

# **Inzidenz, Detektion und molekulare Charakterisierung der Akuten Lymphatischen Leukämie mit hoher *CRLF2*-Genexpression im Kindesalter**

---

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von

**Juliane Schmäh, geb. Lippert**

aus Schwerin

**Kiel, 2019**

Erster Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Roeder

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Gunnar Cario

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2019

Zum Druck genehmigt: 16.10.2019

gez. Prof. Dr. rer. nat. Frank Kempken, Dekan

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. Gunnar Cario in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein angefertigt.

Die Forschungsarbeiten im Rahmen des Promotionsprojektes wurden durch das *European Network for Cancer Research in Children and Adolescents* (ENCCA)-Projekt sowie durch die Madeleine Schickedanz-KinderKrebs-Stiftung finanziell unterstützt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

**Schmäh J**, Fedders B, Panzer-Grümayer R, Fischer S, Zimmermann M, Dagdan E, Bens S, Schewe D, Möricke A, Bleckmann K, Siebert R, Schrappe M, Stanulla M, Cario G (2017) „Molecular characterization of acute lymphoblastic leukemia with high *CRLF2* gene expression in childhood“. *Pediatric Blood and Cancer*, 2017 Oct;64(10).

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis .....	IX
<b>1. Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Summary.....</b>	<b>2</b>
<b>3. Einleitung.....</b>	<b>3</b>
3.1 Akute lymphatische Leukämie (ALL) im Kindesalter.....	3
3.1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie.....	3
3.1.2 Diagnose und Klassifikation .....	4
3.1.3 Therapie .....	6
3.2 Genexpressionsanalysen .....	9
3.3 Die Rolle von <i>CRLF2</i> .....	10
3.4 Zielsetzung .....	14
<b>4. Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
4.1 Patienten.....	15
4.2 Aufbereitung der klinischen Proben .....	16
4.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen .....	16
4.2.2 DNA-Präparation .....	16
4.2.3 RNA-Präparation .....	17
4.2.4 cDNA-Synthese .....	17
4.3 Genexpressionsanalysen .....	18
4.3.1 Quantitative <i>Real-Time</i> PCR (qPCR) .....	18
4.3.2 Transkriptom-Analyse .....	21
4.3.2.1 Massive Analysis of cDNA Ends (MACE) .....	22
4.3.2.2 SuperTag Digital Gene Expression Profiling (ST-DGE).....	22
4.3.2.3 Kombination der MACE- und ST-DGE-Daten.....	23
4.3.2.4 Analyse der Transkriptom-Daten.....	23
4.4 Detektion der <i>P2RY8/CRLF2</i> -Fusion.....	24
4.4.1 RT-PCR.....	25
4.4.2 PCR mittels genomischer DNA .....	25
4.4.3 Multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation (MLPA).....	27
4.5 Quantifizierung der <i>P2RY8/CRLF2</i> -Fusion .....	27
4.6 Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH) .....	29

---

4.7	Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (HRM) .....	30
4.8	Statistische Analysen .....	31
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>33</b>
5.1	Molekulare Charakterisierung der ALL im Kindesalter mit hoher <i>CRLF2</i> -Genexpression .....	33
5.1.1	Hohe <i>CRLF2</i> -Genexpression in der T-ALL .....	33
5.1.2	Inzidenz hoher <i>CRLF2</i> -Genexpression und deren zugrunde liegenden genetischen Aberrationen in der pB-ALL.....	37
5.1.3	Klinische Charakteristika der pB-ALL mit hoher <i>CRLF2</i> -Genexpression .....	39
5.1.4	Zusätzliche genetische Aberrationen in der pB-ALL mit hoher <i>CRLF2</i> -Genexpression .....	44
5.2	Methodenvergleich zur Detektion der <i>P2RY8/CRLF2</i> -Fusion .....	46
5.3	Vergleichende Transkriptom-Analyse von zwei <i>CRLF2</i> -hochexprimierenden Subgruppen....	48
5.3.1	Ergebnisse der Transkriptom-Analyse mittels MACE und ST-DGE .....	48
5.3.2	Validierung der Ergebnisse der Transkriptom-Analyse.....	49
5.3.3	Interpretation der Transkriptom-Daten .....	51
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>60</b>
6.1	Hohe <i>CRLF2</i> -Genexpression als prognostisch relevanter Marker in der T-ALL .....	61
6.2	<i>P2RY8/CRLF2</i> und <i>IGH/CRLF2</i> sind mit einem hohen Rückfallrisiko in der pB-ALL assoziiert .....	63
6.3	RT-PCR als effiziente und gleichzeitig sensitive Methode zur Detektion der <i>P2RY8/CRLF2</i> -Fusion.....	70
6.4	<i>P2RY8/CRLF2</i> -positive ALL ist durch ein distinktes Genexpressionsprofil gekennzeichnet ..	72
6.5	Gezielte Therapieansätze der <i>CRLF2</i> -deregulierten ALL .....	75
6.6	Ausblick .....	79
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>81</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>92</b>
8.1	Tabelle S1 .....	92
8.2	Manuskript 1 .....	93
8.3	EFS und CRI für DS-Patienten mit pB-ALL .....	102
8.4	Tabelle S2 .....	103
8.5	Tabelle S3 .....	108
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>116</b>
<b>10.</b>	<b>Publikationsliste</b> .....	<b>117</b>
<b>11.</b>	<b>Erklärung</b> .....	<b>120</b>
<b>12.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>121</b>

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
<i>ABL1</i>	<i>ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase</i>
AIEOP	<i>Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica</i>
<i>AFF1</i>	<i>AF4/FMR2 family member 1</i>
AKT	Proteinkinase B
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
Array-CGH	Array-basierte vergleichende genomische Hybridisierung ( <i>Array-based comparative genomic hybridization</i> )
<i>ASMTL</i>	<i>Acetylserotonin O-methyltransferase like</i>
ATG	Aminosäuresequenz des Startcodons
B-ALL	B-Zell-ALL
BCR	B-Zell-Rezeptor; <i>B cell receptor</i>
<i>BCR</i>	<i>BCR, RhoGEF and GTPase activating protein</i>
<i>BCR/ABL1</i>	Fusionsgen durch t(9;22) Translokation
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
<i>BIRC7</i>	<i>Baculoviral IAP repeat containing 7</i>
<i>BMP6</i>	<i>Bone morphogenetic protein 6</i>
bp	Basenpaare
BP	Bruchpunkt
<i>BTG1</i>	<i>BTG anti-proliferation factor 1</i>
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CAU	Christian-Albrechts Universität
CCL	Chronisch lymphatische Leukämie
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
<i>CDKN2B</i>	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2B</i>
cDNA	Komplementäre DNA; <i>complementary DNA</i>
CIR	Kumulative Rezidivinzidenz; <i>cumulative incidence of relapse</i>
CMAP	Genexpressionsanalyse-Software; <i>Connectivity Map</i>
<i>CRLF2</i>	<i>Cytokine receptor-like factor 2, oder TSLPR</i>
CS	Konnektivitätswert; <i>connectivity score</i>
<i>CSF2RA</i>	<i>Colony stimulating factor 2 receptor alpha subunit</i>
Ct	Schwellenwert-Zyklus; <i>cycle threshold</i>
DI	DNA-Index
DKKR	Deutsches Kinderkrebsregister
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure; <i>deoxyribonucleic acid</i>
DS	Down-Syndrom

---

<i>EBF1</i>	<i>Early B-cell factor 1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFS	Ereignisfreies Überleben; <i>event free survival</i>
EGIL	<i>European Group for the Immunological Characterisation of Leukemias</i>
ES	Anreicherungs Wert; <i>enrichment score</i>
et al.	und andere; <i>et alii</i>
<i>ETV6</i>	<i>ETS variant 6</i>
<i>ETV6/RUNX1</i>	Fusionsgen durch t(12;22) Translokation
FAB	French-American-British
<i>FBXW7</i>	<i>F-box and WD repeat domain containing 7</i>
fc	Genexpressionsunterschied; <i>fold change</i>
FCM	Durchflusszytometrie; <i>flow cytometry</i>
FDR	Rate falscher Signifikanzen; <i>false discovery rate</i>
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FW	vorwärts; <i>forward</i>
GO	Gen-Ontologie; <i>Gene Ontology</i>
GOAL	Genexpressionsanalyse-Software; <i>Gene Ontology AnaLyzer</i>
GSEA	Genexpressionsanalyse-Software; <i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
HDAC	Histon-Deacetylase
HR	Hochrisiko
HRM	Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse; <i>high resolution melting</i>
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i>
IGH	<i>Immunoglobulin heavy locus</i>
<i>IKZF1</i>	<i>IKAROS family zinc finger 1</i>
<i>IL1R2</i>	<i>Interleukin 1 receptor type 2</i>
<i>IL2R<math>\gamma</math></i>	<i>Interleukin 2 receptor subunit gamma</i>
<i>IL3RA</i>	<i>Interleukin 3 receptor subunit alpha</i>
<i>IL7</i>	<i>Interleukin 7</i>
<i>IL7R<math>\alpha</math></i>	<i>Interleukin 7 receptor subunit alpha</i>
JAK	Januskinase
<i>JAK1</i>	<i>Janus kinase 1</i>
<i>JAK2</i>	<i>Janus kinase 2</i>
kb	Kilobase, 1000 Nukleotide
kD	Kilodalton
KEGG	Datenbank; <i>Kyoto encyclopedia of genes and genomes</i>
KM	Knochenmark
<i>KMT2A</i>	<i>Lysine methyltransferase 2A</i>
<i>KMT2A/AFF1</i>	Fusionsgen durch t(4;11) Translokation
log <sub>2</sub>	Binärer Logarithmus
<i>LRRC32</i>	<i>Leucine rich repeat containing 32</i>
MACE	NGS-Technik; <i>massive analysis of cDNA ends</i>
min	Minute
miRNA	MikroRNA

---

ml	Milliliter
MLPA	Multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation; <i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
M-MuLV	Moloney-Maus-Leukämie-Virus; <i>Moloney murine leukemia virus</i>
MPN	Myeloproliferativer Neoplasien
MR	Mittleres Risiko
MRD	Minimale Resterkrankung; <i>minimal residual disease</i>
mRNA	Boten-RNA; <i>messenger RNA</i>
MSigDB	Datenbank; <i>Molecular Signature Database</i>
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
mTORC1	<i>Mechanistic target of rapamycin complex 1</i>
MYB	<i>MYB proto-oncogene, transcription factor</i>
n	Anzahl
ng	Nanogramm
NGS	Sequenzierung der nächsten Generation; <i>next-generation-sequencing</i>
nm	Nanometer
NOTCH1	<i>Notch 1</i>
P2RY8	<i>Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 8</i>
PAR1	Pseudoautosomale Region 1
PAX5	<i>Paired box 5</i>
PB	Peripheres Blut
pB-ALL	B-Vorläufer-ALL; <i>precursor B-ALL</i>
PBS	Phosphatpuffer; <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion; <i>polymerase chain reaction</i>
pEFS	Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens; <i>probability of event free survival</i>
PGR	Gutes Ansprechen auf Prednison; <i>Prednisone good response</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Proteinkinasen B
pM	Pikomolar
PPR	Schlechtes Ansprechen auf Prednison; <i>Prednisone poor response</i>
PR	Ansprechen auf Prednison; <i>Prednisone response</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PTPRK	<i>Protein tyrosine phosphatase, receptor type K</i>
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR; <i>quantitative real-time PCR</i>
Ras	Proto-Onkogen; <i>Rat sarcoma</i>
RB1	<i>RB transcriptional corepressor 1</i>
RIN	RNA Integritätsnummer; <i>RNA integrity number</i>
RNA	Ribonukleinsäure; <i>ribonucleic acid</i>
RPLP1	<i>Ribosomal protein, large, P1</i>
RPMI	Zellkulturmedium; <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RPM	Normalisierungsmethode; <i>reads assigned per million mapped reads</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RUNX1	<i>Runt related transcription factor 1</i>



RV	Rückwärts; <i>reverse</i>
s	Sekunde
<i>SDHA</i>	<i>Succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A</i>
SE	Standardfehler; <i>standard error</i>
SER	Langsames Therapieansprechen; <i>slow early responder</i>
<i>SLC25A6</i>	<i>Solute carrier family 25 member 6</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
<i>SOX11</i>	<i>SRY-box 11</i>
SR	Standardrisiko
STAT	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription
<i>STAT5</i>	<i>Signal transducer and activator of transcription 5</i>
ST-DGE	NGS-Technik; <i>SuperTag digital gene expression profiling</i>
STRING	Genexpressionsanalyse-Software; <i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes</i>
T-ALL	T-Zell-ALL
<i>TCL1A</i>	<i>T-cell leukemia/lymphoma 1A</i>
<i>TCL1B</i>	<i>T-cell leukemia/lymphoma 1B</i>
<i>TCL6</i>	<i>T-cell leukemia/lymphoma 6 (non-protein coding)</i>
TCR	T-Zellrezeptor; <i>T-cell receptor</i>
TE	TRIS-EDTA
<i>TGF</i>	<i>Transforming growth factor</i>
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>TSLP</i>	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>
<i>TSLPR</i>	<i>Thymic stromal lymphopoietin receptor, oder CRLF2</i>
u.a.	Unter anderem
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
UTR	Untranslatierter Bereich
vs.	Versus
<i>VGF</i>	<i>VGF nerve growth factor inducible</i>
<i>VPREB1</i>	<i>Pre B lymphocyte 1</i>
WBC	Leukozyten, <i>white blood cells</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation; <i>World Health Organization</i>
z.B.	Zum Beispiel
z.T.	Zum Teil
ZNS	Zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Δ	Delta
ΔCt	Expressionsunterschied von Ziel- und Referenzgen
~	Circa
#	Nummer
∞	Unendlich

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Übersicht der ALL-Subgruppen und Inzidenzen innerhalb der ALL-BFM 2000 Studie..	5
<b>Abbildung 2:</b> Überlebenskurven und 6-Jahres EFS-Rate für Patienten der ALL-BFM 70 bis 2000 Studie.	6
<b>Abbildung 3:</b> Therapieschema der AIEOP-BFM ALL 2009 Studie.	7
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung der TSLP-Signalwege.	11
<b>Abbildung 5:</b> Schematische Darstellung der <i>P2RY8/CRLF2</i> -Deletion.	12
<b>Abbildung 6:</b> Flussdiagramm der in dieser Arbeit angewandten Methoden mit Verweis auf den entsprechenden Abschnitt.	15
<b>Abbildung 7:</b> Verteilung der <i>CRLF2</i> -Genexpression der Patienten mit T-ALL.	33
<b>Abbildung 8:</b> Überlebenskurven und 5-Jahres EFS-Rate für Patienten mit T-ALL entsprechend des <i>CRLF2</i> -Genexpressionslevels.	36
<b>Abbildung 9:</b> Kumulative Rezidivinzidenz für Patienten mit T-ALL entsprechend des <i>CRLF2</i> -Genexpressionslevels.	36
<b>Abbildung 10:</b> Verteilung der <i>CRLF2</i> -Genexpression der Patienten mit pB-ALL.	37
<b>Abbildung 11:</b> Übersicht der pB-ALL Subgruppen mit hoher <i>CRLF2</i> -Genexpression.	38
<b>Abbildung 12:</b> Verteilung der Genexpressionslevel der verschiedenen Subgruppen mit hoher <i>CRLF2</i> -Genexpression.	39
<b>Abbildung 13:</b> Verteilung des Alters der Patienten bei der Diagnose der pB-ALL Subgruppen mit hoher <i>CRLF2</i> -Genexpression.	40
<b>Abbildung 14:</b> Überlebenskurven und 5-Jahres EFS-Rate für pB-ALL Patienten mit hoher <i>CRLF2</i> -Genexpression entsprechend der zugrundeliegenden genetischen Aberration.	42
<b>Abbildung 15:</b> Kumulative Rezidivinzidenz für Patienten mit T-ALL entsprechend des <i>CRLF2</i> -Genexpressionslevels.	43
<b>Abbildung 16:</b> Übersicht zusätzlicher genetischer Aberrationen innerhalb der verschiedenen Subgruppen mit hoher <i>CRLF2</i> -Genexpression.	44
<b>Abbildung 17:</b> <i>CRLF2</i> -Genexpressionslevel der pB-ALL Patienten mit <i>P2RY8/CRLF2</i> -Fusion mit und ohne zusätzliche Kopien des <i>CRLF2</i> -Gens.	45
<b>Abbildung 18:</b> Venn-Diagramm zur Darstellung des Methodenvergleichs MLPA vs. RT-PCR zur Detektion der <i>P2RY8/CRLF2</i> -Fusion.	47
<b>Abbildung 19:</b> Venn-Diagramm zur Darstellung des Methodenvergleichs genomische PCR vs. RT-PCR zur Detektion der <i>P2RY8/CRLF2</i> -Fusion.	47
<b>Abbildung 20:</b> Genexpression von 11 Kandidatengenen gemessen mittels qPCR auf individueller Patientenebene zur Validierung der Transkriptom-Analyse.	50

---

<b>Abbildung 21:</b> Heatmap der einzelnen Genexpressionswerte ( $\Delta\text{Ct}$ ) der Patienten gemessen mittels qPCR zur Validierung.....	<b>51</b>
<b>Abbildung 22:</b> Mittels GOAL identifizierte GO-Kategorien der in der <i>P2RY8/CRLF2</i> <sup>+</sup> -Subgruppe niedriger exprimierten Transkripte im Vergleich zur <i>P2RY8/CRLF2</i> <sup>-</sup> -Kontrollgruppe.....	<b>53</b>
<b>Abbildung 23:</b> Graphen der mittels GSEA-Analyse identifizierten Gen-Sets mit negativem ES. ....	<b>54</b>
<b>Abbildung 24:</b> Potentielles Protein-Interaktionsnetzwerk der Genprodukte der niedrigerer exprimierten Transkripte in der <i>P2RY8/CRLF2</i> <sup>+</sup> -Subgruppe erstellt mittels STRING.....	<b>55</b>
<b>Abbildung 25:</b> Mittels GOAL identifizierte GO-Kategorien der in der <i>P2RY8/CRLF2</i> <sup>+</sup> -Subgruppe höher exprimierten Transkripte im Vergleich zur <i>P2RY8/CRLF2</i> <sup>-</sup> -Kontrollgruppe.....	<b>57</b>
<b>Abbildung 26:</b> Graphen der mittels GSEA-Analyse identifizierten Gen-Sets mit positivem ES. ....	<b>58</b>
<b>Abbildung 27:</b> Potentielles Protein-Interaktionsnetzwerk der Genprodukte der höher exprimierten Transkripte in der <i>P2RY8/CRLF2</i> <sup>+</sup> -Subgruppe erstellt mittels STRING.....	<b>59</b>
<b>Abbildung 28:</b> Schematische Darstellung der TSLP-Signalwege und gezielte therapeutische Ansatzmöglichkeiten.....	<b>75</b>

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Übersicht der verwendeten qPCR-Primer.....	<b>19</b>
<b>Tabelle 2:</b> Temperaturprofil #1 für qPCR.....	<b>20</b>
<b>Tabelle 3:</b> Temperaturprofil #2 für qPCR.....	<b>20</b>
<b>Tabelle 4:</b> <i>CRLF2</i> -bezogene genetische Eigenschaften der Proben für das gepoolte NGS und der qPCR-Validierung.....	<b>21</b>
<b>Tabelle 5:</b> Temperaturprofil für RT-PCR. ....	<b>25</b>
<b>Tabelle 6:</b> Primer-Kombinationen für die Detektion der <i>P2RY8/CRLF2</i> -Fusion und Identifikation der Bruchpunkte der Fusionspartner mittels gPCR.....	<b>26</b>
<b>Tabelle 7:</b> Temperaturprofil für genomische PCR.....	<b>26</b>
<b>Tabelle 8:</b> Primer-Sonde-Kombinationen für die Quantifizierung der genomischen <i>P2RY8/CRLF2</i> -Fusion mittels TaqMan-PCR. ....	<b>28</b>
<b>Tabelle 9:</b> Temperaturprofil für TaqMan-PCR.....	<b>29</b>
<b>Tabelle 10:</b> Übersicht der verwendeten HRM-Primer mit Angabe der entsprechend eingesetzten Magnesiumchlorid-Konzentration. ....	<b>30</b>
<b>Tabelle 11:</b> Temperaturprofil für HRM. ....	<b>31</b>
<b>Tabelle 12:</b> Vergleich der klinischen Parameter der T-ALL Patienten gruppiert nach dem <i>CRLF2</i> -Genexpressionslevel. ....	<b>34</b>
<b>Tabelle 13:</b> Vergleich der klinischen Parameter der pB-ALL Patienten mit hoher <i>CRLF2</i> -Genexpression gruppiert nach der zugrundeliegenden genetischen Aberration. ....	<b>41</b>
<b>Tabelle 14:</b> Anzahl der mittels MACE und ST-DGE erhaltenen Sequenzen vor und nach der qualitativen Bearbeitung der Rohdaten.....	<b>48</b>
<b>Tabelle 15:</b> Anzahl der identifizierten Transkripte mittels MACE und ST-DGE, sowie nach Kombination beider Datensätze.....	<b>49</b>
<b>Tabelle 16:</b> Liste der niedriger exprimierten Gene ( $fc < -16$ ) in der <i>P2RY8/CRLF2</i> <sup>+</sup> -Subgruppe im Vergleich zur <i>P2RY8/CRLF2</i> <sup>-</sup> -Kontrollgruppe.....	<b>52</b>
<b>Tabelle 17:</b> Liste der höher exprimierten Gene ( $fc > 16$ ) in der <i>P2RY8/CRLF2</i> <sup>+</sup> -Subgruppe im Vergleich zur <i>P2RY8/CRLF2</i> <sup>-</sup> -Kontrollgruppe.....	<b>56</b>
<b>Tabelle 18:</b> Zusammenfassung der Methoden zur Detektion der <i>P2RY8/CRLF2</i> -Fusion. ....	<b>72</b>

## 1. Zusammenfassung

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter. Durch Anwendung moderner risikoadaptierter Behandlungsstrategien können heute nahezu 80% der Kinder dauerhaft geheilt werden. Dennoch erleidet immer noch jedes fünfte Kind ein Rezidiv. Ein Ziel ist daher die Identifizierung neuer prognostischer Marker, um die Therapie weiter zu optimieren. Eine Subgruppe der B-Vorläufer-ALL (pB-ALL) ist durch eine hohe *CRLF2*-Genexpression charakterisiert, welche durch verschiedene genetische Aberrationen verursacht werden kann. Die häufigste Aberration, die *P2RY8/CRLF2*-Fusion, ist in ALL-BFM-basierten Studien mit einer schlechten Prognose aufgrund einer hohen Rezidivinzidenz assoziiert; dessen zugrundeliegender Mechanismus ist allerdings noch weitestgehend unklar. Darüber hinaus fehlt bislang eine systematische Untersuchung der anderen Aberrationen.

Im Fokus dieser Arbeit stand deshalb eine umfassende prospektive Erfassung der *CRLF2*-Genexpression und der assoziierten genetischen Aberrationen in 1105 Patienten der AIEOP-BFM ALL 2009 Studie. Zusätzlich wurden alle Fälle der pB-ALL mit hoher *CRLF2*-Genexpression auf Veränderungen der Kopienzahl bestimmter Gene der B-Zell-Differenzierung sowie auf Mutationen von *CRLF2* und *JAK2* hin untersucht. Außerdem wurde eine vergleichende NGS-basierte Transkriptom-Analyse mit *CRLF2*-hoch-exprimierenden Fällen mit und ohne *P2RY8/CRLF2*-Fusion durchgeführt sowie ein methodischer Vergleich von verschiedenen Techniken zur Detektion der *P2RY8/CRLF2*-Fusion für eine künftige Implementierung als prognostischer Marker.

Eine hohe *CRLF2*-Genexpression wurde in 15% der Patienten mit T-ALL detektiert, von denen 81% anhand des Therapieansprechens in die Hochrisikogruppe (HR) stratifiziert wurden. Zusammen mit den noch vorläufigen Daten hinsichtlich des Therapieerfolgs scheint die hohe *CRLF2*-Genexpression ein vielversprechender prognostischer Marker innerhalb der T-ALL zu sein. Innerhalb der pB-ALL wurde eine hohe *CRLF2*-Genexpression in 10% der Fälle; in 48% davon die *P2RY8/CRLF2*-Fusion, zusätzliche Kopien des *CRLF2*-Gens in 20% und eine *IGH/CRLF2* Translokation in 18% davon identifiziert. Auffallend war eine hohe Rezidivrate von 44% der Patienten mit *IGH/CRLF2* Translokation. Sowohl für die *P2RY8/CRLF2*- als auch die *IGH/CRLF2*-Subgruppe wurde eine enorme Häufigkeit an zusätzlichen Deletionen von B-Zell-Differenzierungsgenen wie *IKZF1* beobachtet. Zusammengefasst deuten die Daten dieser Arbeit darauf hin, dass die erhöhte Anfälligkeit für akkumulierende Aberrationen im Kontext mit der hohen *CRLF2*-Genexpression zu dem beobachteten hohen Rezidivrisiko in der *P2RY8/CRLF2*- und *IGH/CRLF2*-positiven pB-ALL beitragen. Patienten dieser beiden Subgruppen könnten von einer Intensivierung der Therapie im HR-Arm, möglicherweise kombiniert mit geeigneten Inhibitoren aktivierter Signalwege, profitieren.

## 2. Summary

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignancy in childhood. Applying modern risk-adapted treatment strategies about 80% of children with ALL can be cured in first complete remission. However, 1 out of 5 patients still suffer from relapse. Accordingly, there is a need to identify new prognostic markers in order to improve the current therapeutic results. A high-level expression of the *CRLF2* gene is frequent in precursor B-cell ALL (pB-ALL) and can be caused by various genetic aberrations. *P2RY8/CRLF2* fusion, the most frequent alteration, was shown to be associated with a high relapse incidence in children treated according to ALL-BFM protocols, which is poorly understood. Moreover, the frequency of other alterations had not been systematically analyzed yet.

Therefore, *CRLF2* mRNA expression and potential genetic aberrations causing a high *CRLF2* expression were prospectively assessed in 1105 patients treated according to the AIEOP-BFM ALL 2009 protocol. Additionally, copy number alterations in selected B-cell differentiation genes for all *CRLF2* high-expressing pB-ALL cases, as well as *JAK2* and *CRLF2* mutations were determined. Moreover, *CRLF2* high-expressing cases with and without *P2RY8/CRLF2* fusion were analyzed by next-generation sequencing based gene expression profiling. Finally, several methods detecting the *P2RY8/CRLF2* fusion were tested in order to identify the most reliable and efficient technique for future implementation as diagnostic classifier.

A *CRLF2* high expression was detected in 15% of T-ALL cases, 81% of them had been stratified as high-risk patients by treatment response. Together with preliminary outcome data *CRLF2* high expression is indicated as a potent prognostic marker in T-ALL. In pB-ALL, a *CRLF2* high expression was determined in 10%; the *P2RY8/CRLF2* fusion in 48% of them, supernumerary copies of *CRLF2* in 20% and the *IGH/CRLF2* translocation in 18%. Notably, 44% of patients with *IGH/CRLF2* translocation had already relapsed. *P2RY8/CRLF2* and *IGH/CRLF2* positive samples were characterized by a high frequency of additional deletions in B-cell differentiation genes such as *IKZF1*. The acquired data suggest that the high frequency of genetic aberrations in the context of a high *CRLF2* expression could contribute to the high risk of relapse in *P2RY8/CRLF2* and *IGH/CRLF2* positive ALL. Accordingly, patients of these two subgroups could benefit from adapted therapy in high-risk regimen and treatment with suitable inhibitors of activated signaling pathways may serve as potential additives.

## 3. Einleitung

### 3.1 Akute lymphatische Leukämie (ALL) im Kindesalter

#### 3.1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie

Die akute lymphatische Leukämie ist eine maligne Erkrankung des blutbildenden Systems, welche durch eine unkontrollierte Proliferation von lymphatischen Vorläuferzellen (Lymphoblasten) gekennzeichnet ist. Durch die Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark kommt es in der Regel zu einer rasch fortschreitenden Knochenmarkinsuffizienz. Typische klinische Symptome sind daher Blässe und Abgeschlagenheit infolge einer Anämie, vermehrte Blutungsneigung durch einen Mangel an Thrombozyten sowie eine erhöhte Infektanfälligkeit durch die verminderte Produktion immunkompetenter Abwehrzellen. Darüber hinaus kann es auch zur Infiltration von weiteren Organen wie z.B. Leber, Milz, Lymphknoten oder des zentralen Nervensystems (ZNS) durch die leukämischen Zellen kommen. Unbehandelt verläuft die Erkrankung schnell tödlich.<sup>1</sup>

Die ALL macht 75% aller kindlichen Leukämien aus und ist die einzige Form der Leukämie, die häufiger bei Kindern als bei Erwachsenen auftritt. Das deutsche Kinderkrebsregister (DKKR) gibt für den Beobachtungszeitraum 2009 - 2015 einen Anteil der ALL von 22,7% aller Krebserkrankung bei Kindern unter 18 Jahren an und ist damit die häufigste maligne Erkrankung im Kindes- und Jugendalter überhaupt. In Deutschland erkranken bei einer Inzidenz von ca. 4/100.000 Kindern jährlich 500 Kinder an ALL. Eine besondere Häufung der Erkrankung ist im Kleinkindalter zwischen zwei und fünf Jahren bei Diagnosestellung zu beobachten und Jungen sind 1,3-fach häufiger betroffen als Mädchen.<sup>2</sup>

Die Ursache für die Entstehung einer ALL kann in den meisten Fällen nicht geklärt werden. Spontane somatische Mutationen oder präexistierende Keimbahnmutationen sind als wahrscheinlichste Ursache bei den meisten Patienten anzunehmen. Prädisponierende Faktoren, welche mit einer erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit assoziiert sind, können sowohl genetische als auch exogene Faktoren sein. So ist die Inzidenz der ALL bei Kindern mit bestimmten konstitutionellen chromosomalen Aberrationen und genetischen Syndromen deutlich erhöht.<sup>3</sup> Chromosomen-Instabilitätssyndrome wie das Louis-Bar-Syndrom und das Nijmegen-Breakage-Syndrom gehen mit einer erhöhten Disposition für Krebserkrankungen einher.<sup>4</sup> Ein besonders hohes Risiko an ALL zu erkranken, haben Kinder mit Trisomie 21 (Down-Syndrom), bei welchen eine ALL ca. 20-fach häufiger auftritt als bei gesunden Kindern.<sup>5</sup> Außerdem haben Geschwister eines leukämiekranken Kindes ein geringfügig

erhöhtes Risiko ebenfalls an einer Leukämie zu erkranken, während ein deutlich erhöhtes Risiko bei eineiigen Zwillingen besteht.<sup>6</sup> Es konnte durch Untersuchungen von eineiigen Zwillingen mit konkordanter ALL festgestellt werden, dass zumindest einige Subtypen der ALL pränatalen Ursprungs zu sein scheinen.<sup>7</sup> Welche exogenen Faktoren besonders zur Entstehung der ALL beitragen, konnte bislang noch nicht geklärt werden. Allerdings wird ein Zusammenhang mit der Exposition gegenüber ionisierender Strahlung, chemischen Substanzen und bestimmter viraler Infektionen aufgrund ihrer mutagenen Wirkung vermutet.<sup>8</sup>

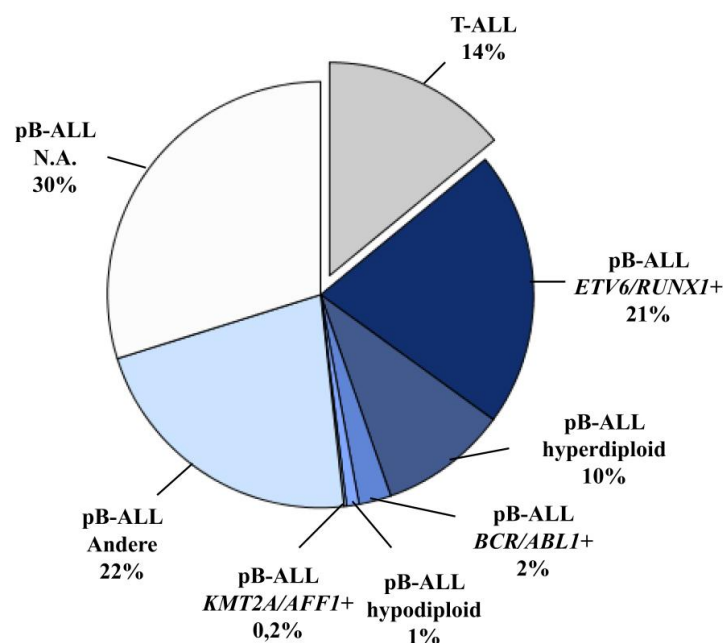
### 3.1.2 Diagnose und Klassifikation

Die Diagnostik einer ALL erfolgt in den meisten Fällen mittels einer Knochenmarkpunktion, da die Expansion der Lymphoblasten ins periphere Blut unterschiedliche Verlaufsformen annehmen kann. Allgemein wird die Diagnose der ALL bei einem Lymphoblastenanteil von mehr als 25% der kernhaltigen Zellen im Knochenmark oder peripheren Blut gestellt.<sup>9</sup> Im Rahmen der Diagnosestellung erfolgen zur genaueren Charakterisierung der Leukämiezellen Untersuchungen der Zytomorphologie, des Immunphänotyps und der Zyto- bzw. Molekulargenetik gemäß der *World Health Organization* (WHO)-Klassifikation (2008).<sup>10,11</sup> Zytomorphologisch wird die ALL entsprechend der *French-American-British* (FAB)-Klassifikation in die Subtypen L1, L2 und L3 eingeteilt.<sup>12</sup> Allerdings ist heute für die klinische Praxis hauptsächlich die seltene L3-Klassifikation relevant, welche der reifzelligen B-ALL bzw. Burkitt-Leukämie/Lymphom entspricht und im Rahmen separater Studien gesondert zu therapieren ist.<sup>13</sup> Von größerer Bedeutung ist die Bestimmung des Immunphänotyps entsprechend den Kriterien der *European Group for the Immunological Characterisation of Leukemias* (EGIL)-Klassifikation.<sup>14</sup> Hierbei wird das Expressionsmuster von Oberflächenantigenen (CD, *Cluster of Differentiation*) der Lymphoblasten mittels Durchflusszytometrie bestimmt und entsprechend die Zelllinienzugehörigkeit und das Differenzierungsstadium festgestellt. Der Immunphänotyp unterscheidet demnach zwischen einer B-ALL (pro-B, common, prä-B, reife B) und einer T-ALL (pro-T, prä-T, intermediäre T, reife T). Im Kindesalter werden ca. 85% der ALL der B-Vorläufer-Reihe (pB-ALL, *precursor B-ALL*) und nur ca. 15% der T-lymphozytären Reihe zugeordnet.<sup>15</sup> Außerdem erfolgt eine weitere Differenzierung anhand von zyto- bzw. molekulargenetischen Eigenschaften der Leukämiezellen. Mit Hilfe von Karyotypisierung, Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH), Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) sowie der Bestimmung des DNA-Index (DI) mittels Durchflusszytometrie oder aber auch



multipler Ligationsabhängiger Sondenamplifikation (MLPA) und *single nucleotide polymorphism* (SNP)-Arrays werden bestimmte genetische Aberrationen detektiert, welche eine entscheidende Bedeutung für die Prognose und die Therapie haben. Innerhalb der pB-ALL ist das Auftreten des *BCR/ABL1*-Fusionsgens durch eine t(9;22) Chromosomentranslokation oder des *KMT2A/AFF1*-Fusionsgens durch eine t(4;11) Chromosomentranslokation mit einer schlechten Prognose assoziiert.<sup>16</sup> Auch ein hypoploider Karyotyp (< 45 Chromosomen; DI < 0,8) gilt als prognostisch ungünstig und wurde daher in der AIEOP-BFM ALL 2009 Studie als ein weiteres Hochrisiko (HR)-Kriterium aufgenommen.<sup>17,18</sup> Hingegen haben Patienten mit dem *ETV6/RUNX1*-Fusionsgen durch eine t(12;21) Chromosomentranslokation und Patienten mit hoher Hyperploidie (> 50 Chromosomen; DI  $\geq 1,16$ ) eine deutlich bessere Prognose.<sup>16,19</sup> Rund ein Viertel der pB-ALL weist keine dieser beschriebenen genetischen Aberrationen auf und ist noch nicht hinlänglich für die Risikostratifizierung charakterisiert.<sup>20</sup> Für die T-ALL hingegen wurden eine Vielzahl von genetischen Aberrationen beschrieben, welche z.B. die Gene des T-Tellrezeptors, *KMT2A* oder *NOTCH1* involvieren.<sup>21</sup> Allerdings konnten bislang aufgrund dieser Heterogenität keine prognostisch relevanten Subgruppen der T-ALL definiert werden.<sup>22</sup>

Die Häufigkeit der einzelnen ALL-Subgruppen ist exemplarisch für die ALL-BFM 2000 Studie<sup>23,24</sup> in Abbildung 1 veranschaulicht.

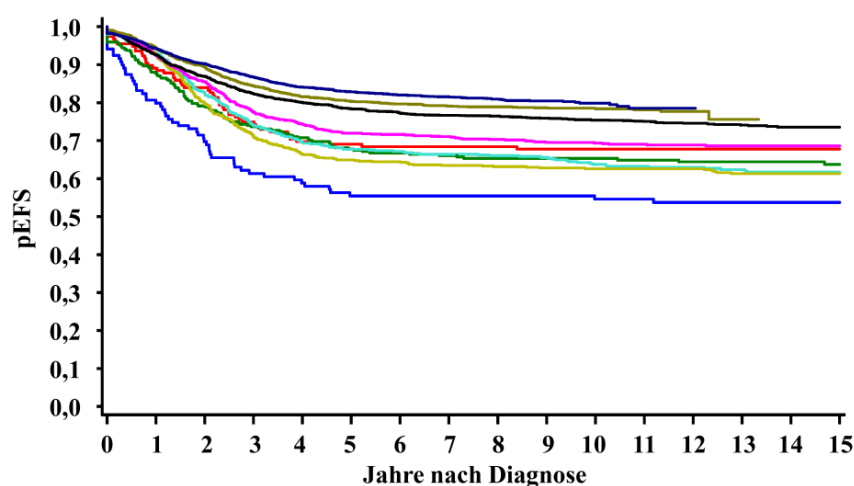


**Abbildung 1: Übersicht der ALL-Subgruppen und Inzidenzen innerhalb der ALL-BFM 2000 Studie.** Abkürzungen: pB-ALL, B-Vorläufer-ALL (*precursor B-ALL*); Andere, negativ für *ETV6/RUNX1*, *BCR/ABL1*, *KMT2A/AFF1*, Hyperdiploidie und Hypodiploidie; N.A., nicht vollständig analysiert.

Neben dieser ausführlichen leukämiespezifischen Diagnostik und Klassifikation erfolgt eine umfassende Patienten- und Familienanamnese sowie klinische Untersuchung des Patienten, u.a. zur Diagnostik extramedullärer Manifestationen wie z.B. der Befall von Lymphknoten, Leber oder Hoden.

### 3.1.3 Therapie

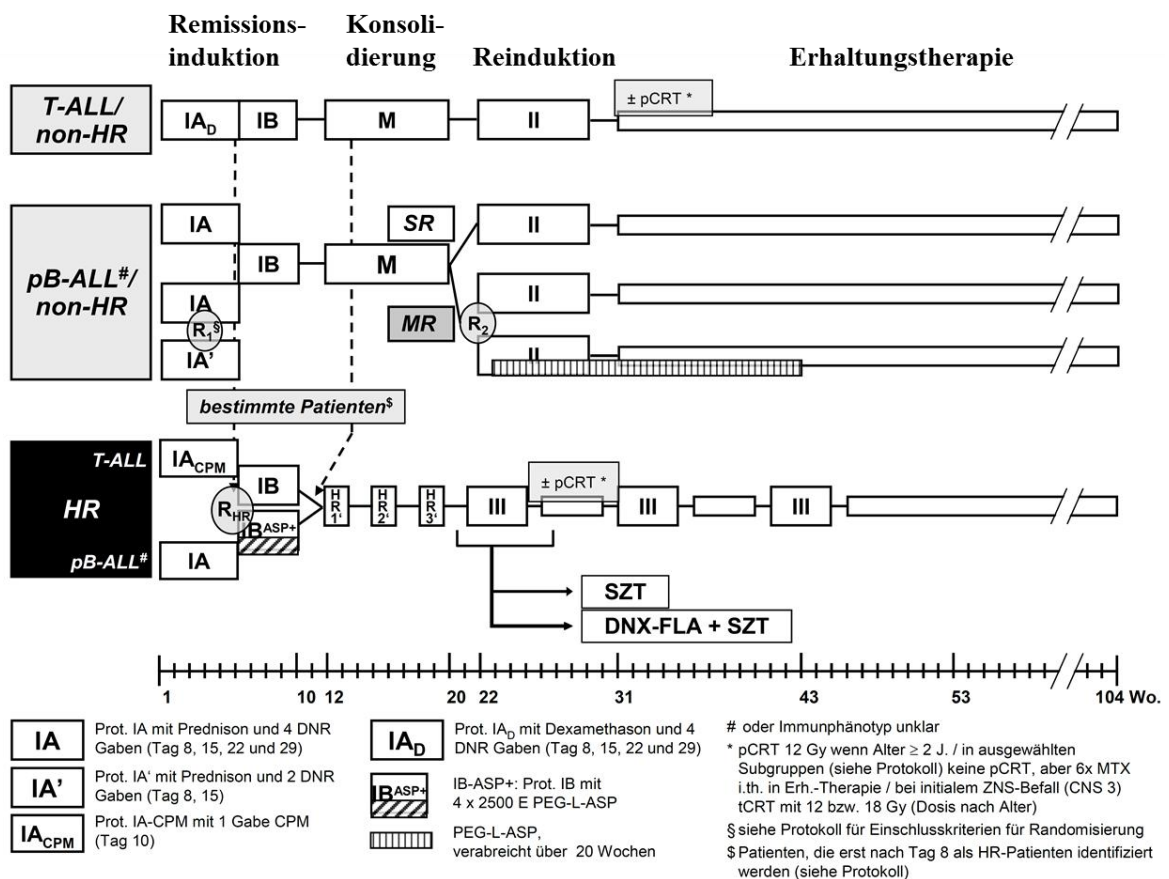
Die Therapie der ALL im Kindesalter basiert im Wesentlichen auf einer risikoadaptierten Polychemotherapie und dauert in der Regel zwei Jahre. In Deutschland erfolgt die Behandlung der Kinder im Rahmen multizentrischer Therapieoptimierungsstudien, in dessen Rahmen mittels Randomisierung neue Therapieelemente kontrolliert gegenüber der konventionellen Therapie geprüft werden. Seit Gründung der ALL-BFM Studiengruppe in den 1970er Jahren konnte im Laufe mehrerer aufeinanderfolgender Therapiestudien eine eindrucksvolle Verbesserung der Heilungsrate und eine Reduzierung der Therapienebenwirkungen erzielt werden. So wurde die Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben (pEFS, *probability of event free survival*) innerhalb von sechs Jahren nach der Diagnose seit der ALL-BFM 70 Studie sukzessive von 55% auf 82% in der ALL-BFM 2000 Studie verbessert (siehe Abbildung 2).



— ALL-BFM 70 (n = 119) 6-Jahre-pEFS = 0,55; SE = 0,05	— ALL-BFM 86 (n = 998) 6-Jahre-pEFS = 0,72; SE = 0,01
— ALL-BFM 76 (n = 156) 6-Jahre-pEFS = 0,68; SE = 0,04	— ALL-BFM 90 (n = 2179) 6-Jahre-pEFS = 0,77; SE = 0,01
— ALL-BFM 79 (n = 323) 6-Jahre-pEFS = 0,67; SE = 0,03	— ALL-BFM 95 (n = 2169) 6-Jahre-pEFS = 0,80; SE = 0,01
— ALL-BFM 81 (n = 611) 6-Jahre-pEFS = 0,67; SE = 0,02	— ALL-BFM 2000 (n = 4086) 6-Jahre-pEFS = 0,82; SE = 0,01
— ALL-BFM 83 (n = 653) 6-Jahre-pEFS = 0,64; SE = 0,02	

**Abbildung 2: Überlebenskurven und 6-Jahres EFS-Rate für Patienten der ALL-BFM 70 bis 2000 Studie.** Die Überlebenszeitanalyse für Patienten der verschiedenen ALL-BFM Studien erfolgte nach Kaplan-Meier. Abkürzungen: pEFS, Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (*probability of event free survival*); SE, Standardfehler (*standard error*); n, Anzahl.

Trotz dieser Erfolge erlitten immer noch 16% der Patienten der ALL-BFM 2000 Studie innerhalb der ersten sechs Jahre nach Diagnosestellung ein Rezidiv. Zur weiteren Optimierung der Therapie folgte die AIEOP-BFM ALL 2009 Studie<sup>18</sup> und aktuell die AIEOP-BFM ALL 2017 Studie<sup>25</sup> unter Leitung von Prof. Dr. med. Martin Schrappe (Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I, UKSH, Kiel). Im Wesentlichen gliedert sich die Behandlung der ALL in drei intensive Therapieelemente: Remissionsinduktion (Protokoll I), Konsolidierungsphase (Protokoll M bzw. HR-Blöcke) und Reinduktion (Protokoll II/III). Anschließend folgt die Erhaltungstherapie bis zu einer Gesamtdauer von 24 Monaten. Wenn nötig, kann die Behandlung durch eine intensivierete ZNS-gerichtete Therapie oder eine allogene Stammzelltransplantation erweitert werden. Eine Übersicht der Therapieelemente der AIEOP-BFM ALL 2009 Studie ist in der Abbildung 3 schematisch dargestellt.



**Abbildung 3: Therapieschema der AIEOP-BFM ALL 2009 Studie.**<sup>18</sup> Entsprechend der Risikostratifizierung in Standardrisiko (SR), Mittleres Risiko (MR) und Hochrisiko (HR) werden verschiedene Therapiearme angewandt. Der Zeitstrahl gibt den Therapieverlauf in Wochen wieder.

Das Therapieprotokoll der AIEOP-BFM ALL 2009 Studie schreibt die erforderliche Diagnostik, Medikation sowie den zeitlichen Ablauf der Therapie exakt vor.<sup>18</sup> Die Intensität

der Therapie richtet sich nach dem individuellen Risiko des Patienten. Die Risikostratifizierung erfolgte in der AIEOP-BFM ALL 2009 Studie auf der Grundlage von zyto- bzw. molekulargenetischen Markern (Vorliegen einer t(4;11) Translokation bzw. des *KMT2A/AFF1*-Fusionsgens oder eines hypodiploiden Karyotyps) sowie dem individuellen Ansprechen auf die Therapie und mündet in drei verschiedene Therapiezweige: Standard-Risiko (SR), Mittleres Risiko (MR) und Hochrisiko (HR). Die Beurteilung des Therapieansprechens basiert auf der Bestimmung von verbliebenen Leukämiezellen im Blut oder Knochenmark an definierten Zeitpunkten der Therapie. Die erste Kontrolle des Therapieansprechens erfolgt an Therapietag 8 als zytomorphologisch bestimmter Lymphoblastenanteil im peripheren Blut und wird als *Prednisone response* (PR) bezeichnet. Die Kontrolle des zytomorphologischen Therapieansprechens findet außerdem am Ende der Induktionstherapie (Therapietag 33) zur Bewertung der Remission im Knochenmark statt. Des Weiteren erfolgt die Bestimmung der minimalen Resterkrankung (*minimal residual disease*, MRD) weit unterhalb der morphologischen Nachweisgrenze mittels Durchflusszytometrie an Therapietag 15 (FCM-MRD) und mittels quantitativer *Real-Time* PCR (PCR-MRD) an Therapietag 33 und 78. Der molekulargenetische Nachweis der MRD erfolgt über leukämiespezifische T-Zellrezeptor- und Immunglobulin-Genumlagerungen und erlaubt eine Detektierbarkeit von bis zu einer Leukämiezelle unter 100.000 gesunden Zellen ( $10^{-5}$ ).<sup>23</sup> Patienten mit pB-ALL, die zytogenetische Risikofaktoren (*KMT2A/AFF1*; hypodiploider Karyotyp) oder ein schlechtes zytomorphologisches Therapieansprechen (*Prednisone poor response*, PPR [ $\geq 1000$  Blasten/ $\mu$ l Blut an Therapietag 8];  $> 5\%$  Blasten im Knochenmark an Therapietag 33) oder ein unzureichendes durchflusszytometrisches bzw. molekulargenetisches Therapieansprechen ( $\geq 10\%$  Blasten mittels FCM-MRD an Therapietag 15; *Slow early responder*, SER [MRD-Last  $\geq 10^{-3}$  an Therapietag 33 und  $< 10^{-3}$  an Therapietag 78 mittels PCR-MRD]; hohe MRD-Last von  $\geq 10^{-3}$  an Therapietag 78 mittels PCR-MRD) aufweisen, werden in die Hochrisikogruppe mit entsprechender Intensivierung der Therapie stratifiziert, da diese Kriterien nach Studienlage als prognostisch ungünstig gelten. In der Standardrisikogruppe werden hingegen Patienten behandelt, die eine sehr günstige Prognose haben: kein HR-Kriterium und keine messbare MRD-Last an Therapietag 33 und 78. Alle Patienten, die weder die SR- noch die HR-Kriterien erfüllen, werden in der Gruppe mit mittlerem Risiko eingeordnet. Bei Patienten mit einer T-ALL erfolgt die Risikostratifizierung aus Mangel an prognostisch relevanten, genetischen Markern hauptsächlich auf Grundlage des Therapieansprechens in HR oder *non*-HR. Alle Patienten,

bei denen eine t(9;22) Translokation bzw. das *BCR/ABL1*-Fusionsgen nachgewiesen wird, werden gesondert im Rahmen der EsPhALL Studie therapiert.

Relativ betrachtet besitzen Hochrisikopatienten das größte Risiko eines Therapieversagens (MRD-HR: 6% (189/3184); 5 Jahre-pEFS = 50%; n(Rezidiv) = 60), aber absolut gesehen werden die meisten Patienten, die ein Rezidiv erleiden, in die zahlenmäßig stärkste Patientengruppe mit mittlerem Risiko stratifiziert (MRD-MR: 52% (1647/3184); 5 Jahre-pEFS = 78%; n(Rezidiv) = 266).<sup>24</sup> Ein Rezidiv der Erkrankung liegt vor, wenn nach Erreichen der vollständigen Remission (sonst spricht man von einer Therapieresistenz; *Non-Response*) der Lymphoblastenanteil im Knochenmark erneut  $\geq 25\%$  der kernhaltigen Zellen beträgt oder eine extramedulläre Manifestation der Erkrankung (z.B. ZNS oder Hoden) vorliegt.<sup>9</sup> Erleidet ein Patient ein Rezidiv, beträgt seine Heilungsrate nur noch 50%.<sup>26</sup> Zudem geben auch die teils schweren akuten Nebenwirkungen der Therapie sowie das potentielle Auftreten von zum Teil lebenslangen Spätschäden (z.B. Osteonekrosen, Kardiomyopathien und Sekundärmalignomen) Anlass, die Therapie der ALL immer weiter zu optimieren.<sup>27-29</sup> Daher stellt die Identifizierung weiterer prognostisch relevanter Marker zur Verbesserung der Abschätzung des individuellen Risikos eines jeden Patienten und der damit verbundenen Adaption der Therapie ein Basismotiv der kommenden ALL-BFM Studien und der zukünftigen Forschung dar. Auch die Erforschung der Biologie der ALL steht im Fokus, um gezielte Therapien zu entwickeln, welche z.B. in deregulierte Signalwege der Leukämiezelle eingreifen.

