

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie  
(Direktor: Prof. Dr. med. Martin Schrappe)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

---

**Prognostische Bedeutung der Expression der  
*P2RY8-CRLF2*-Fusions-assoziierten Gene  
*LRRC32*, *BMP6* und *VPREB1* für die Akute Lymphoblastische  
Leukämie im Kindes- und Jugendalter**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Swantje Buchmann**

aus **Melle**

Kiel **2015**

1. Berichtstatter:

Priv.Doz. Dr. G. Cario, Klinik für Allgemeine Pädiatrie, UKSH, Campus Kiel

2. Berichtstatter:

Prof. Dr. M. Gramatzki, Leiter Sektion Stammzell- u. Immuntherapie, UKSH, Campus Kiel

Tag der mündlichen Prüfung:

18.01.2017

gez.

---

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | Einleitung.....   | 1  |
| 1.1   | Die Akute Lymphoblastische Leukämie im Kindesalter.....                                 | 1  |
| 1.1.1 | Definition, Epidemiologie und Ursachen.....   | 1  |
| 1.1.2 | Klinik und Symptome .....   | 2  |
| 1.1.3 | Diagnostik und Klassifikation.....  | 3  |
| 1.1.4 | Therapie.....   | 4  |
| 1.2   | Die Bedeutung der minimalen Resterkrankung.....   | 7  |
| 1.3   | Genexpressionsanalysen.....   | 9  |
| 1.4   | Die Rolle des <i>P2RY8-CRLF2</i> -Rearrangements.....                                   | 10 |
| 1.5   | Vorstellung der drei Kandidatengene <i>LRRC32</i> , <i>BMP6</i> und <i>VPREB1</i> ..... | 10 |
| 1.6   | Fragestellung .....   | 12 |
| 2     | Material und Methoden.....  | 13 |
| 2.1   | Patienten .....   | 13 |
| 2.2   | Aufbereitung der klinischen Proben .....  | 13 |
| 2.2.1 | Isolierung mononukleärer Zellen .....   | 13 |
| 2.2.2 | tRNA-Präparation.....   | 14 |
| 2.2.3 | RNA- Messung.....   | 14 |
| 2.2.4 | cDNA- Synthese.....   | 15 |
| 2.3   | Die Polymerase-Kettenreaktion.....  | 15 |
| 2.3.1 | Übersicht .....   | 15 |
| 2.3.2 | Die quantitative Real-Time PCR.....   | 16 |
| 2.3.3 | Die Duplex quantitative Real-Time PCR.....  | 16 |
| 2.4   | Assaydesign .....   | 18 |
| 2.5   | Reaktionsansatz und -protokoll .....  | 19 |
| 2.6   | Statistische Analyse.....   | 19 |

---

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3     | Ergebnisse.....  | 21 |
| 3.1   | Vergleichende Analyse der Genexpression von T-ALL vs. pB-ALL.....                                      | 23 |
| 3.2   | Assoziation von Genexpression und pEFS bei Patienten mit T-ALL.....                                    | 23 |
| 3.3   | Assoziation von Genexpression und pEFS bei Patienten mit pB-ALL.....                                   | 24 |
| 3.4   | Betrachtung der Assoziation von Genexpression und pEFS in genetischen und MRD-Subgruppen .....         | 25 |
| 3.5   | Erweiterte Auswertung der Genexpressionsdaten von <i>LRRC32</i> .....                                  | 27 |
| 3.5.1 | Multivariate Analysen zur prognostischen Relevanz der <i>LRRC32</i> -Expression. 31                    |    |
| 3.6   | Zusammenfassung der Ergebnisse.....  | 32 |
| 4     | Diskussion.....  | 33 |
| 4.1   | Prognostische Relevanz der Expression der Kandidatengene.....  | 34 |
| 4.1.1 | <i>LRRC32</i> -Expression als möglicher prognostischer Marker .....                                    | 34 |
| 4.2   | Interpretation der Genexpressionsdaten von <i>LRRC32</i> hinsichtlich möglicher Pathomechanismen ..... | 35 |
| 4.3   | Ergebnisbewertung der Genexpressionsmessungen von <i>BMP6</i> und <i>VPREB1</i> .....                  | 37 |
| 4.4   | Einordnung der Ergebnisse und Ausblick .....   | 39 |
| 5     | Zusammenfassung.....   | 41 |
|       | Literaturverzeichnis.....  | 43 |
|       | Danksagung.....  | 51 |
|       | Lebenslauf.....  | 52 |

---

## Abkürzungsverzeichnis

|                    |  |
|--------------------|--|
| µl                 | Mikroliter   |
| µmol               | Mikromol   |
| Abb                | Abbildung  |
| AIEOP              | L'Associazione Italiana Ematologia ed Oncologia Pediatrica   |
| ALL                | Akute Lymphoblastische Leukämie  |
| B-ALL              | B-Zell-Leukämie  |
| BAL                | Biphänotypische ALL  |
| BBQ                | BlackBerry Quencher, Fluoreszenzfarbstoff  |
| BCR-ABL            | Breakpoint cluster region-ABL protooncogene 1, non receptor tyrosine kinase;<br>Fusionsgen durch t(9;22) Translokation |
| BFM                | Berlin-Frankfurt-Münster   |
| BMP6               | Bone morphogenetic protein 6   |
| CD                 | Cluster of Differentiation   |
| cDNA               | Complementary DNA; Komplementäre DNA   |
| CRI                | Cumulative relapse incidence; Kumulative Rezidivinzidenz   |
| CRLF2              | Cytokine-like receptor factor 2  |
| Ct                 | Cycle threshold; Schwellenwert-Zyklus  |
| dl                 | Deziliter  |
| DMSO               | Dimethylsulfoxidlösung   |
| DNA                | Deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure  |
| DQ                 | Dark quencher dye; Fluoreszenzfarbstoff  |
| EFS                | Event free survival; Ereignisfreies Überleben  |
| FAB                | French-American-British Cooperative Group  |
| FAM                | Fluorescein admite; Fluoreszenzfarbstoff   |
| FET                | Fluoreszenz-Energietransfer  |
| FOXP3 <sup>+</sup> | Forkhead box protein P3  |
| g                  | Gramm  |
| GARP               | Glycoprotein A repetition predominant  |
| Hb                 | Hämoglobin   |
| HR                 | Hochrisiko   |
| l                  | Liter  |
| L1                 | Akute Lymphoblastenleukämie mit kleinen Zellen   |
| L2                 | Akute Lymphoblastenleukämie mit mittelgroßen Zellen  |
| L3                 | Akute Lymphoblastenleukämie mit großen Zellen  |
| LNA                | Locked Nucleid Acid; Geschlossene Nukleinsäure   |
| LRRC32             | Leucine-rich repeat containing 32  |
| LTBP               | Latent TGF beta-binding protein  |
| MLL-AF4            | Mixed Lineage Leukemia-ALL-1 fused gene on chromosome 4; Fusionsgen<br>durch t(4;11) Translokation                     |
| MR                 | Mittleres Risiko   |
| MRD                | Minimal residual disease; Minimale Resterkrankung  |
| n                  | Anzahl   |
| ng                 | Nanogramm  |
| P2RY8              | Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 8  |
| pB-ALL             | Precursor B-ALL; B-Vorläuferzell-ALL   |
| PBS                | Phosphate buffered saline; Phosphatpuffer  |
| PCR                | Polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion   |
| PGR                | Prednisone good response; Gutes Ansprechen auf Prednison   |

---

|                   |  |
|-------------------|--|
| PPR               | Prednisone poor response; Schlechtes Ansprechen auf Prednison  |
| PR                | Prednisone response; Ansprechen auf Prednison  |
| Q                 | Quartil  |
| qPCR              | Real-Time quantitative PCR   |
| RIN               | RNA integrity Number; RNA Integritätsnummer  |
| RNA               | Ribonucleic acid; Ribonukleinsäure   |
| RPLP1             | Ribosomal protein, large, P1   |
| RT-PCR            | Reverse Transkriptase PCR  |
| SE                | Standard error; Standardfehler   |
| SR                | Standardrisiko   |
| T-ALL             | T-Zell-Leukämie  |
| Tab               | Tabelle  |
| TEL-AML1          | Translocation E26 transformin specific leukemia-acute myeloid leukemia 1;<br>Fusionsgen durch t(12;22) Translokation |
| TGF               | Transforming growth factor   |
| T <sub>regs</sub> | Regulatorische T-Zelle   |
| tRNA              | Totale RNA   |
| UPL               | Universal ProbeLibrary   |
| VPREB1            | Pre B lymphocyte 1   |
| WHO               | World Health Organisation; Weltgesundheitsorganisation   |
| YAK               | Yakima Yellow; Fluoreszenzfarbstoff  |
| ZNS               | Zentrales Nervensystem   |

---

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungen

- Abb. 1      Therapieschema der ALL BFM 2000-Studie, unter Berücksichtigung der Risikostratifizierung in SR, MR und HR
- Abb. 2      Mögliche MRD-Verläufe und MRD-Nachweisgrenzen bei Leukämiepatienten
- Abb. 3      Prinzip der hydrolysierenden Sonden
- Abb. 4      Therapieergebnisse von Patienten mit einer T-ALL
- Abb. 5      Therapieergebnisse von Patienten mit einer pB-ALL
- Abb. 6      Therapieergebnisse von pB-ALL-Patienten assoziiert zur *LRRC32*-Expression
- Abb. 7      Therapieergebnisse von pB-ALL-Patienten im Vergleich der Gruppe mit niedriger *LRRC32*-Expression und der mit hoher *LRRC32*-Expression

### Tabellen

- Tab. 1      Übersicht der klinischen Zeichen bei Diagnosestellung von Kindern mit einer ALL
- Tab. 2      Zugangsnummern, Primer- und Sondensequenzen
- Tab. 3      Gegenüberstellung der klinischen und biologischen Charakteristika und des Therapieansprechens von 647 untersuchten Patienten dieses Projektes und 1688 nicht untersuchten Patienten mit einer kindlichen ALL der ALL BFM 2000-Studie
- Tab. 4      Gegenüberstellung der klinischen und biologischen Charakteristika und des Therapieansprechens assoziiert zur *LRRC32*-Expression von 547 untersuchten Patienten mit einer pB-ALL der ALL BFM 2000-Studie
- Tab. 5      Multivariate Cox-Regressionsanalyse für das Rezidivrisiko in Patienten mit einer pB-ALL

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Die Akute Lymphoblastische Leukämie im Kindesalter

### 1.1.1 Definition, Epidemiologie und Ursachen

Die Akute Lymphoblastische Leukämie (ALL) ist eine bösartige Erkrankung des blutbildenden Systems. Unreife lymphatische Zellen (Blasten) vermehren sich autonom und unkontrolliert. Diese Überproduktion führt zu einer Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark, sodass eine Minderproduktion von Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten resultiert. Typische klinische Symptome sind daher Anämie, vermehrte Blutungsneigung und allgemeine Infektanfälligkeit. Unbehandelt verläuft die Erkrankung schnell tödlich.

In Deutschland ist die ALL mit einem Anteil von ca. 30 % die häufigste aller Krebserkrankungen im Kindesalter. Im Schnitt erkranken im Jahr 500 Kinder unter fünfzehn Jahren, das Verhältnis von Jungen zu Mädchen wird mit 1,2:1 beschrieben. Der Altersgipfel bei Diagnosestellung liegt innerhalb des Kleinkindesalters zwischen zwei und fünf Jahren. [1]

Die Ursachen für die Entstehung einer ALL sind weitgehend unbekannt. Einige genetische wie auch exogene Faktoren werden allerdings mit einer erhöhten Inzidenz in Verbindung gebracht.

Genetische Faktoren:

1. Erbliche Faktoren sind nur selten ursächlich, jedoch gelten Erkrankungen mit chromosomalen Anomalien als prädisponierend. Beispiele hierfür sind die Fanconi-Anämie oder die Trisomie 21. Bei letzterer wurde ein um das 18-fach erhöhte Risiko für das Auftreten einer akuten Leukämie beobachtet. [2]
2. Bei eineiigen Zwillingen, die beide an einer ALL leiden, wurden identische klonale Marker der Leukämiezellen nachgewiesen, sodass angenommen werden kann, dass die Veränderung einer Stammzelle bereits pränatal stattgefunden haben muss. Ausbruchzeitpunkt der Erkrankung ist dann durch postnatale Ereignisse, wie unterschiedliche Umwelteinflüsse, bestimmt. [3, 4]

Exogene Faktoren:

1. Eine chronische Exposition gegenüber bestimmten chemischen Karzinogenen, wie Benzol oder Chloramphenicol, erhöht das Risiko für Chromosomenschäden, die pathogenetischen Wert haben können. [5] Auch eine vermehrte radioaktive Strahlenbelastung begünstigt die Entwicklung einer kindlichen ALL. [6]
2. Virale Infektionen mit beispielsweise dem Epstein-Barr-Virus gelten als Risikofaktor für erworbene Genmutationen. [7, 8] Des Weiteren wurde eine erhöhte Inzidenz bei höherem sozialen Status beobachtet, was auf eine geringere Anzahl an Infektionen in der Kindheit zurückzuführen sein könnte. [4, 9]

### 1.1.2 Klinik und Symptome

Kinder, die an einer ALL erkranken, entwickeln ihre Symptome meist innerhalb weniger Wochen, selten auch mehrerer Monate. Auffällig sind zunächst allgemeine Krankheitszeichen wie Blässe, Abgeschlagenheit oder vermehrte subfebrile Infektionen. Anamnestisch werden auch Haut- oder Schleimhautblutungen angegeben. Die Krankheitserscheinungen korrelieren mit der Knochenmarksinfiltration leukämischer Zellen und deren extramedullärer Ausbreitung. Der Grad der Zytopenie ist somit maßgeblich für die klinische Manifestation verantwortlich.

*Tab. 1: Übersicht der klinischen Zeichen bei Diagnosestellung von Kindern mit einer ALL [1]*

| <b>Klinische Symptome</b>       | <b>Prozentualer Anteil (%)</b> |
|---------------------------------|--------------------------------|
| <b>Allgemeinsymptome:</b>       |                                |
| Fieber (> 38,5°Celsius)         | 61                             |
| Blutung                         | 48                             |
| Knochenschmerz                  | 23                             |
| <b>Lymphadenopathie</b>         | 43                             |
| <b>Splenomegalie</b>            | 49                             |
| <b>Hepatosplenomegalie</b>      | 55                             |
| <b>Mediastinalverbreiterung</b> | 7                              |

Neben diesen allgemeinen Symptomen kann auch die krankheitsbedingte Fehlfunktion einzelner Organe zu massiven körperlichen Ausfällen führen. Hervorzuheben ist hier eine Vergrößerung des Thymus und der Lymphknoten im Mediastinum (vor allem bei der T-Zell-ALL), die durch Verdrängung zu lebensbedrohlicher oberer Einflusstauung mit Atemnot

führen kann. Bei Befall des Zentralen Nervensystems (ZNS) können neurologische Veränderungen wie Kopfschmerzen, Hirnnervenlähmungen und sogar Hirndruckzeichen auftreten. Daher ist eine ausführliche Untersuchung und Diagnostik unabdingbar.

Kennzeichnende Befunde treten besonders in der Hämatologie auf:

Der Hämoglobinwert ist normal bis extrem vermindert (Hb (g/dl) < 8 in ca. 58 % der Fälle), die Retikulozytenzahl ist erniedrigt. Die Leukozytenzahl kann stark variieren. In mehr als 50 % ist eine stark erniedrigte Anzahl (<10x10<sup>9</sup>/l Blut) der weißen Blutkörperchen nachweisbar. Verminderte Thrombozytenwerte treten bei 90 % der Patienten auf, bei über der Hälfte liegt der Wert unter 50x10<sup>9</sup>/l Blut. [1]

### 1.1.3 Diagnostik und Klassifikation

Neben einem Blutbild ist häufig eine Knochenmarksuntersuchung zur Diagnosestellung einer ALL notwendig, da die Zahl peripherer Blasten oft nicht ausreicht, um alle notwendigen Untersuchungen durchzuführen. Das Knochenmark, oder bei hoher Zahl an Leukämiezellen auch nur das periphere Blut, dienen zur genaueren Charakterisierung der Leukämiezellen und sind Grundlagenmaterial zur Diagnostik anhand der gültigen WHO-Klassifikation (2008). Generell wird von einer Leukämie gesprochen, wenn > 25 % Blasten im Knochenmark detektiert werden. Eingeteilt wird nach folgenden Merkmalen:

- Die **Zytomorphologie** beschreibt die Differenzierungszeichen der Blasten und wird mithilfe der French-American-British (FAB)-Klassifikation in drei Untergruppen (L1, L2, L3) eingeteilt. [10]
- Die **Zytochemie** dient hauptsächlich der Unterscheidung zwischen einer myeloischen von einer lymphatischen Zellreihe, sie ist heute weitgehend von der Immunphänotypisierung abgelöst worden. [11, 12]
- Die **Immunphänotypisierung** nutzt das Expressieren von Oberflächenmolekülen (CD, Cluster of Differentiation) der Leukozyten aus. Mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffmarkierten spezifischen Antikörpern können diese Moleküle qualitativ und quantitativ in der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden und entsprechend ihrer Zellreihe und ihres Differenzierungsgrades zugeordnet werden. [13] Der Immunphänotyp unterscheidet zwischen B- und T-lymphoblastischer Leukämie, wobei 80 % der B-Linie (pro-B-ALL, common ALL, prä-B-ALL und reife B-ALL) und annähernd 15 % der

T-Linie (prä-T-ALL, intermediäre T-ALL und reife T-ALL) angehören. Die restlichen 5 % sind BAL (biphänotypische ALL), pro-T-ALL oder haben einen unklaren Immunstatus.

