

Aus der Klinik für Innere Medizin II
mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie
(Direktorin: Prof. Dr. C. Baldus)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

„Vorkommen und Bedeutung von Mutationen im
NT5C2-Gen
in der rezidierten T-ALL des Erwachsenen“

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

vorgelegt von
Sebastian Wolf
aus Marburg

Kiel, 2019

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Monika Brüggemann, Klinik für Innere
Medizin II mit den Scherpunkten Hämatologie und
Onkologie

2. Berichterstatterin: Priv-Doz. Dr. Almuth Caliebe, Institut für
Humangenetik

Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.2020

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 28.02.2020

gez.: Priv-Doz. Dr. Renate Burger
(Vorsitzende der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Einleitung.....	1
1.1 Die akute lymphatische Leukämie.....	1
1.1.1 Risikostratifikation.....	2
1.1.2 Therapie und Prognose der ALL.....	3
1.1.3 Therapie des ALL Rezidivs.....	5
1.2 Minimal Residual Disease	6
1.3 Das NT5C2-Gen	6
1.3.1 Untersuchung des NT5C2-Gens bei pädiatrischer ALL.....	7
1.3.2 Bedeutung der ALL-Therapie für die Resistenzbildung	8
1.4 Methoden zum Nachweis einer Mutation in NT5C2	9
1.4.1 Sanger Sequenzierung	9
1.4.2 Next Generation Sequencing.....	9
1.4.3 Allelspezifische PCR.....	10
1.5 Fragestellung der Arbeit.....	10
2. Material und Methoden.....	11
2.1 Patientenkollektiv.....	11
2.1.1 Kollektiv I (Nelarabine-Therapie)	11
2.1.2 Kollektiv II (erweitertes Screening)	11
2.1.3 Positivkontrollen.....	12
2.2 Sanger Sequenzierung	12
2.2.1 Primerdesign.....	12
2.2.2 PCR Ansätze	13
2.2.3 Aufreinigung.....	14
2.2.4 Agarosegel.....	15
2.2.5 Sequenzierung und Auswertung.....	15
2.3 NGS.....	15
2.3.1 Primerdesign.....	16
2.3.2 PCR-Ansätze	18
2.3.3 Aufreinigung der PCR-Produkte	19
2.3.4 Sequenzierung.....	20
2.3.5 Bioinformatische Auswertung	21
2.4 Allelspezifische PCR.....	21
2.4.1 Primerdesign.....	21
2.4.2 PCR	22
2.4.3 Auswertung und Verifizierung.....	23
2.5 Geräte und Reagenzien	23
3. Ergebnisse.....	26
3.1 Patientencharakteristika des Kollektivs I.....	26
3.2 Sanger Sequenzierung	26
3.3 NGS.....	28
3.3.1 Optimierungsschritte und finales Primerset	28
3.3.2 Detektierte Mutationen.....	31
3.4 AS-PCR.....	31

3.5 Positivkontrollen	32
3.5.1 Sensitivitätstestungen	33
4. Diskussion	35
Referenzen	44
Zusammenfassung	49
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Danksagungen	VIII
Veröffentlichungen zum Dissertationsthema	IX

Abkürzungsverzeichnis

6-MP	6-Mercaptopurin
6-TG	6-Thioguanin
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
Ara-G	9-β-D-Arabinofuranosylguanine
AS-PCR	Allelspezifische PCR
bp	Basenpaar
BWA	Burrows-Wheeler-Aligner
CnII	Zytosolische Nukleotidase II
CR	Komplette Remission
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ED	Erstdiagnose
EGIL	European Group of the Immunological Classification of Leukemias
GATK	Genome Analysis Tool Kit
GB	Gigabyte
GMALL	German Multicenter Study Group on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia
GMP	Guanosin-Monophosphat
HR	Hochrisiko
IGV	Integrative Genome Viewer
IMP	Inosin-Monophosphat
KM	Knochenmark
MRD	Minimal Residual Disease
MRD ^{neg}	MRD-Negativität
NGS	Next Generation Sequencing
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
SNPs	Einzelnukleotidpolymorphismen
SR	Standard-Risiko
SZT	Allogene Stammzelltransplantation
T-LBL	T-Linien-Lymphoblastisches Lymphom
TPMT	Thiopurine-Methyltransferase
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

1.1 Die akute lymphatische Leukämie

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist eine maligne hämatologische Erkrankung, die mit einer Gesamtinzidenz von 1,1/100.000/Jahr selten vorkommt. Der absolute Häufigkeitsgipfel liegt im Kindesalter <5 Jahren. Anschließend fällt die Inzidenz kontinuierlich ab, bis es ab dem 50. Lebensjahr zu einem erneuten Anstieg mit dem Gipfel >80. Lebensjahr kommt ¹.