### 3.2 Genexpressionsanalysen

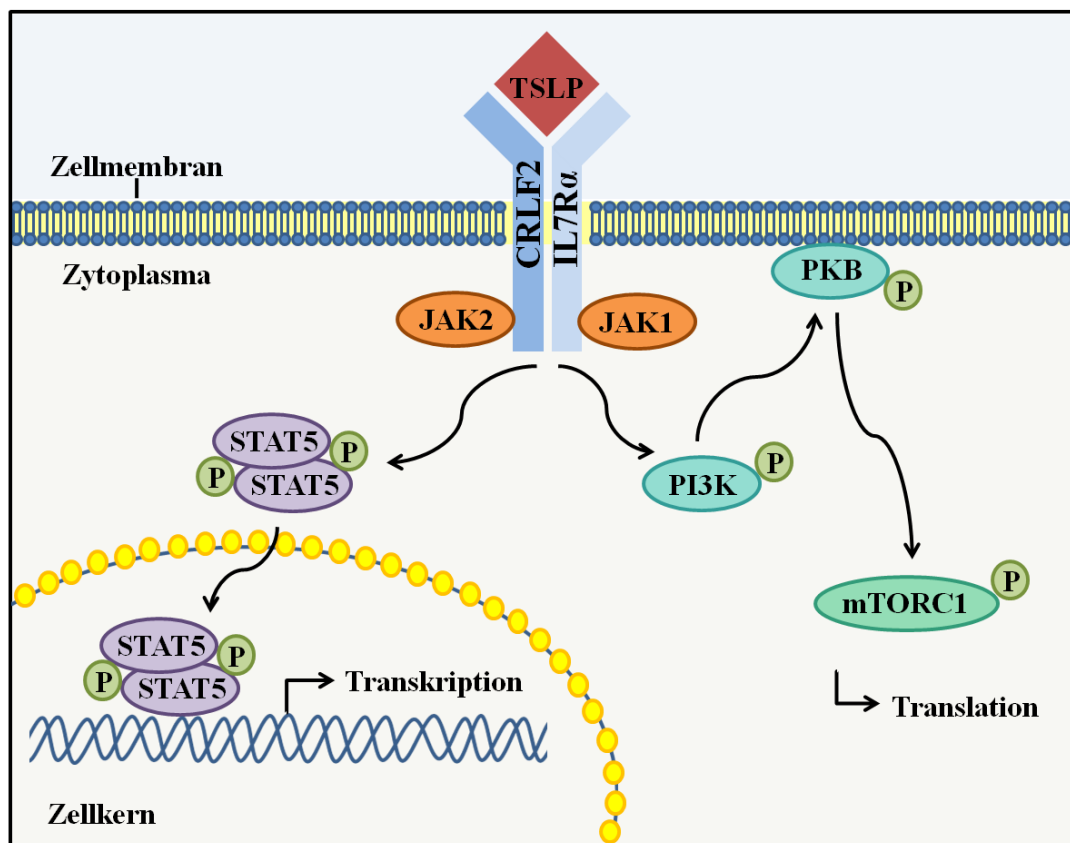
Neben der Identifizierung von genetischen Aberrationen der Leukämiezelle spielt auch die Genexpressionsanalyse eine bedeutende Rolle in der Erforschung der ALL. Sie gibt Aufschluss über den Grad der tatsächlichen Aktivität der Gene. Mittels quantitativer *Real-Time* PCR (qPCR) können einzelne Transkripte untersucht werden, während mit Hilfe neuester Technologien wie z.B. Microarray und *next-generation-sequencing* (NGS) das gesamte Transkriptom analysiert wird. Auf diese Weise können bestimmte Genexpressionsprofile identifiziert und mit klinischen bzw. biologischen Charakteristika oder auch mit dem Therapieerfolg in Verbindung gebracht werden. Für die in Kapitel 3.1.2 erwähnten, prognostisch relevanten Subgruppen der ALL wurden distinkte Genexpressionssignaturen beschrieben, aber auch neue, genetisch noch unklassifizierte Subgruppen wurden durch ein charakteristisches Genexpressionsprofil identifiziert.<sup>30</sup> Ein

bedeutendes Beispiel ist das sogenannte *BCR-ABL-like*-Genexpressionsprofil. Dieses definiert eine Subgruppe der ALL, welche ein ähnliches Genexpressionsmuster aufweist wie die *BCR-ABL1*-positive Subgruppe und ebenfalls mit einer schlechten Prognose assoziiert ist.<sup>31</sup> Ebenso wurde kürzlich eine Subgruppe mit *ETV6-RUNX1-like*-Genexpressionsprofil identifiziert.<sup>32</sup> In einer anderen Studie wurden die Genexpressionssignaturen von sensitiven und resistenten ALL-Proben miteinander verglichen, um das molekulare Therapieansprechen zu untersuchen. Hierbei konnte ein Genexpressionsprofil von 54 Genen identifiziert, welches das Therapieansprechen voraussagt und künftig in der Risikostratifizierung herangezogen werden könnte.<sup>33</sup> Aber auch die Expression einzelner Gene wurde mit klinischen Parametern und Prognose assoziiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine initial hohe *IL-15* Genexpression mit einer Beteiligung des ZNS bzw. mit einem späteren ZNS-Rezidiv assoziiert ist.<sup>34</sup> Für Patienten mit einer *KMT2A*-Translokation ist eine niedrige *FLT3* Genexpression mit einer niedrigeren Überlebenswahrscheinlichkeit und einem erhöhten Risiko für ein Rezidiv assoziiert.<sup>35</sup> Und circa 10% der pB-ALL sind durch eine hohe *CRLF2* Genexpression charakterisiert.<sup>36,37</sup>

### 3.3 Die Rolle von *CRLF2*

Das *Cytokine receptor-like factor 2 (CRLF2)* Gen kodiert den Rezeptor für das Zytokin Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) und ist deshalb auch als TSLPR bekannt. Es bildet einen funktionellen Komplex zusammen mit der *IL7R $\alpha$* -Untereinheit des Interleukin-7-Rezeptors und dem Liganden TSLP.<sup>38</sup> Dies führt zu einer Aktivierung des Januskinase/Signaltransduktor und Aktivator der Transkription (JAK/STAT)-Signalweges sowie des Phosphoinositid-3-Kinasen/*mechanistic target of rapamycin* (PI3K/mTOR)-Signalweges (siehe Abbildung 4).<sup>39</sup> *CRLF2* ist somit beteiligt an einer Vielzahl von regulatorischen Prozessen wie Zellproliferation, Immunantwort und Entwicklung des hämatopoetischen Systems.<sup>40</sup>

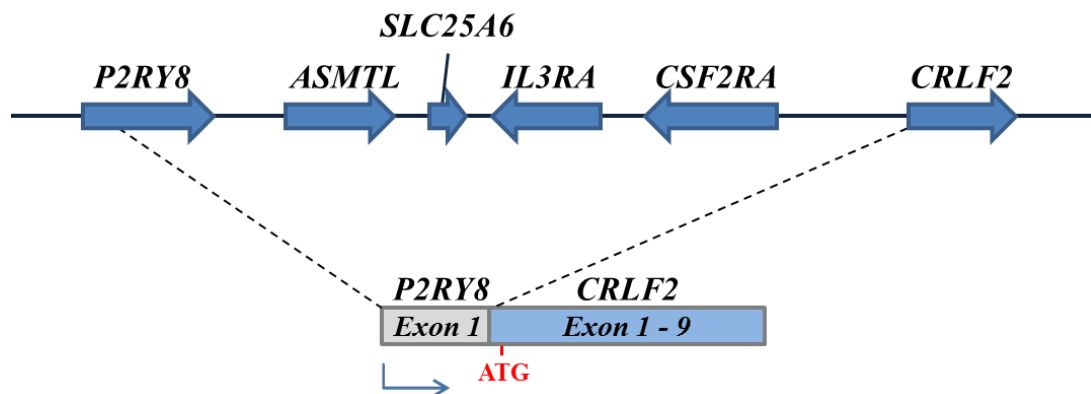
*CRLF2* gehört zur Familie der Typ1-Zytokinrezeptoren, welche auch als hämatopoetische Wachstumsfaktorrezeptorfamilie bekannt ist. Diese transmembranen Rezeptoren haben alle ein extrazelluläres Aminosäuremotiv (WSXWS) gemein. *CRLF2* weist eine signifikante Homologie mit *IL2R $\gamma$*  auf, dem anderen Partner von *IL7R $\alpha$*  im *IL7*-Rezeptor. Das Protein *CRLF2* hat eine Molekülmasse von ungefähr 40 kD und besteht aus 371 Aminosäuren, davon bilden 210 Aminosäurereste die extrazelluläre Domäne und 119 Aminosäurereste die intrazelluläre Domäne.<sup>41</sup>



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der TSLP-Signalwege.** Durch die Bindung des Liganden *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) kommt es zur Heterodimerisierung des Rezeptors *cytokine receptor-like factor 2/Interleukin-7-Rezeptor α* (CRLF2/IL7Rα). Die rezeptorassoziierten Januskinasen (JAKs) katalysieren die Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors. Diese werden durch die Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (STATs) gebunden und ebenfalls durch die JAKs phosphoryliert (P). Nach Dissoziation vom Rezeptor entsteht ein aktiviertes STAT-Dimer, welches im Zellkern als Transkriptionsfaktor wirkt. Gleichzeitig aktiviert die TSLP-Rezeptorbindung auch den komplexen PI3K/mTOR-Signalweg. Über eine Reihe von Phosphorylierungen und unter Beteiligung einer Vielzahl von akzessorischen und regulatorischen Proteinen führt dieser Signalweg über die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K), die Proteinkinase B (PKB) und den *mechanistic target of rapamycin complex 1* (mTORC1) zur Aktivierung der Translation.

Das Gen, welches dieses Protein kodiert, ist in der pseudoautosomalen Region 1 (PAR1) des X- und Y-Chromosoms lokalisiert (Xp22.33; Yp11.2) und besteht aus 9 Exonen. Es sind mehrere Transkriptvarianten durch alternatives Spleißen bekannt. *CRLF2* wird hauptsächlich von dendritischen Zellen, Monozyten, basophilen Granulozyten und einigen T-Zellen exprimiert, aber normalerweise nicht von B-Vorläuferzellen.<sup>42,43</sup> Allerdings zeigen rund 10% der pB-ALL, 15% der T-ALL und 60% der Down-Syndrom (DS)-ALL eine hohe *CRLF2*-Genexpression.<sup>36,37,44</sup> *In vitro* Experimente zeigten eine kausale Rolle der hohen *CRLF2*-Genexpression an der Leukämogenese durch eine erhöhte Proliferation von lymphatischen Vorläuferzellen mittels STAT5-Aktivierung.<sup>45</sup> Außerdem ist eine hohe *CRLF2*-Genexpression

häufig assoziiert mit einer zusätzlichen Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges durch Mutationen des *CRLF2*- oder *JAK2*-Gens.<sup>44</sup> Während in der T-ALL bis heute noch keine Ursache für die hohe *CRLF2*-Genexpression identifiziert werden konnte,<sup>37</sup> kann diese in der pB-ALL durch verschiedene genetische Aberrationen verursacht werden. Zum einen führt eine interstitielle Mikrodeletion innerhalb der PAR1-Region dazu, dass *CRLF2* unter den Promoter von *purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 8 (P2RY8)* gerät (siehe Abbildung 5).<sup>44,46</sup>



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der *P2RY8/CRLF2*-Deletion.** Die Bruchpunktregion der interstitiellen Mikrodeletion innerhalb der PAR1-Region ist durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet und führt zur Deletion der darin gelegenen Gene. Der Bruchpunkt in *P2RY8* befindet sich an der Grenze zwischen Exon 1 und Intron 1 und führt zur Fusion des 5'-untranslatierten Bereichs (UTR) von *P2RY8* an das Exon 1 von *CRLF2* unmittelbar vor dem Startcodon (ATG). Die Pfeile zeigen die Richtung der Transkription.

Zum anderen führt eine t(X;14) oder t(Y;14) Chromosomentranslokation, bei der *CRLF2* unter den Enhancer des *immunoglobulin heavy locus (IGH)* gerät, zu einer hohen *CRLF2*-Genexpression.<sup>45</sup> Außerdem wurde ein seltenes *CSF2RA/CRLF2*-Fusionstranskript mit einer Deletion der *CRLF2*-Promoterregion entdeckt, bei welchem wahrscheinlich ein Enhancer des *colony stimulating factor 2 receptor alpha subunit (CSF2RA)* die Expression von *CRLF2* kontrolliert.<sup>47</sup> Auch zusätzliche Kopien des *CRLF2*-Gens werden häufig in Fällen mit hoher *CRLF2*-Genexpression identifiziert, während in anderen Fällen keine bekannten Aberrationen detektierbar sind und deren Ursache weiterhin unklar ist.<sup>36,47,48</sup>

Allerdings wurde in ALL-BFM-basierten Studien bislang nur gezeigt, dass die *P2RY8/CRLF2*-Fusion mit einer schlechten Prognose aufgrund einer hohen Rezidivinzidenz assoziiert ist.<sup>36,49,50</sup> In diesen retrospektiven Studien waren aber nur wenige Fälle mit der *IGH/CRLF2*-Translokation eingeschlossen. Die *P2RY8/CRLF2*-Fusion zeigte den größten prognostischen Wert in der Patientengruppe mit mittlerem Risiko und unabhängig von einer



hohen *CRLF2*-Genexpression.<sup>36,49,50</sup> Rund 5% der pB-ALL weist eine *P2RY8/CRLF2*-Fusion auf.<sup>45,46,50</sup> Diese Patienten erkranken meist sehr jung an der ALL und die *P2RY8/CRLF2*-Fusion konnte rückwirkend bereits zum Zeitpunkt der Geburt anhand von archivierten Guthrie-Karten nachgewiesen werden.<sup>49</sup> Die Detektion der *P2RY8/CRLF2*-Fusion ist nicht immer mit einer hohen globalen *CRLF2*-Genexpression assoziiert, da die Fusion auch nur in einem kleinen Subklon vorliegen kann.<sup>49,50</sup> Außerdem wurde gezeigt, dass die *P2RY8/CRLF2*-Fusion oftmals im Rezidiv nicht mehr vorhanden ist.<sup>49</sup> Daraus lässt sich schließen, dass ein *P2RY8/CRLF2*-positiver Klon nicht den selektiven Vorteil besitzt, um ein Rezidiv zu entwickeln. Basierend auf diesen Beobachtungen wird vermutet, dass die *P2RY8/CRLF2*-Aberration nur ein Surrogatmarker für eine schlechte Prognose ist und keine ursächliche Relevanz besitzt. Der Ursprung und der zugrundeliegende Mechanismus für die Entstehung der hohen Rezidivwahrscheinlichkeit sind noch unklar und bedürfen weiterer Erforschung.

### 3.4 Zielsetzung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand eine umfassende Untersuchung der Inzidenz und molekularen Charakterisierung der ALL im Kindesalter mit hoher *CRLF2*-Genexpression und deren zugrundeliegenden Aberrationen. Hierfür sollten folgende Untersuchungen erfolgen:

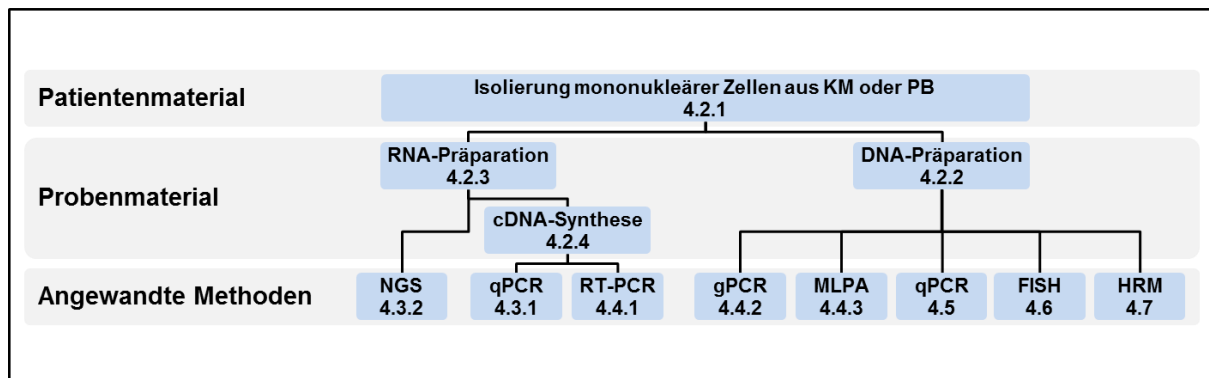
- Prospektive Erfassung der *CRLF2*-Genexpression mit Hilfe der qPCR und Screening nach *P2RY8/CRLF2*-Fusionstranskripten mittels RT-PCR in allen Patienten der laufenden AIEOP-BFM ALL 2009 Studie über einen Zeitraum von vier Jahren, bei denen eine entsprechende Einwilligung vorlag und Material verfügbar war.
- Untersuchung der Fälle mit hoher *CRLF2*-Genexpression ohne *P2RY8/CRLF2*-Aberration auf *IGH/CRLF2*-Translokation und zusätzliche Kopien des *CRLF2*-Gens mittels FISH.
- Identifizierung zusätzlicher genetischer und potentiell prognostischer Aberrationen wie z.B. einer *IKZF1*-Deletion mit Hilfe der multiplexen ligationsabhängigen Sondenamplifikation (MLPA) sowie Mutationen von *CRLF2* und *JAK2* in allen Fällen mit hoher *CRLF2*-Genexpression.
- Analyse der akquirierten Daten im Kontext mit klinischen Parametern und Bewertung der prognostischen Relevanz.

Zusätzlich sollte ein methodischer Vergleich von verschiedenen Techniken zur Detektion der *P2RY8/CRLF2*-Fusion für eine künftige Implementierung als prognostischer Marker durchgeführt werden.

Ein weiteres Ziel war die Identifizierung von potentiellen Faktoren, welche zu der hohen Rezidivinzidenz der *P2RY8/CRLF2*-positiven Patienten beitragen. Dazu wurde eine vergleichende NGS-basierte Transkriptom-Analyse mit *CRLF2*-hochexprimierenden Fällen mit und ohne *P2RY8/CRLF2*-Fusion durchgeführt.

## 4. Material und Methoden

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit angewandten Methoden beschrieben. Allgemein übliche Labormethoden, Arbeitsanweisungen, Reagenzien und Geräte werden nicht separat angegeben. Die Verwendung von Kits, Geräten und Software erfolgte entsprechend den Angaben des jeweiligen Herstellers. Eine Übersicht der in dieser Arbeit angewandten Methoden ist in der Abbildung 6 dargestellt.



**Abbildung 6: Flussdiagramm der in dieser Arbeit angewandten Methoden mit Verweis auf den entsprechenden Abschnitt.** Abkürzungen: KM, Knochenmark; PB, peripheres Blut; NGS, Sequenzierung der nächsten Generation (*next-generation-sequencing*); PCR, Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*); qPCR, quantitative *Real-Time* PCR; RT-PCR, Reverse Transkriptase-PCR; gPCR, genomische PCR; MLPA, multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation (*multiplex ligation-dependent probe amplification*); FISH, Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung; HRM, Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (*high resolution melting*).

### 4.1 Patienten

In der vorliegenden Arbeit wurden kryokonservierte klinische Proben von an ALL erkrankten Kindern im Alter von 1 - 18 Jahren vor Therapiebeginn untersucht. Diagnostik, Risikogruppen-Stratifizierung und Behandlung der Patienten erfolgte nach dem Protokoll der ALL-BFM 2000-Studie<sup>23,24</sup> und anschließend nach dem Protokoll der AIEOP-BFM ALL 2009 Studie (EudraCT-Nummer: 2007-004270-43). Die Untersuchungen erfolgten im Rahmen von den zuständigen Ethikkommissionen der Medizinischen Hochschule Hannover und des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein genehmigten Begleitforschungsprojekten mit Einverständnis der Patienten bzw. deren gesetzlicher Vertreter gemäß der Deklaration von Helsinki. Hierzu wurde in der Studienzentrale Kiel eine umfassende Biobank von verbliebenem, zu diagnostischen Zwecken entnommenem Patientenmaterial aufgebaut.

## 4.2 Aufbereitung der klinischen Proben

Die Aufarbeitung der klinischen Proben erfolgte unter streng standardisierten Bedingungen. Es wurden nur Proben des Knochenmarks oder peripheren Bluts verwendet, bei denen zytomorphologisch ein Lymphoblastenanteil von mehr als 80% bestimmt wurde, da die Kontamination mit nichtleukämischen Zellen zur Verfälschung der Genexpressionsanalysen führen würde.

### 4.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen

Die Isolierung mononukleärer Zellen (Lymphoblasten, Lymphozyten und Monozyten) aus dem Vollblut erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation.<sup>51</sup> Hierzu wurde mit Heparin oder EDTA antikoaguliertes peripheres Blut oder Knochenmark zu gleichen Teilen mit *phosphate buffered saline* (PBS)-Puffer (Biochrom) verdünnt und auf 15 ml Biocoll (Biochrom) geschichtet. Zellen höherer Dichte wie Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen passieren die Biocoll-Trennschicht aus ungeladenen Saccharosepolymeren, während sich mononukleäre Zellen mit geringerer Dichte in der Interphase zwischen Trennschicht und Plasma ansammeln. Gemäß den Herstellerangaben wurde diese Interphase nach Zentrifugation mit einer Pipette abgenommen, mit PBS gewaschen und das Zellpellet anschließend in RPMI-Medium (Life Technologies) mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich) als Gefrierschutz für die anschließende Kryokonservierung resuspendiert.<sup>52</sup>

### 4.2.2 DNA-Präparation

Die Extraktion und Aufreinigung genomischer DNA aus den angereicherten Lymphoblasten wurde mit Hilfe des QIAamp DNA Blood Midi Kits (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurden max.  $2 \times 10^7$  Zellen zunächst lysiert und enthaltene Proteine mittels Proteinase K degradiert. Nach 1:1 Verdünnung des Zelllysats mit Ethanol, wurde die DNA über eine Kieselgelsäule durch selektive Adsorption extrahiert, durch mehrere Waschschrte gereinigt und anschließend in TRIS-EDTA (TE)-Puffer (Sigma-Aldrich) eluiert.<sup>53</sup>

Anschließend wurde die Konzentration und Qualität der isolierten DNA mittels Spektralphotometrie am NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) bestimmt.<sup>54</sup> Hierzu wurde die Absorption bei 260 nm gemessen, welche dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren entspricht. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz entspricht eine Absorption von 1,0 einer Konzentration von 50µg/ml doppelsträngiger DNA. Zur Beurteilung der Qualität und

Reinheit wurde zusätzlich das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm ermittelt. Reine DNA besitzt eine 260:280-*Ratio* von ~1,8. Eine *Ratio* unter 1,8 deutet auf Kontaminationen mit Proteinen hin, während die *Ratio* bei Kontaminationen mit RNA in Richtung 2,0 verschoben ist. Die isolierte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 4.2.3 RNA-Präparation

Mit Hilfe der Trizol-Chloroform-Extraktion nach Chomczynski & Sacchi wurde die Gesamt-RNA aus den angereicherten Lymphoblasten isoliert.<sup>55</sup> Hierzu wurden  $\sim 1 \times 10^7$  Zellen mit 1 ml TRIzol Reagenz (Ambion) versetzt. Das darin enthaltene Guanidiniumthiocyanat lysiert die Zellen und inaktiviert RNasen und andere Enzyme, während sich die RNA in dem enthaltenem Phenol löst. Gemäß den Herstellerangaben erfolgte die Phasentrennung durch Zugabe von 200 µl Chloroform (Sigma-Aldrich) und anschließender Zentrifugation. Dabei sammeln sich Proteine in der unteren organischen Phase, DNA in der Interphase und RNA in der oberen wässrigen Phase. Zur weiteren Aufreinigung der RNA wurde die wässrige Phase entnommen, 1:1 mit 70%igem Ethanol verdünnt und die enthaltene RNA durch selektive Adsorption mittels Kieselgelsäulen des RNeasy Mini Kits (Qiagen) extrahiert.<sup>53</sup> Gemäß den Herstellerangaben erfolgten mehrere Waschschrte und die Elution in 50 µl RNase freiem Wasser. Anschließend wurde ein vollständiger DNA-Verdau mit Hilfe des DNA-free Kits (Ambion) durchgeführt, um eventuell verbliebende DNA-Kontaminationen zu entfernen.

Die Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der aufgereinigten RNA wurde mit Hilfe des Agilent RNA 6000 Nano Kits (Agilent Technologies) am Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurde 1 µl RNA in einem Kapillarsystem mit Gelmatrix elektrophoretisch aufgetrennt.<sup>56</sup> Die Auswertung erfolgte mit der Agilent 2100 Expert Software. Zur Beurteilung der Qualität der RNA dient die *RNA integrity number* (RIN), welche den Grad der Degradierung von RNA klassifiziert.<sup>57</sup> Hierbei entspricht eine RIN von 10 RNA höchster Integrität und 0 einer vollständigen Degradierung. Um repräsentative Genexpressionsanalysen zu gewährleisten, wurde nur RNA mit einer RIN > 7 verwendet.<sup>58</sup> Die isolierte RNA wurde bei -80 °C gelagert.

### 4.2.4 cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA erfolgte mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) unter Verwendung des RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kits (Thermo Scientific) nach dem Protokoll des Herstellers. Hierzu wurden 1000 ng Gesamt-RNA mit

Hilfe der M-MuLV Reverse Transkriptase sowie Random Hexamer Primern in cDNA umgeschrieben.<sup>59</sup> Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 4.3 Genexpressionsanalysen

Zur Untersuchung der Genexpression der initialen Lymphoblasten wurden verschiedene Methoden angewandt. Die Analyse der Expression einzelner Gene erfolgte mittels quantitativer *Real-Time* PCR (qPCR) unter Verwendung von cDNA. Für die genomweite Untersuchung der Genexpression, die sogenannte Transkriptom-Analyse, wurde RNA mittels *next-generation-sequencing* (NGS)-basierenden Techniken wie *massive analysis of cDNA ends* (MACE) und *SuperTag digital gene expression profiling* (ST-DGE) analysiert.

#### 4.3.1 Quantitative *Real-Time* PCR (qPCR)

Die qPCR beruht auf dem Prinzip der klassischen Polymerase-Kettenreaktion zur *in vitro* Vervielfältigung von Nukleinsäuren verbunden mit der Quantifizierung des Amplifikats mittels Fluoreszenzmessung während jedes PCR-Zyklus in Echtzeit (*real-time*).<sup>60</sup> Hierzu wurde der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I verwendet, welcher unspezifisch an die kleine Furche doppelsträngiger DNA bindet.<sup>61,62</sup> Somit nimmt die Stärke des Fluoreszenzsignals proportional zur Menge der entstehenden DNA zu. Die qPCR wurde am 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) unter Verwendung der SDS v2.3 Software (Applied Biosystems) und des Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Der Reaktionsansatz erfolgte in einer MicroAmp Fast 96-Well Mikrotiterplatte (Applied Biosystems) in einem Volumen von 20 µl. Es wurden entweder 2 µl QuantiTect Primer Assay (Qiagen) oder selbst designte Primer (synthetisiert von Invitrogen) in einer finalen Konzentration von je 20 pM eingesetzt. Diese spezifischen Oligonukleotide flankieren die zu amplifizierende Gensequenz Intron-überspannend, um die Amplifikation von genomischer DNA auszuschließen. Eine Übersicht der verwendeten Primer ist in der Tabelle 1 dargestellt. Zu jeder Reaktion wurden 2 ng in cDNA umgeschriebene RNA hinzugefügt. Jede Probe wurde doppelt bestimmt. Zur Qualitätskontrolle der Amplifikation enthielt jede Platte eine Probe ohne cDNA (Wasserkontrolle), um mögliche Kontaminationen auszuschließen, sowie eine Kalibratorprobe zur Gewährleistung vergleichbarer Ergebnisse. Die Reaktionsbedingungen für jedes qPCR-Assay wurden im Vorfeld optimiert und die Spezifität der PCR mittels Schmelzkurvenanalyse<sup>63</sup> validiert.

**Tabelle 1: Übersicht der verwendeten qPCR-Primer mit Angabe des entsprechend verwendeten Temperaturprofils (siehe Tabelle 2 und 3).**

Gen	Transkripte	Name des Primer Assays oder Primersequenz (5' - 3')	Größe Produkt	Temp. Profil	T* [°C]
<i>CRLF2</i>	NM_001012288 NM_022148	Hs_CRLF2_1_SG QuantiTect Primer Assay	133 bp	#2	60
<i>SDHA</i>	NM_004168 NM_001294332 XM_005248329 XM_005248331	Hs_SDHA_1_SG QuantiTect Primer Assay	147 bp	#2	60
<i>BMP6</i>	NM_001718.4	FW: GTGGATGCCACTAACTCGAAACC RV: GGGTAATAAGGCACTGGCATGAG	149 bp	#2	63
<i>VGF</i>	NM_003378.3	FW: TGGTTTGTGCGAGTTCCCTTG RV: GGGTCAATTCACAGCGACTTGG	178 bp	#2	60
<i>LRCC32</i>	NM_005512.2 NM_001128922.1	FW: GGGCTCAGTAATGTGCGAGAAAG RV: TGGCTCTGCCATTGACTCTC	109 bp	#2	65
<i>IL1R2</i>	NM_001261419.1 NR_048564.1 NM_004633.3	FW: TGTACGTGTTGGTAATGGGAGT RV: TGTAATGCCTCCCACGAAAC	96 bp	#2	60
<i>PTPRK</i>	NM_001135648.1 NM_002844.3 NM_001291981.1 NM_001291984.1	FW: GTCTTGTTACATGCTCCACGTAG RV: GCTGGCAATCTAGAAAGAGGACAC	99 bp	#1	60
<i>VPREB1</i>	NM_007128.2	FW: AGAGGGAGTGGGAGGAAGAAATG RV: AACTGCAGGACCAGGAGATG	172 bp	#1	60
<i>TCL1A</i>	NM_021966.2 NM_001098725.1	FW: AGGCCTATGACCCCCACC RV: CATTCTCCAGACCCCA	307 bp	#2	65
<i>TCL1B</i>	NM_004918.3	FW: TCCAGTGCTGAGCAAGCAATG RV: CTTACGGACTAGCATCCCTTC	137 bp	#1	60
<i>TCL6</i>	NR_028288.1	FW: GCCTCCCAAGCAGCTAAGA RV: CTGCTTGCTGTGTGTCTATGG	111 bp	#2	63
<i>BIRC7</i>	NM_139317.1 NM_022161.2	FW: ATGGCAGAGCTGGTGTCCATC RV: TCAGAAGCATCCAAACAGGTACAG	125 bp	#1	60
<i>SOX11</i>	NM_003108.3	FW: GTGCACAGATAGGACTGTTT RV: CCAATTGCTCATTGGAAACC	138 bp	#1	60
<i>RPLP1</i>	NM_001003.2, NM_213725.1	FW: AGTCACGGAGGATAAGATCAATGC RV: ACATTGCAGATGAGGCTCCC	123 bp	#1 / #2	60-65

Abkürzungen: Temp., Temperatur; FW, vorwärts (*forward*); RV, rückwärts (*reverse*); bp, Basenpaare.

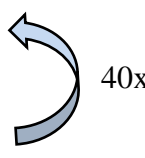
\*T, Temperatur der Primerhybridisierung.

Es wurden je nach Assay zwei verschiedene Temperaturprofile verwendet. Der klassische PCR-Zyklus (Tabelle 2) besteht aus der wiederholten Abfolge von drei Temperaturschritten: der Denaturierung, um die Wasserstoffbrückenbindungen der doppelsträngigen DNA aufzutrennen, der Primerhybridisierung, bei der sich die Primer spezifisch an den jeweiligen

DNA-Einzelstrang anlagern, und der anschließenden Elongation, bei der die im Master Mix enthaltene hitzestabile *Taq*-Polymerase beginnend am 3'-Ende des angelagerten Primers den komplementären DNA-Strang synthetisiert.<sup>64,65</sup>

**Tabelle 2: Temperaturprofil #1 für qPCR.**


Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	15 min
Denaturierung	95 °C	15 s
Primerhybridisierung	Siehe Tabelle 1	20 s
Elongation	72 °C	20 s
Finale Elongation	72 °C	5 min



Das verkürzte Temperaturprofil (Tabelle 3) kombiniert die Primerhybridisierung und Elongation in einem Temperaturschritt.

**Tabelle 3: Temperaturprofil #2 für qPCR.**

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
Denaturierung	95 °C	15 s
Amplifikation	Siehe Tabelle 1	60 s



Je nach Primer wurde die optimale Temperatur für die Primerhybridisierung gewählt, welche in der Tabelle 1 aufgelistet ist.

Es erfolgte eine relative Quantifizierung mit Hilfe einer internen Kontrolle.<sup>66</sup> Hierbei werden die Expressionsergebnisse mit Hilfe eines konstitutiv exprimierten Haushaltsgens normalisiert, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA bzw. cDNA auszugleichen. *Succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A (SDHA)* oder *Ribosomal protein, large, P1 (RPLP1)* wurden als Referenzgen ausgewählt. Die Auswertung der qPCR erfolgte mit Hilfe der RQ Manager v1.2.1 Software (Applied Biosystems) unter Anwendung der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode.<sup>67</sup> Hierbei wird zu Beginn der exponentiellen Phase der PCR der *cycle threshold* (Ct-Wert) bestimmt, welcher den Zyklus angibt, an dem das Fluoreszenzsignal erstmalig die unspezifische Hintergrundfluoreszenz signifikant überschreitet. Zur Bestimmung des Expressionslevels des Zielgens wird die relative Quantität (RQ-Wert) als  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  berechnet, wobei sich das  $\Delta\Delta C_t$  aus dem Expressionsunterschied von



Ziel- und Referenzgen ( $\Delta Ct$ ) der Probe normalisiert durch den  $\Delta Ct$  der Kalibratorprobe ergibt.

#### 4.3.2 Transkriptom-Analyse

Es wurde eine vergleichende genomweite Untersuchung der Genexpression von zwei *CRLF2*-hochexprimierenden Subgruppen mit gepoolter RNA von 17 Patienten mit *P2RY8/CRLF2*-Fusion (*P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>) und 18 Patienten ohne (*P2RY8/CRLF2*<sup>-</sup>) durchgeführt, um gruppenspezifische Genexpressionsprofile zu identifizieren. Zur Validierung der Ergebnisse wurden exemplarisch 11 Kandidatengene mittels qPCR auf individueller Patientenebene für 27 Patienten der *P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>-Subgruppe und 27 Patienten der *P2RY8/CRLF2*<sup>-</sup>-Subgruppe untersucht (siehe Abschnitt 4.3.1). Der *CRLF2*-Hochexpression zugrundeliegenden genetischen Eigenschaften der untersuchten Proben sind in Tabelle 4 aufgelistet und die dazugehörigen klinischen Parameter der Patienten sind in der Tabelle S1 im Anhang zusammengefasst. Alle untersuchten Patienten waren negativ für die bekannten, prognostisch relevanten Translokationen *BCR/ABL1*, *KMT2A/AFF1* und *ETV6/RUNX1*.

**Tabelle 4: *CRLF2*-bezogene genetische Eigenschaften der Proben für das gepoolte NGS und der qPCR-Validierung.**

	<i>P2RY8/CRLF2</i> <sup>+</sup>	<i>P2RY8/CRLF2</i> <sup>-</sup>
<b>NGS-Kohorte (gepoolt)</b>		
<i>P2RY8/CRLF2</i> -Fusion	17	0
<i>IGH/CRLF2</i> -Translokation	0	4
Zusätzliche <i>CRLF2</i> -Kopien	0	11
Unbekannte Aberration	0	3
<b>Validierungskohorte (qPCR)</b>		
<i>P2RY8/CRLF2</i> -Fusion	27	0
<i>IGH/CRLF2</i> -Translokation	0	0
Zusätzliche <i>CRLF2</i> -Kopien	0	21
Unbekannte Aberration	0	6

Abkürzungen: NGS, Sequenzierung der nächsten Generation (*next-generation-sequencing*); qPCR, quantitative Real-Time PCR.

Die Transkriptom-Analyse wurde durch die Firma GenXPro GmbH mit zwei NGS-basierenden Techniken durchgeführt: *massive analysis of cDNA ends* (MACE)<sup>68</sup> sowie

*SuperTag digital gene expression profiling* (ST-DGE) auch bekannt als deepSuperSAGE.<sup>69</sup> Beide Methoden erlauben eine Sequenzierung des 3'-Endfragments und erzeugen exakt nur ein Fragment pro Transkript, was eine zuverlässige Quantifizierung besonders für selten exprimierte Gene ermöglicht im Gegensatz zu Techniken wie RNA-Seq<sup>70</sup> oder Microarrays.<sup>71</sup> Die Ergebnisse beider Techniken wurden kombiniert und mit Hilfe verschiedener Analyse-Softwares interpretiert.

#### 4.3.2.1 Massive Analysis of cDNA Ends (MACE)

Die genomweite Genexpressionsuntersuchung mittels MACE wurde durch die Firma GenXPro GmbH unter Einsatz von je 5 µg gepoolter Gesamt-RNA durchgeführt.<sup>68</sup> Hierzu erfolgte zunächst eine reverse Transkription der polyadenylierten RNA in cDNA mit Hilfe von 3'-biotinylierten Oligo(dT)<sub>20</sub>-Primern mit anschließender Fragmentierung in 80-500 bp durch Sonifikation. Nach Anreicherung der biotinylierten Fragmente über eine Streptavidin-Matrix wurden diese mittels PCR amplifiziert und schließlich auf einer Illumina HiSeq2000 Plattform sequenziert. Um PCR-bedingte Kopien im Datensatz zu identifizieren wurde GenXPro's patentierte TrueQuant Technologie angewandt, bei der jedes Molekül vor der Amplifikation mit einem einzigartigen Barcode versehen wird.<sup>72</sup> Nach qualitativer Bearbeitung der Rohdaten erfolgte zunächst das Abgleichen der Sequenzen mit der RefSeq RNA Datenbank<sup>73</sup> und anschließend mit dem menschlichen Genom (UCSC, hg19)<sup>74</sup> unter Verwendung der Novoalign Software (<http://www.novocraft.com/main/index.php>). Zur Annotation der genomischen Positionen wurde der RefSeq Annotation Track (UCSC table browser)<sup>75</sup> verwendet. Es erfolgte eine Normalisierung zur Bestimmung der *reads assigned per million mapped reads* (RPM) gemäß  $n_{\text{Gen}}/(n_{\text{Total}} \times 10^6)$ . Die differentielle Genexpression zwischen den beiden *CRLF2*-hochexprimierenden Subgruppen wurde mit Hilfe des DEGseq/Bioconductor R-Packets berechnet.<sup>76</sup> Die Bestimmung der *false discovery rate* (FDR) erfolgte nach Benjamini-Hochberg.<sup>77</sup> Die MACE-Daten sind zugänglich in der ArrayExpress-Datenbank<sup>78</sup> (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) unter der Zugangsnummer E-MTAB-4737.

#### 4.3.2.2 SuperTag Digital Gene Expression Profiling (ST-DGE)

ST-DGE wurde ebenfalls durch die Firma GenXPro GmbH unter Anwendung der patentierten TrueQuant Technologie<sup>72</sup> durchgeführt. Hierzu wurden je 4 µg gepoolte Gesamt-RNA nach dem Protokoll von Matsumura *et al.* analysiert.<sup>69</sup> Nach reverser Transkription der polyadenylierten RNA in cDNA erfolgte die Fragmentierung gezielt mittels der

Endonukleasen NlaIII und EcoP15I. Anschließend wurden die biotinylierten Fragmente über eine Streptavidin-Matrix angereichert, mittels PCR amplifiziert und schließlich auf einer Illumina HiSeq2000 Plattform sequenziert. Die bioinformatische Verarbeitung der Rohdaten erfolgte wie in Abschnitt 4.3.2.1 beschrieben. Die Daten des ST-DGE sind ebenfalls in der ArrayExpress-Datenbank<sup>78</sup> (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) unter der Zugangsnummer E-MTAB-4737 zugänglich.

#### 4.3.2.3 Kombination der MACE- und ST-DGE-Daten

Die Ergebnisse beider NGS-basierenden Techniken wurden kombiniert, indem nach Genen mit signifikant differenzieller Expression ( $p < 0,001$ ) gefiltert wurde. Außerdem wurden Gene ausgeschlossen, die in beiden Methoden keinen ähnlichen Genexpressionsunterschied (wenigstens  $|1,3 \pm 0,2|$  in der  $\log_2$ -Skala) aufwiesen. Somit wurden für die Identifizierung differenziell exprimierter Transkripte folgende Kriterien angewandt:

i) Signifikanz:

MACE oder ST-DGE:  $p < 0,001$

ii) Genexpressionsunterschied ( $fc$ , *fold change*): a oder b muss erfüllt sein

a)  $|\log_2(fc_{MACE})| > 1,5$  und  $|\log_2(fc_{ST-DGE})| > 1,1$

b)  $|\log_2(fc_{MACE})| > 1,1$  und  $|\log_2(fc_{ST-DGE})| > 1,5$

#### 4.3.2.4 Analyse der Transkriptom-Daten

Für die Interpretation der Genexpressionsdaten wurden verschiedene Analyse-Softwares verwendet:

Zur funktionellen Charakterisierung von Gengruppen wurde der *Gene Ontology AnaLyz*er (GOAL; <https://bioinfo.iit.nrc.ca/GOAL>) angewandt, welcher sowohl *Gene Ontology* (GO), *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) als auch Transkriptionsfaktor-assoziierte Daten integriert.<sup>79</sup> Die p-Werte wurden nach Benjamini-Hochberg korrigiert und signifikante Abweichungen von einer zufälligen Verteilung durch eine  $FDR \leq 0,05$  angezeigt. Es wurden alle signifikant differentiell exprimierten Gene der zwei *CRLF2*-hochexprimierenden Subgruppen analysiert.

*Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA; <http://www.broadinstitute.org/gsea>)<sup>80</sup> dient der Identifizierung von überrepräsentierten biologischen Prozessen innerhalb von funktionellen

Gen-Sets (C2-Katalog) aus der *Molecular Signature Database* (MSigDB v3.1; <http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>).<sup>81</sup> Hierfür wurden die gesamten kombinierten NGS-Daten anhand des Genexpressionsunterschieds (fc) geordnet. Als Parameter wurden 1000 Permutationen und die Gen-Sets als Permutationstyp gewählt. Ein hoch positiver Anreicherungswert (ES; *enrichment score*) zeigt eine Anreicherung von höher exprimierten Genen in einem Gen-Set, während ein hoch negativer ES eine Anreicherung von niedriger exprimierten Genen kennzeichnet. Die GSEA-Ergebnisse wurden entsprechend des nominalen p-Werts ( $< 0,05$ ) und der FDR ( $\leq 0,25$ ) bewertet.

Außerdem wurden mittels *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes* (STRING v9.1; <http://string-db.org>) potentielle Protein-Protein-Interaktionsnetzwerke erstellt.<sup>82,83</sup> Hierbei wurde innerhalb der Liste der signifikant differentiell exprimierten Gene nach bekannten und vorhergesagten Protein-Interaktionen gesucht, welche in einem Netzwerk visualisiert und durch Anwendung verschiedener Algorithmen geclustert werden konnten. Die Interaktionen schlossen sowohl direkte (physikalische) als auch indirekte (funktionelle) Assoziationen ein und wurden durch die Berechnung eines Konfidenz-Scores bewertet.

Die *Connectivity Map* (CMAP; <https://portals.broadinstitute.org/cmap>) Datenbank wurde genutzt für ein *in silico* Wirkstoff-Screening.<sup>84,85</sup> Krankheitsassoziierte Genexpressionsprofile werden hierbei verknüpft mit entsprechenden Genexpressionsänderungen, verursacht durch die Behandlung von kultivierten humanen Zellen mit verschiedenen Wirkstoffen. Dadurch können potentielle Wirkstoffe identifiziert werden, welche dem Rezidiv-assoziierten Genexpressionsprofil entgegenwirken. Der Konnektivitätswert (CS; *connectivity score*) von +1 bis -1 repräsentiert die Korrelation zwischen diesem Genexpressionsprofil mit einer bestimmten Signatur der CMAP Datenbank. Ein hoch positiver Wert kennzeichnet einen Wirkstoff, der dieses Genexpressionsprofil induziert, während ein Wirkstoff mit hoch negativem Wert dieses Genexpressionsmuster supprimiert. Potentielle Wirkstoffe wurden identifiziert mit einem p-Wert  $< 0,05$  und einem Konnektivitätswert von  $< -0,9$ .

#### 4.4 Detektion der *P2RY8/CRLF2*-Fusion


Für die Detektion der *P2RY8/CRLF2*-Fusion verursachenden PAR-Deletion gibt es verschiedene Methoden, welche sich in ihrer Sensitivität unterscheiden. Es wurden drei gebräuchliche Methoden getestet und hinsichtlich verschiedener Aspekte verglichen: RT-PCR, genomische PCR und die multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation (MLPA, *multiplex ligation-dependent probe amplification*).

#### 4.4.1 RT-PCR

Zum Nachweis der *P2RY8/CRLF2*-Fusion mittels RT-PCR wurden 5 ng in cDNA umgeschriebene RNA unter Verwendung der HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben im Thermocycler (Eppendorf) amplifiziert. Der Reaktionsansatz erfolgte in einer 96-Multiply PCR-Platte (Sarstedt) in einem Volumen von 20 µl. Es wurden folgende von Hertzberg *et al.* publizierte Primer (Invitrogen) in einer finalen Konzentration von je 20 pM eingesetzt: P2RY8F01: 5'-CACGAACACCTTCTCAAGCA-3'; CRLF2R03: 5'-GGTAGTTGGTGCACCTGGTCA-3'.<sup>44</sup> Es wurde folgendes Temperaturprofil verwendet:

**Tabelle 5: Temperaturprofil für RT-PCR.**

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	15 min
Denaturierung	95 °C	30 s
Primerhybridisierung	55 °C	30 s
Elongation	72 °C	60 s
Finale Elongation	72 °C	10 min
Kühlung	10 °C	∞

 35x

Zur Qualitätskontrolle der Amplifikation enthielt jeder PCR-Ansatz eine Probe ohne cDNA (Wasserkontrolle), um mögliche Kontaminationen auszuschließen, sowie eine Patientenprobe mit bekannter *P2RY8/CRLF2*-Fusion (Positivkontrolle).

Die Detektion des amplifizierten *P2RY8/CRLF2*-Fusionstranskripts erfolgte mittels des hochauflösenden Kapillarelektrophorese Systems QIAxcel (Qiagen) unter Verwendung des QX Size Markers 50 – 800 bp (Qiagen) als Längenstandard entsprechend den Herstellerangaben. Das erwartete PCR-Produkt mit 390 bp Länge ist nur bei vorhandener PAR-Deletion zu detektieren.

#### 4.4.2 PCR mittels genomischer DNA

Die Detektion der *P2RY8/CRLF2*-Fusion mittels genomischer PCR (gPCR) erfolgte nach dem Protokoll von Morak *et al.*<sup>49</sup> Hierzu wurden je 100 ng genomische DNA unter Verwendung der Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) entsprechend den Herstellerangaben im Thermocycler (Eppendorf) amplifiziert. Der

Reaktionsansatz erfolgte in einer 96-Multiply PCR-Platte (Sarstedt) in einem Volumen von 20 µl. Um die verschiedenen Bruchpunkte beider Fusionspartner abzudecken, erfolgten drei PCR-Ansätze mit verschiedenen Primer-Kombinationen, welche in Tabelle 6 angegeben sind. Die Primer (Invitrogen) wurden in einer finalen Konzentration von je 10 pM eingesetzt.

**Tabelle 6: Primer-Kombinationen für die Detektion der *P2RY8/CRLF2*-Fusion und Identifikation der Bruchpunkte der Fusionspartner mittels gPCR.**

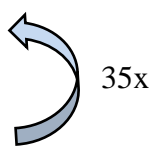
<i>CRLF2</i>	Primer	Sequenz (5' - 3')	Produktgröße	<i>P2RY8</i>
BP1	FW- <i>P2RY8</i> -1	AGCCACCCTTCCTTTAATAACTCAT	136 bp	BP1
	RV- <i>CRLF2</i> -1	TCTGAGCTCCATGGTTCGTCA	270 bp	BP2
			895 bp	BP3
BP2	FW- <i>P2RY8</i> -1	AGCCACCCTTCCTTTAATAACTCAT	157 bp	BP1
	RV- <i>CRLF2</i> -2	CAAACACTGTGATGGTAGCATATG	291 bp	BP2
			916 bp	BP3
BP3	FW- <i>P2RY8</i> -1	AGCCACCCTTCCTTTAATAACTCAT	129 bp	BP1
	RV- <i>CRLF2</i> -3	GTCAGAAAGGAACTAGGGAAATG	263 bp	BP2
			888 bp	BP3

Abkürzungen: BP, Bruchpunkt; FW, vorwärts (*forward*); RV, rückwärts (*reverse*); bp, Basenpaare.

Zur Qualitätskontrolle der Amplifikation enthielt jeder PCR-Ansatz eine Probe ohne DNA (Wasserkontrolle), um mögliche Kontaminationen auszuschließen, sowie eine Patientenprobe mit bekannter *P2RY8/CRLF2*-Fusion (Positivkontrolle). Es wurde folgendes Temperaturprofil verwendet:

**Tabelle 7: Temperaturprofil für genomische PCR.**

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s
Denaturierung	98 °C	10 s
Primerhybridisierung	68 °C	30 s
Elongation	72 °C	2 min
Finale Elongation	72 °C	10 min
Kühlung	10 °C	∞



Die Detektion des amplifizierten *P2RY8/CRLF2*-Fusionstranskripts erfolgte mittels des hochauflösenden Kapillarelektrophorese Systems QIAxcel (Qiagen) unter Verwendung des QX Size Markers 100 bp – 2,5 kb (Qiagen) als Längenstandard entsprechend den Hersteller-

angaben. Die Länge der erwarteten PCR-Produkte entsprechend der jeweiligen Bruchpunkte der Fusionspartner ist in der Tabelle 6 aufgelistet.

#### 4.4.3 Multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation (MLPA)

Die *P2RY8/CRLF2*-Fusion kann auch durch die Detektion der Deletion von *CSFRA* und *IL3RA* identifiziert werden. Dazu wurde die multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation (MLPA, *multiplex ligation-dependent probe amplification*) unter Verwendung des SALSA MLPA P335 ALL-*IKZF1* Kit (MRC-Holland) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.<sup>86</sup> Zusätzlich wird auch *SHOX*, *CRLF2* und *P2RY8* der pseudoautosomalen Region 1 (PAR1) abgedeckt. Außerdem enthält das Kit auch Sonden für jedes der 8 Exons von *IKZF1* sowie ausgewählte Exons von *EBF1*, *JAK2*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *ETV6*, *BTG1* und *RBI*. Die MLPA-Analyse wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Martin Stanulla (Medizinische Hochschule Hannover; MHH) unter Einsatz von 100 ng genomischer DNA am 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) durchgeführt. Für die Datenanalyse wurde die Coffalyser.Net Software verwendet. Die relative Kopienzahl wurde berechnet durch interne Normalisierung mittels 13 Kontrollsonden des Kits sowie durch externe Normalisierung mittels Kontrollproben (DNA von gesunden Spendern). Eine *Ratio* von  $1 \pm 0,3$  repräsentiert eine normale Kopienzahl von 2, eine *Ratio* von weniger als 0,7 oder 0,3 identifiziert heterozygote bzw. homozygote Deletionen, während eine *Ratio* von mehr als 1,3 zusätzliche Kopien anzeigt.

