiten Intron des KPG *TCF7L2* auf. In dem Bereich, in dem letztere Variante lokalisiert ist, befinden sich zwei Enhancer des Gens *TCF7L2* der GeneHancer Datenbank, die jedoch nicht in embryonalen neuroektodermalen Zellen aktiv sind (76).

Der Patient P4 war zum Zeitpunkt seiner Geburt an einem Gliom erkrankt. Bereits in utero wurde ein Hydrozephalus diagnostiziert. Zudem hatte das Kind einen Maleszensus testis, multiple Endokrinopathien und strukturelle Auffälligkeiten der Gehirnentwicklung. Es zeigten sich multiple noduläre Heterotopien, eine kortikale Dysplasie rechts frontal sowie eine ektope Neurohypophyse. Seine Großmutter mütterlicherseits war an einem Ovarialkarzinom verstorben. Gliome stellen eine für KPSs typische Tumorart dar, sodass das Kriterium eines Indikatortumors gegeben war. Aufgrund der beschriebenen kongenitalen Anomalien erfüllte der Patient P4 ein weiteres Kriterium, das das Vorliegen eines KPS wahrscheinlich macht (57, 60).

In seinem Genom wurden 45 SVs detektiert, darunter eine ca. 1,4 kbp lange Deletion auf ChrX (q26.2) im zweiten Intron des KPG *GPC3*. In der durch WGOM beschriebenen Region sind ein Enhancer dieses Gens sowie eine durch Boomsma et al. beschriebene, 1626 kbp lange Deletion (esv3559353, Frequenz 0,1%) und eine durch gnomAD publizierte 1335 bp lange Deletion (nssv15943740) bekannt (76, 144, 145).

Der Fall des Patienten P16 wird genauer im Kapitel 3.4.2 dargelegt. Da sein Vater und Großvater väterlicherseits an einem Ösophagus- bzw. einem Kopf-Hals-Tumor erkrankt waren, galt die Familienanamnese des im Alter von 5,8 Jahren an einer AML erkrankten Jungen als auffällig (57, 60). Insgesamt wurden bei dem Patienten P16 62 SVs festgestellt. Auf Chr3 (p14.2) wurde bei ihm eine ca. 14,4 kbp lange, durch den Vater vererbte Deletion im vierten Intron des KPG *FHIT* detektiert. In dieser Region befinden sich aktuell keine durch GeneHancer publizierten regulatorischen Elemente (76). Beim Abgleich mit Populationsdatenbanken fiel eine

Überlappung mit einer 14310 bp großen, durch gnomAD beschriebenen Deletion (nsv4073808) auf (145).

Wie in 3.2.2 beschrieben wurde, waren die Eltern der Patientin P18, die im Alter von 1,9 Jahren eine B-ALL entwickelte, konsanguin. Daher war das Kriterium einer auffälligen Familienanamnese erfüllt. Zusätzlich war die Großmutter mütterlicherseits an einer nicht näher bezeichneten malignen hämatologischen Erkrankung verstorben. Die Patientin P18 wies auf Chr6 (q21) eine ca. 1,8 kbp lange, maternal vererbte Deletion im ersten Intron von zwei Transkriptvarianten des Gens *PRDM1* auf. Im angegebenen Bereich war zudem ein Enhancer des Gens lokalisiert (76).

Bei dem Patienten P22 wurde im Alter von 2,1 Jahren ein SHH-aktiviertes Medulloblastom diagnostiziert, welches einem Indikatortumor entspricht, der das Vorliegen eines KPS wahrscheinlich macht. Zudem war der Patient von einer Entwicklungsverzögerung betroffen, weshalb auch das Kriterium klinischer Anomalien erfüllt war (57, 60). In seinem Genom wurden insgesamt 67 SVs identifiziert und in der Region Chr20 (q11.21) eine ca. 1,9 kbp lange Deletion festgestellt, welche im vierten Intron des KPG *ASXL1* lokalisiert ist. Der durch WGOM angegebene Bereich umfasst eine ca. 2105 bp lange, durch das 1000 Genome Consortium Phase 3 publizierte Deletion (esv3645664), die mit einer Frequenz von 0,5% in der Allgemeinbevölkerung auftritt sowie eine 1984 bp große Deletion (nsv4275263), die durch gnomAD beschrieben wurde (145, 146). Diese bekannten Deletionen überlappen nicht mit einem regulatorischen Element der GeneHancer Datenbank (76).

Die Klinik des an einer T-ALL erkrankten Patienten P25 wurde bereits in 3.2.2 erläutert. Bei ihm wurde eine ca. 540 bp lange, paternal vererbte Deletion in der Region Chr10 (q23.2) im dritten Intron des KPG *BMPR1A* identifiziert. In der angegebenen Region wurden durch Boomsma et al. eine 579 bp lange Deletion (esv3546621) und durch gnomAD eine 515 bp lange Deletion (nsv4178292) beschrieben (144). Auch hier finden sich keine durch GeneHancer bekannten regulatorischen Elemente (76). Außerdem wurde im Genom des Patienten P25 in der Region Chr21 (q22.12) eine ca. 2 kbp lange, paternal vererbte Deletion identifiziert, die im neunten Intron einer Transkriptvariante des KPG *RUNX1* lokalisiert war und mit einer in dbVar beschriebenen 1907 bp langen Deletion (nssv16199098) überlappte, die in 2,3% der Allgemeinbevölkerung zu finden war und keine regulatorischen Elemente beeinflusste (70, 76). Zwei SVs (15,4%) befanden sich in einem intergenischen Genomabschnitt in der Nähe eines KPG. Bei dem Patienten P22, dessen Fall in diesem Kapitel bereits vorgestellt wurde, befand sich auf Chr11 (p13), ca. 10 kbp von dem KPG *WT1* entfernt, eine ca. 1,7 kbp lange, paternal vererbte Deletion, die jedoch nicht mit einem regulatorischen Element der GeneHancer Datenbank überlappte (76).

Bei dem Patienten P28 wurde im Alter von 13,4 Jahren ein MDS diagnostiziert. Es handelt sich dabei um eine Diagnose, bei deren Auftreten im Kindesalter eine zugrundeliegende Keimbahnvariante wahrscheinlich ist. Zudem war es die zweite maligne Erkrankung des Jungen,

der zuvor bereits ein Astrozytom entwickelte. Auffällig erschien weiterhin, dass seine Großmutter mütterlicherseits im Alter von 60 Jahren ebenfalls an einem MDS erkrankte (57, 60). In seinem Genom zeigten sich insgesamt 49 SVs, darunter eine ca. 1,7 kbp lange Deletion in der Region Chr2 (p16.3), welche sich weniger als 1 kbp vom KPG *MSH6* entfernt befand. Der durch WGOM beschriebene Bereich dieser SV überlappte nicht mit einem Enhancer oder Promotor des *MSH6*-Gens (76).

3.3.1 Identifikation einer Insertion im Enhancer des *CREBBP*-Gens

Der Patient P1 erkrankte im Alter von 1,3 Jahren an einem ATRT vom *Sonic-Hedgehog*-Typ. ATRTs entsprechen laut Rippberger et al. und Jongmans et al. einer in Bezug auf Tumorprädispositionen auffälligen Erkrankung (57, 60). Darüber hinaus ließen sich bei P1 kongenitale Anomalien feststellen. Hierzu zählen eine Trigonocephalie und eine Spaltfußbildung mit Dysmorphie der dritten Zehe rechts. Außerdem litt er unter einer Syndaktylie des Zeige- und Mittelfingers auf der rechten Seite. Weiterhin zeigte er eine verlangsamte Sprachentwicklung und verzögerte Gewichtsentwicklung ab dem 6. Lebensmonat (<3. Perzentile).

Im Tumorbiopsat des Patienten P1 zeigte sich, wie es für ATRTs typisch ist, ein Verlust der *SMARCB1*-Expression. Verschiedene Studien detektierten in Patient*innen mit ATRTs in 25–30% Keimbahnmutationen in *SMARCB1*, meist *de novo* entstanden, und *SMARCA4*, meist durch ein Elternteil vererbt (54). In diesen Genloki konnten bei dem Patienten P1 allerdings weder im WES, noch mittels WGOM genetische Alterationen detektiert werden.

Da bei der WES-Analyse keine SNVs/indels detektiert wurden, die auf eine Tumorprädisposition hinweisen, wurde WGOM durchgeführt. Hierbei wurden insgesamt im Genom des Patienten P1 64 SVs identifiziert. 39 SVs waren intergenisch, 8 intronisch und 17 in potentiell kodierenden Genomabschnitten lokalisiert. Da kein genetisches Material der Eltern verfügbar war, kann keine Aussage hinsichtlich ihrer Vererbung oder *de novo* Entstehung getroffen werden. Besonders hervorzuheben ist bei diesem Patienten eine 3384 bp lange, heterozygote Insertion im zweiten Intron des KPG *CREBBP* in der Region Chr16:3,815,321–3,818,623 bp (hg38) (vgl. Abb. 22). Bei der Insertion könnte es sich sowohl um eine Insertion einer unbekannten genetischen Sequenz als auch um eine Duplikation des zweiten Introns des *CREBBP*-Gens handeln. In beiden Fällen ist generell denkbar, dass die SV entweder keinen oder einen Einfluss auf die Funktion des entstehenden epigenetischen Regulatorproteins hat. Interessanterweise enthält die Region, in der die Insertion liegt, den Enhancer GH16J003792, der in einer Vielzahl von Geweben aktiv ist (76, 147).

CREBBP ist als transkriptioneller Ko-Aktivator für viele verschiedene Transkriptionsfaktoren bekannt (104).

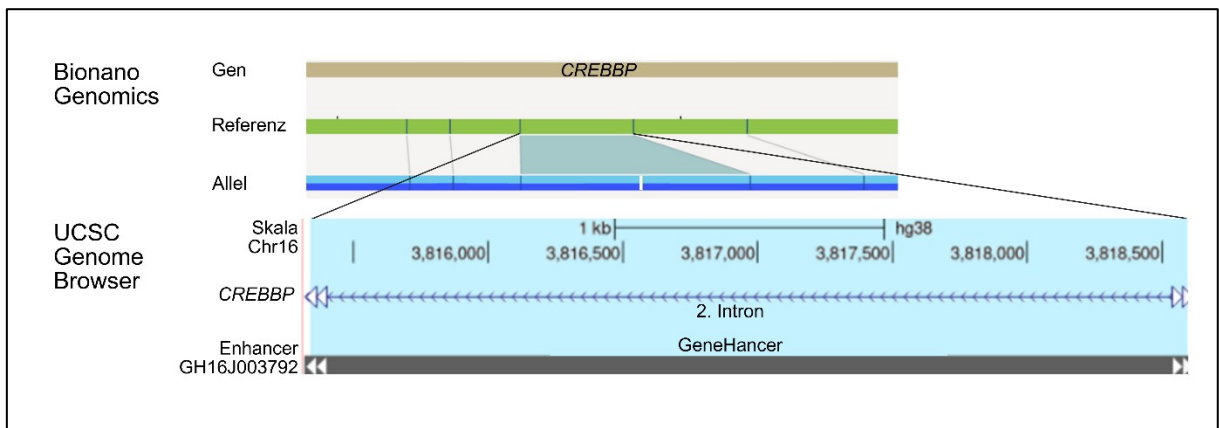


Abb. 22 3384 bp große Insertion auf Chr16 (p13.3) im Genom des Patienten P1, die im 2. Intron des KPG *CREBBP* lokalisiert ist

Im oberen Teil der Abbildung ist die optische Genomkartierung des Patienten P1 im Bereich Chr16:3,815,321–3,818,623 bp (hg38) dargestellt. Der obere, braune Balken entspricht dem KPG *CREBBP*. Darunter werden die Kartierung des GRCh38-Referenzgenoms in grün und des durch die Insertion betroffenen Allels in blau gezeigt. Ersichtlich ist eine zusätzlich eingefügte Markierung (weißer vertikaler Strich in der Allel-Kartierung). Deutlich wird ein 3384 bp großer Zugewinn genetischen Materials, bei dem es sich sowohl um eine Insertion als auch um eine Duplikation handeln kann.

Der untere Teil der Abbildung zeigt in hellblau die Region zwischen den oben dargestellten Markierungen, in der sich die Insertion befindet bzw. in der eine Duplikation stattfand. Es handelt sich um das 2. Intron des KPG *CREBBP*, in dem der Enhancer GH16J003792 (dunkelgrauer Balken) lokalisiert ist (76). Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt. Die Nutzung erfolgt im Einklang mit der akademischen Lizenzvereinbarung von BioRender.

Um potentielle Effekte der Insertion auf die Expression des Gens zu untersuchen, wurde eine qPCR durchgeführt. Wie in 2.2.3.3 erläutert, wurde die Primer-Effizienz in drei Versuchen an RC-K8-Zellen bestimmt, die stets zwischen 95% und 100% lag. Untersucht wurde die relative Expression von *CREBBP* in Relation zu der der *Housekeeping*-Gene *HPRT1* und *GUSB* anhand von PBMCs des Patienten P1, seiner ATRT-Tumorprobe und sechs PBMC-Proben von Individuen, die in der untersuchten Region keine SVs zeigten (vgl. Abb. 23).

Im Vergleich zum Mittel aller Proben der sechs Individuen, bei denen keine SV in der Region festgestellt wurde, zeigte der Patient P1 eine um das 1,4-fache erhöhte bzw. um das 0,7-fache reduzierte relative Expression von *CREBBP* gegenüber *GUSB* bzw. *HPRT1*. Ein unabhängiger t-Test ergab keinen signifikanten Unterschied in der mRNA-Expression von *CREBBP* zwischen PBMCs des Patienten P1 und den sechs Kontrollen (*GUSB/CREBBP* $p=0,120$; *HPRT1/CREBBP* $p=0,229$).

Darüber hinaus wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe pädiatrische Neuroonkologie der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf eine RNA-Sequenzierung der ATRT-Probe des Patienten durchgeführt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Arbeitsgruppe verglich die *CREBBP*-Expression der Tumorprobe mit der von elf ATRT-Proben unterschiedlicher Subtypen (*MYC*, *SHH* und *TYR*) (vgl. Abb. 24). Es zeigten sich keine Unterschiede der *CREBBP*-Expression des Tumorgewebes von P1 zu anderen ATRT Tumorproben verschiedener Subgruppen.

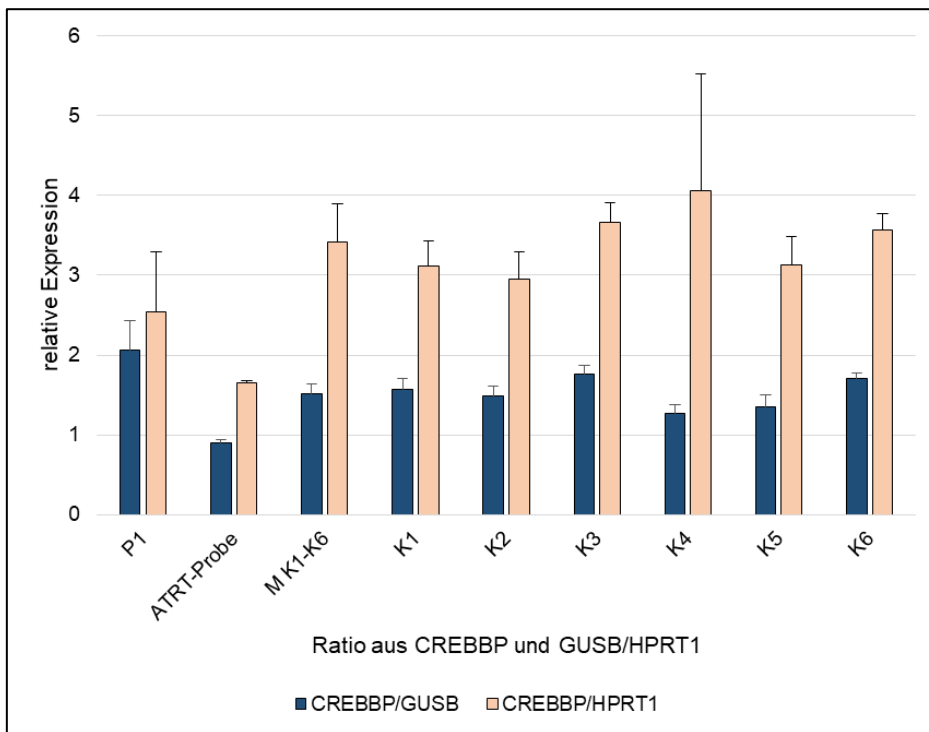


Abb. 23 Relative Expression der CREBBP-mRNA in Relation zu GUSB und HPRT1 in dem Patienten P1, dem ATRT-Gewebe und PBMC-Kontrollen

Dargestellt ist die relative CREBBP-mRNA-Expression normalisiert gegen *GUSB* (dunkelblau) und *HPRT1* (orange) als Referenzgene ($\Delta\Delta C_t$ -Wert). Die Y-Achse zeigt den relativen mRNA-Expressionswert, die X-Achse die experimentellen Proben, bestehend aus PBMCs des Patienten P1, seinem ATRT-Tumorgewebe sowie PBMCs von sechs Individuen, die keine SV in der untersuchten Region tragen (K1-K6) und deren Mittelwert (M K1-K6). Die Daten sind als Mittelwert aus N=3 unabhängigen Experimenten dargestellt.

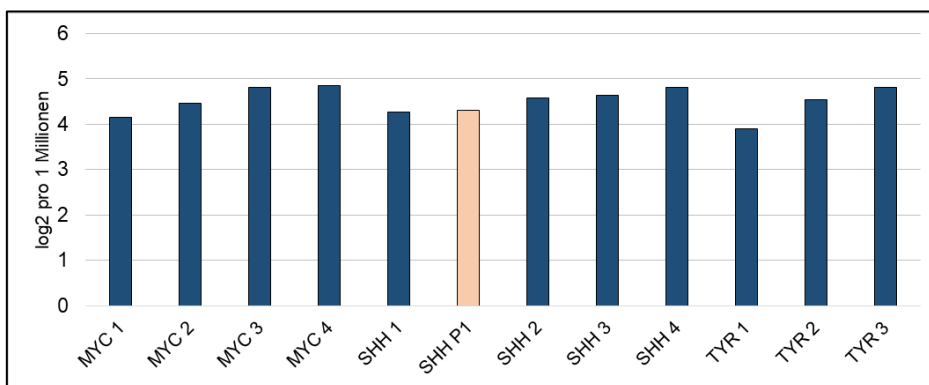


Abb. 24 Transformierte und normalisierte CREBBP-mRNA-Expressionsdaten in der ATRT-Probe des Patienten P1 und anderen ATRTs, untersucht durch mRNA-Sequenzierung

Log2-normalisierte Genexpression des *CREBBP*-Gens in verschiedenen ATRT-Proben des MYC-Subtyps (MYC1-MYC4), des SHH-Subtyps (SHH1-SHH4), darunter die Tumorseite des Patienten P1 (SHH P1, orange) und des TYR-Subtyps (TYR1-TYR3). Die RNA-Sequenzierungsdaten sind als log2-normalisierte Transkripthäufigkeit pro 1 Million Reads (log2 CPM/TPM) dargestellt. Ein Wert von 4 entspricht einer mittelhohen Genexpression.

3.4 Varianten, die Kandidatengene betreffen

Es zeigten sich SVs in Kandidatengenen für die Prädisposition von Tumorerkrankungen im Kindesalter. Diese sollen im Folgenden genauer betrachtet werden (vgl. Tabelle 36).

Tabelle 36 Übersicht über SVs mit Einfluss auf Kandidaten-KPGs

Die genomische Region aller mit einem KPG überlappender SVs ist angegeben. Zudem sind deren SV-Typ, die Größe und Lokalisation dargestellt. Alle identifizierten Varianten waren heterozygot. Die Spalte „bekannte SV/Polymorphismus“ gibt an, ob die Region, in der die SV detektiert wurde, mit einer bekannten CNV überlappt. Ist das der Fall, wurde angegeben, in welcher Datenbank die CNV beschrieben wurde sowie deren Größe und Allelfrequenz.

ID	genomische Region (hg38)	SV-Typ	Größe in bp	Kandidatengen/Enhancer	Lokalisation	bekannte SV/Polymorphismus
P6	Chr7:102,443,197–102,542,055 bp	Deletion	98858	<i>RASA4B</i>	potentiell exonisch	keine
P9	Chr8:16,077,334–16,191,109 bp	Deletion	77465	<i>MSR1</i>	potentiell exonisch	1000 Genomes Project Phase 1, 78566 bp, 0.086%
P10	Chr8:16,077,334–16,195,019 bp		77938			
P12	Chr15:38,123,996–38,130,065 bp	Deletion	2464	Enhancer von <i>SPRED1</i>	intergenisch	1000 Genomes Project Phase 3, 2444 bp, 0.08%
P14	Chr10:52,432,178–52,451,594 bp	Deletion	555	Enhancer von <i>DDK1</i>	intergenisch	keine
P16	Chr7:102,574,533–102,691,465 bp	Deletion	95701	<i>RASA4</i>	potentiell exonisch	Kidd et al. 2010; 96521 bp, 1 SV in 9 Proben

3.4.1 Deletion des *MSR1*-Gensorts

Die Patientinnen P9 und P10 sind Schwestern, die beide von einer Tumorerkrankung betroffen waren. Im Alter von 10,1 Jahren erkrankte die Patientin P9 an einem pilozytischen Astrozytom, während ihre Schwester P10 im Alter von 18,5 Jahren ein Hodgkin-Lymphom entwickelte.

Nach den Kriterien von Jongmans et al. und Ripperger et al. zeigten die Schwestern eine auffällige Familienanamnese. Ihre Großväter mütterlicher- und väterlicherseits litten seit dem 60. bzw. 65. Lebensjahr an einem Prostatakarzinom. Da aufgrund der Familienanamnese eine gemeinsame, für ein KPS ursächliche SV wahrscheinlich ist, wurden die WGOM-Daten der beiden Schwestern verglichen (57, 60). Eine Analyse des Genoms der Eltern mittels WGOM erfolgte nicht. Für weiterführende Analysen wurden WES-Daten der Eltern genutzt.

Insgesamt konnten bei den Schwestern 14 gemeinsame SVs nachgewiesen werden. Ein möglicher Zusammenhang mit einer Krebsprädisposition wurde für jede SV anhand ihrer Lokalisation, ihres potentiellen Einflusses auf regulatorische Elemente und mittels intensiver Literaturrecherche überprüft.

Auffällig war eine ca. 77,5 kbp lange Deletion auf Chr8 (p22), die in Abb. 25 zu sehen ist. In der durch WGOM angegebenen Region befinden sich für die Patientin P9 die Exone zwei bis zehn und Introne eins bis neun des *MSR1*-Gens.

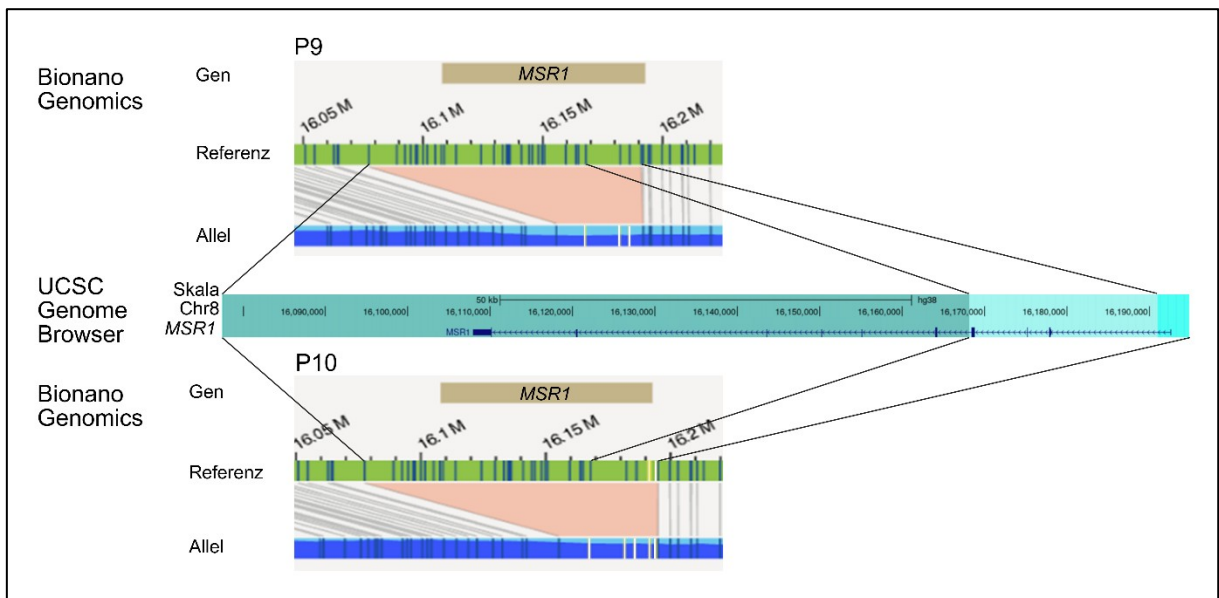


Abb. 25 Detektion einer >77,5 kbp Deletion auf Chr8 (p22) in den Patientinnen P9 und P10, die Teile des *MSR1*-Gens umfasst

Im oberen und unteren Teil der Abbildung ist die optische Genomkartierung der Schwestern im Bereich Chr8:16,077,334–16,191,109 (hg38, P9, oberer Teil der Abbildung) und Chr8:16,077,334–16,195,019 (hg38, P10, unterer Teil der Abbildung) dargestellt. Der obere, braune Balken entspricht der Lokalisation des Gens *MSR1*. In der Mitte befindet sich in grün die Kartierung des GRCh38-Referenzgenoms, darunter in blau die Kartierung des durch die Deletion betroffenen Allels. Deutlich wird eine 77,5 kbp große Deletion.

Der mittlere Teil der Abbildung zeigt die Lokalisation der deletierten Region, die Teile des *MSR1*-Gens umfasst. Ersichtlich ist, dass der durch WGOM angegebene Bereich für die Patientin P10 (blaugrauer, hellblauer und türkisfarbener Bereich) etwas größer ist als für P9 (blaugrauer und hellblauer Bereich) und einige Markierungen durch WGOM im *Downstream*-Bereich nicht verbunden werden konnten, jedoch erhalten sind. Es ist daher davon auszugehen, dass die Exone 1–4, die im rechten, hellblauen und türkisfarbenen Bereich des mittleren Teils der Abbildung dargestellt sind, erhalten sind, während die Exone 5–10, die im linken, blaugrau gefärbten Bereich des mittleren Teils der Abbildung gezeigt sind, deletiert sind. Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt. Die Nutzung erfolgt im Einklang mit der akademischen Lizenzvereinbarung von BioRender.

Für die Patientin P10 liegt das gesamte *MSR1*-Gen im angegebenen Bereich. Anhand der Markierungen ist eine Deletion der Exone fünf bis zehn und Introne vier bis neun wahrscheinlich. Die Markierungen am rechten Bildrand sind erhalten, wenn auch nicht als übereinstimmend detektiert. *MSR1* kodiert für ein Transmembranprotein in Makrophagen, das u. a. zur Entstehung atherosklerotischer Prozesse beiträgt (116, 148).

Zur Verifizierung dieser >77,5 kbp großen Deletion wurden im nächsten Schritt die WES-Daten genutzt. Dafür wurde die normalisierte mittlere Abdeckung der einzelnen Exonabschnitte der Patientin mit dem der Eltern sowie der Schwester verglichen (vgl. Abb. 26). Es zeigt sich eine niedrigere mittlere Abdeckung in den Exonen fünf bis zehn des *MSR1*-Genlokus der beiden Schwestern und der Mutter im Vergleich zur Probe des Vaters. Dies deutet auf eine vorhandene Deletion der Exone fünf bis zehn des *MSR1*-Gens hin, die bei den beiden Geschwistern und auch bei der Mutter vorliegt. Somit konnte anhand der vorliegenden WES-Daten eine Deletion im *MSR1*-Genort verifiziert werden. Zudem deuten die Daten auf eine Vererbung der Deletion durch die Mutter hin.

Ergebnisse

Zur genauen Verifizierung der Bruchpunkte der >77,5 kbp langen Deletion wurde eine Long-range PCR, wie in 2.2.2.6 beschrieben, durchgeführt. Verglichen wurde DNA der Patientinnen P9 und P10 mit der Kontrolle des Vaters, die in diesem Bereich keine Deletion aufwies, und Nuklease-freiem Wasser. Abb. 27 zeigt die Ergebnisse der Gel-Elektrophorese nach der Long-range PCR. Die Länge des Wildtyp-PCR-Produkts der gesunden Kontrolle betrug 92684 bp und war damit für die Generierung eines PCR-Produkts und die Darstellung in dieser Gelelektrophorese zu lang.

In der DNA der Patientinnen P9 und P10 konnte, wie die beiden deutlichen Banden zeigen, ein ~20 kbp langes PCR-Produkt nachgewiesen werden. Für die Kontrolle des Vaters und die Wasser-Probe zeigten sich keine Banden.

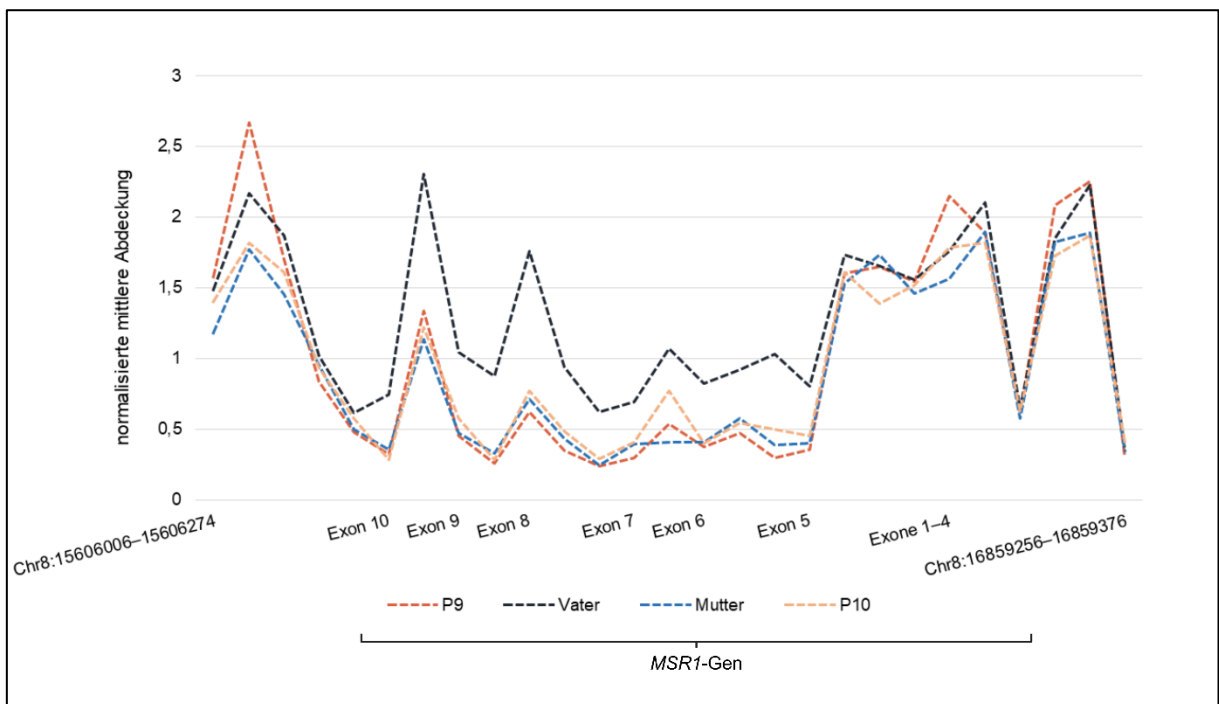


Abb. 26 WES-Abdeckung der Region um das *MSR1*-Gen für die Patientinnen P9, P10 und deren Eltern

Gezeigt ist die zur mittleren Abdeckung von Chromosom 8 der Probe normalisierte mittlere Abdeckung im Bereich Chr8:15,606,006–16,859,376 bp (hg19). Deutlich ist die niedrigere mittlere Abdeckung für die Patientinnen P9 (orange), P10 (gelb) und deren Mutter (blau) im Bereich der Exone 5–10 des *MSR1*-Gens im Vergleich zur Probe des Vaters (dunkelblau).

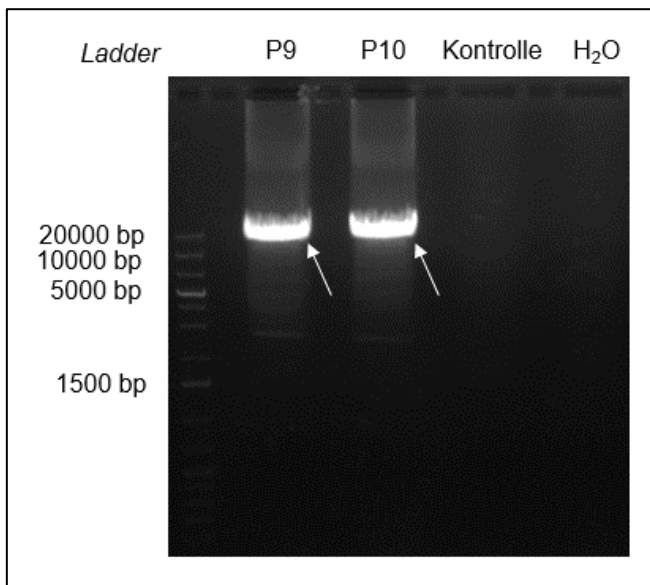


Abb. 27 Ergebnisse der Gel-Elektrophorese nach der Long-range PCR zur Identifikation des PCR-Produkts in den Proben der Patientinnen P9 und P10 mit der >77,5 kbp Deletion

Aufgetragen ist die GeneRuler 1kb Plus Ladder. Mit Pfeilen markiert sind die Banden der Proben der Patientinnen P9 und P10, in denen ein ~20 kbp langes PCR-Produkt nachgewiesen werden konnte. In der Wildtyp-Kontrolle des Vaters sowie Nuklease-freiem Wasser stellte sich diese Bande nicht dar.