- Die **Zytogenetik und die molekulare Zytogenetik** untersuchen Chromosomenaberrationen der Blasten, die hohen diagnostischen und prognostischen Wert haben. Hierbei kombiniert die Analysetechnik unter anderem Chromosomenbanden mit Fluoreszenz-*In-situ*-Hybridisierung. [14, 15] Darüber hinaus werden molekularbiologische Verfahren wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt.

Die WHO-Klassifikation stellt den Anspruch, die genannten morphologischen, biologischen, immunologischen und genetischen Merkmale in einer klinisch relevanten Nomenklatur zusammenzufassen und aktuelle Erkenntnisse der Forschung stetig zu integrieren. [16, 17] So schließt die 2008 aktualisierte Version auch neue immunphänotypische und genetische Eigenschaften ein, deren Entdeckung eine noch genauere Einteilung der leukämischen Subgruppen ermöglicht. Besonders betont sei hierbei die Einteilung der ALL in eine B- bzw. T-Zelllinie und die verstärkte Beachtung von Genrearrangements und Ploidien. [17] Diese molekularen Profile tragen eine entscheidende Rolle in der Prognoseeinschätzung und Therapieplanung der Erkrankung. [14, 15, 18] Zu den wichtigsten Abnormitäten gehören die Chromosomentranslokation t(9;22), die zu dem Fusionsprotein *BCR-ABL* führt und die Translokation t(4;11), die das Fusionsprotein *MLL-AF4* bildet. Beide Aberrationen gelten als Marker für eine ungünstige Prognose, sodass Patienten mit einer solchen Veränderung in die Hochrisikogruppe des Therapiekonzeptes eingestuft werden. [19-21] Das Fusionsprotein *TEL-AML1*, resultierend aus der Translokation t(12;21), hingegen ist ein Prädiktor für eine günstige Prognose und mit ca. 15-20 % die am häufigsten auftretende Veränderung. [19, 22] Auch numerische Chromosomenabnormitäten können einen Hinweis auf die Verlaufsform einer ALL geben. So gilt ein hyperdiploider Karyotyp (> 52 Chromosomen) als günstig, während Hypoploidie (< 45 Chromosomen) eher eine schlechte Prognose zugesprochen wird. [23]

#### 1.1.4 Therapie

Die Basistherapie der kindlichen ALL besteht grundsätzlich aus einer risikoadaptierten Polychemotherapie mit begleitenden Supportivmaßnahmen, die einen Zeitraum von zwei

Jahren umfasst. Die Behandlung der Kinder in Deutschland erfolgt im Rahmen multizentrischer Therapieoptimierungsstudien, ca. 90 % der Patienten werden durch die AIEOP-BFM ALL-Studie unter Leitung von Prof. M. Schrappe erfasst. Die aktuell laufende Studie ist die AIEOP-BFM ALL 2009-Studie. Die folgende Beschreibung bezieht sich jedoch auf die Vorgängerstudie, da die Patienten dieser Arbeit nach dem Konzept der ALL BFM 2000-Studie behandelt wurden.

Die ALL BFM 2000-Studie ist ein internationales Behandlungskonzept für Kinder und Jugendliche mit einer ALL. Seit Gründung der Studiengruppe in den 70er Jahren mit Vereinigung der Universitätskliniken aus Berlin, Frankfurt und Münster hat sich aufgrund konsekutiver Untersuchungen und Analysen die Prognose dieser Erkrankung mit einer langfristigen Überlebenswahrscheinlichkeit von ca. 20 % auf 80 % gravierend gebessert. [24, 25] Dies ist hauptsächlich auf eine Intensivierung der Chemotherapie mit leukämiespezifischen Zytostatika und nachfolgend essentiell unterstützenden Therapieelementen zurückzuführen, was erst durch konsequente Integration von neuen Forschungserkenntnissen möglich wurde. [25-27]

Im Wesentlichen gliedert sich die Therapie in drei Blöcke, die sogenannten Protokolle: Remissionsinduktion (Protokoll I), Konsolidierungsphase (Protokoll M) und Reinduktion (Protokoll II und III). [24] Bei Notwendigkeit kann dieses Schema durch eine intensivierete ZNS-gerichtete Therapie oder eine Stammzelltransplantation erweitert werden. Das Ziel des ersten Protokolls ist das Erreichen der kompletten Remission, das heißt Elimination der Blasten (< 5 % im Knochenmark) und der Organmanifestationen. Damit die Remission aufrechterhalten wird, müssen zwei Chemotherapieblöcke (Protokoll M und II, teilweise Protokoll III) folgen. Diese Intensivtherapie hat eine Dauer von ca. sechs bis zwölf Monaten, es schließt sich eine Erhaltungstherapie zur effizienten Rückfallverhinderung bis zu einer Gesamtdauer von etwa zwei Jahren an. Die Intensität der Therapie richtet sich nach dem individuellen Risikoprofil des Patienten. Zur Risikostratifizierung wurden spezielle Einstufungen (Standardrisiko (SR), Mittleres Risiko (MR) und Hochrisiko (HR)) entwickelt, die dieses individuelle Risikoprofil berücksichtigen. Diese Einteilung wird anhand von zyto- bzw. molekulargenetischen Markern (Vorliegen eines *BCR/ABL*-, *MLL/AF4*- bzw. *TEL/AML*-Rearrangements, Hypo- bzw. Hyperdiploidität) und morphologisch beurteilbaren Therapieansprechen stratifiziert. Als Parameter für das Therapieansprechen wird sowohl die Anzahl der Leukämiezellen im Blut nach Beginn der Induktionstherapie an Tag 8 (Prednisone response, PR) sowie im Knochenmark an Therapietag 33 am Ende der Induktion bestimmt, als auch die minimale



Folgetherapie. [33] Während Hochrisikopatienten die höchste Wahrscheinlichkeit für ein solches Rezidiv besitzen, ist auffällig, dass die absolut gesehen meisten Patienten mit Rückfall der MR-Risikogruppe zugeteilt wurden. Ein Grund dafür ist sicherlich die noch große und unbekannte Heterogenität der ALL hinsichtlich biologischem Profil und Klinik, sodass die individuellen Charakteristika noch genauer aufgearbeitet und getrennt werden müssen. Definitiv zu berücksichtigen sind auch die teils schwerwiegenden Nebenwirkungen, mit denen die jungen Patienten nicht nur während, sondern auch jahrelang nach Therapie zu kämpfen haben. Daher ist die Identifizierung zusätzlicher spezifischer Prognosefaktoren, die zu einer für den einzelnen Patienten noch besser angepassten Therapie in Zusammensetzung und Intensität führen soll, eine der Basismotivationen der ALL BFM 2000-Studie und Grundlage dieses Promotionsprojektes. [34, 35]

## **1.2 Die Bedeutung der minimalen Resterkrankung**

Ein großer Anspruch in der Behandlung aller Leukämien ist es, ein Maß für den Grad der Remission unter Therapie zu finden. Man möchte sowohl diejenigen Patienten möglichst früh detektieren, bei denen die Therapie nicht ausreichend anschlägt, als auch Patienten erkennen, die ein exzellentes Ansprechen aufzeigen. Anlass hierfür ist die richtige und unmittelbare Zuteilung zu den Risikogruppen. Die Messung der MRD hat hierfür einen entscheidenden Beitrag geleistet. Bei Diagnosestellung einer Leukämie kann eine Tumorlast von  $10^{10}$  -  $10^{12}$  Zellen im Körper nachgewiesen werden, die nach Therapiebeginn bestenfalls unter die Nachweisgrenze von konventionellen morphologischen und bildgebenden Verfahren fällt. [36] Jedoch können trotz klinischer Remission residuelle Tumorzellen ( $0$  -  $10^{10}$ ) vorhanden sein, was als minimale Resterkrankung bezeichnet wird (siehe Abbildung 2). Da der zeitliche Verlauf der MRD mit der Wahrscheinlichkeit eines Rückfalls korreliert und somit prognostischen Wert besitzt, wurden verschiedene Messwerte und -verfahren getestet und entwickelt: [33, 37]

- Die Durchflusszytometrie misst die Anzahl der Antigene leukämieassoziierter Immunphänotypen aus Knochenmark.
- Die Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) amplifiziert strukturelle Chromosomenaberrationen aus RNA. [39]
- Mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR) werden T-Zellrezeptor- und Immunglobulin-Genumlagerungen aus DNA vervielfältigt. [33]

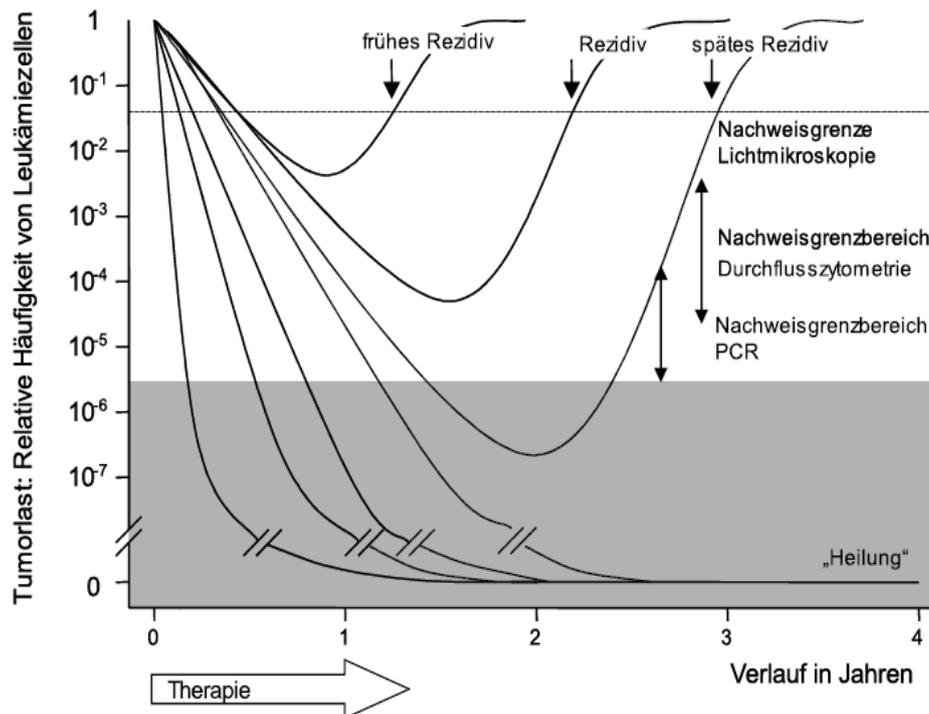


Abb. 2: Mögliche MRD-Verläufe und MRD-Nachweisgrenzen bei Leukämiepatienten [36]

Der Nachweis der MRD über T-Zellrezeptor- und Immunglobulin-Genumlagerungen ist mit einer Detektierbarkeit von einer Leukämiezelle unter einer Million gesunder Zellen die sensitivste Methode. T-Zellrezeptoren und Immunglobuline bestehen aus mehreren verbundenen Proteinketten, die sich in funktionelle Einheiten gliedern. Es wird ein konstanter von einem variablen Abschnitt unterschieden. Die Gene für die Proteine der variablen Kette sind auf unterschiedlichen DNA-Segmenten (V-, J-, und D-Segmente) kodiert, die zufällig miteinander kombiniert werden. Somit entsteht eine enorme Vielfalt an spezifischen Antikörpern und T-Zellrezeptoren. Diese V(D)J-Rekombination liefert die Grundlage für die Antikörperdiversität und konsequent für die MRD-Diagnostik. [38]

Die Umsetzung dieser Nachweismethode ist jedoch sehr aufwändig, die Einführung der qPCR hat inzwischen eine deutliche Vereinfachung des Versuchsaufbaues erbracht und wird demnach standardisiert eingesetzt. [39]

Da wiederholt nachgewiesen werden konnte, dass die MRD-Bestimmung unabhängig von anderen Risikofaktoren prädiktiven Wert besitzt, wurde diese Diagnostik in das Protokoll der BFM ALL 2000-Studie aufgenommen. Die Höhe der MRD-Last an zwei definitiven Zeitpunkten der Therapie (R1 und R2) weist den Patienten unter anderem der individuellen Risikogruppe (SR, MR oder HR) zu und stellt ein mittlerweile unverzichtbares Instrument der Therapieplanung dar (siehe Kapitel 1.1.4). [40]

### 1.3 Genexpressionsanalysen

Die Aufschlüsselung der genetischen Informationen von Lebewesen hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Man ist der Annahme, dass die Struktur der Gene, ihre Anordnung im Genom und die Funktion der Proteine in Einzel- und Wechselwirkung einer ganz bestimmten Ordnung unterliegen, dessen Ganzheit jedoch noch nicht genügend geklärt ist. Es soll ein grundlegendes Verständnis für die Funktionsweise einer Zelle und somit ihres gesamten Organismus entstehen, sodass Mechanismen von Krankheiten verstanden und als Ansatzpunkt für Therapien genutzt werden können. [41]

Hierbei ist besonders die Betrachtung von Genen auf RNA-Ebene (oder entsprechender komplementärer DNA (cDNA)) von Bedeutung, die die Expression und dadurch den Grad der tatsächlichen Aktivität eines Genes wiedergibt. Diverse molekularbiologische Methoden wie die Microarray-Technologie oder die qPCR finden hier Einsatz und liefern wertvolle Informationen über die Transkriptome der erkrankten Zellen. So können beispielsweise deregulierte Gene in diversen Tumorproben nachgewiesen und in Assoziation zu klinischen und biologischen Merkmalen gesetzt werden. Diese Untersuchungen haben sich mittlerweile so weit entwickelt, dass bestimmte Expressionsprofile für Krankheiten unterschiedlichster Genese identifiziert und sogar mit Therapieerfolg oder -misserfolg in Verbindung gebracht werden konnten. [42-44]

Auch für die kindliche ALL wurden zahlreiche Genexpressionsanalysen durchgeführt, deren Ergebnisse eine prognostische Relevanz beschreiben. [18] So wurde beispielsweise bei Patienten mit einer prä-B-ALL, die genetisch noch unklassifiziert waren, ein charakteristisches Genexpressionsprofil gefunden, das große Übereinstimmungen mit dem *BCR-ABL*-assoziierten Profil besitzt. Alle Patienten mit diesem so genannten *BCR-ABL-like*-Genexpressionsprofil weisen ähnlich wie die *BCR-ABL*-positiven Fälle eine schlechte Prognose auf, sodass eine neue genetisch markierte Subgruppe identifiziert werden konnte. [45] In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass das *CRLF2*-Gen (Cytokine-like receptor factor 2) bei Hochrisikopatienten der prä-B-ALL aufgrund verschiedener Aberrationen überexprimiert und mit einem schlechten Therapieergebnis assoziiert ist. [46]

Die Einteilung der ALL in noch weitere und genauere Subklassen hinsichtlich Prognose und Therapie mittels Genexpressionsanalysen stellen daher eine interessante und wertvolle Methode dar. Der Anspruch besteht auch hier, dem einzelnen Patienten eine individuell angepasste Therapie zu ermöglichen, sodass ein angemessener Kompromiss zwischen Behandlung, Nebenwirkungen und Spätkomplikationen erreicht werden kann.

## 1.4 Die Rolle des *P2RY8-CRLF2*-Rearrangements

Im Rahmen der ALL BFM 2000-Studie konnte gezeigt werden, dass das *CRLF2*-Gen in einer Subgruppe der pB-ALL überexprimiert ist. Grund dafür sind verschiedene Aberrationen, wie eine Translokation des IgH-Lokus, zusätzliche *CRLF2*-Kopien oder eine Fusion des Gens mit dem Promoter *P2RY8*. Auffällig war jedoch, dass nur das *P2RY8-CRLF2*-Rearrangement mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Dies ist hauptsächlich durch eine besonders hohe Anzahl an Rezidiven in der MR-Risikogruppe bedingt, in denen nach Therapieschema keine intensivierete Behandlung vorgesehen ist. [47] Um diese spezielle Gruppe von Patienten genauer molekular charakterisieren zu können, wurde sowohl in der *P2RY8-CRLF2*-Subgruppe als auch in der *CRLF2*-hochexprimierenden Gruppe ohne diese Fusion ein Transkriptomprofil mittels RNA-Sequenzierung erstellt. Es konnten differentiell exprimierte Kandidatengene identifiziert werden, die anschließend mittels qPCR validiert wurden. [48] Die Gene *LRRC32* (Leucine-rich repeat containing 32), *BMP6* (Bone morphogenic protein 6) und *VPREB1* (Pre-B lymphocyte 1) zeigten relativ den größten Expressionsunterschied und erwiesen sich somit als besonders interessant.

## 1.5 Vorstellung der drei Kandidatengene *LRRC32*, *BMP6* und *VPREB1*

### *LRRC32*:

Dieses Gen ist in der Subgruppe der pB-ALL mit *P2RY8-CRLF2*-Fusion, deren Patienten eine schlechte Prognose besitzen, niedriger exprimiert.