Die ALL ist charakterisiert durch eine unkontrollierte Proliferation und Akkumulation lymphatischer Vorläuferzellen in Knochenmark und Blut. Auch ein Befall anderer lymphatischer Organe, wie Lymphknoten und Milz und nicht lymphatischer Organe ist möglich. Genetische Aberrationen finden sich in 60% der adulten ALL-Fälle, die genauen pathogenetischen Ursachen sind allerdings in der Mehrzahl der Fälle unklar. Zu den Risikofaktoren zählen u.a. kongenitale Defekte in DNA-Reparaturgenen, Trisomie 21, radioaktive Strahlung sowie Belastungen mit Benzol.

Die klinischen Symptome entstehen innerhalb kurzer Zeit und resultieren vor allem aus einer zunehmenden Verdrängung der normalen Hämatopoese und einer daraus resultierenden hämatopoetischen Insuffizienz. Die häufigsten Symptome sind in Tabelle (Tab.) 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Typische Symptome der hämatopoetischen Insuffizienz

Ursache	Symptome
Anämie	Blasse Haut und Schleimhäute, Tachykardie, Dyspnoe, Schwindel, Leistungsminderung
Granulozytopenie, v.a. Neutrophile	Fieber, Infektneigung
Thrombozytopenie	Blutungsneigung, Hämatomneigung, Petechien

nach Gökbuget *et al.* ¹

Die Diagnostik der ALL umfasst neben der klinischen Untersuchung obligat eine Knochenmarkpunktion mit mehreren sich anschließenden Untersuchungen zur mikroskopischen Beurteilung des Knochenmark (KM)-ausstrichs sowie zur immunphänotypischen, (molekular-) zytogenetischen und molekularen

Charakterisierung der Blasten.

Diese diagnostischen Schritte erlauben eine genaue Zuordnung der ALL in unterschiedliche Subgruppen sowie eine Identifikation von Markern für eine spätere Quantifizierung von minimaler Resterkrankung (minimal residual disease, MRD) in den Verlaufsmaterialien. Die Klassifikation der World Health Organisation (WHO) erfolgt nach zyto- und molekulargenetischen Kriterien. In der Praxis findet auch noch die Einteilung der European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL) Anwendung, die nach dem Immunphänotyp kategorisiert ² (siehe auch Tab. 2).

Tabelle 2: Einteilung der ALL in den GMALL-Studien nach Immunphänotyp

Subgruppe Bezeichnung	Immunphänotyp Charakteristische Marker	Inzidenz	Zyto/Molekulargenetik	
			Mögliche Aberrationen	Molekulare Marker
B-Linien-ALL	HLA-DR+, TdT+, CD19+ u./o. CD79a+ u./o. CD22+	76%		
B-Vorläufer-ALL				
pro-B	CD10-	11%	t(4;11)	ALL1-AF4
c- (common)	CD10+	49%	t(9;22)	BCR-ABL
prä-B	CyIgM+	12%	t(1;19) t(9;22)	E2A-PBX1 BCR-ABL
Reife B	Slg+	4%	t(8;14)	cMYC
T-Linien-ALL				
prä-T-ALL		6%		
pro-T-ALL	TdT+, cyCD3+, CD7+CD2-, sCD3-, CD1a- CD2+ und/oder CD5+ und/oder CD8+			
thy- T-ALL	sCD3±, CD1a+	12%		
reife T-ALL	sCD3+, CD1a-	6%		

nach Gökbuget et al. ¹

1.1.1 Risikostratifikation

Für die Therapie der ALL spielt neben der Einteilung nach Immunphänotyp die Beurteilung des Risikos bzw. der Aggressivität der Erkrankung eine wichtige Rolle. Hier wird zwischen einer Standardrisiko- (SR) und einer Hochrisikogruppe (HR) unterschieden. Prognostisch ungünstige Faktoren, welche in der *German Multicenter*