Somit wurden im nächsten Schritt für die Bestimmung der exakten Bruchpunkte der Deletion, wie in 2.2.2.8 erläutert, eine Sanger-Sequenzierung durchgeführt. Aufgrund der Auflösung der WGOM-Methode waren die genauen Bruchpunkte der Deletion unbekannt. Sie konnten zwischen dem chromosomalen Bereich Chr8:16,077,334 bp (hg38, letzte Markierung, die noch als nicht deletiert detektiert wurde) und Bereich Chr8:16,191,109 bp (hg38) für die Patientin P9 und Chr8: 16,195,019 bp (hg38, erste Markierung, die deletiert ist) für P10 liegen. Daher wurde sich mit Hilfe eines *Primer-Walkings* mit verschiedenen Primern an die Bruchpunkt herangetastet. Final konnte so mit Hilfe der Sanger-Sequenzierung der genau Bruchpunkt und somit die Größe und Lage der Deletion bestimmt werden. Detektiert wurden die Deletions-Bruchpunkte Chr8:16,087,937–16,166,438 bp (hg38), die somit insgesamt 78501 bp umfassen. Die Deletion der Exone fünf bis zehn und Introne vier bis neun konnte damit bestätigt werden (vgl. Abb. 28).

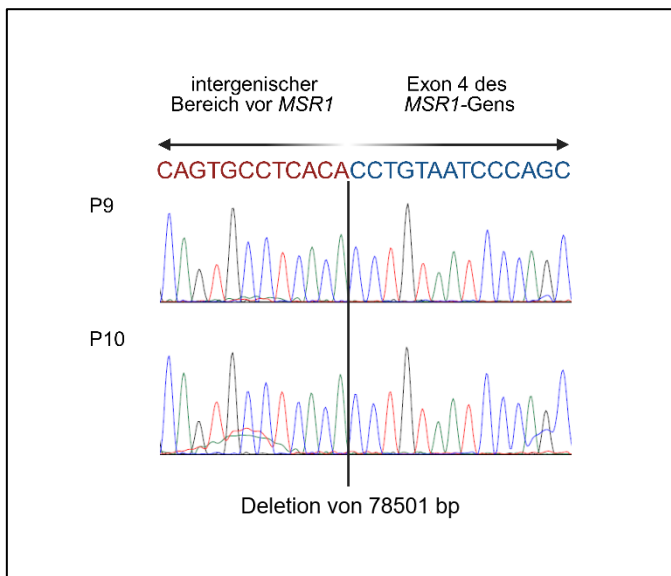


Abb. 28 Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung zur Detektion der Bruchpunkte der Deletion, die Teile des *MSR1*-Gens umfasst, bei den Patientinnen P9 und P10

Gezeigt sind die mittels Sanger-Sequenzierung ermittelten Bruchpunkte der 78501 bp langen Deletion, die die Exone 5 bis 10 des *MSR1*-Gens umfasst für die Patientinnen P9 (oberer Teil der Abbildung) und P10 (unterer Teil der Abbildung).

3.4.2 Deletionen des *RASA4*- und *RASA4B*-Genlokus

In der Region Chr7 (q22.1), die die Gene *RASA4* und *RASA4B* beinhaltet, wurden in zwei Fällen SVs >90 kbp detektiert. Im Genom der Patienten P6 und P16 wurden eine ca. 96 kbp lange bzw. eine 99 kbp lange, heterozygote Deletion identifiziert. Einen Überblick über diese Patienten gibt Tabelle 37.

Im Alter von 13,2 Jahren wurde bei dem Patienten P6 eine T-ALL mit einer Translokation t(9;11), die zur Fusion von *KMT2A* mit *MLL2* führte, diagnostiziert. Zudem zeigte der Patient faziale Dysmorphien wie z. B. einen Hypertelorismus, tiefsitzende Ohren und einen flachen Nasenrücken sowie Auffälligkeiten beider Daumen, die mit einer Bewegungseinschränkung einhergingen. Er litt im Zuge der Therapie an einer exzessiven Toxizität, die sich durch Mukositis und eine starke Neurotoxizität zeigte. Somit erfüllte er nach Jongmans et al. und Ripperger et al. sowohl das Kriterium kongenitaler Anomalien als auch das einer gesteigerten Toxizität im Rahmen der Behandlung (57, 60).

Tabelle 37 Die Patienten P6 und P16, bei denen Deletionen des *RASA4*- und *RASA4B*-Genlokus detektiert wurden

Das Alter der Patient*innen bei Diagnosestellung wird in Jahren angegeben. Die KPS-Kriterien beschreiben die in 1.2.2 erläuterten Kriterien, die auf ein KPS hinweisen und durch Jongmans et al. und Ripperger et al. publiziert wurden (57, 60).

ID	Diagnose	Alter	KPS-Kriterium	Anzahl detektierter SVs	Deletion im Kandidatengen	Länge
P6	T-ALL	13,2	kongenitale Anomalien, exzessive Toxizität im Zuge der Therapie	49	<i>RASA4B</i>	98858 bp
P16	AML	2,4	auffällige Familienanamnese	62	<i>RASA4</i>	>95702 bp

Außerdem entwickelte sein Onkel väterlicherseits im Alter von 45 Jahren ein Bronchialkarzinom und verstarb daran. P6 hatte Schwierigkeiten beim Lernen und besuchte eine Förderschule. Drei Jahre nach der Diagnose erlitt er einen Rückfall und verstarb zehn Monate später. Im Genom des Patienten P6 wurden 49 manuell überprüfte SVs festgestellt. Davon waren 31 Deletionen, 14 Insertionen und vier Duplikationen. Detektiert wurden 26 SVs in intergenischen, neun in intronischen und 14 in potentiell exonischen Bereichen des Genoms. 38 SVs waren heterozygot, fünf hemizygot und eine homozygot. Bei fünf SVs konnte keine eindeutige Zygotie erkannt werden. Da es sich um eine Duo-Analyse handelt, konnte nicht über alle identifizierten SVs eine Aussage hinsichtlich ihrer Vererbung getroffen werden. SVs in KPGs wurden im Genom des Patienten P6 nicht detektiert. Nach ausführlicher Literaturrecherche wurde jedoch eine Deletion eines Kandidatengens näher untersucht, die im Zusammenhang mit der Krebsentstehung des Jungen stehen könnte. In Abb. 29 ist die identifizierte, 98858 bp lange Deletion in der Region Chr7:102,443,197–102,542,055 bp (hg38) zu erkennen. Die Variante wurde entweder durch den Vater vererbt oder ist *de novo* entstanden, da sie im Genom der Mutter nicht detektiert wurde. In der Region sind die Gene *ORAI2*, *ALKBH4*, *LRWD1*, *POLR2J*, *RASA4B* und *UPK3BL2* lokalisiert.

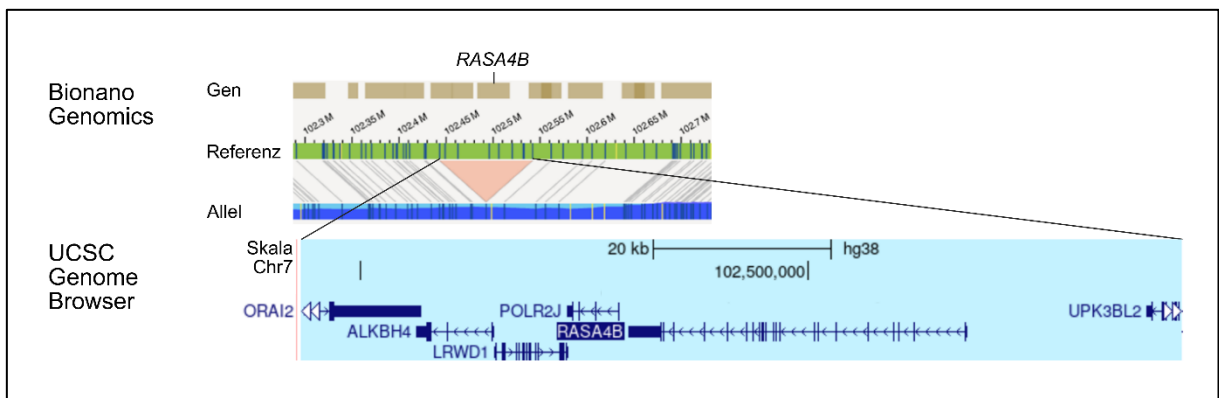


Abb. 29 98858 bp große Deletion auf Chr7 (q22.1) in dem Patienten P6, die das *RASA4B*-Gen umfasst

Im oberen Teil der Abbildung ist die optische Genomkartierung des Patienten P6 im Bereich Chr7:102,443,197–102,542,055 bp (hg38) dargestellt. Die oberen, braunen Balken entsprechen den Lokalisationen der in der Region lokalisierten Gene, u. a. *RASA4B*. Darunter werden die Kartierung des GRCh38-Referenzgenoms in grün und des durch die Deletion betroffenen Allels in blau gezeigt. Deutlich wird eine 98858 bp große Deletion.

Der untere Teil der Abbildung zeigt in hellblau die deletierte Region, die die Gene *ORAI2*, *ALKBH4*, *LRWD1*, *POLR2J*, *RASA4B* und *UPK3BL2* umfasst. Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt. Die Nutzung erfolgt im Einklang mit der akademischen Lizenzvereinbarung von BioRender.

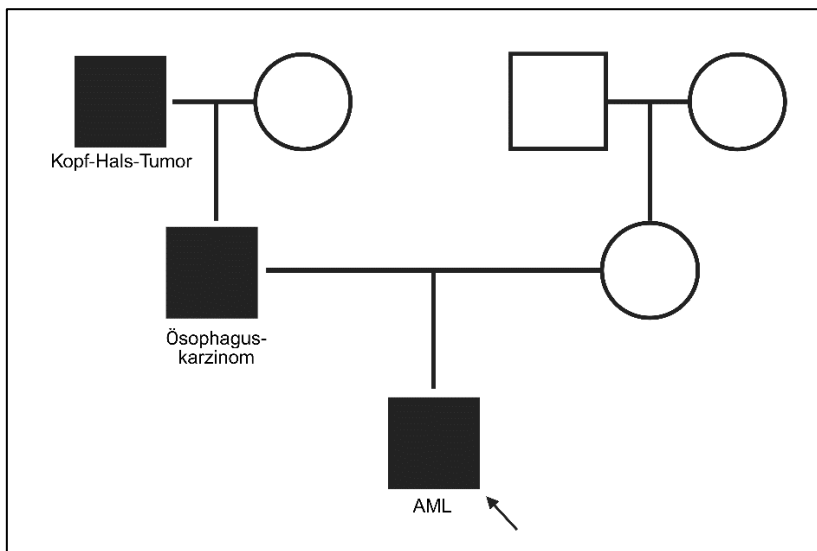


Abb. 30 Familienstammbaum des Patienten P16

Der dargestellte Familienstammbaum umfasst drei Generationen. Personen, die im Alter <45 Jahre an Krebs erkrankten sind in schwarz markiert. Bei dem Patienten P16 wurde eine AML diagnostiziert. Er wurde in der Abbildung mit einem Pfeil markiert. In Generation 1 war der Großvater väterlicherseits an einem Kopf-Hals-Tumor erkrankt. In Generation 2 erkrankte der Vater des Patienten P16 an einem Ösophaguskarzinom. Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt. Die Nutzung erfolgt im Einklang mit der akademischen Lizenzvereinbarung von BioRender.

P16 erkrankte im Alter von 2,4 Jahren an einer AML. Die Familienanamnese des Jungen war auffällig, da sein Vater und sein Großvater väterlicherseits beide im Alter von <45 Jahren an Krebs erkrankten. Der Vater entwickelte vor dem 35. Lebensjahr ein Ösophaguskarzinom, wobei das exakte Erkrankungsalter nicht bekannt ist. Bei dem Großvater väterlicherseits wurde im Alter von 30 Jahren ein Kopf-Hals-Tumor diagnostiziert (vgl. Abb. 30).

Neben dem Genom des Patienten konnten auch die Genome beider Elternteile untersucht werden, sodass hier ein Rückschluss auf *de novo* entstandene Varianten möglich war. Nach den in 2.2.1 erklärten Filterschritten wurden insgesamt 62 SVs im Genom des Patienten P16 detektiert, von denen 39 durch die Mutter, 23 durch den Vater vererbt wurden und keine *de novo* entstanden war. Die identifizierte Deletion im Intron des KPG *FHIT* wurde bereits in 3.3 thematisiert.

Es erfolgte eine Analyse der Art, Zygotie und Lokalisation der übrigen 61 detektierten SVs sowie eine ausführliche Literaturrecherche zu ihrem möglichen Einfluss auf Kandidatengene der Krebsprädisposition.

In diesem Kontext interessant war eine ca. 96 kbp lange Deletion der Gene *RASA4*, *UPK3BL1*, *SPDY2B* und *POLR2J2*, die durch den Vater des Patienten P16 vererbt wurde. Sie ist in Abb. 31 dargestellt und befindet sich in der Region Chr7:102,574,533–102,691,465 bp (hg38). Hierbei konnten die Bruchpunkte anhand der Markierungen nicht exakt bestimmt werden. Dies ist in der Abbildung insofern ersichtlich, als dass auf der Kartierung des Allels zwischen den letzten erhaltenen Markierungen ein Abstand besteht. Daher ist auch keine exakte Längenangabe möglich.

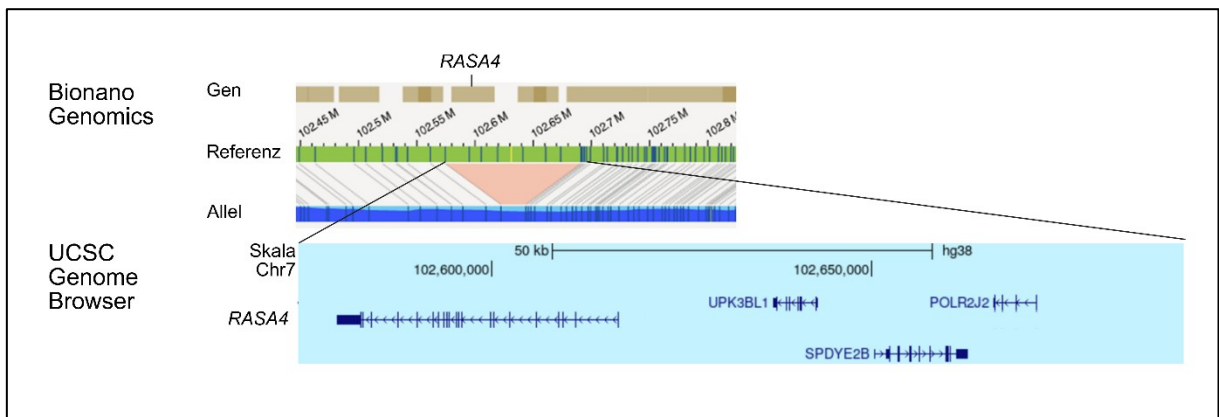


Abb. 31 Ca. 96 kbp große Deletion auf Chr7(q22.1) in dem Patienten P16, die das *RASA4*-Gen umfasst

Im oberen Teil der Abbildung ist die optische Genomkartierung des Patienten P16 im Bereich Chr7:102,574,533–102,691,465 bp (hg38) dargestellt. Die oberen, braunen Balken entsprechen den Lokalisationen der in der Region vorliegenden Gene, u. a. *RASA4*. Darunter werden die Kartierung des GRCh38-Referenzgenoms in grün und des durch die Deletion betroffenen Allels in blau gezeigt. Deutlich wird eine ca. 96 kbp große Deletion.

Der untere Teil der Abbildung zeigt in hellblau die deletierte Region, die die Gene *RASA4*, *UPK3BL1*, *SPDYE2B* und *POLR2J2* umfasst. Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt. Die Nutzung erfolgt im Einklang mit der akademischen Lizenzvereinbarung von BioRender.

Zur weiteren Untersuchung der identifizierten Deletionen auf Chr7(q22.1) bei den Patienten P6 und P16 wurden die durch WES generierten Daten analysiert. Betrachtet wurde die mittlere zu Chromosom 7 der Probe normalisierte Abdeckung in den betroffenen Regionen. Es handelt sich um stark repetitive Bereiche des Genoms, wodurch eine präzise Zuordnung von *Reads* erschwert bis nicht möglich war. Daher ist die Abdeckung in den Regionen niedrig und nicht auswertbar. Die WES-Daten konnten hinsichtlich einer Validierung der Deletionen daher nicht genutzt werden.

Als nächstes wurden Primer design, um den Einfluss der Deletionen auf die Expression von *RASA4* bzw. *RASA4B* mittels qPCR zu verifizieren.

Trotz dreier unabhängiger Primerdesign-Versuche war es nicht möglich, spezifische qPCR-Primer für die Zielregion zu erstellen, da diese eine hohe Sequenzhomologie aufweist. Dies führte zu unspezifischer Amplifikation, die sich im Agarosegel durch das Auftreten mehrerer unspezifischer Banden unterschiedlicher Größe, diffuser *Smear*-Muster sowie durch Primer-Dimere äußerte (vgl. Abb. 32). Letzteres konnte auch durch Einsatz unterschiedlicher Primer-Konzentrationen nicht vermieden werden. Es ist daher zum aktuellen Zeitpunkt nicht möglich, spezifische Primer für die durch die Deletionen betroffenen Regionen zu designen, weshalb eine Expressionsanalyse mittels qPCR nicht erfolgen konnte.

Im Genom der Patienten P6 und P16 wurden eine >98 kbp bzw. eine ca. 96 kbp lange Deletion nachgewiesen, die u. a. die Gene *RASA4B* bzw. *RASA4* umfassen. Die Deletionen können keinen Einfluss oder aber einen Effekt auf die Expression und Funktion der Gene haben. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie ist aktuell keine weitere Verifizierung der Deletionen möglich.

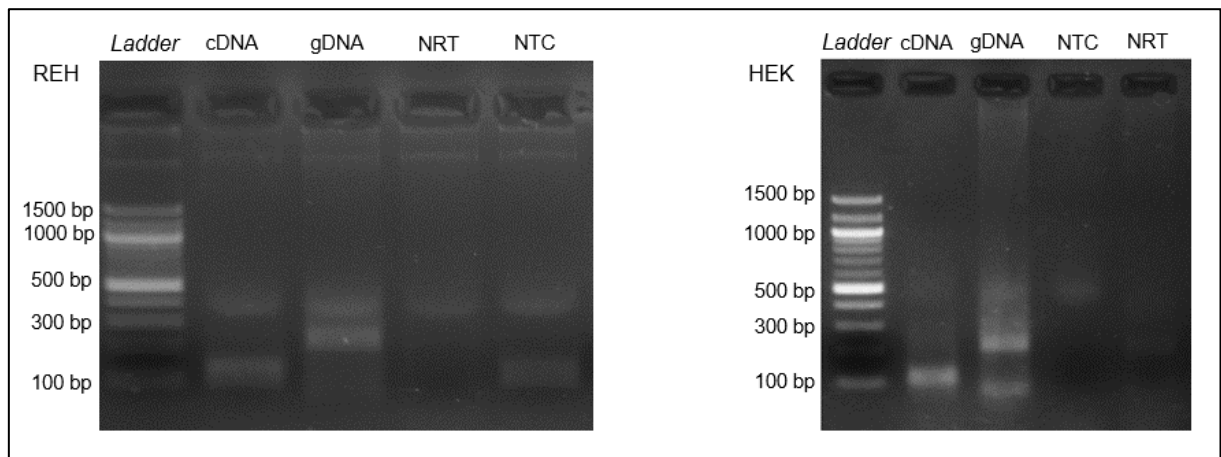


Abb. 32 Validierung der qPCR-Primer zur Expressionsanalyse von *RASA4* anhand von cDNA und gDNA aus Reh- und HEK293-Zellen

Beispielhaft abgebildet sind die Aufnahmen des 2%-Agarosegels zur Validierung eines qPCR-Primerpaars zur Expressionsanalyse von *RASA4*. Genutzt wurde cDNA und gDNA aus Rehbein(Reh)-Zellen (links) und humanen embryonalen Nieren-293(HEK)-Zellen (rechts), verglichen mit einer Negativkontrolle ohne cDNA- bzw. gDNA-Template (NTC) und einer Kontrolle ohne Reverse Transkriptase (NRT). Aufgetragen ist die Quick-Load 100bp DNA Ladder (New England BioLabs). Ersichtlich sind unspezifische Banden, *Smear*-Muster und Banden durch Primerdimere bei cDNA und gDNA aus Reh- und HEK293-Zellen.

3.4.3 Potentielle Deletion eines *DKK1*-Enhancers

Die Patientin P14 erhielt im Alter von 3,1 Jahren die Diagnose eines ZNS-Tumors. Im Biopsat konnten ein SHH-aktiviertes, *NTRK1*-positives Medulloblastom sowie ein *NTRK1*-negatives Astrozytom identifiziert werden. Somit sind zwei der auf ein KPS hinweisenden Kriterien erfüllt, da bei der Patientin zum einen zwei synchron vorliegende Tumorerkrankungen diagnostiziert wurden und SHH-aktivierte Medulloblastome per se auf KPS hindeuten (57, 60).

Die SVs der Patientin konnten mit Hilfe von WGOM mit denen der Eltern verglichen werden. Insgesamt trägt die Patientin 41 SVs, von denen eine *de novo* entstand, 21 maternal und 19 paternal vererbt wurden.

Es wurde eine Deletion detektiert, die im Zusammenhang mit einer möglichen Krebsprädisposition stehen könnte. Diese ist auf Chr10 (q21.1) lokalisiert, heterozygot und 555 bp groß. Moleküle, die die Deletion tragen, wurden sowohl im Genom der Mutter (45 Moleküle) als auch im Genom des Vaters der Patientin P14 (52 Moleküle) identifiziert. Der durch WGOM angegebene Bereich, Chr10:52,432,178–52,451,594 bp, ist in Abb. 33 abgebildet. In diesem sind zwei Markierungen erhalten, wodurch eine konkretere Aussage zur Lokalisation der Deletion ermöglicht wird.

Es kann vermutet werden, dass sie im linken, dunkelblauen Bereich der Abbildung lokalisiert ist. Hier befinden sich die Enhancer GH10J052436 und GH10J052439 (76).

Sie wirken auf das *DKK1*-Gen, das als Kandidaten-Tumorsuppressorgen in Wnt-aktivierten Medulloblastomen diskutiert wird (149).

Für die Verifizierung der Deletion wurde aufgrund der Größe der durch WGOM angegebenen Region keine PCR durchgeführt.

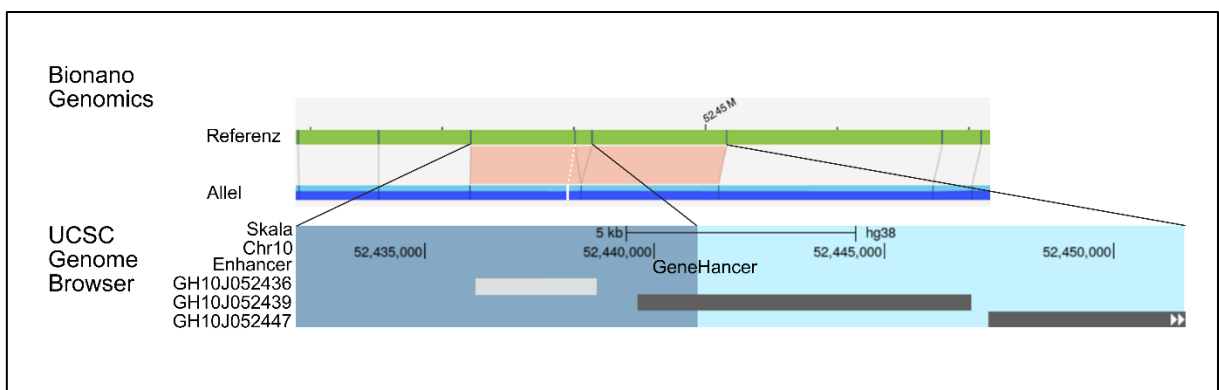


Abb. 33 555 bp große Deletion auf Chr10 (q21.1) in der Patientin P14 mit potentiellm Einfluss auf einen Enhancer des *DKK1*-Gens

Im oberen Teil der Abbildung ist die optische Genomkartierung der Patientin P14 im Bereich Chr10:52,432,178–52,451,594 bp (hg38) dargestellt. Der obere, grüne Balken entspricht der Kartierung des GRCh38-Referenzgenoms, der blaue darunter der Kartierung des durch die Deletion betroffenen Allels. Deutlich wird eine 555 bp große Deletion.

Der untere Teil der Abbildung zeigt die durch WGOM angegebene Region, welche Enhancer umfasst, die u. a. die Expression des *DKK1*-Gens regulieren (70, 76). Da zwei Markierungen in diesem Bereich auf dem Allel erhalten sind, von denen jedoch eine (weiße Markierung) durch WGOM nicht verknüpft werden konnte, lässt sich die Aussage zur Lokalisation der Deletion konkretisieren. Demnach ist die Deletion im linken, dunkelblauen Bereich lokalisiert. Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt. Die Nutzung erfolgt im Einklang mit der akademischen Lizenzvereinbarung von BioRender.

Es erfolgte stattdessen eine qPCR, um einen möglichen Effekt der Deletion auf die mRNA-Expression von DKK1 bei der Patientin zu evaluieren. Als Kontrollen wurden vier Medulloblastom-Zelllinien genutzt, von denen zwei als Positivkontrollen mit hoher DKK1-Expression dienten (Daoy und UW-228-2) und zwei als Negativkontrollen (D425 Med und MED-MEB-8a). Die Expressionsdaten der Zelllinien wurden durch die Arbeitsgruppe pädiatrische Neuroonkologie der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf mittels RNA-Sequenzierung erhoben und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Zunächst wurde als Grundsatzbeweis der Methode die mRNA-Expression von DKK1 normalisiert gegen die *Housekeeping*-Gene HPRT1 und GUSB in den o. g. Zelllinien bestimmt (vgl. Abb. 34 A). Es zeigte sich eine höhere normalisierte DKK1-mRNA-Expression in den Positivkontrollen als in den Negativkontrollen. Im unabhängigen t-Test konnte dies mit einer sehr starken bzw. extrem starken Signifikanz bestätigt werden ($p \leq 0,001$; für DKK1/GUSB in Daoy/D425 Med $p \leq 0,01$).

Im Folgenden wurde die Expression von DKK1 gegen die Expression von HPRT1 und GUSB normalisiert in PBMCs der Patientin P14, ihrer Eltern sowie von sechs Individuen ohne SV in der Region untersucht (vgl. Abb. 34 B).

Die WGOM-Daten lassen eine heterozygote Deletion bei der Patientin P14 sowie deren Mutter und Vater vermuten. In den drei Proben dieser Personen konnte eine erhöhte relative DKK1-mRNA-Expression im Vergleich zu den Proben der Proband*innen, die keine SV in der untersuchten Region tragen (Kontrollen), festgestellt werden. Im unabhängigen t-Test wurde ein starker bzw. sehr starker signifikanter Unterschied der relativen DKK1-mRNA-Expression in den Proben der Patientin P14 und deren Mutter zu den Kontrollen detektiert ($p \leq 0,05$). Im Vergleich zum Mittel aller Kontrollproben zeigte die Patientin P14 eine um das 5,3-fache (DKK1/GUSB) bzw. 6,7-fache (DKK1/HPRT1) erhöhte relative Expression von DKK1. Bei ihrer Mutter konnte eine 3,6-fache (DKK1/GUSB) bzw. 6,0-fache (DKK1/HPRT1) Steigerung der relativen Expression nachgewiesen werden. In der Probe des Vaters der Patientin P14 wurde ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) für die gegen HPRT1 normalisierte DKK1-mRNA-Expression festgestellt. Die Untersuchung der gegen GUSB normalisierten DKK1-mRNA-Expression ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied ($p \geq 0,05$). Ein signifikanter Unterschied der relativen DKK1-mRNA-Expression zwischen den Proben der Patientin P14 und ihrer Mutter sowie der Probe des Vaters konnte im unabhängigen t-Test nicht ermittelt werden ($p \geq 0,05$). Verglichen mit dem Mittelwert der Kontrollen zeigte sich eine erhöhte relative DKK1-mRNA-Expression in den Proben der Patientin P14 und ihrer Mutter. Die Ergebnisse divergieren jedoch für beide *Housekeeping*-Gene, sodass für die Probe des Vaters in der Normalisierung gegen GUSB kein signifikanter Unterschied erfasst werden konnte, in der Normalisierung gegen HPRT1 jedoch gegeben war.

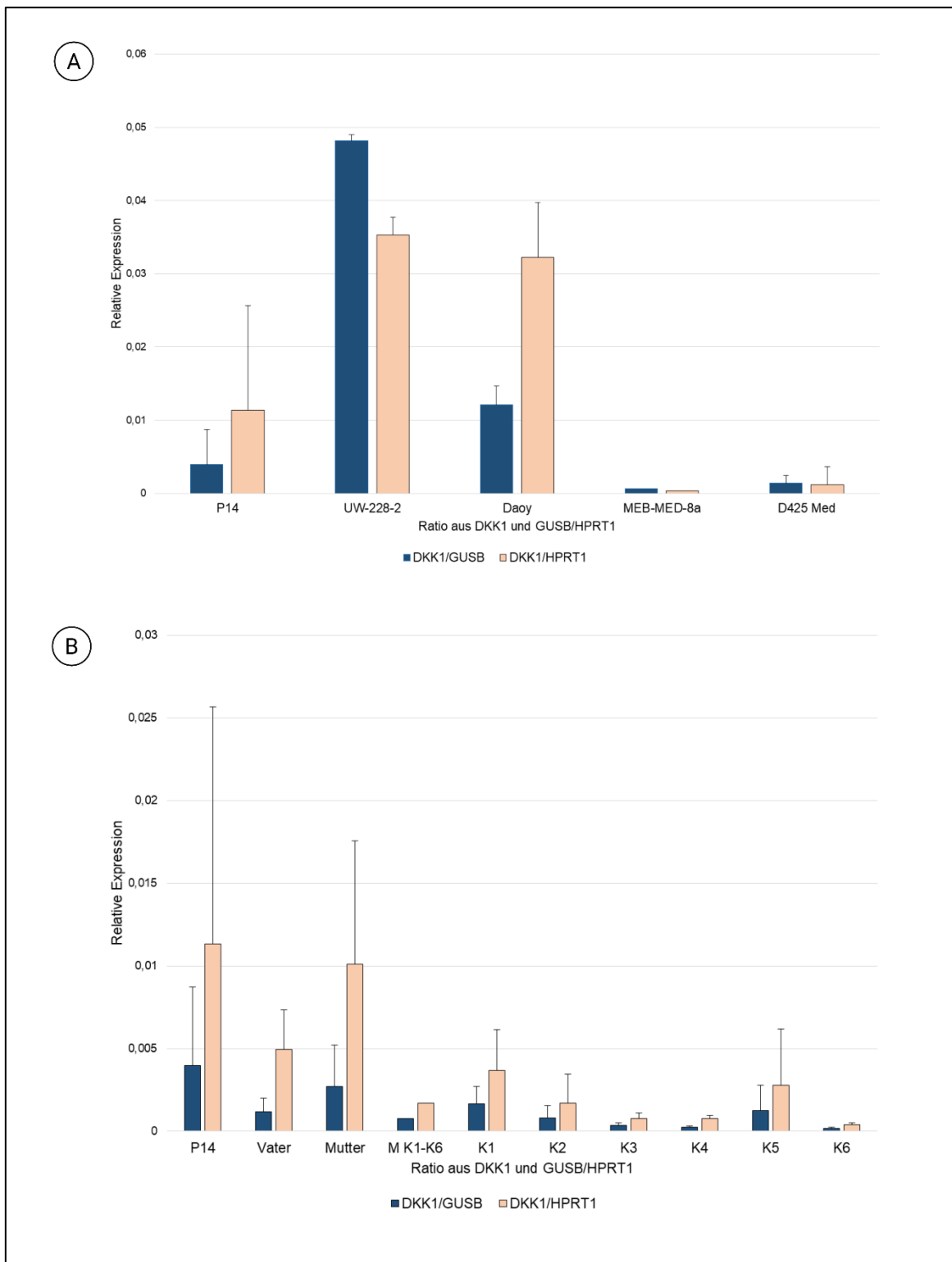


Abb. 34 Relative Expression der DKK1-mRNA in Relation zu GUSB und HPRT1 in der Patientin P14, ausgewählten Zelllinien, ihren Eltern und PBMC-Kontrollen

Dargestellt ist die relative DKK1-mRNA-Expression normalisiert gegen GUSB (dunkelblau) und HPRT1 (orange) als Referenzgene ($\Delta\Delta C_t$ -Wert). Die Y-Achse zeigt den relativen Expressionswert, die X-Achse die experimentellen Proben. In A ist die mRNA-Expression in PBMCs der Patientin P14 sowie in Zelllinien dargestellt, in denen eine hohe DKK1-Expression (UW-228-2 und Daoy) bzw. eine niedrige Expression (MED-MED-8a und D425 Med) bekannt ist. Dies dient als Grundsatzbeweis für die Untersuchung der DKK1-mRNA-Expression. Auf der X-Achse in B sind die PBMC-Proben von P14, ihren Eltern sowie sechs Individuen, die keine SV in der untersuchten Region tragen (K1-K6) und deren Mittelwert (M K1-K6) gezeigt. Die Daten sind als Mittelwert aus N=3 unabhängigen Experimenten dargestellt. Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt. Die Nutzung erfolgt im Einklang mit der akademischen Lizenzvereinbarung von BioRender.

3.4.4 Mögliche Deletion eines *SPRED1*-Enhancers

Im Alter von einem Jahr entwickelte der Patient P12 ein Optikusgliom. Außerdem wurden auf seiner Haut CALM erkannt. Unter den durch Jongmans et al. und Ripperger et al. publizierten Hinweisen auf das Vorliegen eines KPS erfüllte er somit die Kriterien der auffälligen Tumordiagnose sowie zusätzlich der klinischen Anomalien (57, 60).

In der WGOM fielen überdurchschnittlich viele SVs im Genom des Patienten P12 auf. Während die Anzahl der SVs pro Patient*in im Mittel bei $53 \pm 21,8$ lag, wurden bei dem Jungen 149 manuell überprüfte SVs identifiziert. Davon war keine *de novo* entstanden. 31 SVs wurden von der Mutter, 118 vom Vater vererbt.