#### 4.5 Quantifizierung der *P2RY8/CRLF2*-Fusion

Die genomische *P2RY8/CRLF2*-Fusion wurde mittels qPCR quantifiziert, um die entsprechende Klonegröße zu bestimmen.<sup>49</sup> Es erfolgte eine absolute Quantifizierung mit Hilfe einer Standardkurve bestehend aus logarithmischen Verdünnungsschritten ( $1 \times 10^{-1}$  -  $1 \times 10^{-5}$ ) einer Patientenprobe mit einem Hauptklon von nahezu 100%. Die Fluoreszenzmessung erfolgte durch die Verwendung einer Hydrolyse-Sonde (TaqMan-PCR).<sup>87</sup> Diese Sonde ist ein spezifisches Oligonukleotid, welches am 5'-Ende einen Quencher (TAMRA, Carboxytetramethylrhodamin) und am 3'-Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (FAM, 6-FAM-phosphoramidit) trägt. Die Fluoreszenz des Reporter-Fluorophors wird bei intakten TaqMan-Sonden durch den Quencher mittels strahlungsfreier Energieübertragung (FRET, Förster-Resonanzenergietransfer) unterdrückt. Während eines PCR-Zyklus hybridisiert die Sonde an den komplementären DNA-Strang. Die im Master Mix enthaltene Taq-Polymerase

hydrolysiert auf Grund ihrer 5'-3'-Exonucleaseaktivität während der Synthese des Gegenstranges das 5'-Ende der Sonde. Die Fluoreszenz des Reporters wird nun nicht mehr durch den Quencher gelöscht und kann gemessen werden. Die qPCR wurde am 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) unter Verwendung der SDS 2.3 Software (Applied Biosystems) und des TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Der Reaktionsansatz erfolgte in einer MicroAmp Fast 96-Well Mikrotiterplatte (Applied Biosystems) in einem Volumen von 20 µl. Entsprechend den mittels genomischer PCR ermittelten Bruchpunkten der Fusionspartner wurden folgende Primer-Sonde-Kombinationen verwendet:

**Tabelle 8: Primer-Sonde-Kombinationen für die Quantifizierung der genomischen P2RY8/CRLF2-Fusion mittels TaqMan-PCR.**

<i>CRLF2</i>	<i>P2RY8</i>	Primer/Sonde	Sequenz (5' - 3')	T* [°C]
BP1	BP1	FW- <i>P2RY8</i> -1	AGCCACCCTTCCTTTAATAACTCAT	65
		Sonde- <i>P2RY8</i> -1	TGGGCGGATCACGAGGTCAGGA	
		RV- <i>CRLF2</i> -1	TCTGAGCTCCATGGTTCGTC	
BP1	BP2	FW- <i>P2RY8</i> -1	AGCCACCCTTCCTTTAATAACTCAT	58
		Sonde- <i>P2RY8</i> -1	TGGGCGGATCACGAGGTCAGGA	
		RV- <i>CRLF2</i> -2	CAAACACTGTGATGGTAGCATATG	
BP1	BP3	FW- <i>P2RY8</i> -1	AGCCACCCTTCCTTTAATAACTCAT	58
		Sonde- <i>P2RY8</i> -1	TGGGCGGATCACGAGGTCAGGA	
		RV- <i>CRLF2</i> -3	GTCAGAAAGGAAACTAGGGAAATG	
BP2	BP1	FW- <i>P2RY8</i> -2	AAATACAAAAATTAGCCAGGCCGT	60
		Sonde- <i>P2RY8</i> -2	TGGATCATCTGAGGTCAGGAGTTCG	
		RV- <i>CRLF2</i> -1	TCTGAGCTCCATGGTTCGTC	
BP2	BP2	FW- <i>P2RY8</i> -2	AAATACAAAAATTAGCCAGGCCGT	60
		Sonde- <i>P2RY8</i> -2	TGGATCATCTGAGGTCAGGAGTTCG	
		RV- <i>CRLF2</i> -2	CAAACACTGTGATGGTAGCATATG	
BP2	BP3	FW- <i>P2RY8</i> -2	AAATACAAAAATTAGCCAGGCCGT	58
		Sonde- <i>P2RY8</i> -2	TGGATCATCTGAGGTCAGGAGTTCG	
		RV- <i>CRLF2</i> -3	GTCAGAAAGGAAACTAGGGAAATG	
BP3	BP1	FW- <i>P2RY8</i> -3	CACCTCAGACCTCATTTGTACAG	60
		Sonde- <i>P2RY8</i> -3	TAAAAAGCTGAGAAAAGGCAGAGGGA	
		RV- <i>CRLF2</i> -1	TCTGAGCTCCATGGTTCGTC	
BP3	BP2	FW- <i>P2RY8</i> -3	CACCTCAGACCTCATTTGTACAG	58
		Sonde- <i>P2RY8</i> -3	TAAAAAGCTGAGAAAAGGCAGAGGGA	
		RV- <i>CRLF2</i> -2	CAAACACTGTGATGGTAGCATATG	
BP3	BP3	FW- <i>P2RY8</i> -3	CACCTCAGACCTCATTTGTACAG	58
		Sonde- <i>P2RY8</i> -3	TAAAAAGCTGAGAAAAGGCAGAGGGA	
		RV- <i>CRLF2</i> -3	GTCAGAAAGGAAACTAGGGAAATG	

Abkürzungen: BP, Bruchpunkt; FW, vorwärts (*forward*); RV, rückwärts (*reverse*).


\*T, Temperatur der Primerhybridisierung.



Die Primer (Invitrogen) wurden in einer finalen Konzentration von je 10 pM und die Sonde (Eurofins) in einer finalen Konzentration von 5 pM eingesetzt. Zu jeder Reaktion wurden 100 ng DNA hinzugefügt. Jede Probe wurde doppelt bestimmt. Zur Qualitätskontrolle der Amplifikation enthielt jede Platte eine Probe ohne DNA (Wasserkontrolle), um mögliche Kontaminationen auszuschließen, sowie eine Patientenprobe mit bekannter *P2RY8/CRLF2*-Fusion und entsprechender Bruchpunkt-Kombination (Positivkontrolle). Es wurde folgendes Temperaturprofil verwendet:

**Tabelle 9: Temperaturprofil für TaqMan-PCR.**

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
Denaturierung	95 °C	15 s
Amplifikation	Siehe Tabelle 8	60 s



55x

Je nach Primer-Sonde-Kombination wurde die optimale Temperatur für die Primer-hybridisierung gewählt, welche in der Tabelle 8 aufgelistet ist.

#### 4.6 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) an Interphase-Zellkernen zur Identifizierung von bestimmten genetischen Aberrationen wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Reiner Siebert durchgeführt.<sup>88</sup> Hierbei werden Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sonden verwendet, welche über Basenpaarung an die nachzuweisende Nukleinsäure hybridisieren. Mit Hilfe der Shandon Cytospin 3 Zytocentrifuge (Thermo Scientific) wurden zunächst Zytospins von kryokonservierten mononukleären Zellen hergestellt. Diese wurden zuvor aufgetaut und mit PBS-Puffer gewaschen. Die Vorbehandlung der Zellen, die Hybridisierung, die Waschschrte und die Bewertung der Objektträger erfolgten nach dem Protokoll von Ventura *et al.*<sup>89</sup> Die Detektion von zusätzlichen Kopien des *CRLF2*-Gens sowie die Identifizierung von Bruchpunkten innerhalb des *CRLF2*-Lokus wurde gemäß dem Protokoll von Russel *et al.* durchgeführt.<sup>45</sup> Zur Untersuchung von potentiellen Bruchpunkten oder Imbalancen des IGH-Lokus wurde die Vysis LSI IGH Dual Color Break Apart Rearrangement Sonde (Abbott) verwendet. In Fällen mit IGH- und *CRLF2*-Bruch wurde anschließend eine IGH/*CRLF2*-Fusionssonde verwendet, um die Translokation zu bestätigen. Fälle mit *CRLF2*-Bruch ohne IGH-Bruch wurden zusätzlich nach potentiellen Bruchpunkten des IGL- oder IGK-Lokus entsprechend dem Protokoll von Martin-Subero *et al.* untersucht.<sup>90</sup> Die FISH-Signale wurden

mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Zeiss) mit entsprechenden Filtern (AHF) bewertet. Die Dokumentation der Hybridisierungen erfolgte unter Verwendung des digitalen Bildbearbeitungssystems ISIS (Metasystems).

#### 4.7 Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (HRM)

Zur Identifizierung von Mutationen in bestimmten Genregionen wurde die Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (HRM, *high resolution melting*) angewandt.<sup>91</sup> Diese Methode nutzt den DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, um das Aufschmelzen von PCR-Produkten zu detektieren.<sup>61</sup> Da die jeweilige Schmelztemperatur von der DNA-Sequenz des Amplikons abhängig ist, können so kleinste Abweichungen in der Sequenz identifiziert werden. Die HRM-Analyse wurde am LightCycler 480 Instrument (Roche Diagnostics) unter Verwendung der LightCycler 480 GeneScanning 1.5.1 Software und des High Resolution Melting Master Mix (Roche Diagnostics) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Der Reaktionsansatz erfolgte in einer LightCycler® 480 96-Multiwell Mikrotiterplatte (Roche Diagnostics) in einem Volumen von 20 µl. Es wurden folgende Primer (Invitrogen) in einer finalen Konzentration von je 4 pM eingesetzt:

**Tabelle 10: Übersicht der verwendeten HRM-Primer mit Angabe der entsprechend eingesetzten Magnesiumchlorid-Konzentration.**

Gen	Exon	Sequenz (5' - 3')	Konz. MgCl <sub>2</sub>	T* [°C]
<i>CRLF2</i>	6	FW: CCGCACGTCATGTTGAAAAC RV: ACAGAAGGAGGAGAGACACC	3 mM	60
<i>JAK2</i>	16	FW: TTTGGGGGCTTGAACATACT RV: TTCAAGGAAAATTAACAACATGC	3,5 mM	53

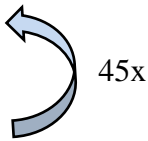
Abkürzungen: Konz., Konzentration; MgCl<sub>2</sub>, Magnesiumchlorid; FW, vorwärts (*forward*); RV, rückwärts (*reverse*); mM, Millimolar.

\*T, Temperatur der Primerhybridisierung.

Zu jeder Reaktion wurden 20 ng DNA hinzugefügt. Zur Qualitätskontrolle der Amplifikation enthielt jede Platte eine Probe ohne DNA (Wasserkontrolle), um mögliche Kontaminationen auszuschließen. Als Wildtyp-Referenz wurde DNA eines Pools mononukleären Zellen des peripheren Bluts von gesunden Spendern verwendet und DNA eines Patienten mit bekannter R683G *JAK2*-Mutation oder F232C *CRLF2*-Mutation als Positivkontrolle. Es wurde folgendes Temperaturprofil verwendet:

**Tabelle 11: Temperaturprofil für HRM.**

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
Denaturierung	98 °C	10 s
Primerhybridisierung	Siehe Tabelle 10	10 s
Elongation	72 °C	15 s
Denaturierung	95 °C	60 s
Abkühlung	40 °C	60 s
Schmelzanalyse	60 °C - 95 °C	+ 0,02 °C/s



Je nach Primer wurde die optimale Temperatur für die Primerhybridisierung gewählt, welche in der Tabelle 10 aufgelistet ist.

Alle PCR-Produkte mit einer abweichenden Schmelzkurve wurden anschließend durch die Firma GATC sequenziert. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit Hilfe der BioEdit v7.1.3.0 Software.

## 4.8 Statistische Analysen

Zur Bewertung prognostischer Relevanz wurden Überlebenszeitanalysen nach Kaplan-Meier<sup>92</sup> durchgeführt und Unterschiede mittels Log-rank-Test<sup>93</sup> verglichen. Das ereignisfreie Überleben (EFS, *event free survival*) wurde berechnet vom Tag der Diagnose bis zur letzten Nachuntersuchung oder bis zum ersten Ereignis. Hierbei wurde eine unvollständige Remission als Ereignis an Tag 0 definiert. Außerdem wurde ein Rezidiv, ein Zweitmalignom oder der Tod durch jegliche Ursache als Ereignis gewertet. Das Gesamtüberleben wurde berechnet vom Tag der Diagnose bis zum Tod jeglicher Ursache oder bis zur letzten Nachuntersuchung unabhängig von anderen Ereignissen. Die kumulative Rezidivinzidenz (CIR, *cumulative incidence of relapse*) wurde nach der Methode von Kalbfleisch und Prentice<sup>94</sup> berechnet und Unterschiede mittels Gray-Test<sup>95</sup> verglichen, um die Bedeutung von Rezidiven für das EFS beurteilen zu können.

Für den Vergleich von Patientengruppen hinsichtlich klinischer und biologischer Parameter wurden der  $\chi^2$ -Test und der Exakte Fisher-Test verwendet. Multivariable Analysen erfolgten mittels der Cox-Regression.<sup>96</sup> Abhängig von der Verteilung der Variablen wurden Korrelationsanalysen durch die Berechnung von Kontingenztafeln, des Pearson- oder

Spearman-Korrelationskoeffizienten durchgeführt. Genexpressionsunterschiede zwischen Patientengruppen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test verglichen.<sup>97</sup> Ergebnisse mit einem p-Wert < 0,05 wurden als signifikant betrachtet. Die statistische Analyse der Daten erfolgte unter Verwendung der IBM SPSS Statistics v22 Software.

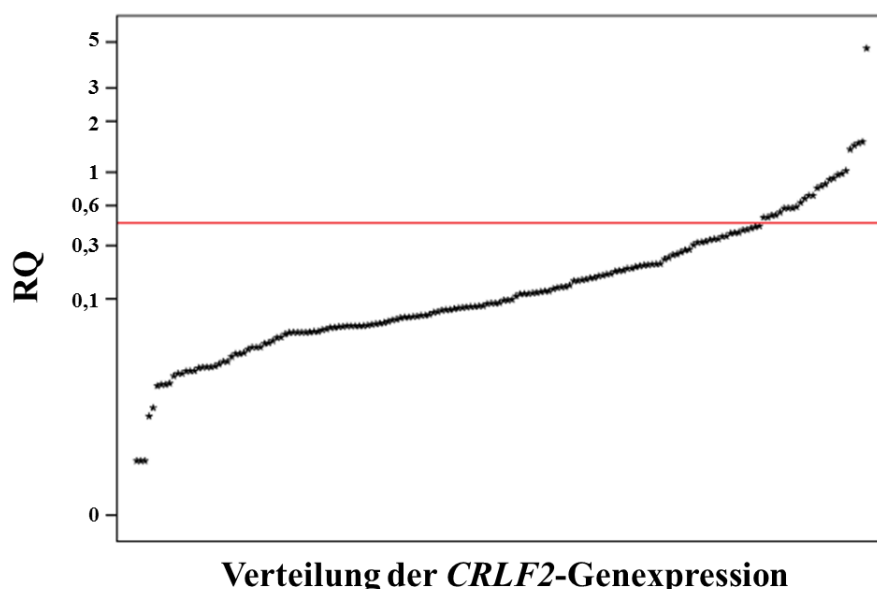
## 5. Ergebnisse

### 5.1 Molekulare Charakterisierung der ALL im Kindesalter mit hoher *CRLF2*-Genexpression

Dieser Teil der Arbeit wurde bereits unter dem Titel „*Molecular characterization of acute lymphoblastic leukemia with high CRLF2 gene expression in childhood*“ in *Pediatric, Blood and Cancer* (2017;64:e26539.) publiziert und ist im Anhang beigefügt (siehe 8.2). Die umfassende Charakterisierung der ALL im Kindesalter mit hoher *CRLF2*-Genexpression erfolgte sowohl auf molekularer Ebene als auch in Bezug auf klinische Parameter. Hierzu wurden prospektiv in einem Zeitraum von vier Jahren die *CRLF2*-Genexpression sowie das Vorhandensein der *P2RY8/CRLF2*-Fusion für 1105 Patienten erfasst, welche im Rahmen der laufenden AIEOP-BFM ALL 2009 Studie diagnostiziert und behandelt wurden, und für die die erforderliche Einverständniserklärung sowie Material vorhanden waren.

#### 5.1.1 Hohe *CRLF2*-Genexpression in der T-ALL

Für die T-ALL wurde gemäß Palmi *et al.* eine hohe *CRLF2*-Genexpression als mindestens das 5-fache mediane Expressionslevel definiert.<sup>37</sup> Eine hohe *CRLF2*-Genexpression wurde für 26 von 178 (14,6%) Patienten mit einer T-ALL detektiert (siehe Abbildung 7). Ein Vergleich der klinischen Parameter der T-ALL Patienten mit hoher oder niedriger *CRLF2*-Genexpression ist in der Tabelle 12 zusammengefasst.



**Abbildung 7:** Verteilung der *CRLF2*-Genexpression der Patienten mit T-ALL. Die *CRLF2*-Genexpression wurde mittels qPCR analysiert und als relative Quantität (RQ) nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode bestimmt. Die rote Linie differenziert die Patienten mit hoher (oberhalb) von denen mit niedriger (unterhalb) *CRLF2*-Genexpression.

**Tabelle 12: Vergleich der klinischen Parameter der T-ALL Patienten gruppiert nach dem *CRLF2*-Genexpressionslevel.**

	<i>CRLF2</i> -Genexpressionslevel		p-Wert <sup>a</sup>	Gesamt
	niedrig	hoch		
<b>Anzahl Patienten (%)</b>	152 (85,4)	26 (14,6)		178 (100)
<b>Alter in Jahren (%)</b>			,67	
1 - 10	80 (52,6)	12 (46,2)		92 (51,7)
≥ 10	72 (47,4)	14 (53,8)		86 (48,3)
<b>Geschlecht (%)</b>			1,0	
Männlich	120 (78,9)	21 (80,8)		141 (79,2)
Weiblich	32 (21,1)	5 (19,2)		37 (20,8)
<b>Down-Syndrom (%)</b>			1,0	
Nein	152 (100)	26 (100)		178 (100)
Ja	0 (0)	0 (0)		0 (0)
<b>Initiale WBC/μl (%)</b>			,58	
< 10.000	22 (14,5)	4 (15,4)		26 (14,6)
10.000 - < 50.000	48 (31,6)	5 (19,2)		53 (29,8)
50.000 - < 100.000	20 (13,2)	3 (11,5)		23 (12,9)
≥ 100.000	62 (40,8)	14 (53,8)		76 (42,7)
<b>Immunphänotyp (%)</b>			,048	
Pro-T-ALL	3 (2,0)	1 (3,8)		4 (2,3)
Prä-T-ALL	36 (23,7)	12 (46,2)		48 (27,0)
Intermediäre T-ALL	91 (59,9)	13 (50,0)		104 (58,4)
Reife-T-ALL	20 (13,1)	0 (0)		20 (11,2)
Nicht spezifizierte T-ALL	2 (1,3)	0 (0)		2 (1,1)
<b>ZNS-Beteiligung (%)</b>			,69	
Nein	114 (75,0)	19 (73,1)		133 (74,7)
Ja	14 (9,2)	1 (3,8)		15 (8,4)
Unbekannt	24 (15,8)	6 (23,1)		30 (16,9)
<b>Prednison-Ansprechen<sup>b</sup> (%)</b>			,02	
Gut	96 (63,2)	10 (38,5)		106 (59,6)
Schlecht	53 (34,9)	16 (61,5)		69 (38,8)
<b>FCM-MRD Risikogruppe<sup>c</sup> (%)</b>			<,001	
Nicht-Hochrisiko	108 (71,1)	6 (23,1)		114 (64,0)
Hochrisiko	35 (23,0)	16 (61,5)		51 (28,7)
Unbekannt	9 (5,9)	4 (15,4)		13 (7,3)
<b>PCR-MRD Risikogruppe<sup>d</sup> (%)</b>			,19	
Standardrisiko	27 (17,8)	1 (3,8)		28 (15,7)
Mittleres Risiko	95 (62,5)	16 (61,5)		111 (62,4)
Hochrisiko	13 (8,6)	3 (11,5)		16 (9,0)
Unbekannt	17 (11,2)	6 (23,1)		23 (12,9)
<b>Finale Protokollstratifizierung (%)</b>			<,001	
Standardrisiko	30 (19,7)	1 (3,8)		31 (17,4)
Mittleres Risiko	59 (38,8)	4 (15,4)		63 (35,4)
Hochrisiko	63 (41,4)	21 (80,8)		84 (47,2)

Abkürzungen: WBC, Leukozyten (*white blood cells*); ZNS, Zentrales Nervensystem; FCM, Durchflusszytometrie (*flow cytometry*); MRD, Minimale Resterkrankung (*minimal residual disease*); PCR, Polymerase-Kettenreaktion.

<sup>a</sup>Exakter Fisher-Test zum Vergleich der Gruppen mit niedriger oder hoher *CRLF2*-Genexpression.

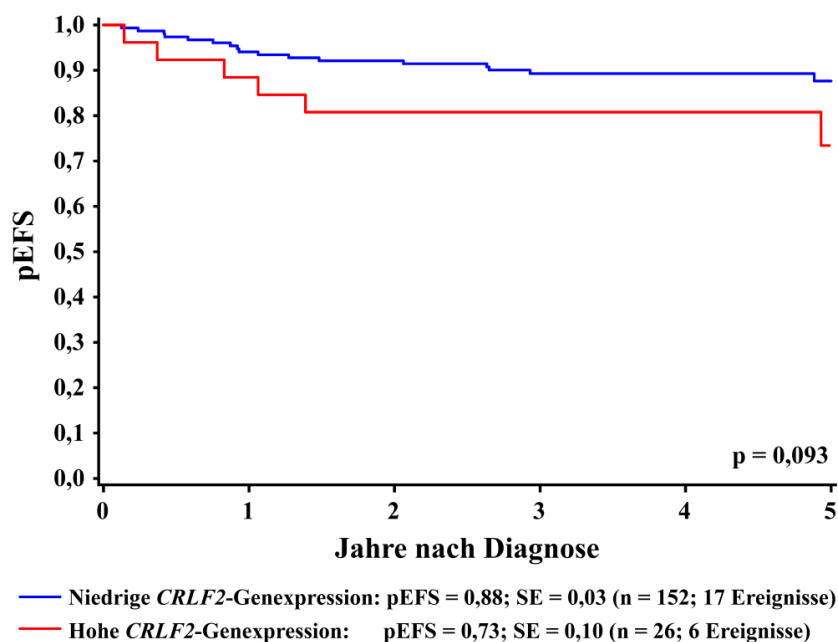
<sup>b</sup>Gut: < 1.000 leukämische Blasten/μl an Therapietag 8; Schlecht: > 1.000 /μl.

<sup>c</sup>Risikostratifizierung mittels FCM-MRD an Therapietag 15; Nicht-Hochrisiko: < 10% Blasten; Hochrisiko: ≥ 10% Blasten.

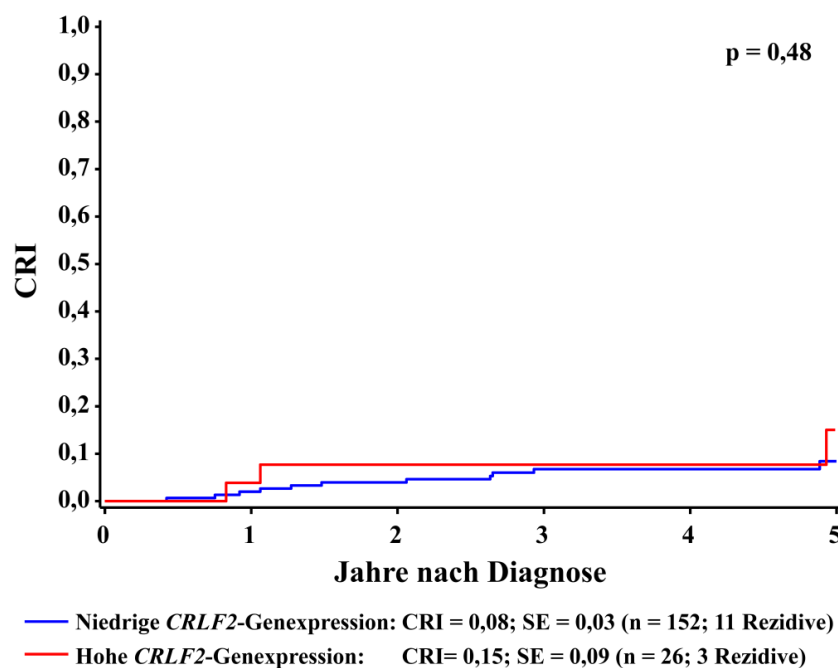
<sup>d</sup>Risikostratifizierung mittels PCR-MRD an Therapietag 33 und 78; Standardrisiko: MRD-negativ an Tag 33 und Tag 78; Mittleres Risiko: MRD-positiv an Tag 33 und/oder Tag 78, und MRD-Last  $< 10^{-3}$  an Tag 78; Hochrisiko: MRD-Last  $\geq 10^{-3}$  an Tag 78.

Alle 178 Patienten waren negativ für die *P2RY8/CRLF2*-Fusion. Es wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Alters der Patienten bei der Diagnose, des Geschlechts, der initialen Leukozytenzahl (WBC, *white blood cells*) oder der Beteiligung des zentralen Nervensystems (ZNS) beobachtet. Die Hälfte der Patienten mit einer hohen *CRLF2*-Genexpression waren zu einer frühen T-ALL mit geringem Differenzierungsgrad (1/26 [4%] pro-T-ALL; 12/26 [46%] prä-T-ALL) zugehörig, während drei Viertel der Patienten mit niedriger *CRLF2*-Genexpression zur intermediären (91/152 [60%]) oder reifen T-ALL (20/152 [13%]) gehörten. Die meisten T-ALL Patienten mit hoher *CRLF2*-Genexpression zeigten ein schlechtes Ansprechen auf Prednison (PPR, *Prednisone poor response*) im Vergleich zu denen mit niedriger *CRLF2*-Genexpression (16/26 [62%] vs. 53/152 [35%];  $p = 0,02$ ). Durch die Messung der minimalen Resterkrankung (MRD, *minimal residual disease*) mittels Durchflusszytometrie (FCM, *flow cytometry*) am Therapietag 15 wurden die meisten T-ALL Patienten mit hoher *CRLF2*-Genexpression in die Hochrisikogruppe (HR) stratifiziert (16/26 [62%] vs. 35/152 [23%];  $p < 0,001$ ). Somit wurden insgesamt 21 der 26 (81%) T-ALL Patienten mit hoher *CRLF2*-Genexpression final in den HR-Therapiearm stratifiziert im Vergleich zu den T-ALL Patienten mit niedriger *CRLF2*-Genexpression (63/152 [41%];  $p < 0,001$ ).

Da die Zeit der Nachuntersuchung noch zu kurz ist, um abschließende Aussagen hinsichtlich des Therapieerfolgs zu treffen, können an dieser Stelle nur vorläufige Ergebnisse präsentiert werden. In der Abbildung 8 ist die Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier dargestellt. T-ALL Patienten mit hoher *CRLF2*-Genexpression hatten eine um 15% niedrigere Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben in fünf Jahren nach der Diagnose im Vergleich zu Patienten mit niedriger *CRLF2*-Genexpression (pEFS: 0,73 vs. 0,88;  $p = 0,093$ ). Aufgrund der kleinen Fallzahl in der Gruppe mit hoher *CRLF2*-Genexpression war der Unterschied jedoch nicht signifikant. Ebenso konnte bei der Berechnung der kumulativen Rezidivinzidenz (siehe Abbildung 9) kein signifikanter Unterschied ermittelt werden, obwohl die Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv innerhalb von fünf Jahren nach der Diagnose zu erleiden fast doppelt so hoch ist für T-ALL Patienten mit hoher *CRLF2*-Genexpression im Vergleich zu Patienten mit niedriger *CRLF2*-Genexpression (CRI: 0,08 vs. 0,15;  $p = 0,48$ ).



**Abbildung 8: Überlebenskurven und 5-Jahres EFS-Rate für Patienten mit T-ALL entsprechend des *CRLF2*-Genexpressionslevels.** Die Überlebenszeitanalyse für T-ALL Patienten mit niedriger (blau) und hoher (rot) *CRLF2*-Genexpression erfolgte nach Kaplan-Meier. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) wurden mit Hilfe des Log-rank-Tests beurteilt. Abkürzungen: pEFS, Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (*probability of event free survival*); SE, Standardfehler (*standard error*); n, Anzahl.

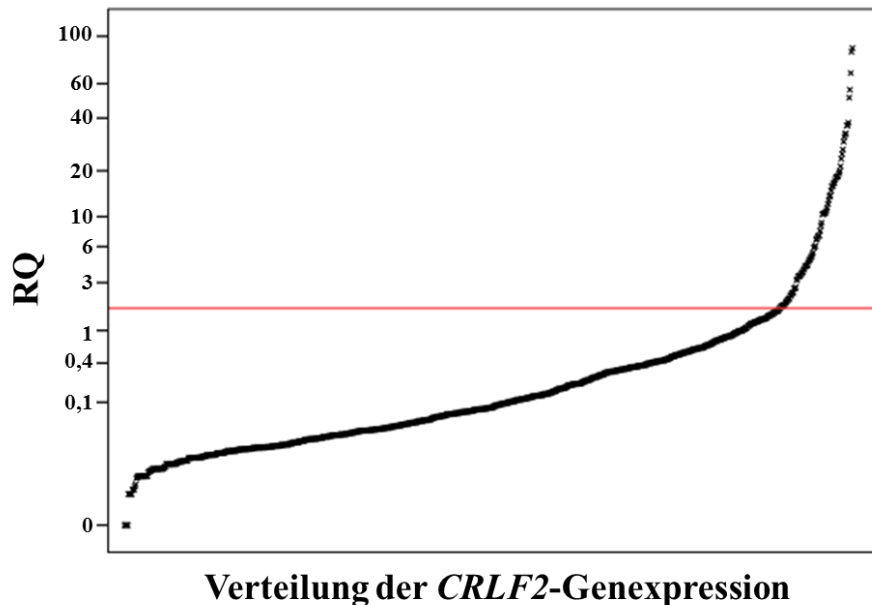


**Abbildung 9: Kumulative Rezidivinzidenz für Patienten mit T-ALL entsprechend des *CRLF2*-Genexpressionslevels.** Die Berechnung der 5-Jahres CRI für T-ALL Patienten mit niedriger (blau) und hoher (rot) *CRLF2*-Genexpression erfolgte nach der Methode von Kalbfleisch und Prentice. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) wurden mit Hilfe des Gray-Tests beurteilt. Abkürzungen: CRI, kumulative Rezidivinzidenz (*cumulative incidence of relapse*); SE, Standardfehler (*standard error*); n, Anzahl.



### 5.1.2 Inzidenz hoher *CRLF2*-Genexpression und deren zugrunde liegenden genetischen Aberrationen in der pB-ALL

Eine hohe *CRLF2*-Genexpression wurde in 91 von 927 (9,8%) Patienten mit pB-ALL detektiert (siehe Abbildung 10), welche gemäß Cario *et al.* als ein wenigstens 20-faches medianes Expressionslevel definiert wurde.<sup>36</sup>



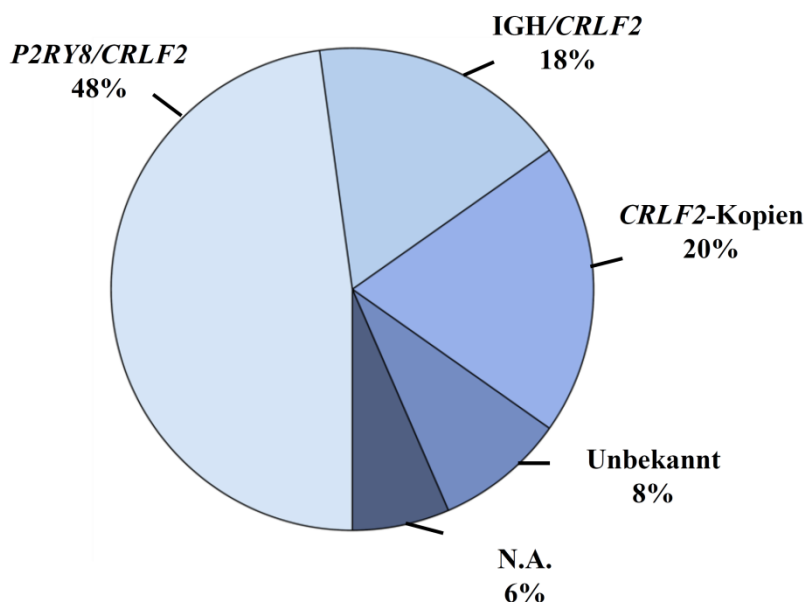
**Abbildung 10: Verteilung der *CRLF2*-Genexpression der Patienten mit pB-ALL.** Die *CRLF2*-Genexpression wurde mittels qPCR analysiert und als relative Quantität (RQ) nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode bestimmt. Die rote Linie trennt die Patienten mit hoher (oberhalb) oder niedriger (unterhalb) *CRLF2*-Genexpression.

Prognostisch relevante Translokationen wie *BCR/ABL1*, *KMT2A/AFF1* oder *ETV6/RUNX1* waren in den Fällen mit hoher *CRLF2*-Genexpression, mit Ausnahme eines Patienten mit *ETV6/RUNX1*-Fusion, nicht vorhanden.

Die *P2RY8/CRLF2*-Fusion wurde mittels RT-PCR in 52 von 927 (5,6%) pB-ALL Patienten identifiziert: in 44 von 91 (48,3%) Fällen mit hoher *CRLF2*-Genexpression und in 8 von 836 (1%) Fällen mit niedriger *CRLF2*-Genexpression (0,1- bis 6-faches medianes Expressionslevel). Mit Hilfe der MLPA-Analyse wurde die *P2RY8/CRLF2*-Fusion in 29 der 44 (66%) mittels RT-PCR positiven Fällen detektiert.

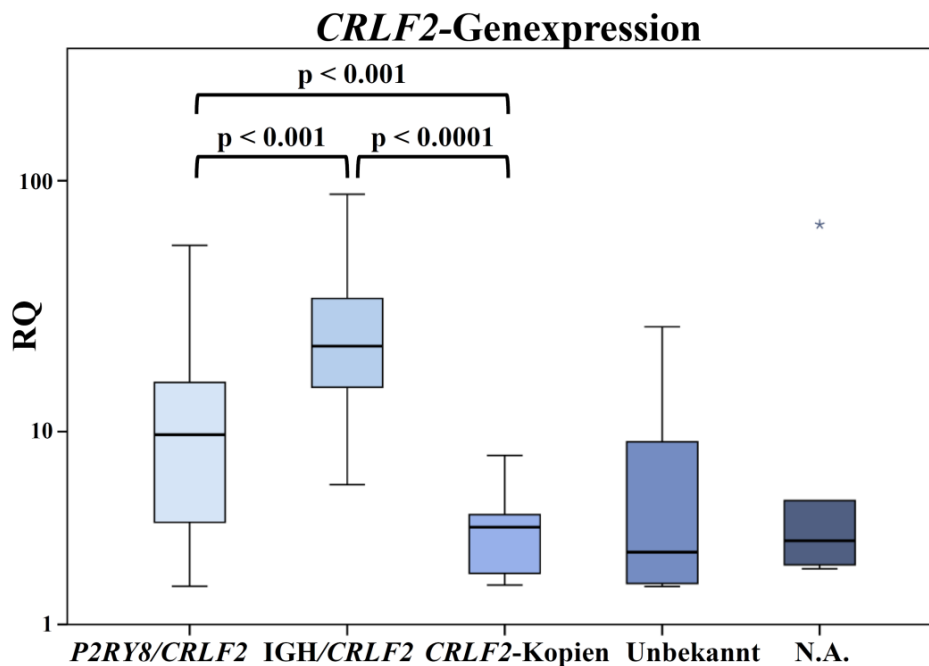
Zur weiteren Charakterisierung der pB-ALL mit hoher *CRLF2*-Genexpression ohne *P2RY8/CRLF2*-Fusion wurden 41 Fusions-negative Fälle mittels FISH untersucht. In 17 von 91 (17,6%) Fällen wurde die hohe *CRLF2*-Genexpression durch eine *IGH/CRLF2*-Translokation verursacht und in 18 von 91 (19,8%) Fällen war sie mit zusätzlichen Kopien

des *CRLF2*-Gens assoziiert. Für 15 dieser 18 Fälle waren Informationen zur Ploidie verfügbar, von denen 14 eine hohe Hyperploidie ( $DI \geq 1,16$ ) aufwiesen. Für 7 von 91 (7,7%) Fällen scheint die hohe *CRLF2*-Genexpression einem anderen bis jetzt noch unbekanntem Mechanismus zu unterliegen, da alle negativ waren für die *P2RY8/CRLF2*-Fusion, *IGH/CRLF2*-Translokation und zusätzliche Kopien des *CRLF2*-Gens. Zwei dieser Fälle hatten zwar einen Bruchpunkt im *CRLF2*-Gen, aber weder einen Bruchpunkt im *IGH*- noch *IGK*- oder *IGL*-Lokus. Die Ursache der hohen *CRLF2*-Genexpression bei 8 der 91 (8,8%) Fälle konnte nicht untersucht werden, da keine Zellen zur FISH-Analyse zur Verfügung standen. Die Verteilung der hohen *CRLF2*-Genexpression zugrundeliegenden genetischen Aberrationen in Patienten mit pB-ALL der AIEOP-BFM ALL 2009 Studie ist in der Abbildung 11 zusammengefasst.



**Abbildung 11: Übersicht der pB-ALL Subgruppen mit hoher *CRLF2*-Genexpression.** Inzidenz der zugrundeliegenden genetischen Aberrationen der hohen *CRLF2*-Genexpression in Patienten mit pB-ALL der AIEOP-BFM ALL 2009 Studie. Abkürzung: N.A., nicht analysiert mittels FISH.

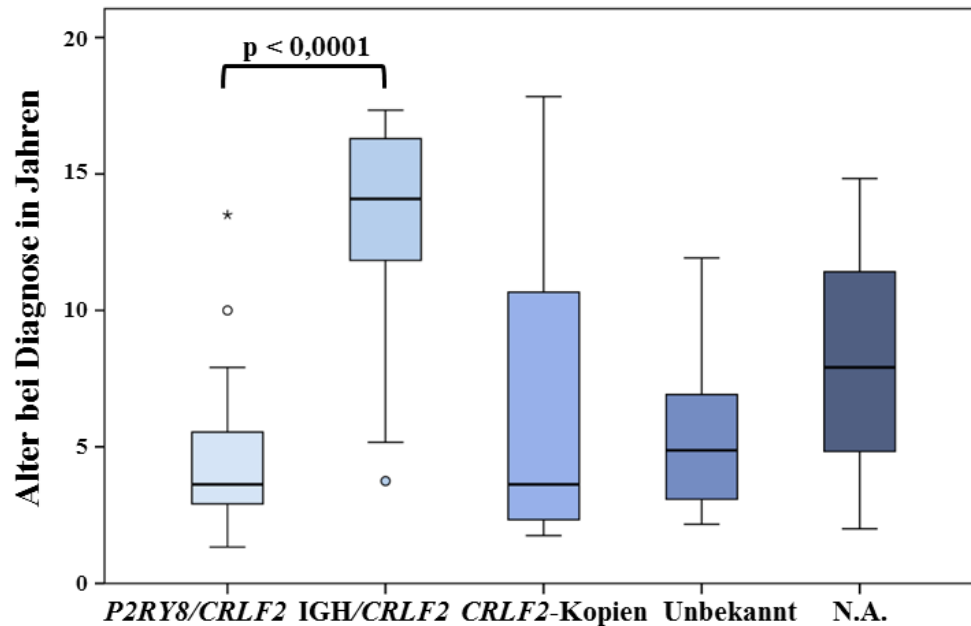
Die *CRLF2*-Genexpressionslevel der Subgruppen mit hoher *CRLF2*-Genexpression sind in der Abbildung 12 dargestellt: Fälle mit *IGH/CRLF2*-Translokation zeigten das signifikant höchste *CRLF2*-Genexpressionslevel (medianer RQ = 250-fach über dem Gesamtmedian) verglichen mit den Fällen mit *P2RY8/CRLF2*-Fusion (medianer RQ = 100-fach über dem Gesamtmedian;  $p < 0,001$ ) oder zusätzlichen Kopien des *CRLF2*-Gens (medianer RQ = 40-fach über dem Gesamtmedian;  $p < 0,0001$ ).



**Abbildung 12: Verteilung der Genexpressionslevel der verschiedenen Subgruppen mit hoher *CRLF2*-Genexpression.** Die *CRLF2*-Genexpression wurde mittels qPCR analysiert und als relative Quantität (RQ) nach der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode bestimmt. Die vertikalen Linien zeigen das Minimum und das Maximum, die horizontalen Abgrenzungen der Boxen das erste und dritte Quartil, die dicke schwarze Linie in der Mitte der Box den Median der Daten. Punkte repräsentieren Ausreißer und Sterne Extremwerte. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) in der Genexpression wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests beurteilt. Abkürzung: N.A., nicht analysiert mittels FISH.

### 5.1.3 Klinische Charakteristika der pB-ALL mit hoher *CRLF2*-Genexpression

Die klinischen Charakteristika der pB-ALL Patienten mit hoher *CRLF2*-Genexpression unterteilt in die verschiedenen Subgruppen sind in der Tabelle 13 zusammengefasst. Es wurden keine Unterschiede hinsichtlich des Geschlechts, der initialen Leukozytenzahl (WBC, *white blood cells*) oder der Beteiligung des zentralen Nervensystems (ZNS) zwischen den Subgruppen beobachtet. 16 der 25 (64%) Patienten mit Down-Syndrom (DS) zeigten eine hohe *CRLF2*-Genexpression. Für 13 dieser 16 (81%) DS-Patienten wurde die hohe *CRLF2*-Genexpression durch die *P2RY8/CRLF2*-Fusion verursacht und nur für 3 von 16 (19%) durch die *IGH/CRLF2*-Translokation. Patienten mit *P2RY8/CRLF2*-positiver pB-ALL waren signifikant jünger bei der Diagnose mit einem medianen Alter von 3 Jahren verglichen mit den Patienten mit *IGH/CRLF2*-Translokation mit einem medianen Alter von 14 Jahren ( $p < 0,0001$ ). Die Verteilung des Alters der Patienten bei der Diagnose ist in Abbildung 13 dargestellt.



**Abbildung 13: Verteilung des Alters der Patienten bei der Diagnose der pB-ALL Subgruppen mit hoher *CRLF2*-Genexpression.** Die vertikalen Linien zeigen das Minimum und das Maximum, die horizontalen Abgrenzungen der Boxen das erste und dritte Quartil, die dicke schwarze Linie in der Mitte der Box den Median der Daten. Punkte repräsentieren Ausreißer und Sterne Extremwerte. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Subgruppen hinsichtlich des Alters bei der Diagnose wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests beurteilt. Abkürzung: N.A., nicht analysiert mittels FISH.

Unabhängig von der genetischen Aberration zeigten fast alle pB-ALL Patienten (89/91, 98%) mit hoher *CRLF2*-Genexpression ein gutes Ansprechen auf Prednison. Die meisten Patienten mit der *P2RY8/CRLF2*-Fusion wurden mit Hilfe des MRD-Monitorings mittels PCR als Nicht-HR stratifiziert (MRD-SR: 15/44, 34%; MRD-MR: 22/44, 50%), genauso wie die Patienten mit zusätzlichen Kopien des *CRLF2*-Gens (MRD-SR: 8/18, 44%; MRD-MR: 9/18, 50%). Somit wurden die meisten Patienten mit der *P2RY8/CRLF2*-Fusion final in den Standardrisiko- (SR: 16/44, 36%) oder mittleres Risiko- (MR: 21/44, 48%) Therapiearm stratifiziert, ebenso die Patienten mit zusätzlichen Kopien des *CRLF2*-Gens (SR: 8/18, 44%; MR: 8/18, 44%). Im Gegensatz hierzu waren 8 von 16 (50%) Patienten mit *IGH/CRLF2*-Translokation mittels PCR hoch MRD-positiv ( $\geq 10^{-3}$ ) an Therapietag 33 und hatten immer noch eine messbare MRD ( $<10^{-3}$ ) an Therapietag 78. Dieses langsame Therapieansprechen ist als MRD-*slow early responder* (SER) definiert, welches in der aktuellen AIEOP-BFM ALL 2009 Studie ein neues HR-Kriterium ist.

**Tabelle 13: Vergleich der klinischen Parameter der pB-ALL Patienten mit hoher CRLF2-Genexpression gruppiert nach der zugrundeliegenden genetischen Aberration.**

	pB-ALL mit hoher CRLF2-Genexpression					Gesamt
	P2RY8/CRLF2	IGH/CRLF2	CRLF2-Kopien	Unbekannt	N.A.	
<b>Anzahl Patienten (%)</b>	44 (48,3)	16 (17,6)	18 (19,8)	7 (7,7)	6 (6,6)	91 (100)
<b>Alter in Jahren (%)</b>						
1 - 10	42 (95,5)	3 (18,8)	13 (72,2)	7 (100)	4 (66,7)	69 (75,8)
≥ 10	2 (4,5)	13 (81,3)	5 (27,8)	0 (0)	2 (33,3)	22 (24,2)
<b>Geschlecht (%)</b>						
Männlich	21 (47,7)	12 (75,0)	9 (50,0)	4 (57,1)	3 (50,0)	49 (53,8)
Weiblich	23 (52,3)	4 (25,0)	9 (50,0)	3 (42,9)	3 (50,0)	42 (46,2)
<b>Down-Syndrom (%)</b>						
Nein	31 (70,5)	13 (81,3)	18 (100)	7 (100)	6 (100)	75 (82,4)
Ja	13 (29,5)	3 (18,8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	16 (17,6)
<b>Initiale WBC/μl (%)</b>						
< 10.000	18 (40,9)	6 (37,5)	7 (38,9)	1 (14,3)	5 (83,3)	37 (40,6)
10.000 - < 50.000	14 (31,8)	4 (25,0)	10 (55,6)	2 (28,6)	1 (16,7)	31 (34,1)
50.000 - < 100.000	9 (20,5)	3 (18,8)	0 (0)	3 (42,8)	0 (0)	15 (16,5)
≥ 100.000	3 (6,8)	3 (18,8)	1 (5,6)	1 (14,3)	0 (0)	8 (8,8)
<b>ZNS-Beteiligung (%)</b>						
Nein	41 (93,2)	15 (93,8)	16 (88,9)	6 (85,7)	5 (83,3)	83 (91,2)
Ja	1 (2,3)	1 (6,3)	1 (5,6)	0 (0)	0 (0)	3 (3,3)
Unbekannt	2 (4,6)	0 (0)	1 (5,6)	1 (14,3)	1 (16,7)	5 (5,5)
<b>Prednison-Ansprechen<sup>a</sup> (%)</b>						
Gut	43 (97,7)	16 (100)	17 (94,4)	7 (100)	6 (100)	89 (97,8)
Schlecht	1 (2,3)	0 (0)	1 (5,6)	0 (0)	0 (0)	2 (2,2)
<b>FCM-MRD Risikogruppe<sup>b</sup> (%)</b>						
Nicht-Hochrisiko	37 (84,1)	14 (87,5)	16 (88,9)	5 (71,4)	5 (83,3)	77 (84,6)
Hochrisiko	5 (11,4)	2 (12,5)	1 (5,6)	2 (28,6)	1 (16,7)	11 (12,1)
Unbekannt	2 (4,5)	0 (0)	1 (5,6)	0 (0)	0 (0)	3 (3,3)
<b>PCR-MRD Risikogruppe<sup>c</sup> (%)</b>						
Standardrisiko	15 (34,1)	2 (12,5)	8 (44,4)	1 (14,3)	3 (50,0)	29 (31,9)
Mittleres Risiko	22 (50,0)	5 (31,3)	9 (50,0)	3 (42,8)	2 (33,3)	41 (45,0)
SER	2 (4,5)	8 (50,0)	0 (0)	2 (28,6)	1 (16,7)	13 (14,3)
Hochrisiko	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (14,3)	0 (0)	1 (1,1)
Unbekannt	5 (11,4)	1 (6,3)	1 (5,6)	0 (0)	0 (0)	7 (7,7)
<b>Finale Protokoll-stratifizierung (%)</b>						
Standardrisiko	16 (36,4)	3 (18,8)	8 (44,4)	1 (14,3)	3 (50,0)	31 (34,1)
Mittleres Risiko	21 (47,7)	5 (31,3)	8 (44,4)	2 (28,6)	2 (33,3)	38 (41,7)
Hochrisiko	7 (15,9)	8 (50,0)	2 (11,1)	4 (57,1)	1 (16,7)	22 (24,2)

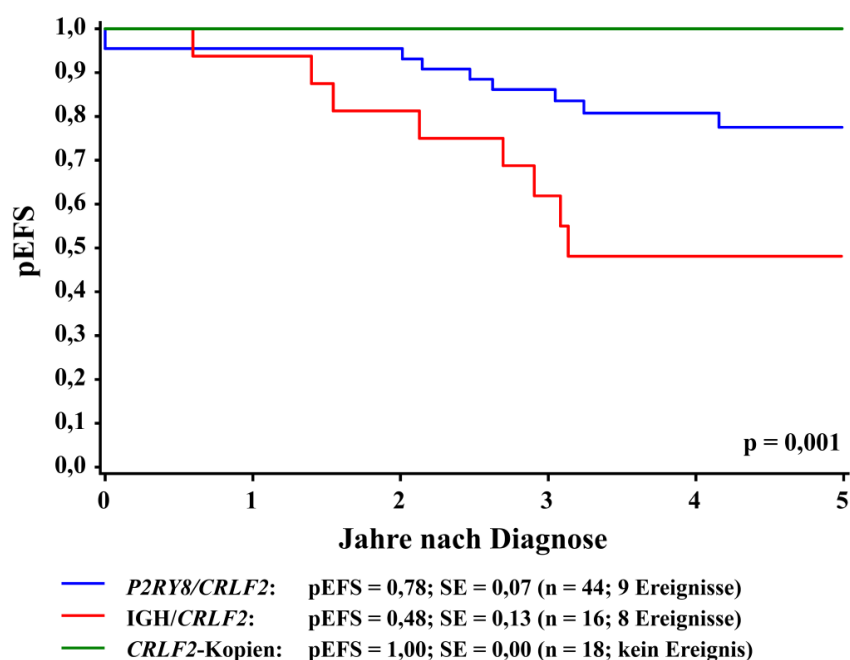
Abkürzungen: N.A., nicht analysiert mittels FISH; WBC, Leukozyten (*white blood cells*); ZNS, Zentrales Nervensystem; FCM, Durchflusszytometrie (*flow cytometry*); MRD, Minimale Resterkrankung (*minimal residual disease*); PCR, Polymerase-Kettenreaktion; SER, langsames Therapieansprechen (*slow early responder*).

<sup>a</sup>Gut: < 1.000 leukämische Blasten/μl an Therapietag 8; Schlecht: > 1.000 /μl.

<sup>b</sup>Risikostratifizierung mittels FCM-MRD an Therapietag 15; Nicht-Hochrisiko: < 10% Blasten; Hochrisiko: ≥ 10% Blasten.

°Risikostratifizierung mittels PCR-MRD an Therapietag 33 und 78; Standardrisiko: MRD-negativ an Tag 33 und Tag 78; Mittleres Risiko: MRD-positiv an Tag 33 und/oder Tag 78, und MRD-Last  $< 10^{-3}$  an Tag 78; SER: MRD-Last  $\geq 10^{-3}$  an Tag 33 und  $< 10^{-3}$  an Tag 78; Hochrisiko: MRD-Last  $\geq 10^{-3}$  an Tag 78.

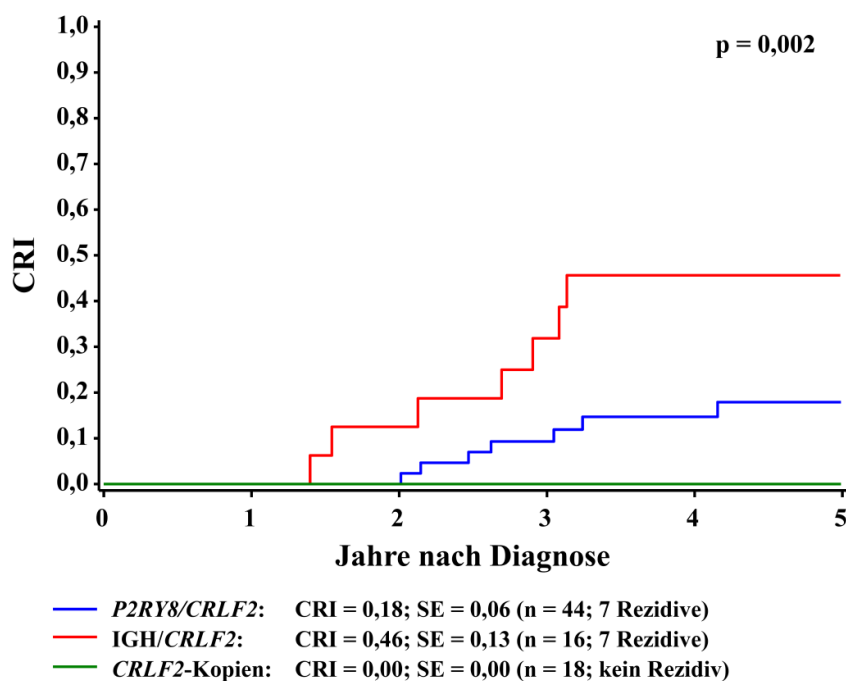
Da die Zeit der Nachuntersuchung noch zu kurz ist, um abschließende Aussagen hinsichtlich des Therapieerfolgs zu treffen, können an dieser Stelle nur vorläufige Ergebnisse präsentiert werden. Die Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier wurde für die drei pB-ALL Subgruppen mit hoher *CRLF2*-Genexpression durchgeführt, bei denen die zugrundeliegende genetische Aberration bekannt ist. Die entsprechenden Überlebenskurven unter Angabe der 5-Jahres EFS-Rate sind in der Abbildung 14 dargestellt.



**Abbildung 14: Überlebenskurven und 5-Jahres EFS-Rate für pB-ALL Patienten mit hoher *CRLF2*-Genexpression entsprechend der zugrundeliegenden genetischen Aberration.** Die Überlebenszeitanalyse für pB-ALL Patienten mit *P2RY8/CRLF2*-Fusion (blau), *IGH/CRLF2*-Translokation (rot) und zusätzlichen Kopien des *CRLF2*-Gens (grün) erfolgte nach Kaplan-Meier. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) wurden mit Hilfe des Log-rank-Tests beurteilt. Abkürzungen: pEFS, Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (*probability of event free survival*); SE, Standardfehler (*standard error*); n, Anzahl.