Study Group on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GMALL) derzeit die Einordnung in HR nach sich ziehen, sind:

- Hohe Leukozytenzahlen bei Erstdiagnose (ED) von $>30.000/\mu\text{l}$ bei der B-Vorläufer-ALL
- Immunphänotyp: pro-B, early-T, mature-T
- Zytogenetik: t(4;11)
- Remissionsstatus: keine Komplettremission nach Induktion II
- Hohes Minimal Residual Disease (MRD) Niveau nach Konsolidierung, erneuter MRD-Anstieg (auf dieses Thema wird in Kapitel 1.2 genauer eingegangen)^{3,4}

Die BCR-ABL1-positive ALL, die charakterisiert ist durch die Translokation t(9;22), entsprach früher der Höchstisiko-ALL. Durch Einführung einer zielgerichteten Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren ist die Prognose dieser Patienten mittlerweile nicht schlechter als die der BCR-ABL1-negativen ALL-Patienten.

1.1.2 Therapie und Prognose der ALL

Nach der genauen Klassifikation der ALL wird eine risikoadaptierte Therapie begonnen. In Deutschland geschieht dies für erwachsene ALL-Patienten in der Regel im Rahmen von Therapieprotokollen der GMALL (siehe Abbildung (Abb.) 1). Die verwendeten Medikamente unterscheiden sich je nach ALL-Subtyp, Alter und Risikoprofil. Im Folgenden werden die wesentlichen aufgeführt.

Die Therapie startet in der Regel mit einer Vorphasetherapie zur Reduktion der Tumorlast. Eingesetzte Substanzen sind Vinca-Alkaloide, Steroide und Alkylantien. Es folgt eine 6-8 Wochen andauernde Induktionstherapie, welche sich in zwei Untereinheiten aufteilt. In der Induktion I wird mit Dexamethason, Vincristin und Anthracyclinen therapiert, in der anschließenden Induktion-II mit Cyclophosphamid, Cytarabin, 6-Mercaptopurin (6-MP) sowie pegylierter Asparaginase.

An diese beiden Therapiestufen schließt sich eine Konsolidierungstherapie an, welche aus hochdosiertem Methotrexat und pegylierter Asparaginase in mehreren Zyklen in möglichst kurzen Intervallen besteht.

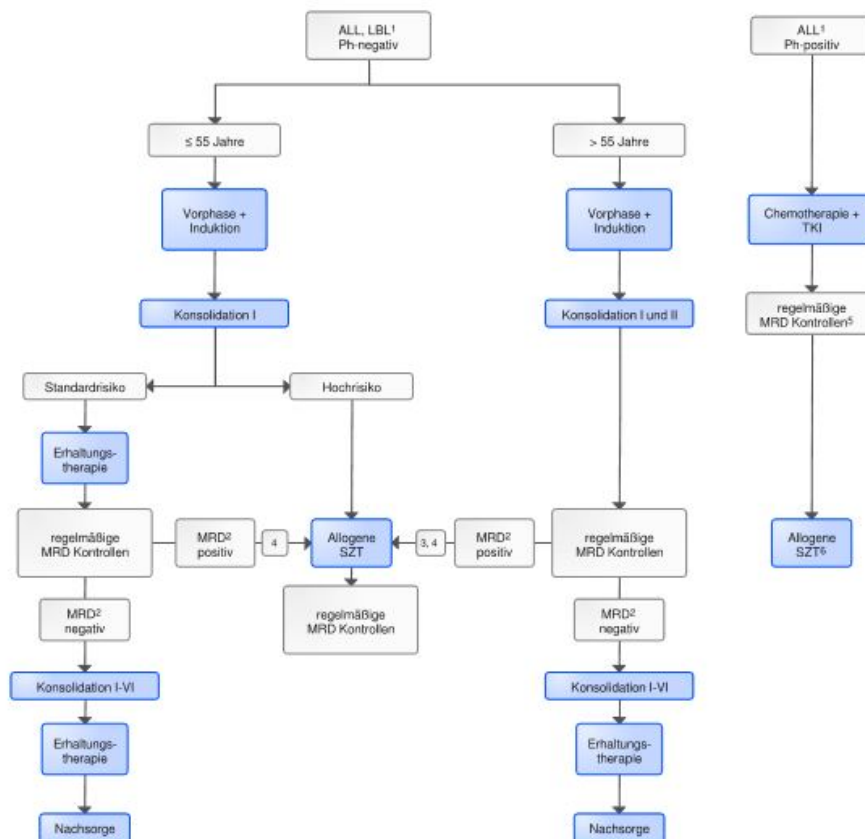
Besteht ein HR-Profil, wird nach der ersten Konsolidierung und Erreichen einer kompletten Remission (CR) eine allogene Stammzelltransplantation (SZT) angestrebt, ebenso bei SR und MRD-Positivität nach Ende der Konsolidierung I.