In Bezug auf eine mögliche Krebsprädisposition interessant war eine ca. 2,5 kbp lange, intergenisch lokalisierte Deletion in der Region Chr15 (q14), die durch die Mutter des Jungen vererbt wurde (vgl. Abb. 35). In diesem Bereich befindet sich eine durch das 1000 Genomes Consortium Phase 3 Projekt beschriebene, 2444 bp große Deletion (esv3636189), die in 0,08% der untersuchten Kontrollen vorhanden ist (71). Jene Variante überlappt mit einem Teil des Enhancers GH15J038126, wie der untere Teil von Abb. 35 zeigt. Dieser Enhancer reguliert u. a. die Expression des Gens *SPRED1* in zahlreichen Geweben, darunter auch Astrozyten (76, 150).

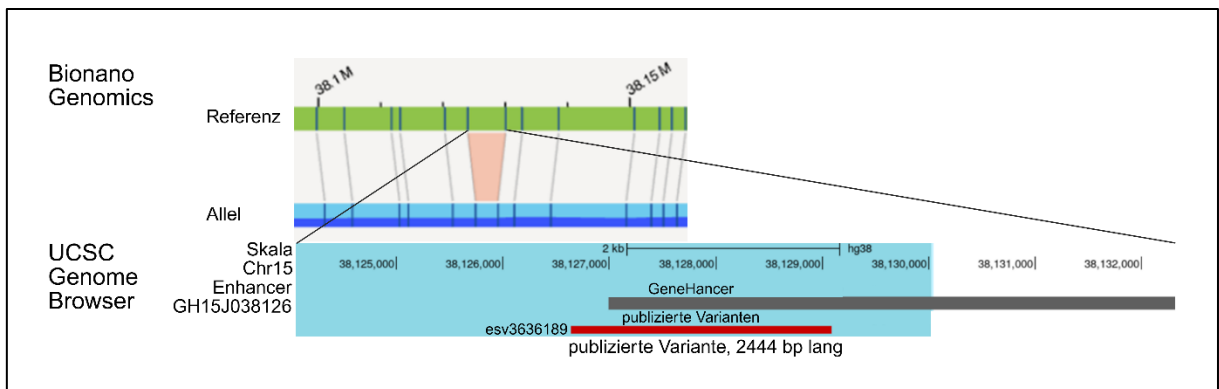


Abb. 35 2464 bp große Deletion auf Chr15 (q14) im Genom des Patienten P12 mit potentielltem Einfluss auf einen Enhancer des *SPRED1*-Gens

Im oberen Teil der Abbildung ist die optische Genomkartierung des Patienten P12 im Bereich Chr15:38,123,996–38,130,065 bp (hg38) dargestellt. Der obere, grüne Balken entspricht der Kartierung des GRCh38-Referenzgenoms, der blaue darunter der Kartierung des durch die Deletion betroffenen Allels. Deutlich wird eine Deletion, da der Abstand zwischen den Markierungen auf dem Allel im Vergleich zur Referenz verkürzt ist.

Der untere Teil der Abbildung zeigt die durch WGOM angegebene Region. Der darin oben dargestellte, graue Balken entspricht einem Enhancer, der u. a. die Expression des *SPRED1*-Gens reguliert (76). Der darunter angezeigte, rote Balken zeigt eine durch das 1000 Genomes Consortium Phase 3 beschriebene Variante, die 2444 bp groß ist und in 0,08% der Kontrollen identifiziert wurde. Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt. Die Nutzung erfolgt im Einklang mit der akademischen Lizenzvereinbarung von BioRender.

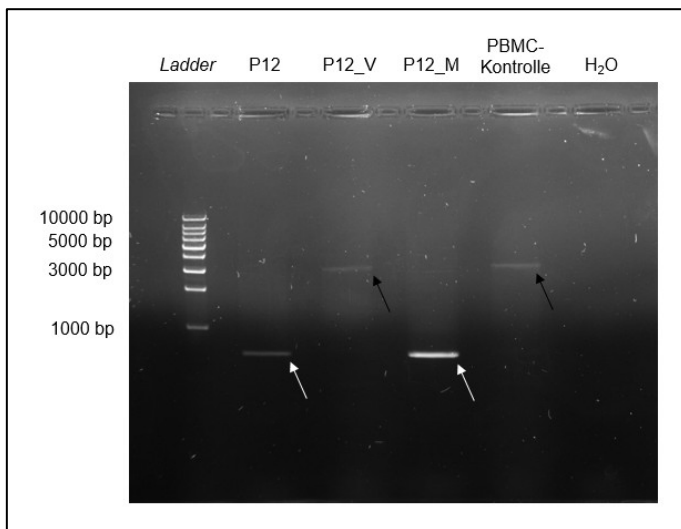


Abb. 36 Ergebnisse der Gel-Elektrophorese nach der Touchdown PCR zur Verifizierung der ca. 2,5 kbp großen Deletion in dem Patienten P12 und seiner Mutter (P12_M)

Aufgetragen ist die GelPilot 1 kb Ladder. Mit weißen Pfeilen markiert sind die Banden der Proben von P12 und der Mutter von P12 (P12_M), in denen ein 635 bp langes PCR-Produkt nachgewiesen werden konnte. In der Wildtyp-Kontrolle des Vaters (P12_V) sowie einem PBMC-Pool aus Proben, die die Deletion nicht tragen, wurde ein 3095 bp langes PCR-Produkt identifiziert, das mit schwarzen Pfeilen markiert ist. In Nuklease-freiem Wasser (H₂O) stellte sich keine Bande dar.

Um die ca. 2,5 kbp lange Deletion zu verifizieren, wurde eine Touchdown-PCR, wie in 2.2.2.5 erläutert, durchgeführt. Verglichen wurde DNA des Patienten P12 mit der seiner Mutter und seines Vaters sowie mit einem Pool gesunder Kontrollen, bei denen im betreffenden Bereich keine SV vorhanden war, und Nuklease-freiem Wasser (vgl. Abb. 36). Das Wildtyp-PCR-Produkt ist ca. 3,1 kbp lang und anhand der Banden der PBMC-Pool-Kontrolle und der Probe des Vaters sichtbar. Im Gegensatz dazu beträgt die Länge der PCR-Produkte der Proben von P12 und seiner Mutter <1 kbp. Dies beweist die Deletion von ca. 2,5 kbp bei P12 und seiner Mutter. Um die Lokalisation der Bruchpunkte der Deletion genau zu bestimmen, wurde, wie in 2.2.2.8 erklärt ist, eine Sanger-Sequenzierung durchgeführt. Deletiert ist der Bereich Chr15:38,126,637–38,129,085 bp (hg38).

Abb. 37 zeigt die Verifizierung der Bruchpunkte der Deletion von P12 und seiner Mutter durch die Sanger-Sequenzierung. Die Sequenzierung bestätigte die 2450 bp lange Deletion, wobei 4 bp zusätzlich eingefügt wurden. Die Bruchpunkte der Deletion befinden sich 7 bp und 2 bp von denen der durch das 1000 Genoms Consortium Phase 3 beschriebenen Variante entfernt (71).

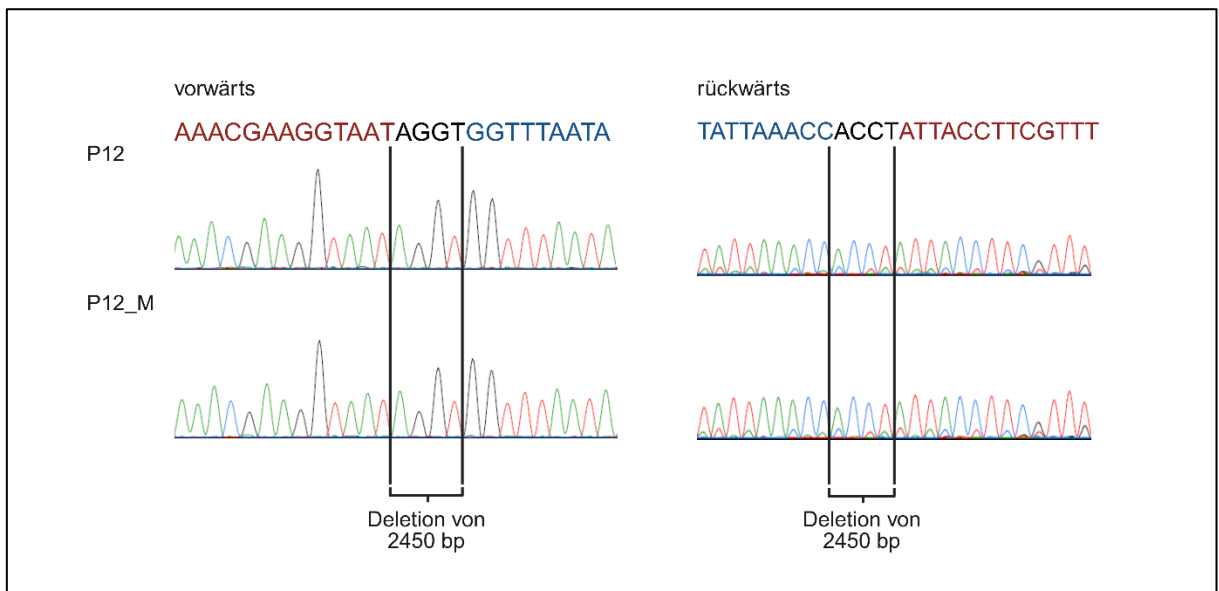


Abb. 37 Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung zur Detektion der Bruchpunkte der Deletion im Enhancer des *SPRED1*-Gens bei dem Patienten P12 und seiner Mutter (P12_M)

Gezeigt sind die mittels Sanger-Sequenzierung ermittelten Bruchpunkte der 2450 bp langen Deletion, die den Enhancer des *SPRED1*-Gens umfasst für den Patienten P12 (oberer Teil der Abbildung) und seiner Mutter (P12_M, unterer Teil der Abbildung). Zusätzlich eingefügt wurden 4 bp. Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt. Die Nutzung erfolgt im Einklang mit der akademischen Lizenzvereinbarung von BioRender.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Genom von 29 pädiatrischen, an Krebs erkrankten Patient*innen untersucht, um für deren Tumorentstehung potentiell prädisponierende SVs zu identifizieren. Ausgewählte SVs wurden mit weiterführenden Methoden, z. B. PCR, qPCR oder Sanger-Sequenzierung, verifiziert.

Im Folgenden sollen die Kohorte der Patient*innen und die Gesamtheit der detektierten SVs diskutiert werden. Weiterhin werden einzelne SVs auf ihren möglichen Beitrag zu einer Krebsprädisposition überprüft.

4.1 Klinische Merkmale und Charakteristika der Patient*innen

In dieses Projekt wurden 29 Familien eingeschlossen. Die Kohorte ergab sich aus den in 2.1.1 beschriebenen Auswahlkriterien. Sie ist aus verschiedenen Gründen kleiner als in vorangegangenen Publikationen, die sich mit Krebsprädisposition im Erwachsenen- und Kindesalter befassen (12). Krebserkrankungen des Kindesalters sind selten. Deutschlandweit wurden im Jahr 2018 bei 2255 Kindern und Jugendlichen bis 18 Jahre Krebserkrankungen diagnostiziert. Eines von 337 Neugeborenen erkrankt bis zum 18. Lebensjahr an einer malignen Neubildung (151). Es erfolgte eine strenge Selektion anhand anamnestischer oder körperlicher Auffälligkeiten, die das Vorliegen eines KPS wahrscheinlich machen. Außerdem wurden ausschließlich Patient*innen ausgewählt, bei denen in der WES keine pathogene oder wahrscheinlich pathogene, für Krebserkrankungen prädisponierende Variante identifiziert wurde. Bei den eingeschlossenen Patient*innen war das Vorliegen eines KPS also wahrscheinlich, ein Nachweis durch die etablierten Methoden jedoch nicht möglich. Schließlich wurde für die Durchführung von WGOM eine bestimmte Menge hochmolekularer DNA benötigt, die bei einigen Patient*innen, auf die die o. g. Kriterien passen würden, nicht extrahiert werden konnte. Exkludiert wurden außerdem Fälle, die die Qualitätsparameter (Tabelle 40, Tabelle 41 und Tabelle 42 im Anhang) nicht erfüllten. Bei wenigen Proben (P17, P20, Probe der Mutter von P8, Proben des Vaters von P17 und P20) wurden geringe Abweichungen einzelner Qualitätskriterien toleriert, um eine Auswertung zu ermöglichen.

4.1.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede der Inzidenz

Jungen erkranken häufiger an malignen Erkrankungen als Mädchen. Dies trifft auf verschiedene Krebsentitäten zu, u. a. auf hämatologische und ZNS-Neoplasien des Kindesalters (152). Nach Daten des deutschen Kinderkrebsregisters waren ca. 56% der zwischen 2009 und 2018 erkrankten Kinder männlich und 44% weiblich (151). Die in 2.1.1 erläuterten Kriterien trafen auf mehr Jungen (66%) als Mädchen (34%) zu, sodass auch in der untersuchten Kohorte mehr Jungen als Mädchen betrachtet wurden. Ähnlich zeigte sich dies in bisher publizierten Studien zur Krebsprädisposition bei Kindern. In diesen machte der Anteil männlicher Kinder und Jugendlicher 51–65% aus (39, 41, 42, 72).

Weshalb das Auftreten von Krebserkrankungen bei Jungen häufiger als bei Mädchen ist, ist noch nicht abschließend geklärt. Neben Umweltfaktoren und Verhaltensunterschieden zwischen den Geschlechtern scheinen auch biologische Faktoren eine unterschiedliche Inzidenz zu bedingen. Hierzu zählen der Einfluss von Sexualhormonen und der Geschlechtschromosomen auf die Tumorentwicklung. Weiterhin wurden Differenzen in der Funktionsweise des Immunsystems festgestellt (153, 154). Darüber hinaus wurden kongenitale Anomalien ebenfalls häufiger bei Jungen als bei Mädchen beobachtet. Ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Tumorerkrankung zeigten dabei Kinder mit chromosomalen Anomalien, Monosomien und nicht-syndromalen angeborenen Behinderungen (155). Gillani et al. beobachteten einen geschlechtsspezifischen Zusammenhang zwischen sehr großen, unbalancierten Chromosomenanomalien (>1 Mbp) in der Keimbahn und einem 4-fach erhöhten Risiko für solide Tumoren bei männlichen Kindern. Für weibliche Patientinnen konnte dieser Zusammenhang nicht festgestellt werden. Die Gründe für diesen geschlechtsabhängigen Unterschied sind bislang nicht bekannt. Die großen, unbalancierten SVs wurden nicht an speziellen Loci detektiert, sondern schienen scheinbar willkürlich über das Genom verstreut. Daher vermuteten die Autor*innen einen Zusammenhang zu genomischer Instabilität, insbesondere während der Tumorinitiation (156). Eine weitere Theorie betrachtet die genetische Redundanz. Redundanz bedeutet, dass ein Organismus mehrere Kopien eines Gens besitzt, die für dieselbe oder ähnliche Funktionen zur Verfügung stehen und bei der Mutation einer Genkopie eine Kompensation erlauben. Bei einer XY-Chromosomenkombination ist sie geringer als bei einer XX-Kombination. Durch Deletionen oder Duplikationen kann die Anzahl der Kopien eines Gens oder Genabschnitts verändert werden (Dosierungsungleichgewicht), wodurch die Expression verringert oder verstärkt wird. Laut dieser Theorie reagieren männliche Individuen (XY-Chromosomensatz) empfindlicher auf z. B. ein Dosierungsungleichgewicht durch SVs. Jedoch sind auf dem Y-Chromosom nur wenige klassische Onko- oder Tumorsuppressorgene bekannt (157). Weitere mögliche Differenzen ergeben sich aus epigenetischen Mechanismen und einer möglichen geringeren Effizienz in der DNA-Reparatur bei männlichen Individuen (156). Vermutet wird also ein Zusammenspiel genetischer, hormoneller und epigenetischer Faktoren, die zu einer geschlechtsspezifischen Risikoerhöhung beitragen. Um die zugrundeliegenden Mechanismen besser zu verstehen, sind weitere Studien erforderlich.

4.1.2 Altersabhängige Unterschiede der Inzidenz

Betrachtet man das Alter der Kinder zum Zeitpunkt der erstmaligen Diagnosestellung, fällt auf, dass eine unterschiedliche Inzidenz in verschiedenen Altersgruppen besteht. Laut dem Jahresbericht des Deutschen Kinderkrebsregisters von 2019, welcher diagnostizierte Fälle zwischen 2009 und 2018 betrachtet, treten die meisten Fälle in der Gruppe bis zum 5. Lebensjahr auf (37,5%). 21,3% der Meldungen stammen aus der Gruppe der 5–10-Jährigen, 24,3% von den 10–15-Jährigen und 16,9% aus der Gruppe der 15–18-Jährigen (151). Auch

in diesem Projekt war der Anteil der Kinder bis 5 Jahre am größten (44,8%). Die Altersgruppe zwischen 5 und 10 Jahren machte 20,7%, die zwischen 10 und 15 Jahren 27,6% und jene >15 Jahre 6,9% aus. Ähnliche Verteilungen zeigen bisher veröffentlichte Publikationen, wobei der Anteil der Kinder <5 Jahre bei einigen Studien mit 52,5–60,6% noch höher ist (41, 72). Auch bei Untersuchungen der häufigsten malignen Erkrankung des Kindesalters, der akuten lymphatischen B-Zell-Precursor Leukämie, konnte ein Altersgipfel zwischen dem zweiten und sechsten Lebensjahr festgestellt werden. Dieser zeigt sich bei anderen Leukämien, z. B. T-ALL oder AML im Jugend- oder Erwachsenenalter und ist weniger deutlich ausgeprägt. Es gibt verschiedene Theorien dazu, weshalb diese altersabhängigen Unterschiede der Inzidenz bestehen. Für die akute lymphatische B-Zell-Precursor Leukämie geht man von einer genetischen Prädisposition aus, durch die bereits frühzeitig präkursorische Zellklone expandieren, teils während der fetalen Hämatopoese. Zudem kommt es in der frühen Kindheit zu einer rasanten Entwicklung des Immunsystems und multiplen Expositionen gegenüber Infektionen aus der Umwelt. Vermutet wird, dass frühkindliche Reifung und Prägung des Immunsystems („*early-life immune training*“) einen präventiven Effekt auf die Entstehung von Leukämien hat. Diese kann beispielsweise durch frühzeitige Impfungen und ein vielfältiges Darmmikrobiom erfolgen. Dagegen können infektionsbedingte Störungen des Immunsystems und eine zu geringe immunologische Prägung die Entstehung von Leukämien unterstützen (158).

Auffällig ist weiterhin, dass auch solide Tumoren in der Altersgruppe <5 Jahre häufiger sind und embryonale Tumoren am häufigsten bei Neugeborenen auftreten, was einen pränatalen Ursprung nahelegt (159). In den frühen Lebensjahren durchlaufen Kinder entscheidende Wachstums- und Entwicklungsphasen, in denen die Zellteilung und -replikation stark erhöht sind. Diese Prozesse können zu Mutationen führen, die das Risiko für die Entstehung von Krebs erhöhen. Zu einer Anhäufung genetischer Veränderungen und damit zur Entwicklung einer malignen Erkrankung kann es beispielsweise durch unreife oder eingeschränkte DNA-Reparaturmechanismen kommen. Eine andere Theorie beschäftigt sich mit der Aktivierung von z. B. endogenen DNA-Nukleasen, die zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten Mutationen induzieren können (160).

Wie in bereits publizierten Studien war im Rahmen dieser Arbeit der Anteil der an Krebs erkrankten Kinder <5 Jahre am höchsten, was u. a. mit einer vermehrten Zellteilung, durch die mehr genetische Varianten entstehen, sowie durch die Immunchypothese erklärt werden kann.

4.1.3 Inzidenz struktureller Varianten nach ethnischer Zugehörigkeit

Es wurde, wie in 3.1.1 gezeigt ist, ein deutlicher Unterschied in der Anzahl der detektierten SVs je nach ethnischer Herkunft der Patient*innen festgestellt. Bei den Kategorien handelt es sich jedoch nicht um klar abgrenzbare Gruppen, sondern um grobe Annäherungen an die komplexe genetische Vielfalt durch geographische Bezeichnungen. Im Mittel wurden bei den Patient*innen mit Eltern europäischer Herkunft $47,2 \pm 10,1$ SVs erfasst. Bei P18, der Patientin mit türkischen Wurzeln, waren es weniger, bei den weiteren Kindern, deren Eltern nicht aus Europa stammen, waren es deutlich mehr SVs. Auffällig ist, dass bei dem Patienten P12 149 SVs identifiziert wurden. Seine Eltern sind europäischer bzw. afrikanischer Herkunft. Dieser deutliche Unterschied in der Anzahl der detektierten SVs lässt sich mit der Auswahl des Kontrollgenoms erklären. Hierfür wurde das GRCh38-Referenzgenom genutzt. Es umfasst verschiedene Populationen, jedoch vorwiegend das Genom eines afrikanisch/europäischen Mannes, und wechselt an mehreren Stellen von einem ethnischen Haplotyp zu einem anderen (161).

Es existiert eine Vielfalt ethnienspezifischer, sich jedoch teils überlappender Haplotypen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass bei der Assemblierung von Genomen diverser z. B. afrikanischer, asiatischer oder indigener nordamerikanischer Ethnien zu einem bedeutenden Anteil Sequenzen auftreten, die durch das Referenzgenom nicht repräsentiert werden (162, 163). Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch WGOM im Vergleich zum GRCh38-Referenzgenom detektierte SVs mit Datenbanken wie DGV, die Informationen über ethnienspezifische Polymorphismen enthalten, abgeglichen.

Einige der bei dem Patienten P12, dessen Vater aus Ghana stammt, ermittelten SVs entsprechen also bevölkerungsspezifischen Varianten, die durch die Auswahl der Referenz nicht als solche erkannt werden (162, 163).

Darüber hinaus wurde in Afrikaner*innen und *African Americans* die stärkste genetische Diversität innerhalb einer Population beobachtet, was auf die lange Entwicklungsgeschichte in Bezug auf die geographische Heimat zurückgeführt wird (164). In der Entwicklung der afrikanischen Bevölkerung werden zudem weniger *Bottleneck*-Effekte, Phasen, in denen die Bevölkerungszahl und damit die genetische Diversität deutlich reduziert wurden, diskutiert als in z. B. den europäischen Populationen (165).

Aktuell wird, z. B. im Rahmen des Telomere-to-Telomere-Projekts (T2T) mittels LRS, an der Vervollständigung von Referenzgenomen und Pangenomen gearbeitet. Lücken bestanden bisher insbesondere in repetitiven DNA-Regionen, die ca. 8% des Genoms ausmachen und nun systematisch analysiert werden können. Damit können graphbasierte Referenzgenome entwickelt, populationsspezifische Unterschiede in der SV-Erkennung minimiert und die genetische Diversität besser abgebildet werden. Außerdem werden bisher unbekannte Gene und regulatorische Elemente entdeckt (166).

Die Anzahl der detektierten SVs war also abhängig von der ethnischen Herkunft der Patient*innen, was mit der Auswahl der Referenz zusammenhängt.

4.1.4 Verteilung der Tumorarten in der Kohorte

Maligne hämatologische Erkrankungen, zu denen Leukämien und Lymphome zählen, sind die häufigsten Krebserkrankungen des Kindesalters. Laut dem Jahresbericht des Deutschen Kinderkrebsregisters machen sie 45% aller Krebserkrankungen aus. In den Analysen von Zhang et al. wurden bei Patient*innen mit hämatologischen malignen Erkrankungen jedoch am seltensten pathogene Keimbahnvarianten identifiziert (12). Im Rahmen dieses Projekts war ebenfalls der Hauptteil der Patient*innen (58,6%) an hämatologischen Neoplasien, wie Leukämien oder Lymphomen, erkrankt. Die zweitgrößte Gruppe stellen sowohl in diesem Projekt (24,1%), als auch deutschlandweit (23,6%) Kinder dar, bei denen ZNS-Tumoren diagnostiziert wurden. Solide und embryonale Tumoren machen einen geringeren Anteil aus (151). Eine ähnliche Verteilung zeigt sich in zuvor publizierten Studien, die sich mit Krebsprädispositionen bei Kindern befassten (12, 41, 72). Mit jenen sind die Daten der vorliegenden Untersuchung daher hinsichtlich der betrachteten Tumorentitäten vergleichbar.

4.1.5 Klinische Kriterien für das Vorliegen eines KPS

Um die begrenzte Ressource des WGOM möglichst optimal zu nutzen, wurden im Rahmen dieser Arbeit an Krebs erkrankte Kinder und Jugendliche untersucht, bei denen mit erhöhter Wahrscheinlichkeit ein KPS vorliegt. Jongmans et al. und Ripperger et al. beschrieben die in 1.2.2 dargestellten und in diesem Projekt genutzten Faktoren, die sich der Frage näherten, wann in der klinischen Praxis ein KPS in Betracht gezogen werden und eine humangenetische Vorstellung erfolgen sollte. Dabei ist jedoch wichtig zu wissen, dass durch die heterogene Gruppe an Krebserkrankungen keine vollständige Darstellung aller prädisponierenden Konditionen und Symptome erreicht werden kann. Teils lagen nur bedingt evidenzbasierte Studien vor, sodass die Erfahrung der Expert*innen in die Auswahl der Kriterien einbezogen wurde. Diese Auswahl soll zukünftig reevaluiert werden. Die klinische Untersuchung, in der z. B. kongenitale Anomalien, Hautveränderungen oder Dysmorphien erkannt werden sollen, ist stets abhängig von der durchführenden Person (57, 60).

Denkbare Limitationen bestehen darüber hinaus in unvollständigen Familienanamnesen. Diese ergeben sich beispielsweise, wenn zu einem Teil der Familie kein Kontakt besteht oder Unwissenheit über Krankheits- und Todesfälle verwandter Personen herrscht. Außerdem können klinische Auffälligkeiten, die auf ein KPS hinweisen, bei jungen Kindern noch nicht ausgeprägt sein. Auch eine exzessive Toxizität als Reaktion auf die Therapie kann häufig erst im Verlauf beurteilt werden. Beispielsweise entwickeln Patient*innen mit einem Nävoid-Basalzell-Karzinom-Syndrom Jahre nach einer Strahlentherapie zahlreiche Basalzellkarzinome in der bestrahlten Körperregion (57). Wurde bei einem*r Patient*in kein Kriterium als auffällig beschrieben, heißt das nicht, dass kein KPS vorliegen kann.

Die Zuverlässigkeit klinischer Kriterien, die auf ein KPS hindeuten, wurde zuletzt durch verschiedene Studien untersucht. Friedrich et al. zeigten, dass bei Nutzung klinischer Checklisten KPSs bei ca. einem Drittel der betroffenen Kinder unerkannt bleiben (167). Bakhuizen et al. untersuchten bei Kindern mit neu diagnostizierten malignen Erkrankungen die Effektivität einer genetischen Testung nach klinischer Selektion im Vergleich zu einer phänotypunabhängigen Panel-Sequenzierung zur Identifikation ursächlicher KPSs. Der phänotypbasierte Ansatz ermöglichte die Detektion der meisten ursächlichen Syndrome. Die phänotypunabhängige Sequenzierung identifizierte zusätzliche KPSs, deren klinische Relevanz jedoch unklar ist (168). In den Studien wurden klinische Checklisten genutzt, die den in dieser Arbeit verwendeten Kriterien nach Jongmans et al. und Ripperger et al. weitgehend entsprechen. Letztere berücksichtigen darüber hinaus eine erhöhte therapieassoziierte Toxizität als weiteres Kriterium (57, 60, 167, 168). Beide Gruppen empfehlen die komplementäre Nutzung von standardisierter, klinischer Evaluation und genetischer Diagnostik (167, 168).

Die in dieser Arbeit genutzten Kriterien, die das Vorliegen eines KPS wahrscheinlich machen, stellen also eine für den klinischen Alltag geeignete Richtlinie dar, sollten aber weiterhin durch neue Evidenzen und Erfahrungswerte reevaluiert und angepasst werden.

4.2 Gesamtübersicht der detektierten strukturellen Varianten

Wie in 1.4 beschrieben, konnten Wagener et al. und Broeckel et al. zeigen, dass mittels WGOM eine valide Detektion von SVs in Keimbahnproben möglich ist (79, 89). Um die Anzahl der SVs auf die am ehesten klinisch relevanten zu reduzieren, nutzten die Gruppen bestimmte Filterkriterien. Laut Broeckel et al. lag die Anzahl der SVs pro Fall nach mehreren Filterschritten zwischen 25 und 60. Die Filterkriterien waren dabei ähnlich zu den in dieser Arbeit verwendeten. Eingeschlossen wurden Varianten, die in weniger als 1% der Bevölkerung auftreten und mindestens 1500 bp lang sind (89). Die Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, wovon diese Arbeit einen Teil darstellt, ergaben bei 34 pädiatrischen Krebspatient*innen im Mittel $49 \pm 5,3$ SVs (79). Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten 29 Patient*innen handelte es sich im Mittel um $53 \pm 21,8$ SVs. Dies ist vergleichbar mit den o. g. Ergebnissen zuvor publizierter Daten (79, 89).

4.2.1 Strukturelle Varianten im Hinblick auf den Typ

Den Großteil der in diesem Projekt erfassten SVs stellen Deletionen und Insertionen dar. Dies entspricht den bisher publizierten Ergebnissen diverser Studien zu SVs in der Keimbahn an Krebs erkrankter Patient*innen (79, 169). Fujimoto et al. und Kidd et al. erläutern mögliche Prozesse, die zur Entstehung von SVs führen und das häufigere Auftreten von Deletionen und Insertionen bedingen. Die meisten SVs in der Keimbahn entstehen demnach durch mikrohologievermittelte Prozesse, nicht-allelische homologe Rekombination und L1-Retrotransposition. Als elementar werden Transposons betrachtet. Es handelt sich dabei um mobile, repetitive DNA-Elemente, die an verschiedenen Stellen des Genoms ausgeschnitten und wieder eingefügt werden können. Relevant sind außerdem segmentale Duplikationen und Pseudogene (169-171).

Durch die WGOM erfolgt keine Sequenzierung. Es werden Markierungen in spezifische DNA-Motive eingebracht. Dies bedingt eine gewisse Ungenauigkeit bei der Einteilung in SV-Typen. Fehlen Markierungen oder werden zusätzliche im Vergleich zur Referenz angezeigt, spricht man von Deletionen bzw. Insertionen. Wird der Abstand zwischen zwei Markierungen kleiner oder größer, ist auch dies ein Hinweis auf eine Deletion bzw. Insertion. Bei einer Vergrößerung des Abstands zwischen zwei Markierungen ist jedoch auch eine Verdopplung des genetischen Materials denkbar, die mit Hilfe der WGOM nur bedingt nachgewiesen werden kann. Sind mehrere Markierungen von einer Verdopplung betroffen sind, kann eine Duplikation sicherer identifiziert werden. Gleiches gilt für Inversionen. Befinden sich in dem invertierten Abschnitt keine Markierungen, kann dieser nicht identifiziert werden. Möglich ist also, dass nicht alle in der Keimbahn der Patient*innen vorhandenen Duplikationen und Inversionen als solche erkannt wurden. Da jedoch die Markierungen in kurzen Abständen über das gesamte Genom verteilt sind, ist davon auszugehen, dass durch die Methode keine großen SVs übersehen wurden (92).

4.2.2 Strukturelle Varianten in Bezug auf die Zygotie

Menschen besitzen einen diploiden Chromosomensatz, zwei Allele eines Gens auf homologen Chromosomen. Sind beide Allele von der gleichen Variante betroffen, spricht man von Homozygotie. Dies traf auf wenige in dieser Arbeit betrachtete SVs zu (2,5%). Fehlen im Falle eines KPG beide gesunden Kopien des Gens, kann es zur Krebsentstehung kommen. Krüger et al. beschrieben beispielsweise eine homozygote *PMS2*-Mutation in Assoziation mit einem KPS, welches mit hämatologischen und ZNS-Tumoren einhergeht (172).

Laut der Zwei-Treffer-Hypothese, die Alfred Knudson 1971 anhand von Retinoblastom-Patient*innen entwickelte, entsteht ein Tumor dann, wenn beide Kopien eines Tumorsuppressorgens deaktiviert werden. Dabei ist es auch möglich, dass ein Allel in der Keimbahn von einer inaktivierenden Mutation betroffen ist und das andere durch eine Mutation in somatischen Zellen geschädigt wird. Es kommt zum Verlust der Heterozygotie (173). Weiterhin wurden zusammengesetzte heterozygote Varianten bei verschiedenen pädiatrischen Krebserkrankungen identifiziert, bei denen jedes Elternteil ein anderes verändertes Allel innerhalb desselben Gens beiträgt. Hierzu variieren die Daten zu Prävalenz und Pathogenität innerhalb der Studien (174).

Über 90% der in dieser Arbeit erfassten SVs wurden, wie in 3.2.1 erläutert, auf einem der beiden Allele detektiert und waren daher heterozygot. Betreffen heterozygote SVs ein KPG, ist grundsätzlich eine Prädisposition im Sinne der Zwei-Treffer-Hypothese denkbar. Ihr Effekt außerhalb von KPGs soll in 4.2.4 diskutiert werden.

2,9% der Varianten waren auf dem X-Chromosom eines männlichen Patienten lokalisiert. Es handelt sich um eine vulnerable genetische Region, da Varianten nicht durch ein gesundes Allel kompensiert werden können. Die Redundanz ist geringer. Wie in 4.1.1 angesprochen, bestehen hinsichtlich der Bedeutung dieser hemizygoten Varianten für die Krebsprädisposition weiterhin offene Fragen (156, 175).

Ein Teil der SVs konnte keiner Zygotie zugeordnet werden. Diese entsprechen hauptsächlich detektierten Duplikationen und haben einen Anteil von ca. 4,0%.