Besonders auffällig ist, dass für Patienten mit *IGH/CRLF2*-Translokation die Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben in fünf Jahren nach der Diagnose lediglich 48% beträgt im Vergleich zur sehr guten Prognose der Patienten mit zusätzlichen Kopien des *CRLF2*-Gens (pEFS: 0,48 vs. 1;  $p = 0,0006$ ). Patienten mit *P2RY8/CRLF2*-

Fusion haben hingegen eine um 22% niedrigere Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben in fünf Jahren nach der Diagnose im Vergleich zu Patienten mit zusätzlichen Kopien des *CRLF2*-Gens (pEFS: 0,78 vs. 1;  $p = 0,042$ ). Auch der Unterschied zwischen der 5-Jahres EFS-Rate der *P2RY8/CRLF2*- und der *IGH/CRLF2*-Subgruppe ist signifikant (pEFS: 0,78 vs. 0,48;  $p = 0,016$ ). Um festzustellen, ob die niedrige EFS-Rate der *P2RY8/CRLF2*- und der *IGH/CRLF2*-Subgruppe durch eine hohe Anzahl an Rezidiven begründet ist, wurde zusätzlich die CRI berechnet. So ist in der Abbildung 15 deutlich zu erkennen, dass fast die Hälfte der Patienten mit *IGH/CRLF2*-Translokation bereits ein Rezidiv erlitten im Vergleich zu keinem einzigen Rezidiv in der Subgruppe mit zusätzlichen Kopien des *CRLF2*-Gens (CRI: 0,46 vs. 0;  $p = 0,002$ ). Patienten mit *P2RY8/CRLF2*-Fusion haben hingegen eine 18% höhere Wahrscheinlichkeit, innerhalb von fünf Jahren nach der Diagnose ein Rezidiv zu erleiden im Vergleich zu den Patienten mit zusätzlichen Kopien des *CRLF2*-Gens, allerdings wurde die Signifikanzgrenze hierfür nicht erreicht (CRI: 0,18 vs. 0;  $p = 0,07$ ). Übereinstimmend mit der EFS-Rate ist auch der Unterschied zwischen der CRI der *P2RY8/CRLF2*- und der *IGH/CRLF2*-Subgruppe signifikant (CRI: 0,18 vs. 0,46;  $p = 0,017$ ).

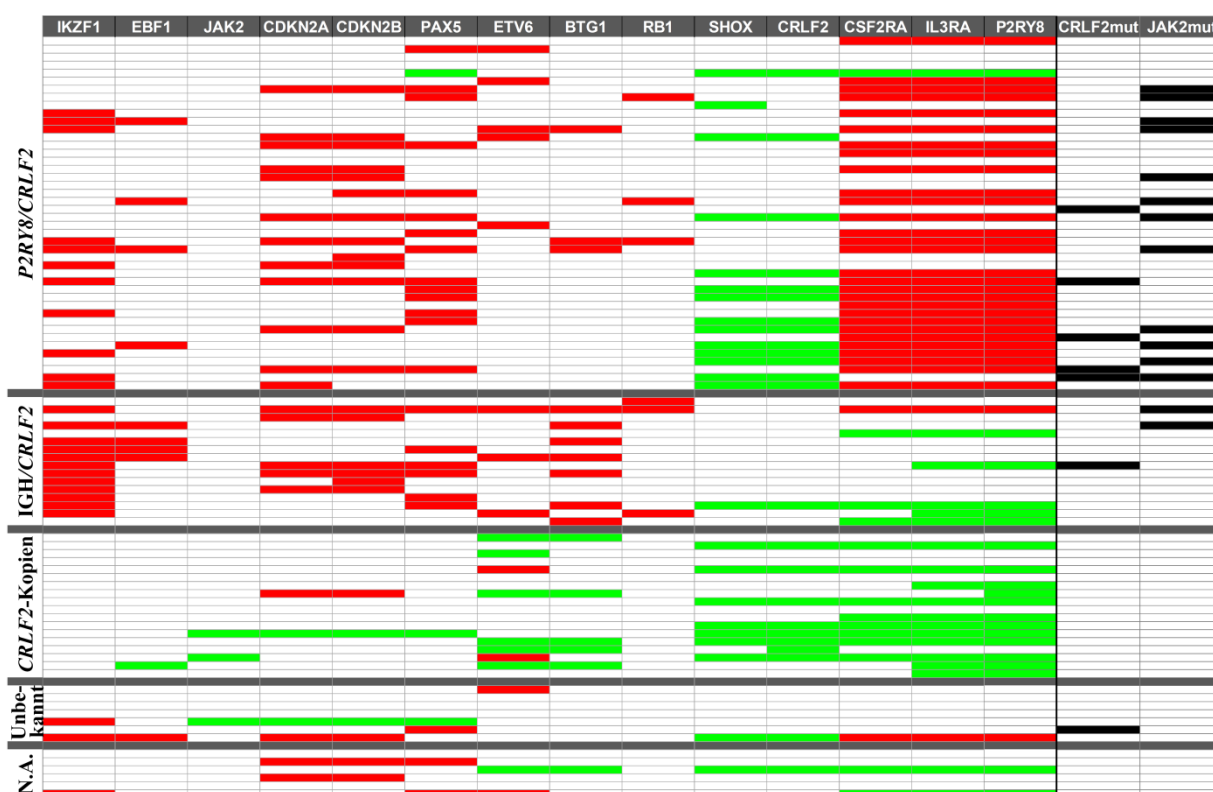


**Abbildung 15: Kumulative Rezidivinzidenz für Patienten mit T-ALL entsprechend des *CRLF2*-Genexpressionslevels.** Die Berechnung der 5-Jahres CRI für T-ALL Patienten mit niedriger (blau) und hoher (rot) *CRLF2*-Genexpression erfolgte nach der Methode von Kalbfleisch und Prentice. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) wurden mit Hilfe des Gray-Tests beurteilt. Abkürzungen: CRI, kumulative Rezidivinzidenz (*cumulative incidence of relapse*); SE, Standardfehler (*standard error*); n, Anzahl.

Um gesondert die prognostische Relevanz der hohen *CRLF2*-Genexpression für Patienten mit Down-Syndrom zu untersuchen, wurden zusätzlich die EFS-Rate und die CRI für diese Patientengruppe ermittelt. Aufgrund der kleinen Fallzahlen konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (siehe Anhang 8.3). Allerdings konnte die Tendenz einer schlechteren Prognose für DS-Patienten mit hoher *CRLF2*-Genexpression aufgrund einer höheren Rezidivinzidenz beobachtet werden.

#### 5.1.4 Zusätzliche genetische Aberrationen in der pB-ALL mit hoher *CRLF2*-Genexpression

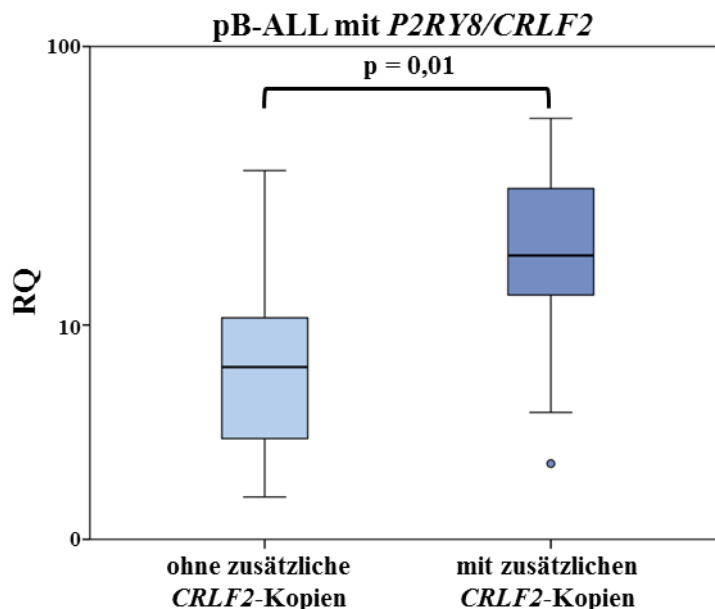
Um Veränderungen der Kopienzahl von bestimmten Genen der B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung innerhalb der verschiedenen Subgruppen mit hoher *CRLF2*-Genexpression zu bestimmen, wurden MLPA-Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 16 zusammengefasst.



**Abbildung 16: Übersicht zusätzlicher genetischer Aberrationen innerhalb der verschiedenen Subgruppen mit hoher *CRLF2*-Genexpression.** Veränderungen der Kopienzahl von bestimmten Genen der B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung analysiert mittels MLPA. Jede Zeile repräsentiert einen Fall und jede Spalte ein Gen. Grün zeigt eine Amplifikation und rot ist deletiert. Aktivierende *CRLF2*- und *JAK2*-Mutationen detektiert mittels HRM sind in schwarz gekennzeichnet.



Eine Amplifikation des *CRLF2*-Gens wurde in 13 der 44 (30%) Fälle mit der *P2RY8/CRLF2*-Fusion beobachtet, welche, wie in Abbildung 17 dargestellt, zu einer signifikant höheren *CRLF2*-Genexpression führte im Vergleich zu den *P2RY8/CRLF2*-positiven Fällen ohne zusätzliche *CRLF2*-Kopie (medianer RQ: 18 vs. 7;  $p = 0,01$ ).



**Abbildung 17:** *CRLF2*-Genexpressionslevel der pB-ALL Patienten mit *P2RY8/CRLF2*-Fusion mit und ohne zusätzliche Kopien des *CRLF2*-Gens. Die vertikalen Linien zeigen das Minimum und das Maximum, die horizontalen Abgrenzungen der Boxen das erste und dritte Quartil, die dicke schwarze Linie in der Mitte der Box den Median der Daten. Punkte repräsentieren Ausreißer und Sterne Extremwerte. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Genexpressionsleveln wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests beurteilt.

Es wurden keine weiteren Amplifikationen anderer Gene in der *P2RY8/CRLF2*-Subgruppe beobachtet. Allerdings wurde in dieser Subgruppe eine Deletion des *IKZF1*-Gens in 11 von 44 (25%) Fällen identifiziert, sowie eine Deletion in *CDKN2A* und/oder *CDKN2B* in 14 von 44 (32%) Fällen und in *PAX5* in 14 von 44 (32%) Fällen. Deletionen in *EBF1*, *ETV6*, *BTG1* und *RB1* wurden nur sporadisch beobachtet. Insgesamt hatten 31 der 44 (70%) Fälle mit der *P2RY8/CRLF2*-Fusion eine zusätzliche Deletion. Nur 1 der 16 (6%) Fälle mit *IGH/CRLF2*-Translokation hatte zusätzlich eine Amplifikation des *CRLF2*-Gens. In dieser Subgruppe wurde eine *IKZF1*-Deletion in 12 von 16 (75%) Fällen detektiert, eine Deletion in *CDKN2A* und/oder *CDKN2B* in 6 von 16 (38%) Fällen, eine *PAX5*-Deletion in 6 von 16 (38%) Fällen sowie eine Deletion des *BTG1*-Gens in 7 von 16 (44%) Fällen. Zusätzliche Deletionen in *EBF1*, *ETV6* und *RB1* wurden in einigen Fällen beobachtet. Insgesamt hatten 15 der 16 (94%) Fälle mit *IGH/CRLF2*-Translokation eine zusätzliche Deletion, aber keine anderen

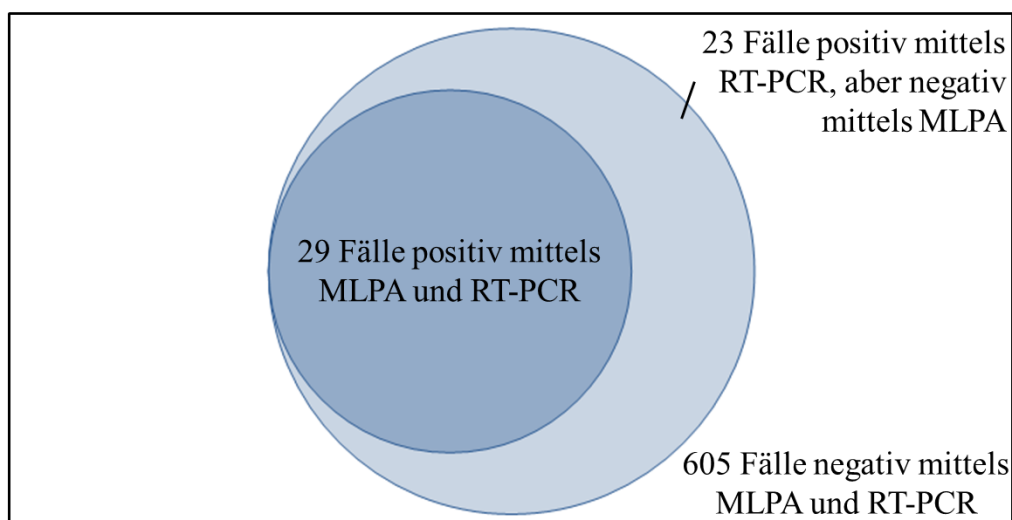
Amplifikationen. Im Gegensatz hierzu waren zusätzliche Deletionen selten (3/18, 17%) in Fällen mit hoher *CRLF2*-Genexpression assoziiert mit zusätzlichen Kopien des *CRLF2*-Gens, während zusätzliche Amplifikationen häufiger waren (8/18, 50%). Diese Beobachtung stimmt mit dem hohen hyperdiploiden Karyotyp in 14 von 18 (78%) Fällen überein. Eine heterogene Verteilung von Amplifikationen und Deletionen wurde in der Subgruppe mit unbekannter Ursache für die hohe *CRLF2*-Genexpression beobachtet.

Mit Hilfe der HRM-Analyse wurden aktivierende *CRLF2*- und *JAK2*-Mutationen detektiert, welche assoziiert sind mit hoher *CRLF2*-Genexpression. In 7 von 91 (8%) Fällen mit hoher *CRLF2*-Genexpression wurde die F232C *CRLF2*-Mutation identifiziert: in 5 der 44 (11%) Fällen mit der *P2RY8/CRLF2*-Fusion, in 1 der 16 (6%) Fälle mit *IGH/CRLF2*-Translokation und in 1 der 7 (14%) Fälle mit unbekannter Ursache der hohen *CRLF2*-Genexpression. *JAK2*-Mutationen wurden in 14 von 91 (15%) Fällen mit hoher *CRLF2*-Genexpression detektiert (9x R683G, 3x R683S, 1x F694L sowie eine Insertion: I682delinsGSV): in 12 der 44 (27%) Fälle mit der *P2RY8/CRLF2*-Fusion und 2 der 16 (13%) Fälle mit *IGH/CRLF2*-Translokation.

## 5.2 Methodenvergleich zur Detektion der *P2RY8/CRLF2*-Fusion

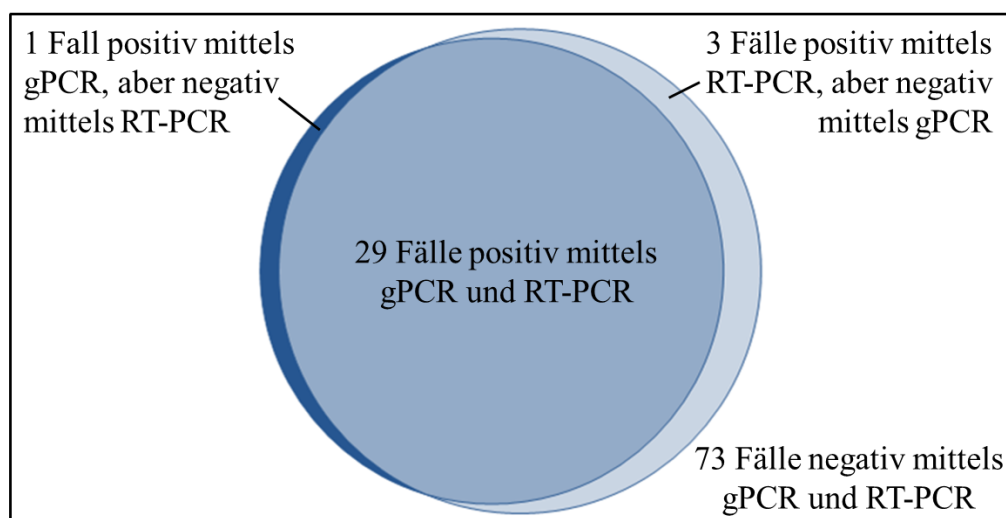
Es gibt verschiedene Methoden, um die *P2RY8/CRLF2*-Fusion zu detektieren, welche sich in der Sensitivität, der Durchführung und dem erforderlichen Patientenmaterial unterscheiden. Bevor ein neuer prognostischer Marker in die Risikostratifizierung implementiert wird, sollte deshalb zunächst evaluiert werden, welche Methode zur Detektion angewandt werden kann, um sowohl die Aberration effizient zu identifizieren als auch robuste, reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Es wurden drei Methoden zur Detektion der *P2RY8/CRLF2*-Fusion getestet und miteinander verglichen: MLPA, genomische PCR und RT-PCR.

Für den Vergleich von MLPA mit RT-PCR wurden 657 Proben mittels beider Methoden analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 veranschaulicht. In 605 Fällen wurde die *P2RY8/CRLF2*-Fusion durch beide Methoden nicht nachgewiesen. In 52 Proben, welche mittels RT-PCR positiv waren für die *P2RY8/CRLF2*-Fusion, konnte MLPA diese nicht detektieren: Die Fusion konnte in keinem der 8 Fälle mit einer niedrigen *CRLF2*-Genexpression detektiert werden und für die Fälle mit einer hohen *CRLF2*-Genexpression identifizierte MLPA diese nur in 29 von 44 (66%) der mittels RT-PCR positiven Fälle.



**Abbildung 18: Venn-Diagramm zur Darstellung des Methodenvergleichs MLPA vs. RT-PCR zur Detektion der *P2RY8/CRLF2*-Fusion.** Abkürzungen: MLPA, multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation (multiplex ligation-dependent probe amplification); RT-PCR, Reverse Transkriptase-PCR.

Darüber hinaus wurden 100 Proben zusätzlich mittels genomischer PCR analysiert (siehe Abbildung 19). Bei diesem Vergleich der PCR basierend auf DNA mit der RT-PCR basierend auf RNA waren mit Hilfe beider Methoden 73 Proben negativ für die *P2RY8/CRLF2*-Fusion und 23 Proben positiv. Außerdem waren drei Proben Fusions-positiv mittels RT-PCR, aber negativ mittels genomischen PCR, während eine Probe Fusions-positiv war auf DNA-Ebene, aber negativ auf RNA-Ebene.



**Abbildung 19: Venn-Diagramm zur Darstellung des Methodenvergleichs genomische PCR vs. RT-PCR zur Detektion der *P2RY8/CRLF2*-Fusion.** Abkürzungen: gPCR, genomische PCR; RT-PCR, Reverse Transkriptase-PCR.

Für die 24 Proben, welche mittels genomischer PCR positiv für die *P2RY8/CRLF2*-Fusion waren, wurde die Fusion mit Hilfe der qPCR quantifiziert, um die jeweilige Klonegröße zu bestimmen. Hierbei erfolgte die Unterscheidung eines Hauptklons ( $\geq 20\%$ ) von einem kleineren Subklon ( $< 20\%$ ) gemäß der Definition von Morak *et al.*<sup>49</sup> In 18 der 24 (75%) Fälle lag die *P2RY8/CRLF2*-Fusion in einem Hauptklon vor und in 6 von 24 (25%) Fällen als kleinerer Subklon.

### 5.3 Vergleichende Transkriptom-Analyse von zwei *CRLF2*-hochexprimierenden Subgruppen

Um gruppenspezifische Genexpressionsprofile zu identifizieren, wurde eine vergleichende genomweite Untersuchung der Genexpression durchgeführt mit gepoolter RNA von zwei *CRLF2*-hochexprimierenden Subgruppen: mit *P2RY8/CRLF2*-Fusion (*P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>) und ohne (*P2RY8/CRLF2*<sup>-</sup>). Hierzu wurden zwei NGS-basierende Techniken, MACE und ST-DGE, angewandt und kombiniert. Zur Validierung der Ergebnisse wurden exemplarisch 11 Kandidatengene mittels qPCR auf individueller Patientenebene untersucht. Die Zusammensetzung der Patientenkohorte für die Transkriptom-Analyse und der Validierungskohorte ist in der Tabelle 4 (Abschnitt 4.3.2) aufgelistet und die dazugehörigen klinischen Parameter der Patienten sind in der Tabelle S1 im Anhang zusammengefasst. Die Interpretation der Transkriptom-Daten erfolgte mit Hilfe verschiedener Analyse-Softwares.

#### 5.3.1 Ergebnisse der Transkriptom-Analyse mittels MACE und ST-DGE

Die Rohdaten der Transkriptom-Analyse sind zugänglich in der ArrayExpress-Datenbank (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) unter der Zugangsnummer: E-MTAB-4737. Die Anzahl der mittels MACE und ST-DGE erhaltenen Sequenzen vor und nach der qualitativen Bearbeitung der Rohdaten sind in der Tabelle 14 zusammengefasst.

**Tabelle 14: Anzahl der mittels MACE und ST-DGE erhaltenen Sequenzen vor und nach der qualitativen Bearbeitung der Rohdaten.**

	<i>P2RY8/CRLF2</i> <sup>+</sup>	<i>P2RY8/CRLF2</i> <sup>-</sup>
<b>MACE</b>		
# Sequenzen der Rohdaten	9.326.959	8.233.445
# gefilterte Sequenzen	8.564.662	7.649.903
<b>ST-DGE</b>		
# Sequenzen der Rohdaten	10.621.037	6.430.193
# gefilterte Sequenzen	6.286.952	5.513.306

Abkürzungen: MACE, *massive analysis of cDNA ends*; ST-DGE, *SuperTag digital gene expression profiling*.

Homopolymere und PCR-bedingte Duplikate wurden durch die TrueQuant Technologie identifiziert und vor der Quantifizierung ausgeschlossen. Die Anzahl der Sequenzen nach Anwendung der Qualitätsfilter reichte von 8.564.662 (91,8%) in dem *P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>-Pool mittels MACE bis zu 5.513.306 (85,7%) in dem *P2RY8/CRLF2*<sup>-</sup>-Pool mittels ST-DGE. Die Anzahl der mittels MACE und ST-DGE identifizierten Transkripte sowie die Anzahl der Transkripte nach Kombination beider Datensätze sind in der Tabelle 15 angegeben.

**Tabelle 15: Anzahl der identifizierten Transkripte mittels MACE und ST-DGE, sowie nach Kombination beider Datensätze.**

	MACE	ST-DGE	Kombiniert
# höher exprimierte Transkripte in <i>P2RY8/CRLF2</i> <sup>+</sup>	533	678	351
# niedriger exprimierte Transkripte in <i>P2RY8/CRLF2</i> <sup>+</sup>	296	288	202
# Transkripte gleicher Expression	15.178	13.703	12.348
<b>Gesamtanzahl Transkripte</b>	16.006	14.669	12.901

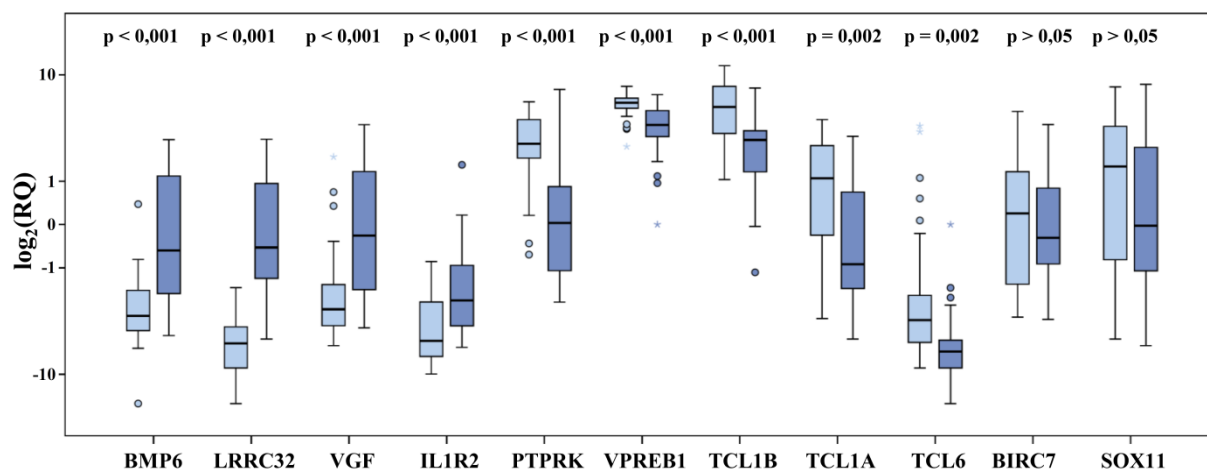
Abkürzungen: MACE. *massive analysis of cDNA ends*; ST-DGE. *SuperTag digital gene expression*.

In den Lymphoblasten der beiden *CRLF2*-hochexprimierenden Subgruppen wurden insgesamt 553 differentiell exprimierte Transkripte identifiziert: 351 Transkripte waren signifikant höher exprimiert in der *P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>-Subgruppe und 202 Transkripte waren signifikant niedriger exprimiert im Vergleich zu der *P2RY8/CRLF2*<sup>-</sup>-Kontrollgruppe.

### 5.3.2 Validierung der Ergebnisse der Transkriptom-Analyse

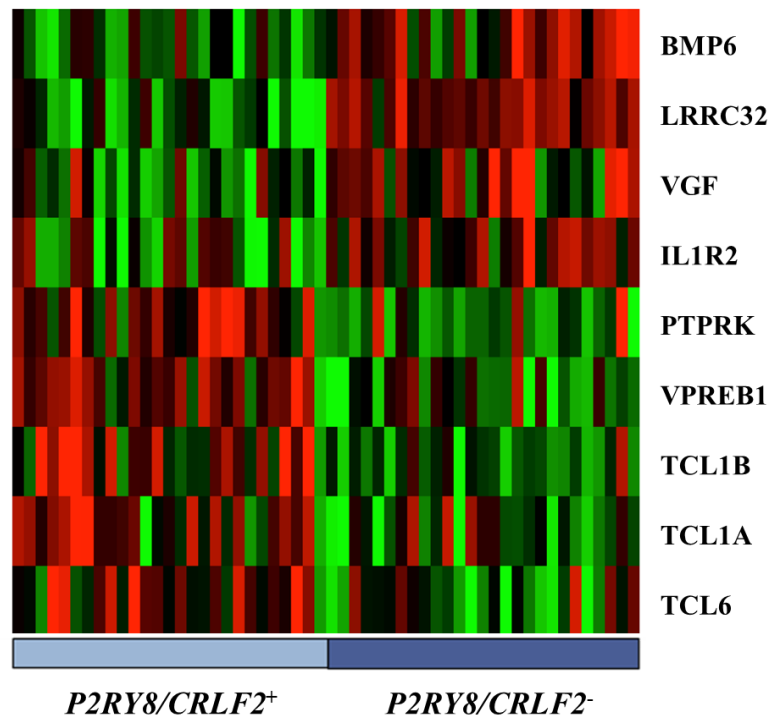
Die Validierung der gepoolten NGS-basierten Transkriptom-Analyse erfolgte mittels qPCR auf individueller Patientenebene in einer Validierungskohorte von insgesamt 54 Patienten. Es wurde exemplarisch die Expression von 11 Genen untersucht. Die Resultate sind als log<sub>2</sub>(RQ)-Werte normalisiert in der Abbildung 20 zusammengefasst. Die signifikant niedrigere Expression in den Lymphoblasten der *P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>-Subgruppe im Vergleich zur *P2RY8/CRLF2*<sup>-</sup>-Kontrollgruppe konnte für alle 4 mittels Transkriptom-Analyse identifizierten Kandidatengene mit einem  $p < 0,001$  bestätigt werden (*BMP6* [fc: -7,0], *LRRC32*[fc. -38,6], *VGF* [fc: -6,5], *IL1R2* [fc: -14,8]). Von 7 Kandidatengenen, welche mittels Transkriptom-Analyse eine höhere Expression in der *P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>-Subgruppe aufwiesen, zeigten 5 Gene eine signifikant differentielle Expression in der Validierungskohorte mit einem  $p < 0,01$  (*PTPRK* [fc: 6,1], *VPREB1* [fc: 53,4], *TCL1B* [fc: 6,5], *TCL1A* [fc: 4,0], *TCL6* [fc: 8,1]), während die anderen zwei Gene nur eine

entsprechende Tendenz ohne Signifikanz ( $p > 0,05$ ) aufwiesen (*BIRC7* [fc: 1,3], *SOX11* [fc: 2,9]).



**Abbildung 20: Genexpression von 11 Kandidatengenen gemessen mittels qPCR auf individueller Patientenebene zur Validierung der Transkriptom-Analyse.** Die hellblauen Boxen zeigen das Genexpressionslevel der *P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>-Subgruppe und die dunkelblauen Boxen repräsentieren die *P2RY8/CRLF2*<sup>-</sup>-Kontrollgruppe. Die Daten sind zur Normalisierung als  $\log_2(\text{RQ})$ -Werte dargestellt. Die vertikalen Linien zeigen das Minimum und das Maximum, die horizontalen Abgrenzungen der Boxen das erste und dritte Quartil, die dicke schwarze Linie in der Mitte der Box den Median der Daten. Punkte repräsentieren Ausreißer und Sterne Extremwerte. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) in der Genexpression wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests beurteilt.

Visualisiert man die einzelnen Genexpressionswerte der Patienten in einer Heatmap, ist ein deutlicher Unterschied im Genexpressionsprofil der neun differentiell exprimierten Kandidatengene zwischen der *P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>-Subgruppe und der *P2RY8/CRLF2*<sup>-</sup>-Kontrollgruppe zu erkennen (siehe Abbildung 21). So ist die *P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>-Subgruppe durch eine niedrigere Genexpression von *BMP6*, *LRRC32*, *VGF* und *IL1R2* sowie einer höheren Genexpression von *PTPRK*, *VPREB1*, *TCL1A*, *TCL1B* und *TCL6* im Vergleich zur Kontrollgruppe gekennzeichnet.



**Abbildung 21: Heatmap der einzelnen Genexpressionswerte ( $\Delta C_t$ ) der Patienten gemessen mittels qPCR zur Validierung.** Jede Zeile repräsentiert eins der 9 differentiell exprimierten Kandidatengene und jede Spalte einen Patienten. Die Balken unterhalb der Heatmap zeigen die Gruppenzugehörigkeit der Patienten: in hellblau die *P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>-Subgruppe und in dunkelblau die *P2RY8/CRLF2*<sup>-</sup>-Kontrollgruppe. Unterschiede in der Genexpression sind anhand der Farbvariation veranschaulicht: eine hohe Genexpression wird in rot angezeigt und eine niedrige Expression in grün.

### 5.3.3 Interpretation der Transkriptom-Daten

Für die Interpretation der Genexpressionsdaten wurden verschiedene Analyse-Softwares wie GOAL, GSEA, STRING und CMAP verwendet, um Assoziationen zwischen Transkriptionsprofil und beobachtetem Phänotyp zu identifizieren.

Von den 553 differentiell exprimierten Transkripten, wurden 202 Transkripte niedriger exprimiert in der *P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>-Subgruppe im Vergleich zur *P2RY8/CRLF2*<sup>-</sup>-Kontrollgruppe, welche in der Tabelle S2 im Anhang aufgelistet sind. Gene mit einer mehr als 16-fach niedrigeren Expression sind zusammen mit der Angabe zu ihrer potentiellen Funktion in der Tabelle 16 aufgelistet.

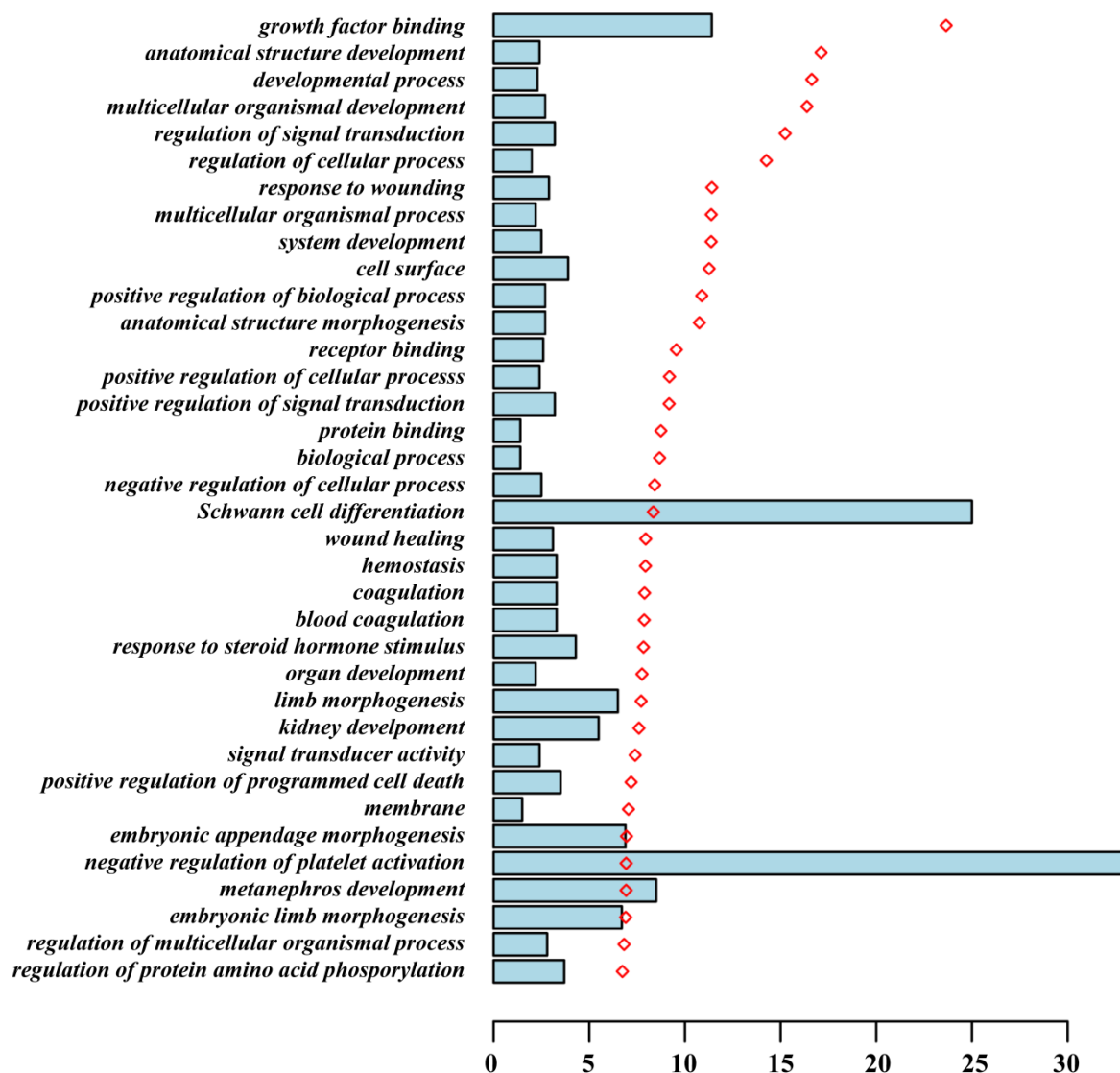
**Tabelle 16: Liste der niedriger exprimierten Gene ( $fc < -16$ ) in der  $P2RY8/CRLF2^+$ -Subgruppe im Vergleich zur  $P2RY8/CRLF2$ -Kontrollgruppe in absteigender Reihenfolge des mittleren  $\log_2(fc)$ . Mittels qPCR validierte Gene sind durch Fettdruck hervorgehoben.**

Gen	$\log_2(fc)$ MACE	$\log_2(fc)$ ST-DGE	Mittlerer $\log_2(fc)$	Mittlerer p-Wert	Funktion
<b>IL1R2</b>	-5,41	-5,99	-5,7	6,41E-09	Decoy-Rezeptor; IL1-Signalweg
LY6H	-6,14	-5,18	-5,66	9,36E-06	GPI-verankertes Glykoprotein; Entwicklung des zentralen Nervensystems
ZCCHC12	-3,91	-7,09	-5,5	3,27E-14	Transkriptioneller Koaktivator; TGF- $\beta$ -Signalweg
NTRK1	-6,23	-4,75	-5,49	2,45E-36	Rezeptor-Tyrosinkinase; Entwicklung des zentralen Nervensystems
<b>BMP6</b>	-4,58	-6,09	-5,33	4,31E-07	Wachstumsfaktor; TGF- $\beta$ -Signalweg
IL24	-4,1	-6,39	-5,25	4,88E-09	Zytokin; JAK/STAT-Signalweg
MYT1L	-3,52	-6,85	-5,18	2,61E-08	Transkriptionsfaktor; Entwicklung des zentralen Nervensystems
<b>VGF</b>	-5,43	-4,57	-5,0	4,05E-17	Neurosekretorisches Protein; Entwicklung des zentralen Nervensystems
CLDN5	-4,96	-4,8	-4,88	4,63E-87	Strukturprotein; Zell-Zell-Adhäsion
COL13A1	-5,06	-4,64	-4,85	2,55E-04	Strukturprotein; Zell-Matrix-Adhäsion
SORCS2	-5,06	-4,35	-4,7	9,40E-04	Rezeptor des zentralen Nervensystems
ITGB5	-4,23	-5,09	-4,66	1,27E-04	Integrin-Rezeptor; Zell-Matrix-Adhäsion
LOXHD1	-4,19	-5,11	-4,65	3,58E-17	Calciumkanal; Haarzellen
DOCK4	-4,14	-5,09	-4,62	3,59E-05	GTP-Austauschfaktor; Zell-Zell-Adhäsion
SHISA2	-4,68	-4,37	-4,53	3,81E-19	Transmembranprotein; FGF- und WNT-Signalweg
LAMB2	-3,38	-5,57	-4,48	1,57E-05	Glykoprotein der extrazellulären Matrix
TMSB15A	-3,64	-5,09	-4,36	9,35E-03	Bindet Aktin; Organisation des Zytoskeletts
BMP3	-5,19	-3,5	-4,34	1,52E-02	Wachstumsfaktor; TGF- $\beta$ -Signalweg
CEMP1	-3,99	-4,58	-4,29	1,01E-21	Bindet Hyaluronsäure; Zellmigration
SIX3	-4,38	-4,18	-4,28	1,84E-03	Transkriptionsfaktor; Entwicklung des zentralen Nervensystems und Auges
RET	-3,96	-4,35	-4,16	9,90E-04	Rezeptor-Tyrosinkinase; Protoonkogen
PDGFB	-3,14	-5,09	-4,12	1,14E-04	Wachstumsfaktor; Protoonkogen
TKTL1	-4,64	-3,57	-4,11	4,14E-06	Transketolase; Glucose-Stoffwechsel
SEPT12	-2,76	-5,43	-4,09	1,12E-03	GTPase; Organisation des Zytoskeletts
IL1RAP	-3,56	-4,15	-3,86	2,99E-03	Korezeptor; IL1-Signalweg
<b>LRRC32</b>	-4,01	-3,93	-4,0	7,65E-218	Glykoprotein; TGF- $\beta$ -Signalweg

Abkürzungen: fc, Genexpressionsunterschied (*fold change*); MACE, *massive analysis of cDNA ends*; ST-DGE, *SuperTag digital gene expression*.

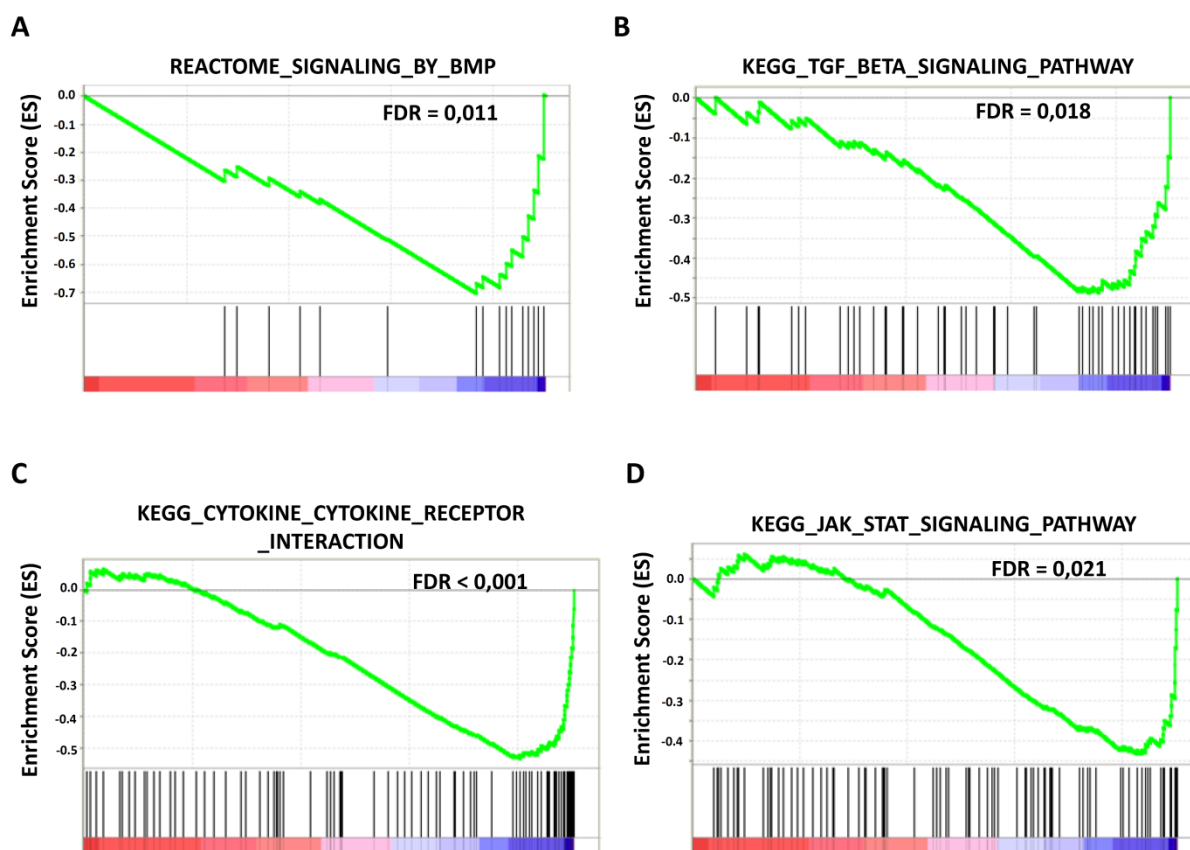


Funktionelle Analysen mittels GOAL identifizierten eine Anreicherung von 36 GO-Kategorien ( $FDR < 0,05$ ), welche in der Abbildung 22 zusammengefasst sind. Viele dieser GO-Termini deuten auf eine entwicklungsorientierte Aktivität hin: Die meist signifikant angereicherten Kategorien waren unter anderem „*growth factor binding*“ ( $FDR = 9,3E-08$ ) und „*developmental process*“ ( $FDR = 9,3E-06$ ).



**Abbildung 22:** Mittels GOAL identifizierte GO-Kategorien der in der *P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>-Subgruppe niedriger exprimierten Transkripte im Vergleich zur *P2RY8/CRLF2*-Kontrollgruppe. Die blauen Balken repräsentieren den prozentualen Anteil der differenziell exprimierten Gene in der entsprechenden Kategorie. Die roten Punkte zeigen die FDR als  $-\log_2(\text{korrigierter p-Wert})$ .

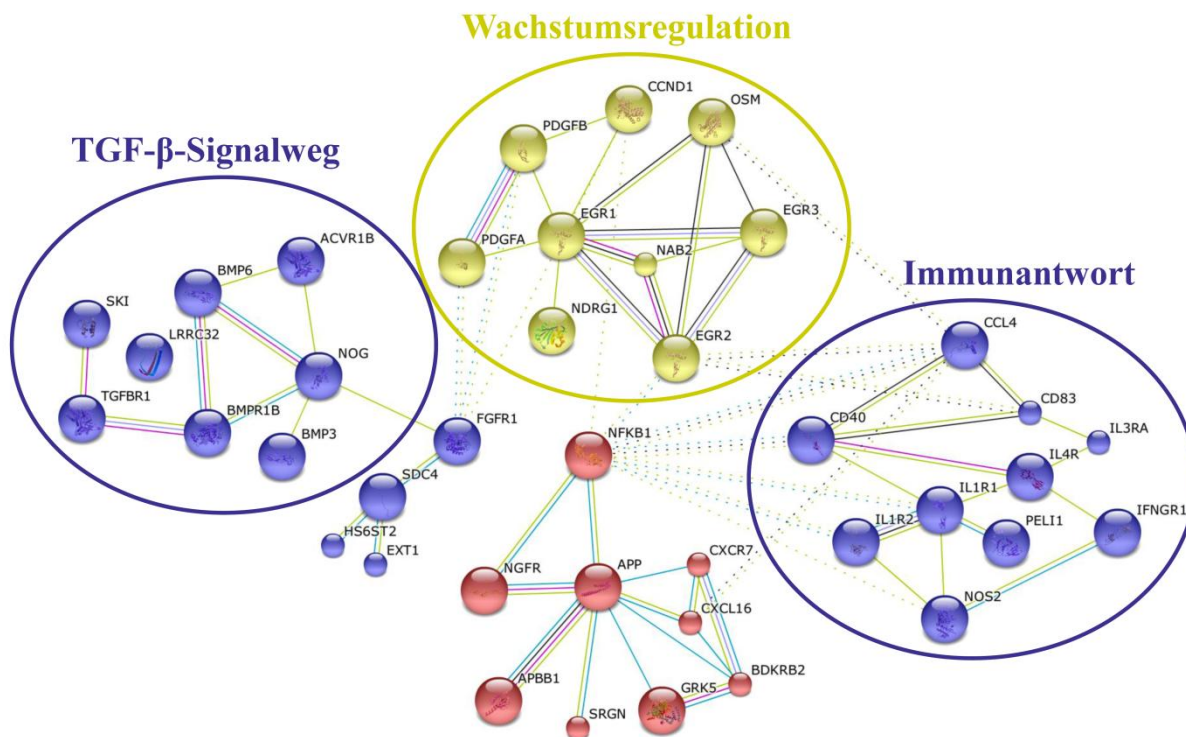
Ebenso zeigte die Analyse mittels GSEA eine negative Anreicherung von Genen des BMP-Signalwegs (ES = -0,71; FDR = 0,011;  $p < 0,0001$ ) und TGF- $\beta$ -Signalwegs (ES = -0,49; FDR = 0,018;  $p = 0,005$ ). Zudem waren Gene negativ angereichert, welche beteiligt sind an der Zytokin-Rezeptor-Interaktion (ES = -0,53; FDR < 0,001;  $p < 0,0001$ ) und dem JAK/STAT-Signalweg (ES = -0,43; FDR = 0,021;  $p < 0,0001$ ). Die dazugehörigen Graphen der GSEA-Analyse sind in der Abbildung 23 gezeigt.



**Abbildung 23: Graphen der mittels GSEA-Analyse identifizierten Gen-Sets mit negativem ES.** Dieser negative Wert kennzeichnet eine Anreicherung von Genen in einem Gen-Set, welche in der *P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>-Subgruppe niedrigerer exprimiert wurden im Vergleich zur *P2RY8/CRLF2*-Kontrollgruppe. Eine signifikante Anreicherung wurde entsprechend dem nominalen p-Wert (< 0,05) und der FDR ( $\leq 0,25$ ) beurteilt.

Protein-Interaktions-Analysen mittels STRING ergaben für die in der *P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>-Subgruppe niedriger exprimierten Transkripte Netzwerke mit signifikant angereicherten Protein-Protein-Interaktionen. Es wurden insgesamt 103 Interaktionen beobachtet. Das Hauptnetzwerk bestehend aus 40 Genprodukten und 68 Interaktionen ist in der Abbildung 24 visualisiert. Dieses potentielle Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk zeigt NFkB1 im

Zentrum. Durch Clustern der Proteine nach k-Means konnten einzelne Proteine zu funktionellen Gruppen zusammengefasst werden. Hierbei wurde erneut der TGF- $\beta$ -Signalweg identifiziert und außerdem noch Wachstumsregulation und Immunantwort.



**Abbildung 24:** Potentielles Protein-Interaktionsnetzwerk der Genprodukte der niedriger exprimierten Transkripte in der *P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>-Subgruppe erstellt mittels STRING. Die Knoten repräsentieren die Genprodukte, während die Striche potentielle Interaktionen zwischen den Proteinen anzeigen. Funktionelle Gruppen sind mit einem Kreis zusammengefasst.

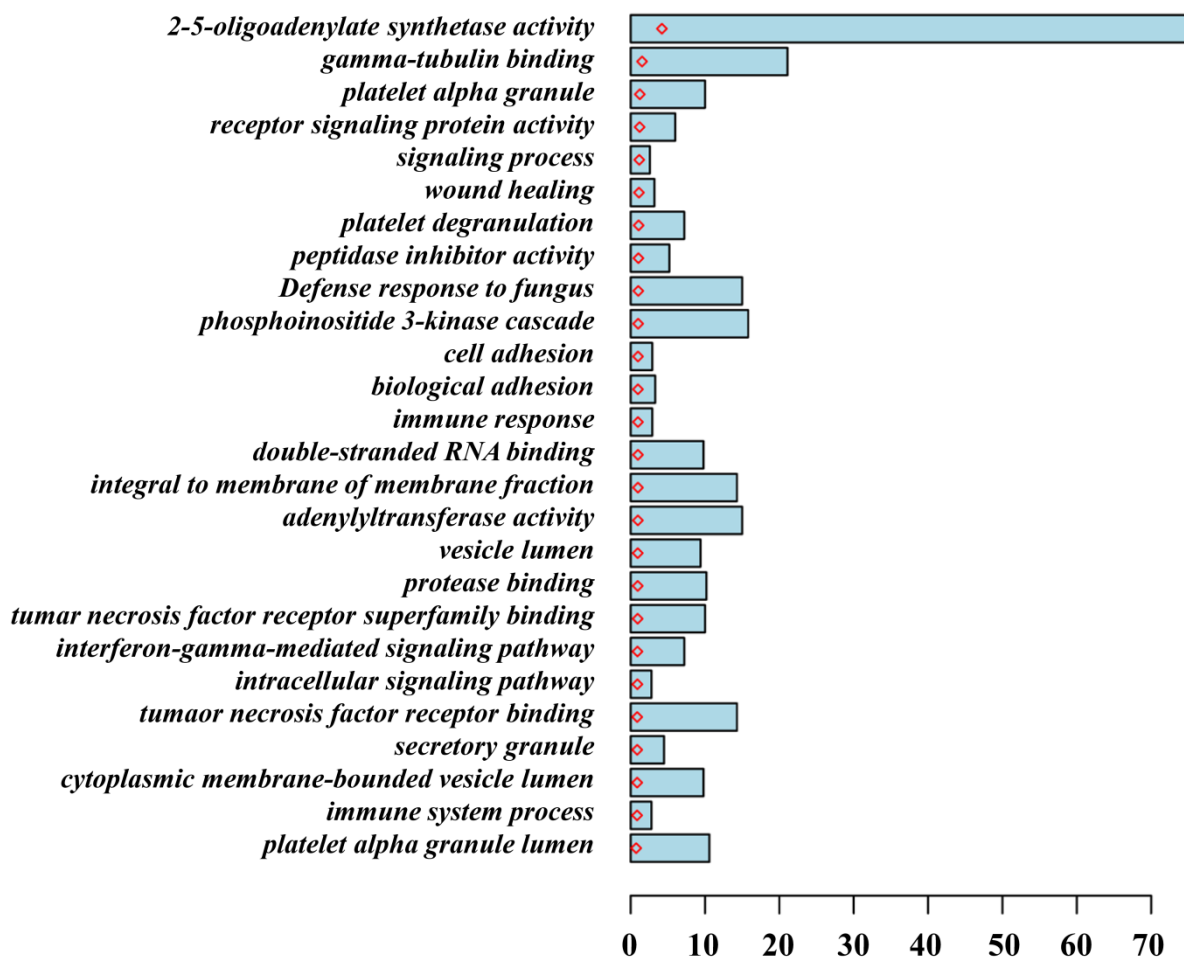
Entsprechende Analysen wurden auch für die 351 Transkripte durchgeführt, welche in der *P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>-Subgruppe signifikant höher exprimiert wurden im Vergleich zur *P2RY8/CRLF2*<sup>-</sup>-Kontrollgruppe (siehe Tabelle S3 im Anhang). Gene mit einer mehr als 16-fach höheren Expression sind zusammen mit der Angabe zu ihrer potentiellen Funktion in der Tabelle 17 aufgelistet.