Es kodiert für das Membranprotein GARP (Glycoprotein A repetition predominant), welches unter anderem auf FOXP3<sup>+</sup> (Forkhead box protein P3)-stimulierten T<sub>regs</sub> (regulatorische T-Zellen) und Thrombozyten exprimiert wird. GARP bindet das Trägerprotein LTBP (Latent TGF-beta-binding protein) von TGF beta (Transforming growth factor beta) und spielt somit eine Rolle in der vielfältigen Regulation des TGF beta-Signalwegs. Es konnte gezeigt werden, dass TGF-beta positive und negative Effekte auf die Tumorentstehung bewirkt und auch T<sub>regs</sub> die Immunität gegenüber jeglicher Tumorart supprimieren können. [49-51]. Vorstellbar wäre in diesem Zusammenhang, dass T<sub>regs</sub> die Aktivität des TGF-beta-Signalwegs durch die Expression von GARP steuern. Die Expression von *LRRC32* könnte daher in Verbindung mit der Immunregulation stehen. [52, 53]

*BMP6:*

Dieses Gen ist in der Subgruppe der pB-ALL, deren Patienten eine schlechte Prognose besitzen, ebenfalls niedriger exprimiert.

Es kodiert für das knochenmorphogenetische Protein 6, welches zur Familie der TGF-beta-Signalmoleküle zählt. BMPs sind multifunktionale Proteine, die sowohl das Knochen- und Knorpelwachstum induzieren, als auch hämatopoetische Stammzellen regulieren können. [54, 55] Daher könnte vermutet werden, dass die Expression von *BMP6* weitreichende Auswirkungen auf die Zelldifferenzierung hat. [55]

*VPREB1:*

Dieses Gen ist in der Subgruppe der Patienten mit einer pB-ALL mit schlechter Prognose höher exprimiert.

Es kodiert für die Immunglobulin Jota Kette, welche Teil des Prä-B-Zellrezeptors ist. B-Zellen sind die Träger der humoralen Immunantwort des Körpers und synthetisieren als Plasmazellen auf Antigenreiz die spezifischen Antikörper. Während der Entwicklung von der frühen Pro-B-Zelle bis zur reifen B-Zelle werden die einzelnen Gene der Immunglobulinketten unterschiedlich miteinander kombiniert (somatische Rekombination). Der Prä-B-Zell-Rezeptor wird für diese Rekombination und auch für die Initiierung der Proliferation benötigt, sodass eine differentielle Expression eines der Kettengene, beispielsweise *VPREB1*, zu einer unreifen Entwicklung der B-Zelle führen könnte. [56] Auch eine Entkoppelung der Rekombination der Kettengene ist denkbar. [56, 57]

## 1.6 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll die Expression der drei Gene *LRRC32*, *BMP6* und *VPREB1* in einem umfangreichen und etablierten Patientenkollektiv hinsichtlich ihres potentiellen prognostischen Wertes über die *CRLF2*-Expression hinaus untersucht werden. Folgende Fragestellungen sollen berücksichtigt werden:

1. Gibt es einen Unterschied in der Expression der drei Gene in den immunologischen bzw. zytogenetischen Subgruppen?
2. Besteht ein Zusammenhang zwischen Genexpression und klinischen bzw. biologischen Faktoren?
3. Lässt sich eine Assoziation zwischen Genexpression und Therapieansprechen sowie Therapieergebnis finden?
4. Lassen sich über mögliche Prognose-assoziierte Genexpressionen Hinweise auf die Pathomechanismen von Therapieresistenz und Therapieversagen finden, aufgrund derer Hypothesen für weitere Analysen formuliert werden können?

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Patienten

Grundlagenmaterial der Untersuchungen dieser Arbeit waren kryokonservierte Blut- bzw. Knochenmarkspalten von an einer ALL erkrankten Kindern im Alter von 1-18 Jahren vor Therapiebeginn, deren Behandlung nach dem Protokoll der ALL-BFM 2000-Studie durchgeführt wurde. [31, 39] Die Patienten wurden im Zeitraum von Juli 1999 bis Dezember 2004 erfasst. Die Probenentnahme erfolgte mit Zustimmung der Patienten bzw. deren gesetzlichen Vertretern und als von der zuständigen Ethikkommission an der Medizinischen Hochschule Hannover genehmigte Begleitforschung. Voraussetzung der Verwendung der Proben war ein Lymphoblastenanteil von über 80 %, da die Existenz anderer Blutzellen zur Verfälschung der Genexpressionsanalysen der Leukämiezellen führen würde. Die Risikostratifizierung der Patienten erfolgte aufgrund der PR an Therapietag 8, der MRD an Tag 33 und am Ende der Induktionstherapie nach Woche 12. Des Weiteren wurden alle Proben auf die prognoserelevanten zytogenetischen Fusionsproteine – *BCR/ABL*, *MLL/AF4* und *TEL/AML* – getestet, der DNA-Index bestimmt und die Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie vorgenommen (siehe Kapitel 1.1.4).

Das Probenmaterial dieser Arbeit stammt aus einem Patientenkollektiv, das im Rahmen eines früheren, von der Deutschen Krebshilfe geförderten Forschungsprojektes zusammengestellt wurde, und umfasst 647 Patienten mit einer ALL.

### 2.2 Aufbereitung der klinischen Proben

#### 2.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen

Mononukleäre Zellen können aus dem Vollblut mithilfe einer Dichtegradientenzentrifugation von den restlichen Blutbestandteilen getrennt werden. [57] Dafür wurde das Blut bzw. das Knochenmark zunächst mit PBS-Puffer (Phosphate buffered saline) zu gleichen Teilen verdünnt und anschließend auf Biocoll (Biochrom) geschichtet. Das aus ungeladenen Saccharosepolymeren bestehende Biocoll filtriert die Zellen höherer Dichte wie Erythrozyten

und tote Zellen, nimmt Zellen gleicher Dichte wie Granulozyten auf und lagert mononukleäre Zellen in der Interphase zwischen Serum und Biocollschicht.

Diese Interphase wurde mit einer Pipette abgesaugt, zentrifugiert, mit PBS gewaschen und erneut herunterzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde aufgenommen, mit 10 %iger DMSO (Dimethylsulfoxidlösung) zum Gefrierschutz versetzt und danach in Stickstofftanks gelagert.

### 2.2.2 tRNA-Präparation

Die tRNA-Präparation (totale RNA) kombinierte die Schritte der Extraktion (TRIzol Reagent, Ambion) und der darauf folgenden Aufreinigung (RNeasy Mini Kit, Qiagen).

Die Isolation mithilfe der Trizollösung beruht auf dem Verfahren nach Chomczynski, bei dem die zuvor separierten Zellen durch Guanidiniumthiocyanat lysiert und gleichzeitig RNasen und weitere Enzyme inaktiviert werden. [58] Das ebenfalls enthaltene Phenol löst die RNA. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll der Firma Ambion.

Um die enthaltene RNA von noch vorhandenen DNA- oder Proteinf Fragmenten zu trennen, erfolgte darauf die Aufreinigung nach Protokoll des RNeasy Mini Kits von Qiagen. Dieses Kit nutzt eine auf Silikagel basierte Membran, die RNA in Kombination mit mehreren Zentrifugations – und Waschschr itten selektiv bindet. [59] Zusätzlich wurde mit dem DNA-free Kit von Ambion ein DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen durchgeführt.

Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die entstandene RNA bei -80°C eingefroren.

### 2.2.3 RNA- Messung

Um sicherzustellen, dass die gewonnene RNA als Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese zu aussagefähigen Ergebnissen führt, folgte auf die RNA-Extraktion eine Qualitätskontrolle. Geprüft wurden die Reinheit, die Qualität (Degradationsbestimmung anhand des RIN-Wertes (RNA Integrity Number)) und die Konzentration der RNA mithilfe des Agilent RNA 6000 Nano Kits. [60] Hierbei werden die RNA-Moleküle in einem Kapillarsystem mit Gelmatrix elektrophoretisch aufgetrennt und die Ergebnisse anschließend in einem Elektropherogramm dargestellt. [61] Die Durchführung der Messung erfolgte nach dem Agilent RNA 6000 Nano Assay Protokoll mit dem Bioanalyzer 2100 desselben Herstellers.

### 2.2.4 cDNA- Synthese

Die Reverse Transkriptase schreibt RNA in cDNA um, sodass eine Vervielfältigung dieser mit einer PCR möglich ist. Weitere Analysen wie hier die Genexpressionsanalysen mittels qPCR können dann folgen. Zur cDNA-Synthese wurde das Revert Aid Strand cDNA Synthesis Kit von Thermo Scientific verwendet und dessen Anleitung befolgt.

Gelagert wurden die Proben anschließend bei -20°C.

## 2.3 Die Polymerase-Kettenreaktion

### 2.3.1 Übersicht

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine der wichtigsten und am meisten verwendeten Methoden in der modernen Molekularbiologie und dient der *in vitro*-Vervielfältigung eines bekannten und gekennzeichneten DNA-Abschnittes. [62] Diese Sequenz wird durch zwei komplementäre Oligonukleotide (Forward- und Reverseprimer für Hin- und Rückrichtung des DNA-Stranges) eingerahmt und mithilfe einer hitzestabilen Polymerase amplifiziert. Die PCR lässt sich in drei Schritte unterteilen, die zusammen einen Zyklus darstellen:

1. Denaturierung
2. Primerannealing (Hybridisierung der Primer an den jeweiligen DNA-Strang)
3. Elongation (Amplifikation beider DNA-Stränge)

Während des Denaturierungsprozesses wird die doppelsträngige DNA auf ca. 95°C erhitzt, um die Wasserstoffbrückenbindungen aufzutrennen. Nach Abkühlung auf ca. 60°C binden die eingesetzten Primer an die nun einzelsträngige DNA (Templat). Die hitzestabile Taq-Polymerase synthetisiert darauffolgend bei ihrem Temperaturoptimum von ca. 72°C den komplementären DNA-Strang. [63, 64] Diese entstandenen DNA-Doppelstränge können erneut denaturiert und elongiert werden, sodass bei zahlreichen Zyklen exponentiell wachsende DNA-Mengen derselben Sequenz entstehen.

### 2.3.2 Die quantitative Real-Time PCR

Die qPCR beruht auf dem Prinzip der klassischen PCR mit zusätzlicher Quantifizierung der amplifizierten Nukleinsäure. Durch Zugabe von DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen, auch gekoppelt an Sonden, in den PCR-Ansatz können bei Durchlauf eines Zyklus Farbsignale in Echtzeit gemessen werden, die proportional zur entstandenen DNA-Menge stehen. Diese Messung kann jedoch nur während der exponentiellen Phase einer PCR stattfinden, da nur zu diesem Zeitpunkt die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen. Der Beginn dieser Phase wird durch den Ct-Wert (Cycle threshold) markiert, der die Zykluszahl angibt, an dem das Fluoreszenzsignal erstmalig ein konstantes Niveau erreicht. Bei optimaler Effizienz verdoppelt sich die Anzahl der DNA-Menge mit jedem Zyklus und analog dazu das Fluoreszenzsignal. Ausgewertet wird diese PCR-Methode entweder absolut mithilfe einer externen Kalibrierkurve oder relativ zu einer internen Kontrolle. Für Genexpressionsanalysen wird die relative Quantifizierung angewendet, die die Expressionsergebnisse von RNA mithilfe des sogenannten ‚Housekeeping-Gens‘ normalisiert. Ein Housekeeping-Gen ist in seiner Expression unabhängig von Zellzyklus, -stadium oder äußeren Einflüssen und kann somit Unterschiede in der Genexpression aufgrund ungleicher Gesamtmengen von RNA bzw. cDNA relativieren. [65] Der Expressionsunterschied ( $\Delta Ct$ ) von Ziel- und Referenzgen wird mittels einer Kalibratorprobe normalisiert. Zur Bestimmung des Expressionslevels des Zielgens wird das ‚delta-delta Ct‘-Berechnungsmodell verwendet, welches die relative Quantität (RQ-Wert) ermittelt: [66, 67]

1. Normierung:  $\Delta Ct = Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ Referenzgen}$
2. „delta-delta Ct“ Berechnung:  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct \text{ Kalibrator}$
3. Relativer Expressionsunterschied:  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

### 2.3.3 Die Duplex quantitative Real-Time PCR

Neben der einfachen quantitativen Vervielfältigung von Nukleinsäuren, wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, gibt es auch die Möglichkeit, sowohl verschiedene Zielsequenzen und die interne Kontrolle zusammen in einem qPCR-Ansatz zu amplifizieren und zu quantifizieren. Diese Methode wird auch als Multiplex-qPCR bezeichnet. In dieser Arbeit wurde eine als Duplex-qPCR verwendet, also simultane Vervielfältigung von Ziel- und Referenzgen. [68]

Die Firma Roche bietet für die Erstellung eines solchen Assays ein gesondertes Programm (Assay Design Center; <http://qpcr.probefinder.com/roche3.html>) an, welches bei der Erstellung der entsprechenden Primer und Sonden unterstützt. [68] Die speziellen UPL-Sonden (Universal ProbeLibrary) bestehen aus acht bis neun Nukleotiden, deren Motiv in sehr vielen Transkriptomen prävalent ist. Die Wahrscheinlichkeit das gesuchte Transkript zu detektieren, ist nach Bindung der sequenzspezifischen Primer dementsprechend sehr hoch, sodass die Sensitivität der Duplex-qPCR gesteigert wird. Da sich die UPL-Sonden nur aus wenigen Nukleotiden zusammensetzen, sind LNAs (Locked Nucleic Acid) in die Oligonuklidsequenz integriert worden. Die sehr kurzen Sonden werden so strukturell unflexibler und besitzen eine stärkere Bindungskraft zur DNA. [69] Zusätzlich sind diese hydrolysierenden Sonden an ihrem 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff und an ihrem 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff markiert. Aufgrund des Fluoreszenz-Energietransfers (FET) unterdrückt der Quencher bei Anregung der Sonden durch Licht den Reporter. Erst wenn die Taq-Polymerase mit ihrer Exonukleaseaktivität die Sonden an dem zu amplifizierenden DNA-Strang verdrängt und anschließend schneidet, werden Reporter und Quencher voneinander getrennt und das Fluoreszenzsignal wird freigesetzt (siehe Abbildung 3). Nicht hydrolysierte Sonden hingegen geben kein Signal ab, sodass die Fluoreszenz streng sequenzspezifisch ist. [70]

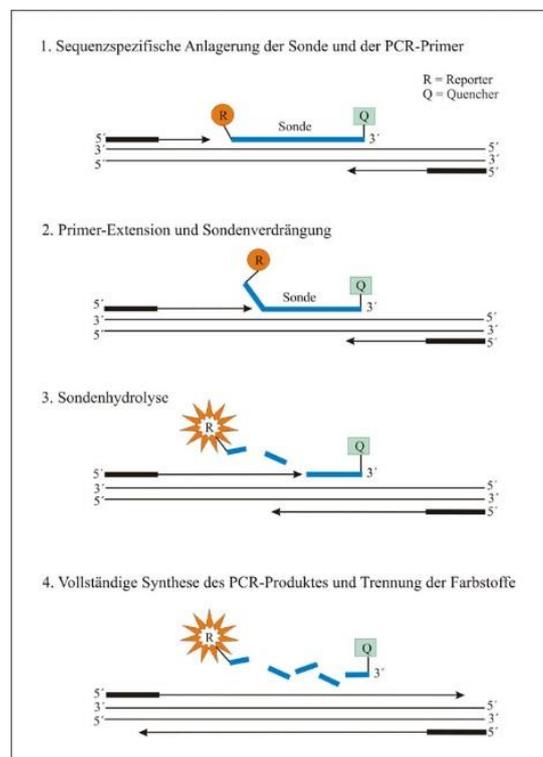


Abb. 3: Prinzip der hydrolysierenden Sonden [71]

## 2.4 Assaydesign

Die in Kapitel 1.5 vorgestellten Kandidatengene *LRRC32*, *BMP6* und *VPREB1* wurden auf ihre Expression in einem Kollektiv von 647 Patienten untersucht. Als interne Kontrolle wurde das *RPLP1*-Gen (Ribosomal protein, large, P1) verwendet.

Für die Zielsequenzen der drei Gene wurden Sonden und Primer mit der Universal Probe Library von Roche, Mannheim, entworfen, die Sonden von selbiger Firma und die Primer bei der Firma Life Technologies (Invitrogen), Carlsbad in Kalifornien, bezogen. Die Primer und die Sonde für das Referenzgen sind selbst designt und von Invitrogen bzw. von TIB Molbiol, Berlin, synthetisiert. Die Sonden für die Zielsequenzen waren jeweils mit dem Reporterfarbstoff ‚Fluoreceine admite‘ (FAM) und dem Quencher ‚Dark Quencher dye‘ (DQ) markiert, die Sonde für die Referenzsequenz mit ‚Yakima Yellow‘ (YAK) bzw. ‚BlackBerry Quencher‘ (BBQ) (siehe Tabelle 2).

Bei Verwendung von zwei Primerpaaren und zwei Sonden können vermehrt Wechselwirkungen untereinander auftreten, die einen Sensitivitätsverlust zur Folge haben. Deswegen wurden die Primer und Sonden im Vorfeld auf mögliche Interaktionen, wie die Entstehung von Primerdimeren, mithilfe einer Software (AutoDimer 1.0) untersucht. [72] Auch die Reaktionsbedingungen für den Duplex-qPCR-Ansatz wurden durch die Bestimmung der idealen Annealing-Temperatur, Zykluszahl und Konzentrationen von Primern, Sonden und Mastermix optimiert.