Der Großteil der detektierten SVs war also, wie zu erwarten war, heterozygot. Dies kann, sollte es sich um eine pathogene SV handeln, im Sinne der Zwei-Treffer-Hypothese zu einer Krebsentstehung führen.

4.2.3 Strukturelle Varianten im Kontext ihrer Lokalisation

Der Großteil der erkannten SVs ist in intergenischen Bereichen (54,2%) oder Introns (19,8%) lokalisiert und betrifft damit keine kodierende DNA-Sequenz. 26,0% der SVs sind potentiell exonisch lokalisiert.

Exone sind proteinkodierende Regionen der DNA, zu welchen die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen als terminale Exons gehören. Durch Transkription werden sie in prä-mRNA übersetzt und die dazwischen liegenden, nicht-kodierenden Abschnitte durch *Splicing* entfernt. Die mRNA wird dann in eine Aminosäuresequenz translatiert, die in ihrer Gesamtheit das

Protein ergibt. Durch alternatives *Splicing* ist es möglich, dass aus einem einzigen Gen mehrere Transkripte und Protein-Isoformen entstehen (176, 177).

Verschiedene Studien konnten bereits den Einfluss exonischer SVs auf eine Tumorprädisposition im Kindesalter beweisen (12, 41, 72). Liegt ein Bruchpunkt einer Deletion, Insertion oder Duplikation in einem Exon, können Missense-Varianten und Leserasterverschiebungen auftreten sowie Stoppcodons eingefügt werden und das Gen in seiner Funktion inhibieren (*Loss of function*). So können Tumorsuppressorgene inaktiviert werden. Außerdem können Veränderungen des *Splicings* auftreten. Inversionen oder Translokationen können zur Bildung von Fusionsgenen führen. Durch die Fusion von zwei Genen oder einem Gen mit einem regulatorischen Element eines anderen kann ein Zugewinn an Funktionen (*Gain of Function*) entstehen. Duplikationen können außerdem zur Überexpression von Genen führen. Auf diese Art und Weise können Protoonkogene zu Onkogenen aktiviert werden (41, 69, 178).

Die Genfunktionen aller potentiell beeinflussten Exone wurden recherchiert und auf eine mögliche tumorprädisponierende Wirkung geprüft.

Da durch WGOM der Bereich zwischen zwei Markierungen angegeben wird, in dem sich eine Variante, z. B. eine Deletion befindet, ist die exakte Lokalisation jedoch unklar. Überspannt der Bereich ein Exon, wurde die Lokalisation als potentiell exonisch angegeben. In einigen Fällen besteht jedoch auch die Möglichkeit einer intronischen oder intergenischen Lokalisation dieser Varianten. Duplikationen sind meist größer als angegeben, da der Abstand zwischen den zuletzt sicher duplizierten Markierungen gemessen wird. Dadurch kann eine mögliche exonische Lage übersehen werden.

Für lange Zeit beschränkte man die Analyse von SVs auf den kodierenden Bereich des Genoms. Dann wurde bekannt, dass intronische Varianten die Ergebnisse des *Splicings* beeinflussen (179). Chen et al. beschrieben, dass Keimbahn-SVs, deren Bruchpunkte sich innerhalb von 100 kbp um Gene befinden, deren Expression in Tumoren verschiedener Gewebe beeinflussen können und somit potentielle Risikofaktoren für die Krebsentstehung darstellen (180). Weitere Ergebnisse zeigen, dass intronisch und intergenisch lokalisierte SVs die Wirkung und Position regulatorischer Elemente beeinflussen. Sie können die 3D-Organisation des Genoms stören, was die Kommunikation von Enhancern und Promotern beeinflusst und eine Fehlregulation der Genexpression bedingt. Als Beispiele nennen Allou und Mundlos die Fusion topologisch assoziierter Domänen (TAD-Fusion), Neo-TAD-Bildungen und Enhancer-Adoptionen, durch die ein Enhancer, der physiologisch andere Gene reguliert, neue Zielgene aktiviert. (69, 181). So ist es möglich, dass TAD-Störungen zu einer Aktivierung von Protoonkogenen zu Onkogenen führen. Ein Beispiel dafür bietet das *PAX3-FOXO1*-Fusionsgen. Regulatorische Elemente von *FOXO1* kontrollieren den Promotor von *PAX3*, wodurch das Fusions-Onkogen aktiviert wird (182).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die GeneHancer Datenbank verwendet, um die Lokalisation regulatorischer Elemente in durch SVs betroffenen Genomabschnitten und von ihnen

beeinflusste Gene zu erfassen (76). Die Funktion nicht-kodierender DNA-Abschnitte ist jedoch weiter unzureichend verstanden. Viele Enhancer, Promotoren, Silencer und lange nicht-kodierende RNAs wurden erst kürzlich entdeckt, was die Interpretation früherer SVs erschwert. Sie interagieren gewebe- und zellspezifisch. Außerdem wurden zahlreiche regulatorische Elemente bislang nur putativ vorhergesagt und nicht experimentell validiert. Auch die Mechanismen der Genomorganisation, z. B. TAD-Grenzen sind bislang nicht vollständig verstanden. Es wurde eine Promotor-Enhancer-Spezifität beobachtet. Das heißt, einige Promotoren sind empfänglich für nicht-native Enhancer, andere jedoch nicht, wobei die Ursache unklar ist. Es verbleiben also viele offene Fragen zum Einfluss intronisch und intergenisch lokalisierter SVs, nicht zuletzt, da SVs gleichzeitig gegensätzliche Effekte auf verschiedene regulatorische Elemente haben können. Methoden wie WGOM, LRS und die Kombination genomischer, epigenomischer und transkriptomischer Daten können zukünftig helfen, komplexe SVs in repetitiven DNA-Regionen zu erkennen und den Einfluss betroffener regulatorischer Elemente einzuschätzen (181).

4.2.4 Analyse der Gesamtheit der detektierten strukturellen Varianten

Um potentiell tumorprädisponierende strukturelle Keimbahnvarianten zu identifizieren, wird in dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk auf zwei Gruppen detektierter SVs gelegt. Dazu zählen *de novo* entstandene SVs und SVs, die mit einem KPG überlappen. Abb. 38 zeigt, dass der Großteil der SVs jedoch weder aus *de novo* entstandenen, noch aus mit einem KPG überlappenden Varianten besteht.

Insbesondere bei Patient*innen mit unauffälliger Familienanamnese, bei denen nicht davon ausgegangen wird, dass ein KPS durch die Eltern vererbt wurde, sind *de novo* entstandene Varianten relevant. Im Vergleich zu allen identifizierten SVs (1534) erscheint die Anzahl der *de novo* entstandenen SVs (4) gering. Nur im Rahmen von Trio-Analysen, bei denen SVs der Patient*innen mit denen der Eltern verglichen werden, ist es möglich, *de novo* entstandene SVs zu identifizieren. Trio-Analysen konnten nur bei 55,2% der Patient*innen erfolgen. Zudem stellte sich ein Teil der durch WGOM erkannten *de novo* SVs in der manuellen Überprüfung als Artefakte heraus.

De novo SVs entstehen durch diverse Mutationsmechanismen und treten mit einer Rate von 3–4 SVs pro Generation auf (183). Die in dieser Arbeit ermittelte Rate von 0,25 SVs ist geringer. In der o. g. Studie wurden zur SV-Detektion mehrere komplementäre *Short-* und *Long-Read*-Methoden kombiniert. Denkbar ist, dass dadurch mehr SVs erfasst wurden als in dieser Arbeit mittels WGOM.

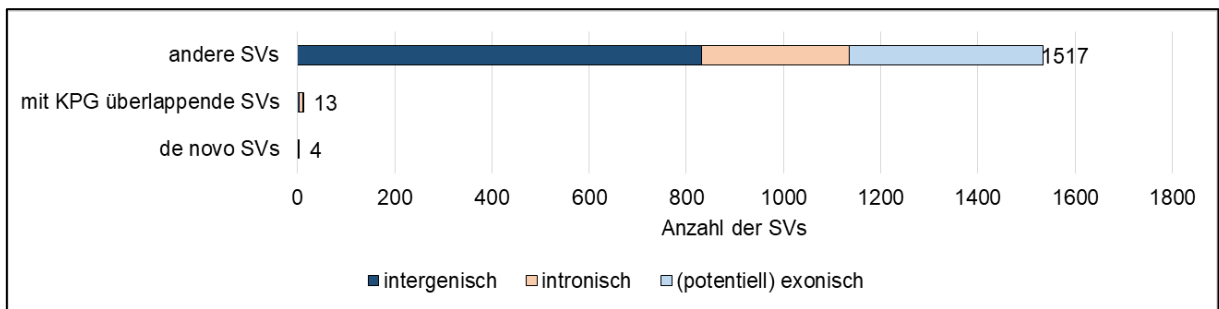


Abb. 38 De novo entstandene, mit einem KPG überlappende und andere detektierte SVs

Gezeigt ist die absolute Anzahl aller detektierte SVs (1534), an denen *de novo* entstandene (4) und mit einem KPG überlappende (13) nur einen geringen Anteil haben. Unter allen anderen SVs (1517) sind die meisten intergenisch (dunkelblau) lokalisiert. Geringeren Anteil haben potentiell exonisch (hellblau) und intronisch (orange) lokalisierte SVs.

Interessant wäre eine Referenz, wie viele *de novo* SVs durch andere Forschungsgruppen mittels WGOM pro Fall identifiziert werden. Aktuell gibt es hierzu jedoch noch keine Daten.

Abb. 38 stellt ebenso dar, dass nur 13 mit einem KPG überlappende SVs festgestellt wurden. Dabei ist wichtig zu bemerken, dass die Liste der KPGs unvollständig ist. Durch neue Forschungserkenntnisse werden regelmäßig neue Gene in diesen Kreis aufgenommen. 2.2.1.7 erklärt die Auswahl der in dieser Arbeit als KPGs geltenden Gene. Darüber hinaus wurden Patient*innen, bei denen bereits im WES eine Variante in einem KPG detektiert wurde, nicht in die Studie eingeschlossen. Es handelt sich also um eine selektierte Kohorte, in der eine niedrigere Anzahl an mit KPGs überlappenden SVs zu erwarten ist, als in unselektierten Studienpopulationen (12, 41, 72). Dies stellt eine Herausforderung für die Interpretation sowohl der verbleibenden SVs, die mit KPGs überlappen, als auch für die übrigen 1517 SVs dar. Zusätzlich illustriert Abb. 38, dass der überwiegende Teil der SVs, wie in 4.2.3 erläutert wurde, in intergenischen und intronischen Bereichen lokalisiert ist. Alle zum Zeitpunkt der Arbeit bekannten, betroffenen Gene und regulatorischen Elemente wurden genau auf ihre mögliche Relevanz in Bezug auf eine mögliche Krebsprädisposition im Kindesalter überprüft.

4.2.5 De novo entstandene strukturelle Varianten

Erfolgte neben der Untersuchung des Genoms der Patient*innen auch eine Analyse des Genoms der Eltern, ließen sich Rückschlüsse auf die Vererbung einer Variante ziehen. Insbesondere bei unauffälliger Familienanamnese bestand der Verdacht darauf, dass eine *de novo* entstandene Variante zu einer Krebsprädisposition geführt haben könnte. In 16 Trio-Analysen konnten insgesamt 4 manuell überprüfte, *de novo* entstandene SVs identifiziert werden. Diese werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Der Patient P8 erkrankte im Alter von 5,8 Jahren an einer B-ALL. Zudem waren bei dem Jungen eine Entwicklungsverzögerung und Wachstumsstörung bekannt. In den Analysen zeigte sich eine *de novo* entstandene, 350 kbp lange, heterozygote Deletion auf Chr14 (q11.2). Es handelt sich um eine nahe des Zentromers gelegene Region, in der zahlreiche Gene lokalisiert sind, die für die variable Region der Alpha-Kette des T-Zell-Rezeptors kodieren. T-Zellen erkennen Antigene über ihren T-Zell-Rezeptor, der aus einer

Alpha- und einer Beta-Kette besteht. Diese enthalten jeweils variable Regionen, welche für die Antigenerkennung verantwortlich sind. Gebildet werden diese variablen Regionen durch die Rekombination von V(Variabilität)-, D(Diversität)- und J(*joining*)-Gensegmenten. So entsteht die Vielfalt der T-Zell-Rezeptoren, die wichtig ist, um eine große Bandbreite an Antigenen erkennen zu können (143, 184). Denkbar ist, dass die große Deletion Auswirkungen auf die Diversität der T-Zell-Rezeptoren und damit auf die Funktionalität des Immunsystems hat. Auch in Zusammenhang mit T-Zell-Leukämien wurden genetische Anomalien der Region beschrieben (185). Ein Zusammenhang mit malignen B-Zell-Erkrankungen liegt jedoch nicht nahe. Zudem war die Abdeckung der Region im WGOM nur schwach. Einzig sieben DNA-Moleküle belegen die Variante. Möglich ist, dass hierbei ein somatisches, klonales Rearrangement von T-Zellen detektiert wurde, das keine Aussage über die Keimbahn erlaubt. Insgesamt ist nicht davon auszugehen, dass diese Deletion zur Prädisposition der B-ALL beiträgt.

In 3.2.2 ist die im Genom des Patienten P25, einem an einer T-ALL erkrankten Jungen, identifizierte ca. 4,8 kbp lange Deletion in der Region Chr8 (p22) beschrieben. Durch die heterozygote Deletion betroffen sind potentiell das dritte Intron, das vierte Exon oder das vierte und fünfte Exon und vierte Intron des *FGL1*-Gens. Dies könnte zu einem Funktionsverlust des Gens führen.

FGL1 kodiert für ein Protein, welches zur Fibrinogen-Familie gehört. Es interagiert mit dem Immuncheckpoint-Rezeptor *LAG-3* und ist so in der Lage, zytotoxische Aktivität von T-Zellen zu inhibieren. Dies kann das Tumorwachstum fördern (186). Nayeb-Hashemi et al. diskutieren eine tumorsuppressive Wirkung des Gens für hepatozelluläre Karzinome (HCC). Im Mausmodell zeigten sie, dass Tiere mit einem *FGL1*-Verlust doppelt so häufig ein HCC entwickeln wie solche, die über das Wildtyp-Allel verfügen. Sie beobachteten bei diesen Mäusen eine Überaktivierung des AKT/mTOR-Signalwegs (187). Eine verminderte Expression ist mit einer Progression von HCCs und einer schlechteren Prognose assoziiert (188). Im Gegensatz dazu wurde für Magenkarzinome von einer Überexpression von *FGL1* berichtet und davon, dass eine hohe *FGL1*-Expression mit einem kürzeren Überleben assoziiert war als niedrige Expressionslevel. Ein Verlust von *FGL1* war hier mit einer Inhibition von Proliferation, Invasion und Migration der Tumorzellen verbunden (186). Ähnliche Effekte wurden für Bronchialkarzinome und Kolorektale Karzinome beschrieben (186, 189). Ein Einfluss auf hämatologische maligne Erkrankungen und Krebserkrankungen des Kindesalters ist bislang in der Literatur nicht bekannt. Für ein verwandtes Gen, *FGL2*, gibt es Hinweise auf eine immunmodulatorische Wirkung, die zur Genese von B-Zell-Lymphomen beiträgt (186). Die Rolle von *FGL1* in Krebserkrankungen erscheint also kontextabhängig und variiert in verschiedenen Krebsentitäten und unter unterschiedlichen physiologischen Bedingungen.

Die Familienanamnese des Patienten war bis auf das Mammakarzinom seiner Großmutter väterlicherseits unauffällig. Die in 1.2.2 erläuterten Kriterien der auffälligen Familienanamnese,

die das Vorliegen eines KPS wahrscheinlicher machen, treffen daher nicht auf ihn zu. Dies macht eine *de novo* entstandene Variante als Ursache seiner malignen Erkrankung wahrscheinlich. Klinisch auffällig waren eine Mikrozephalie, eine Thenarhypotrophie beidseits, Adipositas und endokrinologische Störungen. Ein Zusammenhang solcher Anomalien mit Varianten in *FGL1* wurde in der Literatur bislang nicht beschrieben.

Außerdem entwickelte der Junge im Laufe der Therapie schwere Infektionen und eine Neuropathie. Bekannt ist, dass eine verminderte T-Zell-Funktion mit einem erhöhten Risiko opportunistischer Infektionen bei Krebspatient*innen einhergeht (190). Auch im Rahmen Chemotherapie-induzierter peripherer Neuropathien spielen zytotoxische T-Zellen eine Rolle. T-Zell-defiziente Mäuse zeigten, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, eine verlängerte mechanische Hyperalgesie, welche durch die Gabe zytotoxischer T-Zellen behoben werden konnte (191). Eine Assoziation der therapieassoziierten Toxizitäten in Zusammenhang mit der immunsuppressiven Wirkung von *FGL1* auf zytotoxische T-Zellen wäre denkbar, wenn es sich eher um einen Funktionsgewinn handeln würde, der z. B. bei einer Duplikation möglich ist (186). Im Fall des Patienten P25 handelt es sich jedoch um eine Deletion.

Die Bedeutung der *de novo* entstandenen Deletion bei dem hier untersuchten Patienten in Hinsicht auf seine Tumorerkrankung kann somit nicht abschließend geklärt werden. Möglich erscheint, sollte eine Deletion eines oder beider Exone vorliegen, ein Verlust der durch Nayeab-Hashemi et al. beschriebenen tumorsuppressiven Wirkung von *FGL1* (187). Jedoch sprechen die anderen o. g. Publikationen dagegen (186, 189). Interessant wäre es, zukünftig die Rolle von *FGL1* in Krebserkrankungen des Kindesalters, speziell hämatologischen Erkrankungen, zu ermitteln.

Die in 3.2.2 erwähnten, *de novo* entstandenen Insertionen im Genom der Patientinnen P14 und P18 liegen in intergenischen Abschnitten der DNA, in denen bisher keine regulatorischen Elemente bekannt sind. Daher kann aktuell keine Aussage zu einer möglichen Rolle in Bezug auf eine Krebsprädisposition getroffen werden.

4.3 Strukturelle Varianten, die KPGs betreffen

Wie Abb. 17 in Kapitel 3.3 zeigt, wurden 13 SVs, die mit einem KPG überlappen, festgestellt. Davon betrafen drei potentiell ein kodierendes Exon eines KPG (*MAPK2K* und *TP53*), während die anderen intronische Bereiche betrafen oder in einem intergenischen Abschnitt in unmittelbarer Nähe eines KPGs lokalisiert waren. Im Folgenden werden die drei SVs, die kodierende Genregionen betreffen, hinsichtlich ihrer möglichen Rolle als prädisponierende Veränderungen bei dem jeweiligen Patienten näher diskutiert.

4.3.1 Eine Insertion im *MAP2K2*-Genlokus als Variante unklarer Signifikanz

Bei der Patientin P23 wurde ein Medulloblastom diagnostiziert. Auf Chr19 (p13.3) wurde in ihrem Genom eine 514 bp lange Insertion identifiziert, die potentiell mit dem ersten Exon und ersten Intron sowie einem Promotor des KPG *MAP2K2* überlappt und daher in Bezug auf eine mögliche Krebsprädisposition interessant war (76). Insertionen können, wie in 4.2.1 erklärt wurde, DNA-Sequenzen stören und so zu einem Funktionsverlust des Gens oder regulatorischen Elements führen (69). Außerdem könnte es sich um eine Duplikation handeln. Im Rahmen der Analysen wurde deutlich, dass die Insertion potentiell eine von acht Transkriptvarianten des Gens betrifft. Jedoch ist auch eine intergenische Lokalisation möglich. *MAP2K2* kodiert für ein Protein, das eine zentrale Rolle im Ras-abhängigen MAPK/ERK-Signalweg spielt und damit zahlreiche zelluläre Prozesse, u. a. Proliferation, Differenzierung, Zellzyklusprogression und Überleben, reguliert. Eine Überaktivierung des Signalwegs kann zu einer unkontrollierten Zellproliferation führen. Daher wird die Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinase Kinasen mit Krebserkrankungen in Verbindung gebracht (192). Insbesondere in RASopathien spielt *MAP2K2* eine wichtige Rolle und wurde in mehreren Studien bereits auf eine mögliche Assoziation zur Krebsprädisposition untersucht (12, 30). Genetische Varianten in dem Gen führen zum Kardio-fazio-kutanen Syndrom, welches insbesondere in der frühen Kindheit mit einem erhöhten Krebs-, vor allem ALL-Risiko verbunden ist. Die Inzidenz von Krebserkrankungen beim Kardio-fazio-kutanen Syndrom wird mit 1,6% angegeben (193). Eine Assoziation von *MAP2K2* mit der Genese von Medulloblastomen wurde bislang in der Literatur nicht beschrieben. Für ein verwandtes Gen, *MAP4K4*, wurde jedoch eine Überexpression in 30% der untersuchten Tumorseiten von Medulloblastompatient*innen festgestellt (194). Aufgrund einer geringen Abdeckung der *MAP2K2*-Genregion, insbesondere des potentiell durch die Insertion betroffenen ersten Exons, in den vorhandenen WES-Daten, ist es nicht möglich, zu evaluieren, ob es hier ggf. zu einer Duplikation des 5'-Anteils des *MAP2K2*-Gens gekommen ist.

Zudem deuten die WGOM-Daten darauf hin, dass die Insertion durch den Vater des Mädchens vererbt wurde, der eine in Bezug auf Krebserkrankungen unauffällige Anamnese aufwies. In den genutzten Populationsdatenbanken wurde bislang keine Insertion vergleichbarer Größe

in der Region beschrieben. Somit deuten die aktuellen Daten nicht auf eine Rolle der Insertion als prädisponierende Keimbahnveränderung hin. Es handelt sich daher um eine VUS.

4.3.2 Eine Deletion im *TP53*-Genort als benigne Variante

Der Patient P5 war an einem Nephroblastom und der Patient P8 an einer B-ALL erkrankt. Sie wiesen zudem klinische Anomalien auf. P5 zeigte eine Hypospadie, P8 eine Entwicklungsverzögerung.

Bei beiden Kindern wurde eine >1,4 kbp lange Deletion auf Chr17 (p13.1) identifiziert. Im >42 kbp großen, durch WGOM angegebenen Bereich befindet sich das KPG *TP53*. Wie in 1.2.1 beschrieben wurde, führen Keimbahnvarianten in diesem Gen zum autosomal-dominant vererbten Li-Fraumeni-Syndrom, mit dem eine Prädisposition für diverse maligne Erkrankungen assoziiert ist. Die Variante wurde jedoch an P5 bzw. P8 jeweils von einem Elternteil weitergegeben, dessen Anamnese in Bezug auf Krebserkrankungen unauffällig ist. Die Deletion überlappt außerdem, wie in 3.3 gezeigt ist, ausschließlich mit dem sechsten Intron und siebten Exon einer selten exprimierten Transkriptvariante von *TP53* (147).

Bei einem Abgleich der Deletion mit der dbVar Populationsdatenbank für SVs konnte eine Überlappung der hier identifizierten Deletion mit einer bekannten, 1585 bp großen Deletion identifiziert werden. Sie tritt mit einer Frequenz von 4,5% in der Bevölkerung auf und entspricht somit einem Polymorphismus (70). Bei einem so häufigen Nachweis der Deletion in der gesunden Kontrollpopulation ist nicht mit einer Tumörprädisposition durch diese Variante zu rechnen. Daher ist die Variante als benigne einzuschätzen, weshalb keine weiterführenden Analysen durchgeführt wurden.

4.3.3 Eine Insertion im *CREBBP*-Genloкус als mögliche krebsprädisponierende Veränderung

Bei dem Patienten P1 wurde ein ATRT diagnostiziert wurde. Es handelt sich dabei um einen hochmalignen, aggressiven Tumor des ZNS, in dem rhabdoide Zellen gemeinsam mit primitiven neuroektodermalen Zellen sowie epithelialen oder mesenchymalen Zellen zu finden sind. Am häufigsten kommen ATRTs bei Kindern bis zum dritten Lebensjahr vor (195). ATRTs treten typischerweise im Rahmen von KPSs auf. Außerdem wurden bei dem Jungen diverse klinische Auffälligkeiten, die ebenfalls auf ein KPS hinweisen und in 3.3.1 erläutert wurden, festgestellt (57, 60, 195).

Typisch für ATRTs ist, wie in 1.2.1 erwähnt wurde, die bi-allelische Inaktivierung von *SMARCB1*, die auch im Tumorgewebe von P1 beobachtet wurde, oder in selteneren Fällen von *SMARCA4*. In bis zu 30% der Fälle wird durch eine heterozygote, pathogene Keimbahnvariante in einem der beiden Gene das Rhabdoid-Tumorprädispositionssyndrom 1 bzw. 2 ausgelöst (54). Außerdem wurden bei Patient*innen mit Beckwith-Wiedemann-Syndrom und Ringchromosom 22 von ATRTs berichtet (196, 197). Sowohl mittels WES als auch WGOM konnte bei dem Patienten P1 keine Keimbahnvariante in einem der für die beschriebenen Syndrome

ursächlichen Gene detektiert werden. Es wurde auch keine SV in einem regulatorischen Element nachgewiesen, das eines dieser Gene beeinflusst.

Im Genom des Patienten P1 wurde jedoch eine SV in einem anderen KPG nachgewiesen. Es handelt sich um eine ca. 3384 bp lange Insertion auf Chr16 (p13.3), die im zweiten Intron des KPG *CREBBP* lokalisiert ist. Wie in 3.3.1 erklärt ist, könnte auch eine Duplikation der Region erfolgt sein, sodass sowohl ein funktionsverringender als auch ein funktionsverstärkender oder kein Effekt möglich sind.

In dem durch WGOM angegebenen Bereich befindet sich ein Enhancer des *CREBBP*-Gens, der in diversen Geweben, u. a. neuronalen Stammzellen und PBMCs, aktiv ist (76, 147). Bis heute ist nicht abschließend geklärt, aus welchem Gewebe ATRTs entstehen. Als wahrscheinlich gilt jedoch, insbesondere bei SHH-aktivierten Tumoren, ein neuroektodermaler Ursprung (198). Möglich ist, dass der Enhancer in multipotenten neuronalen Stammzellen aktiv ist, durch die Insertion in seiner Funktion verändert wurde und damit zur Krebsentstehung beitrug.

Rückschlüsse auf eine Vererbung der Variante lassen sich nicht ziehen, da kein zu untersuchendes Material der Eltern zur Verfügung stand. Es ist also auch eine *de novo* Entstehung der Insertion, insbesondere da die Familienanamnese hinsichtlich Krebserkrankungen unauffällig war, denkbar.

Dem KPG *CREBBP* wird eine bedeutende Rolle in der embryonalen Entwicklung und in der Wachstumskontrolle zugeschrieben. Weiterhin wird eine Acetyltransferase-Aktivität auf Histone und Nicht-Histon-Proteine beschrieben, die zu einer Auflockerung der Chromatinstruktur führt (104). Mutationen in *CREBBP*, die beispielsweise eine Verschiebung des Leserasters bedingen, verursachen das Rubinstein-Taybi-Syndrom (RSTS). Zu bekannten Varianten zählen Punktmutationen, Mikrodeletionen und trunkierende Mutationen, die zu einer verminderten Acetyltransferase- oder Transkriptionsaktivität führen. Die autosomal dominant vererbte Erkrankung geht mit einer Tumorprädisposition, postnatalen Wachstumsstörungen und einer Intelligenzminderung einher. Außerdem weisen betroffene Kinder häufig faziale Auffälligkeiten und Malformationen der Hände und Füße auf (199, 200). 2024 wurden erstmals standardisierte Diagnosekriterien für das RSTS publiziert, die retrospektiv zum Phänotyp des Patienten P1 passen. Eine aktuelle Evaluation der klinischen Kriterien ist aufgrund des Versterbens des Patienten nicht möglich. Er wies, was typisch für das RSTS ist, eine postnatale Wachstumsretardierung, eine Entwicklungsverzögerung, z. B. in Bezug auf das Erlernen des Sprechens, sowie Fußfehlbildungen auf. Zudem war seine Kopfform auffällig. RSTS wird autosomal dominant vererbt, tritt aber, wie es bei dem Patienten P1 möglich ist, in 99% der Patient*innen *de novo* auf (200).

In Zusammenhang mit dem Syndrom wurde ein gehäuftes Auftreten benigner Tumore wie Meningeome und Pilomatrixome beobachtet (200). Miller und Rubinstein beschrieben bereits 1995 das Auftreten neuronaler Tumoren und Tumoren der embryonalen und frühkindlichen Entwicklung im Kopfbereich bei RSTS-Patient*innen – ähnlich zu dem bei dem Patienten P1

aufgetretenen ATRT (201). In späteren Studien wurde jedoch keine Evidenz für ein vermehrtes Auftreten maligner Erkrankungen bei Personen <40 Jahre mit RSTS gezeigt (200).

Trotzdem ist *CREBBP* von großer Bedeutung als Tumorsuppressor in verschiedenen soliden und hämatologischen Krebsentitäten, was z. B. bei Lymphomen, hoch-hyperdiploider ALL und kleinzelligen Bronchialkarzinomen gezeigt wurde. Ein Verlust der Heterozygotie von *CREBBP* im Tumorgewebe wurde in bis zu 50% der Fälle solider Tumore beobachtet (199, 202-205). Aktuelle Studien belegen, dass ein gleichzeitiger Funktionsverlust von *CREBBP* mit einer Überexpression von *MYCN* in neuronalen Stammzellen die Entstehung aggressiver Frontalhirntumoren bei Mäusen begünstigt (206).

Für die Entwicklung eines Medulloblastoms prädisponieren Keimbahnmutationen der Gene *PTCH*, *APC* und *TP53*. Das durch *CREBBP* kodierte Protein interagiert mit den Signalwegen dieser drei Gene. Naheliegender und bisher durch einen Fallbericht beschrieben ist daher eine Prädisposition für die Entwicklung eines Medulloblastoms durch den Funktionsverlust von *CREBBP* (207, 208). Es zeigten sich außerdem vermehrt Mutationen in dem Gen in SHH-aktivierten Tumorsubtypen (208). Der histologische Subtyp des ATRT des Patienten P1 entsprach ebenfalls einem SHH-aktivierten Tumor, sodass auch bei ihm über eine tumorprädisponierende Bedeutung von *CREBBP* für diese Tumorentität nachgedacht werden kann.

In den Daten des WES war kein Kopienzahlzugewinn im *CREBBP*-Genlokus nachweisbar. Dies könnte auch darauf hindeuten, dass es sich um eine intronische Insertion handelt, die nicht durch die vorhandenen WES-Daten abgebildet werden kann. Da *CREBBP* auch in PBMCs exprimiert wird (117), erfolgte die Untersuchung der mRNA-Expressionslevel in PBMCs. Hierbei konnte jedoch kein Unterschied in der mRNA-Expression von *CREBBP* in dem Patienten P1 im Vergleich zu sechs Individuen, die keine SV in der untersuchten Region tragen, festgestellt werden.

Dabei ist allerdings zu beachten, dass in der Untersuchung PBMCs als Ausgangsmaterial verwendet wurden. Da die Aktivität regulatorischer Elemente, wie des durch die Insertion betroffenen Enhancers, gewebeabhängig ist (76), besteht die Möglichkeit, dass die *CREBBP*-mRNA-Expression in PBMCs keinen Unterschied aufweist, während in embryonalen Geweben eine veränderte mRNA-Expression vorliegt. Jedoch konnte auch im Tumorgewebe des Patienten keine veränderte *CREBBP*-RNA-Expression im Vergleich zu anderen ATRT verschiedener Subtypen mit Hilfe von RNA-Seq nachgewiesen werden.

Somit konnte hier kein Hinweis auf einen möglichen Effekt der Insertion auf die Expression des *CREBBP*-Gens gezeigt werden, sodass diese in Hinblick auf eine Rolle als kreboprädisponierende Veränderung eher als wahrscheinlich benigne zu bewerten ist.

4.3.4 Weitere intronische Varianten in Krebsprädispositionsgenen

Zudem wurde bei dem Patienten P1 eine ca. 4,6 kbp lange Deletion auf Chr10 (q25.2) nachgewiesen. Die Region überlappt mit dem zweiten Intron des KPG *TCF7L2*. Der Transkriptionsfaktor spielt eine entscheidende Rolle im Wnt/ β -Catenin-Signalweg und reguliert

damit die Zellentwicklung und das –wachstum. Varianten in dem Gen wurden in Zusammenhang mit einer möglichen Prädisposition für Brust-, Prostata- und Kolonkarzinome beschrieben (209). In der Fragestellung nach einer Krebsprädisposition im Kindesalter wurde es bereits als Tumorsuppressorgen auf Varianten untersucht (12, 30). In dem durch WGOM markierten, intronischen Bereich des Gens befinden sich zwei Enhancer. Diese scheinen jedoch nicht in embryonalen neuroektodermalen Zellen, dem Ursprungsgewebe eines ATRT, aktiv zu sein, sodass klinische Auswirkungen dieser Deletion, die zu der Entstehung eines ATRT führen, unwahrscheinlich sind (76, 195).

Bei dem Patienten P4, der bereits zum Zeitpunkt seiner Geburt an einem Gliom erkrankt war, wurde eine ca. 1,4 kbp lange Deletion auf ChrX (q26.2) detektiert, die im zweiten Intron des KPG *GPC3* lokalisiert ist. Ein Funktionsverlust von *GPC3* durch Deletionen und Punktmutationen verursacht das Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom, welches mit einer Tumorprädisposition bei Kindern, insbesondere für Hepatoblastome und Wilms-Tumore, einhergeht. Darüber hinaus zeichnet sich das Syndrom durch Hochwuchs und organische Fehlbildungen aus (210). Da diese Variante auf dem X-Chromosom des Patienten lokalisiert war, handelt es sich um eine hemizygote Deletion. Hätte sie einen klinischen Effekt, könnte dieser nicht durch das andere Allel kompensiert werden (156, 175, 210). Bei einem Abgleich der Deletion mit Populationsdatenbanken für SVs konnte eine Überlappung der hier identifizierten Deletion mit einer bekannten, 1626 bp großen Deletion in Boomsma et al. (esv3559353) sowie mit einer 1335 bp großen Deletion, publiziert durch gnomAD (nssv15943740) detektiert werden (70, 144, 145). Sie überlappen mit keinem durch die GeneHancer Datenbank beschriebenen regulatorischen Element (76). Daher erfolgten keine weiterführenden Untersuchungen. Es ist aktuell von einer VUS auszugehen.