Bei SR-Patienten wird die Konsolidierungstherapie ansonsten unter regelmäßigen MRD-Remissionskontrollen bis zum Ende des ersten Therapiejahres fortgeführt. Bei

anhaltender CR schließt sich eine bis zu 1,5 Jahre dauernde Erhaltungstherapie mit Methotrexat und 6-MP an ^{1,4-6}.

Bei der BCR-ABL1 positiven ALL wird über den gesamten Therapiezeitraum zusätzlich zur Chemotherapie/SZT eine zielgerichtete Therapie, z.B. mit Imatinib durchgeführt ^{6,7}. Bei der CD20-positiven B-Vorläufer-ALL wird die Chemotherapie in aktuellen GMALL-Protokollen um den CD20-Antikörper Rituximab ergänzt ⁸.

Abb. 1: Ablauf der ALL-Therapie des Erwachsenen ¹



Die Prognose hängt stark von den oben genannten Risikofaktoren ab. Diese Dissertation befasst sich mit Patienten, die an einer T-ALL erkrankt sind. Diese Subgruppe macht ca. 25% der adulten ALL-Fälle aus. Eine CR wird nach Induktionstherapie bei >90% der Patienten erreicht, allerdings kommt es in einer Vielzahl der Fälle zum Rezidiv, sodass Langzeitüberlebensraten von 27%-54% erreicht werden ⁴. Bei pädiatrischen Patienten liegt in 15% der Fälle eine T-ALL vor, dabei werden Heilungsraten von über 80% erreicht ^{9,10}.

1.1.3 Therapie des ALL Rezidivs

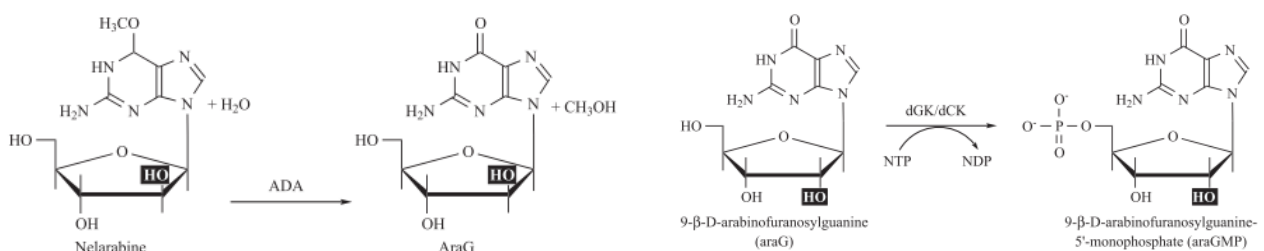
Kommt es im Krankheitsverlauf zu einem Rezidiv, sinken die Heilungschancen bei erwachsenen Patienten auf 10-30% ¹¹. Therapeutisches Ziel der Rezidivtherapie ist es, möglichst rasch eine CR zu erreichen und eine SZT durchzuführen, gegebenenfalls auch mit experimentellen Therapieformen. Aktuelle Ansätze sind hier beispielsweise der Einsatz von bispezifischen Antikörpern, wie z.B. Blinatumomab, oder CAR-T-Zellen bei der B-Vorläufer-ALL ^{12,13}.