**Tab 2:** Zugangsnummern, Primer- und Sondensequenzen

| Gen           | Zugangsnummer                | Primer/Sonde                    | Sequenz (5' nach 3')   |
|---------------|------------------------------|---------------------------------|--|
| <i>LRRC32</i> | NM_005512.2,<br>NM_001128922 | Forward<br>Reverse<br>Sonde #1  | CAAAGTGCCCTGTAAGATGGT<br>ATCAAGGGTCTCAGTGTCTGG<br>FAM-GCTCCAGG-DQ                          |
| <i>BMP6</i>   | NM_001718.4                  | Forward<br>Reverse<br>Sonde #22 | ACATGGTCATGAGCTTTGTGA<br>ACTCTTTGTGGTGTGCTGA<br>FAM-TGGTGGAG-DQ                            |
| <i>VPREB1</i> | NM_007128.2                  | Forward<br>Reverse<br>Sonde #30 | CATGCTGTTTGTCTACTGCACA<br>CGGATTGTGGTTCCAAGG<br>FAM-CCTCAGCC-DQ                            |
| <i>RPLP1</i>  | NM_001003.2,<br>NM_213725.1  | Forward<br>Reverse<br>Sonde     | AGTCACGGAGGATAAGATCAATGC<br>ACATTGCAGATGAGGCTCCC<br>YAK-TAAAGCAGCCGGTGAAATGTTGAGCC-<br>BBQ |

## 2.5 Reaktionsansatz und -protokoll

Die Duplex-qPCR wurde jeweils auf einer Mikrotiterplatte mit 96 Wells in einem Reaktionsvolumen von je 20 µl angesetzt. Dieser Reaktionsansatz enthielt 14,2 µl Mastermix (FastStart Universal Probe Master (Rox), Roche), je 1 µmol/l Primer der Zielsequenz, 0,5 µmol/l Primer der Referenzsequenz, je 0,2 µmol/l der beiden Sonden und 2 ng in cDNA umgeschriebene tRNA. Jede Probe wurde doppelt bestimmt. Als Kalibrator wurde stets die gleiche Probe genutzt, die als Grundlage zur Erstellung vergleichender Ergebnisse diente. Für die Negativkontrolle wurde destilliertes Wasser (H<sub>2</sub>O) verwendet.

Die Durchführung der Duplex-qPCR erfolgte mit dem LightCycler 480 System von Roche, welcher durch die LightCycler Software 3.5 verwendet wurde. Die einzelnen theoretischen PCR-Schritte sind in Kapitel 2.3.1 beschrieben. Hier stellt der erste Zyklus die Aktivierung der Taq-Polymerase dar.

- Für die Gene *LRRC32* und *VPREB1* zeigte folgendes Protokoll die aussagekräftigsten Ergebnisse:
  1. 1 Zyklus bei 95°C für 15 Minuten
  2. 50 Zyklen bei je 95°C für 15 Sekunden, 60°C für 20 Sekunden und 72°C für 20 Sekunden
  
- Für das Gen *BMP6* wurde die Temperatur der Primerannealingsphase leicht modifiziert, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen:
  1. 1 Zyklus bei 95°C für 15 Minuten
  2. 50 Zyklen bei je 95°C für 15 Sekunden, 58°C für 20 Sekunden und 72°C für 20 Sekunden

## 2.6 Statistische Analyse

Um die prognostische Relevanz der Genexpression zu betrachten, wurden Überlebenszeitanalysen mithilfe des Kaplan-Meier-Verfahrens durchgeführt. [73, 74] Als Überlebenszeitdaten wurde die EFS-Rate (Event free survival) genutzt, die den Zeitraum von der Diagnosestellung der ALL bis zur letzten Nachuntersuchung oder bis zum ersten Ereignis umfasst. Als Ereignis wurde die inkomplette Remission, ein Rezidiv, ein Zweitmalignom oder Tod durch jegliche Ursache definiert. Die in Quartile bzw. Perzentilen eingeteilten

Genexpressionsgruppen wurden durch den Log-rank-Test miteinander verglichen. Zusätzlich wurde die CRI (Cumulative relapse incidence) berechnet, um festzustellen, ob eine niedrige EFS-Rate in einer hohen Anzahl an Rezidiven begründet ist. Hierfür wurde die Methode von Kalbfleisch und Prentice verwendet und die Genexpressionsgruppen mit dem Gray-Test verglichen. [75, 76] Genexpressionsunterschiede in den Subgruppen nach Immunphänotyp wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen, multivariable Analysen mit der Cox-Regression durchgeführt. [77, 78] Die relativen Unterschiede der klinischen und biologischen Merkmale der Genexpressionsgruppen wurden durch den  $\chi^2$ -Test und den Exakten Fisher-Test untersucht.

### 3 ERGEBNISSE

Die Genexpression der drei Kandidatengene - *LRRC32*, *BMP6* und *VPREB1* - wurde in 647 diagnostischen Blut- bzw. Knochenmarksproben von Kindern mit einer ALL gemessen, die im Rahmen der ALL BFM 2000-Studie behandelt wurden. Im Vergleich der Patienten dieses Kollektivs zu der nicht untersuchten Kohorte wurden mehr Patienten im Alter von 10 Jahren oder älter (28,7 % vs. 23,9 %;  $p = 0,02$ ), mit einer höheren initialen Anzahl von Leukozyten ( $> 10.000/\mu\text{l}$  Blut; 70,3 % vs. 45,7 %;  $p < 0,0001$ ), mit *MLL/AF4*-Rearrangement (0,9 % vs. 0,2 %;  $p = 0,02$ ), mit einem DNA-Index  $\leq 1,16$  (67,7 % vs. 46,1 %;  $p = 0,02$ ) und einem PPR (12,3 % vs. 9,4 %;  $p = 0,05$ ) eingeschlossen. Signifikante Unterschiede bezüglich des Geschlechts, einer Leukämie mit den Fusionsproteinen *BCR/ABL* und *TEL/AML* und der Risikostratifizierung nach MRD konnten nicht beobachtet werden (siehe Tabelle 3).

**Tab. 3:** Gegenüberstellung der klinischen und biologischen Charakteristika und des Therapieansprechens von 647 untersuchten Patienten dieses Projektes und 1688 nicht untersuchten Patienten mit einer kindlichen ALL der ALL BFM 2000-Studie

|  | <b>Untersucht<br/>Anzahl (%)</b> | <b>Nicht untersucht<br/>Anzahl (%)</b> | <b>P<sup>#</sup></b> |
|--|----------------------------------|--|----------------------|
| <b>Gesamt</b>                          | 647 (100)                        | 1688 (100)                             |                      |
| <b>Geschlecht</b>                      |                                  |  | 0,67                 |
| männlich                               | 361 (55,8)                       | 959 (56,8)                             |                      |
| weiblich                               | 286 (44,2)                       | 729 (43,2)                             |                      |
| <b>Alter</b>                           |                                  |  | 0,02                 |
| 1 - 9 Jahre                            | 461 (71,3)                       | 1284 (76,1)                            |                      |
| ≥ 10 Jahre                             | 186 (28,7)                       | 404 (23,9)                             |                      |
| <b>Anzahl initialer<br/>Leukozyten</b> |                                  |  | < 0,001              |
| < 10.000                               | 192 (29,3)                       | 916 (54,3)                             |                      |
| 10.000 - < 50.000                      | 254 (39,3)                       | 511 (30,3)                             |                      |
| 50.000 - < 1.000.000                   | 92 (14,2)                        | 134 (7,9)                              |                      |
| ≥ 1.000.000                            | 109 (16,8)                       | 127 (7,5)                              |                      |
| <b>Immunologie</b>                     |                                  |  | 0,9                  |
| pB-ALL                                 | 549 (84,9)                       | 1381 (81,8)                            |                      |
| T-ALL                                  | 95 (14,7)                        | 244 (14,5)                             |                      |
| kein Ergebnis                          | 3 (0,5)                          | 63 (3,7)                               |                      |
| <b>DNA-Index</b>                       |                                  |  | 0,02                 |
| ≥ 1,16                                 | 81 (12,5)                        | 198 (11,7)                             |                      |
| < 1,16                                 | 451 (69,7)                       | 779 (46,1)                             |                      |
| kein Ergebnis                          | 115 (17,8)                       | 711 (42,1)                             |                      |
| <b>TEL/AML</b>                         |                                  |  | > 0,999              |
| negativ                                | 478 (73,9)                       | 1159 (68,7)                            |                      |
| positiv                                | 145 (22,4)                       | 351 (20,8)                             |                      |
| kein Ergebnis                          | 24 (3,7)                         | 178 (10,5)                             |                      |
| <b>BCR/ABL</b>                         |                                  |  | 0,23                 |
| negativ                                | 639 (98,8)                       | 1653 (97,9)                            |                      |
| positiv                                | 8 (1,2)                          | 35 (2,1)                               |                      |
| <b>MLL/AF4</b>                         |                                  |  | 0,02                 |
| negativ                                | 641 (99,1)                       | 1685 (99,8)                            |                      |
| positiv                                | 6 (0,9)                          | 3 (0,2)                                |                      |
| <b>CRLF2-Expression</b>                |                                  |  | -                    |
| hoch                                   | 48 (7,4)                         | -                                      |                      |
| niedrig                                | 496 (76,7)                       |  |                      |
| kein Ergebnis                          | 103 (15,9)                       |  |                      |
| <b>P2RY8-CRLF2</b>                     |                                  |  | -                    |
| negativ                                | 623 (96,3)                       | -                                      |                      |
| positiv                                | 24 (3,7)                         |  |                      |
| <b>Prednisone response*</b>            |                                  |  | 0,05                 |
| PGR                                    | 565 (87,3)                       | 1508 (89,3)                            |                      |
| PPR                                    | 79 (12,2)                        | 156 (9,2)                              |                      |
| kein Ergebnis                          | 3 (0,5)                          | 24 (1,4)                               |                      |
| <b>Risikogruppen nach<br/>MRD**</b>    |                                  |  | 0,44                 |
| Standardrisiko                         | 209 (32,3)                       | 549 (32,5)                             |                      |
| Mittleres Risiko                       | 277 (42,8)                       | 635 (37,6)                             |                      |
| Hochrisiko                             | 41 (6,3)                         | 106 (6,3)                              |                      |
| kein Ergebnis                          | 120 (18,5)                       | 398 (23,6)                             |                      |

**Erläuterungen:** \* PGR: < 1000 leukämische Blasten/μl an Therapietag 8; PPR: ≥ 1000 leukämische Blasten/μl an Tag 8; \*\* Standardrisiko: keine MRD-Last an Zeitpunkt R1 und R2, Mittleres Risiko: MRD-Last < 10<sup>3</sup> an R1 und/oder R2, Hochrisiko: R2 ≥ 10<sup>3</sup>; # Vergleich der beiden Gruppen durch den Exakten Fisher-Test

Die relative Quantität der Expression der drei Kandidatengene zum Referenzgen wurde zur Skalierung in Quartile (Q1-Q4) eingeteilt. Als zentrale Zielsetzung dieser Untersuchung wurde die Frage nach der Assoziation von Genexpression und prognostischer Relevanz festgelegt. Hierzu wurden Kaplan-Meier-Überlebenskurven für eine 5-Jahres EFS-Rate erstellt und ein nach dem Log-Rank-Test berechneter p-Wert von  $\leq 0,05$  als signifikant angesehen. Die zugehörige CRI galt bei einem p-Wert von  $\leq 0,05$  nach dem Gray-Test als signifikant.

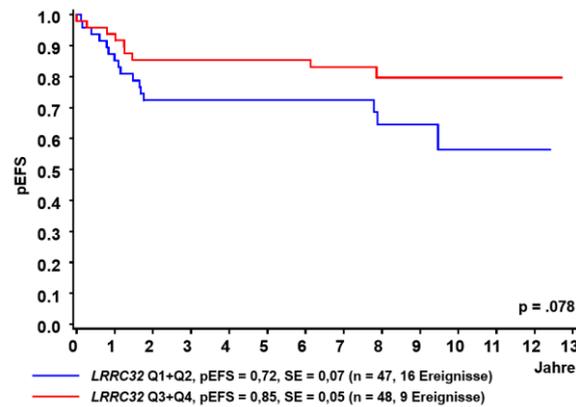
### 3.1 Vergleichende Analyse der Genexpression von T-ALL vs. pB-ALL

Die Immunphänotypisierung von Leukämiezellen besitzt einen wesentlichen Stellenwert in der Diagnostik und Therapieplanung einer ALL. Um zu überprüfen, ob ein Unterschied in der Expression von *LRRC32*, *BMP6* und *VPREB1* zwischen einer T-ALL und einer pB-ALL besteht, wurde die Expression der Gene zwischen beiden Subgruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen. In der Gruppe der pB-ALL wurden alle Patienten mit einer pro-B-ALL, einer cALL und einer prä-B-ALL zusammengefasst. Es wurde beobachtet, dass die Genexpressionswerte aller drei getesteten Gene signifikant höher in Patienten mit einer pB-ALL waren (Mittelwert T-ALL vs. pB-ALL: *LRRC32*: 0,0014 vs. 0,1491; *BMP6*: 0,0225 vs. 0,3787; *VPREB1*: 0,025 vs. 0,5117; jeweils  $p \leq 0,0001$ ), sodass die weitere Betrachtung getrennt nach den beiden Immunphänotypen erfolgte.

### 3.2 Assoziation von Genexpression und pEFS bei Patienten mit T-ALL

Für die Untersuchung der Genexpression bei Patienten mit einer T-ALL wurden lediglich zwei Gruppen unterschieden, da die Anzahl der Patienten nach Einteilung in vier Quartilgruppen für die Auswertung zu gering war: Die Gruppe ‚Q1 + Q2‘ umfasst alle RQ-Werte der ersten und zweiten Quartile und die Gruppe ‚Q3 + Q4‘ alle RQ-Werte der dritten und vierten Quartile.

Bei der Betrachtung des Gens *LRRC32* zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der 5-Jahres EFS-Rate von ‚Q1 + Q2‘ gegen ‚Q3 + Q4‘ (pEFS (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung):  $0,72 \pm 0,07$  vs.  $0,85 \pm 0,05$ ), beobachtet wurde lediglich die Tendenz eines schlechteren Therapieergebnisses bei Patienten, die eine niedrige Genexpression aufweisen ( $p = 0,078$ ) (siehe Abbildung 4). Die Expression von *BMP6* und *VPREB1* zeigte keine signifikante Assoziation zur 5-Jahres EFS-Rate der beiden Gruppen (pEFS  $0,81 \pm 0,06$  vs.  $0,77 \pm 0,06$ ;  $p = 0,6$  bzw. pEFS  $0,83 \pm 0,05$  vs.  $0,74 \pm 0,06$ ;  $p = 0,21$ ).



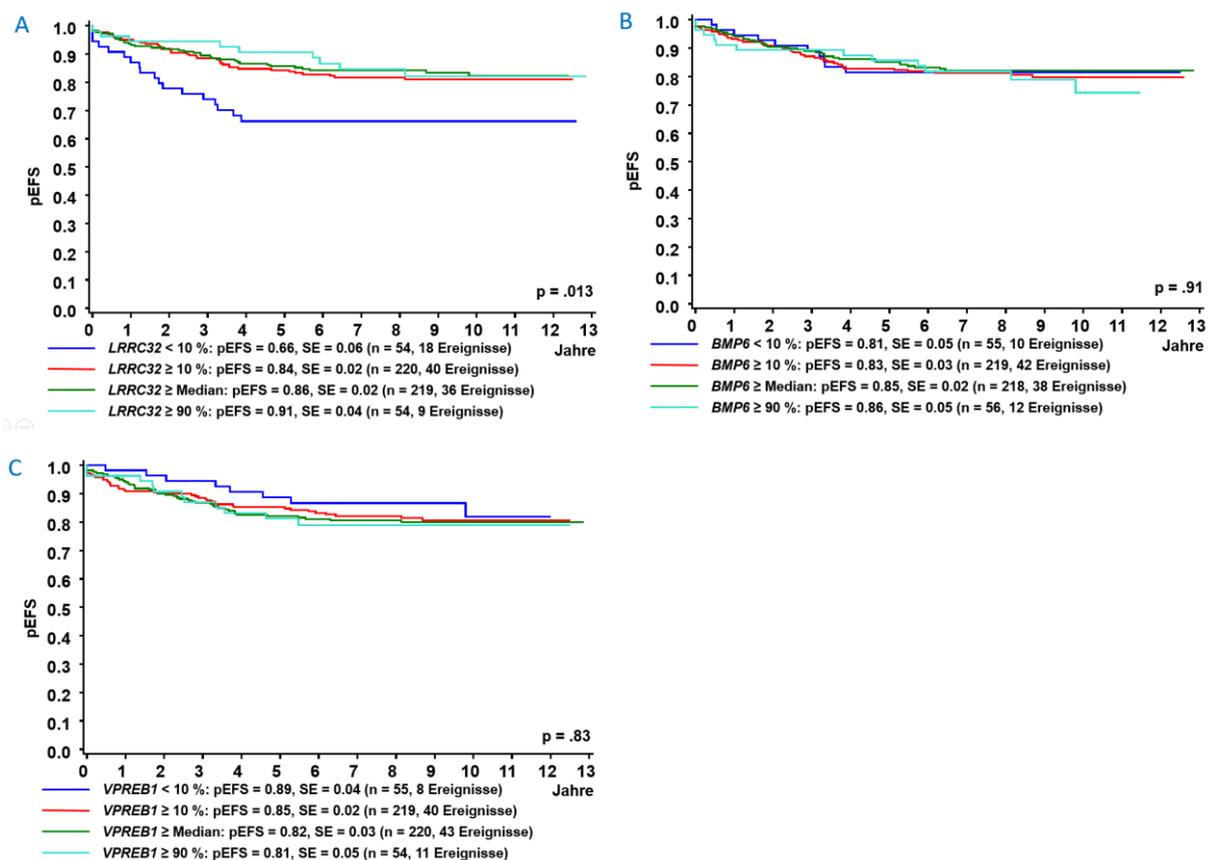
**Abb. 4:** Therapieergebnisse von Patienten mit einer T-ALL veranschaulicht anhand der 5-Jahres EFS-Rate mit Kaplan-Meier-Überlebenskurve assoziiert zur Expression von *LRRC32*; Skalierung der RQ-Werte in zwei Gruppen anhand von Quartilen

Da für die Patienten mit einer T-ALL keine Assoziation von Expression unserer Kandidatengene und der EFS bestand und aufgrund der geringen Zahl an Patienten keine weitere Subgruppenanalyse möglich war, wurden alle weiteren Analysen nur für Patienten mit einer pB-ALL durchgeführt.