Die Familienanamnese des Patienten P16, der an einer AML erkrankte, war väterlicherseits hinsichtlich Krebserkrankungen auffällig. Im Genom des Patienten wurde auf Chr3 (p14.2) eine ca. 14,4 kbp lange, paternal vererbte Deletion identifiziert, die sich im vierten Intron des Tumorsuppressorgens *FHIT* befindet. Das *FHIT*-Gen wird durch Verlust der Heterozygotie, Deletionen oder Hypermethylierungen des Promotors in frühen Stadien vieler Krebsentitäten, u. a. AML, inaktiviert (211). Eine nahezu gleich große Deletion (nsv4073808, 14310 bp) wurde durch gnomAD beschrieben (145). In der durch WGOM gekennzeichneten Region wurden keine regulatorischen Elemente erfasst, weshalb aktuell nicht von einer klinische Relevanz dieser Variante auszugehen ist (76).

Bei der Patientin P18 wurde eine B-ALL diagnostiziert. Ihre Eltern waren konsanguin und die Großmutter mütterlicherseits an einer hämatologischen Neoplasie verstorben. Im Genom der Patientin wurde eine ca. 1,8 kbp lange, durch die Mutter vererbte Deletion auf Chr6 (q21) nachgewiesen, die im ersten Intron von zwei Transkriptvarianten des Gens *PRDM1* lokalisiert ist. Es handelt sich um einen Transkriptionsfaktor, der zur Differenzierung von Plasmazellen beiträgt und in diffusen, großzelligen B-Zell-Lymphomen als Tumorsuppressor wirkt (212). In

Proben von Patient*innen mit akuten lymphoblastischen Leukämien wurden keine Varianten in dem Gen gefunden (213). *PRDM1* trägt zur epigenetischen Regulation der Genexpression bei und nimmt Einfluss auf das Auftreten, die Invasion und Metastasierung von Krebs. *PRDM1* kann in verschiedenen Isoformen vorliegen und damit gegensätzliche Funktionen in Bezug auf die Karzinogenese erfüllen (212). Die Transkriptvariante, die im Blut am höchsten exprimiert wird, ist nicht durch die Deletion betroffen (145). In dem durch WGOM gekennzeichneten, intronischen Bereich befinden sich zudem keine regulatorischen Elemente, die Einfluss auf die Expression des Gens nehmen könnten (76). Daher kann die Deletion als VUS in Bezug auf ein mögliches KPS eingeordnet werden.

Der Patient P22 entwickelte ein SHH-aktiviertes Medulloblastom. Zudem fiel bei dem Jungen eine Entwicklungsverzögerung auf. Im Genom zeigte sich auf Chr20 (q11.21) eine ca. 1,9 kbp lange Deletion. Diese ist im vierten Intron von *ASXL1* lokalisiert. Das Gen kodiert für ein Chromatin-bindendes Protein. Genetische Varianten in *ASXL1* führen zum Bohring-Opitz-Syndrom, welches, was zum Phänotyp des Patienten passen würde, u. a. mit geistiger Retardierung einhergeht und in dessen Zusammenhang zwei Fälle von Wilms-Tumoren und drei Fälle eines Hepatoblastoms beschrieben wurden. Faziale Dysmorphien, die ebenfalls zum typischen Phänotyp des Syndroms gehören, wies der Junge nicht auf (214, 215). Der ca. 4 kbp große, durch WGOM angegebene Bereich, in dem keine regulatorischen Elemente bekannt sind, umfasst eine durch gnomAD publizierte Deletion, die von ähnlicher Größe wie die im Genom des Patienten P22 vorliegende ist, sodass diese als VUS einzuschätzen ist (76, 145). Im Genom des an einer T-ALL erkrankten Patienten P25 zeigte sich auf Chr10 (q23.2) eine ca. 540 bp lange Deletion, welche sich im dritten Intron des KPG *BMPR1A* befindet. Das Gen ist Teil des *Transforming growth factor-βs* (TGF-βs) und *bone morphometric protein* (BMP)-Signalwegs, der Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose reguliert. Keimbahnvarianten im *BMPR1A*-Gen sind mit dem juvenilen gastrointestinalen Polyposis-KPS assoziiert (216). In dem ca. 3,3 kbp großen, gekennzeichneten Bereich wurden bereits ähnlich große Deletionen (esv3546621 durch Boomsma et al. und nsv4178292 durch gnomAD) beschrieben, bei denen es sich nicht um Polymorphismen handelt, die jedoch keinen Enhancer oder Promotor zu beeinflussen scheinen (76, 144). Daher lassen sich sowohl die Entwicklung der T-ALL als auch der klinisch auffällige Phänotyp des Jungen, der in 3.2.2 erläutert wurde, durch diese Deletion nicht erklären.

Im Genom des Patienten P25 wurde außerdem eine ca. 2 kbp lange Deletion auf Chr21 (q22.12) detektiert. Diese war im neunten Intron einer der zahlreichen Transkriptvarianten des KPG *RUNX1* lokalisiert. *RUNX1* ist ein hämatopoetischer Transkriptionsfaktor. Keimbahnvarianten des Gens wurden bereits in T-ALL-Patient*innen erfasst (217). Regulatorische Elemente wurden jedoch nicht von der >30 kbp großen, durch WGOM angezeigten Region erfasst (76). In den Analysen wurde eine überlappende 1907 bp Deletion (nssv16199098) in der Datenbank von dbVar erfasst, bei der es sich durch eine

Prävalenz von 2,3% in der Bevölkerung um einen Polymorphismus handelt (70). Daher ist die detektierte Deletion als benigne Variante zu werten.

4.3.5 Intergenisch lokalisierte Varianten, die Krebsprädispositionsgene betreffen können

Im Genom des Patienten P28 wurde eine ca. 1,7 kbp lange Deletion in der Region Chr2 (p16.3), weniger als 1 kbp von dem KPG *MSH6* entfernt, identifiziert. *MSH6* spielt eine Rolle in der DNA-*Mismatch*-Reparatur. Kommt es zu bi-allelischen Mutationen des Gens, kann ein *Mismatch*-Reparatur-Defizienz-Syndrom resultieren, das durch frühzeitig auftretende maligne Erkrankungen gekennzeichnet ist. Kinder mit Keimbahnvarianten in *MSH6* entwickeln diverse Krebsarten, darunter hämatologische und gastrointestinale Malignome sowie Hirntumore wie Gliome und Glioblastome (218). In den Analysen wurde jedoch kein potentiell beeinflusstes regulatorisches Element in dem ca. 16 kbp großen, intergenischen Bereich detektiert (76). Auch in der Analyse der Populationsdatenbanken wurde keine Deletion ähnlicher Größe in der Region detektiert (70). Aufgrund der Familienanamnese liegt eine ursächliche SV, die durch die Mutter vererbt wurde, nahe. Die hier beschriebene Deletion wurde jedoch paternal vererbt. In Zusammenschau dieser Ergebnisse ist von einer VUS auszugehen.

Im Genom des Patienten P22 konnte auf Chr11 (p13) eine ca. 1,7 kbp lange Deletion identifiziert werden, die ca. 10 kbp von dem Transkriptionsfaktor *WT1* entfernt lokalisiert ist. Keimbahnvarianten in diesem Gen führen u. a. zum Denys-Drash-Syndrom, welches mit einer Prädisposition für Wilms-Tumore assoziiert ist (219). Mutationen in *WT1* wurden aber auch in anderen Tumoren des Kindesalters und Glioblastomen identifiziert (220, 221). Die Rolle in einer potentiellen Prädisposition für Medulloblastome ist unklar. Da keine Promotoren oder Enhancer der GeneHancer Datenbank mit der >18 kbp großen Region überlappen, ist ein Einfluss der Deletion auf die *WT1*-Expression unwahrscheinlich (76). Zudem ist der Vater des Patienten, durch den die Deletion übertragen wurde, nicht von einer Krebserkrankung betroffen. Insgesamt ist die Deletion damit als benigne einzuschätzen.

4.4 Strukturelle Varianten, die Kandidatengene beeinflussen

Im Folgenden sollen die in 3.4 beschriebenen SVs mit Einfluss auf potentielle Kandidaten-KPGs diskutiert werden. Es handelt sich dabei um Gene, die bislang noch nicht im Zusammenhang mit KPSs beschrieben wurden, aufgrund der Recherchen im Rahmen dieser Arbeit aber mit einer Krebsprädisposition in Verbindung gebracht werden können.

4.4.1 Die potentiell krebsprädisponierende Wirkung einer Deletion im *MSR1*-Genlokus

Wie in 3.4.1 erläutert wurde, ist die Familienanamnesen der Patientinnen P9 und P10 insofern auffällig, als dass die beiden Schwestern sind (57, 60).

Die Patientin P9 erkrankte im Alter von 10,1 Jahren an einem pilozytischen Astrozytom. Dabei handelt es sich um den häufigsten Hirntumor des Kindesalters, der eine langsame Wachstums- und hohe Überlebensrate (10-Jahres-Überlebensrate >90% im Kindesalter) aufweist. Pilozytische Astrozytome werden zur Gruppe der Gliome gezählt. Im Rahmen von KPSs treten sie vermehrt auf, so beispielsweise bei NF1 am Nervus opticus (222). Bei P10 war ein Hodgkin-Lymphom aufgetreten. Dieses zählt zu den B-Zell-Lymphomen und tritt vermehrt im jungen Erwachsenenalter auf. Charakteristisch ist die Existenz von Reed-Sternberg-Zellen im entzündlich veränderten Tumorgewebe. Klinisch manifestieren sich Hodgkin-Lymphome meist durch eine supradiaphragmale Lymphadenopathie und B-Symptomatik. Sie treten gehäuft bei EBV-Infizierten auf (223). Keimbahnvarianten in *KDR*, *KLHDC8B*, *PAX5* und *GATA3* gelten als potentiell prädisponierend für Hodgkin-Lymphome (224).

Da beide Schwestern erkrankt waren, wurde insbesondere nach SVs gesucht, die in beiden Genomen nachweisbar sind (insgesamt 14 SVs). Darunter war eine mindestens 77,5 kbp lange Deletion auf Chr8 (p22). Die durch WGOM dargestellte Region zwischen den zuletzt korrekt zugeordneten Markierungen umfasste ca. 114 kbp (P9) bzw. 118 kbp (P10). Abb. 25 in 3.4.1 zeigt, dass ein Teil der Markierungen in diesem Bereich, auch wenn diese nicht als übereinstimmend erkannt werden, erhalten ist. Dadurch kann die Lokalisation der SV noch besser eingeschätzt werden. Es ist am wahrscheinlichsten, dass die Introne vier bis neun und Exone fünf bis zehn des *MSR1*-Gens deletiert sind.

MSR1 kodiert für ein Transmembranprotein auf Makrophagen, welches die Aufnahme von acetyliertem *low density* Lipoprotein (LDL) steuert und damit zu atherosklerotischen Prozessen beiträgt. Weiterhin wirkt es als *Pattern-Recognition*-Rezeptor. Bedeutsam ist *MSR1* vor allem für Makrophagen vom M2-Phänotyp. Diese sind, im Gegensatz zu den proinflammatorischen M1-Makrophagen, für Gewebereparaturen und die Förderung der Zellproliferation verantwortlich. Sie haben eine antiinflammatorische Wirkung. Neben einem hohen Vorkommen von *MSR1* im Fettgewebe, der Lunge und in Arterien, wird das Gen auch in Astrozyten und zu einem geringen Anteil auch in B-Zellen exprimiert (116, 148).

MSR1 stellt einen bedeutenden Marker für tumorassoziierte Makrophagen (TAM) dar. Diese inhibieren die Tumordestruktion durch das Immunsystem, steigern dessen Proliferation, Invasion, Angiogenese und Metastasierung über die Sekretion verschiedener Interleukine und Wachstumsfaktoren. Eine erhöhte Anzahl *MSR1*-positiver TAMs ist assoziiert mit einer schlechteren Prognose und geringerer Überlebenszeit der Patient*innen mit verschiedenen Tumoren, darunter auch Gliomen. Die Expression von *MSR1* zeigt in Gliomen eine positive Korrelation mit dem Malignitätsgrad und war kontinuierlich hoch reguliert in Tumoren mit einer Wildtyp-Isocitrat-Dehydrogenase (148). Eine tumorsuppressive Wirkung des Gens wurde in chronisch myeloischen Leukämien beschrieben, während *MSR1* in Magenkarzinomen durch den Einfluss auf M2-Makrophagen zur Tumorprogression beiträgt (148, 225).

Im Tumorgewebe verschiedener Krebsentitäten wurden bereits häufig Deletionen in der Region Chr8 (p22), in der sich das *MSR1*-Gen befindet, identifiziert. Diese sind assoziiert mit einer Krankheitsprogression und einer schlechteren Prognose. Insbesondere für Prostatakarzinome sind eine stärkere Aggressivität der Tumore und ein erhöhtes Progressrisiko bei Deletionen in der Region bekannt (148).

Keimbahnvarianten in *MSR1* sind assoziiert mit Adenokarzinomen des Ösophagus sowie dem Risiko, an Prostatakarzinomen zu erkranken (148). Xu et al. identifizierten *Missense*-Mutationen in *MSR1*, die in der Keimbahn von Männern mit nicht-hereditärem Prostatakarzinom mehr als viermal so häufig vorkamen wie bei Nicht-Erkrankten. Dies weist auf die Bedeutung von *MSR1* in der Prädisposition für Prostatakarzinome hin (226). In den vorliegenden Studien wurden vorrangig Punktmutationen und indels betrachtet. Eine Untersuchung von SVs oder CNVs erfolgte nicht (226-228). Interessanterweise hatten beide Großväter der Patientinnen ein Prostatakarzinom. Da beide Schwestern an Krebs erkrankten ist eine vererbte Variante, z. B. durch einen der Großväter, wahrscheinlicher als eine *de novo* aufgetretene. Theoretisch möglich wäre auch eine Vererbung durch beide Großväter. Es wurden jedoch ausschließlich heterozygote SVs, die bei den Patientinnen P9 und P10 auftraten, festgestellt.

Ein Abgleich der WES-Daten zeigte eine um die Hälfte verminderte Abdeckung in den Daten der Patientinnen P9, P10 und deren Mutter im Vergleich zum Vater, was ebenfalls auf eine Deletion hinweist. Dies legt eine Vererbung der heterozygoten Variante durch die Mutter nahe. Ob die Deletion auch bei dem Großvater mütterlicherseits, bei dem im Alter von 60 Jahren ein Prostatakarzinom diagnostiziert wurde, vorlag, kann jedoch anhand der vorhandenen Daten nicht geklärt werden.

Die Deletion wurde, wie in 2.2.2.6 und 3.4.1 erklärt, mittels Long-range PCR validiert. In einem nächsten Schritt wurden mittels Sanger-Sequenzierung die konkreten Bruchpunkte der Deletion identifiziert. Das Verfahren und die Ergebnisse werden in 2.2.2.8 und 3.4.1 beschrieben.

Die Deletions-Bruchpunkte befinden sich auf Chr8:16,087,937–16,166,438 (hg38) und umfassen 78501 bp.

In verschiedenen Studien und Populationsdatenbanken wurden bereits Deletionen ähnlicher Größe in der untersuchten Region beschrieben, die ebenfalls die Exone fünf bis zehn und Introne vier bis neun des *MSR1*-Gens umfassen (vgl. Abb. 39). Sie wurden mit einer Frequenz von <0,01–0,68% erfasst (70, 71, 144, 145, 229). Damit erfolgte keine Exklusion der Deletion anhand der in dieser Arbeit verwendeten Filterkriterien. Dennoch fällt auf, dass eine hohe Prävalenz ähnlich großer und lokalisierter Deletionen in der Allgemeinbevölkerung besteht.

MSR1 stellt also ein Kandidaten-KPG dar. Neben den o. g. Effekten auf Tumorzellen besteht die Möglichkeit, dass eine Deletion in dem Gen die Immunantwort und die Fähigkeit des Immunsystems, Tumore zu erkennen und zu bekämpfen, beeinträchtigt, chronische Infektionen begünstigt und zu Veränderungen in der Tumormikroumgebung durch TAMs führt (148). All diese Faktoren können zur Genese z. B. von Lymphomen führen (230).

Die hohe Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung macht einen pathogenen Effekt der in den Patientinnen P9 und P10 detektierten Deletion unwahrscheinlicher. Weitere Studien sind nötig, um die Mechanismen, die zu einer möglichen Krebsprädisposition führen, genauer zu verstehen und zu analysieren, ob weitere an Krebs erkrankte Kinder von einer Keimbahnvariante in *MSR1* betroffen sind.

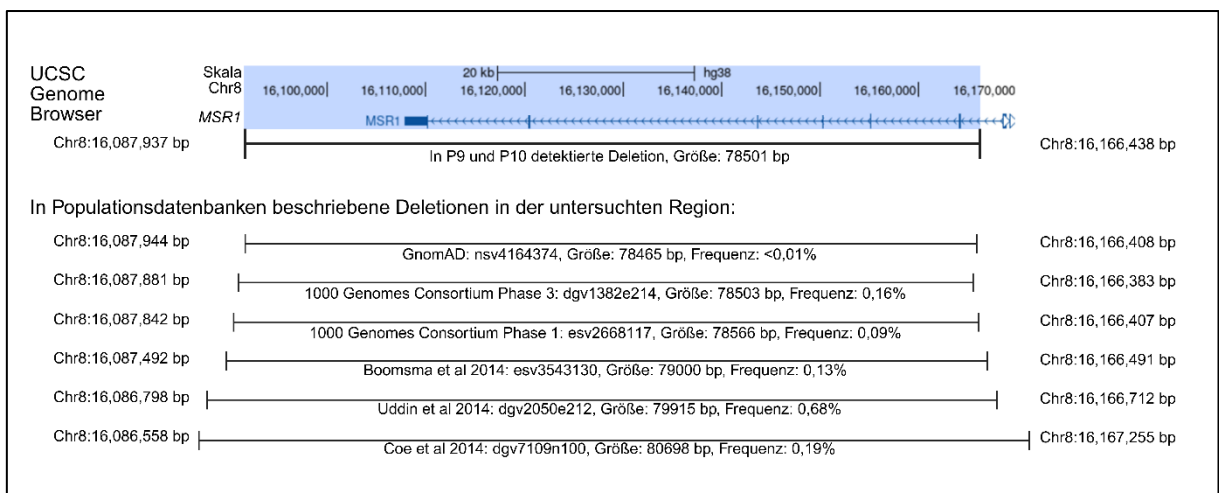


Abb. 39 In Populationsdatenbanken erfasste Deletionen in der untersuchten Region um den *MSR1*-Genlokus

Gezeigt sind im Rahmen des Abgleichs mit Populationsdatenbanken erfasste Deletionen, die in der untersuchten Region lokalisiert sind. Im oberen Abschnitt der Abbildung ist in blau die genomische Region Chr8:16,087,937–16,166,438 (hg38) dargestellt, die die Exone fünf bis zehn und Introne vier bis neun des *MSR1*-Gens umfasst und in den Patientinnen P9 und P10 deletiert ist. Dafür steht der darunter dargestellte schwarze Balken. Die weiteren Markierungen entsprechen in der Literatur beschriebenen Deletionen, zu denen jeweils Datenbank bzw. Publikation, Größe und Frequenz sowie auf der linken und rechten Seite die Bruchpunkte angegeben sind (70, 71, 112, 144, 145, 229). Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt. Die Nutzung erfolgt im Einklang mit der akademischen Lizenzvereinbarung von BioRender.

4.4.2 Deletionen des *RASA4*- und *RASA4B*-Genlokus als mögliche krebsprädisponierende Veränderungen

Bei zwei Patienten wurden Deletionen in der Region Chr7 (q22.1) nachgewiesen. Sie betreffen zwei Gene, *RASA4* und *RASA4B*, die inhibitorisch auf den Ras-Signalweg einwirken und potentielle Tumorsuppressorgene darstellen (231).

Aufgrund dieser Funktion und den beschriebenen Varianten können sie als mögliche Kandidaten-KPGs betrachtet werden. Es handelt sich um eine komplexe Region, die von segmentalen Duplikationen durchzogen ist (232). Segmentale Duplikationen bezeichnen repetitive DNA-Sequenzen >1 kbp mit >90% Sequenzidentität und machen ca. 7% des gesamten humanen Genoms aus (233). Im Bereich segmentaler Duplikationen finden sich 10-mal häufiger CNVs und insbesondere komplexe SV-Typen mit mehreren Bruchpunkten (166), was erklären kann, warum Varianten in mehreren Fällen in der Region detektiert wurden. Sie führen zu einer vermehrten genomischen Instabilität, sind mit chromosomalen Rearrangements und genetischen Erkrankungen wie dem DiGeorge-, dem Williams-Beuren- und potentiell auch KPSs assoziiert (232, 234). Auf Chromosom 7 befinden sich die meisten intrachromosomalen Duplikationen, sodass dort Krankheitsassoziationen vermutet werden (232). Segmentale Duplikationen stellen eine Herausforderung der Genom Assemblierung von *Short-Read*-Sequenzierungen dar, da sie zu Fehlassemblierungen, Fehlzusammenordnungen und geringeren Sequenzabdeckungen der duplizierten Regionen führen (233, 235). Mittels LRS ist heute eine exakte Untersuchung vieler komplexer Abschnitte des Genoms, zu denen segmentale Duplikationen gehören, möglich (166).

Bei dem Patienten P6 wurde die Diagnose einer T-ALL gestellt. Zudem wies der Junge eine auffällige Fazies und breite, bewegungseingeschränkte Daumen auf. Die Beschreibung der Fazies des Patienten passt u. a. zu den im Rahmen von RASopathien wie dem Noonan-Syndrom publizierten Auffälligkeiten, zu denen ein Hypertelorismus und tiefsitzende Ohren zählen. Kinder, die von einer RASopathie betroffen sind, zeigen zudem häufig eine Entwicklungsverzögerung und weitere klinische Auffälligkeiten (236). Bekannt ist, dass der Junge eine Förderschule besuchte, was eine Entwicklungsverzögerung nahelegt. Er entwickelte im Rahmen der Therapie eine starke Mukositis und Neurotoxizität. Sein Onkel väterlicherseits sei im Alter von 45 Jahren an einem Bronchialkarzinom erkrankt. Daher war das Vorliegen eines KPS wahrscheinlich (57, 60).

Im Genom des Jungen wurde eine ca. 99 kbp lange Deletion auf Chr7 (q22.1) detektiert. In dieser Region ist neben den in 3.4.2 genannten Genen *RASA4B* lokalisiert. Da es sich um eine Duo-Analyse handelt, kann ein Rückschluss auf die Vererbung durch die Mutter gezogen werden. Diese SV wurde jedoch nicht in ihrem Genom nachgewiesen. Demnach ist sie *de novo* entstanden oder durch den Vater vererbt worden. Betrachtet man die WES-Daten, fällt eine sehr geringe Abdeckung der Region auf, was die Auswertung nicht ermöglicht. Wie oben erwähnt ist dies typisch für Regionen mit segmentalen Duplikationen, da sich die aufeinander

folgenden DNA-Sequenzen sehr ähnlich sind (235). Daher erlauben die WES-Daten keine Aussage über eine Deletion in der Region.

Der Patient P16 litt an einer AML. Die Familienanamnese des Jungen war, wie in 3.4.2 erklärt wurde, auffällig, da sein Vater und Großvater väterlicherseits an malignen Tumorerkrankungen im Alter <45 Jahren erkrankt waren. Neben der in 4.3.4 diskutierten VUS im KPG *FHIT*, wurde eine ca. 96 kbp lange, paternal vererbte Deletion auf Chr7 (q22.1) festgestellt. In der deletierten Region ist neben weiteren in 3.4.2 erwähnten Genen das mit *RASA4B* verwandte Gen *RASA4* lokalisiert. In der WES fiel durch die starke Homologie der Sequenzen innerhalb segmentaler Duplikationen erneut eine schwache Abdeckung der gesamten Region auf. Dementsprechend ist die Interpretation der WES Daten nicht möglich.

Im Genom der Patienten P6 und P16 wurde also eine vollständige Deletion des *RASA4B*- bzw. *RASA4*-Gens detektiert.

Beide Gene kodieren für Kalzium-sensitive Ras-Guanosin-Triphosphatase-(GTPase)-aktivierende Proteine (GAPs). Diese besitzen die Möglichkeit, den Ras-Signalweg zu inhibieren. Sie sind in der Lage, die Fähigkeit von Ras zur Hydrolyse von GTP und damit den Übergang in den Guanosin-Diphosphat (GDP)-gebundenen Status steigern (vgl. Abb. 40).

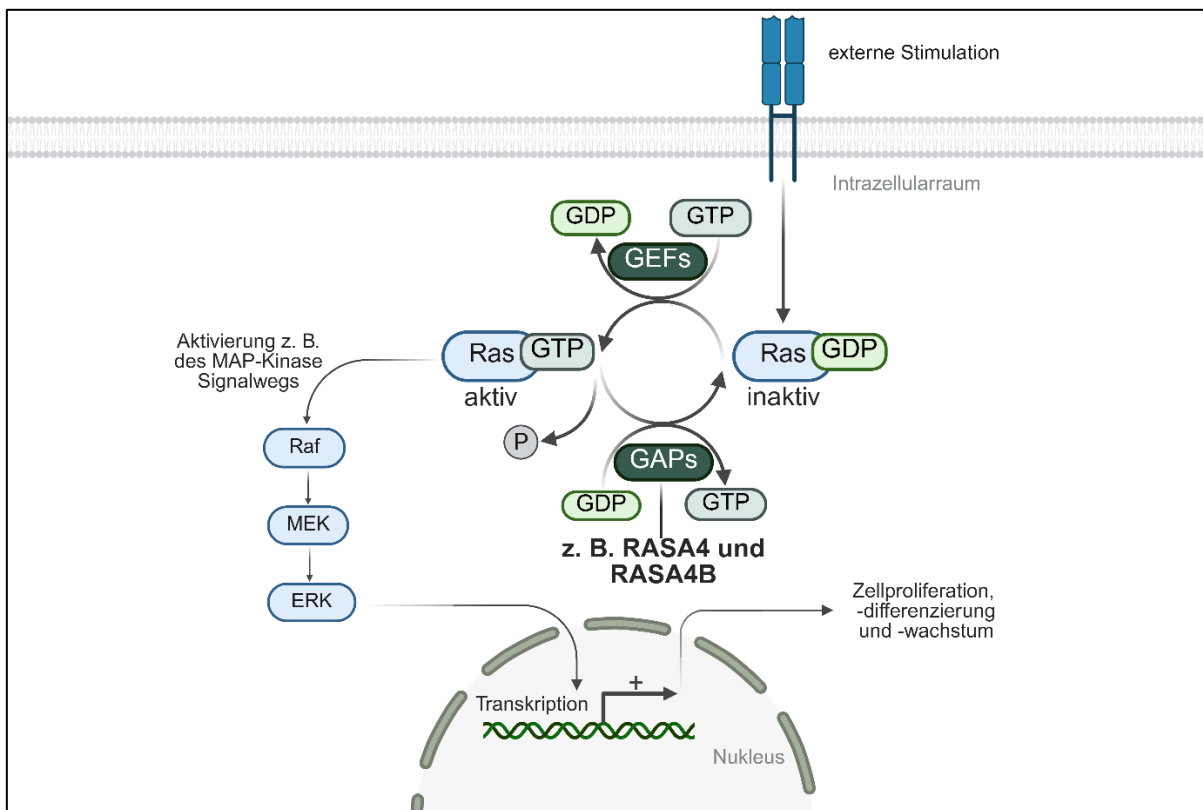


Abb. 40 Funktion von RASA4 und RASA4B als Ras-GTPase-aktivierendes Protein

Schematisch dargestellt ist die Funktion von GAPs, zu denen RASA4 und RASA4B gehören. GAPs stimulieren die intrinsische GTPase-Aktivität von Ras, wodurch GTP zu GDP hydrolysiert und Ras in den inaktiven Zustand (Ras-GDP) überführt wird. Damit wird das Signal, das u. a. durch Aktivierung des hier beispielhaft dargestellten MAP-Kinase Signalwegs zu Zellproliferation, -differenzierung und -wachstum führt, beendet. Als Guanosin-Exchange-Faktoren (GEFs) werden Proteine bezeichnet, die die Dissoziation von GDP von Ras und damit die Bindung von GTP ermöglichen (112, 237). Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt. Die Nutzung erfolgt im Einklang mit der akademischen Lizenzvereinbarung von BioRender.

Dadurch werden die folgenden Signalwege weniger aktiviert, die Einfluss auf die Genexpression, Zellwachstum und –differenzierung nehmen (112, 237).

Eine Überaktivität des Ras-Signalwegs, die durch Varianten für GAPs kodierender Gene entstehen kann, führt zu unkontrolliertem Wachstum von Geweben und zur Krebsentstehung. In Maus und Mensch kann ein Verlust der Expression oder die genetische Alteration eines Ras-GTPase-aktivierenden Proteins zu Störungen der Homöostase des betreffenden Gewebes führen. *RASA4* wird in allen Blutzellen exprimiert und kommt am häufigsten in der Milz und in Lymphknoten vor. Daten zur Expression von *RASA4B* in Blutzellen liegen nicht vor. Bekannt ist aber die Expression in zahlreichen Krebszelllinien, darunter auch Leukämien, wobei auffällt, dass diese im Mittel geringer ist, als in Nicht-Krebszelllinien (116, 231).

Die Assoziation des Locus Chr7 (q22) zu AML ist bereits seit einiger Zeit bekannt (238). Zur Krankheitsassoziation von *RASA4B* gibt es bislang keine konkreten Forschungsergebnisse, vermutet wird jedoch eine weitreichende Paralogie zu *RASA4* (113). *RASA4* gilt als potentielles Tumorsuppressorgen, da seine Suppression in einem RNA-Interferenz-Screening die onkogene Transformation humaner Brust-Epithelzellen förderte (231). Chen et al. beschrieben eine reduzierte *RASA4*-Expression in Zervixkarzinomen, deren Inaktivierung die Proliferation von HeLa- und C-33A-Zellen steigerte (239). Auch in Rektumkarzinomen zeigte sich eine verminderte Expression von *RASA4* (240). In einer Tripel-Negativen Mammakarzinom-Zelllinie wurde die Ras-inhibitorische Funktion von *RASA4* als kalziumabhängig beschrieben (241). In einer Studie zu nasopharyngealen Adenokarzinomen wurde eine CNV in der Region Chr7 (q22), ähnlich wie die durch WGOM registrierte SV, nachgewiesen. Diese umfasste auch *RASA4* (242). In Juvenilen Myelomonozytischen Leukämien wurde *RASA4* als Target von DNA-Hypermethylierung identifiziert, die mit einer schlechteren Prognose und erhöhtem Rückfall-Risiko nach Stammzelltransplantation assoziiert war. Bei Monosomie 7 wurde eine Hypermethylierung von *RASA4* auf dem verbleibenden Allel nachgewiesen (243). Eine DNA-Hypermethylierung reguliert die Genexpression auf eine komplexe und kontextabhängige Weise. In den meisten Fällen führt sie zu einer verminderten Transkription, Herunterregulierung, selten auch zur Steigerung der Genexpression (244). Eine epigenetische Analyse von *RASA4* und *RASA4B* wäre im Tumorgewebe der beiden Jungen interessant gewesen. Dafür stand leider kein Tumormaterial zur Verfügung.

Denkbar ist also, dass durch die vollständige Deletion von *RASA4* bzw. *RASA4B* die Inhibition des Ras-Signalwegs in hämatopoetischen Zellen vermindert wird und dessen Überaktivität zur Krebsentstehung führt (116, 231). Es besteht die Möglichkeit, dass es sich bei der Deletion der beiden Gene um eine Form einer tumorprädisponierenden RASopathie handelt, wozu der Phänotyp des Patienten P6 sowie die paternale Vererbung der SV des Patienten P16 im Kontext der Familienanamnese passen würden.

Um die Expression der Gene im Blut zu untersuchen, sollte eine qPCR durchgeführt werden. Durch die starke Homologie der Region war es jedoch nicht möglich, spezifische Primer zu

designen, sodass zum aktuellen Zeitpunkt keine weiterführende Validierung der Varianten erfolgen konnte.

Es wäre interessant, mit zukünftigen Technologien die Region um *RASA4* und *RASA4B* sowie die Auswirkung der Deletion der Gene auf die Proteinexpression weiter zu untersuchen. Analysen zur enzymatischen Aktivität, Bindungseigenschaften oder Wechselwirkungen mit anderen Molekülen können erfolgen. Molekulare Mechanismen und Omics-Ansätze können zur Beurteilung des Einflusses auf den Ras-Signalweg beitragen. Epidemiologische Daten zu SVs innerhalb segmentaler Duplikationen sollten generiert und die Häufigkeit dieser Varianten in gesunden und erkrankten Populationen dokumentiert werden. Schließlich könnten *in vivo* Modelle die biologischen Folgen der Deletionen in einem physiologischen Kontext zeigen. All diese Schritte können zur Einstufung der Deletionen als pathogen beitragen.

4.4.3 Deletion eines *DKK1*-Enhancers mit potentieller Tumorprädisposition

Bei der Patientin P14 wurde ein ZNS-Tumor, bestehend aus einem SHH-aktivierten Medulloblastom und einem Astrozytom, diagnostiziert.

Wie in 4.2.5 diskutiert wurde, wurde im Genom der Patientin eine *de novo* entstandene, intergenisch lokalisierte SV erfasst.

Darüber hinaus wurde eine 555 bp lange, heterozygote Deletion auf Chr10 (q21.1) identifiziert. Von welchem Elternteil diese vererbt wurde, ist nicht abschließend geklärt, da sowohl bei der Mutter (45 Moleküle) als auch beim Vater (52 Moleküle) diese SV tragende Moleküle nachgewiesen wurden. Es ist möglich, dass es sich hierbei um einen Polymorphismus handelt, den beide Elternteile tragen, jedoch konnte keine mit der Region überlappende Deletion ähnlicher Größe in den Populationsdatenbanken identifiziert werden. Daher ist auch eine Kontamination denkbar. Um diese sicher auszuschließen, könnte der WGOM-Lauf des Kindes wiederholt werden.

Wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben, enthält der ca. 19,5 kbp große, durch WGOM identifizierte Bereich zwei Markierungen, die nicht korrekt verknüpft sind und die Lokalisation der Deletion näher eingrenzen. Möglicherweise ist einer von zwei Enhancern betroffen, die die Expression des *DKK1*-Gens regulieren. Beide sind in Blut-, Haut- und mesenchymalen Stammzellen aktiv, die u. a. im Kleinhirn zu Neuronen und Astrozyten differenzieren können (76, 147, 245). Der Enhancer GH10J052439 zeigt zusätzlich Aktivität in reifen Astrozyten (147). Das *DKK1*-Gen kodiert für ein sekretiertes Protein, das den Wnt/ β -Catenin-Signalweg durch Bindung an LRP6 hemmt und besonders in der embryonalen Entwicklung wichtig ist (246). Im Tiermodell ist es an der Bildung des Vorderhirns und des axialen Mesendoderms beteiligt (247).

Die Funktion des *DKK1*-Gens bei Krebserkrankungen ist kontextabhängig und variiert je nach Tumorart, genetischem Hintergrund und Mikroumgebung. Als Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs kann DKK1 tumorsuppressiv wirken, indem es die Zellproliferation hemmt und die Apoptose fördert (246). Dies wurde in Zelllinien von kolorektalen-, Schilddrüsen- und Mammakarzinomen sowie Leukämien festgestellt (248).

Gleichzeitig wurden auch tumorfördernde Effekte durch den Einfluss auf Metastasierung, Angiogenese und Immunsuppression beschrieben. Auch Wnt-unabhängige Signalwege, könnten zu protumorigenen Effekten beitragen, u. a. durch Schaffung eines immunsuppressiven Mikromilieus (248).

In ZNS-Tumoren zeigt *DKK1* ebenfalls eine ambivalente Rolle. In Medulloblastomen wurde es als epigenetisch stillgelegtes Tumorsuppressorgen identifiziert, dessen Re-Expression das Tumorwachstum inhibierte und Apoptose förderte (149). Gleichzeitig wurde in Wnt-aktivierten Medulloblastomen eine *DKK1*-Überexpression als negatives Feedback beobachtet (249). In Astrozytomen und Glioblastomen ist *DKK1* ebenfalls epigenetisch reguliert und scheint dort wachstumshemmend zu wirken (250). Insgesamt bleibt die Rolle von *DKK1* in ZNS-Tumoren, besonders bei SHH-aktivierten Medulloblastomen, unklar und kann sowohl tumorsuppressiv als auch tumorfördernd sein.

Eine Deletion kann die Funktion eines regulatorischen Elements auf verschiedene Arten stören. Möglich sind die direkte Zerstörung von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, wodurch das Zielgen nicht mehr oder nur verringert transkribiert wird, epigenetische Veränderungen sowie eine Beeinträchtigung der Chromatinstruktur, wodurch die räumliche Nähe von Enhancer und Promotor beeinträchtigt wird, TAD-Grenzen verschoben werden und ggf. neue Interaktionen entstehen, die Fehlexpressionen bedingen (251-253). Sollte der Enhancer von *DKK1* durch die Deletion zerstört worden sein, würde dies u. a. zu einer stärkeren Aktivierung des Wnt-Signalwegs führen, was die Krebsentstehung fördern könnte.

Möglich ist aber auch, dass es sich bei GH10J052436 und GH10J052439 um Silencer des *DKK1*-Gens handelt. In bisherigen Studien wurden diese regulatorischen Elemente, die die Genexpression supprimieren können, weniger untersucht als Enhancer, die diese steigern (77, 254). In der Datenbank Silencer DB wird ein im Blut aktiver Silencer (HS_01717068) vorhergesagt, dessen Koordinaten zu dem durch GeneHancer publizierten regulatorischen Element GH10J052436 passen. Darüber hinaus befindet sich der prognostizierte Silencer HS_01717062 in der wahrscheinlich deletierten Region, der insbesondere in Astrozyten aktiv ist. Die Validierung dieser regulatorischen Elemente steht aktuell jedoch noch aus (254).

Mittels qPCR wurde der Einfluss der Deletion auf die *DKK1*-Expression überprüft. Detektiert wurde eine stark bzw. sehr stark signifikant erhöhte relative *DKK1*-mRNA-Expression in den PBMC-Proben der Patientin P14 und deren Mutter im Vergleich zu den Kontrollen. Die relative *DKK1*-mRNA-Expression des Vaters, der laut WGOM-Daten ebenfalls die Deletion trägt, ist verglichen mit den Kontrollen nur teilweise signifikant erhöht. Ursache dieses uneindeutigen Ergebnisses könnte die Auswahl der *Housekeeping*-Gene sein. Möglich ist weiterhin, dass der Vater nicht Träger der Deletion und es zu einer Kontamination der Proben gekommen ist.

Die erhöhte relative *DKK1*-mRNA-Expression in den Proben der Patientin P14 und ihrer Mutter könnte mit der Deletion eines Silencers des *DKK1*-Gens begründet werden.

Dabei ist, wie bereits in 4.3.3 beschrieben, wichtig zu beachten, dass regulatorische Elemente gewebeabhängig aktiv sind (76). Somit muss eine veränderte Expression im Blut keine veränderte Expression im embryonalen bzw. neurologischen Gewebe zur Folge haben.

Interessant wäre es daher, die Expression im Tumorgewebe zu untersuchen. Weiterhin sollte eine Validierung vorhergesagter Silencer erfolgen. Funktionelle Versuche, die Untersuchung von Chromatin- und Histonmarks sowie ein Knock-Out in einer Zelllinie können Hinweise auf den Einfluss durch SVs betroffener regulatorischer Elemente auf eine mögliche Krebsprädisposition geben.

Weitere Studien sind notwendig, um die kontextabhängige Rolle des Gens in Tumorerkrankungen, u. a. in SHH-aktivierten Hirntumoren, und damit eine mögliche Krebsprädisposition zu ermitteln.

4.4.4 Der mögliche krebssprädizierende Effekt der Deletion eines *SPRED1*-Enhancers

Der Patient P12 war ein Jahr alt, als bei ihm ein Optikusgliom diagnostiziert wurde. Histologisch handelt es sich bei dieser Tumorentität meist um ein pilozytisches Astrozytom (150). Optikusgliome treten häufig im Rahmen der NF1-Erkrankung auf, die durch Keimbahnmutationen im Tumorsuppressorgen *NF1* u. a. Hautveränderungen (z. B. CALM), ZNS-/PNS-Tumoren und skelettale Anomalien verursacht. Bei dem betroffenen Jungen wurden CALM beobachtet, jedoch zeigte die WES keine Mutation in *NF1* oder anderen KPGs, weshalb eine WGOM durchgeführt wurde. Auch diese ergab keine SVs in *NF1* oder anderen KPGs. Kapitel 4.1.3 geht auf die auffällig hohe Zahl an SVs bei dem Patienten P12 im Vergleich zu anderen Patient*innen ein.

Darunter war eine ca. 2,5 kbp lange, maternal vererbte, intergenisch lokalisierte Deletion auf Chr15 (q14). Bislang publiziert ist eine ähnlich große Deletion (esv3636189), bei der es sich nicht um einen Polymorphismus handelt und die einen Teil des Enhancers GH15J038126 betrifft. Dieses regulatorische Element ist u. a. in Astrozyten, dem Ursprungsgewebe von Optikusgliomen, aktiv und beeinflusst die Expression von *SPRED1* (71, 76).

Eine Deletion kann, wie oben beschrieben, die Funktion eines Enhancers stören, etwa durch den Verlust von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen, epigenetische Veränderungen oder eine veränderte Chromatinstruktur. Dadurch können die räumliche Nähe zum Promotor gestört, TAD-Grenzen verschoben und eine fehlerhafte Genexpression ausgelöst werden (251-253). Da der Enhancer nur in geringem Maße auf PBMCs wirkt, war eine Expressionsanalyse von *SPRED1* mittels qPCR nicht sinnvoll (76).

Die Variante wurde, wie in 3.4.4 erklärt, mittels Touchdown-PCR validiert. Deutlich erkennbar ist die Differenz des PCR-Produkts der Probe des Patienten P12 und seiner Mutter zu der Probe des Vaters und der Kontrollprobe, womit die ca. 2,5 kbp große Deletion bewiesen wird. Dass die Bande der Mutter deutlich stärker zu sehen ist als die der anderen Proben, liegt an der eingebrachten DNA-Konzentration.

Die Bruchpunkte der Deletion des Patienten P12 und seiner Mutter wurden mittels Sanger-Sequenzierung bestimmt. Es ergab sich die 2450 bp große Deletion des Bereichs Chr15:38,126,637–38,129,085 bp, von dem die bislang in der Literatur beschriebene Deletion (esv3636189) 7 bp bzw. 2 bp entfernt liegt. Daraus kann eine tatsächliche Affektion des beschriebenen Enhancers geschlussfolgert werden (71, 76).

SPRED1 wirkt als Tumorsuppressor und negativer Regulator des RAS/MAPK-Signalwegs, indem es Neurofibromin, für das *NF1* kodiert, zur Plasmamembran rekrutiert. Dort fungiert Neurofibromin als RasGAP, wodurch Ras inaktiviert und der Signalweg gehemmt wird (255). Außerdem steuert SPRED1 die Mikro-RNA miR-126, die von Relevanz für die Homöostase leukämischer Stammzellen ist (256).

Keimbahnmutationen in *SPRED1*, die zu einem Funktionsverlust führen, verursachen das Legius-Syndrom (LS). Pathogene Varianten umfassen Missense-, Nonsense-, Frameshift- und Kopienzahlvarianten sowie regulatorische Deletionen – bisher jedoch nur im Promotorbereich (257). Das Spektrum der bekannten pathogenen Varianten wird regelmäßig durch neue Studien erweitert (258).

NF1 und LS sind sich klinisch und pathophysiologisch sehr ähnlich. Beide gehören zu den RASopathien, werden autosomal dominant vererbt und zeigen häufig multiple CALM sowie ggf. axilläre oder inguinale Hyperpigmentierungen (51). Das LS kann zudem mit Lernproblemen, Makrozephalie und Noonan-Syndrom-ähnlichen Dismorphien einhergehen (259). Bei dem Patienten P12, der bereits mit einem Jahr erkrankte, waren Lernverhalten und Pigmentierung noch nicht beurteilbar. Dies ist typisch für das frühe Erkrankungsstadium, in dem oft nur CALM als klinischer Hinweis auftreten (260).

Das LS ist seltener als NF1 und macht etwa 1 % der Fälle mit NF1-typischer Pigmentierung aus. Laut Legius et al. (2021) entwickeln LS-Patient*innen im Gegensatz zu NF1-Patient*innen keine Lisch-Knoten, Neurofibrome oder Optikusgliome. Bis 2021 war eine klare Abgrenzung anhand der *National Institutes of Health* (NIH)-Kriterien nicht möglich. Erst die aktualisierten Kriterien von Legius et al. (2021) erlauben eine Differenzierung. Das LS kann bei ≥ 6 CALM und einer pathogenen *SPRED1*-Variante diagnostiziert werden, nicht jedoch, wenn zusätzliche NF1-Kriterien wie ein Optikusgliom vorliegen (51). Für den Patienten P12 ist nach diesen Kriterien keine LS-Diagnose möglich. Jedoch ist aktueller Literatur eine kontroverse Diskussion über eine mögliche Krebsprädisposition durch das LS zu entnehmen (44, 259). Die jüngsten Änderungen zeigen die dynamische Entwicklung der Diagnosekriterien, eine künftige Erweiterung – etwa um eine Krebsprädisposition – ist denkbar.

Mutationen des *SPRED1*-Gens treten in ca. 2% aller somatischer Krebsproben auf, meist als Deletionen, trunkierende Mutationen und Missense-Mutationen. Im Zusammenhang mit dem LS wurde eine Krebs-Prädisposition für pädiatrische akute Leukämien, oft mit Verlust der Heterozygotie und verminderter *SPRED1*-Expression, beschrieben. Dies führt zu einer Überaktivierung des RAS/MAPK-Signalwegs und einer gesteigerter ERK-Phosphorylierung

(259). In chronisch myeloischen Leukämien ist der Verlust von *SPRED1* mit der Transformation von der chronischen in die beschleunigte Phase und Blastenkrise assoziiert (256). Auch in Melanomen wirkt *SPRED1* als Tumorsuppressor (259). Eine reduzierte Expression wurde zudem in Östrogenrezeptor-positivem Brustkrebs, HCC, oralen Plattenepithelkarzinomen und Magenkarzinomen nachgewiesen (259, 261). Ein Fallbericht beschreibt einen Jungen mit multiplen Basalzellkarzinomen und *SPRED1*-Keimbahnmutation (56). Zudem reguliert *SPRED1* die Proliferation neuronaler Stammzellen und spielt eine Rolle in der ZNS-Entwicklung (262), was eine Verbindung zu Optikusgliomen nahelegt.

Die aktuellen Kriterien des LS treffen nicht auf den Patienten P12 zu. Obwohl das LS primär mit gutartigen Veränderungen assoziiert ist, ist davon auszugehen, dass die Dysregulation von *SPRED1* die Anfälligkeit für andere RAS/MAPK-assoziierte Tumorerkrankungen erhöht. Möglich ist, dass eine Deletion im *SPRED1*-Enhancer sowohl die CALM als auch das Optikusgliom verursacht. Alternativ könnten beide Merkmale unabhängig von einander entstanden sein – mit den CALM als Ausdruck des LS und ungeklärter Ursache des Glioms. Weitere Studien sind nötig, um den Zusammenhang zwischen *SPRED1*-Keimbahnvarianten und Krebsprädispositionen des Kindesalters besser zu verstehen.

4.5 Einordnung der optischen Gesamt-Genomkartierung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Keimbahn von 29 pädiatrischen Patient*innen mittels WGOM auf das Vorliegen von für Krebserkrankungen prädisponierenden SVs untersucht.

KPSs können sich phänotypisch heterogen zeigen, weshalb genetische Untersuchungen bei der Diagnosestellung helfen können. Das Wissen um ein KPS kann zur früheren Detektion zweiter Malignome führen und die Auswahl der Therapie beeinflussen. Zudem kann eine genetische Testung der Familie erfolgen (56).

Die Patient*innen wurden nach den durch Jongmans et al. und Ripperger et al. publizierten Kriterien ausgewählt und entsprachen damit Kindern, für die ein zugrundeliegendes KPS besonders wahrscheinlich ist. Dabei besteht die Möglichkeit, dass sich, wie in 4.1.5 erläutert, klinische Anomalien und therapieassoziierte Toxizität erst nach einiger Zeit zeigen und zum Zeitpunkt der Untersuchung noch unauffällig sind, obwohl ein KPS vorliegt. Dementsprechend könnten Patient*innen nicht eingeschlossen worden sein, bei denen Anomalien erst im Verlauf auftraten. Außerdem unterliegen die Kriterien einer Reevaluation, die sich dem Stand der Forschung anpasst (57, 60). Wurde im WES bei den Patient*innen eine ursächliche genetische Variante nachgewiesen, wurden sie aus der Kohorte ausgeschlossen. Das bedeutet auch, dass kurze, pathogene oder wahrscheinlich pathogene SVs, die auch mittels NGS identifizierbar sind, in dieser Arbeit nicht detektiert werden konnten.

Die strengen Einschlusskriterien dieses Projekts führten zu einer im Verhältnis zu anderen Studien kleinen Kohorte, die 29 Patient*innen umfasste. Dadurch können viele Tumorentitäten des Kindes- und Jugendalters nicht abgebildet werden, von anderen Krebsarten wurden nur einzelne Fälle betrachtet, die keinen Rückschluss auf andere Patient*innen erlauben.

Die Methode des WGOM bietet einige Vorteile gegenüber zuvor durchgeführten Untersuchungen auf Keimbahnvarianten bei Kindern mit Krebserkrankungen, die in 5–10% der Fälle pathogene oder wahrscheinlich pathogene Varianten zeigten (12, 40–42, 72). Mittels WGOM können im Gegensatz zu WES intronische und intergenische SVs detektiert werden, die z. B. epigenetische Effekte haben. SVs, die deutlich größer als die mittels WGS und WES erkannten sind, können identifiziert werden. Außerdem ist WGOM besser geeignet, um balancierte SVs und SVs in komplexen und repetitiven DNA-Regionen zu detektieren. Möglich ist auch eine Erfassung von Mosaik-Varianten, die nur in einem Teil der Zellen der Keimbahn vorhanden sind, wenn die Größe und der Mosaikanteil hoch genug sind (56, 81, 83, 88, 263). Wurde eine Variante von zu wenigen Molekülen angezeigt, passierte sie die Filterkriterien nicht und wurde nicht erfasst. Hätte man die Filterkriterien dementsprechend angepasst, wären zu viele Artefakte aufgetreten, die eine Auswertung behindert hätten.

Limitationen von WGOM sind für Zentromer- und pseudoautosomale Regionen bekannt (263). Trotz der verbesserten Abdeckung großer, repetitiver Strukturen können nicht alle segmentalen Duplikationen oder komplexen Regionen abgedeckt werden. Da WGOM eine relativ neue

Technologie ist, gibt es noch nicht genügend Erfahrung, um alle Artefakte, die mit dieser Methode verbunden sind, vollständig zu verstehen und zu interpretieren. Umfassende Erfahrungen können zukünftig zu einer optimierten Anwendung des Verfahrens führen (88).

Die Analyse der mit WGOM gesammelten Daten erfordert spezialisierte bioinformatische Werkzeuge und Kenntnisse. Die Verfügbarkeit und Weiterentwicklung dieser Tools sind entscheidend für die effektive Nutzung der Methode (88).

Für WGOM musste ausreichend Ausgangsmaterial der Kinder und Eltern vorhanden sein, was insbesondere im Rahmen von Krebserkrankungen und Chemotherapien nicht selbstverständlich ist. Die Arbeit zeigt, dass eine Trio-Analyse in Fragen der Krebsprädisposition bei Kindern Aufschluss über Vererbung und *de novo* Entstehung der SVs geben kann. Mangels Verfügbarkeit des elterlichen Materials war dies leider nicht für alle in die Arbeit eingeschlossenen Patient*innen möglich. Bei vielen Patient*innen wäre weiterhin eine Expressionsanalyse der betrachteten Gene im Tumorgewebe interessant gewesen. Dies hätte jedoch den Rahmen der Arbeit überschritten und kann in zukünftigen Studien betrachtet werden.

Bei der Arbeit mit Datenbanken ist stets zu beachten, dass regelmäßig Updates erfolgen und der Grad, zu dem Daten validiert sind, veränderlich ist (67). Auch die Referenzgenome werden aktualisiert und vervollständigt, wodurch bisher unbekannte Gene und regulatorische Elemente identifiziert, die Genauigkeit der Erkennung der Varianten gesteigert und systematische Analysen auch repetitiver DNA-Regionen möglich werden (166). Je mehr Wissen wir über den Effekt genetischer Alterationen auf die zellulären Funktionen dazu gewinnen, desto mehr krebsprädisponierende Läsionen mit Einfluss auf bekannte und neu entdeckte KPGs können ermittelt werden. Dementsprechend ist denkbar, dass den im Rahmen dieser Arbeit detektierten SVs zum aktuellen Stand der Forschung keine krebsprädisponierende Bedeutung zugeschrieben wurde, diese jedoch in der Zukunft erkannt wird.

Letztendlich ist auch möglich, dass ein Teil der Patient*innen keine prädisponierende Keimbahnvariante trägt und andere Ursachen zur Krebsentstehung führten oder eine multigenische Veranlagung besteht. Studien zeigen einen signifikanten Einfluss der Kombination von Varianten in Genen mit geringer oder mittlerer Penetranz für die Krebsentstehung verglichen mit den häufig betrachteten KPGs mit hoher Penetranz (264). Auch um ihre Relevanz zu untersuchen sind weitere Forschungsprojekte erforderlich.

Aktuelle Studien zeigen außerdem eine Relevanz von DNA-Methylierungen von z. B. 5-Methylcytosin und 5-Hydroxymethylcytosin für die Krebsentstehung bei Kindern (265). Diese wurde in dieser Arbeit nicht beleuchtet und stellt eine weitere interessante Forschungsfrage für zukünftige Studien dar.

In zukünftigen Arbeiten könnte künstliche Intelligenz die Analyse und Interpretation von Varianten erleichtern.

WGOM ist in der Lage, strukturelle Varianten ab einer Größe von etwa 500 bp zu erkennen, während kleinere Varianten (SNV oder indels) möglicherweise nicht erfasst werden. Daher

sollte es nicht als alleinige Methode zur umfassenden genetischen Analyse verwendet werden (88). Auch für die Interpretation der SVs sind weiterhin Sequenziertechnologien notwendig, mit denen die exakten Bruchpunkte einer Variante ermittelt werden können.

Beide Methoden, WGOM und LRS, sind zur Detektion komplexer SVs geeignet, wobei mittels WGOM insbesondere großräumige Umlagerungen detektiert werden können und durch LRS eine direkte Sequenzanalyse möglich ist. Für eine präzise und umfassende Identifikation tumorprädisponierender SVs kann daher eine Kombination beider Methoden, ggf. mit Pangenom T2T-Analysen hilfreich und nach Optimierung von Artefakten und Kosten auch in größerem Ausmaß möglich sein (266).

Zukünftige Technologien können genutzt werden, um z. B. die *RASA4*- und *RASA4B*-Genloki sowie die Auswirkung der Deletion der Gene auf die Proteinexpression zu evaluieren. Molekulare Mechanismen und Omics-Ansätze können helfen, den Einfluss von SVs z. B. auf Signalwege zu verstehen. Mit Hilfe von *in vivo* Modellen können die biologischen Folgen der SVs untersucht werden. Damit kann eine Einstufung der SV als pathogen, wahrscheinlich pathogen, VUS, wahrscheinlich benigne oder benigne gelingen, das Grundverständnis der Ursache von Krebserkrankungen im Kindesalter erweitert und langfristig zu einer Optimierung von Diagnostik und Therapie beitragen werden.

Dieses Projekt zeigt die Relevanz der Betrachtung von SVs hinsichtlich einer möglichen Krebsprädisposition und dass WGOM zur Detektion potentiell tumorprädisponierender Keimbahnvarianten bei Kindern geeignet ist.

Das Untersuchungsspektrum prädisponierender genetischer Keimbahnvarianten wird durch diese Arbeit um strukturelle Varianten erweitert. Sie leistet einen Beitrag zum Verständnis der genetischen Grundlage von Krebserkrankungen im Kindesalter, was Relevanz für die zukünftige Diagnostik und Therapie hat.

Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Brown JS, Amend SR, Austin RH, Gatenby RA, Hammarlund EU, Pienta KJ. Updating the Definition of Cancer. *Mol Cancer Res.* 2023;21(11):1142-47. doi:10.1158/1541-7786.Mcr-23-0411
2. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31-46. doi:10.1158/2159-8290.Cd-21-1059
3. Behjati S, Gilbertson RJ, Pfister SM. Maturation Block in Childhood Cancer. *Cancer Discov.* 2021.
4. Huang R. Cancer Treatment Response Differences in Pediatric and Adult Cancers. *Highlights in Science, Engineering and Technology.* 2024;102:658-62. doi:10.54097/j8gxq228
5. Lam CG, Howard SC, Bouffet E, Pritchard-Jones K. Science and health for all children with cancer. *Science.* 2019;363(6432):1182-86. doi:10.1126/science.aaw4892
6. Huang J, Chan SC, Ngai CH, Lok V, Zhang L, Lucero-Prisno DE, 3rd, et al. Global incidence, mortality and temporal trends of cancer in children: A joinpoint regression analysis. *Cancer Med.* 2023;12(2):1903-11. doi:10.1002/cam4.5009
7. Kattner P, Strobel H, Khoshnevis N, Grunert M, Bartholomae S, Pruss M, et al. Compare and contrast: pediatric cancer versus adult malignancies. *Cancer Metastasis Rev.* 2019;38(4):673-82. doi:10.1007/s10555-019-09836-y
8. Botta L, Gatta G, Capocaccia R, Stiller C, Cañete A, Dal Maso L, et al. Long-term survival and cure fraction estimates for childhood cancer in Europe (EUROCare-6): results from a population-based study. *Lancet Oncol.* 2022;23(12):1525-36. doi:10.1016/s1470-2045(22)00637-4
9. Scholz-Kreisel P, Kaatsch P, Spix C, Schmidberger H, Marron M, Grabow D, et al. Second Malignancies Following Childhood Cancer Treatment in Germany From 1980 to 2014. *Dtsch Arztebl Int.* 2018;115(23):385-92. doi:10.3238/arztebl.2018.0385
10. Meadows AT, Friedman DL, Neglia JP, Mertens AC, Donaldson SS, Stovall M, et al. Second neoplasms in survivors of childhood cancer: findings from the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *J Clin Oncol.* 2009;27(14):2356-62. doi:10.1200/jco.2008.21.1920
11. Merchant TE, Pollack IF, Loeffler JS. Brain tumors across the age spectrum: biology, therapy, and late effects. *Semin Radiat Oncol.* 2010;20 1:58-66. doi:10.1016/j.semradonc.2009.09.005
12. Zhang J, Walsh MF, Wu G, Edmonson MN, Gruber TA, Easton J, et al. Germline Mutations in Predisposition Genes in Pediatric Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(24):2336-46. doi:10.1056/NEJMoa1508054
13. Supic G, Jagodic M, Magic Z. Epigenetics: a new link between nutrition and cancer. *Nutr Cancer.* 2013;65(6):781-92. doi:10.1080/01635581.2013.805794
14. Lewandowska AM, Rudzki M, Rudzki S, Lewandowski T, Laskowska B. Environmental risk factors for cancer - review paper. *Ann Agric Environ Med.* 2019;26(1):1-7. doi:10.26444/aaem/94299
15. Rumrich IK, Viluksela M, Vähäkangas K, Gissler M, Surcel HM, Hänninen O. Maternal Smoking and the Risk of Cancer in Early Life - A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016;11(11):e0165040. doi:10.1371/journal.pone.0165040
16. Rumgay H, Shield K, Charvat H, Ferrari P, Sornpaisarn B, Obot I, et al. Global burden of cancer in 2020 attributable to alcohol consumption: a population-based study. *Lancet Oncol.* 2021;22(8):1071-80. doi:10.1016/s1470-2045(21)00279-5
17. Avgerinos KI, Spyrou N, Mantzoros CS, Dalamaga M. Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. *Metabolism.* 2019;92:121-35. doi:10.1016/j.metabol.2018.11.001
18. Kumar A, Chinnathambi S, Kumar M, Pandian GN. Food Intake and Colorectal Cancer. *Nutr Cancer.* 2023;75(9):1710-42. doi:10.1080/01635581.2023.2242103
19. Amitay EL, Dubnov Raz G, Keinan-Boker L. Breastfeeding, Other Early Life Exposures and Childhood Leukemia and Lymphoma. *Nutr Cancer.* 2016;68(6):968-77. doi:10.1080/01635581.2016.1190020
20. Spector LG, Pankratz N, Marcotte EL. Genetic and nongenetic risk factors for childhood cancer. *Pediatr Clin North Am.* 2015;62(1):11-25. doi:10.1016/j.pcl.2014.09.013

21. Mohammadian Khonsari N, Shahrestanaki E, Ehsani A, Asadi S, Sokoty L, Mohammadpoor Nami S, et al. Association of childhood and adolescence obesity with incidence and mortality of adulthood cancers. A systematic review and meta-analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14:1069164. doi:10.3389/fendo.2023.1069164
22. de Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford GM. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Glob Health*. 2020;8(2):e180-e90. doi:10.1016/s2214-109x(19)30488-7
23. Marron M, Brackmann LK, Kuhse P, Christianson L, Langner I, Haug U, et al. Vaccination and the Risk of Childhood Cancer-A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Oncol*. 2020;10:610843. doi:10.3389/fonc.2020.610843
24. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(8):471-84. doi:10.1038/s41568-018-0015-6
25. Abalo KD, Rage E, Leuraud K, Richardson DB, Le Pointe HD, Laurier D, et al. Early life ionizing radiation exposure and cancer risks: systematic review and meta-analysis. *Pediatr Radiol*. 2021;51(1):45-56. doi:10.1007/s00247-020-04803-0
26. Domingues A, Moore KJ, Sample J, Kharoud H, Marcotte EL, Spector LG. Parental Age and Childhood Lymphoma and Solid Tumor Risk: A Literature Review and Meta-Analysis. *JNCI Cancer Spectr*. 2022;6(3). doi:10.1093/jncics/pkac040
27. Kehm RD, Spector LG, Poynter JN, Vock DM, Osypuk TL. Socioeconomic Status and Childhood Cancer Incidence: A Population-Based Multilevel Analysis. *Am J Epidemiol*. 2018;187(5):982-91. doi:10.1093/aje/kwx322
28. Buser JM, Lake K, Ginier E. Environmental Risk Factors for Childhood Cancer in an Era of Global Climate Change: A Scoping Review. *J Pediatr Health Care*. 2022;36(1):46-56. doi:10.1016/j.pedhc.2021.05.005
29. Landrigan PJ, Raps H, Cropper M, Bald C, Brunner M, Canonizado EM, et al. The Minderoo-Monaco Commission on Plastics and Human Health. *Ann Glob Health*. 2023;89(1):23. doi:10.5334/aogh.4056
30. Kühlen M, Taeubner J, Brozou T, Wiczorek D, Siebert R, Borkhardt A. Family-based germline sequencing in children with cancer. *Oncogene*. 2019;38(9):1367-80. doi:10.1038/s41388-018-0520-9
31. Nenclares P, Harrington KJ. The biology of cancer. *Medicine*. 2020;48(2):67-72. doi:10.1016/j.mpmed.2019.11.001
32. Kontomanolis EN, Koutras A, Syllaios A, Schizas D, Mastoraki A, Garmpis N, et al. Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: A review. *Anticancer Res*. 2020;40(11):6009-15. doi:10.21873/anticancer.14622
33. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9
34. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
35. Coussens LM, Jacks T. Genetic and cellular mechanisms of oncogenesis. *Curr Opin Genet Dev*. 2008;18(1):1-2. doi:10.1016/j.gde.2008.04.001
36. Gallon R, Phelps R, Hayes C, Brugieres L, Guerrini-Rousseau L, Colas C, et al. Constitutional Microsatellite Instability, Genotype, and Phenotype Correlations in Constitutional Mismatch Repair Deficiency. *Gastroenterology*. 2023;164(4):579-92.e8. doi:10.1053/j.gastro.2022.12.017
37. Kratz CP, Jongmans MC, Cavé H, Wimmer K, Behjati S, Guerrini-Rousseau L, et al. Predisposition to cancer in children and adolescents. *Lancet Child Adolesc Health*. 2021;5(2):142-54. doi:10.1016/s2352-4642(20)30275-3
38. Varan A, Kebudi R. Secondary malignant neoplasms after childhood cancer. *Pediatr Hematol Oncol*. 2011;28(5):345-53. doi:10.3109/08880018.2011.553879
39. Brozou T, Taeubner J, Velleuer E, Dugas M, Wiczorek D, Borkhardt A, et al. Genetic predisposition in children with cancer - affected families' acceptance of Trio-WES. *Eur J Pediatr*. 2018;177(1):53-60. doi:10.1007/s00431-017-2997-6
40. Gröbner SN, Worst BC, Weischenfeldt J, Buchhalter I, Kleinheinz K, Rudneva VA, et al. The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature*. 2018;555(7696):321-27. doi:10.1038/nature25480

41. Wagener R, Taeubner J, Walter C, Yasin L, Alzoubi D, Bartenhagen C, et al. Comprehensive germline-genomic and clinical profiling in 160 unselected children and adolescents with cancer. *Eur J Hum Genet.* 2021;29(8):1301-11. doi:10.1038/s41431-021-00878-x
42. Akhavanfard S, Padmanabhan R, Yehia L, Cheng F, Eng C. Comprehensive germline genomic profiles of children, adolescents and young adults with solid tumors. *Nature Communications.* 2020;11(1). doi:10.1038/s41467-020-16067-1
43. Capellini A, Williams M, Onel K, Huang KL. The Functional Hallmarks of Cancer Predisposition Genes. *Cancer Manag Res.* 2021;13:4351-57. doi:10.2147/cmar.S311548
44. Brodeur GM, Diller LR, Nichols KE, Plon SE, Porter CC, Malkin D. Pediatric Cancer Predisposition and Surveillance Update: Summary Perspective and Future Directions. *Clin Cancer Res.* 2025. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-25-0423
45. Hafner A, Bulyk ML, Jambhekar A, Lahav G. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(4):199-210. doi:10.1038/s41580-019-0110-x
46. Gargallo P, Yáñez Y, Segura V, Juan A, Torres B, Balaguer J, et al. Li-Fraumeni syndrome heterogeneity. *Clin Transl Oncol.* 2020;22(7):978-88. doi:10.1007/s12094-019-02236-2
47. Frebourg T, Bajalica Lagercrantz S, Oliveira C, Magenheimer R, Evans DG. Guidelines for the Li-Fraumeni and heritable TP53-related cancer syndromes. *Eur J Hum Genet.* 2020;28(10):1379-86. doi:10.1038/s41431-020-0638-4
48. McBride KA, Ballinger ML, Killick E, Kirk J, Tattersall MH, Eeles RA, et al. Li-Fraumeni syndrome: cancer risk assessment and clinical management. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014;11(5):260-71. doi:10.1038/nrclinonc.2014.41
49. Light N, Layeghifard M, Attery A, Subasri V, Zatzman M, Anderson ND, et al. Germline TP53 mutations undergo copy number gain years prior to tumor diagnosis. *Nat Commun.* 2023;14(1):77. doi:10.1038/s41467-022-35727-y
50. Tamura R. Current Understanding of Neurofibromatosis Type 1, 2, and Schwannomatosis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11). doi:10.3390/ijms22115850
51. Legius E, Messiaen L, Wolkenstein P, Pancza P, Avery RA, Berman Y, et al. Revised diagnostic criteria for neurofibromatosis type 1 and Legius syndrome: an international consensus recommendation. *Genet Med.* 2021;23(8):1506-13. doi:10.1038/s41436-021-01170-5
52. Brioude F, Kalish JM, Mussa A, Foster AC, Bliet J, Ferrero GB, et al. Expert consensus document: Clinical and molecular diagnosis, screening and management of Beckwith-Wiedemann syndrome: an international consensus statement. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;14(4):229-49. doi:10.1038/nrendo.2017.166
53. Brodeur GM, Nichols KE, Plon SE, Schiffman JD, Malkin D. Pediatric Cancer Predisposition and Surveillance: An Overview, and a Tribute to Alfred G. Knudson Jr. *Clin Cancer Res.* 2017;23(11):e1-e5. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-17-0702
54. Gastberger K, Fincke VE, Mucha M, Siebert R, Hasselblatt M, Frühwald MC. Current Molecular and Clinical Landscape of ATRT - The Link to Future Therapies. *Cancer Manag Res.* 2023;15:1369-93. doi:10.2147/cmar.S379451
55. Stoltze U, Junk SV, Byrjalsen A, Cavé H, Cazzaniga G, Elitzur S, et al. Overt and covert genetic causes of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2025;39(5):1031-45. doi:10.1038/s41375-025-02535-4
56. Diets IJ, Waanders E, Ligtenberg MJ, van Bladel DAG, Kamping EJ, Hoogerbrugge PM, et al. High Yield of Pathogenic Germline Mutations Causative or Likely Causative of the Cancer Phenotype in Selected Children with Cancer. *Clin Cancer Res.* 2018;24(7):1594-603. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-17-1725
57. Jongmans MC, Loeffen JL, Waanders E, Hoogerbrugge PM, Ligtenberg MJ, Kuiper RP, et al. Recognition of genetic predisposition in pediatric cancer patients: An easy-to-use selection tool. *Eur J Med Genet.* 2016;59(3):116-25. doi:10.1016/j.ejmg.2016.01.008
58. Knapke S, Nagarajan R, Correll J, Kent D, Burns K. Hereditary cancer risk assessment in a pediatric oncology follow-up clinic. *Pediatr Blood Cancer.* 2012;58(1):85-9. doi:10.1002/pbc.23283