**Tabelle 17: Liste der höher exprimierten Gene ( $fc > 16$ ) in der  $P2RY8/CRLF2^+$ -Subgruppe im Vergleich zur  $P2RY8/CRLF2^-$ -Kontrollgruppe in absteigender Reihenfolge des mittleren  $\log_2(fc)$ . Mittels qPCR validierte Gene sind durch Fettdruck hervorgehoben.**

Gen	$\log_2(fc)$ MACE	$\log_2(fc)$ ST-DGE	Mittlerer $\log_2(fc)$	Mittlerer p-Wert	Funktion
RIPK4	5,33	7,17	6,25	1,43E-11	Serin/Threonin-Kinase; Aktiviert NF- $\kappa$ B
FAM19A5	5,89	6,13	6,01	5,06E-09	Chemokin; zentrales Nervensystem
MOV10L1	5,58	5,39	5,49	5,44E-07	RNA-Helikase; Spermatogenese
BIRC7	4,74	6,02	5,38	7,70E-05	Apoptose-Inhibitor
NDN	4,63	5,62	5,13	1,40E-04	Transkriptionsfaktor; inhibiert Zellwachstum
<b>PTPRK</b>	4,22	5,98	5,1	1,15E-09	Tyrosin-Phosphatase; EGFR-Signalweg
PPBP	5,02	4,81	4,92	4,85E-05	Wachstumsfaktor; Chemokin
BRSK1	4,33	5,2	4,76	4,88E-06	Serin/Threonin-Kinase; Zellzyklus-Kontrolle
NFATC4	3,81	5,39	4,6	4,11E-07	Transkriptionsfaktor; Aktivierung T-Zellen
FSTL5	4,39	4,7	4,55	5,43E-04	Sekretorisches Glykoprotein
ITGA7	4,1	4,81	4,46	1,70E-03	Integrin-Rezeptor; Zell-Matrix-Adhäsion
SH3BGR	3,74	5,06	4,4	6,00E-03	SH3-Adaptorprotein; Regulation der Signaltransduktion
RASAL1	4,84	3,67	4,25	4,26E-05	GTPase-Aktivatorprotein; RAS-Suppressor
LINC00487	3,26	5,2	4,23	2,20E-03	Unbekannt; (nicht-kodierende RNA)
KCNQ5	3,52	4,62	4,07	7,65E-04	Kaliumkanal; zentrales Nervensystem

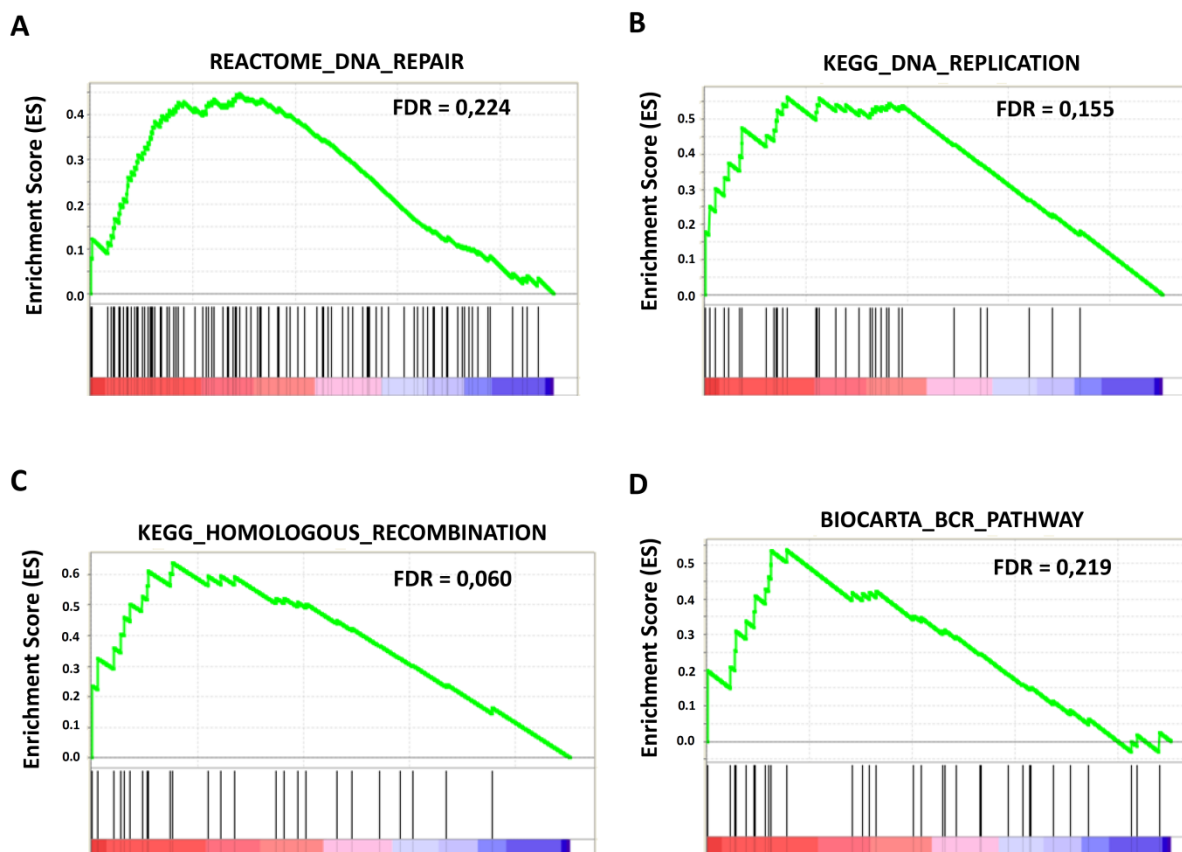
Abkürzungen: fc, Genexpressionsunterschied (*fold change*); MACE, *massive analysis of cDNA ends*; ST-DGE, *SuperTag digital gene expression*.

Mit Hilfe der GOAL-Analyse konnte keine signifikante Anreicherung von GO-Kategorien ( $FDR > 0,05$ ) identifiziert werden. Das Ergebnis der Analyse ist in der Abbildung 25 dargestellt.



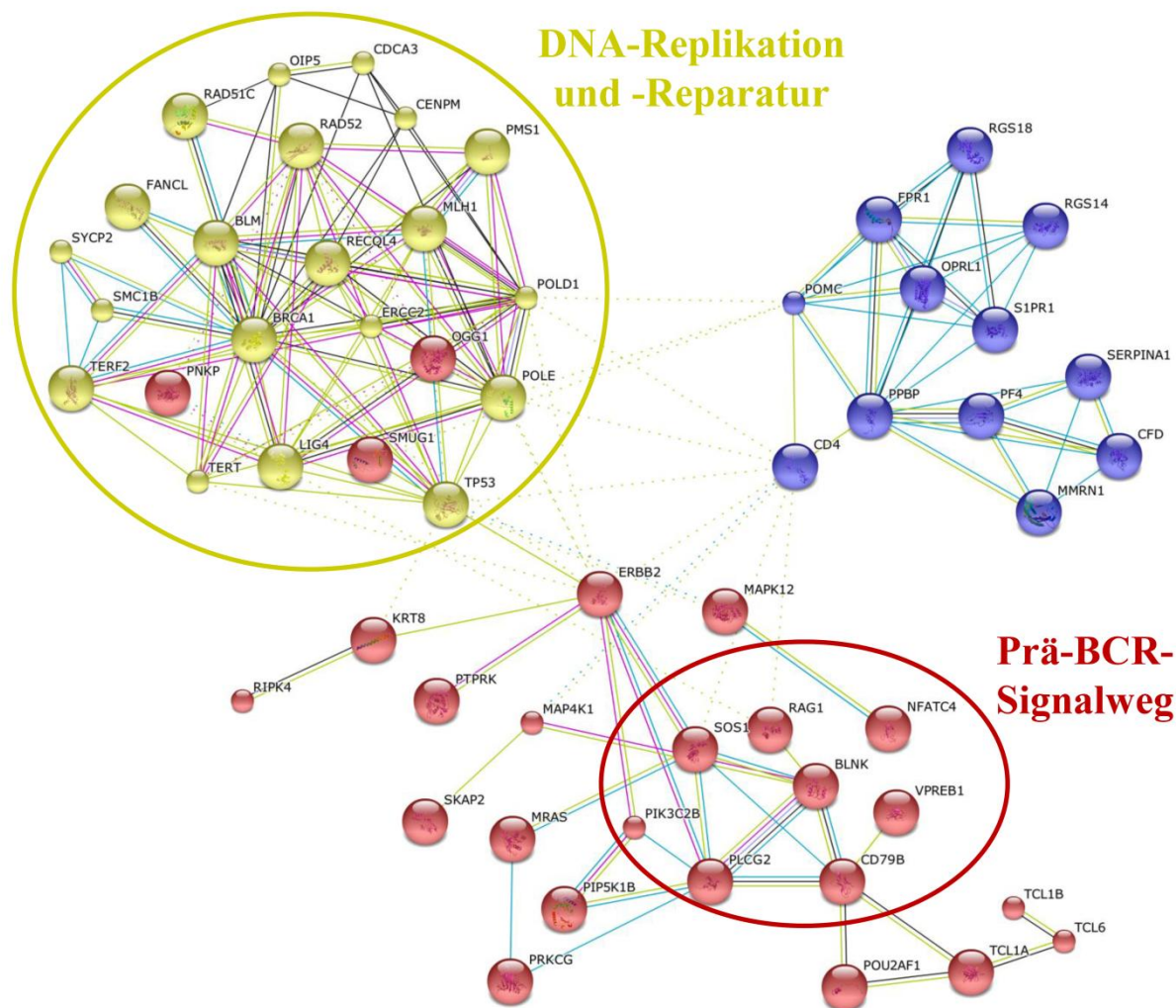
**Abbildung 25:** Mittels GOAL identifizierte GO-Kategorien der in der *P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>-Subgruppe höher exprimierten Transkripte im Vergleich zur *P2RY8/CRLF2*<sup>-</sup>-Kontrollgruppe. Die blauen Balken repräsentieren den prozentualen Anteil der differentiell exprimierten Gene in der entsprechenden Kategorie. Die roten Punkte zeigen die FDR als  $-\log_2(\text{korrigierter p-Wert})$ . Für keine der GO-Kategorien wurde die nötige Signifikanz von  $FDR < 0,05$  erreicht.

Die Analyse mittels GSEA zeigte eine signifikante Anreicherung von Genen, die an der DNA-Replikation (ES = 0,56; FDR = 0,155; p = 0,007), DNA-Reparatur (ES = 0,45; FDR = 0,224; p = 0,002) und homologen Replikation (ES = 0,64; FDR = 0,060; p = 0,001) beteiligt sind. Außerdem waren Gene des B-Zell-Rezeptor (BCR)-Signalwegs (ES = 0,54; FDR = 0,219; p = 0,006) überrepräsentiert. Die dazugehörigen Graphen der GSEA-Analyse sind in der Abbildung 26 gezeigt.



**Abbildung 26: Graphen der mittels GSEA-Analyse identifizierten Gen-Sets mit positivem ES.** Dieser positive Wert kennzeichnet eine Anreicherung von Genen in einem Gen-Set, welche in der *P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>-Subgruppe höher exprimiert wurden im Vergleich zur *P2RY8/CRLF2*<sup>-</sup>-Kontrollgruppe. Eine signifikante Anreicherung wurde entsprechend dem nominalen p-Wert (< 0,05) und der FDR ( $\leq 0,25$ ) beurteilt.

Protein-Interaktions-Analysen mittels STRING ergaben für die in der *P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>-Subgruppe höher exprimierten Transkripte ebenfalls Netzwerke mit signifikant angereicherten Protein-Protein-Interaktionen. Es wurden insgesamt 166 Interaktionen beobachtet. Innerhalb dieses Netzwerks bildeten 57 Genprodukte ein hochgradig vernetztes Subnetzwerk mit 141 Interaktionen und ERBB2 im Zentrum. Dieses potentielle Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk ist in der Abbildung 27 visualisiert. Durch Clustern der Proteine nach k-Means konnten erneut einzelne Proteine zu funktionellen Gruppen zusammengefasst werden. Hierbei wurden Cluster von Genen identifiziert, welche an der DNA-Replikation und -Reparatur beteiligt sind sowie am prä-BCR-Signalweg. Diese Beobachtungen sind mit den Ergebnissen der GSEA-Analyse konform.



**Abbildung 27: Potentielles Protein-Interaktionsnetzwerk der Genprodukte der höher exprimierten Transkripte in der *P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>-Subgruppe erstellt mittels STRING. Die Knoten repräsentieren die Genprodukte, während die Striche potentielle Interaktionen zwischen den Proteinen anzeigen. Funktionelle Gruppen sind mit einem Kreis zusammengefasst.**

Um potentielle Wirkstoffe zu identifizieren, welche dem Rezidiv-assoziierten Genexpressionsprofil der *P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>-Subgruppe entgegenwirken, wurde die CMAP-Datenbank genutzt. Es wurden drei vielversprechende Kandidatenwirkstoffe identifiziert, welche potentiell in der Lage wären, das Genexpressionsprofil der *P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>-Subgruppe zu invertieren: Podophyllotoxin (CS = -0,981;  $p < 0,0001$ ), Anisomycin (CS = -0,950;  $p < 0,0001$ ) und Vinblastin (CS = -0,883;  $p = 0,003$ ).

## 6. Diskussion

Durch die Anwendung moderner risikoadaptierter Behandlungsstrategien können heutzutage nahezu 80% der Kinder, die an einer ALL erkranken, dauerhaft geheilt werden.<sup>16</sup> Dennoch erleidet immer noch jedes fünfte Kind ein Rezidiv der Erkrankung, deren langfristige Heilungsrate nur 50% beträgt.<sup>16,26</sup> Gleichzeitig ist die Toxizität der Therapie mit schweren akuten Nebenwirkungen sowie Langzeitfolgen verbunden<sup>27-29</sup> und sollte in Balance mit der für den Behandlungserfolg tatsächlich nötigen Intensität stehen.<sup>98,99</sup> Das Ziel ist daher die weitere Optimierung der Therapie, um jedem einzelnen Patienten gemäß seinem individuellen Risiko eine optimale Behandlung zukommen zu lassen. Um diesem Anspruch der Präzisionsmedizin gerecht zu werden, müssen sowohl neue prognostisch relevante Marker zur Verbesserung der Abschätzung des individuellen Risikos identifiziert als auch gezielte, auf die jeweilige Biologie der Leukämie zugeschnittene Therapien entwickelt werden.

Neben den bekannten prognostisch relevanten Subgruppen, welche bereits in die ALL-BFM Studienprotokolle Einzug gefunden haben (siehe Abbildung 1 im Abschnitt 3.1.2), ist die T-ALL und rund ein Viertel der pB-ALL noch nicht hinlänglich für die Risikostratifizierung charakterisiert.<sup>20,22</sup> Die *P2RY8-CRLF2*-Fusion, welche zu einer hohen Expression des *CRLF2*-Gens führt, wurde in rund 5% der pB-ALL identifiziert.<sup>45,46</sup> Die Arbeitsgruppe von Prof. Cario und andere zeigten, dass diese Subgruppe mit einer schlechten Prognose aufgrund einer hohen Rezidivinzidenz assoziiert ist, insbesondere in der Patientengruppe mit mittlerem Risiko.<sup>36,49,50</sup> In dieser Risikogruppe treten zahlenmäßig die meisten Rezidive auf, ohne dass die derzeit bekannten Risikomarker dies rechtzeitig prognostizieren.<sup>24</sup> Deshalb ist es besonders für diese Patientengruppe von großer Bedeutung, neue prognostisch relevante Marker für die Risikostratifizierung zu etablieren. Außerdem ermöglichen Risikomarker, welche bereits kurz nach der Diagnose zur Verfügung stehen, im Vergleich zur endgültigen MRD-Stratifizierung mittels Monitoring des Therapieansprechens bis 78 Tage nach der Diagnose eine frühzeitige Therapieadaption in der für den langfristigen Therapieerfolg wichtigen Induktions- und Konsolidierungsphase. Zur Validierung der Inzidenz und prognostischen Relevanz der *P2RY8-CRLF2*-Fusion wurde diese, sowie das *CRLF2*-Genexpressionslevel in allen Patienten der laufenden AIEOP-BFM ALL 2009 Studie über einen Zeitraum von vier Jahren prospektiv erfasst, bei denen eine entsprechende Einwilligung vorlag und Material verfügbar war.



## 6.1 Hohe *CRLF2*-Genexpression als prognostisch relevanter Marker in der T-ALL

Rund 15% der ALL im Kindesalter wird der T-lymphozytären Reihe zugeordnet.<sup>15</sup> Die T-ALL stellt eine aggressive und heterogene Erkrankung dar, für welche eine Vielzahl von genetischen Aberrationen bekannt sind wie z.B. Translokationen der T-Zellrezeptor (TCR)-Gene, Mutationen und Veränderungen der Kopienzahl von *NOTCH1*, *FBXW7* und *MYB*, aber auch Genen des JAK/STAT- und Ras/PI3K-Signalweges sowie epigenetischen Regulatoren und Transkriptionsfaktoren.<sup>21</sup> Allerdings konnten bislang aufgrund dieser Heterogenität keine prognostisch relevanten Subgruppen der T-ALL definiert werden.<sup>22</sup> Somit werden derzeit Patienten mit einem hohen Risiko hauptsächlich auf Grundlage des Therapieansprechens identifiziert. Durch die enormen Fortschritte in den letzten Jahrzehnten erreicht die Therapie der ehemals als prognostisch ungünstig geltenden T-ALL nun ähnliche Ergebnisse wie bei der pB-ALL (7-Jahres-pEFS = 76%).<sup>100</sup> Allerdings beträgt bei T-ALL Patienten mit einem schlechten Therapieansprechen (MRD-HR) die Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben innerhalb von sieben Jahren nach der Diagnose nur 50% und rund 40% entwickeln in dieser Zeit ein Rezidiv.<sup>100</sup> Aus diesem Grund ist die Identifizierung von robusten und gleichzeitig praktikablen Risikomarkern innerhalb der T-ALL von großer Bedeutung.

Erst kürzlich wurde von den italienischen Kollegen um Dr. Palmi eine hohe *CRLF2*-Genexpression in rund 15% der Patienten mit T-ALL identifiziert.<sup>37</sup> Diese Beobachtung konnte für die hier untersuchte, deutsche Patientenkohorte aus der AIEOP-BFM ALL 2009 Studie bestätigt werden. Die *P2RY8-CRLF2*-Fusion konnte hingegen in keinem der Fälle mit T-ALL identifiziert werden, was darauf schließen lässt, dass das Auftreten dieser Aberration auf die pB-ALL beschränkt zu sein scheint. Auch Palmi et al. beschrieben, dass in keinem der Fälle mit hoher *CRLF2*-Genexpression die *P2RY8-CRLF2*-Fusion oder eine *IGH/CRLF2*-Translokation detektiert werden konnte.<sup>37</sup> Der molekulare Mechanismus, welcher zu einer hohen *CRLF2*-Genexpression in der T-ALL führt, ist noch unklar und erfordert weitere Untersuchungen.

Ähnlich der pB-ALL wurde für die Verteilung der *CRLF2*-Genexpressionslevel innerhalb der T-ALL ein sigmoidaler Kurvenverlauf ermittelt, welcher eine heterogene Expression von *CRLF2* innerhalb der T-ALL verdeutlicht (siehe Abbildung 7 im Abschnitt 5.1.1).<sup>36,50</sup> Obwohl das mediane Genexpressionslevel von *CRLF2* innerhalb der T-ALL vergleichbar ist mit dem innerhalb der pB-ALL, liegt das Expressionsniveau einer hohen *CRLF2*-Genexpression in der T-ALL deutlich niedriger als bei der pB-ALL. Dies spiegelt sich auch

in der unterschiedlichen Definition des Grenzwertes wieder ( $\geq 5x$  medianer RQ-Wert vs.  $\geq 20x$  medianer RQ-Wert). Während der Grenzwert in der pB-ALL unter Einbeziehung der zugrundeliegenden genetischen Aberrationen festgesetzt wurde, konnte der Grenzwert in der T-ALL mangels dieser Aberrationen nur aufgrund des Unterschieds in der Überlebenszeitanalyse ermittelt werden.<sup>36,37</sup> Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die in der T-ALL noch unbekannt Ursache für die hohe *CRLF2*-Genexpression einen wesentlich schwächeren Einfluss auf den Grad der Genexpression ausübt im Vergleich zu den genetischen Aberrationen der pB-ALL. Deshalb sollten bei der zukünftigen Erforschung des zugrundeliegenden Mechanismus auch Faktoren der Genregulation wie Transkriptionsfaktoren sowie DNA-Methylierung und Histonmodifikationen in Betracht gezogen werden.

Trotz der im Vergleich zur pB-ALL niedrigeren *CRLF2*-Genexpression und fehlender bekannter genetischer Aberrationen scheint eine hohe *CRLF2*-Genexpression ( $\geq 5x$  medianer RQ-Wert) innerhalb der T-ALL mit einer schlechten Prognose aufgrund eines schlechten Therapieansprechens assoziiert zu sein. So zeigten 62% der Patienten mit einer hohen *CRLF2*-Genexpression sowohl ein schlechtes Ansprechen auf Prednison, als auch ein schlechtes Therapieansprechen an Therapietag 15, gemessen anhand der minimalen Resterkrankung mittels Durchflusszytometrie (FCM-MRD). Somit wurden insgesamt 81% der T-ALL Patienten mit hoher *CRLF2*-Genexpression aufgrund eines schlechten Therapieansprechens final in den HR-Therapiearm stratifiziert. Auch in der italienischen Studie wurden die meisten der T-ALL Patienten mit einer hohen *CRLF2*-Genexpression als Hochrisikopatienten identifiziert.<sup>37</sup> Außerdem zeigten Palmi et al. für diese Patienten eine signifikant niedrigere Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben in fünf Jahren nach der Diagnose im Vergleich zu den Patienten mit einer niedrigen *CRLF2*-Genexpression (41% vs. 69%,  $p = 0,006$ ) sowie eine deutlich erhöhte Rezidivwahrscheinlichkeit (53% vs. 26%,  $p = 0,007$ ).<sup>37</sup> Diese Assoziation konnte für die hier untersuchte deutsche Patientenkohorte aus der AIEOP-BFM ALL 2009 Studie ebenfalls beobachtet werden (siehe Abbildung 8 und 9 im Abschnitt 5.1.1). Aufgrund der kleinen Fallzahl in der Gruppe mit hoher *CRLF2*-Genexpression war der Unterschied jedoch nicht signifikant. Außerdem war die Zeit der Nachuntersuchung noch zu kurz, um abschließende Aussagen hinsichtlich des Therapieerfolgs zu treffen. Deshalb sollte zukünftig zur Validierung eine Langzeituntersuchung der prognostischen Bedeutung der hohen *CRLF2*-Genexpression in einer großen repräsentativen T-ALL Kohorte erfolgen. Eine hohe *CRLF2*-Genexpression

stellt einen vielversprechenden prognostischen Marker innerhalb der T-ALL dar, welcher nicht erst anhand des Ansprechens auf die Therapie, sondern bereits kurz nach der Diagnose in den HR-Therapiearm stratifiziert. Somit könnte eine frühzeitigere Intensivierung der Therapie zu einer Verbesserung der Heilungsrate dieser Patienten führen, welche bislang eine sehr schlechte Prognose und eine hohe Rezidivwahrscheinlichkeit haben.

Neben dem unterschiedlichen Therapieansprechen wurden die beiden Patientengruppen mit niedriger und hoher *CRLF2*-Genexpression im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch auf die Verteilung anderer klinischer Parameter hin untersucht. Es zeigte sich in beiden Gruppen eine für die T-ALL typische Verteilung des Alters der Kinder bei der Diagnose mit einem deutlich höheren Median von 9 Jahren im Vergleich zur pB-ALL (5 Jahre), eine starke männliche Prävalenz von 80% (vs. 54%) sowie eine höhere initiale Leukozytenzahl (Median = 76.420/ $\mu$ l vs. 8400/ $\mu$ l).<sup>22</sup> Eine Hyperleukozytose ( $\geq 100.000/\mu$ l), welche mit frühzeitigen Komplikationen wie Hyperviskosität, Leukostase und akutem Zellzerfall-Syndrom, aber auch einer langfristig schlechteren Prognose assoziiert ist,<sup>101,102</sup> wiesen 54% der Patienten mit einer hohen *CRLF2*-Genexpression auf im Vergleich zu 41% der Patienten mit niedriger *CRLF2*-Genexpression. Ein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen wurde für die Verteilung des Immunphänotyps beobachtet. So gehörte die Hälfte der Patienten mit einer hohen *CRLF2*-Genexpression zu einer frühen T-ALL mit geringem Differenzierungsgrad (4% pro-T-ALL; 46% prä-T-ALL), welche ebenfalls mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist,<sup>100</sup> während drei Viertel der Patienten mit niedriger *CRLF2*-Genexpression zur intermediären (60%) oder reifen T-ALL (13%) gehörten. Es konnten demnach neben dem schlechten Therapieansprechen noch weitere Risikofaktoren innerhalb der T-ALL mit hoher *CRLF2*-Genexpression identifiziert werden, welche die Assoziation mit einer ungünstigen Prognose bekräftigen und die Bedeutung dieses Markers für die zukünftige Stratifizierung hervorheben.

## **6.2 *P2RY8/CRLF2* und *IGH/CRLF2* sind mit einem hohen Rückfallrisiko in der pB-ALL assoziiert**

Die B-Vorläufer-ALL macht rund 85% der ALL im Kindesalter aus<sup>15</sup> und hat mit einer über 80%igen Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben innerhalb von sieben Jahren nach der Diagnose eine gute Prognose.<sup>24</sup> Neben dem Therapieansprechen erfolgt die Risikostratifizierung der pB-ALL anhand von prognostisch beschriebenen genetischen Aberrationen. Zu den prognostisch günstigen Faktoren zählen das *ETV6/RUNX1*-Fusionsgen

durch eine t(12;22) Chromosomentranslokation sowie ein hoher hyperdiploider Karyotyp ( $> 50$  Chromosomen;  $DI \geq 1,16$ ), während das *BCR/ABL1*-Fusionsgen durch eine t(9;22) Chromosomentranslokation, das *KMT2A/AFF1*-Fusionsgen durch eine t(4;11) Chromosomentranslokation sowie ein hypodiploider Karyotyp ( $< 45$  Chromosomen;  $DI < 0,8$ ) prognostisch ungünstig sind.<sup>16,17</sup> Rund ein Viertel der pB-ALL weist jedoch keine dieser genetischen Aberrationen auf und ist noch nicht hinlänglich für die Risikostratifizierung charakterisiert.<sup>20</sup> Ziel ist es daher, für diese uncharakterisierte Subgruppe der pB-ALL prognostische Marker zu identifizieren.

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde bereits eine hohe *CRLF2*-Genexpression in 5-15% der Patienten mit pB-ALL identifiziert.<sup>36,47,50,103,104</sup> Diese Beobachtung konnte für die hier untersuchte, deutsche Patientenkohorte aus der AIEOP-BFM ALL 2009 Studie mit einer Inzidenz von 10% bestätigt werden, ebenso wie die sigmoidale Verteilung der *CRLF2*-Genexpressionslevel innerhalb der pB-ALL (siehe Abbildung 10 im Abschnitt 5.1.2). Prognostisch relevante Translokationen wie *BCR/ABL1*, *KMT2A/AFF1* oder *ETV6/RUNX1* waren in den Fällen mit hoher *CRLF2*-Genexpression, mit Ausnahme eines Patienten mit *ETV6/RUNX1*-Fusion, nicht vorhanden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die hohe *CRLF2*-Genexpression eine von diesen bislang etablierten Markern unabhängige Aberration darstellt. Auf der anderen Seite wurde eine hohe *CRLF2*-Genexpression für die Mehrheit (64%) der Patienten mit Down-Syndrom detektiert. Diese auffallende Prävalenz wurde bereits von Dr. Hertzberg und Kollegen beschrieben; die Ursache jedoch ist bislang noch nicht geklärt.<sup>44</sup> Zum einen scheint der Anteil der DS-Patienten mit hoher *CRLF2*-Genexpression erhöht aufgrund des deutlich selteneren Vorkommens der bei Nicht-DS-Patienten typischen genetischen Aberrationen wie *ETV6/RUNX1*, hoher Hyperdiploidie und *BCR/ABL1*.<sup>105</sup> Zum anderen könnte die Trisomie des 21. Chromosoms während der Embryogenese einen Einfluss auf die B-Zellentwicklung haben, woraus ein erhöhtes Risiko für eine leukämische Transformation bei DS-Patienten resultiert. So ist bekannt, dass einige genetische Aberrationen, welche zu einer hohen *CRLF2*-Genexpression führen, durch eine aberrante V(D)J-Rekombination der B-Zellrezeptoren vermittelt werden.<sup>46,106</sup> Eine weitere Hypothese beruht auf einer durch die Trisomie 21 veränderten Mikroumgebung des Knochenmarks, welche einen positiven Selektionsdruck auf präleukämische Zellen mit hoher *CRLF2*-Genexpression ausüben könnte. Die genauen Zusammenhänge müssen jedoch noch abschließend erforscht werden.

Die prognostische Bedeutung der hohen *CRLF2*-Genexpression innerhalb der pB-ALL ist bislang umstritten. In Studien aus den USA und Japan wurde eine schlechte Prognose beschrieben,<sup>48,107</sup> während deutsche, österreichische, italienische und britische Studien für die hohe *CRLF2*-Genexpression per se keine schlechte Prognose zeigten, sondern nur für bestimmte zugrundeliegende genetische Aberrationen.<sup>36,50,103,108</sup> Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind am wahrscheinlichsten durch die verschiedenen Behandlungsprotokolle der Nationen zu begründen, aber auch die Ethnizität der untersuchten Patienten könnte eine Rolle spielen sowie ein ungleicher Studienaufbau. Auch für die DS-ALL ist die prognostische Bedeutung der hohen *CRLF2*-Genexpression noch nicht abschließend geklärt. Dr. Hertzberg und Kollegen zeigten eine niedrigere Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben der Patienten mit hoher *CRLF2*-Genexpression, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant.<sup>44</sup> Auch in der vorliegenden Arbeit war die Fallzahl der untersuchten DS-Patienten zu klein, um statistische Aussagen zur Prognose zu treffen. Trotzdem konnte die Tendenz einer schlechteren Prognose für DS-Patienten mit hoher *CRLF2*-Genexpression aufgrund einer höheren Rezidivinzidenz beobachtet werden (siehe Anhang 8.3). Generell haben DS-Patienten eine deutlich schlechtere Prognose, da sie ein anderes Toxizitätsprofil aufweisen und dadurch zum einen ein erhöhtes Risiko für schwere Komplikationen während der Therapie haben und zum anderen durch eine Reduktion der Therapie ein erhöhtes Rezidivrisiko entsteht. Für eine konkrete Evaluation der prognostischen Bedeutung innerhalb der DS-ALL wäre eine umfassende Untersuchung der *CRLF2*-Genexpression in einer statistisch repräsentativen DS-Patientenkohorte unter Anwendung multivarianter Analysen zur Berücksichtigung anderer klinischer Parameter erforderlich.

Eine hohe *CRLF2*-Genexpression kann durch verschiedene genetische Aberrationen verursacht werden. Zum einen führt eine interstitielle Mikrodeletion zu einer *P2RY8/CRLF2*-Fusion.<sup>44,46</sup> Für fast die Hälfte der Patienten mit pB-ALL, wurde die hohe *CRLF2*-Genexpression durch diese Deletion verursacht (detektiert mittels RT-PCR). Mit Hilfe der weniger sensitiven MLPA-Analyse wurde die *P2RY8/CRLF2*-Fusion allerdings nur in rund zwei Drittel detektiert. Dies deutet darauf hin, dass die Fusion in diesen Fällen in einem Hauptklon vorlag, welches durch die Quantifizierung der genomischen *P2RY8/CRLF2*-Fusion mittels qPCR validiert wurde. Für die Mehrheit (81%) der DS-Patienten war die hohe *CRLF2*-Genexpression mit der *P2RY8/CRLF2*-Fusion assoziiert und nur 3 DS-Patienten zeigten eine *IGH/CRLF2*-Translokation als Ursache. Insgesamt lag die Inzidenz der *P2RY8/CRLF2*-Fusion bei allen DS-Patienten bei 52% und deckt sich mit den Angaben von

Russell et al.<sup>45</sup> und Mullighan et al.<sup>46</sup> Zusätzlich wurde die *P2RY8/CRLF2*-Fusion in 1% der Patienten mit pB-ALL ohne hohe *CRLF2*-Genexpression identifiziert. Hier ist die niedrige *CRLF2*-Genexpression sehr wahrscheinlich auf eine kleine Klongröße zurückzuführen.<sup>49</sup> Alles in allem waren 6% der Fälle mit pB-ALL positiv für die *P2RY8/CRLF2*-Fusion und bestätigen die Inzidenz dieser Aberration aus anderen Studien.<sup>36,45,50,104</sup> Neben der *P2RY8/CRLF2*-Fusion führen noch andere genetische Aberrationen zu einer hohen *CRLF2*-Genexpression, deren Inzidenzen in dieser Arbeit zum ersten Mal systematisch in einer großen Patientenkohorte untersucht wurden. So wurde die *IGH/CRLF2*-Translokation im Vergleich zu früheren Berichten in einem recht großen Anteil (18%) der Fälle identifiziert.<sup>36,50</sup> Zusätzliche Kopien des *CRLF2*-Gens wurden in 20% der Fälle mit hoher *CRLF2*-Genexpression beobachtet, von denen 78% mit einem hohen hyperdiploiden Karyotyp assoziiert waren. Diese Beobachtung wurde bereits in früheren Studien beschrieben.<sup>36,48,103</sup> Für rund 10% der Fälle scheint die hohe *CRLF2*-Genexpression einem anderen, bis jetzt noch unbekanntem Mechanismus zu unterliegen und bedarf weiterer Untersuchungen, u. a. auch von epigenetischen Modifikationen.

Die aus diesen genetischen Aberrationen resultierenden Subgruppen mit hoher *CRLF2*-Genexpression wiesen unterschiedlich hohe Genexpressionslevel auf (siehe Abbildung 12 im Abschnitt 5.1.2). Die *IGH/CRLF2*-Translokation verursachte ein höheres *CRLF2*-Genexpressionniveau im Vergleich zur *P2RY8/CRLF2*-Fusion, während zusätzliche Kopien des *CRLF2*-Gens den geringsten Einfluss auf den Grad der *CRLF2*-Expression zeigten. Diese Beobachtung stimmt mit früheren Berichten überein.<sup>48,103</sup> Durch die t(X;14) oder t(Y;14) Chromosomentranslokation gerät *CRLF2* unter den Einfluss des Enhancers von *IGH*, welches als Bestandteil des prä-B-Zellrezeptors in der frühen B-Zellentwicklung exprimiert wird.<sup>45,109</sup> Bei der *P2RY8/CRLF2*-Fusion gerät *CRLF2* durch eine interstitielle Mikrodeletion innerhalb der *PAR1*-Region unter den Promoter von *P2RY8*. Dieser G-Protein-gekoppelte Rezeptor wird von vielen Geweben exprimiert, u.a. auch von Lymphozyten.<sup>110</sup> Es wurde gezeigt, dass die *P2RY8*-Genexpression in verschiedenen Leukämieformen erhöht ist.<sup>111</sup> Durch diese beiden verschiedenen genetischen Aberrationen unterliegt *CRLF2* der Genregulation stark exprimierter Gene, während zusätzliche Kopien des *CRLF2*-Gens üblicherweise nur zu einer linearen Steigerung der Genexpression führen. Bei Untersuchungen mittels MLPA wurde in 30% der Fälle mit *P2RY8/CRLF2*-Fusion eine zusätzliche Amplifikation des *CRLF2*-Gens identifiziert. Dies führte zu einer signifikant höheren *CRLF2*-Genexpression im Vergleich zu

den *P2RY8/CRLF2*-positiven Fällen ohne zusätzliche *CRLF2*-Kopie (siehe Abbildung 17 in Abschnitt 5.1.4).

Die Entstehung der *P2RY8/CRLF2*-Fusion ist ein sehr frühes Ereignis in der Leukämogenese und erfolgt wahrscheinlich schon im Mutterleib. So konnte die *P2RY8/CRLF2*-Fusion bereits zum Zeitpunkt der Geburt rückwirkend anhand von archivierten Guthrie-Karten nachgewiesen werden.<sup>49</sup> Diese Annahme wird gestützt durch die Tatsache, dass die Patienten mit *P2RY8/CRLF2*-positiver pB-ALL sehr jung (medianes Alter: 3 Jahre) erkrankten. Im Vergleich dazu waren Patienten mit *IGH/CRLF2*-Translokation deutlich älter (medianes Alter: 14 Jahre) bei der Diagnose. In einer Studie von Russell und Kollegen wurde gezeigt, dass *IGH*-Translokationen, unabhängig von den Partnergenen, vorwiegend bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen auftreten.<sup>112</sup> Die genaue Ursache für diese Altersspezifität ist jedoch noch unklar.

Neben der ungleichen Altersverteilung wurden auch Unterschiede im Therapieansprechen der verschiedenen Subgruppen mit hoher *CRLF2*-Genexpression beobachtet. Nahezu alle Patienten mit *P2RY8/CRLF2*-Fusion sprachen gut auf die Therapie an und wurden in die SR- oder MR-Risikogruppe stratifiziert, was sich mit früheren Studien deckt.<sup>34,46</sup> Ebenso zeigten Patienten mit zusätzlichen Kopien des *CRLF2*-Gens ein gutes Therapieansprechen. Im Gegensatz dazu war für die Subgruppe mit *IGH/CRLF2*-Translokation ein langsames Therapieansprechen (MRD-SER) charakteristisch, wodurch die Hälfte der Patienten dieser Subgruppe in die HR-Risikogruppe stratifiziert wurde. Auch die Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier offenbarte eine auffällig schlechte Prognose für Patienten mit *IGH/CRLF2*-Translokation (siehe Abbildung 14 in Abschnitt 5.1.3). Die Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben innerhalb von fünf Jahren nach der Diagnose betrug gerade einmal 48%. Aber auch die Subgruppe mit *P2RY8/CRLF2*-Fusion zeigte eine um 22% niedrigere Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben innerhalb von fünf Jahren nach der Diagnose im Vergleich zu Patienten mit zusätzlichen Kopien des *CRLF2*-Gens. Allerdings war die Zeit der Nachuntersuchung noch zu kurz, um abschließende Aussagen hinsichtlich des Therapieerfolgs zu treffen und bedarf einer finalen Evaluation zu einem späteren Zeitpunkt. Um festzustellen, ob die niedrige EFS-Rate der *P2RY8/CRLF2*- und der *IGH/CRLF2*-Subgruppe durch eine hohe Anzahl an Rezidiven begründet ist, wurde zusätzlich die CRI berechnet (siehe Abbildung 15 in Abschnitt 5.1.3), welche allerdings auch nur vorläufig zu betrachten ist. Verglichen mit der CRI von 17% und 12% der Patienten mit pB-ALL aus der ALL-BFM 95 und der ALL-BFM 2000 Studie ist die Rezidivrate von 44%

der Patienten mit *IGH/CRLF2*-Translokation außergewöhnlich hoch.<sup>16,24</sup> Infolgedessen wurde in der aktuellen AIEOP-BFM ALL 2017 Studie die genetische Diagnostik um das Screening nach der *IGH/CRLF2*-Translokation erweitert.<sup>25</sup> Patienten mit *P2RY8/CRLF2*-Fusion zeigten eine 18%ige Wahrscheinlichkeit innerhalb von fünf Jahren nach der Diagnose ein Rezidiv zu erleiden, während in der Subgruppe mit zusätzlichen Kopien des *CRLF2*-Gens kein einziges Rezidiv auftrat. Die schlechte Prognose der Patienten mit *P2RY8/CRLF2*-Fusion wurde bereits in der vorangegangenen Studie von Prof. Cario und Kollegen gezeigt, welche vorwiegend auf einer hohen Rezidivinzidenz beruhte.<sup>36</sup> Auffallend war, dass die Rezidive der Patienten mit *P2RY8/CRLF2*-Fusion ziemlich spät, zum Teil erst nach fünf Jahren nach der Diagnose, auftraten, was die in der vorliegenden Arbeit beobachtete verhältnismäßig niedrige Inzidenz von 18% erklärt. Deshalb ist eine erneute Auswertung der Daten hinsichtlich des Therapieerfolgs in ein paar Jahren unerlässlich. Von der Arbeitsgruppe um Prof. Stanulla wurde eine äußerst schlechte Prognose für Patienten mit einer Deletion des *IKZF1*-Gens in Kombination mit einer weiteren Deletion, u.a. der *P2RY8/CRLF2*-Fusion, gezeigt und als *IKZF1*<sup>plus</sup> definiert.<sup>113</sup> In der aktuellen AIEOP-BFM ALL 2017 Studie wurde deshalb der *IKZF1*<sup>plus</sup>-Status als neues HR-Kriterium implementiert.<sup>25</sup> In der hier untersuchten *P2RY8/CRLF2*-Kohorte wiesen allerdings nur drei der Patienten, die ein Rezidiv erlitten, gleichzeitig eine *IKZF1*-Deletion auf. Dies deutet auf eine unabhängige prognostische Bedeutung der *P2RY8/CRLF2*-Fusion hin und sollte in der aktuellen Studie weiterverfolgt werden.

Für eine weitere Charakterisierung der verschiedenen Subgruppen mit hoher *CRLF2*-Genexpression wurden Veränderungen der Kopienzahl von bestimmten Genen der B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung untersucht. In Fällen mit hoher *CRLF2*-Genexpression assoziiert mit zusätzlichen Kopien des *CRLF2*-Gens wurden zusätzliche Deletionen selten detektiert, während zusätzliche Amplifikationen häufiger auftraten (siehe Abbildung 16 in Abschnitt 5.1.4). Diese Beobachtung deckt sich mit der bereits oben erwähnten Assoziation dieser Fälle mit einem hohen hyperdiploiden Karyotyp, welcher grundsätzlich mit einer guten Prognose assoziiert ist.<sup>16,19</sup> Im Gegensatz dazu wurde eine enorme Häufigkeit von zusätzlichen Deletionen, u.a. von *IKZF1*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *PAX5* und *BTG1*, in Fällen mit *P2RY8/CRLF2*-Fusion (70%) oder *IGH/CRLF2*-Translokation (94%) beobachtet. Allerdings konnten keine wiederkehrenden Muster innerhalb der Deletionen identifiziert werden. Es scheint aber, dass beide Subgruppen suszeptibel für zusätzliche genomische Veränderungen sind, was auf eine chromosomale Instabilität hindeuten könnte. Außerdem



wurden aktivierende *CRLF2*- und *JAK2*-Mutationen, welche assoziiert sind mit hoher *CRLF2*-Genexpression,<sup>44</sup> vorherrschend in diesen beiden Subgruppen mittels HRM-Analyse detektiert.

Strukturelle Chromosomenaberrationen wie Translokationen, Deletionen, Duplikationen und Inversionen entstehen in der Regel durch DNA-Doppelstrangbrüche an zwei verschiedenen Regionen des Genoms und das aberrante Zusammenfügen der resultierenden DNA-Enden zu einer neuen Anordnung. In malignen Erkrankungen des blutbildenden Systems wurden vier Hauptmechanismen für DNA-Doppelstrangbrüche identifiziert: (1) V(D)J-Brüche an konservierten Rekombinationssignalsequenzen; (2) CSR-Brüche (*class switch recombination*) an der *Switch*-Region von Immunglobulinen; (3) CpG-Brüche an methylierten CpG-Sequenzen; (4) Sequenz-unabhängige, zufällige Brüche aufgrund von z.B. ROS (*reactive oxygen species*) oder ionisierender Strahlung.<sup>114</sup> Während bei der *P2RY8/CRLF2*-Fusion V(D)J-Brüche beteiligt sind, wurden bei der *IGH/CRLF2*-Translokation CpG-Brüche bei *CRLF2* und V(D)J-Brüche bei *IGH* identifiziert.<sup>46,106</sup> Somit ist in beiden Fällen eine aberrante Aktivität des Rekombination-aktivierenden-Gen (RAG)-Komplexes an der Erzeugung von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt.<sup>114</sup> Ebenso wird vermutet, dass Deletionen von *IKZF1*, *CDKN2A*, *CDKN2B* und *BTG1* durch eine aberrante RAG-Rekombination vermittelt werden.<sup>115-117</sup> Darüber hinaus demonstrierte die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Müschen einen Mechanismus klonaler Entwicklung leukämischer Zellen durch eine RAG-induzierte Anfälligkeit für genetische Aberration.<sup>118</sup> Daher lässt sich schlussfolgern, dass eine aberrante RAG-Aktivität der verantwortliche Mechanismus für die gehäuften Aberrationen in der *P2RY8/CRLF2*- und *IGH/CRLF2*-Subgruppe sein könnte. Diese Hypothese muss allerdings in Zukunft noch genauer erforscht werden.

Zusammengefasst ist die hohe *CRLF2*-Genexpression an sich nicht mit einer schlechten Prognose in der pB-ALL assoziiert. Allerdings könnte die erhöhte Anfälligkeit für akkumulierende Aberrationen von Genen der B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung im Kontext mit einer verstärkten Proliferation, verursacht durch die hohe *CRLF2*-Genexpression, zu dem beobachteten hohen Rezidivrisiko in der *P2RY8/CRLF2*- und *IGH/CRLF2*-positiven pB-ALL beitragen. Ungeachtet dessen stellen die *P2RY8/CRLF2*-Fusion und die *IGH/CRLF2*-Translokation vielversprechende prognostische Marker dar, welche eine Stratifizierung, im Vergleich zum Therapieansprechen, bereits kurz nach der

Diagnose ermöglicht. Somit könnte eine frühzeitigere Intensivierung der Therapie zu einer Verbesserung der Heilungsrate dieser Patienten führen.

### 6.3 RT-PCR als effiziente und gleichzeitig sensitive Methode zur Detektion der *P2RY8/CRLF2*-Fusion

Bevor ein neuer prognostischer Marker in die Risikostratifizierung implementiert wird, sollte zunächst evaluiert werden, welche Methode zur Detektion angewandt werden kann, um sowohl die Aberration effizient zu identifizieren als auch robuste, reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Die *IGH/CRLF2*-Translokation wird klassischerweise mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) diagnostiziert. Eine einfache Detektion der *IGH/CRLF2*-Fusion mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist schwierig, da der *CRLF2*-Bruchpunkt dieser Translokation über einen weiten Bereich (>24 kb) verteilt liegen kann.<sup>106</sup> Im Gegensatz dazu gibt es verschiedene Methoden, um die *P2RY8/CRLF2*-Fusion zu detektieren, welche sich in der Sensitivität, der Durchführung und dem erforderlichen Patientenmaterial unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit wurden drei Methoden zur Detektion der *P2RY8/CRLF2*-Fusion getestet und miteinander verglichen: Multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation (MLPA), genomische PCR und Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR). Während bei der MLPA basierend auf genomischer DNA die *P2RY8/CRLF2*-Fusion über die Deletion von *CSFRA* und *IL3RA* identifiziert wird, wird bei der genomischen PCR direkt das *P2RY8/CRLF2*-Fusionsgen auf DNA-Ebene und bei der RT-PCR auf RNA-Ebene nachgewiesen.

Die MLPA-Analyse ist eine Variante der Multiplex-PCR zur Detektion von Veränderungen der Kopienzahl bestimmter Gene.<sup>86</sup> Verglichen mit der RT-PCR zeigte die MLPA eine Sensitivität von nur 56% (siehe Abbildung 18 im Abschnitt 5.2). In 52 Proben, welche mittels RT-PCR positiv waren für die *P2RY8/CRLF2*-Fusion, konnte MLPA diese nicht detektieren: Die Fusion konnte in keinem der 8 Fälle mit einer niedrigen *CRLF2*-Genexpression detektiert werden und für die Fälle mit einer hohen *CRLF2*-Genexpression identifizierte MLPA diese nur in 29 von 44 (66%) der mittels RT-PCR positiven Fälle. Es wurde gezeigt, dass das Genexpressionslevel von *CRLF2* stark mit der entsprechenden Fusion-positiven Klonegröße korreliert ist.<sup>49</sup> Außerdem wurde für die MLPA-Analyse ein Detektionslimit von 20% (Populationsgröße detektiert mittels FISH) beschrieben.<sup>119</sup> MLPA ist folglich nicht geeignet, um die *P2RY8/CRLF2*-Fusion auch in kleineren Subklonen nachzuweisen. Auf der anderen Seite bietet die MLPA-Analyse die Möglichkeit gleichzeitig weitere Informationen zu

Veränderungen der Kopienzahl anderer prognostisch relevanter Gene wie z.B. eine Deletion von *IKZF1* zu detektieren.

Der Nachweis der *P2RY8/CRLF2*-Fusion mittels genomischer PCR zeigte die gleiche Sensitivität verglichen mit der RT-PCR (siehe Abbildung 19 im Abschnitt 5.3). Allerdings ist die PCR basierend auf der genomischen DNA Bruchpunktregion-spezifisch, sodass drei verschiedene Primerkombinationen angewandt werden müssen, um die verschiedenen Bruchpunkte von beiden Fusionspartnern abzudecken.<sup>49</sup> Die nach der Transkription resultierenden Fusionstranskripte, in welchen immer das erste nichtkodierende Exon von *P2RY8* mit dem ersten Exon von *CRLF2* fusioniert ist, können dagegen mittels RT-PCR in nur einer einzigen Reaktion amplifiziert werden.<sup>44</sup> Der Vorteil der genomischen PCR liegt aber in der Möglichkeit die genomische *P2RY8/CRLF2*-Fusion mit einem Detektionslimit von  $1 \times 10^{-5}$  zu quantifizieren, um die entsprechende Klongröße zu bestimmen.<sup>49</sup>

Neben diesen drei Methoden lässt sich die *P2RY8/CRLF2*-Fusion ebenfalls klassisch mittels FISH nachweisen mit einem Detektionslimit von 5 - 10%.<sup>49</sup> Im Gegensatz zu einer einfachen PCR basierend auf DNA oder RNA ist die FISH-Diagnostik aufwendiger und abhängig von der Verfügbarkeit von Zellen. Eine methodische Weiterentwicklung der klassischen Zytogenetik stellt die Array-basierte vergleichende genomische Hybridisierung (Array-CGH) dar, mit deren Hilfe, ähnlich der MLPA-Analyse, Kopienzahlveränderungen der DNA detektiert werden können.<sup>120</sup> Während MLPA eine kostengünstige, schnelle und einfache Hochdurchsatzmethode zur Untersuchung bestimmter Gene darstellt, bietet die kostenintensivere und aufwändigere Array-CGH die Möglichkeit das gesamte Genom abzudecken.<sup>121</sup> Darüber hinaus ist die Array-CGH in der Lage, Hinweise auf eine *IGH/CRLF2*-Translokation zu liefern. Eine Zusammenfassung der verschiedenen Methoden ist in der Tabelle 18 veranschaulicht.

Schlussendlich ist die Wahl der Methode abhängig von dem Kontext, in welchem die *P2RY8/CRLF2*-Fusion untersucht werden soll. So stellt die RT-PCR eine kostengünstige, effiziente und gleichzeitig sensitive Methode zur Detektion der *P2RY8/CRLF2*-Fusion dar, während die Array-CGH ein zukunftsweisender Ansatz zur Identifizierung mehrerer genetischer Marker in einer immer individualisierteren Risikoabschätzung ist. Aus diesem Grund erfolgt in der aktuellen AIEOP-BFM ALL 2017 Studie die Detektion der *P2RY8/CRLF2*-Fusion im Rahmen der *IKZF1*<sup>plus</sup>-Diagnostik mittels Array-CGH.<sup>25</sup>

**Tabelle 18: Zusammenfassung der Methoden zur Detektion der *P2RY8/CRLF2*-Fusion.**

	FISH	Array-CGH	MLPA	gPCR	RT-PCR
<b>Material</b>	Zellen	DNA	DNA	DNA	RNA
<b>Verbrauch</b>	1x10 <sup>5</sup>	500 ng	100 ng	3 x 100 ng (Bruchpunkt- abhängig)	5 ng (Bruchpunkt- unabhängig)
<b>Detektionslimit</b>	5 - 10%	20% <sup>122</sup>	20%	< 5%	< 5%
<b>Verfügbarkeit</b>	z.T. schlecht	gut	gut	gut	gut

Abkürzungen: FISH, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung; Array-CGH, Array-basierte vergleichende genomische Hybridisierung (*Array-based comparative genomic hybridization*); MLPA, multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation (*multiplex ligation-dependent probe amplification*); gPCR, genomische Polymerasekettenreaktion (*genomic polymerase chain reaction*); RT-PCR, Reverse Transkriptase-PCR; z.T., zum Teil.

Neben den in der obigen Tabelle aufgeführten etablierten Methoden zur Detektion der *P2RY8/CRLF2*-Fusion sollen die Möglichkeiten des *next-generation-sequencing* (NGS) nicht unerwähnt bleiben. Die Sequenzierung des gesamten Transkriptoms mittels RNA-Seq stellt eine weitere Option zur Identifizierung von Fusionsgenen dar.<sup>123</sup> Die Höhe des Transkriptlevels ist allerdings ein limitierender Faktor dieser Methode, weshalb sie ungeeignet für die valide Detektion der *P2RY8/CRLF2*-Fusion ist, welche häufig nur in einem kleinen Subklon vorhanden ist.<sup>49</sup> Im Vergleich dazu bietet die gezielte Sequenzierung mittels RNA CaptureSeq eine sensitive, schnelle und einfache Alternative.<sup>124</sup> Die italienischen Kollegen um Dr. Cazzaniga veröffentlichten vor Kurzem ein für die Diagnostik der pB-ALL optimiertes Protokoll zur Identifizierung von Fusionsgenen unter Anwendung der RNA CaptureSeq.<sup>125</sup> Mithilfe der von ihnen beschriebenen Vorgehensweise demonstrierten sie eine vom Expressionlevel unabhängige Detektion der in der pB-ALL bekannten Fusionsgene, u.a. auch der *P2RY8/CRLF2*-Fusion, und identifizierten darüber hinaus noch weitere neue Fusionsgene. In Zukunft könnte dieser NSG-basierte Ansatz nach weiterer Evaluation Anwendung in der Routinediagnostik der pB-ALL finden.