### 3.3 Assoziation von Genexpression und pEFS bei Patienten mit pB-ALL

Die RQ-Werte für die pB-ALL wurden zunächst zur Skalierung in Q1 - Q4 gruppiert. Bei Betrachtung der Ergebnisse für das Gen *LRRC32* konnte beobachtet werden, dass Patienten, die der Gruppe Q1 zugeordnet wurden, tendenziell eine ungünstigere Prognose aufwiesen als Patienten der Gruppen Q2 – Q4 (pEFS  $0,78 \pm 0,04$  vs.  $0,86 \pm 0,02$ ;  $p = 0,12$ ). Im nächsten Schritt erfolgte nun die Unterteilung unter Hinzunahme der 10er und der 90er Perzentile:

Die 5-Jahres EFS-Rate assoziiert zur *LRRC32*-Expression zeigte jetzt ein deutlich schlechteres ereignisfreies Überleben von Patienten mit einer Genexpression unterhalb der 10er Perzentile gegenüber den Patienten mit einer Expression oberhalb der 10er Perzentile (pEFS  $0,66 \pm 0,06$  vs.  $0,84 \pm 0,02$  vs.  $0,86 \pm 0,02$  vs.  $0,91 \pm 0,04$ ;  $p = 0,013$ ). Für die Gene *BMP6* und *VPREB1* konnte diese Assoziation nicht festgestellt werden (pEFS  $0,81 \pm 0,05$  vs.  $0,83 \pm 0,03$  vs.  $0,85 \pm 0,02$  vs.  $0,86 \pm 0,05$ ;  $p = 0,91$  bzw. pEFS  $0,89 \pm 0,04$  vs.  $0,85 \pm 0,02$  vs.  $0,82 \pm 0,03$  vs.  $0,81 \pm 0,05$ ;  $p = 0,83$ ) (siehe Abbildung 5).

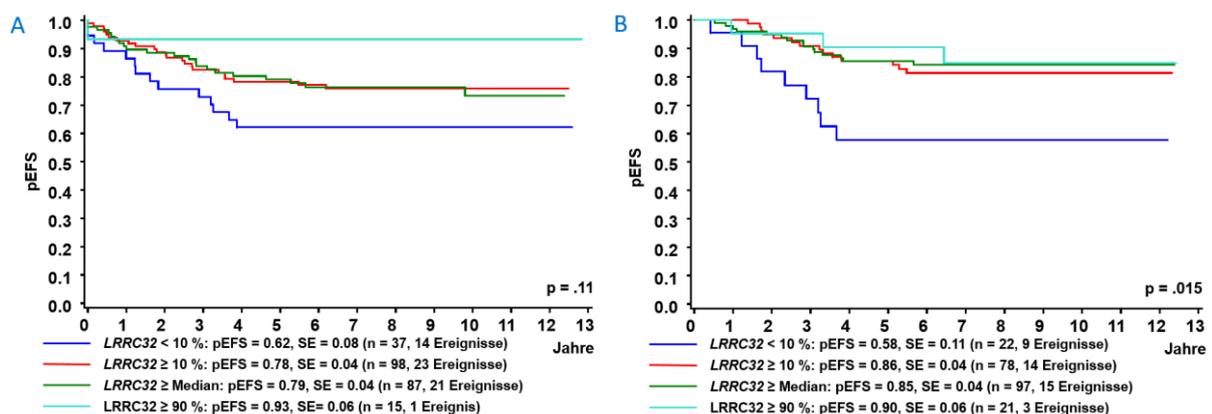


**Abb. 5:** Therapieergebnisse von Patienten mit einer pB-ALL veranschaulicht anhand der 5-Jahres EFS-Rate mit Kaplan-Meier-Überlebenskurven assoziiert zur Expression von *LRRC32* (A), *BMP6* (B) und *VPRED1* (C); Skalierung der RQ-Werte in Perzentilen

### 3.4 Betrachtung der Assoziation von Genexpression und pEFS in genetischen und MRD-Subgruppen

Patienten, deren Leukämiezellen die Rearrangements *BCR/ABL* oder *MLL/AF4* besitzen, haben eine besonders schlechte Prognose, das Fusionsprotein *TEL/AML* sowie ein hyperdiploider Chromosomensatz (oder DNA-Index  $\geq 1,16$ ) hingegen werden mit einem günstigen Therapieverlauf in Verbindung gebracht. Diese genetischen Merkmale charakterisieren somit Subgruppen mit einem distinkten Therapieergebnis und es stellte sich die Frage, ob die Expression von *LRRC32* auch unter Ausschluss dieser Gruppen prognostisch relevant blieb. Unter Ausschluss dieser Marker ließ sich für das Gen *LRRC32* auch hier eine Tendenz zu einem ungünstigen Therapieverlauf bei niedriger Expression erkennen (pEFS  $0,62 \pm 0,08$  vs.  $0,78 \pm 0,04$  vs.  $0,79 \pm 0,04$  vs.  $0,93 \pm 0,06$ ;  $p = 0,11$ ) (siehe Abbildung 6). Die Auswertung von *BMP6* und *VPRED1* zeigte hingegen keinen Unterschied zwischen den vier Gruppen (pEFS  $0,78 \pm 0,07$  vs.  $0,78 \pm 0,04$  vs.  $0,77 \pm 0,05$  vs.  $0,78 \pm 0,1$ ;  $p = 0,96$  bzw. pEFS  $0,87 \pm 0,09$  vs.  $0,82 \pm 0,04$  vs.  $0,73 \pm 0,04$  vs.  $0,74 \pm 0,09$ ;  $p = 0,61$ ).

Wie in Kapitel 1.1.4 bereits eingeleitet, stellt die Stratifizierung der Patienten in einzelne Risikogruppen nach MRD-Diagnostik ein wertvolles Instrument in der Behandlungsplanung der ALL dar. Der größte Anteil von Patienten, die einen Rückfall erleiden, wurden zur Behandlung der MR-Risikogruppe ohne ein verstärkt intensiviertes Therapieprotokoll zugeordnet, da die bekannten Marker keine besonders schlechte Prognose erkennen lassen. Um diese Patienten schon zu Beginn der Therapie - möglicherweise anhand der getesteten Gene - identifizieren zu können, wurden die zu den Genexpressionen assoziierten Therapieergebnisse in den drei MRD-Risikogruppen betrachtet. Besonders interessant erwies sich hierbei das Ergebnis, dass Patienten der MR-Gruppe mit einer sehr niedrigen Expression von *LRRC32* eine eindeutig geringere 5-Jahres pEFS besitzen als Patienten mit höherer Genexpression (pEFS  $0,58 \pm 0,11$  vs.  $0,86 \pm 0,04$  vs.  $0,85 \pm 0,04$  vs.  $0,9 \pm 0,06$ ;  $p = 0,015$ ) (siehe Abbildung 6). In der SR-Gruppe zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied der vier Gruppen (pEFS  $0,89 \pm 0,08$  vs.  $0,89 \pm 0,03$  vs.  $0,96 \pm 0,02$  vs.  $0,95 \pm 0,05$ ;  $p = 0,62$ ), ebenso in der HR-Gruppe (pEFS  $0,25 \pm 0,22$  vs.  $0,5 \pm 0,18$  vs.  $0,38 \pm 0,11$  vs.  $1 \pm 0$ ;  $p = 0,65$ ). Die Untersuchung von *BMP6* ergaben in der MRD-SR-Gruppe zwar einen signifikanten p-Wert ( $p < 0,01$ ), jedoch waren die Ergebnisse in der Gesamtbetrachtung nicht erklärlich (pEFS (Q1)  $0,84 \pm 0,08$  vs. pEFS (Q2)  $0,96 \pm 0,02$  vs. pEFS (Q3)  $0,92 \pm 0,03$  vs. pEFS (Q4)  $0,86 \pm 0,08$ ). Dies ist am wahrscheinlichsten durch die geringe Patientenzahl zu erklären und wurde aufgrund der fehlenden Plausibilität nicht weiter verfolgt. In der MR-Gruppe und auch der HR-Gruppe zeigte sich keine Assoziation zum Therapieergebnis ( $p(\text{MR}) = 0,32$ ;  $p(\text{HR}) = 0,35$ ; pEFS-Daten nicht gezeigt). Auch die RQ-Werte von *VPREB1* konnten in keiner der MRD-Subgruppen signifikant zur 5-Jahres pEFS unterschieden werden ( $p(\text{SR}) = 0,59$ ;  $p(\text{MR}) = 0,24$ ;  $p(\text{HR}) = 0,68$ ; Daten nicht gezeigt).



**Abb. 6:** Therapieergebnisse von pB-ALL-Patienten veranschaulicht anhand der 5-Jahres EFS-Rate mit Kaplan-Meier-Überlebenskurven assoziiert zur Expression von *LRRC32* unter Ausschluss der Rearrangements *TEL/AML*, *BCR/ABL* und *MLL/AF4* sowie einem DNA-Index  $\leq 1,16$  (A) und für die MR-Risikogruppe nach MRD-Diagnostik (B); Skalierung der RQ-Werte in Perzentilen

### 3.5 Erweiterte Auswertung der Genexpressionsdaten von *LRRC32*

Die Auswertung der Ergebnisse des Gens *LRRC32* erwies sich als besonders eindrücklich, da die Wahrscheinlichkeit eines Therapieversagens bei Patienten mit sehr niedriger Genexpression merklich höher war als die der Patienten mit hoher Genexpression. Um diese Beobachtung noch weiter zu differenzieren, wurden in der folgenden Analyse die Patienten in nur zwei Gruppen anhand der 10er Perzentile eingeteilt und miteinander verglichen (< 10er Perzentile vs.  $\geq$  10er Perzentile). Im Vergleich dieser beiden Gruppen waren mehr Patienten im Alter von 10 Jahren oder älter (53,7 % vs. 47,1 %) und mit einem DNA-Index  $\leq 1,16$  (83,3 % vs. 65,9 %) in der niedrigen Expressionsgruppe eingeschlossen. Hinsichtlich des Geschlechts, der initialen Leukozytenzahl, der Rearrangements *TEL/AML*, *BCR/ABL* und *MLL/AF4*, der PR und der Risikostratifizierung nach MRD-Diagnostik konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Folglich ließ sich keine Assoziation zwischen Therapieansprechen, gemessen an der PR an Therapietag 8, und der MRD-Last zum Zeitpunkt R1 und oder R2 (siehe Kapitel 1.1.4) und Genexpression finden (siehe Tabelle 4).

**Tab. 4:** Gegenüberstellung der klinischen und biologischen Charakteristika und des Therapieansprechens assoziiert zur *LRRC32*-Expression von 547 untersuchten Patienten mit einer pB-ALL der ALL BFM 2000-Studie

|  | <b><i>LRRC32</i> niedrig<br/>Anzahl (%)</b> | <b><i>LRRC32</i> hoch<br/>Anzahl (%)</b> | <b><i>P</i><sup>#</sup></b> |
|--|---|--|-----------------------------|
| <b>Gesamt</b>                          | 54 (100)                                    | 493 (100)                                |                             |
| <b>Geschlecht</b>                      |   |  | 0,39                        |
| männlich                               | 25 (46,3)                                   | 261 (52,9)                               |                             |
| weiblich                               | 29 (53,7)                                   | 232 (47,1)                               |                             |
| <b>Alter</b>                           |   |  | 0,002                       |
| 1 - 9 Jahre                            | 30 (55,6)                                   | 376 (76,3)                               |                             |
| ≥ 10 Jahre                             | 24 (44,4)                                   | 117 (23,7)                               |                             |
| <b>Anzahl initialer<br/>Leukozyten</b> |   |  | 0,2                         |
| < 10.000                               | 16 (29,6)                                   | 168 (34,1)                               |                             |
| 10.000 - < 50.000                      | 22 (40,7)                                   | 213 (43,2)                               |                             |
| 50.000 - < 100.000                     | 6 (11,1)                                    | 68 (13,8)                                |                             |
| ≥ 100.000                              | 10 (18,5)                                   | 44 (8,9)                                 |                             |
| <b>DNA-Index</b>                       |   |  | 0,003                       |
| ≥ 1,16                                 | 1 (1,9)                                     | 75 (15,2)                                |                             |
| < 1,16                                 | 45 (83,3)                                   | 325 (65,9)                               |                             |
| kein Ergebnis                          | 8 (14,8)                                    | 93 (18,9)                                |                             |
| <b><i>TEL/AML</i></b>                  |   |  | 0,1                         |
| negativ                                | 44 (81,5)                                   | 341 (69,2)                               |                             |
| positiv                                | 9 (16,7)                                    | 135 (27,4)                               |                             |
| kein Ergebnis                          | 1 (1,9)                                     | 17 (3,4)                                 |                             |
| <b><i>BCR/ABL</i></b>                  |   |  | 0,004                       |
| negativ                                | 50 (92,6)                                   | 489 (99,2)                               |                             |
| positiv                                | 4 (7,4)                                     | 4 (0,8)                                  |                             |
| <b><i>MLL/AF4</i></b>                  |   |  | 0,466                       |
| negativ                                | 53 (98,1)                                   | 488 (99,0)                               |                             |
| positiv                                | 1 (1,9)                                     | 5 (1,0)                                  |                             |
| <b><i>CRLF2</i>-Expression</b>         |   |  | > 0,999                     |
| hoch                                   | 4 (7,4)                                     | 44 (8,9)                                 |                             |
| niedrig                                | 47 (87)                                     | 447 (90,7)                               |                             |
| kein Ergebnis                          | 3 (5,6)                                     | 2 (0,4)                                  |                             |
| <b><i>P2RY8-CRLF2</i></b>              |   |  | 0,387                       |
| negativ                                | 52 (96,3)                                   | 471 (95,5)                               |                             |
| positiv                                | 2 (3,7)                                     | 22 (4,5)                                 |                             |
| <b>Prednisone response*</b>            |   |  | 0,271                       |
| PGR                                    | 47 (87,0)                                   | 457 (92,7)                               |                             |
| PPR                                    | 6 (11,1)                                    | 35 (7,1)                                 |                             |
| kein Ergebnis                          | 1 (1,9)                                     | 1 (0,2)                                  |                             |
| <b>Risikogruppe nach<br/>MRD**</b>     |   |  | 0,396                       |
| Standardrisiko                         | 18 (33,3)                                   | 180 (36,5)                               |                             |
| Mittleres Risiko                       | 22 (40,7)                                   | 196 (39,8)                               |                             |
| Hochrisiko                             | 4 (7,4)                                     | 19 (3,9)                                 |                             |
| kein Ergebnis                          | 10 (18,5)                                   | 98 (19,9)                                |                             |

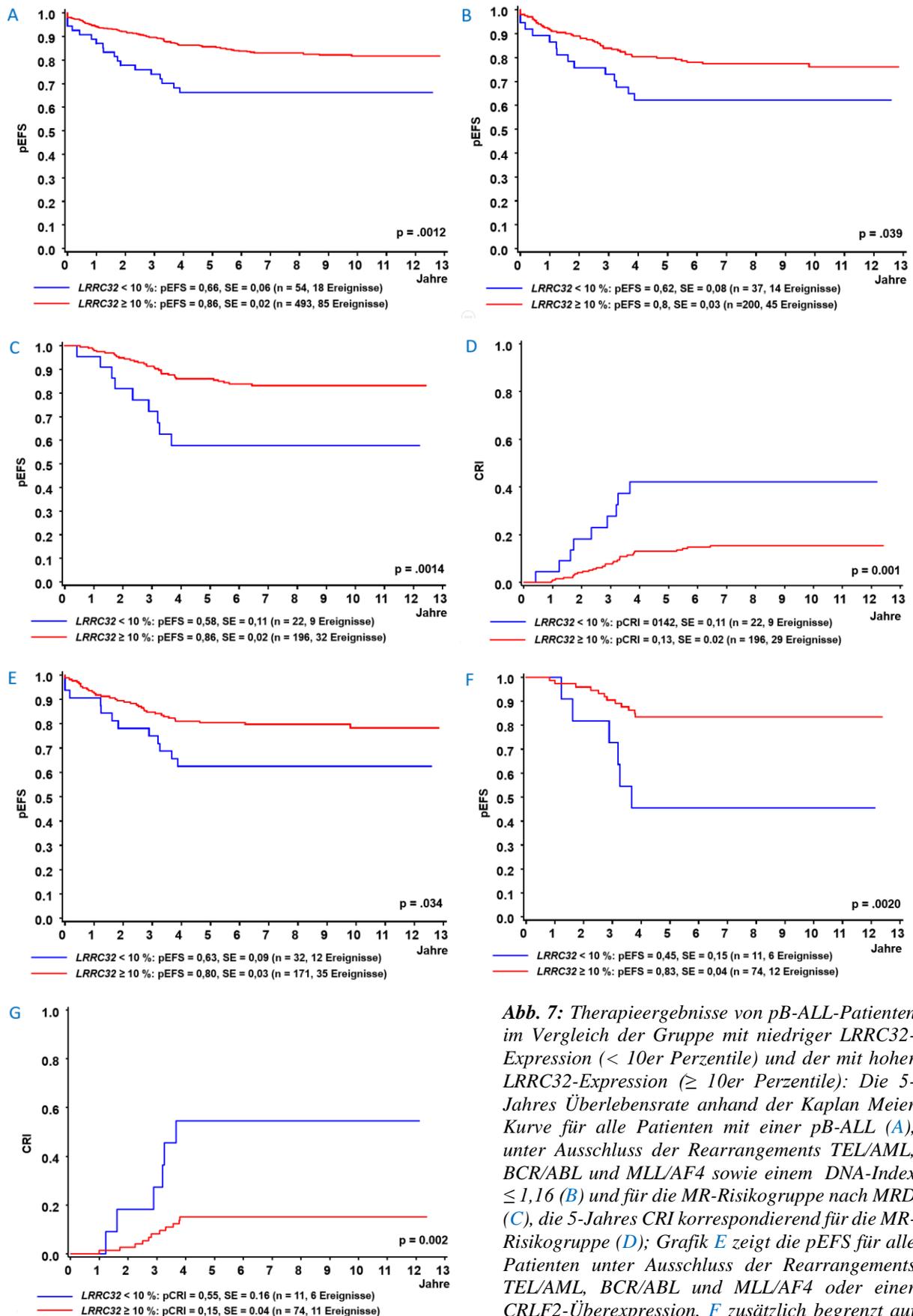
**Erläuterungen:** \* PGR: < 1000 leukämische Blasten/μl an Therapietag 8; PPR: ≥ 1000 leukämische Blasten/μl an Tag 8; \*\* Standardrisiko: keine MRD-Last an Zeitpunkt R1 und R2, Mittleres Risiko: MRD-Last < 10<sup>3</sup> an R1 und/oder R2, Hochrisiko: R2 ≥ 10<sup>3</sup>; # Vergleich der beiden Gruppen durch den Exakten Fisher-Test