59. Merks JH, Caron HN, Hennekam RC. High incidence of malformation syndromes in a series of 1,073 children with cancer. *Am J Med Genet A*. 2005;134a(2):132-43. doi:10.1002/ajmg.a.30603
60. Ripperger T, Bielack SS, Borkhardt A, Brecht IB, Burkhardt B, Calaminus G, et al. Childhood cancer predisposition syndromes-A concise review and recommendations by the Cancer Predisposition Working Group of the Society for Pediatric Oncology and Hematology. *Am J Med Genet A*. 2017;173(4):1017-37. doi:10.1002/ajmg.a.38142
61. Wimmer K, Etzler J. Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome: have we so far seen only the tip of an iceberg? *Hum Genet*. 2008;124(2):105-22. doi:10.1007/s00439-008-0542-4
62. Bhatia S, Sklar C. Second cancers in survivors of childhood cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(2):124-32. doi:10.1038/nrc722
63. Kehrer-Sawatzki H, Mautner VF, Cooper DN. Emerging genotype-phenotype relationships in patients with large NF1 deletions. *Hum Genet*. 2017;136(4):349-76. doi:10.1007/s00439-017-1766-y
64. Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74. doi:10.1038/nature15393
65. Yang L. A Practical Guide for Structural Variation Detection in the Human Genome. *Curr Protoc Hum Genet*. 2020;107(1):e103. doi:10.1002/cphg.103
66. Cosenza MR, Rodriguez-Martin B, Korbel JO. Structural Variation in Cancer: Role, Prevalence, and Mechanisms. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2022;23:123-52. doi:10.1146/annurev-genom-120121-101149
67. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-24. doi:10.1038/gim.2015.30
68. Ho SS, Urban AE, Mills RE. Structural variation in the sequencing era. *Nat Rev Genet*. 2020;21(3):171-89. doi:10.1038/s41576-019-0180-9
69. Spielmann M, Lupiáñez DG, Mundlos S. Structural variation in the 3D genome. *Nat Rev Genet*. 2018;19(7):453-67. doi:10.1038/s41576-018-0007-0
70. Lappalainen I, Lopez J, Skipper L, Hefferon T, Spalding JD, Garner J, et al. DbVar and DGVA: public archives for genomic structural variation. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):D936-41. doi:10.1093/nar/gks1213
71. MacDonald JR, Ziman R, Yuen RK, Feuk L, Scherer SW. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D986-92. doi:10.1093/nar/gkt958
72. Byrjalsen A, Hansen TVO, Stoltze UK, Mehrjouy MM, Barnkob NM, Hjalgrim LL, et al. Nationwide germline whole genome sequencing of 198 consecutive pediatric cancer patients reveals a high incidence of cancer prone syndromes. *PLoS Genet*. 2020;16(12):e1009231. doi:10.1371/journal.pgen.1009231
73. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol*. 2021;82(11):801-11. doi:10.1016/j.humimm.2021.02.012
74. Mahmoud M, Gobet N, Cruz-Dávalos DI, Mounier N, Dessimoz C, Sedlazeck FJ. Structural variant calling: the long and the short of it. *Genome Biol*. 2019;20(1):246. doi:10.1186/s13059-019-1828-7
75. Eichler EE. Genetic Variation, Comparative Genomics, and the Diagnosis of Disease. *N Engl J Med*. 2019;381(1):64-74. doi:10.1056/NEJMra1809315
76. Fishilevich S, Nudel R, Rappaport N, Hadar R, Plaschkes I, Iny Stein T, et al. GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards. *Database (Oxford)*. 2017;2017. doi:10.1093/database/bax028
77. Della Rosa M, Spivakov M. Silencers in the spotlight. *Nat Genet*. 2020;52(3):244-45. doi:10.1038/s41588-020-0583-8
78. Korbel JO, Urban AE, Affourtit JP, Godwin B, Grubert F, Simons JF, et al. Paired-end mapping reveals extensive structural variation in the human genome. *Science*. 2007;318(5849):420-6. doi:10.1126/science.1149504

79. Wagener R, Brandes D, Jung M, Huetzen MA, Bergmann AK, Panier S, et al. Optical genome mapping identifies structural variants in potentially new cancer predisposition candidate genes in pediatric cancer patients. *Int J Cancer*. 2024;154(4):607-14. doi:10.1002/ijc.34721
80. Jacobs PA, Baikie AG, Court Brown WM, Strong JA. The somatic chromosomes in mongolism. *Lancet*. 1959;1(7075):710. doi:10.1016/s0140-6736(59)91892-6
81. Escaramís G, Docampo E, Rabionet R. A decade of structural variants: description, history and methods to detect structural variation. *Brief Funct Genomics*. 2015;14(5):305-14. doi:10.1093/bfgp/elv014
82. Bayani J, Squire JA. Fluorescence in situ Hybridization (FISH). *Curr Protoc Cell Biol*. 2004;Chapter 22:Unit 22.4. doi:10.1002/0471143030.cb2204s23
83. Nakagawa H, Fujita M. Whole genome sequencing analysis for cancer genomics and precision medicine. *Cancer Sci*. 2018;109(3):513-22. doi:10.1111/cas.13505
84. Chaisson MJP, Sanders AD, Zhao X, Malhotra A, Porubsky D, Rausch T, et al. Multi-platform discovery of haplotype-resolved structural variation in human genomes. *Nat Commun*. 2019;10(1):1784. doi:10.1038/s41467-018-08148-z
85. Dixon JR, Xu J, Dileep V, Zhan Y, Song F, Le VT, et al. Integrative detection and analysis of structural variation in cancer genomes. *Nat Genet*. 2018;50(10):1388-98. doi:10.1038/s41588-018-0195-8
86. Wang B, Jia P, Gao S, Zhao H, Zheng G, Xu L, et al. Long and Accurate: How HiFi Sequencing is Transforming Genomics. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2025;23(1). doi:10.1093/gpbjnl/qzaf003
87. Sakamoto Y, Sereewattanawoot S, Suzuki A. A new era of long-read sequencing for cancer genomics. *J Hum Genet*. 2020;65(1):3-10. doi:10.1038/s10038-019-0658-5
88. Dremsek P, Schwarz T, Weil B, Malashka A, Laccone F, Neesen J. Optical Genome Mapping in Routine Human Genetic Diagnostics-Its Advantages and Limitations. *Genes (Basel)*. 2021;12(12). doi:10.3390/genes12121958
89. Broeckel U, Iqbal MA, Levy B, Sahajpal N, Nagy PL, Scharer G, et al. Detection of Constitutional Structural Variants by Optical Genome Mapping: A Multisite Study of Postnatal Samples. *J Mol Diagn*. 2024;26(3):213-26. doi:10.1016/j.jmoldx.2023.12.003
90. Fischer U, Yasin L, Täubner J, Brozou T, Borkhardt A. Family Trio-Based Whole Genome Optical Mapping Identifies Candidate Structural Variations Predisposing Children to Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. 2019;134(Suppl 1):5201. doi:10.1182/blood-2019-130014
91. Malone ET, Ganther S, Mena N, Radaic A, Shariati K, Kindberg A, et al. Treponema denticola-Induced RASA4 Upregulation Mediates Cytoskeletal Dysfunction and MMP-2 Activity in Periodontal Fibroblasts. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:671968. doi:10.3389/fcimb.2021.671968
92. Chan S, Lam E, Saghbini M, Bocklandt S, Hastie A, Cao H, et al. Structural Variation Detection and Analysis Using Bionano Optical Mapping. *Methods Mol Biol*. 2018;1833:193-203. doi:10.1007/978-1-4939-8666-8_16
93. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968;97:77-89.
94. Bionano Genomics Inc. Bionano Prep SP Frozen Human Blood DNA Isolation Protocol [Internet]. San Diego, CA, USA: 2020. verfügbar unter: <https://bionano.com/>
95. Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). Qubit™ dsDNA BR Assay Kit: User Guide [Internet]. Carlsbad, CA, USA: 2020. verfügbar unter: <https://documents.thermofisher.com/>
96. Bionano Genomics Inc. Bionano Prep Direct Label and Stain DLS Protocol [Internet]. San Diego, CA, USA: 2019. verfügbar unter: <https://bionano.com/>
97. Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). Qubit™ dsDNA HS Assay Kit: User Guide [Internet]. Carlsbad, CA, USA: 2020. verfügbar unter: <https://documents.thermofisher.com/>
98. Bionano Genomics Inc. Saphyr System User Guide [Internet]. San Diego, CA, USA: 2018. verfügbar unter: <https://bionano.com/>
99. Bionano Genomics Inc. Molecule Quality Report Guidelines [Internet]. San Diego, CA, USA: 2020. verfügbar unter: <https://bionano.com/>

100. Bionano Genomics Inc. Bionano Genomics [Internet]. San Diego, CA, USA: Bionano Genomics; 2023 updated 2023; cited 2023. verfügbar unter: <https://bionano.com/>
101. Bionano Genomics Inc. Bionano Access® Software User Guide [Internet]. San Diego, CA, USA: 2021. verfügbar unter: <https://bionano.com/>
102. Bionano Genomics Inc. Bionano Solve Theory of Operation: Structural Variant Calling [Internet]. San Diego, CA, USA: 2021. verfügbar unter: <https://bionano.com/>
103. Bionano Genomics Inc. Bionano Solve Theory of Operation: Variant Annotation Pipeline [Internet]. San Diego, CA, USA: 2021. verfügbar unter: <https://bionano.com/>
104. O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciufo S, Haddad D, McVeigh R, et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D733-45. doi:10.1093/nar/gkv1189
105. Morales J, Pujar S, Loveland JE, Astashyn A, Bennett R, Berry A, et al. A joint NCBI and EMBL-EBI transcript set for clinical genomics and research. *Nature.* 2022;604(7905):310-15. doi:10.1038/s41586-022-04558-8
106. Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, et al. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature.* 2010;464(7289):704-12. doi:10.1038/nature08516
107. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 2002;12(6):996-1006. doi:10.1101/gr.229102
108. Fernández JM, de la Torre V, Richardson D, Royo R, Puiggròs M, Moncunill V, et al. The BLUEPRINT Data Analysis Portal. *Cell Syst.* 2016;3(5):491-95.e5. doi:10.1016/j.cels.2016.10.021
109. Kühlen M, Borkhardt A. Trio sequencing in pediatric cancer and clinical implications. *EMBO Mol Med.* 2018;10(4). doi:10.15252/emmm.201708641
110. Godley LA, Shimamura A. Genetic predisposition to hematologic malignancies: management and surveillance. *Blood.* 2017;130(4):424-32. doi:10.1182/blood-2017-02-735290
111. Huang KL, Mashl RJ, Wu Y, Ritter DI, Wang J, Oh C, et al. Pathogenic Germline Variants in 10,389 Adult Cancers. *Cell.* 2018;173(2):355-70.e14. doi:10.1016/j.cell.2018.03.039
112. Consortium U. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(D1):D523-d31. doi:10.1093/nar/gkac1052
113. Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, et al. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2016;54:1.30.1-1.30.33. doi:10.1002/cpbi.5
114. Sayers EW, Bolton EE, Brister JR, Canese K, Chan J, Comeau DC, et al. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(D1):D20-26. doi:10.1093/nar/gkab1112
115. Rappaport N, Twik M, Plaschkes I, Nudel R, Iny Stein T, Levitt J, et al. MalaCards: an amalgamated human disease compendium with diverse clinical and genetic annotation and structured search. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D877-87. doi:10.1093/nar/gkw1012
116. Karlsson M, Zhang C, Méar L, Zhong W, Digre A, Katona B, et al. A single-cell type transcriptomics map of human tissues [Internet]. 2021 updated; cited 2021. doi:10.1126/sciadv.abh2169. verfügbar unter: <https://www.proteinatlas.org/>
117. Gíslason MH, Demircan GS, Prachar M, Furtwängler B, Schwaller J, Schoof Erwin M, et al. BloodSpot 3.0: a database of gene and protein expression data in normal and malignant haematopoiesis. *Nucleic Acids Res.* 2023;52(D1):D1138-D42. doi:10.1093/nar/gkad993
118. Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, Kawashima M, Ishiguro-Watanabe M. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(D1):D587-d92. doi:10.1093/nar/gkac963
119. Köhler S, Gargano M, Matentzoglou N, Carmody LC, Lewis-Smith D, Vasilevsky NA, et al. The Human Phenotype Ontology in 2021. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(D1):D1207-d17. doi:10.1093/nar/gkaa1043
120. National Library of Medicine U. PubMed: National Center for Biotechnology Information [Internet]. Bethesda, MD, USA: National Library of Medicine; 2021 updated; cited. verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>

121. QIAGEN. RNeasy Mini Handbook [Internet]. Hilden, Germany: 2020. verfügbar unter: <https://www.qiagen.com>
122. Thermo Fisher Scientific. NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer User Guide [Internet]. Waltham, MA, USA: 2020. verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/nanodrop>
123. Brown T. Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction. 7th ed. ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2016.
124. Nippon Genetics Europe. Midori Green Advance DNA Stain – Safety Report [Internet]. Düren, Germany: 2020. verfügbar unter: <https://www.nippongenetics.eu/app/uploads/safety-report-midori-green-advance-1.pdf>
125. QIAGEN. QIAquick Gel Extraction Kit Handbook [Internet]. Hilden, Germany: 2020. verfügbar unter: <https://www.qiagen.com>
126. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;6(10):986-94. doi:10.1101/gr.6.10.986
127. Promega. GoTaq® qPCR Master Mix, Technical Manual [Internet]. Madison, WI, USA: 2024. verfügbar unter: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/gotaq-qpcr-master-mix-protocol.pdf>
128. Wang J, Pan X, Liang X. Assessment for Melting Temperature Measurement of Nucleic Acid by HRM. *J Anal Methods Chem.* 2016;2016:5318935. doi:10.1155/2016/5318935
129. Picard D, Felsberg J, Langini M, Stachura P, Qin N, Macas J, et al. Integrative multi-omics reveals two biologically distinct groups of pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol.* 2023;146(4):551-64. doi:10.1007/s00401-023-02626-5
130. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114-20. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
131. Illumina Inc. Bcl2fastq Conversion Software v2.19.0 [Internet]. Version 2.19.0. San Diego, CA: Illumina; 2019. verfügbar unter: <https://support.illumina.com/>
132. Church DM, Schneider VA, Graves T, Auger K, Cunningham F, Bouk N, et al. Modernizing reference genome assemblies. *PLoS Biol.* 2011;9(7):e1001091. doi:10.1371/journal.pbio.1001091
133. Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics.* 2010;26(6):841-2. doi:10.1093/bioinformatics/btq033
134. Lindenbaum P. bamstats04: Coverage statistics for a BED file [Internet]. Version 04. 2019. verfügbar unter: <https://lindenb.github.io/jvarkit/BamStats04.html>
135. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res.* 2012;22(3):568-76. doi:10.1101/gr.129684.111
136. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010;20(9):1297-303. doi:10.1101/gr.107524.110
137. Rimmer A, Phan H, Mathieson I, Iqbal Z, Twigg SRF, Wilkie AOM, et al. Integrating mapping-, assembly- and haplotype-based approaches for calling variants in clinical sequencing applications. *Nat Genet.* 2014;46(8):912-18. doi:10.1038/ng.3036
138. McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GR, Thormann A, et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol.* 2016;17(1):122. doi:10.1186/s13059-016-0974-4
139. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D941-d47. doi:10.1093/nar/gky1015
140. Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, Church DM, et al. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D980-5. doi:10.1093/nar/gkt1113
141. Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat.* 2002;19(6):607-14. doi:10.1002/humu.10081
142. Fokkema I, Kroon M, López Hernández JA, Asscheman D, Lugtenburg I, Hoogenboom J, et al. The LOVD3 platform: efficient genome-wide sharing of genetic variants. *Eur J Hum Genet.* 2021;29(12):1796-803. doi:10.1038/s41431-021-00959-x

143. Koop BF, Rowen L, Wang K, Kuo CL, Seto D, Lenstra JA, et al. The human T-cell receptor TCRAC/TCRDC (C alpha/C delta) region: organization, sequence, and evolution of 97.6 kb of DNA. *Genomics*. 1994;19(3):478-93. doi:10.1006/geno.1994.1097
144. Boomsma DI, Wijmenga C, Slagboom EP, Swertz MA, Karssen LC, Abdellaoui A, et al. The Genome of the Netherlands: design, and project goals. *Eur J Hum Genet*. 2014;22(2):221-7. doi:10.1038/ejhg.2013.118
145. Chen S, Francioli LC, Goodrich JK, Collins RL, Kanai M, Wang Q, et al. A genomic mutational constraint map using variation in 76,156 human genomes. *Nature*. 2024;625(7993):92-100. doi:10.1038/s41586-023-06045-0
146. Mills RE, Walter K, Stewart C, Handsaker RE, Chen K, Alkan C, et al. Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. *Nature*. 2011;470(7332):59-65. doi:10.1038/nature09708
147. Cunningham F, Allen JE, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, et al. Ensembl 2022. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(D1):D988-d95. doi:10.1093/nar/gkab1049
148. Gudgeon J, Marín-Rubio JL, Trost M. The role of macrophage scavenger receptor 1 (MSR1) in inflammatory disorders and cancer. *Front Immunol*. 2022;13:1012002. doi:10.3389/fimmu.2022.1012002
149. Vibhakkar R, Foltz G, Yoon JG, Field L, Lee H, Ryu GY, et al. Dickkopf-1 is an epigenetically silenced candidate tumor suppressor gene in medulloblastoma. *Neuro Oncol*. 2007;9(2):135-44. doi:10.1215/15228517-2006-038
150. Aihara Y, Chiba K, Eguchi S, Amano K, Kawamata T. Pediatric Optic Pathway/Hypothalamic Glioma. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2018;58(1):1-9. doi:10.2176/nmc.ra.2017-0081
151. Erdmann F KP, Grabow D, Spix C. Annual report 2019 (1980–2018) [Internet]. Johannes Gutenberg University Mainz; 2021. verfügbar unter: https://www.kinderkrebsregister.de/fileadmin/kliniken/dkkkr/pdf/jb/jb2019/Buch_DKKR_Jahresbericht_2019_komplett.pdf
152. Liu Z, Yang Q, Cai N, Jin L, Zhang T, Chen X. Enigmatic Differences by Sex in Cancer Incidence: Evidence From Childhood Cancers. *Am J Epidemiol*. 2019;188(6):1130-35. doi:10.1093/aje/kwz058
153. Dunford A, Weinstock DM, Savova V, Schumacher SE, Cleary JP, Yoda A, et al. Tumor-suppressor genes that escape from X-inactivation contribute to cancer sex bias. *Nat Genet*. 2017;49(1):10-16. doi:10.1038/ng.3726
154. Clocchiatti A, Cora E, Zhang Y, Dotto GP. Sexual dimorphism in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(5):330-9. doi:10.1038/nrc.2016.30
155. Marcotte EL, Schraw JM, Desrosiers TA, Nembhard WN, Langlois PH, Canfield MA, et al. Male Sex and the Risk of Childhood Cancer: The Mediating Effect of Birth Defects. *JNCI Cancer Spectr*. 2020;4(5):pkaa052. doi:10.1093/jncics/pkaa052
156. Gillani R, Collins RL, Crowdis J, Garza A, Jones JK, Walker M, et al. Rare germline structural variants increase risk for pediatric solid tumors. *bioRxiv*. 2024. doi:10.1101/2024.04.27.591484
157. Müller P, Velazquez Camacho O, Yazbeck AM, Wölwer C, Zhai W, Schumacher J, et al. Why loss of Y? A pan-cancer genome analysis of tumors with loss of Y chromosome. *Comput Struct Biotechnol J*. 2023;21:1573-83. doi:10.1016/j.csbj.2023.02.024
158. Hauer J, Fischer U, Borkhardt A. Toward prevention of childhood ALL by early-life immune training. *Blood*. 2021;138(16):1412-28. doi:10.1182/blood.2020009895
159. Birch JM, Blair V. The epidemiology of infant cancers. *Br J Cancer Suppl*. 1992;18:S2-4.
160. Kentsis A. Toward a Unified Theory of Why Young People Develop Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2024;14(10). doi:10.1101/cshperspect.a041658
161. Sherman RM, Salzberg SL. Pan-genomics in the human genome era. *Nat Rev Genet*. 2020;21(4):243-54. doi:10.1038/s41576-020-0210-7
162. Köroğlu Ç, Chen P, Taurig M, Altok S, Bogardus C, Baier LJ. De Novo Genome Assemblies From Two Indigenous Americans from Arizona Identify New Polymorphisms in Non-Reference Sequences. *Genome Biol Evol*. 2024;16(9). doi:10.1093/gbe/evae188
163. Liu QL, Shi L, Wang K. Ethnicity-Specific Reference Genome Assembly by Long-Read Sequencing. *J Mol Genet Med*. 2018;12. doi: 10.4172/1747-0862.1000385

164. Tishkoff SA, Reed FA, Friedlaender FR, Ehret C, Ranciaro A, Froment A, et al. The genetic structure and history of Africans and African Americans. *Science*. 2009;324(5930):1035-44. doi:10.1126/science.1172257
165. Reich D. *Who We Are And How We Got Here: Ancient DNA and the New Science of the Human Past*. Oxford: Oxford University Press; 2018.
166. Logsdon GA, Ebert P, Audano PA, Loftus M, Porubsky D, Ebler J, et al. Complex genetic variation in nearly complete human genomes. *bioRxiv*. 2024. doi:10.1101/2024.09.24.614721
167. Friedrich UA, Bienias M, Zinke C, Prazenicova M, Lohse J, Jahn A, et al. A clinical screening tool to detect genetic cancer predisposition in pediatric oncology shows high sensitivity but can miss a substantial percentage of affected children. *Genet Med*. 2023;25(8):100875. doi:10.1016/j.gim.2023.100875
168. Bakhuizen JJ, van Dijk F, Koudijs MJ, Bladergroen RS, Bon SBB, Hopman SMJ, et al. Comparison of clinical selection-based genetic testing with phenotype-agnostic extensive germline sequencing to diagnose genetic predisposition in children with cancer: a prospective diagnostic study. *Lancet Child Adolesc Health*. 2024;8(10):751-61. doi:10.1016/s2352-4642(24)00144-5
169. Pócza T, Grolmusz VK, Papp J, Butz H, Patócs A, Bozsik A. Germline Structural Variations in Cancer Predisposition Genes. *Front Genet*. 2021;12:634217. doi:10.3389/fgene.2021.634217
170. Fujimoto A, Wong JH, Yoshii Y, Akiyama S, Tanaka A, Yagi H, et al. Whole-genome sequencing with long reads reveals complex structure and origin of structural variation in human genetic variations and somatic mutations in cancer. *Genome Med*. 2021;13(1):65. doi:10.1186/s13073-021-00883-1
171. Kidd JM, Graves T, Newman TL, Fulton R, Hayden HS, Malig M, et al. A human genome structural variation sequencing resource reveals insights into mutational mechanisms. *Cell*. 2010;143(5):837-47. doi:10.1016/j.cell.2010.10.027
172. Krüger S, Kinzel M, Walldorf C, Gottschling S, Bier A, Tinschert S, et al. Homozygous PMS2 germline mutations in two families with early-onset haematological malignancy, brain tumours, HNPCC-associated tumours, and signs of neurofibromatosis type 1. *Eur J Hum Genet*. 2008;16(1):62-72. doi:10.1038/sj.ejhg.5201923
173. Park S, Supek F, Lehner B. Systematic discovery of germline cancer predisposition genes through the identification of somatic second hits. *Nat Commun*. 2018;9(1):2601. doi:10.1038/s41467-018-04900-7
174. Miller DB, Piccolo SR. Compound Heterozygous Variants in Pediatric Cancers: A Systematic Review. *Front Genet*. 2020;11:493. doi:10.3389/fgene.2020.00493
175. Van den Eynden J, Basu S, Larsson E. Somatic Mutation Patterns in Hemizygous Genomic Regions Unveil Purifying Selection during Tumor Evolution. *PLoS Genet*. 2016;12(12):e1006506. doi:10.1371/journal.pgen.1006506
176. Enculescu M, Braun S, Thonta Setty S, Busch A, Zarnack K, König J, et al. Exon Definition Facilitates Reliable Control of Alternative Splicing in the RON Proto-Oncogene. *Biophys J*. 2020;118(8):2027-41. doi:10.1016/j.bpj.2020.02.022
177. Shenasa H, Bentley DL. Pre-mRNA splicing and its cotranscriptional connections. *Trends Genet*. 2023;39(9):672-85. doi:10.1016/j.tig.2023.04.008
178. Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR. Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2009;10:451-81. doi:10.1146/annurev.genom.9.081307.164217
179. Chiang HL, Chen YT, Su JY, Lin HN, Yu CA, Hung YJ, et al. Mechanism and modeling of human disease-associated near-exon intronic variants that perturb RNA splicing. *Nat Struct Mol Biol*. 2022;29(11):1043-55. doi:10.1038/s41594-022-00844-1
180. Chen F, Zhang Y, Sedlazeck FJ, Creighton CJ. Germline structural variation globally impacts the cancer transcriptome including disease-relevant genes. *Cell Rep Med*. 2024;5(3):101446. doi:10.1016/j.xcrm.2024.101446
181. Allou L, Mundlos S. Disruption of regulatory domains and novel transcripts as disease-causing mechanisms. *Bioessays*. 2023;45(10):e2300010. doi:10.1002/bies.202300010
182. Vicente-García C, Villarejo-Balcells B, Irastorza-Azcárate I, Naranjo S, Acemel RD, Tena JJ, et al. Regulatory landscape fusion in rhabdomyosarcoma through interactions

- between the PAX3 promoter and FOXO1 regulatory elements. *Genome Biol.* 2017;18(1):106. doi:10.1186/s13059-017-1225-z
183. Porubsky D, Dashnow H, Sasani TA, Logsdon GA, Hallast P, Noyes MD, et al. Human de novo mutation rates from a four-generation pedigree reference. *Nature.* 2025;643(8071):427-36. doi:10.1038/s41586-025-08922-2
 184. Sim GK, Yagüe J, Nelson J, Marrack P, Palmer E, Augustin A, et al. Primary structure of human T-cell receptor alpha-chain. *Nature.* 1984;312(5996):771-5. doi:10.1038/312771a0
 185. Aisenberg AC, Krontiris TG, Mak TW, Wilkes BM. Rearrangement of the gene for the beta chain of the T-cell receptor in T-cell chronic lymphocytic leukemia and related disorders. *N Engl J Med.* 1985;313(9):529-33. doi:10.1056/nejm198508293130901
 186. Yu J, Li J, Shen J, Du F, Wu X, Li M, et al. The role of Fibrinogen-like proteins in Cancer. *Int J Biol Sci.* 2021;17(4):1079-87. doi:10.7150/ijbs.56748
 187. Nayeb-Hashemi H, Desai A, Demchev V, Bronson RT, Hornick JL, Cohen DE, et al. Targeted disruption of fibrinogen like protein-1 accelerates hepatocellular carcinoma development. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;465(2):167-73. doi:10.1016/j.bbrc.2015.07.078
 188. Hua N, Chen A, Yang C, Dong H, He X, Ru G, et al. The correlation of fibrinogen-like protein-1 expression with the progression and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Mol Biol Rep.* 2022;49(8):7911-19. doi:10.1007/s11033-022-07624-6
 189. Li JJ, Wang JH, Tian T, Liu J, Zheng YQ, Mo HY, et al. The liver microenvironment orchestrates FGL1-mediated immune escape and progression of metastatic colorectal cancer. *Nat Commun.* 2023;14(1):6690. doi:10.1038/s41467-023-42332-0
 190. O'Brien SN, Blijlevens NM, Mahfouz TH, Anaissie EJ. Infections in patients with hematological cancer: recent developments. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2003;438-72. doi:10.1182/asheducation-2003.1.438
 191. Krukowski K, Eijkelkamp N, Laumet G, Hack CE, Li Y, Dougherty PM, et al. CD8+ T Cells and Endogenous IL-10 Are Required for Resolution of Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain. *The Journal of Neuroscience.* 2016;36:11074 - 83. doi:10.1523/JNEUROSCI.3708-15.2016
 192. Ullah R, Yin Q, Snell AH, Wan L. RAF-MEK-ERK pathway in cancer evolution and treatment. *Semin Cancer Biol.* 2022;85:123-54. doi:10.1016/j.semcancer.2021.05.010
 193. Bess J, Brown T, Bhala S, Faizer A, Ahmadzada M, Livinski AA, et al. A Literature Review and Pooled Case Analysis of Cardiofaciocutaneous Syndrome to Estimate Cancer Risk. *medRxiv.* 2024. doi:10.1101/2024.08.09.24311751
 194. Tripolitsioti D, Kumar KS, Neve A, Migliavacca J, Capdeville C, Rushing EJ, et al. MAP4K4 controlled integrin β 1 activation and c-Met endocytosis are associated with invasive behavior of medulloblastoma cells. *Oncotarget.* 2018;9(33):23220-36. doi:10.18632/oncotarget.25294
 195. Rechberger JS, Nesvick CL, Daniels DJ. Atypical teratoid rhabdoid tumor (ATRT): disease mechanisms and potential drug targets. *Expert Opin Ther Targets.* 2022;26(3):187-92. doi:10.1080/14728222.2022.2040017
 196. Jackson EM, Shaikh TH, Zhang F, Wainwright LM, Storm PB, Hakonarson H, et al. Atypical teratoid/rhabdoid tumor in a patient with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet A.* 2007;143a(15):1767-70. doi:10.1002/ajmg.a.31843
 197. Byers HM, Adam MP, LaCroix A, Leary SE, Cole B, Dobyns WB, et al. Description of a new oncogenic mechanism for atypical teratoid rhabdoid tumors in patients with ring chromosome 22. *Am J Med Genet A.* 2017;173(1):245-49. doi:10.1002/ajmg.a.37993
 198. Pinto EM, Hamideh D, Bahrami A, Orr BA, Lin T, Pounds S, et al. Malignant rhabdoid tumors originating within and outside the central nervous system are clinically and molecularly heterogeneous. *Acta Neuropathol.* 2018;136(2):315-26. doi:10.1007/s00401-018-1814-2
 199. Attar N, Kurdistani SK. Exploitation of EP300 and CREBBP Lysine Acetyltransferases by Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(3). doi:10.1101/cshperspect.a026534
 200. Lacombe D, Bloch-Zupan A, Bredrup C, Cooper EB, Houge SD, García-Miñaur S, et al. Diagnosis and management in Rubinstein-Taybi syndrome: first international consensus statement. *J Med Genet.* 2024;61(6):503-19. doi:10.1136/jmg-2023-109438
 201. Miller RW, Rubinstein JH. Tumors in Rubinstein-Taybi syndrome. *Am J Med Genet.* 1995;56(1):112-5. doi:10.1002/ajmg.1320560125