#### **6.4 *P2RY8/CRLF2*-positive ALL ist durch ein distinktes Genexpressionsprofil gekennzeichnet**

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von potentiellen Faktoren, welche zu der hohen Rezidivinzidenz der *P2RY8/CRLF2*-positiven Patienten beitragen. Basierend auf der Beobachtung, dass die Fusion im Rezidiv häufig nicht mehr vorhanden ist, wird vermutet, dass ein *P2RY8/CRLF2*-positiver Klon nicht den selektiven Vorteil besitzt, um ein Rezidiv zu

entwickeln.<sup>49</sup> Die *P2RY8/CRLF2*-Aberration scheint nur ein Surrogatmarker für eine schlechte Prognose ohne ursächliche Relevanz zu sein. Eine mögliche Ursache für die schlechte Prognose dieser Patientengruppe wurde bereits im Abschnitt 6.2 diskutiert. Eine erhöhte Anfälligkeit für akkumulierende Aberrationen von Genen der B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung im Kontext mit einer verstärkten Proliferation, verursacht durch die hohe *CRLF2*-Genexpression, spielt womöglich eine wesentliche Rolle dabei. Es wurde ein spezifisches Genexpressionsprofil der *P2RY8/CRLF2*-Subgruppe mittels einer vergleichenden NGS-basierten Transkriptom-Analyse mit *CRLF2*-hochexprimierenden Fällen mit und ohne *P2RY8/CRLF2*-Fusion erstellt. Hierzu wurde ein zum Zeitpunkt der Durchführung innovativer und kostengünstiger Ansatz unter Verwendung von gepoolter RNA der zwei Gruppen für die NGS-Analysen verfolgt. Zur Validierung der Ergebnisse wurden exemplarisch 11 Kandidatengene mittels qPCR auf individueller Patientenebene untersucht (siehe Abbildung 20 im Abschnitt 5.3.2). Für neun der elf Kandidatengene konnten die Resultate der gepoolten NGS-basierten Transkriptom-Analyse mit entsprechender Signifikanz bestätigt werden. Bei zwei Kandidatengenen wurde zwar dieselbe Tendenz beobachtet, allerdings ohne Erreichen der Signifikanzgrenze. Mit Hilfe einer Heatmap zur Visualisierung der einzelnen Genexpressionswerte der Patienten lassen sich die *P2RY8/CRLF2*-positive Subgruppe und die *P2RY8/CRLF2*-negative Kontrollgruppe anhand des Genexpressionsprofil der neun differentiell exprimierten Kandidatengene deutlich voneinander unterscheiden (siehe Abbildung 21 im Abschnitt 5.3.2). Somit stellt die vergleichende NGS-basierte Transkriptom-Analyse mit gepoolten Proben eine geeignete und kostensparende Methode zur Identifizierung von gruppenspezifischen Genexpressionsmustern dar, welche bereits früher in verschiedenen anderen Forschungsbereichen Anwendung fand.<sup>126-130</sup> Auf der anderen Seite erfordert dieser gepoolte Ansatz eine gewissenhafte Planung der Kohortenzusammensetzung, da rückwirkend keine Proben wieder ausgeschlossen werden können. So enthielt der Kontrollpool ohne *P2RY8/CRLF2*-Fusion dieser Transkriptomanalyse auch Fälle mit *IGH/CRLF2*-Translokation, für welche im Nachhinein ebenfalls eine schlechte Prognose identifiziert wurde. Da diese vier Patientenproben aber nur einen geringen Anteil des Kontrollpools ausmachten und die Ergebnisse der Validierungskohorte ohne *IGH/CRLF2*-Fälle mit denen der Transkriptomanalyse übereinstimmten, wurde diese Unstimmigkeit für die Analyse der gewonnenen Transkriptom-Daten weitgehend vernachlässigt.

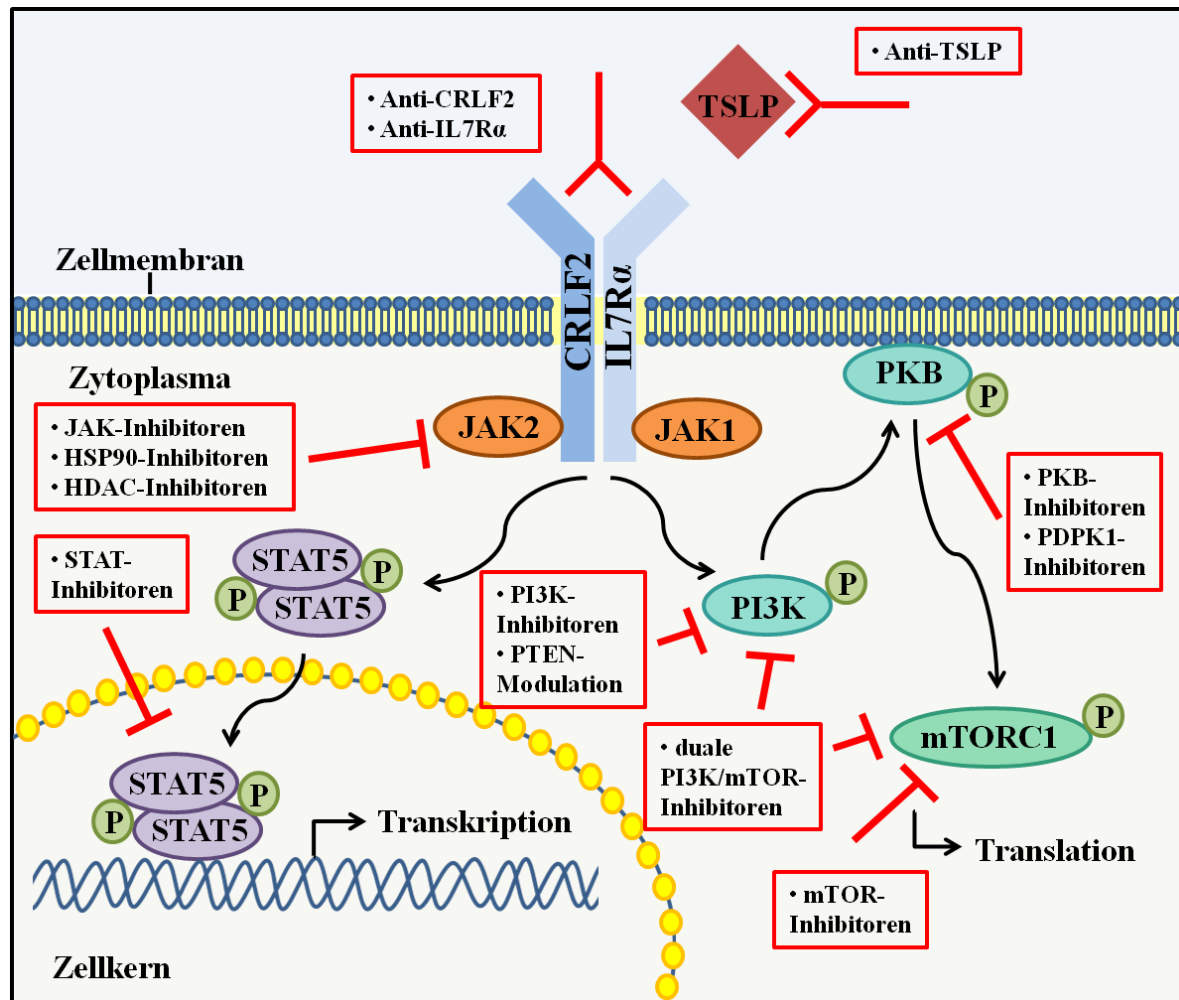
Insgesamt wurden auf diese Weise 553 differentiell exprimierte Transkripte in den Lymphoblasten der beiden *CRLF2*-hochexprimierenden Gruppen identifiziert. Die Interpretation der Genexpressionsdaten erfolgte mit Hilfe verschiedener Analyse-Softwares, um Assoziationen zwischen Transkriptionsprofil und beobachtetem Phänotyp zu eruieren (siehe Abschnitt 5.3.3). Für die *P2RY8/CRLF2*-positive ALL wurde ein distinktes Genexpressionsprofil identifiziert, welches charakterisiert ist durch eine niedrigere Expression von Genen des TGF $\beta$ -Signalweges und der Immunantwort in der Rezidiv-anfälligen Subgruppe mit *P2RY8/CRLF2*-Fusion im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Fusion. TGF $\beta$  ist ein bedeutendes regulatorisches Zytokin mit vielfältigen Effekten auf hämatopoetische Zellen.<sup>131</sup> Nach allgemeiner Auffassung ist TGF $\beta$  der wirksamste Inhibitor der Zellzyklusprogression in hämatopoetischen Vorläuferzellen.<sup>132</sup> Folglich könnte eine verminderte Aktivität des TGF $\beta$ -Signalweges zur erhöhten Proliferation der Lymphoblasten mit *P2RY8/CRLF2*-Fusion beitragen. Diese Vermutung deckt sich mit der höheren Expression an der DNA-Replikation beteiligter Gene in der *P2RY8/CRLF2*-Subgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Außerdem zeigte die Gruppe mit *P2RY8/CRLF2*-Aberration eine höhere Expression von Genen, welche an Mechanismen der DNA-Reparatur und homologen Rekombination beteiligt sind. Dies könnte auf einen erhöhten Reparaturbedarf von DNA-Schädigungen aufgrund einer chromosomalen Instabilität hindeuten und deckt sich mit der in Abschnitt 6.2 diskutierten Hypothese. Darüber hinaus wurden auch Gene des prä-B-Zellrezeptor-Signalweges wie *VPREB1*, *CD79B*, *BLNK* und sogar *RAG1* in der *P2RY8/CRLF2*-Subgruppe höher exprimiert, was eine verstärkte RAG-Aktivierung nahelegt.<sup>133</sup> Somit konnte mit Hilfe der Transkriptom-Analyse die Hypothese, dass eine aberrante RAG-Rekombination der verantwortliche Mechanismus für die gehäuften Aberrationen in der *P2RY8/CRLF2*-Subgruppe sein könnte und mit der Entstehung der hohen Rezidivanfälligkeit assoziiert ist, weiter bestärkt werden.

Um potentielle Wirkstoffe zu identifizieren, welche dem Rezidiv-assoziierten Genexpressionsprofil der *P2RY8/CRLF2*-Subgruppe entgegenwirken, wurde die CMAP-Datenbank genutzt. Es wurden drei vielversprechende Kandidatenwirkstoffe identifiziert, welche potentiell in der Lage wären, das Genexpressionsprofil der *P2RY8/CRLF2*-positiven ALL zu invertieren. Sowohl Podophyllotoxin als auch Vinblastin und Anisomycin sind gekennzeichnet durch eine antiproliferative Wirkung.<sup>134,135</sup> Vor allem Vinblastin ist ein in der Krebstherapie bekanntes Zytostatika, welches u.a. beim Hodgkin-Lymphom und Non-Hodgkin-Lymphom sowie Kaposi-Sarkom oder Mammakarzinom Anwendung findet.<sup>136-139</sup>

Verwandte Vincaalkaloiden wie Vincristin und Vindesin sind bereits feste Bestandteile der AIEOP-BFM ALL Behandlungsprotokolle.

## 6.5 Gezielte Therapieansätze der *CRLF2*-deregulierten ALL

Neben den anhand des Genexpressionsprofils identifizierten Wirkstoffen bieten gezielt wirkende Therapieansätze die Möglichkeit, in die durch die hohe *CRLF2*-Genexpression deregulierten Signalwege der Leukämiezelle einzugreifen (siehe Abbildung 28).



**Abbildung 28: Schematische Darstellung der TSLP-Signalwege und gezielte therapeutische Ansatzmöglichkeiten (rot).** Abkürzungen: TSLP, *thymic stromal lymphopoietin*; CRLF2, *cytokine receptor-like factor 2*; IL7Ra, *Interleukin-7-Rezeptor α*; JAK, *Januskinasen*; STAT, *Signaltransduktor und Aktivator der Transkription*; PI3K, *Phosphoinositid-3-Kinasen*; PKB, *Proteinkinase B*; mTORC1, *mechanistic target of rapamycin complex 1*; P, *Phosphatgruppe*; HSP90, *heat shock protein 90*; HDAC, *Histon-Deacetylasen*; PTEN, *phosphatase and tensin homolog*; PDPK1, *3-phosphoinositide dependent protein kinase 1*.

Dementsprechend könnten theoretisch Antikörper gegen den Liganden TSLP diesen binden

und dadurch eine Rezeptorbindung und die daraus resultierende Aktivierung des Signalweges blockieren. Ebenso würden Antikörper gegen CRLF2 oder IL7R $\alpha$  eine Rezeptorbindung und -aktivierung verhindern. Da eine hohe CRLF2-Genexpression häufig aber mit zusätzlichen aktivierenden Mutationen des CRLF2- oder JAK2-Gens assoziiert ist, welche zu einer Aktivierung der Signalwege unabhängig von der Liganden-Rezeptorbindung führen,<sup>44</sup> sind diese Ansatzmöglichkeiten allein wahrscheinlich unzureichend.

Von größerer Bedeutung sind in diesem Fall die Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs), welche gezielt deregulierte Tyrosinkinasen hemmen. Ruxolitinib ist ein dualer JAK1/JAK2-Inhibitor und wird bereits bei der Myelofibrose angewandt.<sup>140</sup> Auch bei refraktärer oder rezidivierender akuter myeloischer Leukämie (AML) und ALL wurde Ruxolitinib in Phase I/II-Studien erfolgreich getestet.<sup>141,142</sup> Ebenso ist Momelotinib ein JAK1/JAK2-Inhibitor, welcher in klinischen Studien myeloproliferativer Neoplasien (MPN) und des Pankreaskarzinom getestet wird.<sup>143,144</sup> In einer präklinischen Studie wurde für beide JAK-Inhibitoren eine zytotoxische Wirkung auf pB-ALL-Zellen mit JAK-Aberration gezeigt.<sup>145</sup> Beides sind Typ I-Inhibitoren und binden kompetitiv an die aktive Konformation der Kinasedomäne. Allerdings wurde ein Rebound-Effekt beobachtet, bei dem es nach dem Ablösen des Inhibitors zu einer starken Reaktivierung des JAK/STAT-Signalweges kam. Deshalb wurde ein Typ II-Inhibitor CHZ868 entwickelt, welcher JAK2 in der inaktiven Konformation stabilisiert.<sup>146</sup> In *in vitro* und *in vivo* Experimenten wurde eine wirksame Unterdrückung des Wachstums von pB-ALL-Zellen mit CRLF2-Aberration gezeigt, sowie die Unterbrechung des JAK/STAT-Signalweges und ein verbessertes Überleben im Xenograft-Mausmodell. Diese Effekte wurden durch die Kombination mit Dexamethason, einem Kortikosteroid, noch verstärkt. Klinische Studien zur Überprüfung dieses vielversprechenden JAK-Inhibitors müssen noch folgen.

Alternativ könnte die JAK-Aktivität indirekt durch HSP90-Inhibitoren unterdrückt werden. Das *heat shock protein 90* (HSP90) ist ein molekulares Chaperon, welches für die Faltung, Aktivierung und Stabilisierung einer Vielzahl von Substratproteinen, u.a. den JAKs benötigt wird.<sup>147</sup> So wurde experimentell eine Degradation der JAKs durch das Proteasom unter HSP90-Inhibition beobachtet. Es befinden sich mehrere HSP90-Inhibitoren in klinischen Studien verschiedener maligner Erkrankungen.<sup>148</sup> Für die pB-ALL mit CRLF2-Aberration wurde in präklinischen Studien eine vielfach höhere Wirksamkeit im Vergleich zu JAK-Inhibitoren gezeigt.<sup>149</sup> Auf der anderen Seite wirken HSP90-Inhibitoren weniger selektiv aufgrund des großen Substratspektrums von HSP90. Desweiteren induzieren auch Histon-



Deacetylasen (HDACs)-Inhibitoren eine proteasomale Degradation der JAKs durch die Hyperacetylierung von HSP90 und der damit verbundenen Inhibierung seiner Funktion als Chaperon.<sup>150</sup> In *in vitro* Experimenten wurde gezeigt, dass der HDAC-Inhibitor Givinostat die Proliferation von pB-ALL-Zelllinien mit *CRLF2*-Aberration inhibiert und deren Apoptose induziert.<sup>151</sup> Klinische Studien sind notwendig, um diese therapeutischen Ansätze zur gezielten Intervention der JAK-vermittelten Signalwege in der pB-ALL zu untersuchen, insbesondere bei Resistenz gegenüber JAK-Inhibitoren. Eine weitere Möglichkeit zur Unterbrechung des JAK/STAT-Signalweges stellen STAT-Inhibitoren dar. Da Transkriptionsfaktoren keine enzymatische Aktivität besitzen, ist die Entwicklung direkter Inhibitoren schwierig. Es wird an der Entwicklung von Peptidmimetika, niedermolekularen Inhibitoren und Oligonukleotiden gearbeitet.<sup>152</sup> Allerdings sind zurzeit kaum Wirkstoffkandidaten für klinische Studien vorgesehen und die Erforschung dieses therapeutischen Ansatzes bedarf noch einiger Zeit.

Um gezielt in den PI3K/mTOR-Signalweg einzugreifen, gibt es aufgrund der Komplexität dieses Signalweges eine Vielzahl von Möglichkeiten. Als Inhibitoren der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) sind derzeit Copanlisib beim folliculären Lymphom sowie Duvelisib und Idelalisib beim folliculären Lymphom und chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) zugelassen.<sup>153-155</sup> Eine Vielzahl weiterer Inhibitoren wird in klinischen Studien getestet. Auch für die ALL befinden sich mehrere PI3K-Inhibitoren in präklinischen Studien und zwei, Buparlisib und Dactolisib, in klinischen Studien.<sup>156</sup> Das wohl größte Problem der aktuell zugelassenen PI3K-Inhibitoren sind die z.T. schweren Nebenwirkungen. Die Phosphatase *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) ist ein Tumorsuppressor und Antagonist der PI3K.<sup>157</sup> Eine Erhöhung der PTEN-Aktivität durch z.B. direkte Gabe von zellgängiger PTEN, Inhibition der MikroRNA (miRNA) von PTEN oder Gentherapie sind zukunftsweisende therapeutische Ansätze und stellen Alternativen zu PI3K-Inhibitoren dar.<sup>158</sup> Die Proteinkinasen B (PKB) spielen eine zentrale Rolle in diesem Signalweg und können direkt, oder indirekt durch Inhibitoren der *3-phosphoinositide dependent protein kinase 1* (PDPK1) inhibiert werden. PDPK1 spielt eine entscheidende Rolle im PI3K/mTOR-Signalweg durch die Aktivierung von PKB.<sup>159</sup> Die Inhibition von PDPK1 im Vergleich zu PI3K oder PKB hat den Vorteil, dass nur eine einzige Isoform existiert. Auf der anderen Seite ist PDPK1 in der Lage einer Vielzahl weiterer AGC-Proteinkinasen zu phosphorylieren und aktivieren, sodass die Inhibition zu einer Reihe von Nebeneffekten führen könnte.<sup>160</sup> Mehrere Pharmakonzerne arbeiten an der Entwicklung von PDPK1-Inhibitoren mit dem Ziel einer möglichst selektiven

Inhibition.<sup>161</sup> Aufgrund der zentralen Rolle der PKB und der Beeinflussung von vielfältigen Prozessen, welche zur Tumorgenese beitragen, stellen PKB-Inhibitoren in vielen malignen Erkrankungen eine attraktive Behandlungsstrategie dar. Es wurden bereits verschiedenste PKB-Inhibitoren wie ATP-kompetitive, allosterische oder irreversible Inhibitoren entwickelt, welche sich zurzeit in klinischen Studien befinden; allerdings noch keine zur Behandlung der ALL.<sup>162</sup> Die Inhibition des *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) ist limitiert aufgrund von Rückkopplungsschleifen im Signalweg und der Bedeutung von mTOR in der normalen Physiologie.<sup>163</sup> Außerdem inhibiert der klassische mTOR-Inhibitor Rapamycin nur einige Effekte von mTOR.<sup>164</sup> mTOR-Inhibitoren der zweiten Generation hingegen binden an der ATP-Bindestelle der Kinasedomäne und blockieren somit den mTOR-Komplex 1 und 2 (mTORC1/2).<sup>165</sup> Aufgrund von strukturellen Übereinstimmungen konservierter Bereiche wurden duale PI3K/mTOR-Inhibitoren entwickelt.<sup>163</sup> Diese dualen Inhibitoren wirken der durch Rückkopplung verursachten Hochregulation von PI3K nach selektiver mTORC1-Inhibition entgegen und zeigten eine vielversprechende antileukämische Wirkung in präklinischen Studien der pB-ALL.<sup>166</sup>

Der Fortschritt in der Entwicklung gezielter Wirkstoffe ermöglicht vielfältige Therapieansätze für die *CRLF2*-deregulierte ALL. Viele dieser Therapeutika befinden sich allerdings noch in präklinischen oder klinischen Studien, sodass die Überprüfung dieser Behandlungsstrategien erst in ferner Zukunft abgeschlossen sein wird. Da eine hohe *CRLF2*-Genexpression sowohl den JAK/STAT-Signalweg als auch den PI3K/mTOR-Signalweg aktiviert, scheint eine kombinatorische Inhibition beider Signalwege am effektivsten zu sein.<sup>167</sup> Außerdem ist zu bedenken, dass gezielt wirkende Inhibitoren, wie z.B. Imatinib zur Behandlung von *BCR/ABL1*-positiver ALL, erst in Kombination mit konventioneller Chemotherapie zu einer drastischen Verbesserung der Heilungsrate geführt haben.<sup>168</sup> Daraus ergeben sich unzählige Kombinationsmöglichkeiten, wann, welche und in welcher Dosis gezielt wirkende Therapeutika die Behandlung der *CRLF2*-deregulierten ALL zu optimieren vermögen. Auch die Entwicklung von Resistenzen gegenüber bestimmten Wirkstoffen, das Auftreten von schwerwiegenden Nebenwirkungen sowie der Einfluss der Mikroumgebung des Knochenmarks auf die Leukämiezellen stellen für den erwünschten Therapieerfolg eine große Herausforderung dar. Nichtsdestotrotz geben der bislang erzielte Forschungsstand und die fortschreitenden diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten Hoffnung, dass in Zukunft nahezu alle Patienten mit ALL erfolgreich therapiert werden können.

## 6.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl die prognostische Relevanz der hohen *CRLF2*-Genexpression innerhalb der T-ALL, als auch der *P2RY8/CRLF2*-Fusion innerhalb der pB-ALL bestätigt werden. Außerdem wurde eine unerwartet hohe Inzidenz der *IGH/CRLF2*-Translokation innerhalb der pB-ALL verbunden mit einer sehr schlechten Prognose aufgedeckt, infolgedessen die genetische Diagnostik in der aktuellen AIEOP-BFM ALL 2017 Studie um das Screening nach der *IGH/CRLF2*-Translokation erweitert wurde.<sup>25</sup> Allerdings war im Rahmen dieser Arbeit die Zeit der Nachuntersuchung noch zu kurz, um abschließende Aussagen hinsichtlich des Therapieerfolgs treffen zu können und bedarf in Zukunft einer finalen Evaluation.

Mit einer Inzidenz von rund 15% stellt die hohe *CRLF2*-Genexpression einen vielversprechenden Marker innerhalb der eher heterogenen T-ALL dar, für die bislang keine prognostisch relevanten Subgruppen definiert werden konnten. Eine Langzeituntersuchung zur Validierung der prognostischen Bedeutung der hohen *CRLF2*-Genexpression in einer großen repräsentativen T-ALL Kohorte sowie die Untersuchung des bislang noch unklaren molekularen Mechanismus, welcher zu einer hohen *CRLF2*-Genexpression in der T-ALL führt, stellen zukünftige Aufgaben dar.

Auch innerhalb der pB-ALL scheint für rund 10% der Fälle mit hoher *CRLF2*-Genexpression der zugrundeliegende Mechanismus noch unbekannt zu sein und bedarf weiterer Studien. Desweiteren deuten die Ergebnisse dieser Arbeit daraufhin, dass sowohl für die *P2RY8/CRLF2*- als auch für die *IGH/CRLF2*-Subgruppe eine aberrante RAG-Aktivität der verantwortliche Mechanismus für akkumulierende Aberrationen von Genen der B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung sein könnte. Im Kontext mit einer verstärkten Proliferation, verursacht durch die hohe *CRLF2*-Genexpression, scheint diese zu dem beobachteten hohen Rezidivrisiko in den beiden Subgruppen der pB-ALL beizutragen. Diese Hypothese muss in Zukunft noch genauer überprüft werden. Ungeachtet dessen stellen die *P2RY8/CRLF2*-Fusion und die *IGH/CRLF2*-Translokation vielversprechende prognostische Marker dar, welche eine Stratifizierung, im Vergleich zum Therapieansprechen, bereits kurz nach der Diagnose ermöglicht. Somit könnte in Zukunft eine frühzeitigere Intensivierung der Therapie zu einer Verbesserung der Heilungsrate dieser Patienten führen. Aber auch der Einsatz gezielt wirkender Therapeutika, welche in die durch die hohe *CRLF2*-Genexpression deregulierten Signalwege der Leukämiezelle eingreifen, bieten für die Zukunft neue

Möglichkeiten die Heilungschancen dieser Patienten zu verbessern. So ist in der aktuellen AIEOP-BFM ALL 2017 Studie eine experimentelle Behandlung mit gezielt wirkenden TKIs für Patienten mit entsprechender Aberration möglich, wenn diese eine Resistenz gegenüber der Protokolltherapie (molekulare *Non-Response*) aufweisen.<sup>25</sup> Zugleich wurde in die erst kürzlich gestartete amerikanische Studie „*Total Therapy XVII for Newly Diagnosed Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia and Lymphoma*“ (NCT03117751) die Behandlung von *P2RY8/CRLF2*- oder *IGH/CRLF2*-positiven Patienten mit Ruxolitinib integriert.<sup>169</sup> Die Resultate dieser Studien bleiben abzuwarten.

Für die Implementierung neuer prognostischer Marker in die Risikostratifizierung bzw. das Behandlungsprotokoll spielt die Wahl der diagnostischen Methode eine wesentliche Rolle. Während die *IGH/CRLF2*-Translokation klassischerweise mittels FISH diagnostiziert wird, gibt es für die Detektion der *P2RY8/CRLF2*-Fusion verschiedene Methoden, welche sich in der Sensitivität, der Durchführung und dem erforderlichen Patientenmaterial unterscheiden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei Methoden: MLPA, genomische PCR und RT-PCR getestet und miteinander verglichen. Hierbei stellte sich die RT-PCR als eine kostengünstige, effiziente und gleichzeitig sensitive Methode zur Detektion der *P2RY8/CRLF2*-Fusion heraus. Allerdings ist die Wahl der Methode auch abhängig von dem Kontext, in welchem die Fusion untersucht werden soll. So bietet eine methodische Weiterentwicklung der klassischen Zytogenetik, die Array-CGH, die Möglichkeit zur simultanen Identifizierung mehrerer genetischer Marker und findet deshalb in der aktuellen AIEOP-BFM ALL 2017 Studie im Rahmen der *IKZF1*<sup>plus</sup>-Diagnostik Anwendung.<sup>25</sup> Aber auch das NGS-basierte RNA CaptureSeq bietet vielversprechende Möglichkeiten für die Detektion von Fusionsgenen.<sup>125</sup> Zur Gewährleistung robuster, reproduzierbarer und vergleichbarer Ergebnisse sollte zukünftig eine Evaluation dieser zukunftsweisenden Methoden für die Detektion der *P2RY8/CRLF2*-Fusion erfolgen.

Die weitere Untersuchung der ALL im Kindesalter mit hoher *CRLF2*-Genexpression bleibt auch zukünftig wegen der noch offenen mechanistischen Fragen und den vielfältigen Möglichkeiten der gezielten therapeutischen Intervention ein interessantes und wichtiges Forschungsgebiet.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Imbach P, Kühne T, Arceci RJ. *Kompendium Kinderonkologie*: Springer Berlin Heidelberg; 2014.
2. www.kinderkrebsregister.de. Detaillierte Auswertungen für lymphatische Leukämien, Deutschland (2009 - 2015) Kinder unter 18 Jahren. *Kinderkrebsregister Mainz* 2016.
3. Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J. *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*: Springer Berlin Heidelberg; 2005.
4. Schutte P, Moricke A, Zimmermann M, et al. Preexisting conditions in pediatric ALL patients: Spectrum, frequency and clinical impact. *Eur J Med Genet*. Mar 2016;59(3):143-151.
5. Hasle H, Clemmensen IH, Mikkelsen M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet*. Jan 15 2000;355(9199):165-169.
6. Belson M, Kingsley B, Holmes A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environ Health Perspect*. Jan 2007;115(1):138-145.
7. Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM. Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood*. Oct 01 2003;102(7):2321-2333.
8. Eden T. Aetiology of childhood leukaemia. *Cancer Treat Rev*. Jun 2010;36(4):286-297.
9. van der Does-van den Berg A, Bartram CR, Basso G, et al. Minimal requirements for the diagnosis, classification, and evaluation of the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) in the "BFM Family" Cooperative Group. *Med Pediatr Oncol*. 1992;20(6):497-505.
10. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. Jul 30 2009;114(5):937-951.
11. McGregor S, McNeer J, Gurbuxani S. Beyond the 2008 World Health Organization classification: the role of the hematopathology laboratory in the diagnosis and management of acute lymphoblastic leukemia. *Semin Diagn Pathol*. Feb 2012;29(1):2-11.
12. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. Aug 1976;33(4):451-458.
13. Reiter A, Schrappe M, Tiemann M, et al. Improved treatment results in childhood B-cell neoplasms with tailored intensification of therapy: A report of the Berlin-Frankfurt-Munster Group Trial NHL-BFM 90. *Blood*. Nov 15 1999;94(10):3294-3306.
14. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. Oct 1995;9(10):1783-1786.
15. Ratei R, Schabath R, Karawajew L, et al. Lineage Classification of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia according to the EGIL Recommendations: Results of the ALL-BFM 2000 Trial. *Klin Padiatr*. 22.05.2013 2013;225(S 01):S8-S8.

16. Moricke A, Zimmermann M, Reiter A, et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia*. Feb 2010;24(2):265-284.
17. Nachman JB, Heerema NA, Sather H, et al. Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. Aug 15 2007;110(4):1112-1115.
18. Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M, et al. AIEOP-BFM ALL 2009: Internationales kooperatives Behandlungsprotokoll für Kinder und Jugendliche mit akuter lymphoblastischer Leukämie. 2013;Protokollversion: 1.3(07. Januar 2013).
19. Trueworthy R, Shuster J, Look T, et al. Ploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol*. Apr 1992;10(4):606-613.
20. Lilljebjorn H, Fioretos T. New oncogenic subtypes in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. Sep 21 2017;130(12):1395-1401.
21. Iacobucci I, Mullighan CG. Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol*. Mar 20 2017;35(9):975-983.
22. Karrman K, Johansson B. Pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. Feb 2017;56(2):89-116.
23. Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, 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*. Apr 2008;22(4):771-782.
24. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, 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*. Apr 22 2010;115(16):3206-3214.
25. Schrappe M, Zimmermann M, Valsecchi MG, et al. AIEOP-BFM ALL 2017: International collaborative treatment protocol for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. 2018;Protocol version 1.5(01.07.2018).
26. Henze G, v Stackelberg A, Eckert C. ALL-REZ BFM--the consecutive trials for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Klinische Padiatrie*. May 2013;225 Suppl 1:S73-78.
27. Burger B, Beier R, Zimmermann M, Beck JD, Reiter A, Schrappe M. Osteonecrosis: a treatment related toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL)--experiences from trial ALL-BFM 95. *Pediatr Blood Cancer*. Mar 2005;44(3):220-225.
28. Loning L, Zimmermann M, Reiter A, et al. Secondary neoplasms subsequent to Berlin-Frankfurt-Munster therapy of acute lymphoblastic leukemia in childhood: significantly lower risk without cranial radiotherapy. *Blood*. May 01 2000;95(9):2770-2775.
29. Ness KK, Armenian SH, Kadan-Lottick N, Gurney JG. Adverse effects of treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia: general overview and implications for long-term cardiac health. *Expert Rev Hematol*. Apr 2011;4(2):185-197.
30. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell*. Mar 2002;1(2):133-143.

31. Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol.* Feb 2009;10(2):125-134.
32. Lilljebjorn H, Henningsson R, Hyrenius-Wittsten A, et al. Identification of ETV6-RUNX1-like and DUX4-rearranged subtypes in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun.* Jun 06 2016;7:11790.
33. Cario G, Stanulla M, Fine BM, et al. Distinct gene expression profiles determine molecular treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* Jan 15 2005;105(2):821-826.
34. Cario G, Izraeli S, Teichert A, et al. High interleukin-15 expression characterizes childhood acute lymphoblastic leukemia with involvement of the CNS. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* Oct 20 2007;25(30):4813-4820.
35. Fedders H, Alsadeq A, Schmah J, et al. The role of constitutive activation of FMS-related tyrosine kinase-3 and NRas/KRas mutational status in infants with KMT2A-rearranged acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* Aug 24 2017.
36. Cario G, Zimmermann M, Romey R, 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.* Jul 1 2010;115(26):5393-5397.
37. Palmi C, Savino AM, Silvestri D, et al. CRLF2 over-expression is a poor prognostic marker in children with high risk T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget.* Jul 15 2016.
38. Tal N, Shochat C, Geron I, Bercovich D, Izraeli S. Interleukin 7 and thymic stromal lymphopoietin: from immunity to leukemia. *Cell Mol Life Sci.* Feb 2014;71(3):365-378.
39. Tasian SK, Doral MY, Borowitz MJ, et al. Aberrant STAT5 and PI3K/mTOR pathway signaling occurs in human CRLF2-rearranged B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* Jul 26 2012;120(4):833-842.
40. He R, Geha RS. Thymic stromal lymphopoietin. *Ann N Y Acad Sci.* Jan 2010;1183:13-24.
41. Zhang W, Wang J, Wang Q, et al. Identification of a novel type I cytokine receptor CRL2 preferentially expressed by human dendritic cells and activated monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* Mar 09 2001;281(4):878-883.
42. Reche PA, Soumelis V, Gorman DM, et al. Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J Immunol.* Jul 01 2001;167(1):336-343.
43. Siracusa MC, Saenz SA, Hill DA, et al. TSLP promotes interleukin-3-independent basophil haematopoiesis and type 2 inflammation. *Nature.* Aug 14 2011;477(7363):229-233.
44. Hertzberg L, Vendramini E, Ganmore I, et al. Down syndrome acute lymphoblastic leukemia, a highly heterogeneous disease in which aberrant expression of CRLF2 is associated with mutated JAK2: a report from the International BFM Study Group. *Blood.* Feb 04 2010;115(5):1006-1017.
45. Russell LJ, Capasso M, Vater I, et al. Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* Sep 24 2009;114(13):2688-2698.

46. Mullighan CG, Collins-Underwood JR, Phillips LA, et al. Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* Nov 2009;41(11):1243-1246.
47. Yano M, Imamura T, Asai D, et al. An overall characterization of pediatric acute lymphoblastic leukemia with CRLF2 overexpression. *Genes Chromosomes Cancer.* Oct 2014;53(10):815-823.
48. Chen IM, Harvey RC, Mullighan CG, et al. Outcome modeling with CRLF2, IKZF1, JAK, and minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood.* Apr 12 2012;119(15):3512-3522.
49. Morak M, Attarbaschi A, Fischer S, et al. Small sizes and indolent evolutionary dynamics challenge the potential role of P2RY8-CRLF2-harboring clones as main relapse-driving force in childhood ALL. *Blood.* Dec 20 2012;120(26):5134-5142.
50. Palmi C, Vendramini E, Silvestri D, et al. Poor prognosis for P2RY8-CRLF2 fusion but not for CRLF2 over-expression in children with intermediate risk B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* Oct 2012;26(10):2245-2253.
51. Boyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol.* Jun 1976;Suppl 5:9-15.
52. Glassman AB, Bennett CE. Cryopreservation of human lymphocytes: a brief review and evaluation of an automated liquid nitrogen freezer. *Transfusion.* Mar-Apr 1979;19(2):178-181.
53. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheimvandillen PME, Vandernoordaa J. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic-Acids. *J Clin Microbiol.* Mar 1990;28(3):495-503.
54. Lottspeich F, Engels JW, Solodkoff ZL. *Bioanalytik*: Spektrum Akademischer Verlag; 2012.
55. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* Apr 1987;162(1):156-159.
56. Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, et al. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res.* Mar 30 2005;33(6):e56.
57. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* Jan 31 2006;7:3.
58. Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett.* Oct 2006;28(19):1601-1613.
59. Gerard GF, Fox DK, Nathan M, DAlessio JM. Reverse transcriptase - The use of cloned moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA. *Mol Biotechnol.* Aug 1997;8(1):61-77.
60. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* Oct 1996;6(10):986-994.
61. Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol.* Oct 13 2003;3:18.



62. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* Jul 12 2004;32(12):e103.
63. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* Feb 15 1997;245(2):154-160.
64. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-350.
65. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* Jan 29 1988;239(4839):487-491.
66. Pfaffl MW. AZ of Quantitative PCR, Chapter 3–Quantification strategies in real-time PCR. *International University Line (IUL). La Jolla. Editors, SA Bustin.* 2004.
67. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* Dec 2001;25(4):402-408.
68. Zawada AM, Rogacev KS, Muller S, et al. Massive analysis of cDNA Ends (MACE) and miRNA expression profiling identifies proatherogenic pathways in chronic kidney disease. *Epigenetics.* Jan 1 2014;9(1):161-172.
69. Matsumura H, Yoshida K, Luo S, et al. High-throughput SuperSAGE for digital gene expression analysis of multiple samples using next generation sequencing. *PLoS One.* Aug 06 2010;5(8):e12010.
70. Asmann YW, Klee EW, Thompson EA, et al. 3' tag digital gene expression profiling of human brain and universal reference RNA using Illumina Genome Analyzer. *BMC Genomics.* 2009;10:531.
71. Su Z, Li Z, Chen T, et al. Comparing next-generation sequencing and microarray technologies in a toxicological study of the effects of aristolochic acid on rat kidneys. *Chem Res Toxicol.* Sep 19 2011;24(9):1486-1493.
72. Rotter B. Method for the quantitative analysis of nucleic acids. markers therefor and their use. 2009; Patent application No. WO2009152928.
73. Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR. NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res.* Jan 01 2005;33(Database issue):D501-504.
74. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* Feb 15 2001;409(6822):860-921.
75. Karolchik D, Hinrichs AS, Furey TS, et al. The UCSC Table Browser data retrieval tool. *Nucleic Acids Res.* Jan 1 2004;32(Database issue):D493-496.
76. Wang L, Feng Z, Wang X, Zhang X. DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics.* Jan 1 2010;26(1):136-138.
77. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J Roy Stat Soc B Met.* 1995;57(1):289-300.
78. Brazma A, Parkinson H, Sarkans U, et al. ArrayExpress--a public repository for microarray gene expression data at the EBI. *Nucleic Acids Res.* Jan 01 2003;31(1):68-71.

79. Tchagang AB, Gawronski A, Berube H, Phan S, Famili F, Pan Y. GOAL: a software tool for assessing biological significance of genes groups. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:229.
80. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 25 2005;102(43):15545-15550.
81. Liberzon A, Subramanian A, Pinchback R, Thorvaldsdottir H, Tamayo P, Mesirov JP. Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics*. Jun 15 2011;27(12):1739-1740.
82. Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, et al. The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res*. Jan 2011;39(Database issue):D561-568.
83. Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res*. Jan 2013;41(Database issue):D808-815.
84. Lamb J, Crawford ED, Peck D, et al. The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science*. Sep 29 2006;313(5795):1929-1935.
85. Lamb J. The Connectivity Map: a new tool for biomedical research. *Nat Rev Cancer*. Jan 2007;7(1):54-60.
86. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. Jun 15 2002;30(12):e57.
87. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 15 1991;88(16):7276-7280.
88. Cheung SW, Tishler PV, Atkins L, Sengupta SK, Modest EJ, Forget BG. Gene mapping by fluorescent in situ hybridization. *Cell Biol Int Rep*. May 1977;1(3):255-262.
89. Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, et al. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. May 2006;8(2):141-151.
90. Martin-Subero JI, Harder L, Gesk S, et al. Interphase FISH assays for the detection of translocations with breakpoints in immunoglobulin light chain loci. *Int J Cancer*. Mar 20 2002;98(3):470-474.
91. Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, Pryor RJ, Chen J, Wittwer CT. Amplicon melting analysis with labeled primers: A closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin Chem*. Mar 2003;49(3):396-406.
92. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric-Estimation from Incomplete Observations. *J Am Stat Assoc*. 1958;53(282):457-481.
93. Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep*. Mar 1966;50(3):163-170.
94. Kalbfleisch JD, Prentice RL. *The statistical analysis of failure time data*: Wiley; 1980.

95. Gray RJ. A Class of K-Sample Tests for Comparing the Cumulative Incidence of a Competing Risk. *Ann Stat*. Sep 1988;16(3):1141-1154.
96. Cox DR. Regression Models and Life-Tables. *J R Stat Soc B*. 1972;34(2):187-+.
97. Mann HB, Whitney DR. On a Test of Whether One of 2 Random Variables Is Stochastically Larger Than the Other. *Ann Math Stat*. 1947;18(1):50-60.
98. Hunger SP, Winick NJ, Sather HN, Carroll WL. Therapy of low-risk subsets of childhood acute lymphoblastic leukemia: when do we say enough? *Pediatr Blood Cancer*. Dec 2005;45(7):876-880.
99. Arico M, Conter V, Valsecchi MG, et al. Treatment reduction in highly selected standard-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. The AIEOP ALL-9501 study. *Haematologica*. Sep 2005;90(9):1186-1191.
100. Schrappe M, Valsecchi MG, Bartram CR, 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*. Aug 25 2011;118(8):2077-2084.
101. Eguiguren JM, Schell MJ, Crist WM, Kunkel K, Rivera GK. Complications and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia with hyperleukocytosis. *Blood*. Feb 15 1992;79(4):871-875.
102. Schrappe M, Reiter A, Zimmermann 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*. Dec 2000;14(12):2205-2222.
103. Ensor HM, Schwab C, Russell LJ, et al. Demographic, clinical, and outcome features of children with acute lymphoblastic leukemia and CRLF2 deregulation: results from the MRC ALL97 clinical trial. *Blood*. Feb 17 2011;117(7):2129-2136.
104. Harvey RC, Mullighan CG, Chen IM, et al. Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. Jul 1 2010;115(26):5312-5321.
105. Maloney KW, Carroll WL, Carroll AJ, et al. Down syndrome childhood acute lymphoblastic leukemia has a unique spectrum of sentinel cytogenetic lesions that influences treatment outcome: a report from the Children's Oncology Group. *Blood*. Aug 19 2010;116(7):1045-1050.
106. Tsai AG, Yoda A, Weinstock DM, Lieber MR. t(X;14)(p22;q32)/t(Y;14)(p11;q32) CRLF2-IGH translocations from human B-lineage ALLs involve CpG-type breaks at CRLF2, but CRLF2/P2RY8 intrachromosomal deletions do not. *Blood*. Sep 16 2010;116(11):1993-1994.
107. Yamashita Y, Shimada A, Yamada T, et al. IKZF1 and CRLF2 gene alterations correlate with poor prognosis in Japanese BCR-ABL1-negative high-risk B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. Oct 2013;60(10):1587-1592.
108. Attarbaschi A, Morak M, Cario G, et al. Treatment outcome of CRLF2-rearranged childhood acute lymphoblastic leukaemia: a comparative analysis of the AIEOP-BFM and UK NCRI-CCLG study groups. *Br J Haematol*. Sep 2012;158(6):772-777.
109. Zhang M, Srivastava G, Lu L. The pre-B cell receptor and its function during B cell development. *Cell Mol Immunol*. Apr 2004;1(2):89-94.

110. Cantagrel V, Lossi AM, Boulanger S, et al. Disruption of a new X linked gene highly expressed in brain in a family with two mentally retarded males. *J Med Genet.* Oct 2004;41(10):736-742.
111. Fujiwara S, Yamashita Y, Choi YL, et al. Transforming activity of purinergic receptor P2Y<sub>8</sub>, G protein coupled, 8 revealed by retroviral expression screening. *Leuk Lymphoma.* May 2007;48(5):978-986.
112. Russell LJ, Enshaei A, Jones L, et al. IGH@ translocations are prevalent in teenagers and young adults with acute lymphoblastic leukemia and are associated with a poor outcome. *J Clin Oncol.* May 10 2014;32(14):1453-1462.
113. Stanulla M, Dagdan E, Zaliova M, et al. IKZF1(plus) Defines a New Minimal Residual Disease-Dependent Very-Poor Prognostic Profile in Pediatric B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol.* Apr 20 2018;36(12):1240-1249.
114. Tsai AG, Lu H, Raghavan SC, Muschen M, Hsieh CL, Lieber MR. Human chromosomal translocations at CpG sites and a theoretical basis for their lineage and stage specificity. *Cell.* Dec 12 2008;135(6):1130-1142.
115. Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, et al. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature.* May 1 2008;453(7191):110-114.
116. Kitagawa Y, Inoue K, Sasaki S, et al. Prevalent involvement of illegitimate V(D)J recombination in chromosome 9p21 deletions in lymphoid leukemia. *J Biol Chem.* Nov 29 2002;277(48):46289-46297.
117. Waanders E, Scheijen B, van der Meer LT, et al. The origin and nature of tightly clustered BTG1 deletions in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia support a model of multiclonal evolution. *PLoS Genet.* 2012;8(2):e1002533.
118. Swaminathan S, Klemm L, Park E, et al. Mechanisms of clonal evolution in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Immunol.* Jul 2015;16(7):766-774.
119. Schwab CJ, Jones LR, Morrison H, et al. Evaluation of multiplex ligation-dependent probe amplification as a method for the detection of copy number abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* Dec 2010;49(12):1104-1113.
120. Pinkel D, Segraves R, Sudar D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet.* Oct 1998;20(2):207-211.
121. Dutta UR. Precision in chromosome identification with leads in molecular cytogenetics: An illustrated review. *J Pediatr Genet.* Mar 2014;3(1):1-7.
122. Hartmann L, Stephenson CF, Verkamp SR, et al. Detection of clonal evolution in hematopoietic malignancies by combining comparative genomic hybridization and single nucleotide polymorphism arrays. *Clin Chem.* Dec 2014;60(12):1558-1568.
123. Kumar S, Vo AD, Qin F, Li H. Comparative assessment of methods for the fusion transcripts detection from RNA-Seq data. *Sci Rep.* Feb 10 2016;6:21597.
124. Mercer TR, Clark MB, Crawford J, et al. Targeted sequencing for gene discovery and quantification using RNA CaptureSeq. *Nat Protoc.* May 2014;9(5):989-1009.
125. Grioni A, Fazio G, Rigamonti S, et al. A Simple RNA Target Capture NGS Strategy for Fusion Genes Assessment in the Diagnostics of Pediatric B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *HemaSphere.* 2019;3(3):e250.

126. Kendzierski C, Irizarry RA, Chen KS, Haag JD, Gould MN. On the utility of pooling biological samples in microarray experiments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 22 2005;102(12):4252-4257.
127. Rezende F, Moll F, Walter M, et al. The NADPH oxidizers NoxO1 and p47phox are both mediators of diabetes-induced vascular dysfunction in mice. *Redox Biol*. May 2018;15:12-21.
128. Wanet A, Caruso M, Domelevo Entfellner JB, et al. The Transcription Factor 7-Like 2-Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator-1 Alpha Axis Connects Mitochondrial Biogenesis and Metabolic Shift with Stem Cell Commitment to Hepatic Differentiation. *Stem Cells*. Oct 2017;35(10):2184-2197.
129. Lenz TL, Eizaguirre C, Rotter B, Kalbe M, Milinski M. Exploring local immunological adaptation of two stickleback ecotypes by experimental infection and transcriptome-wide digital gene expression analysis. *Mol Ecol*. Feb 2013;22(3):774-786.
130. Behringer D, Zimmermann H, Ziegenhagen B, Liepelt S. Differential Gene Expression Reveals Candidate Genes for Drought Stress Response in *Abies alba* (Pinaceae). *PLoS One*. 2015;10(4):e0124564.
131. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:99-146.
132. Kim SJ, Letterio J. Transforming growth factor-beta signaling in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia*. Sep 2003;17(9):1731-1737.
133. Herzog S, Reth M, Jumaa H. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. Mar 2009;9(3):195-205.
134. Jordan MA, Thrower D, Wilson L. Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *J Cell Sci*. Jul 1992;102 ( Pt 3):401-416.
135. Yu C, Xing F, Tang Z, et al. Anisomycin suppresses Jurkat T cell growth by the cell cycle-regulating proteins. *Pharmacol Rep*. 2013;65(2):435-444.
136. Hay AE, Meyer RM. Balancing risks and benefits of therapy for patients with favorable-risk limited-stage Hodgkin lymphoma: the role of doxorubicin, bleomycin, vinblastine, and dacarbazine chemotherapy alone. *Hematol Oncol Clin North Am*. Feb 2014;28(1):49-63.
137. Veneri D, Zanetti F, Franchini M, Krampera M, Pizzolo G. Low-dose epirubicin in combination with cyclophosphamide, vinblastine and prednisone (mini-CEOP) for the treatment of aggressive non-Hodgkin's lymphoma in elderly patients. *Haematologica*. Nov 2002;87(11):ELT43.
138. Brambilla L, Miedico A, Ferrucci S, et al. Combination of vinblastine and bleomycin as first line therapy in advanced classic Kaposi's sarcoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. Oct 2006;20(9):1090-1094.
139. Ospovat I, Siegelmann-Danieli N, Grenader T, Hubert A, Hamburger T, Peretz T. Mitomycin C and vinblastine: an active regimen in previously treated breast cancer patients. *Tumori*. Nov-Dec 2009;95(6):683-686.
140. Keohane C, Radia DH, Harrison CN. Treatment and management of myelofibrosis in the era of JAK inhibitors. *Biologics*. 2013;7:189-198.

141. Pemmaraju N, Kantarjian H, Kadia T, et al. A phase I/II study of the Janus kinase (JAK)1 and 2 inhibitor ruxolitinib in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. Mar 2015;15(3):171-176.
142. Loh ML, Tasian SK, Rabin KR, et al. A phase 1 dosing study of ruxolitinib in children with relapsed or refractory solid tumors, leukemias, or myeloproliferative neoplasms: A Children's Oncology Group phase 1 consortium study (ADVL1011). *Pediatr Blood Cancer*. Oct 2015;62(10):1717-1724.
143. Verstovsek S, Courby S, Griesshammer M, et al. A phase 2 study of momelotinib, a potent JAK1 and JAK2 inhibitor, in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Leuk Res*. Sep 2017;60:11-17.
144. Ng K, Hendifar A, Starodub A, et al. Phase 1 dose-escalation study of momelotinib, a Janus kinase 1/2 inhibitor, combined with gemcitabine and nab-paclitaxel in patients with previously untreated metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Invest New Drugs*. Jul 30 2018.
145. Steeghs EMP, Jerchel IS, de Goffau-Nobel W, et al. JAK2 aberrations in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. Oct 27 2017;8(52):89923-89938.
146. Wu SC, Li LS, Kopp N, et al. Activity of the Type II JAK2 Inhibitor CHZ868 in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. Jul 13 2015;28(1):29-41.
147. Shang L, Tomasi TB. The heat shock protein 90-CDC37 chaperone complex is required for signaling by types I and II interferons. *J Biol Chem*. Jan 27 2006;281(4):1876-1884.
148. Jhaveri K, Taldone T, Modi S, Chiosis G. Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers. *Biochim Biophys Acta*. Mar 2012;1823(3):742-755.
149. Weigert O, Lane AA, Bird L, et al. Genetic resistance to JAK2 enzymatic inhibitors is overcome by HSP90 inhibition. *J Exp Med*. Feb 13 2012;209(2):259-273.
150. Bali P, Pranpat M, Bradner J, et al. Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem*. Jul 22 2005;280(29):26729-26734.
151. Savino AM, Sarno J, Trentin L, et al. The histone deacetylase inhibitor givinostat (ITF2357) exhibits potent anti-tumor activity against CRLF2-rearranged BCP-ALL. *Leukemia*. Nov 2017;31(11):2365-2375.
152. Furqan M, Akinleye A, Mukhi N, Mittal V, Chen Y, Liu D. STAT inhibitors for cancer therapy. *J Hematol Oncol*. Dec 5 2013;6:90.
153. Mensah FA, Blaize JP, Bryan LJ. Spotlight on copanlisib and its potential in the treatment of relapsed/refractory follicular lymphoma: evidence to date. *Onco Targets Ther*. 2018;11:4817-4827.
154. Blair HA. Duvelisib: First Global Approval. *Drugs*. Nov 2018;78(17):1847-1853.
155. Zirlik K, Veelken H. Idelalisib. *Recent Results Cancer Res*. 2018;212:243-264.
156. Sanchez VE, Nichols C, Kim HN, Gang EJ, Kim YM. Targeting PI3K Signaling in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci*. Jan 18 2019;20(2).
157. Myers MP, Pass I, Batty IH, et al. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 10 1998;95(23):13513-13518.