Wie in den vorangegangenen Untersuchungen wurden auch hier 5-Jahres Überlebenskurven und entsprechende CRIs für die bereits interessanten Tendenzen in der Assoziation zum Immunphänotyp, zu genetischen Aberrationen und zur MRD-Stratifizierung erstellt:

Im Vergleich der beiden Expressionsgruppen mit einer pB-ALL konnte der bereits signifikante Unterschied der eindeutig ungünstigeren Prognose von Patienten mit sehr niedriger Genexpression noch stärker verdeutlicht werden (pEFS  $0,66 \pm 0,06$  vs.  $0,86 \pm 0,02$ ;  $p = 0,0012$ ). Bemerkenswert war die Signifikanzsteigerung unter Ausschluss der bekannten Prognose-assoziierten genetischen Veränderungen (pEFS  $0,62 \pm 0,08$  vs.  $0,8 \pm 0,03$ ;  $p = 0,039$ ) und in der MR-Gruppe nach MRD (pEFS  $0,58 \pm 0,11$  vs.  $0,86 \pm 0,02$ ;  $p = 0,0014$ ). Das deutlich schlechtere Therapieergebnis in der MR-Gruppe war in einer hohen Rezidivrate begründet, wobei die Übereinstimmung der Anzahl der Ereignisse der Überlebenskurve – 9 Ereignisse in 22 Patienten - mit der Anzahl der Rezidive auffällig war (CRI  $0,13 \pm 0,02$  vs.  $0,42 \pm 0,11$ ;  $p = 0,001$ ) (siehe Abbildung 7).

Wie in der Einleitung beschrieben, erfolgte die Identifikation der Kandidatengene im Vergleich der Patienten mit Überexpression von *CRLF2*, die durch die *P2RY8-CRLF2*-Fusion charakterisiert sind und eine sehr schlechte Prognose haben, mit den *CRLF2*-überexprimierten Patienten ohne Fusion, die eine gute Prognose besitzen. Um zu untersuchen, ob die Assoziation einer niedrigen *LRRC32*-Expression mit einer schlechten Prognose auch unabhängig von der *CRLF2*-Expression bestehen blieb, wurden zusätzlich zu den aufgrund der bekannten genetischen Markern charakterisierten Patienten alle Proben ausgeschlossen, bei denen *CRLF2* hochexprimiert ist. Auch in dieser Kohorte zeigte sich die deutlich geringere 5-Jahres EFS-Rate bei sehr niedriger *LRRC32*-Expression (pEFS  $0,63 \pm 0,09$  vs.  $0,8 \pm 0,03$ ;  $p = 0,034$ ) (siehe Abbildung 7).

Aufgrund dieser Beobachtungen wurden darauf alle Patienten der MR-Gruppe ohne *TEL/AML*- oder *MLL/AF4*-Rearrangement oder *CRLF2*-Überexpression und mit einem DNA-Index  $\leq 1,16$  zu einer neuen Kohorte zusammengefasst und getestet. Wiederum konnte das erheblich geringere ereignisfreie Überleben von Patienten der niedrigen Expressionsgruppe von *LRRC32* im Vergleich zur hochexprimierten Gruppe beschrieben werden (pEFS  $0,45 \pm 0,15$  vs.  $0,83 \pm 0,04$ ;  $p = 0,002$ ). Auch dieses Therapieversagen korrelierte mit einer hohen Anzahl an Krankheitsrückfällen, wobei erneut die Übereinstimmung der Anzahl an Ereignissen und Rezidiven – 6 Ereignisse in 9 Patienten – beobachtet werden konnte (CRI  $0,15 \pm 0,04$  vs.  $0,55 \pm 0,16$ ;  $p = 0,002$ ) (siehe Abbildung 7).



**Abb. 7:** Therapieergebnisse von pB-ALL-Patienten im Vergleich der Gruppe mit niedriger LRRC32-Expression (< 10er Perzentile) und der mit hoher LRRC32-Expression ( $\geq$  10er Perzentile): Die 5-Jahres Überlebensrate anhand der Kaplan Meier Kurve für alle Patienten mit einer pB-ALL (A), unter Ausschluss der Rearrangements TEL/AML, BCR/ABL und MLL/AF4 sowie einem DNA-Index  $\leq 1,16$  (B) und für die MR-Risikogruppe nach MRD (C), die 5-Jahres CRI korrespondierend für die MR-Risikogruppe (D); Grafik E zeigt die pEFS für alle Patienten unter Ausschluss der Rearrangements TEL/AML, BCR/ABL und MLL/AF4 oder einer CRLF2-Überexpression, F zusätzlich begrenzt auf Patienten der MR-Risikogruppe nach MRD, dazu in G die entsprechende 5-Jahres CRI.

3.5.1 Multivariate Analysen zur prognostischen Relevanz der *LRRC32*-Expression

Um zu prüfen, ob die niedrige *LRRC32*-Expression einen unabhängigen prognostischen Wert besitzt, erfolgte im nächsten Schritt die multivariate Cox-Regressionsanalyse unter Einschluss bekannter prognostischer Parameter. Hierbei zeigt sich, dass die *LRRC32*-Expression zwar bei Betrachtung der Gesamtkohorte keinen unabhängigen prognostischen Wert besitzt, diesen jedoch innerhalb der MRD-MR-Gruppe aufweist (siehe Tabelle 5).

**Tab. 5:** Multivariate Cox-Regressionsanalyse für das Rezidivrisiko in Patienten mit einer pB-ALL

| Marker                               | Gesamte Kohorte |              |         | Mittlere Risikogruppe nach MRD |             |       |
|--------------------------------------|-----------------|--------------|---------|--------------------------------|-------------|-------|
|                                      | HR              | 95 % KI      | P       | HR                             | 95 % KI     | P     |
| <i>LRRC32</i> niedrig                | 2,22            | 0,88 – 5,56  | 0,091   | 2,44                           | 1,03 – 5,56 | 0,041 |
| Mädchen                              | 0,52            | 0,27 – 0,99  | 0,048   | 0,5                            | 0,25 - 1    | 0,051 |
| Alter ≥ 10 Jahre                     | 1               | 0,51 – 1,95  | 0,997   | 0,99                           | 0,46 – 2,11 | 0,976 |
| Anzahl initialer Leukozyten ≥ 50.000 | 2,09            | 1,14 – 3,86  | 0,018   | 2,63                           | 1,37 – 5,07 | 0,004 |
| DNA-Index                            | 1,03            | 0,38 – 2,76  | 0,959   | 0,97                           | 0,36 – 2,63 | 0,954 |
| <i>P2RY8/CRLF2</i>                   | 2,56            | 0,72 -9,09   | 0,143   | 2,94                           | 1,14 – 7,69 | 0,026 |
| <i>BCR/ABL, MLL/AF4</i>              | 3,37            | 0,75 – 15,13 | 0,113   | -                              | -           | -     |
| <i>TEL/AML</i>                       | 1,12            | 0,5 – 2,52   | 0,784   | 1,08                           | 0,47 – 2,5  | 0,854 |
| MRD-SR                               | 0,36            | 0,16 – 0,79  | 0,011   | -                              | -           | -     |
| MRD-HR                               | 6,04            | 2,45 – 14,86 | < 0,001 | -                              | -           | -     |

**Erläuterungen:** HR: Hazard Ratio; 95 % KI: 95 % Konfidenzintervall für das Hazard Ratio; P: p-Wert des ‚likelihood-ratio‘-Tests

### 3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die wesentliche Zielsetzung dieser Untersuchungen war die Frage nach einer Assoziation von Expression der Gene *LRRC32*, *BMP6* und *VPREB1* und Therapieergebnis hinsichtlich prognostischer Relevanz in Patienten mit einer kindlichen ALL.

Die Gene *BMP6* und *VPREB1* konnten in keiner der eingeteilten Subgruppen signifikant mit einem bestimmten Therapieergebnis in Verbindung gebracht werden.

Für *LRRC32* hingegen wurde eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit eines Therapieversagens in Patienten mit einer pB-ALL bei sehr niedriger Expression beobachtet, besonders in Patienten der MRD-MR-Risikogruppe. Auch unter Ausschluss der bekannten Marker und sogar ohne Berücksichtigung von Patienten mit einer *CRLF2*-Überexpression bestätigte sich diese Assoziation. Als besonders bemerkenswert erwies sich auch, dass die Anzahl der Ereignisse unter Therapie sowohl in der gesamten MRD-MR-Gruppe als auch in der kleineren Kohorte der MRD-MR-Risikogruppe ohne die bekannten genetischen Marker und ohne *CRLF2*-Überexpression genau mit der Anzahl der Krankheitsrückfälle übereinstimmte.

---

## 4 DISKUSSION

In den letzten drei Jahrzehnten konnten bahnbrechende Erfolge in der Therapie der kindlichen ALL erzielt werden, sodass durch die derzeitigen Behandlungsschemata nahezu 80 % der Patienten eine langfristige Heilung erfahren. Jedoch erleiden immer noch 20 % der Kinder einen Rückfall ihrer Erkrankung, deren dauerhafte Genesungsrate sehr viel geringer ist. [79, 80] Unbedingt erwähnenswert sind auch die teils schwerwiegenden Nebenwirkungen der sehr toxischen Therapie, wie beispielsweise die Entwicklung von Kardiomyopathien, Funktionsstörungen der Nieren oder des endokrinen Systems und auch das Auftreten von Zweitmalignomen, die nicht nur unter Behandlung, sondern auch Jahre danach das Leben der Patienten häufig drastisch beeinträchtigen. [81]

Daher muss die Therapieoptimierung weiterhin eine dringende Herausforderung bleiben. Dies kann möglicherweise durch die Identifikation neuer molekularer Marker geschehen, die schon initial eine Vorhersage des Krankheitsverlaufes erlauben und somit die benötigte Therapie abschätzen lassen. In zahlreichen Studien zur Untersuchung der unterschiedlichsten Erkrankungen konnte bereits gezeigt werden, dass Genexpressionsanalysen eine nützliche Methode zur Erkennung dieser Marker sein können. [82, 83] Erstrebenswert wäre dies beispielsweise für die Patienten, die im Rahmen der ALL BFM-Studie in die MR-Risikogruppe nach MRD-Diagnostik mit nur gering intensiviertem Therapieschema stratifiziert werden. [31] Auch wenn die relative Zahl an Rezidiven in der HR-Gruppe am höchsten ist, stammen die absolut gesehen meisten Rezidive aus der zahlenmäßig größten MR-Gruppe, ohne dass bisher erkennbar war, welche der MR-Patienten zu einem Rückfall neigen; hilfreiche prognostische Charakteristika dieser Subgruppe fehlen noch. Ziel muss es also bleiben, die Behandlung für den einzelnen Patienten noch weiter zu individualisieren, sodass diejenigen, die eine schlechte Prognose besitzen, genügend Therapie erhalten, aber auch die Patienten mit einem günstigen Krankheitsverlauf nur so viel Behandlung bekommen, wie sie auch benötigen. Ebenso können Veränderungen oder Abweichungen in den Wachstums- und Entwicklungsprozessen von erkrankten Blutzellen möglicherweise aufgrund der molekularen Darstellung besser verstanden werden und in den Kontext von schon bekannten Pathomechanismen integriert und ergänzt werden. Dies könnte als Ansatzpunkt für eine aussagekräftige Diagnostik genutzt werden, die zusammen mit einer zielgerichteten Therapie als potente Gesamtbehandlung zum Einsatz käme.

## 4.1 Prognostische Relevanz der Expression der Kandidatengene

Schon in mehreren Publikationen zur Fragestellung nach einer Therapieoptimierung der kindlichen ALL wurde erkannt, dass die meisten Kinder mit einem manifesten Rezidiv zum Zeitpunkt der Diagnosestellung oder während der initialen Behandlung nicht als HR-Patienten erkannt werden und dementsprechend keine speziell intensivierete Behandlung erhalten. [31, 80] Daher wurde der Anspruch auf die Identifikation neuer und geeigneter Marker, die diese Patienten möglicherweise charakterisieren, als wesentliches Forschungsziel formuliert und unter anderem mittels Genexpressionsanalysen verfolgt. Die dieser Arbeit zugrunde liegende Studie untersuchte das Therapieergebnis von Patienten mit einer pB-ALL und einer Überexpression von *CRLF2*, bei denen beobachtet wurde, dass nur das Rearrangement *P2RY8/CRLF2* mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert ist. [47] Die drei Kandidatengene wurden in der Subgruppe mit *P2RY8-CRLF2*-Fusion als dereguliert identifiziert: Im Vergleich zur *CRLF2*-hochexprimierenden Kontrollgruppe ohne die Fusion mit vergleichsweise guter Prognose waren *LRRC32* und *BMP6* niedriger, *VPREB1* hingegen höher exprimiert. [48] Ableitend aus diesem Zusammenhang galten die drei Gene als vielversprechend zur weiteren Untersuchung mit Hinblick auf eine mögliche prognostische Relevanz.

Die Genexpressionsmessungen zu *BMP6* und *VPREB1* zeigten in dem *CRLF2*-unabhängigen Kollektiv keine prognostische Relevanz, deswegen werden diese Ergebnisse in Kapitel 4.3 diskutiert.

### 4.1.1 *LRRC32*-Expression als möglicher prognostischer Marker

Es konnte eindrücklich gezeigt werden, dass die niedrige Genexpression von *LRRC32* in Patienten mit einer pB-ALL in signifikantem Zusammenhang mit einem ungünstigem Therapieergebnis nach fünf Jahren steht. So differiert die Wahrscheinlichkeit, sowohl die akute Behandlungszeit als auch die folgenden Jahre ereignisfrei zu überleben, zwischen 66 %  $\pm$  6 % bei sehr niedriger und 86 %  $\pm$  2 % bei hoher *LRRC32*-Expression. Aufgrund der genannten Motivation, einen neuen Marker besonders für die Kinder mit einer hohen Rezidivwahrscheinlichkeit zu finden, blieb die Frage nach einer bestehenden Konstanz dieses Ergebnisses auch unter Ausschluss aller Risikokriterien der ALL BFM-Studie und der *CRLF2*-hochexprimierenden Proben. Bemerkenswerterweise verdeutlichte sich der Unterschied im ereignisfreien Überleben bei einer Wahrscheinlichkeit von 45 %  $\pm$  15 % für die *LRRC32*-niedrigexprimierenden Patienten im Vergleich zu den hochexprimierenden Patienten mit

83 %  $\pm$  4 %. Unterstützend hierfür begründete sich die schlechte Prognose von Patienten mit niedriger Genexpression hauptsächlich in einer hohen Rezidivrate. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse stellt sich die Genexpression von *LRRC32* als unabhängiger prognostischer Faktor für Patienten mit einer pB-ALL der MRD-MR-Risikogruppe dar.

Viele verschiedene prognostische Parameter konnten in den letzten Jahren für die kindliche ALL identifiziert werden und sicherlich werden in naher Zukunft noch einige hinzukommen. So konnte beispielsweise die Deletion des Gens *IKZF1* oder auch eine hohe Expression des Proteins CD45 in Leukämiezellen mit einer schlechten Prognose assoziiert werden - auch hier hauptsächlich für Patienten aus der MR-Gruppe und begründet durch eine hohe Anzahl an Rezidiven. [82, 84-86] Wenn die klassischen Stratifizierungsmarker durch diese neuen Merkmale ergänzt werden können, ist die Zuversicht groß, dass die Therapieplanung noch effizienter und individueller wird. Patienten, die mit hoher Wahrscheinlichkeit einen Rückfall ihrer Erkrankung erfahren werden, könnten früher als HR-Patienten erkannt und dementsprechend behandelt werden. Die Messung des *LRRC32*-Status könnte hierzu einen wichtigen Beitrag leisten und als additives Hilfsmittel Teil dieser neuen Gruppe von Klassifikatoren werden. Zweifelsohne benötigt diese Aussage noch weitere und breiter aufgestellte Untersuchungen, die eine noch größere Anzahl von Patienten berücksichtigen. Dies könnte in Kombination mit der Testung einiger der kürzlich entdeckten Marker geschehen, um einen neuen molekularen Prädiktor des Therapieansprechens zu etablieren.