202. Jia D, Augert A, Kim DW, Eastwood E, Wu N, Ibrahim AH, et al. Crebbp Loss Drives Small Cell Lung Cancer and Increases Sensitivity to HDAC Inhibition. *Cancer Discov.* 2018;8(11):1422-37. doi:10.1158/2159-8290.Cd-18-0385
203. Kayser S, Hills RK, Langova R, Kramer M, Guijarro F, Sustkova Z, et al. Characteristics and outcome of patients with acute myeloid leukaemia and t(8;16)(p11;p13): results from an International Collaborative Study. *Br J Haematol.* 2021;192(5):832-42. doi:10.1111/bjh.17336
204. Inthal A, Zeithofer P, Zeginigg M, Morak M, Grausenburger R, Fronkova E, et al. CREBBP HAT domain mutations prevail in relapse cases of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2012;26(8):1797-803. doi:10.1038/leu.2012.60
205. Liu Y, Gonzalez Y, Amengual JE. Chromatin-Remodeled State in Lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep.* 2019;14(5):439-50. doi:10.1007/s11899-019-00541-9
206. Schoof M, Epplen GD, Walter C, Ballast A, Holdhof D, Göbel C, et al. The tumor suppressor CREBBP and the oncogene MYCN cooperate to induce malignant brain tumors in mice. *Oncogenesis.* 2023;12(1):36. doi:10.1038/s41389-023-00481-3
207. Taylor MD, Mainprize TG, Rutka JT, Becker L, Bayani J, Drake JM. Medulloblastoma in a child with Rubenstein-Taybi Syndrome: case report and review of the literature. *Pediatr Neurosurg.* 2001;35(5):235-8. doi:10.1159/000050428
208. Robinson G, Parker M, Kranenburg TA, Lu C, Chen X, Ding L, et al. Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma. *Nature.* 2012;488(7409):43-8. doi:10.1038/nature11213
209. Chen J, Yuan T, Liu M, Chen P. Association between TCF7L2 gene polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. *PLoS One.* 2013;8(8):e71730. doi:10.1371/journal.pone.0071730
210. Vaisfeld A, Neri G. Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2024;196(4):e32088. doi:10.1002/ajmg.c.32088
211. Zheng S, Ma X, Zhang L, Gunn L, Smith MT, Wiemels JL, et al. Hypermethylation of the 5' CpG island of the FHIT gene is associated with hyperdiploid and translocation-negative subtypes of pediatric leukemia. *Cancer Res.* 2004;64(6):2000-6. doi:10.1158/0008-5472.can-03-2387
212. Casamassimi A, Rienzo M, Di Zazzo E, Sorrentino A, Fiore D, Proto MC, et al. Multifaceted Role of PRDM Proteins in Human Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020;21(7). doi:10.3390/ijms21072648
213. Yoo NJ, Jeong EG, Lee SH, Lee SH. Absence of PRDM1 exon 2 mutation in acute leukemia. *Eur J Haematol.* 2007;78(2):171-2. doi:10.1111/j.1600-0609.2006.00794.x
214. Russell BE, Kianmahd RR, Munster C, Yu A, Ahad L, Tan WH. Clinical findings in 39 individuals with Bohring-Opitz syndrome from a global patient-driven registry with implications for tumor surveillance and recurrence risk. *Am J Med Genet A.* 2023;191(4):1050-58. doi:10.1002/ajmg.a.63125
215. Patel K, McQuaid S, Ketterl T, Benedetti DJ, Sokol E. Two cases of hepatoblastoma in Bohring-Opitz syndrome: An emerging association. *Pediatr Blood Cancer.* 2024;71(7):e31010. doi:10.1002/pbc.31010
216. MacFarland SP, Ebrahimzadeh JE, Zelle K, Begum L, Bass LM, Brand RE, et al. Phenotypic Differences in Juvenile Polyposis Syndrome With or Without a Disease-causing SMAD4/BMPR1A Variant. *Cancer Prev Res (Phila).* 2021;14(2):215-22. doi:10.1158/1940-6207.Capr-20-0348
217. Li Y, Yang W, Devidas M, Winter SS, Kesserwan C, Yang W, et al. Germline RUNX1 variation and predisposition to childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest.* 2021;131(17). doi:10.1172/jci147898
218. Das A, MacFarland SP, Meade J, Hansford JR, Schneider KW, Kuiper RP, et al. Clinical Updates and Surveillance Recommendations for DNA Replication Repair Deficiency Syndromes in Children and Young Adults. *Clin Cancer Res.* 2024;30(16):3378-87. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-23-3994
219. Maciaszek JL, Oak N, Nichols KE. Recent advances in Wilms' tumor predisposition. *Hum Mol Genet.* 2020;29(R2):R138-r49. doi:10.1093/hmg/ddaa091
220. Charlton J, Pritchard-Jones K. WT1 Mutation in Childhood Cancer. *Methods Mol Biol.* 2016;1467:1-14. doi:10.1007/978-1-4939-4023-3_1

221. Kijima N, Hashimoto N, Chiba Y, Fujimoto Y, Sugiyama H, Yoshimine T. Functional Roles of Wilms' Tumor 1 (WT1) in Malignant Brain Tumors. In: van den Heuvel-Eibrink MM, editor. Wilms Tumor. Brisbane (AU): Codon Publications; 2016. doi:10.15586/codon.wt.2016.ch15
222. Bornhorst M, Frappaz D, Packer RJ. Pilocytic astrocytomas. *Handb Clin Neurol*. 2016;134:329-44. doi:10.1016/b978-0-12-802997-8.00020-7
223. Shanbhag S, Ambinder RF. Hodgkin lymphoma: A review and update on recent progress. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(2):116-32. doi:10.3322/caac.21438
224. Flerlage JE, Myers JR, Maciaszek JL, Oak N, Rashkin SR, Hui Y, et al. Discovery of novel predisposing coding and noncoding variants in familial Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2023;141(11):1293-307. doi:10.1182/blood.2022016056
225. Chen X, Jiang J, Liu H, Li A, Wang W, Ni Z, et al. MSR1 characterized by chromatin accessibility mediates M2 macrophage polarization to promote gastric cancer progression. *Int Immunopharmacol*. 2022;112:109217. doi:10.1016/j.intimp.2022.109217
226. Xu J, Zheng SL, Komiya A, Mychaleckyj JC, Isaacs SD, Chang B, et al. Common sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. *Am J Hum Genet*. 2003;72(1):208-12. doi:10.1086/345802
227. Orloff M, Peterson C, He X, Ganapathi S, Heald B, Yang YR, et al. Germline mutations in MSR1, ASCC1, and CTHRC1 in patients with Barrett esophagus and esophageal adenocarcinoma. *JAMA*. 2011;306(4):410-9. doi:10.1001/jama.2011.1029
228. Seppälä EH, Ikonen T, Autio V, Rökman A, Mononen N, Matikainen MP, et al. Germline alterations in MSR1 gene and prostate cancer risk. *Clin Cancer Res*. 2003;9(14):5252-6.
229. Coe BP, Witherspoon K, Rosenfeld JA, van Bon BW, Vulto-van Silfhout AT, Bosco P, et al. Refining analyses of copy number variation identifies specific genes associated with developmental delay. *Nat Genet*. 2014;46(10):1063-71. doi:10.1038/ng.3092
230. Similuk M, Rao VK, Churpek J, Lenardo M. Predispositions to Lymphoma: A Practical Review for Genetic Counselors. *J Genet Couns*. 2016;25(6):1157-70. doi:10.1007/s10897-016-9979-0
231. King PD, Lubeck BA, Lapinski PE. Nonredundant functions for Ras GTPase-activating proteins in tissue homeostasis. *Sci Signal*. 2013;6(264):re1. doi:10.1126/scisignal.2003669
232. Ebert G, Steininger A, Weißmann R, Boldt V, Lind-Thomsen A, Grune J, et al. Distribution of segmental duplications in the context of higher order chromatin organisation of human chromosome 7. *BMC Genomics*. 2014;15:537. doi:10.1186/1471-2164-15-537
233. Jeong H, Dishuck PC, Yoo D, Harvey WT, Munson KM, Lewis AP, et al. Structural polymorphism and diversity of human segmental duplications. *bioRxiv*. 2024. doi:10.1101/2024.06.04.597452
234. Lawce H. The Role of Repeat DNA Sequences in Human Evolution and Disease. *J Assoc Genet Technol*. 2022;48(2):54-61.
235. Bailey JA, Yavor AM, Massa HF, Trask BJ, Eichler EE. Segmental duplications: organization and impact within the current human genome project assembly. *Genome Res*. 2001;11(6):1005-17. doi:10.1101/gr.gr-1871r
236. Zenker M. Clinical overview on RASopathies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2022;190(4):414-24. doi:10.1002/ajmg.c.32015
237. Lockyer PJ, Kupzig S, Cullen PJ. CAPRI regulates Ca(2+)-dependent inactivation of the Ras-MAPK pathway. *Curr Biol*. 2001;11(12):981-6. doi:10.1016/s0960-9822(01)00261-5
238. Halik A, Tilgner M, Silva P, Estrada N, Altwasser R, Jahn E, et al. Genomic characterization of AML with aberrations of chromosome 7: a multinational cohort of 519 patients. *J Hematol Oncol*. 2024;17(1):70. doi:10.1186/s13045-024-01590-1
239. Chen J, Huang J, Huang Q, Li J, Chen E, Xu W. RASA4 inhibits the HIFα signaling pathway to suppress proliferation of cervical cancer cells. *Bioengineered*. 2021;12(2):10723-33. doi:10.1080/21655979.2021.2002499
240. Xiao Y, Zhu Y, Chen J, Wu M, Wang L, Su L, et al. Overexpression of SYNGAP1 suppresses the proliferation of rectal adenocarcinoma via Wnt/β-Catenin signaling pathway. *Discov Oncol*. 2024;15(1):135. doi:10.1007/s12672-024-00997-z
241. Wang Y, Qi YX, Qi Z, Tsang SY. TRPC3 Regulates the Proliferation and Apoptosis Resistance of Triple Negative Breast Cancer Cells through the TRPC3/RASA4/MAPK Pathway. *Cancers (Basel)*. 2019;11(4). doi:10.3390/cancers11040558

242. Wang T, Liu X, Yu W, Gao L, Deng W, He Q, et al. Genetic profile identification and clinicopathologic characteristics analysis of the thyroid-like low-grade nasopharyngeal papillary adenocarcinoma. *Pathol Res Pract*. 2022;236:153980. doi:10.1016/j.prp.2022.153980
243. Poetsch AR, Lipka DB, Witte T, Claus R, Nöllke P, Zucknick M, et al. RASA4 undergoes DNA hypermethylation in resistant juvenile myelomonocytic leukemia. *Epigenetics*. 2014;9(9):1252-60. doi:10.4161/epi.29941
244. Baribault C, Ehrlich KC, Ponnaluri VKC, Pradhan S, Lacey M, Ehrlich M. Developmentally linked human DNA hypermethylation is associated with down-modulation, repression, and upregulation of transcription. *Epigenetics*. 2018;13(3):275-89. doi:10.1080/15592294.2018.1445900
245. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012;489(7414):57-74. doi:10.1038/nature11247
246. Zhu G, Song J, Chen W, Yuan D, Wang W, Chen X, et al. Expression and Role of Dickkopf-1 (Dkk1) in Tumors: From the Cells to the Patients. *Cancer Manag Res*. 2021;13:659-75. doi:10.2147/cmar.S275172
247. Hashimoto H, Itoh M, Yamanaka Y, Yamashita S, Shimizu T, Solnica-Krezel L, et al. Zebrafish Dkk1 functions in forebrain specification and axial mesendoderm formation. *Dev Biol*. 2000;217(1):138-52. doi:10.1006/dbio.1999.9537
248. Jaschke N, Hofbauer LC, Göbel A, Rachner TD. Evolving functions of Dickkopf-1 in cancer and immunity. *Cancer Lett*. 2020;482:1-7. doi:10.1016/j.canlet.2020.03.031
249. Valdora F, Banelli B, Stigliani S, Pfister SM, Moretti S, Kool M, et al. Epigenetic Silencing of DKK3 in medulloblastoma. *Int J Mol Sci*. 2013;14(4):7492-505. doi:10.3390/ijms14047492
250. Kafka A, Bukovac A, Brglez E, Jarmek AM, Poljak K, Brlek P, et al. Methylation Patterns of DKK1, DKK3 and GSK3 β Are Accompanied with Different Expression Levels in Human Astrocytoma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(11). doi:10.3390/cancers13112530
251. Mathieu N, Hempel WM, Spicuglia S, Verthuy C, Ferrier P. Chromatin remodeling by the T cell receptor (TCR)-beta gene enhancer during early T cell development: Implications for the control of TCR-beta locus recombination. *J Exp Med*. 2000;192(5):625-36. doi:10.1084/jem.192.5.625
252. Chakraborty T, Perlot T, Subrahmanyam R, Jani A, Goff PH, Zhang Y, et al. A 220-nucleotide deletion of the intronic enhancer reveals an epigenetic hierarchy in immunoglobulin heavy chain locus activation. *J Exp Med*. 2009;206(5):1019-27. doi:10.1084/jem.20081621
253. Kabirova E, Ryzhkova A, Lukyanchikova V, Khabarova A, Korablev A, Shnaider T, et al. TAD border deletion at the Kit locus causes tissue-specific ectopic activation of a neighboring gene. *Nat Commun*. 2024;15(1):4521. doi:10.1038/s41467-024-48523-7
254. Zeng W, Chen S, Cui X, Chen X, Gao Z, Jiang R. SilencerDB: a comprehensive database of silencers. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(D1):D221-d28. doi:10.1093/nar/gkaa839
255. Yan W, Markegard E, Dharmiah S, Urisman A, Drew M, Esposito D, et al. Structural Insights into the SPRED1-Neurofibromin-KRAS Complex and Disruption of SPRED1-Neurofibromin Interaction by Oncogenic EGFR. *Cell Rep*. 2020;32(3):107909. doi:10.1016/j.celrep.2020.107909
256. Qiao J, Liang C, Zhao D, Nguyen LXT, Chen F, Suo S, et al. Spred1 deficit promotes treatment resistance and transformation of chronic phase CML. *Leukemia*. 2022;36(2):492-506. doi:10.1038/s41375-021-01423-x
257. Brems H, Pasmant E, Van Minkelen R, Wimmer K, Upadhyaya M, Legius E, et al. Review and update of SPRED1 mutations causing Legius syndrome. *Hum Mutat*. 2012;33(11):1538-46. doi:10.1002/humu.22152
258. Chelleri C, Brolatti N, De Marco P, Ognibene M, Diana MC, Madia F, et al. Novel causative variants in Legius syndrome: SPRED1 Genotype spectrum expansion. *Am J Med Genet A*. 2024;194(12):e63824. doi:10.1002/ajmg.a.63824
259. Lorenzo C, McCormick F. SPRED proteins and their roles in signal transduction, development, and malignancy. *Genes Dev*. 2020;34(21-22):1410-21. doi:10.1101/gad.341222.120
260. Kehrer-Sawatzki H, Cooper DN. Challenges in the diagnosis of neurofibromatosis type 1 (NF1) in young children facilitated by means of revised diagnostic criteria including genetic

- testing for pathogenic NF1 gene variants. *Hum Genet.* 2022;141(2):177-91. doi:10.1007/s00439-021-02410-z
261. Liu W, Fang S, Zuo G. A Study on the Expression of SPRED1 and PBRM1 (Baf180) and their Clinical Significances in Patients with Gastric Cancer. *Clin Lab.* 2020;66(10). doi:10.7754/Clin.Lab.2020.200312
262. Phoenix TN, Temple S. Spred1, a negative regulator of Ras-MAPK-ERK, is enriched in CNS germinal zones, dampens NSC proliferation, and maintains ventricular zone structure. *Genes Dev.* 2010;24(1):45-56. doi:10.1101/gad.1839510
263. Barseghyan H, Eisenreich D, Lindt E, Wendlandt M, Scharf F, Benet-Pages A, et al. Optical Genome Mapping as a Potential Routine Clinical Diagnostic Method. *Genes (Basel).* 2024;15(3). doi:10.3390/genes15030342
264. Krepischi AC, Pearson PL, Rosenberg C. Germline copy number variations and cancer predisposition. *Future Oncol.* 2012;8(4):441-50. doi:10.2217/fon.12.34
265. Jhanwar S, Deogade A. 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine Signatures Underlying Pediatric Cancers. *Epigenomes.* 2019;3(2). doi:10.3390/epigenomes3020009
266. Cretu Stancu M, van Roosmalen MJ, Renkens I, Nieboer MM, Middelkamp S, de Ligt J, et al. Mapping and phasing of structural variation in patient genomes using nanopore sequencing. *Nat Commun.* 2017;8(1):1326. doi:10.1038/s41467-017-01343-4

Anhang

Tabelle 38 Auf ein KPS hinweisende Kriterien der Patient*innen

Kriterium 1–positive Familienanamnese in Bezug auf Krebserkrankungen

Kriterium 2–für ein KPS typische Tumordiagnose

Kriterium 3–Kind mit ≥ 2 Tumorerkrankungen

Kriterium 4–kongenitale/klinische Anomalien

Kriterium 5–exzessive Toxizität im Rahmen der Therapie

ID	Kriterien					Details zu den erfüllten Kriterien
	1	2	3	4	5	
P1	-	x	-	x	-	ATRT, Entwicklungsverzögerung, Fußfehlbildung
P2	-	-	x	x	-	Medulloblastom und Adenokarzinom, T-Zell-Defekt, autoimmunhämolytische Anämie, autoimmune Thrombozytopenie
P3	-	x	-	x	-	HCC, kardiale Anomalien
P4	-	x	-	x	-	Gliom, Kryptorchismus, Endokrinopathien, kongenitale Malformationen der Hirnentwicklung
P5	-	-	-	x	-	Hypospadie
P6	-	-	-	x	x	psychomotorische Entwicklungsverzögerung, faziale Dysmorphien, Hypertelorismus, unter Therapie Mukositis, Neurotoxizität
P7	-	-	-	x	-	milde Entwicklungsverzögerung, Mikrozephalie
P8	-	-	-	x	-	milde Entwicklungsverzögerung, Wachstumsstörung
P9	x	-	-	-	-	an Krebs erkrankte Schwester
P10	x	-	-	-	-	
P11	-	-	-	x	-	milde Entwicklungsverzögerung, Hochwuchs
P12	-	x	-	x	-	Optikusgliom, Café-au-lait-Flecken
P13	-	-	-	x	-	Daumenfehlbildung
P14	-	x	x	-	-	Medulloblastom (SHH-aktiviert) und Astrozytom
P15	x	-	-	-	-	an ALL erkrankter Halbbruder
P16	x	-	-	-	-	Ösophaguskarzinom des Vaters, Kopf-Hals-Tumor des Großvaters väterlicherseits
P17	x	-	-	x	-	Malignes Melanom der Mutter, kolorektales Karzinom des Großvaters mütterlicherseits, psychomotorische Entwicklungsverzögerung
P18	x	-	-	-	-	konsanguine Eltern, hämatologische maligne Erkrankung der Großmutter mütterlicherseits
P19	-	-	-	x	-	Thrombozytopenie in der jungen Kindheit
P20	x	-	-	-	-	multiple Tumorerkrankungen in der Familie väterlicherseits: Pankreaskarzinom des Großvaters, Zungenkarzinom der Großmutter, Leukämien des Cousins und dessen Tochter, Onkel mit unbekannter Krebserkrankung
P21	-	-	-	x	-	rezidivierende Bronchitiden, Kryptorchismus, Daumenfehlbildung
P22	-	x	-	-	-	Medulloblastom (SHH-aktiviert)
P23	x	-	-	-	-	NHL der Mutter, Bronchialkarzinom des Großvaters väterlicherseits
P24	-	x	-	x	-	Myelosarkom, Autismus
P25	-	-	-	x	x	Mikrozephalie, Adipositas, endokrinologische Störungen, Daumenfehlbildungen, bei Therapie schwere Infektionen und Neuropathien
P26	x	-	-	x	x	Zervix-Karzinom der Mutter, Magenkarzinom des Großvaters mütterlicherseits, Lymphom der Großmutter väterlicherseits, psychomotorische Entwicklungsverzögerung, Nystagmus, Epilepsie, kardiale Anomalien, unter Therapie schwere Infektionen, Neurotoxizität
P27	-	x	-	-	-	BPDCN
P28	-	x	x	-	-	MDS und Astrozytom
P29	x	-	-	-	-	konsanguine Eltern

Tabelle 39 Qualitätskriterien und Referenzbereiche

Die Markierungsdichte beschreibt, wie viele spezifische Fluoreszenzmarkierungen pro 1 kbp vorhanden sind. Eine optimale Markierungsdichte bedingt das Gleichgewicht zwischen ausreichender Informationsdichte und guter Erkennbarkeit der einzelnen Markierungen. Die effektive Abdeckung zur Referenz entspricht den Molekülen, die zur Referenz aligniert wurden. Die positive Markierungsvarianz steigt, wenn eine Markierung an einer Position detektiert wird, an der sie laut Referenz nicht zu erwarten ist. Sie gibt die Abweichung der tatsächlichen von den zu erwartenden Positionen der Markierungen an. Eine hohe positive Markierungsvarianz kann zu Reduktion der Genauigkeit der WGOM und der Identifikation von SVs führen. Im Umkehrschluss beschreibt die negative Markierungsvarianz das Fehlen von laut Referenz erwarteten Markierungen an bestimmten Positionen. Auch eine hohe negative Markierungsvarianz kann zur Ungenauigkeit oder Unzuverlässigkeit der Kartierung führen. Die genutzten Referenzwerte wurden in 2.2.1.5 vorgestellt. Die Kriterien sind elementar zur Beurteilung der Präzision der WGOM. Für optimale Analysen sollten eine ausreichende Markierungsdichte sowie eine geringe Markierungsvarianz gegeben sein.

Qualitätskriterium	Referenzbereich	Erklärung
N50 (≥ 20 kbp)	>150 kbp	N50 der Moleküle ≥ 20 kbp
N50 (≥ 150 kbp)	>230 kbp	N50 der Moleküle ≥ 150 kbp
Kartierungsrate	>70%	Prozentsatz der Moleküle ≥ 150 kbp, die zur Referenz kartiert werden konnten
mittlere Markierungsdichte (≥ 150 kbp)	14–17/100 kbp	mittlere Anzahl von Markierungen pro 100 kbp für Moleküle (≥ 150 kbp)
effektive Abdeckung zur Referenz	>80	Gesamtmenge alignierter DNA/Größe des Referenzgenoms * Kartierungsrate
positive Markierungsvarianz	3–10%	Prozentsatz der in der Referenz fehlenden Markierungen
negative Markierungsvarianz	6–15%	Prozentsatz der fehlenden Referenzmarkierungen in Molekülen

Tabelle 40 Qualitätsdaten der WGOM-Ergebnisse der Patient*innen

N50–Moleküllänge, bei der mindestens 50% der gesamten erfassten Basenmenge in Molekülen dieser Länge oder länger vorliegt, Markierungsdichte–Anzahl der spezifischen Fluoreszenzmarkierungen pro 100 kbp, Effektive Abdeckung zur Referenz–Anteil der Moleküle, die zur Referenz aligniert wurden
 positive Markierungsvarianz–Abweichung der tatsächlichen von den zu erwartenden Positionen der Markierungen, negative Markierungsvarianz–Abweichung von laut Referenz erwarteten Markierungen von tatsächlichen Markierungen

ID	N50 (kbp)	Markierungsdichte (/100 kbp)	effektive Abdeckung zur Referenz	positive Markierungs- varianz in %	negative Markierungs- varianz in %
P1	210,1	15,9	113,1	3,1	10,1
P2	289,8	16,3	127,0	4,9	9,1
P3	280,6	14,6	84,0	2,7	12,2
P4	266,7	16,7	115,4	5,2	9,2
P5	275,5	15,6	91,6	3,1	12,0
P6	266,7	15,8	111,2	2,5	21,0
P7	214,7	15,9	104,1	2,9	10,7
P8	315,3	15,5	107,5	3,4	10,1
P9	245,9	16,6	112,4	5,3	9,3
P10	213,1	16,5	115,8	5,8	9,4
P11	290,9	15,0	82,1	3,0	15,3
P12	355,8	16,0	118,2	3,9	11,5
P13	301,2	15,4	71,4	3,7	10,0
P14	228,2	16,6	123,2	4,7	8,3
P15	243,2	16,5	109,6	4,9	9,3
P16	269,1	16,5	126,5	3,5	9,2
P17	340,2	17,6	71,1	3,7	10,2
P18	274,0	16,2	133,6	3,6	9,6
P19	300,6	16,1	102,0	3,5	9,6
P20	229,3	16,9	67,7	4,5	10,2
P21	258,1	16,2	112,7	3,9	8,9
P22	347,3	16,3	109,2	6,4	8,7
P23	379,6	15,5	111,7	3,9	16,2
P24	305,8	16,4	129,6	6,6	9,8
P25	279,2	16,4	110,1	4,7	9,2
P26	327,0	16,7	97,9	2,6	15,2
P27	295,7	16,4	123,8	4,5	9,1
P28	243,0	15,0	83,4	5,1	12,7
P29	284,7	15,2	99,4	4,3	11,0

Tabelle 41 Qualitätsdaten der WGOM-Ergebnisse der Mütter der Patient*innen

N50–Moleküllänge, bei der mindestens 50% der gesamten erfassten Basenmenge in Molekülen dieser Länge oder länger vorliegt, Markierungsdichte–Anzahl der spezifischen Fluoreszenzmarkierungen pro 100 kbp, Effektive Abdeckung zur Referenz–Anteil der Moleküle, die zur Referenz aligniert wurden
positive Markierungsvarianz–Abweichung der tatsächlichen von den zu erwartenden Positionen der Markierungen, negative Markierungsvarianz–Abweichung von laut Referenz erwarteten Markierungen von tatsächlichen Markierungen

ID	N50 (kbp)	Markierungsdichte (/100 kbp)	effektive Abdeckung zur Referenz	positive Markierungs- varianz in %	negative Markierungs- varianz in %
P1	-	-	-	-	-
P2	-	-	-	-	-
P3	258,8	15,4	83,9	2,7	11,0
P4	-	-	-	-	-
P5	288,4	15,9	78,0	4,6	15,9
P6	374,9	16,6	87,9	3,0	8,3
P7	-	-	-	-	-
P8	343,9	12,2	77,1	2,9	20,5
P9	-	-	-	-	-
P10	-	-	-	-	-
P11	-	-	-	-	-
P12	277,9	15,8	100,9	4,3	10,6
P13	310,3	15,7	100,1	3,0	13,2
P14	265,4	16,4	125,8	4,3	8,6
P15	228,3	16,5	104,4	4,8	8,8
P16	279,5	165,9	124,3	4,1	8,5
P17	317,5	16,1	90,9	3,3	8,9
P18	272,2	16,2	124,7	3,8	9,4
P19	312,1	161,0	120,4	4,1	9,1
P20	235,3	16,4	112,2	4,4	9,6
P21	-	-	-	-	-
P22	328,8	16,4	106,7	5,7	8,3
P23	344,7	16,4	131,2	4,6	10,3
P24	299,2	15,9	113,9	4,2	10,5
P25	340,2	16,2	120,7	4,3	9,1
P26	-	-	-	-	-
P27	309,4	16,3	124,1	4,4	8,8
P28	262,4	15,2	118,3	4,6	10,7
P29	-	-	-	-	-

Tabelle 42 Qualitätsdaten der WGOM-Ergebnisse der Väter der Patient*innen

N50–Moleküllänge, bei der mindestens 50% der gesamten erfassten Basenmenge in Molekülen dieser Länge oder länger vorliegt, Markierungsdichte–Anzahl der spezifischen Fluoreszenzmarkierungen pro 100 kbp, Effektive Abdeckung zur Referenz–Anteil der Moleküle, die zur Referenz aligniert wurden positive Markierungsvarianz–Abweichung der tatsächlichen von den zu erwartenden Positionen der Markierungen, negative Markierungsvarianz–Abweichung von laut Referenz erwarteten Markierungen von tatsächlichen Markierungen

ID	N50 (kbp)	Markierungsdichte (/100 kbp)	effektive Abdeckung zur Referenz	positive Markierungs- varianz in %	negative Markierungs- varianz in %
P1	-	-	-	-	-
P2	-	-	-	-	-
P3	346,1	16,2	77,2	3,0	11,3
P4	-	-	-	-	-
P5	336,6	15,9	82,0	4,2	13,5
P6	-	-	-	-	-
P7	-	-	-	-	-
P8	429,3	16,1	127,6	2,2	9,2
P9	-	-	-	-	-
P10	-	-	-	-	-
P11	319,6	15,8	90,3	3,0	11,4
P12	285,9	16,3	116,1	3,2	10,0
P13	278,4	15,1	129,0	5,7	11,8
P14	297,6	16,2	120,8	4,8	10,1
P15	-	-	-	-	-
P16	272,0	162,5	122,8	3,6	9,4
P17	385,8	16,7	56,3	2,3	13,1
P18	262,0	16,2	127,1	3,8	9,4
P19	358,3	160,5	116,9	3,6	8,6
P20	240,5	11,9	61,0	1,8	31,3
P21	200,6	16,3	81,3	4,2	8,4
P22	384,9	16,8	119,1	5,1	8,9
P23	335,9	16,5	117,3	4,6	8,9
P24	236,6	15,8	104,5	3,0	10,7
P25	306,6	16,2	123,9	4,1	9,5
P26	-	-	-	-	-
P27	-	-	-	-	-
P28	267,9	15,5	117,6	4,5	10,6
P29	293,9	14,8	87,9	7,8	11,8

Tabelle 43 Anzahl der detektierten SVs vor bzw. nach manueller Überprüfung sowie Anzahl der SVs nach Typen

ID	SV-Anzahl vor manueller Überprüfung	SV-Anzahl nach manueller Überprüfung	Deletionen	Insertionen	Duplikationen	Inversionen
gesamt	1861	1534	930	543	59	2
P1	71	64	43	20	1	0
P2	51	40	22	18	0	0
P3	39	25	14	10	1	0
P4	55	45	27	17	1	0
P5	48	38	24	14	0	0
P6	62	49	31	14	4	0
P7	54	44	31	9	4	0
P8	83	59	36	21	2	0
P9	55	49	29	20	0	0
P10	41	34	20	12	2	0
P11	46	37	22	13	2	0
P12	169	150	94	53	3	0
P13	60	50	28	19	3	0
P14	54	41	30	10	1	0
P15	48	44	21	19	4	0
P16	79	62	37	22	2	1
P17	58	51	32	18	1	0
P18	51	44	24	19	1	0
P19	64	61	38	23	0	0
P20	61	43	22	17	4	0
P21	52	39	19	18	2	0
P22	92	67	47	20	0	0
P23	70	59	40	17	2	0
P24	70	65	34	27	4	0
P25	58	49	30	16	3	0
P26	94	76	46	29	1	0
P27	55	48	25	16	6	1
P28	62	49	29	17	3	0
P29	59	52	35	15	2	0

Tabelle 44 Zygotie der detektierten SVs

ID	heterozygote SVs	homozygote SVs	hemizygot SVs	SVs unbekannter Zygotie
gesamt	1389	45	38	62
P1	58	3	2	1
P2	39	1	0	0
P3	23	1	0	1
P4	39	3	2	1
P5	36	1	0	1
P6	38	5	1	5
P7	38	4	1	4
P8	53	4	0	2
P9	47	0	2	0
P10	31	0	2	3
P11	33	1	1	2
P12	147	0	0	3
P13	44	0	3	3
P14	39	0	1	1
P15	39	0	0	5
P16	50	3	7	2
P17	48	0	2	1
P18	42	0	1	1
P19	53	2	1	0
P20	37	0	2	4
P21	34	2	1	2
P22	63	4	0	0
P23	56	0	1	2
P24	60	0	1	4
P25	42	2	2	3
P26	66	6	3	1
P27	41	2	0	5
P28	44	1	1	3
P29	49	0	1	2

Tabelle 45 Lokalisation der SVs

ID	potentiell exonische SVs	intronische SVs	intergenische SVs
gesamt	832	303	399
P1	39	8	17
P2	24	6	10
P3	10	6	9
P4	25	8	12
P5	15	11	12
P6	26	9	14
P7	23	9	12
P8	38	9	12
P9	22	14	13
P10	22	5	8
P11	16	8	13
P12	85	28	37
P13	24	10	16
P14	20	9	12
P15	24	5	15
P16	33	14	14
P17	28	10	13
P18	26	12	6
P19	30	19	12
P20	20	8	15
P21	22	6	11
P22	39	10	18
P23	29	14	16
P24	38	11	16
P25	29	6	14
P26	44	17	15
P27	30	6	12
P28	19	15	15
P29	32	10	10

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst und vor allem möchte ich Herrn Prof. Dr. Arndt Borkhardt für die Bereitstellung des interessanten Dissertationsthemas, das entgegengebrachte Vertrauen, die Übernahme der Betreuung und die Möglichkeit, diese Arbeit in der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und -Klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf durchzuführen, danken. Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Tobias Marschall die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur meiner Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Betreuerinnen Frau Dr. Rabea Wagener und Frau Dr. Ute Fischer sowie Frau Dr. Danielle Brandes, die mich nicht nur fachlich, sondern auch persönlich über die gesamte Dauer des Projekts hinweg begleitet und unterstützt haben. Ihre Geduld, ihr Engagement und ihre jederzeit offene Art haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Für die hilfreiche Einarbeitung, die wertvollen Anregungen, die praktischen Tipps und das stets angenehme Miteinander bin ich außerordentlich dankbar.

Ein großes Dankeschön gilt auch dem gesamten Team der Keimbahnstudie, insbesondere Frau Dr. Triantafyllia Brozou, Herrn Daniel Scholtyssik und Frau Silke Furlan, die mir bei der Datenauswertung bzw. bei der Arbeit im Labor stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Vielen Dank an Frau Dr. Danielle Brandes und Herrn Daniel Scholtyssik für die zuverlässige Probenbearbeitung und den kollegialen Austausch. Die Zusammenarbeit war für mich eine große Hilfe und Bereicherung.

Für die freundliche Bereitstellung der für diese Arbeit verwendeten Proben danke ich der Universitätsklinik Düsseldorf sowie der Universitätsmedizin Rostock. Herzlichen Dank an alle Kooperationspartner*innen für die Bereitstellung der Materialien, Proben, Zelllinien und Geräte, insbesondere an die Arbeitsgruppe pädiatrische Neuroonkologie der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie, und -Klinische Immunologie und dem Team des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums in Düsseldorf.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie für ihre beständige Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Ermutigung und meinem Partner Paul für seine scheinbar endlose Geduld, liebevolle Motivation und die vorbereiteten Abendessen, wenn ich wieder zu lange am Laptop saß. Danke an Julia und Martin für die kluge Kritik und an Kristin und Christin für die beste Motivation an langen Bibliotheksnachmittagen. Danke an Susan und Alex, bei denen ich mich stets willkommen fühlen durfte und an Michaela, deren liebevolle Art und Stärke ich mir zum Vorbild nehmen darf. Danke an meine wunderbaren Freundinnen Sarah, Lisa, Julia, Kathi, Iris und Ann-Kathrin für die offenen Ohren und Herzen, das gemeinsame Durchhalten und die geteilte Freude über Erfolge. Ihr habt Düsseldorf zum Zuhause und den Weg zum Ziel gemacht.