Ein neueres Medikament zur Behandlung der rezidivierten T-ALL ist das Purinanalogon Nelarabine, ein Prodrug von 9-β-D-Arabinofuranosylguanin (Ara-G, siehe Abb. 2). Es gehört zur Gruppe der Desoxyguanosinanaloga. Im Gegensatz zu anderen Substanzen dieser Klasse wirkt es spezifisch auf T-Lymphozyten, da es durch die lymphozytenspezifische Desoxycytidin-Kinase aktiviert wird. Zusätzlich besitzt Ara-G eine Phosphorylaseresistenz, die einer vorzeitigen Inaktivierung entgegenwirkt ^{14,15}.

Wie alle Purinanaloga unterliegt Ara-G in der Zelle dem Purinstoffwechsel, der maßgeblich durch die zytosolische Nukleotidase II beeinflusst wird.

Im Rahmen der GMALL wurde 2001 eine Phase-2-Studie zum Einsatz von Nelarabine als Salvagetherapie zur Remissionsinduktion mit anschließender SZT bei refraktärer oder rezidivierter T-ALL durchgeführt ¹⁶. Eine CR konnte bei adulten Patienten mit einer Gabe von Nelarabine 1,5g/m² an den Tagen 1, 3 und 5 mit der Möglichkeit auf einen zweiten Zyklus nach 21 Tagen bei 36% der Patienten erreicht werden. 80% dieser Patienten erhielten eine SZT, das 3-Jahres-Überleben nach SZT lag bei 37%. Diese Ergebnisse sprechen für eine relativ gute Wirksamkeit der Substanz bei gleichzeitig guter Verträglichkeit ¹⁶.

Abb. 2: Aktivierungsschritte von Nelarabine und Ara-G ¹⁵



1.2 Minimal Residual Disease

Zum Zeitpunkt der Diagnose einer ALL liegt die Tumorlast in der Regel bei 10^{10} bis 10^{12} Blasten. Mit Erreichen einer CR ist der Blastenanteil im KM definitionsgemäß auf unter $<5\%$ gesunken. Allerdings können demnach noch 10^{10} neoplastische Zellen im Körper dem Nachweis entgehen und den Ausgangspunkt eines Rezidivs bilden¹⁷.

Deutlich sensitiver als die Lichtmikroskopie ist der Nachweis der minimalen Resttumorzellen mit molekularen oder durchflusszytometrischen Methoden. Als molekulargenetische MRD-Marker eignen sich bei lymphatischen Neoplasien klonale Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptorgenumlagerungen, die bei fast allen ALLs nachweisbar sind und eine Art DNA-Fingerabdruck eines jeden lymphatischen Klons darstellen^{18,19}.

Der prognostische Wert der MRD ist in Induktion und Konsolidierung besonders stark. Eine frühe MRD-Negativität (MRD^{neg}) ist mit einer sehr guten Prognose assoziiert. Eine MRD-Persistenz bis in die Konsolidierungstherapie hingegen zeigt ein hohes Rezidivrisiko an^{20,21}. Auch das weitere therapeutische Vorgehen kann anhand des MRD-Niveaus nach Erreichen der 1. CR unabhängig von klinischen Risikofaktoren gewählt werden²². In den GMALL-Studien wird der MRD-Wert nach Induktion und früher Konsolidierung zusammen mit klinischen Risikofaktoren zur Therapiestratifikation herangezogen, aber auch im Postremissionsmonitoring wird die MRD-Messung zur frühen Detektion eines drohenden Rezidivs eingesetzt^{1,23}.