## **4.2 Interpretation der Genexpressionsdaten von *LRRC32* hinsichtlich möglicher Pathomechanismen**

Die Auswertung von Genexpressionsanalysen erkrankter Zellen ermöglicht Hypothesen über biologische Zusammenhänge zu stellen und versucht die Mechanismen von sowohl physiologischen als auch pathologischen Zellvorgängen zu verstehen.

Das *LRRC32*-Gen ist auf Chromosom 11q14 lokalisiert, besteht aus vier Exons und kodiert für das Typ-1-Membranprotein GARP, welches 20 ‚leucine-rich-repeats‘ enthält. Die Expression von GARP ist sowohl auf T<sub>regs</sub> als auch auf Thrombozyten und mesenchymalen Stammzellen beschrieben worden. [87-90] Generell ist noch wenig über die physiologische Funktion dieses Gens und auch des Proteins oder dessen Involvierung in Pathologien bekannt, doch zahlreiche Publikationen beschäftigen sich mit dieser Thematik.

So erkannten Stockis et al., dass der Rezeptor GARP den Komplex aus LTBP und dem Signalmolekül TGF-beta bindet, wenn es auf T<sub>regs</sub> exprimiert wird. [52] T<sub>regs</sub> sind eine spezielle Subgruppe von T-Lymphozyten und besitzen die unentbehrliche Aufgabe, die Aktivität des Immunsystems zum Zweck der Selbsttoleranz zu unterdrücken. Jedoch konnten T<sub>regs</sub> auch in großer Zahl in Tumorgewebe nachgewiesen werden, wo sie die Effektorfunktionen von beispielsweise zytotoxischen T-Zellen hemmen und dadurch die Tumorentwicklung begünstigen. [91] Während Chen et al. zeigten, dass T<sub>regs</sub> die körpereigene Tumormunität supprimieren, besonders, wenn sie durch TGF-beta stimuliert werden, deklarierten Wan et al., dass die Aktivierung von T<sub>regs</sub> über TGF-beta auch zur einer verstärkten Immunreaktion gegen Tumorzellen führen kann. [92, 93] Die Effekte von TGF-beta auf T<sub>regs</sub> scheinen folglich sehr heterogen und vielschichtig zu sein.

TGF-beta ist ein hochpotentes Zytokin mit diversen Effekten auf hämatopoetische Zellen, insbesondere auf die Erhaltung der Immuntoleranz durch Regulation von Lymphozytenproliferation und -differenzierung. [94] Im Wesentlichen gilt TGF-beta als Inhibitor von Wachstum und Maturation seiner Zielzellen, es kann unter bestimmten Bedingungen aber auch eine mitogene und proliferative Wirkung auf verschiedene Zellreihen ausüben. [95]

GARP könnte folglich eine Schlüsselrolle in der hochsensiblen Biologie der Immunmodulation und der Proliferationsaktivität vieler verschiedener Zelltypen besitzen und zu dessen besseren Verständnis beitragen. Viele Aussagen verbleiben noch unklar und benötigen dringend weitere Untersuchungen. Möglicherweise könnte die Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit hierzu gedankliche Anstöße liefern:

Das untersuchte Gen *LRRC32* war bei Patienten mit einer pB-ALL mit *P2RY8-CRLF2*-Fusion, die eine schlechte Prognose besitzen, niedriger exprimiert und auch in dem großen Kollektiv dieser Arbeit zeigte sich, dass eine sehr niedrige Genexpression mit einem schlechten Therapieergebnis und einer hohen Rezidivrate assoziiert werden kann.

Vorstellbar wäre, dass die verminderte Expression von GARP zu einer verringerten Kontrolle der Immunregulation durch T<sub>regs</sub> nach Aktivierung von TGF-beta führen könnte. Die körpereigene Tumormunität könnte auf diese Weise herabgesetzt werden, sodass die leukämischen Blasten nicht als immunologisch fremd erkannt würden und länger unentdeckt persistieren könnten. Somit wäre eine Korrelation zu der erhöhten Anzahl an Rezidiven gegeben.

Des Weiteren findet sich die Überlegung, dass die untersuchte cDNA aus Knochenmark oder peripherem Blut neben der genetischen Information von hämatopoetischen Zellen auch

Erbmaterial von Mesenchymzellen, Makrophagen, Adipozyten oder Endothelzellen enthält. Diese Zellen befinden sich hauptsächlich in den so genannten Knochenmarksnischen, wo sie weitreichende Effekte auf die dortigen Blutstammzellen haben. Carilloo-Galvez et al. konnten zeigen, dass die Stilllegung von GARP zu einer verminderten Oberflächenexpression von TGF-beta auf mesenchymalen Stammzellen führt, während gleichzeitig eine gesteigerte Sekretion und Aktivierung von TGF-beta beobachtet werden konnte. [89] So könnte vermutet werden, dass die sehr niedrige Expression von *LRRC32* auf eben solchen Stromazellen eine vermehrte inhibitorische Aktivität von TGF-beta auf die leukämischen Blasten zur Folge hätte. Wie zuvor beschrieben, reguliert TGF-beta die Differenzierung und Proliferation von Zellen durch Eingriff in den Zellzyklus. Die leukämischen Blasten könnten über diesen Weg möglicherweise in einen Zellzyklusarrest gebracht werden. Da die zur Behandlung verwendeten Chemotherapeutika vordergründlich in Zellproliferationsvorgänge eingreifen, könnten sich die Blasten der Therapietoxizität entziehen und für einen längeren Zeitraum überleben. Dieses könnte dann ein Grund für die eingeschränkte Effektivität der Therapie hinsichtlich einer dauerhaften Heilung und dementsprechend für die hohe Rezidivanzahl in Patienten mit einer sehr niedrigen Expression von *LRRC32* sein.

Jedoch muss auch hier erneut die weiterführende Analyse dieses möglichen Zusammenhangs tituliert werden, da die Komplexität der Entstehung einer Leukämie mit Bezug auf immunmodulatorische Prozesse immense Kenntnisse über Grundlagen und Zusammenhänge fordert.

### **4.3 Ergebnisbewertung der Genexpressionsmessungen von *BMP6* und *VPREB1***

Die Ergebnisse der Genexpressionsmessungen für *BMP6* und *VPREB1* konnten in keiner der getesteten Subgruppen signifikant zu einem bestimmten Therapieergebnis assoziiert werden. In der *P2RY8-CRLF2*-Fusionsgruppe waren beide Gene im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant differentiell exprimiert, jedoch konnte dieses Ergebnis nicht repräsentativ für das größere, *CRLF2*-unabhängige Kollektiv dieser Arbeit validiert werden. Somit erlauben die vorliegenden Ergebnisse auch keine Rückschlüsse auf denkbare Pathomechanismen der ALL. Für diese Ergebnisse finden sich folgende Überlegungen:

Möglicherweise liegt eine Begründung in der geringen Probenanzahl der dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchung: Es wurden 87 Patienten mit hoher *CRLF2*-Expression,

darunter 48 Patienten mit Fusion und 39 Patienten ohne Fusion, getestet. So wäre es denkbar, dass die Identifikation der Kandidatengene zufallsbedingt war oder andere Faktoren die Zusammenstellung der Patientenkohorte beeinflusst haben.

Ferner wurden in der Auswertung der Ergebnisse die Proben getrennt nach dem Immunphänotyp betrachtet, jedoch wurden die immunologischen Subgruppen nicht weiter unterteilt. In der Gruppe der pB-ALL wurden alle Patienten mit einer prä-B-ALL, einer cALL oder einer pro-B-ALL zusammengefasst, deren Leukämiezellen folglich alle der B-Linie angehören, aber in einen unterschiedlichen Reifestatus arretiert sind. Daher könnte vermutet werden, dass die Expression von *BMP6* und *VPREB1* nicht einheitlich in diesen Entwicklungsstadien ist, sondern in Analogie zum Nutzen des momentanen Bedarfs der Zelle exprimiert wird. Verantwortlich für diese Änderungen in der quantitativen Genexpression wären dann genregulatorische Prozesse, die die Aktivität der Gene in einem bestimmten Zellzustand steuern. Die Expression der Gene kann in fast allen Schritten der Umsetzung von DNA in RNA beeinflusst werden: Dies kann zum Beispiel initial durch eine Modifikation von Transkriptionsfaktoren in der Initiation der Transkription geschehen, über Regulation der Termination, durch spezifische Steuerung der Translation oder auch durch den Abbau von RNA-Fragmenten. [96, 97]

Des Weiteren könnte auch die Epigenetik eine Rolle spielen, die einen großen Einfluss auf die Differenzierung und Vererbbarkeit von Merkmalen besitzen kann. Der Begriff der Epigenetik umschreibt Mechanismen und Konsequenzen vererbbarer Chromosomenmodifikationen, die nicht auf Veränderungen der DNA-Sequenz beruhen, sondern potentiell auf Umwelteinflüsse zurückzuführen sind. Die wesentlichen epigenetischen Modifikationen sind nachträgliche Veränderungen bestimmter DNA-Basen (DNA-Methylierung) und die Abwandlung des Chromatins (Histon-Modifikationen). [98, 99]

Außerdem könnte die Expression von *BMP6* und *VPREB1* in Verbindung mit dem Auftreten einer hohen *CRLF2*-Expression stehen, speziell mit der *P2RY8-CRLF2*-Fusion, sodass sich die Expressionsdaten der beiden Gene in dem untersuchten *CRLF2*-unabhängigen Kollektiv nicht mehr repräsentativ zeigten. Es konnte beobachtet werden, dass eine hohe Expression von *CRLF2* eine Rolle in der Transformation der pB-ALL spielt und besonders die *P2RY8-CRLF2*-Fusion zu einer Hochregulation der Expression von *CRLF2* führt. [100, 101] So wäre es denkbar, dass diese Transformation möglicherweise sekundär die Expression von *BMP6* und *VPREB1* beeinflusst, beispielsweise durch den Verlust der Gene, die aufgrund der Fusion deletiert wurden. Diesbezüglich existieren in der Literatur derzeit aber keine Hinweise.

Zusammenfassend weisen die vorliegenden Ergebnisse auf eine hohe Heterogenität und Komplexität der kindlichen ALL hin, die über die Genexpressionsmessungen von *BMP6* und *VPREB1* in dem untersuchten Kollektiv nicht weiter geklärt werden konnten.

#### 4.4 Einordnung der Ergebnisse und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Assoziation der quantitativen Genexpression der drei Gene *LRRC32*, *BMP6* und *VPREB1* und dem Therapieergebnis von Kindern mit einer ALL hinsichtlich möglicher prognostischer Relevanz. Rückschlüsse der Genexpressionsdaten auf mögliche Pathomechanismen der ALL-Erkrankung wurden unter Berücksichtigung der Ergebnisse gezogen.

In Hinblick auf eine Assoziation von *LRRC32* mit prognostischen Daten in einer kindlichen ALL existieren zum jetzigen Zeitpunkt keine Studien, die dieser Frage systematisch nachgegangen sind und für einen Vergleich zur Verfügung stehen. Zwar konnte dieses Gen oder dessen Protein GARP in Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungsprozessen gesetzt werden, jedoch wurden hauptsächlich Pathologien unter Mitwirken von  $T_{\text{regs}}$ , wie beispielsweise der asthmatischen Erkrankung, beschrieben. [102-104] Eine Verbindung von *LRRC32* mit einer Erkrankung des blutbildenden Systems konnte bisher nicht gezeigt werden. Die vorliegende Arbeit hingegen lässt vermuten, dass *LRRC32* eine wichtige Rolle in der Prognoseabschätzung einer kindlichen ALL spielen könnte, besonders hinsichtlich der Rezidivneigung. Um diese Aussage noch weiter zu bestärken, wäre eine Testung in einem noch größeren Patientenkollektiv notwendig. Interessant wäre möglicherweise auch die weitere Verfolgung der Expression von *LRRC32* in Patienten mit einer T-ALL, die in dieser Arbeit eine tendenzielle prognostische Relevanz aufzeigte, aber aufgrund von einer zu geringen Probenanzahl vernachlässigt wurde. Des Weiteren könnte die Beobachtung der deutlich höheren Anzahl an Rezidiven bei Patienten mit sehr niedriger Expression des Gens noch genauer untersucht werden, indem beispielsweise geklärt werden könnte, zu welchem Zeitpunkt unter Therapie sich die Rezidive ereignet haben und in welchem Körpersegment das Rezidiv lokalisiert wurde. So könnte die Aussage über die Art des Rezidivs noch genauer definiert werden und die Therapieplanung erleichtert werden.

Auch für das *BMP6*-Gen wurden bisher keine Studien veröffentlicht, die sich mit der prognostischen Fragestellung dieser Arbeit befassen. Allerdings konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression von *BMP6* und einer unreifen Differenzierung von Blutzellen

nachgewiesen werden. [105] Ein wachstumsfördernder Effekt dieses Gens auf leukämische Zellen wurde ebenfalls beschrieben. [106]

*VPREB1* hingegen konnte in einer Arbeit aus den Niederlanden mit einer schlechten Prognose in Kindern mit einer ALL in Verbindung gebracht werden, indem die Deletion dieses Gens bei Patienten mit dem *BCR-ABL-like*-Genexpressionsprofil nachgewiesen werden konnte. [45] Diese Korrelation wurde auch mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit bei Kindern mit Down Syndrom und einer ALL beschrieben. [107] Diese Zusammenhänge ließen sich in dieser Arbeit aber nicht bestätigen. Eventuell besitzt das *VPREB1*-Gen erst in Kombination mit anderen deregulierten Genen eine prognostische Relevanz und wäre dann möglicherweise Teil eines charakterisierenden Genprofils, wie Den Boer et al. schon andeuten.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Akute Lymphoblastische Leukämie (ALL) ist die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung des Kindesalters, pro Jahr erkranken in Deutschland ca. 500 Kinder an einer ALL. Trotz enormer Fortschritte in der Therapie der ALL erleiden noch immer 15 - 20 % der Patienten ein Rezidiv ihrer Erkrankung, zudem sind akute Nebenwirkungen und Langzeitfolgen erheblich. Ziel muss es deshalb unbedingt bleiben, die risikoadaptierte Therapie weiter zu optimieren, um noch mehr Kindern eine langfristige Heilung zu ermöglichen.

Dies kann möglicherweise durch die Identifikation neuer molekularer Marker geschehen, die diejenigen Patienten schon zum Diagnosezeitpunkt oder während der initialen Therapie als Hochrisikopatienten charakterisieren, die noch nicht als solche gelten, aber mit einer hohen Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv erleiden werden. Diese Marker könnten eine Vorhersage des Krankheitsverlaufes erlauben und dementsprechend die benötigte Therapie abschätzen lassen. Im Rahmen der ALL BFM 2000-Studie konnte gezeigt werden, dass in einer Subgruppe der pB-ALL das *CRLF2*-Gen aufgrund unterschiedlicher Aberrationen überexprimiert wird, dass aber nur die *P2RY8-CRLF2*-Fusion mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Zur Untersuchung des unterschiedlichen Therapieansprechens innerhalb der *CRLF2*-hochexprimierenden Subgruppe wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt, die potentiell neue prognostische Marker identifizierten.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese Kandidatengene - *LRRC32*, *BMP6* und *VPREB1* - in einem unselektierten Studienset von 647 Patienten mittels Duplex quantitativer Real Time-PCR hinsichtlich ihrer prognostischen Relevanz untersucht. Rückschlüsse der Genexpressionsdaten auf mögliche Pathomechanismen der ALL-Erkrankung wurden unter Berücksichtigung der Ergebnisse gezogen.

Während die Genexpressionsdaten von *BMP6* und *VPREB1* in dem unselektierten Kollektiv keine prognostische Relevanz zeigten, ergaben die Untersuchungen zu *LRRC32*, dass eine sehr niedrige Expression des Gens in Patienten mit einer pB-ALL mit einem ungünstigen Therapieergebnis assoziiert ist. Hauptsächlich begründet sich dieses Ergebnis in einer hohen Anzahl an Rezidiven. Somit könnten die Expressionsdaten von *LRRC32* prognostisch wertvoll sein, besonders für Patienten der mittleren Risikogruppe nach MRD, aus denen sich die meisten Krankheitsrückfälle rekrutieren. In Kombination mit den kürzlich entdeckten prognostischen

Parametern könnte die Messung des *LRRC32*-Status als additives Hilfsmittel der bekannten Marker zur Therapieoptimierung der kindlichen ALL beitragen.

Zudem könnten die Ergebnisse darauf hinweisen, dass die Expression von *LRRC32* bzw. GARP eine wichtige Rolle in der Immunkontrolle sowie von Proliferation und Differenzierung der leukämischen Blasten spielt.

Zusammenfassend führten die hier vorgestellten Untersuchungen zum einen zur Identifikation eines neuen potentiellen prognostischen Markers, zum anderen zu einem möglicherweise verbesserten Verständnis von Therapieresistenz bei der ALL im Kindes- und Jugendalter.