158. McLoughlin NM, Mueller C, Grossmann TN. The Therapeutic Potential of PTEN Modulation: Targeting Strategies from Gene to Protein. *Cell Chem Biol.* Jan 18 2018;25(1):19-29.
159. Alessi DR, James SR, Downes CP, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol.* Apr 1 1997;7(4):261-269.
160. Mora A, Komander D, van Aalten DM, Alessi DR. PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin Cell Dev Biol.* Apr 2004;15(2):161-170.
161. Barile E, De SK, Pellecchia M. PDK1 inhibitors. *Pharm Pat Anal.* May 2012;1(2):145-163.
162. Brown JS, Banerji U. Maximising the potential of AKT inhibitors as anti-cancer treatments. *Pharmacol Ther.* Apr 2017;172:101-115.
163. Xie J, Wang X, Proud CG. mTOR inhibitors in cancer therapy. *F1000Res.* 2016;5.
164. Ballou LM, Lin RZ. Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *J Chem Biol.* Nov 2008;1(1-4):27-36.
165. Vilar E, Perez-Garcia J, Tabernero J. Pushing the envelope in the mTOR pathway: the second generation of inhibitors. *Mol Cancer Ther.* Mar 2011;10(3):395-403.
166. Badura S, Tesanovic T, Pfeifer H, et al. Differential effects of selective inhibitors targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One.* 2013;8(11):e80070.
167. Tasian SK, Teachey DT, Li Y, et al. Potent efficacy of combined PI3K/mTOR and JAK or ABL inhibition in murine xenograft models of Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* Jan 12 2017;129(2):177-187.
168. Biondi A, Schrappe M, De Lorenzo P, et al. Imatinib after induction for treatment of children and adolescents with Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia (EsPhALL): a randomised, open-label, intergroup study. *Lancet Oncol.* Sep 2012;13(9):936-945.
169. Inaba H, Azzato EM, Mullighan CG. Integration of Next-Generation Sequencing to Treat Acute Lymphoblastic Leukemia with Targetable Lesions: The St. Jude Children's Research Hospital Approach. *Front Pediatr.* 2017;5:258.

## 8. Anhang

### 8.1 Tabelle S1

**Tabelle S1: Klinische Parameter der Patienten mit hoher *CRLF2*-Genexpression stratifiziert nach dem Vorhandensein der *P2RY8/CRLF2*-Fusion. Links: Vergleich der Patientengruppen der NGS-Analyse. Rechts: Vergleich der Patienten der Validierungskohorte mittels qPCR.**

	NGS-Kohorte (n = 35)			Validierungskohorte (n = 54)		
	<i>P2RY8/CRLF2</i> <sup>+</sup>	<i>P2RY8/CRLF2</i> <sup>-</sup>	<i>P</i> <sup>a</sup>	<i>P2RY8/CRLF2</i> <sup>+</sup>	<i>P2RY8/CRLF2</i> <sup>-</sup>	<i>P</i> <sup>a</sup>
<b>Anzahl Patienten (%)</b>	17 (48,6)	18 (51,4)		27 (50,0)	27 (50,0)	
<b>Alter in Jahren (%)</b>			,02			1,0
1 - 10	13 (76,5)	15 (83,3)		23 (85,2)	22 (81,5)	
≥ 10	4 (23,5)	3 (16,7)		4 (14,8)	5 (18,5)	
<b>Geschlecht (%)</b>			,50			,17
Männlich	6 (35,3)	9 (50,0)		9 (33,3)	15 (55,6)	
Weiblich	11 (64,7)	9 (50,0)		18 (66,7)	12 (44,4)	
<b>Down-Syndrom (%)</b>			,10			,010
Nein	14 (82,3)	18 (100)		20 (74,1)	27 (100)	
Ja	3 (17,6)	0 (0)		7 (25,9)	0 (0)	
<b>Initiale WBC/μl (%)</b>			,16			,018
< 10.000	4 (23,5)	8 (44,4)		6 (22,2)	15 (55,6)	
10.000 - < 50.000	7 (41,2)	9 (50,0)		12 (44,4)	10 (37,0)	
50.000 - < 100.000	2 (11,8)	0 (0)		4 (14,8)	2 (7,4)	
≥ 100.000	4 (23,5)	1 (5,6)		5 (18,5)	0 (0)	
<b>Prednison-Ansprechen<sup>b</sup> (%)</b>			>,999			1,0
Gut	17 (100)	17 (94,4)		27 (100)	26 (96,3)	
Schlecht	0 (0)	1 (5,6)		0 (0)	1 (3,7)	
<b>PCR-MRD</b>			,82			,67
<b>Risikogruppe<sup>c</sup> (%)</b>						
Standardrisiko	8 (47,1)	6 (33,3)		11 (40,7)	13 (48,1)	
Mittleres Risiko	6 (35,3)	8 (44,4)		10 (37,0)	11 (40,7)	
Hochrisiko	1 (5,9)	1 (5,6)		2 (7,4)	0 (0)	
Unbekannt	2 (11,8)	3 (16,7)		4 (14,8)	3 (11,1)	
<b>Finale Protokoll-stratifizierung (%)</b>			,68			,85
Standardrisiko	6 (35,3)	4 (22,2)		9 (33,3)	11 (40,7)	
Mittleres Risiko	10 (58,8)	12 (66,7)		15 (55,6)	14 (51,9)	
Hochrisiko	1 (5,9)	2 (11,1)		3 (11,1)	2 (7,4)	

Abkürzungen: NGS, Transkriptom-Analyse (*next-generation-sequencing*); WBC, Leukozyten (*white blood cells*); PCR, Polymerase-Kettenreaktion; MRD, Minimale Resterkrankung (*minimal residual disease*).

<sup>a</sup>Exakter Fisher-Test zum Vergleich der *P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>- und *P2RY8/CRLF2*<sup>-</sup>-Gruppe.

<sup>b</sup>Gut: < 1.000 leukämische Blasten/μl an Therapietag 8; Schlecht: > 1.000 /μl.

<sup>c</sup>Risikostratifizierung mittels PCR-MRD an Therapietag 33 und 78; Standardrisiko: MRD-negativ an Tag 33 und Tag 78; Mittleres Risiko: MRD-positiv an Tag 33 und/oder Tag 78, und MRD-Last < 10<sup>-3</sup> an Tag 78; Hochrisiko: MRD-Last ≥ 10<sup>-3</sup> an Tag 78.



## 8.2 Manuskript 1

„Molecular characterization of acute lymphoblastic leukemia with high *CRLF2* gene expression in childhood“

**Schmäh J**, Fedders B, Panzer-Grümayer R, Fischer S, Zimmermann M, Dagdan E, Bens S, Schewe D, Mörnicke A, Bleckmann K, Siebert R, Schrappe M, Stanulla M, Cario G

*Pediatric Blood and Cancer*, 2017 Oct;64(10).

Received: 4 January 2017 | Revised: 7 February 2017 | Accepted: 23 February 2017

DOI: 10.1002/pbc.26539

## RESEARCH ARTICLE



# Molecular characterization of acute lymphoblastic leukemia with high *CRLF2* gene expression in childhood

Juliane Schmah<sup>1</sup> | Birthe Fedders<sup>1</sup> | Renate Panzer-Grümayer<sup>2</sup> | Susanna Fischer<sup>2</sup> |  
 Martin Zimmermann<sup>3</sup> | Elif Dagdan<sup>3</sup> | Susanne Bens<sup>4,5</sup> | Denis Schewe<sup>1</sup> |  
 Anja Moericke<sup>1</sup> | Julia Alten<sup>1</sup> | Kirsten Bleckmann<sup>1</sup> | Reiner Siebert<sup>4,5</sup> |  
 Martin Schrappe<sup>1</sup> | Martin Stanulla<sup>3</sup> | Gunnar Cario<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, University Medical Center Schleswig-Holstein, Kiel, Germany

<sup>2</sup>Children's Cancer Research Institute, St. Anna Kinderkrebsforschung, Vienna, Austria

<sup>3</sup>Department of Pediatric Hematology and Oncology, Hannover Medical School, Hannover, Germany

<sup>4</sup>Institute of Human Genetics, Christian-Albrechts-University Kiel & University Medical Center Schleswig-Holstein, Kiel, Germany

<sup>5</sup>Institute of Human Genetics, University of Ulm, Ulm, Germany

## Correspondence

Gunnar Cario, Department of Pediatrics, University Medical Center Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Schwannenweg 20, 24105 Kiel, Germany. Email: gunnar.cario@uksh.de

Martin Stanulla and Gunnar Cario contributed equally to this work.

## Abstract

**Background:** A high-level expression of the *CRLF2* gene is frequent in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia (pB-ALL) and can be caused by different genetic aberrations. The presence of the most frequent alteration, the *P2RY8/CRLF2* fusion, was shown to be associated with a high relapse incidence in children treated according to ALL-Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) protocols, which is poorly understood. Moreover, the frequency of other alterations has not been systematically analyzed yet.

**Procedure:** *CRLF2* mRNA expression and potential genetic aberrations causing a *CRLF2* high expression were prospectively assessed in 1,105 patients treated according to the Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica (AIEOP)-BFM ALL 2009 protocol. Additionally, we determined copy number alterations in selected B-cell differentiation genes for all *CRLF2* high-expressing pB-ALL cases, as well as *JAK2* and *CRLF2* mutations.

**Results:** A *CRLF2* high expression was detected in 26/178 (15%) T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cases, 21 of them (81%) had been stratified as high-risk patients by treatment response. In pB-ALL, a *CRLF2* high expression was determined in 91/927 (10%) cases; the *P2RY8/CRLF2* rearrangement in 44/91 (48%) of them, supernumerary copies of *CRLF2* in 18/91 (20%), and, notably, the *IGH/CRLF2* translocation was detected in 16/91 (18%). Remarkably, 7 of 16 (44%) patients with *IGH/CRLF2* translocation had already relapsed. *P2RY8/CRLF2*- and *IGH/CRLF2*-positive samples (70 and 94%, respectively) were characterized by a high frequency of additional deletions in B-cell differentiation genes such as *IKZF1* or *PAX5*.

**Conclusion:** Our data suggest that this high frequency of genetic aberrations in the context of a high *CRLF2* expression could contribute to the high risk of relapse in *P2RY8/CRLF2*- and *IGH/CRLF2*-positive ALL.

## KEYWORDS

acute lymphoblastic leukemia, *CRLF2*, *IGH/CRLF2*, *P2RY8/CRLF2*, prognosis

Abbreviation: AIEOP, Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica; ALL, acute lymphoblastic leukemia; BFM, Berlin-Frankfurt-Münster; cDNA, complementary deoxyribonucleic acid; CNS, central nervous system; CNA, copy number alteration; *CRLF2*, cytokine receptor-like factor 2; *CSF2RA*, colony-stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity; DNA, deoxyribonucleic acid; DS, Down syndrome; FCM, flow cytometry; FISH, fluorescence in-situ hybridization; HR, high risk; HRM, high-resolution melting; *IGH*, immunoglobulin heavy chain; IR, intermediate risk; *JAK2*, Janus kinase 2; MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification; MRD, minimal residual disease; mRNA, messenger ribonucleic acid; *P2RY8*,

purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 8; PAR1, pseudoautosomal region 1; pB-ALL, precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia; PGR, prednisone good responders; PPR, prednisone poor responders; qRT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; RNA, ribonucleic acid; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; RQ, relative quantity; *SDHA*, succinate dehydrogenase complex subunit A; SR, standard risk; T-ALL, T-cell acute lymphoblastic leukemia; WBC, white blood cell

## 1 | INTRODUCTION

By applying modern risk-adapted treatment strategies, about 80% of children with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia (pB-ALL) can be cured in first complete remission. However, one out of five children with ALL treated according to ALL-Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) based protocols suffers from relapse and the majority of relapses occur in intermediate risk (IR) patients.<sup>1,2</sup> The identification of new genetic markers associated with a distinct prognosis may lead to an improvement of risk-adapted treatment and thereby to an increased cure rate.

The *P2RY8/CRLF2* fusion was identified in about 5% of pB-ALL.<sup>3,4</sup> We and others showed for this subgroup an association with a poor prognosis mainly due to a high incidence of relapses.<sup>5-7</sup> Importantly, the *P2RY8/CRLF2* fusion showed its strongest prognostic impact in IR patients.<sup>5-7</sup> It is caused by an interstitial deletion within the pseudoautosomal region 1 (PAR1) on chromosome X or Y juxtaposing *cytokine receptor-like factor 2 (CRLF2)* with the *purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 8 (P2RY8)* promoter. This fusion leads to a high-level expression of *CRLF2* in *P2RY8/CRLF2*-bearing leukemic cells.<sup>3,4</sup> However, the detection of the *P2RY8/CRLF2* fusion is not always associated with the detection of a high expression of *CRLF2* in the leukemic cell pool, as it can be present as a minor subclone only.<sup>5,6</sup> Moreover, the fusion is often lost in relapse.<sup>6</sup> Therefore, it seems that *P2RY8/CRLF2*-positive clones do not have the selective advantage to drive a relapse. On the basis of these observations, one could hypothesize that the *P2RY8/CRLF2* rearrangement is just a surrogate marker for a poor prognosis but not a causative factor.

*CRLF2* high expression is not only caused by the *P2RY8/CRLF2* fusion but, in a similar number of cases, by additional aberrations, which are only partly known. A translocation involving the immunoglobulin heavy chain (IGH) locus on chromosome 14q32.3 leads to *CRLF2* high expression and, recently, a novel rare chimeric *CSF2RA/CRLF2* fusion transcript with a deletion of the *CRLF2* promoter region was identified, suggesting that an enhancer of *colony-stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage) (CSF2RA)* may control the expression of *CRLF2*.<sup>8</sup> Additionally, supernumerary copies of the *CRLF2* locus were frequently found in *CRLF2* high-expressing cases and in a significant proportion of cases no aberrations could be detected.<sup>7-9</sup> In ALL-BFM-based clinical protocols, it was demonstrated that not the *CRLF2* high expression per se but the presence of the *P2RY8/CRLF2* rearrangement provides a negative prognostic impact in *CRLF2* high-expressing pB-ALL in children.<sup>5-7</sup> However, very few cases with IGH/*CRLF2* were included in these retrospective studies.

In order to further explore the incidence and risk group allocation of *CRLF2* aberrations, we prospectively analyzed *CRLF2* mRNA expression levels and assessed the presence of the *P2RY8/CRLF2* fusion in all patients treated according to the ongoing Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica (AIEOP)-BFM ALL 2009 protocol in which informed consent was given and material was available. Cases high-expressing *CRLF2* without the *P2RY8/CRLF2* rearrangement were additionally examined for IGH/*CRLF2* translocation and supernumerary copies of the *CRLF2* gene by FISH. Moreover, *JAK2* and *CRLF2*

were analyzed for mutations in all *CRLF2* high-expressing cases and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis was performed to determine additional genetic and potentially prognostic aberrations such as the deletion of *IKZF1*.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Patient samples

In accordance with institutional review board regulations, clinical samples were obtained from 1-18-year-old children and adolescents with ALL before treatment. Diagnostics, risk group assignment, and treatment were performed according to the AIEOP-BFM ALL 2000 protocol<sup>1,2</sup> and subsequently according to the AIEOP-BFM ALL 2009 protocol (EudraCT Number: 2007-004270-43). These studies were approved by the institutional review boards of the Hannover Medical School, Hannover, Germany, and of the University Medical Center Schleswig-Holstein, Kiel, Germany, and informed consent was obtained from patients and/or their legal guardians in accordance with the Declaration of Helsinki.

The majority of samples contained more than 90% of blasts as assessed cytomorphologically. Samples with less than 80% of blasts were excluded. Mononuclear cells were isolated from bone marrow aspirate or peripheral blood by density gradient centrifugation using Bicol (Biochrom, Berlin, Germany). Genomic DNA was extracted from enriched lymphoblasts using QIAamp DNA Blood Midi Kits (Qiagen, Hilden, Germany). Afterward quality and quantity was determined by spectrophotometry. Total RNA was isolated with Trizol reagent (Ambion, Darmstadt, Germany) and purified by RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). After DNA digest using the DNA-free Kit (Ambion, Darmstadt, Germany), total RNA was quantified and validated for integrity with the Bioanalyzer 2100 (Agilent, Waldbronn, Germany). Total RNA was reverse-transcribed into cDNA by ReverTaid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Darmstadt, Germany).

### 2.2 | Determination of *CRLF2* high expression

Initial *CRLF2* gene expression levels of 1,105 patients were quantified by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) as previously described.<sup>7</sup> qRT-PCR analysis was performed on a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) and QuantiTect Primer Assays (Qiagen, Hilden, Germany). The expression level of the *succinate dehydrogenase complex subunit A (SDHA)* gene was chosen for normalization. Each sample was tested in duplicate. Reverse-transcribed cDNA corresponding to 2 ng of total RNA was added to each reaction. The expression ratio was calculated using comparative Ct analysis ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). As in previous studies, *CRLF2* high expression was defined as an expression level 20-fold or greater than the median expression value in pB-ALL patients and five-fold or greater than the median expression value for T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) patients as previously described.<sup>5,7,10</sup>

### 2.3 | Detection of *P2RY8/CRLF2* fusion transcripts

Reverse-transcribed cDNA of 1,105 patients corresponding to 5 ng of total leukemic RNA were amplified using HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany) and published primers (Invitrogen, Darmstadt, Germany).<sup>11</sup> *P2RY8/CRLF2* fusion transcripts were detected by a QIAxcel high-resolution capillary electrophoresis system (Qiagen, Hilden, Germany).

### 2.4 | Fluorescence *in situ* hybridization

For 41 of 47 pB-ALL cases high-expressing *CRLF2* without the *P2RY8/CRLF2* rearrangement, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) on interphase nuclei was performed to examine the potential *IGH/CRLF2* translocation and supernumerary copies of the *CRLF2* gene. Detection of breakpoints affecting the *CRLF2* locus was performed as previously described.<sup>4</sup> To investigate the potential breakpoints or imbalances of the *IGH* locus, the Vysis LSI *IGH* Dual Color Break Apart Rearrangement Probe (Abbott, Wiesbaden, Germany) was applied. In cases with both *IGH* and *CRLF2* breaks, an *IGH/CRLF2*-fusion probe was used to confirm the translocation. Cases with *CRLF2* break but no *IGH* break were analyzed for potential breakpoints of the *IGL* or *IGK* locus as previously described.<sup>12</sup>

Therefore, cryopreserved leukemic cells were thawed, briefly washed in phosphate buffered saline and cytospin on a slide using Shandon Cytospin 3 cytocentrifuge (Thermo Scientific, Darmstadt, Germany). Pretreatment of cells, hybridization, washings, and evaluation of slides were performed according to recently described protocols.<sup>13</sup> Details of probes used for hybridization are given in Supplementary Table S1. FISH signals were evaluated using Zeiss fluorescence microscopes (Zeiss, Göttingen, Germany) equipped with appropriate filter sets (AHF, Tübingen, Germany). Hybridizations were documented using the ISIS digital imaging system (Metasystems, Altlusheim, Germany).

### 2.5 | Multiplex ligation-dependent probe amplification

MLPA analysis was performed with 100 ng genomic DNA of 91 *CRLF2* high-expressing pB-ALL cases using the SALSA MLPA P335 ALL-*IKZF1* kit (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands) according to the manufacturer's protocol. The *P2RY8/CRLF2* fusion can be identified through assessment of *CSFRA* and *IL3RA* deletions. Additionally, *SHOX* area, *CRLF2*, and *P2RY8* of the *PAR1* are covered. The assay also includes probes for each of the eight exons of the *IKZF1* gene and selected exons of the genes *EBF1*, *JAK2*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *ETV6*, *BTG1*, and *RB1*. Fragment analyses were performed on 3,730 × I DNA Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) and data analyzed using Coffalyser.Net software. Relative copy number was calculated after intrasample normalization against 13 control probes provided by the manufacturer and intersample normalization against control samples (healthy blood donor DNA). A ratio of  $1 \pm 0.3$  represents a normal copy number of 2, ratios of less than 0.7 and less than 0.3 represent heterozygous and homozygous deletions, respectively, while ratios of more than 1.3 indicate gains.

### 2.6 | Mutation analysis

High-resolution melting (HRM) analysis was performed with 20 ng genomic DNA of 91 *CRLF2* high-expressing pB-ALL cases to identify *CRLF2* mutations in exon 6 and *JAK2* mutations in exon 16 as previously described.<sup>5</sup> The amplification reactions were carried out in 20  $\mu$ l volume with the respective forward and reverse primer (Invitrogen, Darmstadt, Germany) in a final concentration of 4 pM each (Supplementary Table S2) and with 3 mM magnesium chloride (Roche Diagnostics) for *CRLF2* or 3.5 mM for *JAK2*. HRM analysis was performed on the LightCycler 480 instrument (Roche Diagnostics) using High Resolution Melting Master (Roche Diagnostics) as described in the manufacturer's instructions. DNA from a pool of peripheral blood buffy coat of healthy donors was used as a wild-type reference and DNA from a patient carrying R683G *JAK2* mutation or F232C *CRLF2* mutation as a positive control. All fragments with abnormal melting profile were confirmed by Sanger sequencing (GATC Biotech AG, Konstanz, Germany).

### 2.7 | Statistical analysis

Proportional differences between patient groups were analyzed by  $\chi^2$  or Fisher exact tests. Depending on the distribution of variables, correlation analyses were performed by computing contingency tables, Pearson, or Spearman correlation coefficients. Comparison of gene expression between groups was performed using the Mann-Whitney U test.<sup>14</sup> A *P* value less than 0.05 was considered significant.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | *CRLF2* high expression and associated clinical features in T-ALL

*CRLF2* gene expression was prospectively analyzed in all patients treated according to the ongoing AIEOP-BFM ALL 2009 protocol in whom informed consent was given and material was available. Applying a cutoff of fivefold over the median expression as recently described by Palmi et al.,<sup>15</sup> *CRLF2* high expression was detected in 26 of 178 (14.6%) patients with T-ALL. In none of the cases, the *P2RY8/CRLF2* rearrangement was identified. A comparison of T-ALL patients with *CRLF2* high expression to those with a low expression showed no differences in age at diagnosis, sex, initial white blood cell (WBC) count, or central nervous system (CNS) involvement. Most *CRLF2* high-expressing patients with T-ALL were prednisone poor responders (PPRs) in contrast to those with a low expression (16/26 [62%] vs. 53/152 [35%]; *P* = 0.02) and were high-risk patients as measured by flow cytometry ([FCM]-minimal residual disease [MRD]) on treatment day 15 (16/26 [62%] vs. 35/152 [23%]; *P* < 0.001). In contrast to patients with *CRLF2* low-expressing ALL (63/152; 41%), 21 of 26 (81%) patients with a high *CRLF2* expression were altogether stratified into high-risk (HR) treatment group (*P* < 0.001) either by PPR or FCM-MRD (Table 1).

**TABLE 1** Clinical characteristics of patients with T-ALL distinguished by *CRLF2* gene expression level

Characteristics	<i>CRLF2</i> gene expression		P value <sup>a</sup>	Total
	Low	High		
No. of patients (%)	152 (85.4)	26 (14.6)		178 (100)
Age, years (%)			0.67	
1–10	80 (52.6)	12 (46.2)		92 (51.7)
≥10	72 (47.4)	14 (53.8)		86 (48.3)
Sex (%)			1.0	
Male	120 (78.9)	21 (80.8)		141 (79.2)
Female	32 (21.1)	5 (19.2)		37 (20.8)
DS (%)			1.0	
Yes	0 (0)	0 (0)		0 (0)
No	152 (100)	26 (100)		178 (100)
WBC count, $\mu$ l (%)			0.58	
<10,000	22 (14.5)	4 (15.4)		26 (14.6)
10,000 to <50,000	48 (31.6)	5 (19.2)		53 (29.8)
50,000 to <100,000	20 (13.2)	3 (11.5)		23 (12.9)
≥100,000	62 (40.8)	14 (53.8)		76 (42.7)
CNS status (%)			0.69	
CNS negative	114 (75.0)	19 (73.1)		133 (74.7)
CNS positive	14 (9.2)	1 (3.8)		15 (8.4)
No result	24 (15.8)	6 (23.1)		30 (16.9)
Pred response <sup>b</sup> (%)			0.02	
Good	96 (63.2)	10 (38.5)		106 (59.6)
Poor	53 (34.9)	16 (61.5)		69 (38.8)
FCM-MRD risk group <sup>c</sup> (%)			<0.001	
Nonhigh risk	108 (71.1)	6 (23.1)		114 (64.0)
High risk	35 (23.0)	16 (61.5)		51 (28.7)
No result	9 (5.9)	4 (15.4)		13 (7.3)
MRD risk group <sup>d</sup> (%)			0.19	
Standard risk	27 (17.8)	1 (3.8)		28 (15.7)
IR	95 (62.5)	16 (61.5)		111 (62.4)
High risk	13 (8.6)	3 (11.5)		16 (9.0)
No result	17 (11.2)	6 (23.1)		23 (12.9)
Final protocol strata (%)			<0.001	
Standard risk	30 (19.7)	1 (3.8)		31 (17.4)
IR	59 (38.8)	4 (15.4)		63 (35.4)
High risk	63 (41.4)	21 (80.8)		84 (47.2)

<sup>a</sup>Fisher exact test comparing the *CRLF2* high and *CRLF2* low group.

<sup>b</sup>Good: <1,000 leukemic blood blasts/ $\mu$ l on treatment day 8; poor: ≥1,000  $\mu$ l.

<sup>c</sup>Risk stratification by FCM-MRD on treatment day 15; nonhigh risk: <10% blasts; high risk: ≥10% blasts.

<sup>d</sup>Risk stratification by PCR-MRD on treatment day 33 and 78; standard risk: MRD negative at day 33 and day 78; IR: MRD positive at day 33 and/or day 78, and MRD load <10<sup>-3</sup> at day 78; high risk: MRD load ≥10<sup>-3</sup> at day 78. Pred, prednisone.

### 3.2 | Detection and incidence of *CRLF2* high expression and related genetic alterations in pB-ALL

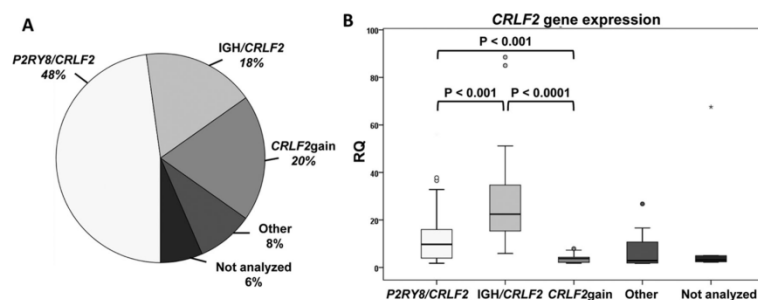
*CRLF2* high expression was identified in 91 of 927 (9.8%) patients with pB-ALL as defined in previous studies by an at least 20-fold expression over the median.<sup>5,7</sup> Recurrent rearrangements like *BCR-ABL1*, *KMT2A-AFF1*, and *ETV6-RUNX1* were absent in cases with *CRLF2* high expression, except for one case with an *ETV6-RUNX1* rearrangement.

The *P2RY8/CRLF2* rearrangement was identified in 52 of 927 (5.6%) pB-ALLs, in 44 of 91 (48.3%) pB-ALL cases with *CRLF2* high expression, and in 8 of 827 (1%) of cases with a low *CRLF2* expression (0.1–6-fold the median). By MLPA, the *P2RY8/CRLF2* rearrangement was detected in 29 of 44 (66%) cases that were tested positive by reverse transcription PCR indicating that the fusion was present in a major clone in these cases. This was confirmed by quantification of the genomic *P2RY8/CRLF2* fusion using TaqMan PCR.

To further characterize *CRLF2* high-expressing pB-ALL without *P2RY8/CRLF2* fusion, 41 fusion-negative cases were analyzed by FISH. *CRLF2* high expression was caused by the *IGH/CRLF2* translocation in 16/91 (17.6%) cases and was associated with supernumerary copies of the *CRLF2* gene in 18/91 (19.8%) cases. In 15 of these 18 cases, information on ploidy was available, and 14 of these 15 ALL were high hyperdiploid. Seven of 91 (7.7%) cases were negative for the *P2RY8/CRLF2* fusion, *IGH/CRLF2* translocation, or supernumerary copies of the *CRLF2* gene suggesting other yet unknown mechanisms of *CRLF2* high expression in these cases. Two of these cases had a *CRLF2* breakpoint, but no breakpoint in the *IGH*, *IGK*, or *IGL* locus. The distribution of underlying genetic aberrations and the respective *CRLF2* gene expression levels in *CRLF2* high-expressing cases are shown in Figure 1: cases with the *IGH/CRLF2* translocation had the highest *CRLF2* gene expression level (median relative quantity [RQ] = 250 $\times$  over the median) compared to cases with the *P2RY8/CRLF2* fusion (median RQ = 100 $\times$  over the median;  $P < 0.001$ ) or supernumerary copies of the *CRLF2* gene (median RQ = 40 $\times$  over the median;  $P < 0.0001$ ).

### 3.3 | Clinical features of *CRLF2* high-expressing pB-ALL cases

Clinical characteristics of patients with *CRLF2* high-expressing pB-ALL classified in the different subgroups are summarized in Table 2. No significant differences for sex, initial WBC count, and CNS involvement were observed between the different subgroups. Patients with *P2RY8/CRLF2*-positive ALL were significantly younger at diagnosis, with a median age of 3 years compared with the patients with the *IGH/CRLF2* translocation with a median age of 14 years ( $P < 0.0001$ ). Sixteen of 25 (64%) patients with Down syndrome (DS) highly expressed *CRLF2*. *CRLF2* high expression was caused by the *P2RY8/CRLF2* fusion for 13 of these 16 (81%) DS patients and by the *IGH/CRLF2* translocation for 3/16 (19%) DS patients. Regarding treatment response, nearly all patients (89/91, 98%) were prednisone good responders (PGRs), independently of the underlying genetic alteration. Most patients with the *P2RY8/CRLF2* rearrangement were stratified in the nonhigh-risk group using minimal residual disease



**FIGURE 1** CRLF2 high-expressing subgroups classified by the presence of different genomic alterations. (A) Incidence of underlying genetic aberrations of CRLF2 high expression in patients with pB-ALL treated according to AIEOP-BFM ALL 2009 protocol. (B) Distribution of the respective CRLF2 gene expression levels of the different CRLF2 high-expressing subgroups analyzed by qRT-PCR. CRLF2 gene expression is represented as RQ determined by comparative Ct analysis. The vertical lines indicate the minimum and maximum of all of the data; the horizontal boundaries of the boxes the first and the third quartile of data; the thick black lines in the middle of the boxes the median of the data. Dots indicate outlier and asterisk extreme outlier. Significant difference in gene expression is judged by Mann-Whitney U test ( $P < 0.05$ )

(MRD) monitoring by PCR (MRD-SR: 15/44, 34%; MRD-IR: 22/44, 50%), as well as patients with supernumerary copies of the CRLF2 gene (MRD-SR: 8/18, 44%; MRD-IR: 9/18, 50%). Thus, most patients with the P2RY8/CRLF2 fusion were finally stratified into the standard risk (SR) (16/44; 36%) or IR (21/44; 48%) treatment groups. Similarly, most patients with supernumerary copies of the CRLF2 gene were finally stratified into the SR (8/18; 44%) or IR (8/18; 44%) treatment groups. In contrast, 8/16 (50%) patients with the IGH/CRLF2 translocation were highly MRD positive ( $\geq 10^{-3}$ ) at day 33 and had still measurable MRD ( $< 10^{-3}$ ) on treatment day 78, which qualified these patients as MRD-slow early responder and allocated them to the HR treatment group. As the time of follow-up is too short, no data on outcome can yet be provided. However, 7 of the 16 (44%) patients with the IGH/CRLF2 translocation already suffered from relapse.

### 3.4 | Additional genetic aberrations in CRLF2 high-expressing cases with pB-ALL

To determine copy number alterations (CNAs) in selected B-cell development and differentiation genes within the different CRLF2 high-expressing subgroups, MLPA analysis was performed. The results are summarized in Supplementary Figure S1. CRLF2 gain was observed in 13 of 44 (30%) cases with the P2RY8/CRLF2 rearrangement, which resulted in a significantly higher CRLF2 gene expression as compared to those without an additional gain (median RQ: 18 vs. 7;  $P = 0.01$ ). No other gains were observed in the P2RY8/CRLF2 subgroup. Moreover, in this subgroup, a deletion in IKZF1 was identified in 11/44 (25%), a deletion in CDKN2A and/or CDKN2B in 14/44 (32%), and a deletion in PAX5 in 14/44 (32%) of cases. Deletions in EBF1, ETV6, BTG1, and RB1 were observed sporadically. Altogether, 31/44 (70%) of cases with the P2RY8/CRLF2 fusion had additional deletions. Only 1 of 16 (6%) cases with the IGH/CRLF2 translocation had a gain in CRLF2. In this subgroup, a deletion in IKZF1 was detected in 12/16 (75%), a deletion in CDKN2A and/or CDKN2B in 6/16 (38%), deletion in PAX5 in 6/16 (38%), and deletion in BTG1 in 7/16 (44%) of cases. Additionally, deletions in EBF1, ETV6, and RB1 were observed in some cases. Altogether 15 of 16 (94%) cases with the IGH/CRLF2 translocation had additional

deletions and no other gains were observed. In contrast, in cases with a CRLF2 high expression associated with supernumerary copies of the CRLF2 gene, additional deletions were rare (3/18; 17%) and gains were more prevalent, which is in line with a hyperdiploid karyotype in 14 of 18 (78%) cases. A heterogeneous distribution of gains and deletions was observed in the subgroup with an unknown cause of CRLF2 high expression.

HRM analysis was performed to detect activating CRLF2 and JAK2 mutations, which were associated with high CRLF2 expression. In 7 of 91 (8%) cases with a CRLF2 high expression, we identified the CRLF2 F232C mutation: in 5/44 (11%) cases with P2RY8/CRLF2 fusion, in 1/16 (6%) case with IGH/CRLF2 translocation, and in 1/7 (14%) case without these aberrations. JAK2 mutations were observed in 14 of 91 (15%) cases with a CRLF2 high expression (nine R683G, three R683S, one F694L, and one insertion mutation: I682delinsGSV): 12/44 (27%) cases with P2RY8/CRLF2 fusion and 2/16 (13%) cases with IGH/CRLF2 translocation were characterized by an additional JAK2 mutation.

## 4 | DISCUSSION

CRLF2 mRNA expression levels and the presence of the P2RY8/CRLF2 fusion were prospectively analyzed in all patients treated according to the ongoing AIEOP-BFM ALL 2009 protocol over a period of 4 years in whom informed consent was given and material was available. CRLF2 high expression was identified in 15% of patients with T-ALL and, applying a different cutoff, in 10% of patients with pB-ALL, which is in line with previous reports.<sup>7,15</sup> Also concordant with other studies, CRLF2 high expression was detected in the majority of patients with DS.<sup>11</sup> For nearly half of the patients with pB-ALL, CRLF2 high expression was caused by the P2RY8/CRLF2 rearrangement; in about two-thirds, this fusion was present in a major clone. For the majority (81%) of patients with DS, CRLF2 high expression was associated with the P2RY8/CRLF2 fusion and only three patients (19%) showed an IGH/CRLF2 translocation. Thus, the P2RY8/CRLF2 rearrangement was present in about half of all patients with DS as already reported by Mullighan et al.<sup>3</sup> and Russell et al.<sup>4</sup> Additionally,

**TABLE 2** Clinical characteristics of *CRLF2* high-expressing patients with pB-ALL according to the genetic alterations

Characteristics	pB-ALL with <i>CRLF2</i> high expression					Total
	<i>P2RY8/CRLF2</i>	<i>IGH/CRLF2</i>	<i>CRLF2</i> gain <sup>a</sup>	Other	N.A.	
No. of patients (%)	44 (48.3)	16 (17.6)	18 (19.8)	7 (7.7)	6 (6.6)	91 (100)
Age, years (%)						
1–10	42 (95.5)	3 (18.8)	13 (72.2)	7 (100)	4 (66.7)	69 (75.8)
≥10	2 (4.5)	13 (81.3)	5 (27.8)	0 (0)	2 (33.3)	22 (24.2)
Sex (%)						
Male	21 (47.7)	12 (75.0)	9 (50.0)	4 (57.1)	3 (50.0)	49 (53.8)
Female	23 (52.3)	4 (25.0)	9 (50.0)	3 (42.9)	3 (50.0)	42 (44.2)
DS (%)						
Yes	13 (29.5)	3 (18.8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	16 (17.6)
No	31 (70.5)	13 (81.3)	18 (100)	7 (100)	6 (100)	75 (82.4)
WBC count, $\mu$ l (%)						
<10,000	18 (40.9)	6 (37.5)	7 (38.9)	1 (14.3)	5 (83.3)	37 (40.6)
10,000 to <50,000	14 (31.8)	4 (25.0)	10 (55.6)	2 (28.6)	1 (16.7)	31 (34.1)
50,000 to <100,000	9 (20.5)	3 (18.8)	0 (0)	3 (42.8)	0 (0)	15 (16.5)
≥100,000	3 (6.8)	3 (18.8)	1 (5.6)	1 (14.3)	0 (0)	8 (8.8)
CNS status (%)						
CNS negative	41 (93.2)	15 (93.8)	16 (88.9)	6 (85.7)	5 (83.3)	83 (91.2)
CNS positive	1 (2.3)	1 (6.3)	1 (5.6)	0 (0)	0 (0)	3 (3.3)
No result	2 (4.6)	0 (0)	1 (5.6)	1 (14.3)	1 (16.7)	5 (5.5)
Pred response (%)						
Good <sup>b</sup>	43 (97.7)	16 (100)	17 (94.4)	7 (100)	6 (100)	89 (97.8)
Poor	1 (2.3)	0 (0)	1 (5.6)	0 (0)	0 (0)	2 (2.2)
FCM-MRD risk group <sup>c</sup> (%)						
Nonhigh risk	37 (84.1)	14 (87.5)	16 (88.9)	5 (71.4)	5 (83.3)	77 (84.6)
High risk	5 (11.4)	2 (12.5)	1 (5.6)	2 (28.6)	1 (16.7)	11 (12.1)
No result	2 (4.5)	0 (0)	1 (5.6)	0 (0)	0 (0)	3 (3.3)
PCR-MRD risk group <sup>d</sup> (%)						
Standard risk	15 (34.1)	2 (12.5)	8 (44.4)	1 (14.3)	3 (50.0)	29 (31.9)
IR <sup>e</sup>	22 (50.0)	5 (31.3)	9 (50.0)	3 (42.8)	2 (33.3)	41 (45.0)
Slow early responder	2 (4.5)	8 (50.0)	0 (0)	2 (28.6)	1 (16.7)	13 (14.3)
High risk	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (14.3)	0 (0)	1 (1.1)
No result	5 (11.4)	1 (6.3)	1 (5.6)	0 (0)	0 (0)	7 (7.7)
Final protocol strata (%)						
Standard risk	16 (36.4)	3 (18.8)	8 (44.4)	1 (14.3)	3 (50.0)	31 (34.1)
IR	21 (47.7)	5 (31.3)	8 (44.4)	2 (28.6)	2 (33.3)	38 (41.7)
High risk	7 (15.9)	8 (50.0)	2 (11.1)	4 (57.1)	1 (16.7)	22 (24.2)

<sup>a</sup>*CRLF2*gain: more than two *CRLF2* copies.

<sup>b</sup>Good: <1,000 leukemic blood blasts/ $\mu$ l on treatment day 8; poor:  $\geq$ 1,000  $\mu$ l.

<sup>c</sup>Risk stratification by FCM-MRD on treatment day 15; nonhigh risk: <10% blasts; high risk:  $\geq$ 10% blasts.

<sup>d</sup>Risk stratification by PCR-MRD on treatment days 33 and 78; standard risk: MRD negative at day 33 and day 78; IR: MRD positive at day 33 and/or day 78, and MRD load  $<10^{-3}$  at day 78; slow early responder: MRD load  $\geq 10^{-3}$  at day 33 and  $<10^{-3}$  at day 78; high risk: MRD load  $\geq 10^{-3}$  at day 78.

<sup>e</sup>MRD-IR group excluding slow early responder.

Pred, prednisone; N.A., not analyzed by FISH.

the *P2RY8/CRLF2* fusion was identified in 1% of patients with pB-ALL without high-expressing *CRLF2*, which is most probably due to a small clone size.<sup>6</sup> Altogether, the *P2RY8/CRLF2* fusion was present in 5.6% of all cases with pB-ALL and none with T-ALL. Thus, the *P2RY8/CRLF2*

rearrangement seems to be restricted to pB-ALL and the mechanisms leading to *CRLF2* high expression in T-ALL are unclear. However, the observation that in T-ALL *CRLF2* high expression per se seems to be a poor prognostic factor even in absence of the *P2RY8/CRLF2* fusion<sup>15</sup> is

supported by the data presented here, as the majority of patients with T-ALL high-expressing *CRLF2* were stratified into the HR group.

For the first time, we systematically screened a large patient cohort of pB-ALL cases with high *CRLF2* expression for additional aberrations beyond the *P2RY8/CRLF2* fusion and identified the *IGH/CRLF2* translocation in a high proportion (18%). Supernumerary copies of the *CRLF2* locus were observed in about 20% of *CRLF2* high-expressing cases, whereas the reason for *CRLF2* high expression is still unknown for about 10% of cases and have to be further investigated, inter alia, for epigenetic modifications. Looking at *in vivo* response to treatment, it is remarkable that nearly all patients with *P2RY8/CRLF2* rearrangement are treatment sensitive and stratified into the SR or IR group, which is in agreement with previous reports.<sup>6,7</sup> In contrast, patients with *IGH/CRLF2* translocation were characterized by treatment resistance. Moreover, compared with a cumulative relapse incidence of 17 and 12% in patients with pB-ALL in trial ALL-BFM 95 and in trial AIEOP-BFM ALL 2000, respectively, the relapse rate of 44% in patients with *IGH/CRLF2* translocation shown here is remarkably high.<sup>1,16</sup> Consequently, in the upcoming ALL BFM trial, all pB-ALL cases will be screened for the presence of the *IGH/CRLF2* translocation in order to confirm this observation. Analysis of CNAs within the different *CRLF2* high-expressing subgroups revealed a high frequency of additional deletions in cases with the *P2RY8/CRLF2* fusion (70%) and the *IGH/CRLF2* translocation (94%). We could not identify any recurrent pattern within the deletions, but it seems that both *CRLF2* high-expressing subgroups are susceptible to additional genomic alterations, which may indicate chromosomal instability. Furthermore, *CRLF2* and *JAK2* mutations were predominantly observed in these two subgroups. While the *P2RY8/CRLF2* deletion involve V(D)J type breaks at recombination signal sequences (RSSs), the *IGH/CRLF2* translocation involve CpG-type break at *CRLF2* and V(D)J type break at *IGH*.<sup>3,17</sup> Thus, in both *CRLF2* rearrangements, an aberrant activity of the recombination-activating gene (RAG) complex creating DNA double-strand breaks (DSBs) are involved.<sup>18</sup> Likewise, deletions of *IKZF1*, *CDKN2A/B*, and *BTG1* are thought to be mediated by aberrant RAG recombination.<sup>19–21</sup> Thus, one could hypothesize that illegitimate RAG activity might be the responsible mechanism for cumulative aberrations, which needs further investigation. In contrast, cases with *CRLF2* high expression associated with supernumerary copies of the *CRLF2* gene were characterized by rare additional deletions and a hyperdiploid karyotype, which is in general not associated with a high risk of relapse.<sup>22</sup>

In summary, not the *CRLF2* high expression alone, but an increased susceptibility for cumulative aberrations of B-cell development-related genes in the context of an enforced proliferation caused by the high *CRLF2* expression might contribute to the high risk of relapse in *P2RY8/CRLF2* and *IGH/CRLF2* fusion positive ALL cases. Further investigation is required to confirm this hypothesis.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to all participants and personnel involved in the clinical trials associated with this work. We thank Christian Bretscher from the ALL-BFM laboratory at the Department of Pediatrics in Kiel as well

as Reina Zühlke-Jenisch from the Institute of Human Genetics in Kiel for their excellent technical assistance.

This project was supported by the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) [grant number FKZ 0316043], the Deutsche Krebshilfe, the European network for cancer research in children and adolescents (ENCCA), the Madeleine Schickedanz-Kinderkrebs-Stiftung, the European TRANSCALL consortium, the KinderKrebsInitiative Buchholz Holm-Seppensen and the European Union's Seventh Framework Programme through the Blueprint Consortium [grant agreement 282510].

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no competing financial interests.

#### REFERENCES

- Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, 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):3206–3214.
- Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, 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):771–782.
- Mullighan CG, Collins-Underwood JR, Phillips LA, et al. Rearrangement of *CRLF2* in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2009;41(11):1243–1246.
- Russell LJ, Capasso M, Vater I, 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):2688–2698.
- Palmi C, Vendramini E, Silvestri D, et al. Poor prognosis for *P2RY8-CRLF2* fusion but not for *CRLF2* over-expression in children with intermediate risk B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2012;26(10):2245–2253.
- Morak M, Attarbaschi A, Fischer S, et al. Small sizes and indolent evolutionary dynamics challenge the potential role of *P2RY8-CRLF2*-harboring clones as main relapse-driving force in childhood ALL. *Blood*. 2012;120(26):5134–5142.
- Cario G, Zimmermann M, Romey R, 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):5393–5397.
- Yano M, Imamura T, Asai D, et al. An overall characterization of pediatric acute lymphoblastic leukemia with 2 overexpression. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014;53(10):815–823.
- Chen IM, Harvey RC, Mullighan CG, et al. Outcome modeling with *CRLF2*, *IKZF1*, *JAK*, and minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood*. 2012;119(15):3512–3522.
- Palmi C, Savino AM, Silvestri D, et al. *CRLF2* over-expression is a poor prognostic marker in children with high risk T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. 2016;7(37):59260–59272.
- Hertzberg L, Vendramini E, Ganmore I, et al. Down syndrome acute lymphoblastic leukemia, a highly heterogeneous disease in which aberrant expression of *CRLF2* is associated with mutated *JAK2*: a report



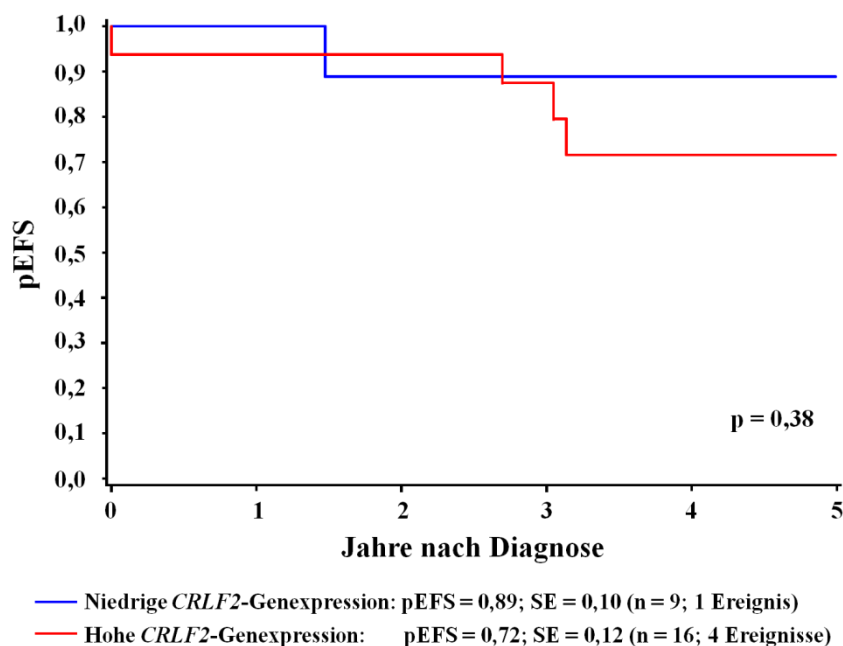
- from the International BFM Study Group. *Blood*. 2010;115(5):1006–1017.
12. Martin-Subero JI, Harder L, Gesk S, et al. Interphase FISH assays for the detection of translocations with breakpoints in immunoglobulin light chain loci. *Int J Cancer*. 2002;98(3):470–474.
  13. Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, et al. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn*. 2006;8(2):141–151.
  14. Mann HB, Whitney DR. On a test of whether one of 2 random variables is stochastically larger than the other. *Ann Math Stat*. 1947;18(1):50–60.
  15. Palmi C, Silvestri D, Bronzini I, et al. CRLF2 over-expression is a poor prognostic marker in children with high risk T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014;124(21).
  16. Moricke A, Zimmermann M, Reiter A, et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia*. 2010;24(2):265–284.
  17. Tsai AG, Yoda A, Weinstock DM, Lieber MR. t(X;14)(p22;q32)/t(Y;14)(p11;q32) CRLF2-IGH translocations from human B-lineage ALLs involve CpG-type breaks at CRLF2, but CRLF2/P2RY8 intrachromosomal deletions do not. *Blood*. 2010;116(11):1993–1994.
  18. Tsai AG, Lu H, Raghavan SC, Muschen M, Hsieh CL, Lieber MR. Human chromosomal translocations at CpG sites and a theoretical basis for their lineage and stage specificity. *Cell*. 2008;135(6):1130–1142.
  19. Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, et al. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature*. 2008;453(7191):110–114.
  20. Kitagawa Y, Inoue K, Sasaki S, et al. Prevalent involvement of illegitimate V(D)J recombination in chromosome 9p21 deletions in lymphoid leukemia. *J Biol Chem*. 2002;277(48):46289–46297.
  21. Waanders E, Scheijen B, van der Meer LT, et al. The origin and nature of tightly clustered BTG1 deletions in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia support a model of multiclonal evolution. *PLoS Genet*. 2012;8(2):e1002533.
  22. McGregor S, McNeer J, Gurbuxani S. Beyond the 2008 World Health Organization classification: the role of the hematopathology laboratory in the diagnosis and management of acute lymphoblastic leukemia. *Semin Diagn Pathol*. 2012;29(1):2–11.

#### SUPPORTING INFORMATION

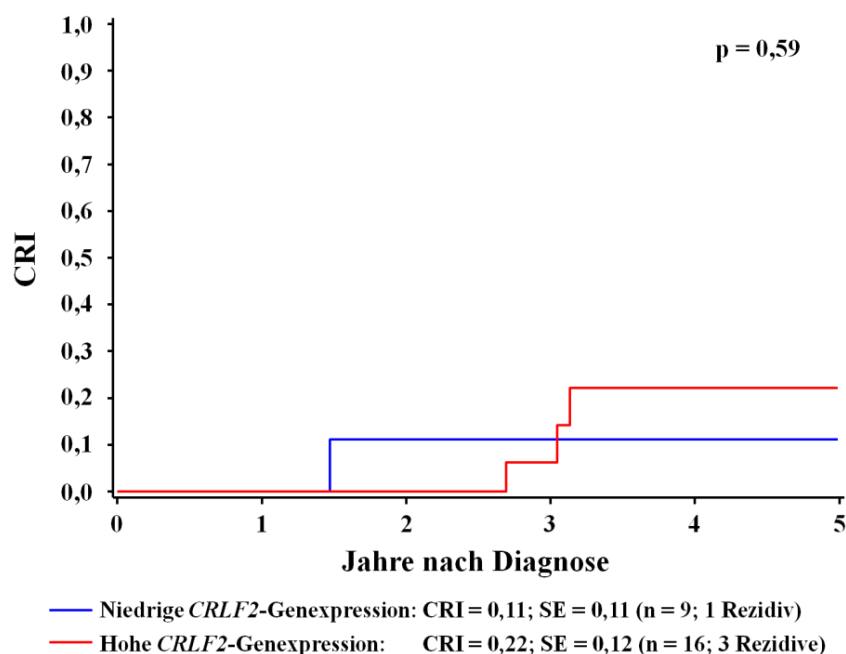
Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

**How to cite this article:** Schmäh J, Fedders B, Panzer-Grümayer R, et al. Molecular characterization of acute lymphoblastic leukemia with high CRLF2 gene expression in childhood. *Pediatr Blood Cancer*. 2017;00:e26539. <https://doi.org/10.1002/pbc.26539>

### 8.3 EFS und CRI für DS-Patienten mit pB-ALL



**Abbildung S1: Überlebenskurven und 5-Jahres EFS-Rate für Patienten mit Down-Syndrom entsprechend des *CRLF2*-Genexpressionslevels.** Die Überlebenszeitanalyse für DS-Patienten mit niedriger (blau) und hoher (rot) *CRLF2*-Genexpression erfolgte nach Kaplan-Meier. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) wurden mit Hilfe des Log-rank-Tests beurteilt. Abkürzungen: pEFS, Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (*probability of event free survival*); SE, Standardfehler (*standard error*); n, Anzahl.