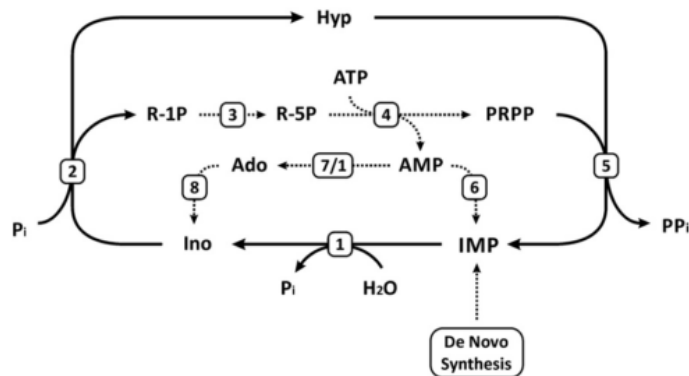
1.3 Das NT5C2-Gen

Das Gen NT5C2 liegt auf Chromosom 10 auf Position 10q24.32-q24.33. Es besitzt 17 Exone und codiert für die zytosolische Nukleotidase II (CnII)^{24,25}. CnII ist eine ubiquitär exprimierte, 6-Hydroxypurin spezifische Nukleotidase, die bevorzugten Substrate sind Inosin-Monophosphat (IMP) und Guanosin-Monophosphat (GMP, siehe Abb. 3). Im Nukleosidstoffwechsel der Zellen übernimmt CnII zwei Funktionen:

- Den Transfer von Phosphatgruppen von Nukleosid-Monophosphaten zu anderen Substraten,
- Es katalysiert die Dephosphorylierung beim Abbauprozess von Nukleosid-Monophosphaten.

CnII spielt damit eine entscheidende Rolle im Phosphorylierungszyklus von Nukleosiden und in der intrazellulären Bereitstellung von Phosphat und Nukleosidbestandteilen²⁶.

Abb. 3: IMP-Metabolismus mit gekoppelten Enzymen ²⁷



1: CnII; 2: Purin-Nucleosid-Phosphorylase; 3: Phosphoribomutase; 4: PRPP Synthase; 5: Hypoxanthine-guanine-Phosphoribosyl-Transferase; 6: AMP-Deaminase; 7: 5'-Nucleotidase Typ I (CnI); 8: Adenosindeaminase; R-1-P: Ribose-1-phosphat; R-5-P: Ribose-5-phosphat.

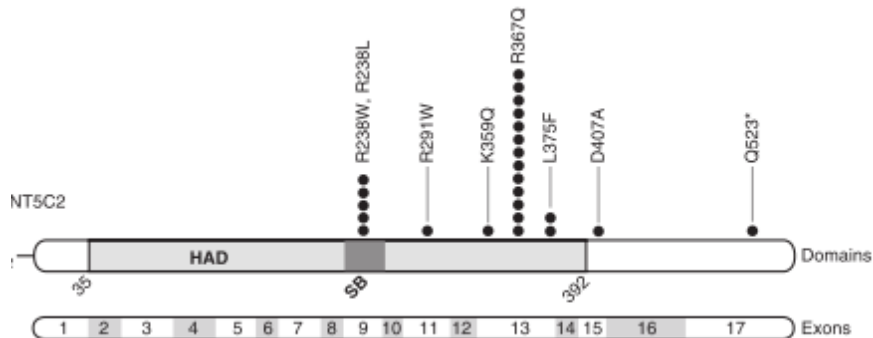
Diesem Zyklus unterliegen neben natürlichen Nucleosiden auch Nucleosidanaloga. Diese werden intrazellulär von verschiedenen Nucleotidasen dephosphoryliert und damit inaktiviert. Eine erhöhte CnII-Expression führt zu einer verminderten Wirksamkeit der Nucleosidanaloga. Dies resultiert einerseits aus der direkten Dephosphorylierung, andererseits aus der Störung des Nucleosid- und Phosphatpools bei Substanzen, die nicht direkt durch CnII dephosphoryliert werden ²⁷.

1.3.1 Untersuchung des NT5C2-Gens bei pädiatrischer ALL

Der Zusammenhang zwischen CnII-Expression und der Wirksamkeit von Nucleosidanaloga ist vor allem für die pädiatrische ALL belegt. Im Jahr 2013 wurden rezidivspezifische Mutationen im NT5C2-Gen bei pädiatrischen ALL-Patienten von zwei Arbeitsgruppen nachgewiesen ^{28,29}. Meyer *et al.* ²⁹ detektierten NT5C2-Mutationen bei 10% der untersuchten rezidierten B-Vorläufer-ALLs, Tzoneva *et al.* ²⁸ bei 19% der rezidierten T-ALL des Kindes (Abb. 4). Mutationen bei ED wurden ausschließlich von Meyer *et al.* bei 2% der untersuchten Proben mit einer Allelfrequenz von 0,01-0,02% detektiert, während diese im Rezidiv zwischen 20% und 50% lag. Patienten mit NT5C2-Mutationen im Rezidiv zeigten eine signifikant kürzere Zeitdauer von der ED bis zum Rezidiv als Patienten ohne Mutation (516 Tage vs. 930 Tage). Die Rezidive bei NT5C2-mutierten Patienten traten hauptsächlich unter Erhaltungstherapie auf, in der das Nucleosidanalogon 6-MP eine wichtige Rolle spielt ²⁹.