---

**LITERATURVERZEICHNIS**

1. Impach, P. and T. Kühne, *Kompendium Kinderonkologie*. Vol. 2. 1999, Heidelberg: Springer Verlag.
2. Hasle, H., I.H. Clemmensen, and M. Mikkelsen, [*Incidence of cancer in individuals with Down syndrome*]. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 2000. **120**(24): p. 2878-81.
3. Ford, A.M., et al., *In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias*. *Nature*, 1993. **363**(6427): p. 358-60.
4. Hiddemann, W. and C.R. Bartram, *Die Onkologie*. Vol. 2. 2010, Heidelberg: Springer Verlag.
5. Vigliani, E.C. and G. Saita, *Benzene and Leukemia*. *N Engl J Med*, 1964. **271**: p. 872-6.
6. Preston, D.L., et al., *Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987*. *Radiat Res*, 1994. **137**(2 Suppl): p. S68-97.
7. Lehtinen, M., et al., *Maternal herpesvirus infections and risk of acute lymphoblastic leukemia in the offspring*. *Am J Epidemiol*, 2003. **158**(3): p. 207-13.
8. Kinlen, L.J. and A. Balkwill, *Infective cause of childhood leukaemia and wartime population mixing in Orkney and Shetland, UK*: *Lancet*. 2001 Mar 17;**357**(9259):p. 858.
9. Greaves, M.F. and F.E. Alexander, *An infectious etiology for common acute lymphoblastic leukemia in childhood?* *Leukemia*, 1993. **7**(3): p. 349-60.
10. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group*. *Br J Haematol*, 1976. **33**(4): p. 451-8.
11. Behm, F.G., *Morphologic and cytochemical characteristics of childhood lymphoblastic leukemia*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1990. **4**(4): p. 715-41.
12. McKenna, R.W., *Multifaceted approach to the diagnosis and classification of acute leukemias*. *Clin Chem*, 2000. **46**(8 Pt 2): p. 1252-9.
13. Bene, M.C., et al., *Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)*: *Leukemia*. 1995 Oct;**9**(10):p. 1783-6.
14. Cario, G., et al., *Distinct gene expression profiles determine molecular treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 2005. **105**(2): p. 821-6.
15. Woo, H.Y., et al., *Molecular cytogenetic analysis of gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *J Korean Med Sci*, 2005. **20**(1): p. 36-41.

16. Vardiman, J.W., et al., *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes*. Blood, 2009. **114**(5): p. 937-51.
17. Vardiman, J.W., N.L. Harris, and R.D. Brunning, *The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms*. Blood, 2002. **100**(7): p. 2292-302.
18. Yeoh, E.J., et al., *Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling*. Cancer Cell, 2002. **1**(2): p. 133-43.
19. Shurtleff, S.A., et al., *TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis*. Leukemia, 1995. **9**(12): p. 1985-9.
20. Rubnitz, J.E. and A.T. Look, *Molecular genetics of childhood leukemias*. J Pediatr Hematol Oncol, 1998. **20**(1): p. 1-11.
21. Pui, C.H., W.M. Crist, and A.T. Look, *Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 1990. **76**(8): p. 1449-63.
22. Romana, S.P., et al., *High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 1995. **86**(11): p. 4263-9.
23. Ritterbach, J., et al., *Detection of hyperdiploid karyotypes (>50 chromosomes) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) using fluorescence in situ hybridization (FISH)*. Leukemia, 1998. **12**(3): p. 427-33.
24. Reiter, A., et al., *Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86*. Blood, 1994. **84**(9): p. 3122-33.
25. Schrappe, M., et al., *Long-term results of large prospective trials in childhood acute lymphoblastic leukemia*: Leukemia. 2000 Dec;**14**(12): p. 2193-4.
26. Riehm, H., et al., *Therapy results in five ALL-BFM studies since 1970: implications of risk factors for prognosis*. Haematol Blood Transfus, 1987. **30**: p. 139-46.
27. Tzortzatou-Stathopoulou, F., et al., *Low relapse rate in children with acute lymphoblastic leukemia after risk-directed therapy*. J Pediatr Hematol Oncol, 2001. **23**(9): p. 591-7.
28. van Dongen, J.J., et al., *Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood*. Lancet, 1998. **352**(9142): p. 1731-8.
29. Coustan-Smith, E., et al., *Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2000. **96**(8): p. 2691-6.
30. Riehm, H., A. Reiter, and M. Schrappe, *Die Corticosteroid-abhängige Dezimierung der Leukämiezellzahl im Blut als Prognosefaktor bei der akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter (Therapiestudie ALL-BMF 83)*. Klinische Pädiatrie, 1987. **199**(3): p. 151-161

31. Conter, V., et al., *Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study*. Blood, 2010. **115**(16): p. 3206-14.
32. Schrappe, M., A. Reiter, and M. Zimmermann, *Therapieprotokoll der ALL-BFM 2000-Studie zur Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit Akuter Lymphoblastischer Leukämie*. Fassung vom 1. Juli 2000.
33. van der Velden, V.H., et al., *Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects*. Leukemia, 2003. **17**(6): p. 1013-34.
34. Hammond, D., et al., *Analysis of prognostic factors in acute lymphoblastic leukemia*. Med Pediatr Oncol, 1986. **14**(3): p. 124-34.
35. Harbott, J., et al., *Clinical significance of cytogenetic studies in childhood acute lymphoblastic leukemia: experience of the BFM trials*. Recent Results Cancer Res, 1993. **131**: p. 123-32.
36. Raff, T., M. Brüggemann, and M. Kneba, *Klinische Bedeutung der minimalen Resterkrankung bei Leukämien*. Med Welt, 2004. **9**: p. 269-273.
37. Campana, D. and C.H. Pui, *Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance*. Blood, 1995. **85**(6): p. 1416-34.
38. Kulozik, A.E., C. Hagemeier, and B. CR., *3.5 Genrekombination als Grundlage einer spezifischen Immunantwort*. Molekulare Medizin, Grundlagen-Pathomechanismus-Klinik, 2000: p. 94-102.
39. Flohr, T., et al., *Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia, 2008. **22**(4): p. 771-82.
40. Cazzaniga, G., et al., *Results of minimal residual disease (MRD) evaluation and MRD-based treatment stratification in childhood ALL*. Best Pract Res Clin Haematol, 2002. **15**(4): p. 623-38.
41. Golub, T.R., et al., *Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring*. Science, 1999. **286**(5439): p. 531-7.
42. Beer, D.G., et al., *Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma*. Nat Med, 2002. **8**(8): p. 816-24.
43. Rosenwald, A., et al., *The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma*. N Engl J Med, 2002. **346**(25): p. 1937-47.
44. Downing, J.R., *Acute leukemia: subtype discovery and prediction of outcome by gene expression profiling*. Verh Dtsch Ges Pathol, 2003. **87**: p. 66-71.

45. Den Boer, M.L., et al., *A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study*. *Lancet Oncol*, 2009. **10**(2): p. 125-34.
46. Yoda, A., et al., *Functional screening identifies CRLF2 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(1): p. 252-7.
47. Cario, G., et al., *Presence of the P2RY8-CRLF2 rearrangement is associated with a poor prognosis in non-high-risk precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in children treated according to the ALL-BFM 2000 protocol*. *Blood*, 2010. **115**(26): p. 5393-7.
48. Schmah, J., et al., *Two subgroups of CRLF2-overexpressing pediatric acute lymphoblastic leukemias differ in outcome and gene expression*. *Klinische Pädiatrie*, 2014(Thieme). **226**: p. 196
49. Curiel, T.J., et al., *Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival*. *Nat Med*, 2004. **10**(9): p. 942-9.
50. Ikushima, H. and K. Miyazono, *TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression*. *Nat Rev Cancer*, 2010. **10**(6): p. 415-24.
51. Turk, M.J., et al., *Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells*. *J Exp Med*, 2004. **200**(6): p. 771-82.
52. Stockis, J., et al., *Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on the surface of activated human Treg*. *Eur J Immunol*, 2009. **39**(12): p. 3315-22.
53. Zhou, A.X., et al., *GARP-TGF-beta complexes negatively regulate regulatory T cell development and maintenance of peripheral CD4+ T cells in vivo*. *J Immunol*, 2013. **190**(10): p. 5057-64.
54. Kersten, C., et al., *BMP-6 inhibits human bone marrow B lymphopoiesis--upregulation of Id1 and Id3*. *Exp Hematol*, 2006. **34**(1): p. 72-81.
55. Ahmed, N., et al., *Effect of bone morphogenetic protein-6 on haemopoietic stem cells and cytokine production in normal human bone marrow stroma*. *Cell Biol Int*, 2001. **25**(5): p. 429-35.
56. Herzog, S., M. Reth, and H. Jumaa, *Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(3): p. 195-205.
57. English, D. and B.R. Andersen, *Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque*. *J Immunol Methods*, 1974. **5**(3): p. 249-52.
58. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal Biochem*, 1987. **162**: p. 156-159.
59. Boom, R., et al., *Rapid and simple method for purification of nucleic acids*. *Journal of clinical microbiology*, 1990. **28**: p. 495-503.

60. Schroeder, A., et al., *The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements*. BMC Mol Biol, 2006. **7**: p. 3.
61. Imbeaud, S., et al., *Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(6): p. 37-39.
62. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol, 1987. **155**: p. 335-50.
63. Kadowaki, H., et al., *Use of polymerase chain reaction catalyzed by Taq DNA polymerase for site-specific mutagenesis*. Gene, 1989. **76**(1): p. 161-6.
64. Saiki, R.K., et al., *Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase*. Science, 1998. **239**: p. 487-491.
65. Holzapfel, B. and L. Wickert, *Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)*. Biologie in unserer Zeit, 2007. **37**(Wiley-VCH): p. 120-126.
66. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method*. Methods Enzymol, 2001. **25**: p. 402-408.
67. Henegariu, O., et al., *Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol*. BioTechniques, 1997. **23**: p. 505-511.
68. Starr, C.R., et al., *Optimizing the Roche LightCycler(R) for Single-Tube Multiplexed RT-PCR Assays*. J Clin Diagn Res, 2015. **9**(1): p. 1.
69. Kaur, H., et al., *Thermodynamic, counterion and hydration effects for the incorporation of locked nucleic acid (LNA) nucleotides in duplex*. Nucleic Acids Symp Ser, 2008. **52**: p. 425-6.
70. Whitcombe, D., et al., *Detection of PCR product using self-probing amplicons and fluorescence*. Nat Biotechnol, 1999. **17**: p. 804-807.
71. Jacob, D., *Erkennung von Regulationssequenzen für die Transkription in heterologen Systemen*, in *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Diss.*, 2003, Humboldt-Universität Berlin: Berlin.
72. Vallone, P.M. and J.M. Butler, *AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures*. BioTechniques, 2004. **37**(2): p. 226-31.
73. Kaplan, E.L. and P. Meier, *Nonparametric estimation from incomplete observations*. J Am Stat Assoc., 1958. **53**: p. 457-481.
74. Mantel, N., *Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration*. Cancer Chemother Rep, 1966. **50**: p. 163-170.
75. Kalbfleisch, J.D. and R.L. Prentice, *The Statistical Analysis of Failure Time Data. 1st ed.* New York: John Wiley and Sons, 1980: p. 163-188.

76. Gray, R.J., *A class of K-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk*. Ann Stat. , 1988. **16**: p. 1141-1154.
77. Cox, D.R., *Regression models and life tables*. J.R. Stat Soc, 1972. **34**: p. 187.
78. Gravetter, F.J. and L.B. Wallnau, *Statistics for the behavioral sciences*. 2009, Wadsworth Cengage Learning: Belmont.
79. Schrappe, M., et al., *Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995*. Berlin-Frankfurt-Munster. Leukemia, 2000. **14**(12): p. 2205-22.
80. Schrappe, M., et al., *Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study*. Blood, 2011. **118**(8): p. 2077-84.
81. Loning, L., et al., *Secondary neoplasms subsequent to Berlin-Frankfurt-Munster therapy of acute lymphoblastic leukemia in childhood: significantly lower risk without cranial radiotherapy*. Blood, 2000. **95**(9): p. 2770-5.
82. Yao, J., et al., *Identification of common prognostic gene expression signatures with biological meanings from microarray gene expression datasets*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. 21.
83. Ontario, H.Q., *Gene expression profiling for guiding adjuvant chemotherapy decisions in women with early breast cancer: an evidence-based and economic analysis*. Ont Health Technol Assess Ser, 2010. **10**(23): p. 1-57.
84. Dorge, P., et al., *IKZF1 deletion is an independent predictor of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia treated according to the ALL-BFM 2000 protocol*. Haematologica, 2013. **98**(3): p. 428-32.
85. Cario, G., et al., *High CD45 surface expression determines relapse risk in children with precursor B-cell and T-cell acute lymphoblastic leukemia treated according to the ALL-BFM 2000 protocol*. Haematologica, 2014. **99**(1): p. 103-10.
86. Cario, G., et al., *High interleukin-15 expression characterizes childhood acute lymphoblastic leukemia with involvement of the CNS*. J Clin Oncol, 2007. **25**(30): p. 4813-20.
87. Wieczorek, G., et al., *Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue*. Cancer Res, 2009. **69**(2): p. 599-608.
88. Tran, D.Q., et al., *GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(32): p. 13445-50.
89. Carrillo-Galvez, A.B., et al., *Mesenchymal stromal cells express GARP/LRRC32 on their surface: effects on their biology and immunomodulatory capacity*. Stem Cells, 2015. **33**(1): p. 183-95.

90. Ollendorff, V., et al., *The GARP gene encodes a new member of the family of leucine-rich repeat-containing proteins*. Cell Growth Differ, 1994. **5**(2): p. 213-9.
91. Dasgupta, A. and R. Saxena, *Regulatory T cells: a review*. Natl Med J India, 2012. **25**(6): p. 341-51.
92. Chen, M.L., et al., *Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(2): p. 419-24.
93. Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, *'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation*. Immunol Rev, 2007. **220**: p. 199-213.
94. Li, M.O., et al., *Transforming growth factor-beta regulation of immune responses*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 99-146.
95. Hanahan, D. and R. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell 2000. **100**: p. 57-70.
96. Klug, W.S., M.R. Cummings, and C.A. Spencer, eds. *Genetik*. 2007. p. 410-411.
97. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, eds. *Biochemie*. Vol. 6. 2007, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg.
98. Tammen, S.A., S. Friso, and S.W. Choi, *Epigenetics: the link between nature and nurture*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(4): p. 753-64.
99. Barros, S.P. and S. Offenbacher, *Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease*. J Dent Res, 2009. **88**(5): p. 400-8.
100. Russell, L.J., et al., *Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2009. **114**(13): p. 2688-98.
101. Mullighan, C.G., et al., *Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia*. Nat Genet, 2009. **41**(11): p. 1243-6.
102. Li, X., et al., *The C11orf30-LRRC32 region is associated with total serum IgE levels in asthmatic patients*. 2012: J Allergy Clin Immunol. 2012 Feb;**129**(2): p. 575-8.
103. Weidinger, S., et al., *A genome-wide association study of atopic dermatitis identifies loci with overlapping effects on asthma and psoriasis*. Hum Mol Genet, 2013. **22**(23): p. 4841-56.
104. Derycke, M.S., et al., *Toward understanding the genetics of regulatory T cells in ovarian cancer*. Oncoimmunology, 2013. **2**(6): p. 16.
105. Topic, I., et al., *Bone morphogenetic proteins regulate differentiation of human promyelocytic leukemia cells*. Leuk Res, 2013. **37**(6): p. 705-12.
106. Dosen-Dahl, G., et al., *Bone marrow stroma cells regulate TIEG1 expression in acute lymphoblastic leukemia cells: role of TGFbeta/BMP-6 and TIEG1 in chemotherapy escape*. Int J Cancer, 2008. **123**(12): p. 2759-66.

107. Buitenkamp, T.D., et al., *Outcome in children with Down's syndrome and acute lymphoblastic leukemia: role of IKZF1 deletions and CRLF2 aberrations*. *Leukemia*, 2012. **26**(10): p. 2204-11.

## **DANKSAGUNG**

Herrn PD Dr. med. Gunnar Cario danke ich vielmals für die Überlassung dieses interessanten Themas und herzlich für die Unterstützung in der Zusammenstellung dieser Arbeit. Die stetige Forderung und Motivation haben wesentlich zum Gelingen beigetragen.

Frau Juliane Schmäh danke ich für die Einführung in das laborexperimentelle Arbeiten, die zahlreichen Hilfestellungen in der Durchführung, die Beantwortung all meiner Fragen und die anregenden Diskussionen der Ergebnisse dieser Arbeit.

Herrn Dr. Martin Zimmermann danke ich für die Unterstützung in der Auswertung der Ergebnisse.

Herrn Prof. Dr. med. Schrappe danke ich für die freundliche Aufnahme in die Klinik für Allgemeine Pädiatrie am UKSH in Kiel und die Überlassung des Untersuchungsmaterials.

Allen Labormitgliedern des ALL-Studienlabors in Kiel danke ich für die wertvollen technischen Hinweise und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, insbesondere meinen Schwestern, die mich in jeder Hinsicht so liebevoll unterstützt haben.

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

Name: Buchmann  
Vorname: Swantje  
Geburtsdaten: 04.10.1990, Melle  
Nationalität: deutsch

### Schulische Ausbildung

1997 – 2001 Grundschole in Münster und Melle  
2001 – 2003 Orientierungsstufe Melle-Mitte  
2003 – 2010 Gymnasium Melle, Abschluss: Abitur

### Studium

10/2010 Studienbeginn der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
03/2014 Beginn der Promotion, Thema: Prognostische Bedeutung der Expression der *P2RY8-CRLF2*-Fusions-assoziierten Gene *LRRC32*, *BMP6* und *VPREB1* für die Akute Lymphoblastische Leukämie im Kindes- und Jugendalter  
10/2015 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (schriftlich)