**Abbildung S2: Kumulative Rezidivinzidenz für Patienten mit Down-Syndrom entsprechend des *CRLF2*-Genexpressionslevels.** Die Berechnung der 5-Jahres CRI für DS-Patienten mit niedriger (blau) und hoher (rot) *CRLF2*-Genexpression erfolgte nach der Methode von Kalbfleisch und Prentice. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) wurden mit Hilfe des Gray-Tests beurteilt. Abkürzungen: CRI, kumulative Rezidivinzidenz (*cumulative incidence of relapse*); SE, Standardfehler (*standard error*); n, Anzahl.

## 8.4 Tabelle S2

**Tabelle S2: Liste der signifikant niedriger exprimierten Transkripte in Lymphoblasten der *P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>-Subgruppe im Vergleich zur *P2RY8/CRLF2*<sup>-</sup>-Kontrollgruppe.**

#	Gen	$\log_2(\text{fc}_{\text{MACE}})$	$\log_2(\text{fc}_{\text{ST-DGE}})$	mittlerer $\log_2(\text{fc})$	mittlerer p-Wert
1	IL1R2	-5,419	-5,994	-5,706	6,42E-09
2	LY6H	-6,141	-5,186	-5,664	9,36E-06
3	ZCCHC12	-3,919	-7,093	-5,506	3,28E-14
4	NTRK1	-6,231	-4,751	-5,491	2,46E-36
5	BMP6	-4,585	-6,093	-5,339	4,32E-07
6	IL24	-4,105	-6,396	-5,251	4,89E-09
7	MYT1L	-3,520	-6,859	-5,190	2,61E-08
8	VGF	-5,436	-4,579	-5,007	4,06E-17
9	CLDN5	-4,968	-4,803	-4,885	4,64E-87
10	COL13A1	-5,061	-4,646	-4,853	2,56E-04
11	SORCS2	-5,061	-4,356	-4,709	9,41E-04
12	ITGB5	-4,231	-5,093	-4,662	1,28E-03
13	LOXHD1	-4,195	-5,117	-4,656	3,59E-17
14	DOCK4	-4,148	-5,093	-4,621	3,59E-05
15	SHISA2	-4,685	-4,379	-4,532	3,81E-19
16	LAMB2	-3,383	-5,579	-4,481	1,56E-05
17	TMSB15A	-3,646	-5,093	-4,370	9,35E-03
18	BMP3	-5,190	-3,508	-4,349	1,52E-02
19	KIAA1199	-4,000	-4,587	-4,293	1,02E-21
20	SIX3	-4,383	-4,186	-4,285	1,84E-03
21	RET	-3,968	-4,356	-4,162	9,91E-04
22	PDGFB	-3,148	-5,093	-4,121	1,15E-04
23	TKTL1	-4,646	-3,579	-4,112	4,14E-06
24	SEPT12	-2,761	-5,434	-4,098	1,12E-03
25	LRRC32	-4,011	-3,927	-3,969	7,65E-218
26	ABLIM2	-2,761	-4,994	-3,878	1,15E-03
27	TM4SF1	-2,868	-4,771	-3,820	1,12E-02
28	TNFRSF12A	-2,494	-4,994	-3,744	4,91E-05
29	LOC100507012	-2,968	-4,508	-3,738	8,02E-04
30	GOLIM4	-2,724	-4,646	-3,685	2,41E-04
31	RAMP1	-4,083	-3,212	-3,648	9,39E-13
32	NKX3-1	-2,487	-4,646	-3,567	2,41E-04
33	DDIT4L	-3,907	-3,203	-3,555	1,59E-144
34	GNAT1	-4,383	-2,689	-3,536	2,14E-04
35	PXDC1	-1,535	-5,356	-3,446	1,79E-03
36	HS6ST2	-2,597	-4,186	-3,392	4,99E-06
37	FAM57A	-3,868	-2,887	-3,378	8,13E-04
38	PPAP2B	-3,743	-2,941	-3,342	2,37E-11
39	IL3RA	-3,233	-3,338	-3,285	6,01E-127
40	ZC3H12C	-3,309	-3,186	-3,248	1,29E-04
41	NACAD	-2,761	-3,710	-3,236	1,12E-03
42	CAP2	-1,283	-5,186	-3,235	8,9E-02
43	PMEPA1	-2,156	-4,274	-3,215	2,33E-07
44	IER3	-3,042	-3,308	-3,175	3,15E-139

45	OPLAH	-2,834	-3,508	-3,171	7,62E-08
46	SULF2	-3,174	-3,153	-3,164	1,79E-42
47	SPRED2	-4,868	-1,356	-3,112	1,06E-02
48	CXCR7	-3,254	-2,970	-3,112	1,58E-25
49	NOV	-3,968	-2,196	-3,082	2,94E-20
50	F3	-2,693	-3,449	-3,071	1,59E-06
51	IVNS1ABP	-3,009	-3,096	-3,053	1,49E-145
52	BDKRB2	-2,868	-3,186	-3,027	2,79E-06
53	RIN2	-2,771	-3,254	-3,013	2,86E-13
54	PPFIBP2	-2,646	-3,356	-3,001	2,46E-05
55	IER5L	-1,724	-4,186	-2,955	1,84E-03
56	ARNT2	-1,919	-3,941	-2,930	1,21E-04
57	SEC14L2	-2,646	-3,210	-2,928	5,52E-20
58	SPRED1	-1,798	-3,959	-2,878	2,18E-07
59	SPRY4	-2,761	-2,994	-2,878	1,12E-03
60	TMEM158	-2,868	-2,836	-2,852	1,16E-15
61	BMPR1B	-1,605	-4,093	-2,849	1,84E-04
62	WNT11	-3,120	-2,508	-2,814	3,39E-06
63	CNKSR3	-2,283	-3,222	-2,753	2,19E-03
64	GLT1D1	-3,136	-2,369	-2,752	4,83E-10
65	EMILIN2	-2,313	-3,108	-2,711	7,63E-23
66	SGK1	-2,038	-3,307	-2,673	3,32E-71
67	PDE2A	-1,873	-3,434	-2,654	4,15E-16
68	CABLES1	-2,254	-3,023	-2,638	9,61E-06
69	CCND1	-3,127	-2,117	-2,622	8,20E-14
70	C16orf45	-3,646	-1,594	-2,620	8,54E-07
71	SDC4	-1,954	-3,274	-2,614	3,46E-07
72	MAFF	-1,777	-3,434	-2,606	1,64E-09
73	EXOSC4	-2,428	-2,643	-2,535	9,70E-55
74	PBX4	-1,739	-3,324	-2,531	1,56E-04
75	EPPK1	-2,061	-2,994	-2,527	2,15E-03
76	AGPAT9	-2,646	-2,388	-2,517	2,11E-03
77	LOC256021	-3,309	-1,701	-2,505	2,08E-03
78	ATP9A	-2,270	-2,689	-2,480	1,95E-06
79	IPCEF1	-2,676	-2,260	-2,468	2,18E-12
80	HBZ	-1,646	-3,274	-2,460	1,70E-04
81	SLAMF1	-3,148	-1,689	-2,419	4,32E-03
82	SYNJ2	-2,309	-2,518	-2,414	1,17E-11
83	RNF165	-2,195	-2,615	-2,405	9,90E-24
84	NOTCH2	-2,035	-2,771	-2,403	7,42E-08
85	TREM1	-2,263	-2,540	-2,401	9,62E-09
86	SYTL3	-2,326	-2,390	-2,358	4,87E-20
87	SLC26A11	-2,093	-2,611	-2,352	6,48E-07
88	DOCK9	-2,015	-2,672	-2,344	4,75E-05
89	CD83	-2,052	-2,620	-2,336	2,09E-62
90	STX11	-1,715	-2,925	-2,320	1,10E-18
91	TBC1D8	-2,131	-2,508	-2,320	4,12E-04
92	CCL17	-2,189	-2,431	-2,310	5,94E-160
93	EGR2	-1,898	-2,701	-2,299	3,59E-04
94	NR1D1	-1,904	-2,680	-2,292	5,88E-08

95	LOC100509457	-2,035	-2,545	-2,290	3,25E-38
96	SEZ6	-2,283	-2,257	-2,270	2,39E-03
97	CD109	-1,582	-2,923	-2,253	5,92E-14
98	GAS2L3	-2,120	-2,302	-2,211	2,52E-03
99	EXT1	-3,061	-1,356	-2,209	5,16E-02
100	SOX7	-1,696	-2,672	-2,184	2,85E-15
101	CECR6	-2,789	-1,570	-2,179	2,92E-10
102	FAM108C1	-2,513	-1,845	-2,179	2,10E-28
103	HLA-DQA2	-1,254	-3,093	-2,173	2,30E-02
104	MTSS1L	-1,515	-2,763	-2,139	3,95E-21
105	RHBDF1	-1,283	-2,971	-2,127	4,86E-04
106	KLF9	-2,223	-1,954	-2,088	1,36E-88
107	SLCO4A1	-2,087	-2,079	-2,083	8,94E-05
108	CACNA2D4	-2,220	-1,930	-2,075	4,08E-10
109	SNX9	-1,727	-2,386	-2,057	3,45E-42
110	TGFBR1	-2,324	-1,788	-2,056	4,43E-10
111	ZNF711	-2,787	-1,269	-2,028	9,79E-04
112	SIPA1L1	-2,401	-1,622	-2,011	8,26E-13
113	NRN1	-1,830	-2,163	-1,997	5,38E-09
114	NGFR	-2,097	-1,864	-1,981	2,23E-08
115	KLHL5	-1,870	-2,056	-1,963	1,12E-68
116	JDP2	-1,489	-2,423	-1,956	1,71E-15
117	RAB20	-1,502	-2,399	-1,950	2,04E-04
118	FTH1	-1,583	-2,288	-1,936	2,04E-04
119	ERMN	-2,047	-1,816	-1,931	7,53E-13
120	ZBTB16	-2,320	-1,521	-1,920	3,25E-06
121	PTPRS	-1,498	-2,333	-1,916	1,96E-06
122	NAB2	-1,746	-2,085	-1,915	1,03E-05
123	RDH10	-1,771	-2,030	-1,901	2,95E-08
124	DGKD	-1,807	-1,973	-1,890	7,05E-149
125	IGFBP4	-1,443	-2,300	-1,872	1,19E-22
126	PDE3B	-1,821	-1,897	-1,859	8,10E-12
127	EMP1	-2,076	-1,603	-1,840	7,14E-34
128	SERPINE2	-2,061	-1,601	-1,831	4,12E-02
129	GPRASP1	-2,361	-1,302	-1,831	3,63E-03
130	FERMT2	-1,771	-1,870	-1,821	2,15E-08
131	IL21R	-1,533	-2,058	-1,796	3,12E-19
132	ST8SIA5	-1,267	-2,313	-1,790	1,68E-08
133	FTH1P3	-1,709	-1,864	-1,787	1,08E-06
134	TSC22D1	-1,665	-1,896	-1,780	5,76E-118
135	NOS2	-1,898	-1,646	-1,772	1,66E-06
136	FGFR1	-1,926	-1,570	-1,748	3,37E-20
137	EIF2C2	-1,584	-1,911	-1,747	5,63E-46
138	BCL6B	-1,955	-1,534	-1,744	9,71E-20
139	CRIM1	-1,919	-1,552	-1,735	1,85E-31
140	MT2A	-1,793	-1,678	-1,735	1,28E-54
141	LOC339535	-1,231	-2,237	-1,734	6,97E-02
142	PDGFA	-1,637	-1,817	-1,727	3,22E-29
143	ANTXR2	-1,524	-1,911	-1,718	1,65E-08
144	ANKRD33B	-1,853	-1,573	-1,713	2,00E-04

145	PELI1	-1,610	-1,812	-1,711	1,95E-33
146	FASN	-1,365	-2,045	-1,705	1,10E-39
147	ITGA6	-1,380	-2,024	-1,702	6,44E-18
148	ETV5	-1,393	-1,990	-1,691	1,82E-06
149	DUSP5	-2,273	-1,107	-1,690	5,99E-16
150	PLEKHG1	-1,747	-1,614	-1,680	1,57E-21
151	IL4R	-1,635	-1,708	-1,672	4,97E-24
152	APP	-1,499	-1,845	-1,672	2,06E-21
153	FNDC3B	-1,213	-2,125	-1,669	1,49E-02
154	NT5C3	-1,898	-1,436	-1,667	5,20E-17
155	SCML1	-1,148	-2,177	-1,663	8,59E-06
156	TBL1X	-1,902	-1,422	-1,662	7,93E-15
157	SGCB	-1,405	-1,887	-1,646	8,70E-04
158	POU6F1	-1,486	-1,799	-1,642	2,50E-05
159	SKI	-1,665	-1,613	-1,639	5,48E-54
160	MN1	-1,618	-1,655	-1,637	3,99E-10
161	FMNL2	-1,181	-2,091	-1,636	3,73E-04
162	TLE3	-1,483	-1,777	-1,630	2,91E-17
163	KIAA1462	-1,798	-1,449	-1,624	2,58E-03
164	LMBR1	-1,402	-1,834	-1,618	3,94E-04
165	ADAM9	-1,668	-1,565	-1,616	7,99E-05
166	ECE1	-1,709	-1,508	-1,609	9,41E-02
167	HIVEP1	-1,103	-2,112	-1,608	7,97E-05
168	XIRP1	-1,122	-2,093	-1,607	1,62E-08
169	UPP1	-1,806	-1,379	-1,592	1,39E-02
170	LOC100507278	-1,646	-1,537	-1,591	1,28E-04
171	RAPGEF1	-1,310	-1,832	-1,571	1,43E-42
172	DKFZp451A211	-1,779	-1,356	-1,568	5,15E-02
173	APBB1	-1,283	-1,840	-1,562	3,97E-06
174	SYAP1	-1,278	-1,839	-1,558	5,52E-26
175	CTPS2	-1,383	-1,722	-1,553	6,92E-06
176	LOC100507672	-1,753	-1,350	-1,552	1,29E-09
177	RP9P	-1,839	-1,251	-1,545	2,72E-04
178	TMEM184B	-1,356	-1,718	-1,537	8,72E-07
179	SH2D2A	-1,187	-1,887	-1,537	9,75E-03
180	SEMA3F	-1,603	-1,463	-1,533	6,07E-23
181	CXCL16	-1,148	-1,905	-1,527	2,73E-08
182	GRK5	-1,629	-1,406	-1,518	8,31E-09
183	CCL4	-1,254	-1,755	-1,504	2,35E-03
184	GPR183	-1,592	-1,404	-1,498	7,99E-06
185	SRGN	-1,766	-1,218	-1,492	1,06E-103
186	N4BP3	-1,220	-1,737	-1,478	1,84E-09
187	IL1R1	-1,131	-1,819	-1,475	1,75E-02
188	NFKB1	-1,156	-1,792	-1,474	6,53E-27
189	GFOD1	-1,626	-1,310	-1,468	4,43E-16
190	RILPL2	-1,219	-1,715	-1,467	2,67E-39
191	C19orf59	-1,325	-1,585	-1,455	7,60E-26
192	SLC15A4	-1,667	-1,235	-1,451	7,96E-19
193	GOT1	-1,245	-1,611	-1,428	1,35E-05
194	ACSL1	-1,614	-1,241	-1,428	4,99E-20

---

195	TCEAL3	-1,291	-1,559	-1,425	6,79E-10
196	CD40	-1,306	-1,534	-1,420	8,25E-04
197	SGSH	-1,570	-1,262	-1,416	2,99E-06
198	RRBP1	-1,236	-1,582	-1,409	1,08E-25
199	CACUL1	-1,266	-1,547	-1,406	4,57E-14
200	IZUMO4	-1,502	-1,302	-1,402	2,90E-02
201	CRADD	-1,128	-1,618	-1,373	8,10E-06
202	NDRG1	-1,121	-1,526	-1,324	5,23E-71

---

Abkürzungen: fc, Genexpressionsunterschied (*fold change*); MACE, *massive analysis of cDNA ends*; ST-DGE, *SuperTag digital gene expression*.

## 8.5 Tabelle S3

**Tabelle S3: Liste der signifikant höher exprimierten Transkripte in Lymphoblasten der *P2RY8/CRLF2*<sup>+</sup>-Subgruppe im Vergleich zur *P2RY8/CRLF2*<sup>-</sup>-Kontrollgruppe.**

#	Gen	log <sub>2</sub> (fc <sub>MACE</sub> )	log <sub>2</sub> (fc <sub>ST-DGE</sub> )	mittlerer log <sub>2</sub> (fc)	mittlerer p-Wert
1	RIPK4	5,331	7,171	6,251	1,44E-11
2	FAM19A5	5,893	6,136	6,014	5,06E-09
3	MOV10L1	5,583	5,399	5,491	5,45E-07
4	C1orf222	4,261	6,514	5,387	8,94E-04
5	BIRC7	4,746	6,023	5,385	7,71E-05
6	NDN	4,639	5,621	5,130	1,41E-04
7	PTPRK	4,224	5,984	5,104	1,12E-09
8	PPBP	5,026	4,814	4,920	4,86E-05
9	BRSK1	4,331	5,206	4,769	4,88E-06
10	NFATC4	3,813	5,399	4,606	4,11E-07
11	FSTL5	4,398	4,721	4,559	5,43E-04
12	ITGA7	4,109	4,814	4,461	1,71E-03
13	SH3BGR	3,746	5,062	4,404	6,01E-03
14	RASAL1	4,846	3,672	4,259	4,26E-05
15	LINC00487	3,261	5,206	4,233	2,24E-03
16	KCNQ5	3,524	4,621	4,072	7,65E-04
17	ITGA2B	2,354	5,337	3,846	1,19E-03
18	PRKCG	2,172	5,514	3,843	4,98E-07
19	LOC100130275	3,261	4,399	3,830	2,60E-03
20	LOC100507314	2,939	4,721	3,830	7,76E-03
21	HOTAIRM1	2,998	4,621	3,809	1,21E-04
22	MMRN1	2,261	5,273	3,767	9,55E-03
23	SOX11	2,602	4,901	3,752	2,05E-05
24	SYCP2	2,161	5,337	3,749	3,50E-03
25	PF4	2,261	5,136	3,698	2,05E-03
26	SPATC1	2,524	4,814	3,669	4,34E-04
27	TCEANC	2,398	4,901	3,650	5,47E-03
28	TMEM63C	2,023	5,206	3,614	2,13E-06
29	MGC23284	2,939	4,136	3,537	1,51E-03
30	MST1R	2,398	4,621	3,510	5,56E-03
31	P4HA2	2,961	3,984	3,472	6,23E-09
32	CALD1	2,617	4,273	3,445	6,65E-04
33	CTF1	1,676	5,206	3,441	2,73E-02
34	MGC39372	3,746	3,136	3,441	2,65E-02
35	CYP4V2	1,454	5,399	3,426	2,64E-04
36	C17orf57	1,939	4,901	3,420	3,61E-03
37	ARHGAP22	2,318	4,514	3,416	2,65E-04
38	CADPS2	2,354	4,399	3,376	1,56E-03
39	B4GALNT4	3,653	3,026	3,339	2,75E-22
40	ACP6	2,878	3,721	3,299	2,40E-05
41	ECM2	2,054	4,514	3,284	6,13E-03
42	PIP5K1B	1,398	5,136	3,267	3,87E-02
43	TNFRSF13B	2,524	3,984	3,254	2,61E-03
44	PPP1R13L	1,318	5,062	3,190	3,34E-02
45	EPHX2	1,746	4,621	3,184	4,90E-02



46	DUSP26	1,463	4,901	3,182	2,25E-05
47	ANKRD46	1,219	5,136	3,177	2,42E-02
48	SLC27A4	1,524	4,814	3,169	2,32E-04
49	RGS18	1,939	4,399	3,169	8,98E-02
50	MRAS	1,261	5,062	3,161	1,36E-02
51	KRT8	3,054	3,206	3,130	3,54E-05
52	EFEMP2	2,797	3,457	3,127	1,88E-10
53	FBXO43	3,109	3,136	3,122	4,21E-03
54	VNN2	1,331	4,901	3,116	9,42E-03
55	NEGR1	1,466	4,721	3,093	1,20E-04
56	SCML4	1,848	4,321	3,085	8,38E-15
57	ECHDC2	2,324	3,843	3,084	1,20E-07
58	TMEM194B	1,441	4,721	3,081	1,24E-02
59	KCNA6	1,746	4,399	3,072	4,92E-02
60	DNASE1L2	1,746	4,399	3,072	4,92E-02
61	ADCK5	1,524	4,621	3,072	1,16E-04
62	KCNN1	3,893	2,206	3,050	1,84E-06
63	SPINT1	1,906	4,136	3,021	1,21E-03
64	CHPF	3,639	2,399	3,019	4,95E-03
65	AARS	1,552	4,399	2,975	3,66E-04
66	ELANE	1,318	4,621	2,969	1,34E-04
67	MMS22L	1,441	4,399	2,920	1,27E-02
68	MRM1	1,261	4,399	2,830	6,04E-02
69	BTNL9	2,524	3,099	2,811	3,90E-08
70	CAPN12	1,813	3,672	2,743	1,29E-03
71	CARNS1	2,302	3,136	2,719	2,65E-02
72	TCL6	2,454	2,984	2,719	4,33E-07
73	PARP10	2,224	3,206	2,715	7,44E-09
74	TCL1B	3,233	2,193	2,713	1,49E-58
75	RASSF4	1,434	3,984	2,709	2,22E-03
76	HS1BP3	2,639	2,768	2,704	2,09E-05
77	CST3	1,901	3,477	2,689	1,25E-08
78	LOC100506848	3,639	1,721	2,680	9,75E-03
79	PI16	3,372	1,984	2,678	2,58E-04
80	HAR1B	2,524	2,814	2,669	5,67E-04
81	LOC100887755	2,354	2,984	2,669	1,19E-03
82	AIF1L	2,261	3,072	2,667	5,81E-06
83	S1PR1	2,195	3,136	2,665	5,56E-05
84	ANGPTL6	1,902	3,399	2,651	1,41E-02
85	PYCR1	2,554	2,734	2,644	1,47E-08
86	TMEM79	3,054	2,229	2,642	2,78E-05
87	BEST3	2,813	2,457	2,635	1,11E-04
88	ABCA7	2,378	2,882	2,630	5,71E-38
89	RAB11FIP5	2,380	2,873	2,626	1,80E-05
90	GABRD	3,846	1,399	2,622	2,18E-02
91	PHLDB2	3,261	1,984	2,622	2,29E-03
92	CNFN	1,939	3,299	2,619	7,18E-05
93	SLC25A35	2,983	2,229	2,606	2,00E-03
94	CAND2	3,639	1,514	2,577	2,34E-02
95	PYHIN1	1,893	3,206	2,550	3,12E-05

96	KIAA1407	2,398	2,688	2,543	8,52E-05
97	TMEM121	1,878	3,206	2,542	8,35E-04
98	GNAZ	2,676	2,399	2,537	2,46E-04
99	LINC00174	1,676	3,399	2,537	2,73E-02
100	TRPM4	2,558	2,498	2,528	2,09E-07
101	ADARB2-AS1	2,054	2,984	2,519	6,09E-03
102	KLK1	2,746	2,292	2,519	9,81E-04
103	CD70	2,524	2,514	2,519	4,39E-04
104	C16orf74	2,712	2,308	2,510	7,40E-08
105	TTC5	1,746	3,273	2,510	4,89E-02
106	C19orf57	2,054	2,943	2,499	5,92E-03
107	FCRL1	3,109	1,873	2,491	6,54E-04
108	TRIM47	2,571	2,399	2,485	2,34E-05
109	S100A11	1,719	3,229	2,474	3,74E-07
110	STK32C	1,524	3,399	2,461	4,65E-03
111	MRVII-AS1	2,224	2,621	2,423	1,67E-05
112	FPR1	1,705	3,136	2,420	5,65E-03
113	AMICA1	1,261	3,569	2,415	2,85E-02
114	NTSR1	2,009	2,791	2,400	8,08E-04
115	CBR4	1,990	2,752	2,371	1,16E-04
116	PPP1R14A	3,219	1,471	2,345	2,63E-04
117	ENDOV	1,500	3,136	2,318	8,21E-06
118	CORO2B	2,341	2,285	2,313	2,08E-06
119	ZDHHC21	1,602	3,023	2,313	5,15E-03
120	MAP4K1	1,212	3,399	2,305	1,41E-02
121	SMA5	1,206	3,399	2,303	1,42E-02
122	PCDH9	2,779	1,814	2,297	6,96E-11
123	VPREB1	1,785	2,807	2,296	6,96E-11
124	DTX1	2,410	2,176	2,293	1,05E-05
125	C5orf63	1,524	3,062	2,293	6,52E-04
126	NLRP2	3,068	1,507	2,287	1,43E-07
127	LCN8	2,246	2,292	2,269	2,43E-06
128	SMC1B	1,689	2,814	2,251	6,13E-04
129	DEFA4	2,109	2,372	2,240	1,13E-04
130	C6orf25	2,302	2,163	2,232	3,48E-06
131	CDCA3	1,398	3,062	2,230	3,88E-02
132	NME3	1,440	2,953	2,196	1,75E-10
133	HIST1H4I	1,846	2,542	2,194	5,90E-03
134	SH3GLB2	1,171	3,192	2,182	1,60E-10
135	SEC11C	1,189	3,167	2,178	5,35E-06
136	C14orf149	2,746	1,605	2,176	1,03E-03
137	MLC1	2,602	1,748	2,175	7,51E-10
138	TPBG	1,911	2,426	2,169	1,00E-06
139	S100A9	1,260	3,074	2,167	1,91E-20
140	RNASE6	2,746	1,574	2,160	9,83E-04
141	CDK2AP2	1,314	2,984	2,149	1,98E-07
142	TMEM5	2,161	2,136	2,148	3,50E-03
143	SYTL1	1,594	2,675	2,134	3,54E-17
144	LOC100506334	1,712	2,551	2,131	2,87E-04
145	FRMD4A	1,261	2,984	2,122	1,41E-02

146	TNFSF12	1,234	2,984	2,109	6,17E-03
147	PLD4	1,307	2,901	2,104	2,94E-04
148	FGD2	1,922	2,261	2,091	5,77E-10
149	NEO1	2,602	1,579	2,091	9,55E-03
150	ERBB2	2,441	1,740	2,091	7,74E-04
151	LTB	2,034	2,133	2,084	1,11E-252
152	C16orf86	1,746	2,399	2,072	1,07E-04
153	LRRC45	2,091	2,044	2,067	5,16E-08
154	CYBB	1,990	2,123	2,056	4,55E-14
155	SIPA1L3	2,617	1,492	2,054	8,52E-06
156	LINC00264	1,473	2,630	2,051	1,95E-07
157	ST20	1,280	2,814	2,047	1,11E-03
158	SLC38A10	1,769	2,323	2,046	2,65E-24
159	PNPLA4	1,939	2,136	2,037	1,33E-03
160	ESAM	1,617	2,446	2,031	8,89E-03
161	OAS3	1,393	2,669	2,031	1,29E-09
162	LIMS2	1,635	2,420	2,028	1,44E-14
163	RGS14	1,738	2,299	2,019	2,98E-09
164	CUL7	1,846	2,183	2,014	2,48E-07
165	TMEM91	2,435	1,591	2,013	5,63E-07
166	DICER1-AS1	1,939	2,062	2,000	1,34E-03
167	LOC100505801	2,602	1,399	2,000	1,01E-02
168	IGLL3P	1,524	2,457	1,991	1,63E-02
169	EPHA7	2,135	1,829	1,982	5,67E-08
170	LRRC16B	1,354	2,591	1,973	05,47E-03
171	H2AFY2	1,293	2,644	1,968	8,12E-03
172	CSTA	2,331	1,579	1,955	9,59E-03
173	COCH	1,602	2,299	1,951	5,20E-03
174	PRSS21	1,591	2,299	1,945	3,00E-03
175	LOC100130476	1,219	2,662	1,940	2,63E-03
176	HBM	1,585	2,264	1,925	1,09E-125
177	GSDMB	1,511	2,337	1,924	1,92E-04
178	MMP28	1,865	1,977	1,921	5,72E-09
179	CIB2	1,219	2,621	1,920	2,42E-02
180	S100A1	1,354	2,477	1,915	1,89E-02
181	AGFG2	1,746	2,062	1,904	2,50E-05
182	OPRL1	1,746	2,062	1,904	2,08E-03
183	CSRP2BP	1,705	2,099	1,902	5,60E-03
184	ZNF232	1,524	2,273	1,899	8,03E-03
185	CCDC85C	1,398	2,399	1,899	2,08E-04
186	EBF4	1,832	1,960	1,896	5,97E-04
187	LAMA5	1,293	2,477	1,885	8,12E-03
188	RNASE2	1,631	2,136	1,883	1,34E-02
189	PCBP3	1,746	2,001	1,874	9,61E-03
190	IGLL5	1,645	2,095	1,870	3,34E-114
191	EVC2	2,261	1,477	1,869	9,42E-03
192	ACRBP	1,775	1,960	1,868	8,85E-04
193	FP588	1,261	2,457	1,859	6,01E-03
194	POMC	1,865	1,853	1,859	7,85E-05
195	KCNA5	2,448	1,242	1,845	2,44E-03

196	FIG4	1,202	2,457	1,830	2,32E-03
197	MYO7B	1,605	2,051	1,828	7,89E-09
198	TBX21	1,684	1,970	1,827	2,05E-06
199	CAD	1,468	2,180	1,824	1,44E-08
200	LOC285972	2,132	1,514	1,823	3,01E-04
201	ITIH3	1,971	1,672	1,822	2,59E-06
202	CCS	1,139	2,499	1,819	1,31E-11
203	TERT	1,120	2,514	1,817	4,59E-03
204	C16orf79	1,224	2,399	1,811	1,35E-03
205	DECR2	1,689	1,929	1,809	1,00E-04
206	MAPK12	1,276	2,337	1,807	2,94E-04
207	CPAMD8	1,202	2,399	1,800	1,02E-02
208	COMTD1	1,463	2,136	1,799	2,40E-06
209	NUP210	1,695	1,897	1,796	7,11E-19
210	MDGA1	1,998	1,591	1,795	1,19E-06
211	PYGM	1,617	1,957	1,787	2,08E-05
212	LOC100506115	1,746	1,814	1,780	9,78E-03
213	HLA-DOB	2,109	1,446	1,777	1,57E-03
214	CFD	2,017	1,536	1,777	6,69E-04
215	ZNF507	2,176	1,366	1,771	3,56E-04
216	FAM78A	1,125	2,415	1,770	1,32E-04
217	PLD6	1,775	1,752	1,764	7,90E-04
218	LTK	1,813	1,711	1,762	8,97E-14
219	ALDH4A1	2,308	1,214	1,761	8,80E-05
220	ANO9	1,832	1,688	1,760	2,98E-03
221	PDZK1IP1	1,787	1,731	1,759	2,59E-04
222	ACBD4	1,109	2,399	1,754	1,57E-03
223	LOC100505761	1,700	1,801	1,750	8,08E-07
224	LOC100130503	1,219	2,282	1,750	3,15E-04
225	FAM173A	1,393	2,099	1,746	2,02E-05
226	TNFSF9	2,331	1,158	1,744	5,14E-03
227	MZF1	1,418	2,054	1,736	3,72E-10
228	ACSS1	1,614	1,852	1,733	5,04E-45
229	HMG20A	1,524	1,941	1,733	3,31E-06
230	CD300LF	1,224	2,237	1,731	1,35E-03
231	ODZ4	2,261	1,192	1,727	9,44E-03
232	CYTL1	1,435	2,001	1,718	5,79E-10
233	LOC100506100	1,161	2,273	1,717	7,41E-03
234	FAM69C	1,452	1,980	1,716	7,29E-11
235	LHPP	1,934	1,494	1,714	2,62E-17
236	COG4	1,318	2,102	1,710	3,34E-09
237	TFAP2E	1,380	2,036	1,708	1,10E-02
238	GATA3	1,717	1,695	1,706	9,42E-06
239	AEBP1	2,008	1,399	1,703	1,37E-03
240	MPND	1,351	2,055	1,703	1,24E-10
241	PLCG2	1,623	1,775	1,699	8,58E-09
242	C9orf37	1,870	1,508	1,689	1,54E-07
243	HBG1	1,766	1,608	1,687	2,26E-197
244	HHAT	1,398	1,969	1,684	6,27E-03
245	FAM125A	1,154	2,208	1,681	1,88E-07

246	SUSD3	1,471	1,876	1,673	1,58E-12
247	CRTC1	1,503	1,843	1,673	1,80E-06
248	CCDC106	1,524	1,814	1,669	4,77E-04
249	KIAA0895L	1,405	1,929	1,667	9,03E-03
250	LOC100506936	1,354	1,979	1,666	1,65E-03
251	MYL9	1,769	1,561	1,665	2,29E-04
252	ATG16L2	1,207	2,096	1,652	1,33E-15
253	LRRN2	1,524	1,768	1,646	8,25E-02
254	FCN1	1,545	1,743	1,644	9,63E-12
255	LOC100506459	1,723	1,557	1,640	2,78E-04
256	PNKP	1,316	1,957	1,636	3,25E-10
257	ABHD14A	1,448	1,814	1,631	1,47E-03
258	CENPM	1,249	2,006	1,628	7,01E-05
259	SIGMAR1	1,328	1,918	1,623	9,17E-06
260	DHX58	1,261	1,984	1,622	5,13E-04
261	KIAA1683	1,615	1,621	1,618	1,15E-15
262	ARHGEF4	2,082	1,145	1,614	6,90E-05
263	PQLC3	1,287	1,939	1,613	4,11E-03
264	APOBEC3D	1,546	1,665	1,605	1,37E-06
265	OAS2	1,512	1,693	1,602	8,05E-10
266	ZNF692	1,653	1,551	1,602	1,26E-06
267	SLC14A1	1,161	2,036	1,599	2,67E-05
268	CTSG	1,797	1,399	1,598	2,17E-02
269	CCDC154	1,588	1,602	1,595	1,90E-04
270	FAM129C	1,522	1,666	1,594	5,79E-22
271	HK3	1,787	1,399	1,593	3,59E-03
272	MRVII	1,705	1,478	1,591	1,95E-07
273	SOWAHD	1,415	1,761	1,588	6,78E-04
274	ENO3	1,272	1,904	1,588	2,25E-05
275	LOC100506532	1,939	1,229	1,584	9,11E-03
276	RAG1	1,681	1,485	1,583	6,57E-09
277	TXNRD2	1,362	1,803	1,582	3,06E-05
278	PIEZO1	1,482	1,679	1,580	5,45E-27
279	SMIM1	1,243	1,901	1,572	7,86E-06
280	TSPO2	1,278	1,853	1,565	5,63E-04
281	CCDC88B	1,472	1,654	1,563	1,23E-13
282	FZD6	1,261	1,864	1,563	2,10E-03
283	TMEM44	1,417	1,704	1,561	3,93E-04
284	LOC100652888	1,306	1,814	1,560	6,12E-04
285	TCF19	1,104	2,012	1,558	7,11E-05
286	ANKS3	1,689	1,419	1,554	1,05E-04
287	GAS6-AS1	1,242	1,864	1,553	1,57E-03
288	DOK1	1,705	1,399	1,552	4,01E-04
289	ACAP1	1,434	1,666	1,550	3,27E-34
290	PMS1	1,380	1,721	1,550	1,03E-03
291	TMCO4	1,464	1,634	1,549	1,08E-09
292	MZB1	1,141	1,949	1,545	5,69E-118
293	PUSL1	1,338	1,744	1,541	2,80E-03
294	SMUG1	1,769	1,308	1,539	3,08E-03
295	FOXP1-IT1	1,591	1,481	1,536	3,17E-05

296	SOX12	1,600	1,466	1,533	5,65E-03
297	OAS1	1,214	1,840	1,527	1,81E-05
298	HTRA3	1,627	1,421	1,524	1,50E-05
299	OIP5	1,187	1,858	1,522	2,07E-02
300	TBC1D10C	1,290	1,753	1,521	1,08E-58
301	CRELD2	1,182	1,861	1,521	5,00E-13
302	CCDC111	1,705	1,337	1,521	5,91E-03
303	MTHFSD	1,417	1,621	1,519	4,25E-03
304	NETO1	1,727	1,308	1,518	2,97E-03
305	MPZL1	1,655	1,373	1,514	2,65E-08
306	MYH10	1,406	1,621	1,514	1,31E-04
307	RADIL	1,248	1,770	1,509	1,16E-04
308	CYBASC3	1,540	1,472	1,506	7,30E-21
309	LINC00426	1,530	1,463	1,496	4,25E-20
310	CASK	1,212	1,780	1,496	1,65E-04
311	AMH	1,354	1,633	1,494	1,65E-03
312	AHSA2	1,135	1,851	1,493	3,58E-08
313	NUAK2	1,169	1,814	1,491	3,76E-02
314	POP5	1,167	1,814	1,490	3,76E-03
315	COMMD3	1,248	1,733	1,490	1,79E-07
316	CERCAM	1,694	1,281	1,487	4,21E-04
317	ICAM3	1,167	1,795	1,481	8,94E-23
318	RPUSD3	1,189	1,766	1,478	5,35E-06
319	MTERFD1	1,219	1,731	1,475	2,44E-02
320	CRIP1	1,176	1,767	1,471	2,70E-61
321	BAHCC1	1,287	1,655	1,471	5,93E-17
322	CIITA	1,239	1,698	1,469	1,56E-05
323	PLBD1	1,413	1,524	1,469	4,08E-03
324	LOC100862671	1,665	1,266	1,465	2,84E-04
325	FECH	1,240	1,681	1,461	7,03E-11
326	NRGN	1,746	1,171	1,459	2,08E-03
327	SCARB1	1,318	1,589	1,453	3,62E-15
328	CISD3	1,197	1,706	1,451	3,75E-07
329	S100PBP	1,219	1,670	1,444	3,15E-04
330	CREB3L4	1,524	1,360	1,442	2,04E-06
331	RAB37	1,115	1,751	1,433	8,20E-10
332	LOC100499489	1,123	1,740	1,432	1,25E-02
333	SKAP2	1,119	1,736	1,427	1,13E-07
334	PGLYRP1	1,715	1,111	1,413	4,12E-04
335	IFT27	1,659	1,166	1,413	3,27E-10
336	GAB3	1,237	1,577	1,407	7,24E-08
337	CD4	1,676	1,136	1,406	8,10E-03
338	FBXW8	1,239	1,564	1,401	3,34E-03
339	PPP2R3B	1,629	1,145	1,387	1,40E-08
340	KIAA0182	1,121	1,637	1,379	5,74E-07
341	INTS1	1,228	1,529	1,378	4,40E-46
342	NBEAL2	1,151	1,598	1,375	1,43E-08
343	TERF2	1,157	1,578	1,367	5,29E-26
344	AMT	1,182	1,551	1,366	4,15E-05
345	PIGF	1,180	1,551	1,365	8,69E-03

---

346	TBL2	1,109	1,591	1,350	1,06E-02
347	POU2AF1	1,542	1,107	1,325	3,06E-14
348	LDOC1	1,524	1,113	1,319	6,83E-03
349	SERPINA1	1,101	1,534	1,317	1,25E-03
350	LOC729080	1,109	1,508	1,308	9,15E-02
351	BLNK	1,102	1,507	1,304	3,20E-08

---

Abkürzungen: fc, Genexpressionsunterschied (*fold change*); MACE, *massive analysis of cDNA ends*; ST-DGE, *SuperTag digital gene expression*.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Angaben

---

Name: Juliane Schmäh, geb. Lippert  
Geburtsdatum: 04. Mai 1985  
Geburtsort: Schwerin  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: verheiratet, drei Kinder

### Hochschulausbildung

---

03/2013 – 06/2018 Wissenschaftliche Mitarbeiterin mit der Zielsetzung Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Cario im ALL-Studienlabor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I, UKSH, Campus Kiel  
03/2012 Diplom der Biochemie und Molekularbiologie („sehr gut“)  
08/2011 – 03/2012 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Grötzinger im Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zum Thema: „Klonierung und Expression der CARD- und NACHT-Domänen von NLRC5“  
10/2004 – 03/2012 Studium der Biochemie und Molekularbiologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel mit den Nebenfächern: Molekulare Onkologie, Molekulare Virologie und Pharmazeutische Chemie

### Schulbildung

---

06/2004 Abschluss: Abitur („sehr gut“)  
08/1995 – 06/2004 Sportgymnasium Schwerin  
08/1991 – 07/1995 Astrid-Lindgren-Grundschule Schwerin

### Stipendium

---

07/2016 – 06/2018 Forschungsstipendium der Madeleine Schickedanz-KinderKrebs-Stiftung



## 10. Publikationsliste

### Originalarbeiten:

Fedders H, Alsadeq A, **Schmäh J**, Vogiatzi F, Zimmermann M, Möricke A, Lenk L, zur Stadt U, Horstmann MA, Pieters R, Schrappe M, Stanulla M, Cario G, Schewe DM (2017) „The role of constitutive activation of FMS-related tyrosine kinase-3 and NRas/KRas mutational status in infants with KMT2A-rearranged acute lymphoblastic leukemia”, *Haematologica*, 2017.169870.

**Schmäh J**, Fedders B, Panzer-Grümayer R, Fischer S, Zimmermann M, Dagdan E, Bens S, Schewe D, Möricke A, Alten J, Bleckmann K, Siebert R, Schrappe M, Stanulla M, Cario G (2017) „Molecular characterization of acute lymphoblastic leukemia with high *CRLF2* gene expression in childhood”, *Pediatric Blood and Cancer*, 2017 Oct;64(10).

Müller S, Rycak L, Afonso-Grunz F, Winter P, Zawada AM, Damrath E, Scheider J, **Schmäh J**, Koch I, Kahl G, Rotter B (2014) „APADB: a database for alternative polyadenylation and microRNA regulation events“, *Database (Oxford)*, Vol, 2014.

### Veröffentlichte Tagungsbeiträge:

Sipol AA, Grunewald TG, **Schmäh J**, den Boer ML, Rubío RA, Baldauf M, Wernicke C, Horstmann M, Cario G, Richter G, Burdach S (2017) „Abstract 4515: Metabolic stress sensor MondoA mediates in vivo aggressiveness of common ALL by induction of HIF1 $\alpha$ ”, 108th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 1.-5. April 2017, Washington DC, USA, *Cancer research* 77(13 Supplement):4515.

**Schmäh J**, Fedders B, Panzer-Grümayer R, Fischer S, Zimmermann M, Dagdan E, Bens S, Schewe D, Möricke A, Alten J, Bleckmann K, Siebert R, Schrappe M, Stanulla M, Cario G (2016) „Incidence and molecular characterization of acute lymphoblastic leukemia with high *CRLF2* expression in childhood”, 5. Life Science Student Conference, 30. November 2016, Kiel, Deutschland.

Sipol A, Grunewald TGP, **Schmäh J**, den Boer ML, Rubío RA, Baldauf M, Wernicke C, Horstmann M, Cario G, Richter G, Burdach S (2016) “MondoA mediates in vivo aggressiveness of common ALL by induction of HIF1 $\alpha$ ”, 28th EORTC–NCI–AACR

Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, 29. November – 2. Dezember 2016, München, Deutschland, European Journal of Cancer, Volume 69:S50.

Sipol A, Grunewald TG, **Schmäh J**, Schirmer D, den Boer ML, Rubío RA, Baldauf M, Wernicke C, Kolb HJ, Horstmann M, Cario G, Richter G, Burdach S (2016) “Abstract 2462: MondoA mediates *in vivo* aggressiveness of common ALL and may serve as a T-cell immunotherapy target”, 107th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 16.-20. April 2016, New Orleans, USA, Cancer research 76(14 Supplement):2462.

**Schmäh J**, Fedders B, Zimmermann M, Dagdan E, Bens S, Schewe D, Möricke A, Bleckmann K, Siebert R, Schrappe M, Stanulla M, Cario G (2016) „Inzidenz und molekulare Charakterisierung der Akuten Lymphatischen Leukämie mit *CRLF2*-Überexpression im Kindesalter“, X. Gemeinsames Forschungssymposium der Universitätskinderkliniken Kiel und Lübeck, 13. Juli 2016, Kiel, Deutschland.

Marencke N, **Schmäh J**, Zimmermann M, Schewe D, Möricke A, Alten J, Bleckmann K, Schrappe M, Stanulla M, Cario G (2016) „Impact of the gene expression of natural killer cell receptors and their ligands for treatment response and prognosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia”, XXIX. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für pädiatrisch-onkologische Forschung, 1.-3. Juni 2016, Wilsede, Deutschland, Klin Padiatr 228(03):A13.

**Schmäh J**, Fedders B, Zimmermann M, Dagdan E, Dörge P, Bens S, Möricke A, Alten J, Bleckmann K, Siebert R, Schrappe M, Stanulla M, Cario G (2015) „Incidence and genetic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia with *CRLF2* overexpression treated according to the AIEOP-BFM ALL 2009 protocol”, XXVIII. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für pädiatrisch-onkologische Forschung, 3.-6. Juni 2015, Wilsede, Deutschland, Klin Padiatr 227(03):A12.

Bruckmueller H, **Schmäh J**, Zimmermann M, Schewe D, Fedders H, Möricke A, Alten J, Bleckmann K, Schrappe M, Stanulla M, Cario G (2015) „Gene expression analysis of NK cell receptors and their ligands in childhood acute lymphoblastic leukemia with involvement of the central nervous system”, XXVIII. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für pädiatrisch-onkologische Forschung, 3.-6. Juni 2015, Wilsede, Deutschland, Klin Padiatr 227(03):A14.

Buchmann S, **Schmäh J**, Zimmermann M, Schewe D, Fedders H, Möricke A, Alten J, Bleckmann K, Schrappe M, Stanulla M, Cario G (2015) „Prognostic relevance of the expression of genes associated with the *P2RY8-CRLF2* fusion in acute lymphoblastic leukemia in childhood”, XXVIII. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für pädiatrisch-onkologische Forschung, 3.-6. Juni 2015, Wilsede, Deutschland, Klin Padiatr 227(03):A19.

**Schmäh J**, Müller S, Grunz F, Harms H, Rotter B, Koch I, Kahl G, Winter P, Schrappe M, Stanulla M, Cario G (2014) „Two subgroups of *CRLF2*-overexpressing pediatric acute lymphoblastic leukemias differ in outcome and gene expression”, XXVII. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für pädiatrisch-onkologische Forschung, 11.-14. Juni 2014, Wilsede, Deutschland, Klin Padiatr 226(03):A5.

Müller S, **Schmäh J**, Grunz F, Rotter B, Koch I, Kahl G, Winter P, Schrappe M, Stanulla M, Cario G (2013) „Massive Analysis of cDNA End (MACE) transcriptome profiling differentiates between two subgroups of *CRLF2*-overexpressing Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) patients”, Indraprastha International Conference on Biotechnology, 22.-25. Oktober 2013, Delhi, Indien.

## 11. Erklärung

Hiermit erkläre ich, Juliane Schmäh, gemäß § 8 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, dass die vorliegende Dissertation, abgesehen von der Beratung durch die Betreuer, nach Inhalt und Form die eigene Arbeit ist. Weiterhin habe ich keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Diese Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgesellschaft entstanden.

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits publiziert (siehe Abschnitt 10. Publikationsliste).

Diese Dissertation wurde bis jetzt weder ganz noch in Teilen einer anderen Stelle im Rahmen eines Promotionsverfahrens vorgelegt. Ich habe bisher keinen weiteren Promotionsversuch unternommen und mir wurde kein akademischer Grad entzogen.

Kiel, den 16.07.2019

---

(Juliane Schmäh)

## **12. Danksagung**

Mein herzlichster Dank gilt allen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation auf vielfältigste Weise unterstützt haben:

Danken möchte ich zunächst Herrn Prof. Dr. med. Martin Schrappe für die Möglichkeit, die vorliegende Doktorarbeit in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I, UKSH, Campus Kiel anzufertigen sowie für seinen fürsorglichen Mitarbeiterumgang.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Gunnar Cario für das spannende Dissertationsthema, die Betreuung während der Promotionszeit sowie die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Roeder danke ich vielmals für die Übernahme des Erstgutachtens meiner Arbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und das Interesse an meiner Doktorarbeit.

Mein Dank geht an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der gesamten ALL-BFM-Studiengruppe für jedwede Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich bedanke mich bei allen aktuellen wie ehemaligen Kollegen, die in den letzten Jahren mit mir zusammengearbeitet haben: Dr. rer. nat. Henning Fedders, Dr. rer. nat. Antje Torge, Thies Bartram, Birthe Fedders, Christian Bretscher, Dr. med. Julia Alten, Dr. med. Kirsten Bleckmann, PD Dr. med. Denis Schewe, Dr. rer. nat. Ameera Alsadeq, Dr. rer. nat. Fotini Vogiatzi, Dr. rer. nat. Lennart Lenk, Dr. rer. nat. Sarah Habig, Steffi Spielberg, Nele Belau, Katrin Timm-Richert und Katrin Neumann sowie den TAs des MRD-Labors und des Morphologischen Labors. Danke für das offene und von Hilfsbereitschaft geprägte Arbeitsklima. Unvergessen bleiben unsere tollen Geburtstagsfrühstücke als Highlights im Laboralltag.

Im Besonderen möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Henning Fedders, Dr. rer. nat. Antje Torge und Dr. rer. nat. Ameera Alsadeq für eure freundschaftliche Unterstützung und Motivation, den fachlichen Austausch und für die vielen kritischen Diskussionen bedanken.

Für die tatkräftige Unterstützung im Labor, ihre exzellente Organisation sowie für die effektive und freundschaftliche Zusammenarbeit möchte ich mich von ganzem Herzen bei Birthe Fedders bedanken. Wir waren stets ein super Team.

Bedanken möchte ich mich auch bei unseren Kooperationspartnern. Ich danke den Mitarbeitern von GenXPro, Frankfurt am Main für die Durchführung der Transkriptom-Analysen. Prof. Dr. med. Reiner Siebert, Dr. med. Susanne Bens und Raina Zühlke-Jenisch vom Institut für Humangenetik, UKSH, Campus Kiel für die FISH-Untersuchungen sowie Prof. Dr. med. Martin Stanulla und Dr. rer. nat. Elif Dagdan aus der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, MHH, Hannover für die Durchführung der MLPA-Analysen. Weiterhin bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Renate Panzer-Grümayer vom St. Anna Kinderkrebsforschungsinstitut, Wien und der Max-Eder Nachwuchsgruppe von PD Dr. med. Denis Schewe für die konstruktive Zusammenarbeit und den fachlichen Austausch.

Ein weiterer ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Martin Stanulla, der von Anfang an mich glaubte und in mir das Potential sah, eine Promotion erfolgreich zu meistern trotz meiner familiären Doppelherausforderung. Danke für diese einmalige Chance, den Zuspruch und die Unterstützung auf diesem Weg.

Dr. rer. nat. Antje Torge, Dr. rer. nat. Ameera Alsadeq, Dr. med. Julia Alten, Dr. med. Swantje Buchmann und Dr. rer. nat. Alexandra Kurz danke ich für die hilfreiche Kritik und das gründliche Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein größter Dank aber gebührt meiner Familie. Ich danke meinen Eltern für ihre weit über diese Arbeit hinausgehende Unterstützung in allen Lebenslagen und meinem Ehemann Jan und unseren Kindern Noah, Lena und Anna für ihre Kraft und Liebe, die sie mir jeden Tag aufs Neue schenken. Ich danke euch allen von ganzem Herzen für euren unerschütterlichen Glauben an mich, eure Ermutigung und, wenn nötig, Aufmunterungen sowie für das Verständnis, das ihr stets für mich aufgebracht habt. Ohne euren sicheren Rückhalt in all den Jahren hätte ich diese Arbeit nicht zustande gebracht und ist somit auch euer Verdienst. Danke, dass ihr immer für mich da seid.

Die Forschungsarbeiten im Rahmen des Promotionsprojektes wurden durch das *European Network for Cancer Research in Children and Adolescents* (ENCCA)-Projekt sowie durch die Madeleine Schickedanz-KinderKrebs-Stiftung finanziell unterstützt.

Ich widme diese Arbeit *Amy*. Du bleibst unvergessen.