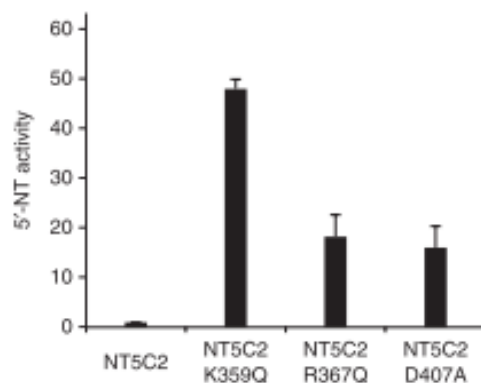
In-vitro Analysen zeigten eine erhöhte Enzymaktivität der Nukleotidase bei Vorliegen der Mutationen (Abb. 5), ebenso eine erhöhte Resistenz gegenüber den Nukleosidanaloga 6-MP und Thioguanin (6-TG)^{28,29}. Demgegenüber bestand in vitro keine erhöhte Resistenz gegen Nelarabine bzw. Ara-G²⁸.

Abb. 4: Verteilung und Häufigkeit von Mutationen im NT5C2-Gen bei der rezidierten T-ALL des Kindes²⁸



Bei den am häufigsten nachgewiesenen Mutationen handelte es sich um NT5C2^{R238W} in Exon 9 und NT5C2^{R367Q} in Exon 13. Diese Hotspotmutationen sowie deren Häufigkeitsverteilung wurden von einer weiteren Arbeit bestätigt^{28–30}.

Abb. 5: CnII-Enzymaktivität WT und mit den Mutationen NT5C2^{K359Q}, NT5C2^{R367Q} und NT5C2^{D407A}²⁸



1.3.2 Bedeutung der ALL-Therapie für die Resistenzbildung

Das gehäufte Auftreten von Rezidiven mit NT5C2-Mutationen unter Erhaltungstherapie deutet auf einen Zusammenhang zwischen NT5C2-Mutationen und Erhaltungstherapie hin^{28,31}. So schlossen die Autoren der genannten Studien, dass es unter 6-MP-haltiger Erhaltungstherapie zu einem Selektionsprozess NT5C2-

mutierter und damit 6-MP-resistenter Subklone kommt, die dann ein Rezidiv der Erkrankung auslösen ^{28,29}. Genauere Analysen bezüglich des Selektionsprozesses wurden nicht durchgeführt. In de novo Leukämien und auch bei soliden Tumoren scheinen Mutationen im NT5C2-Gen keine Rolle zu spielen ³².

1.4 Methoden zum Nachweis einer Mutation in NT5C2

Für den Nachweis von NT5C2-Mutationen wurden unterschiedliche Verfahren entwickelt. Die in dieser Arbeit verwendeten Verfahren werden im Folgenden kurz vorgestellt.

1.4.1 Sanger Sequenzierung

Die Sanger Sequenzierung ist ein erprobtes Standardverfahren zur Sequenzbestimmung und basiert auf der 1977 entwickelten Kettenabbruchreaktion nach Sanger ³³, die seit vielen Jahren mit Hilfe automatischer Kapillarelektrophorese-Sequenzierer einfach und kostengünstig durchführbar ist ³⁴.

Die Grenzen dieser Methode liegen in der Geschwindigkeit der Sequenzierung mit einem Durchsatz von ca. 1 Megabase/Tag sowie in einer maximalen Fragmentlänge von ca. 1000 Basenpaaren (bp) ³⁴. Zusätzlich ist die Sensitivität begrenzt auf 10-30%.

1.4.2 Next Generation Sequencing

Um die Geschwindigkeit, die Genauigkeit und die Sensitivität der Sequenzierung zu erhöhen, wurden in den letzten Jahren mehrere Verfahren entwickelt, die unter dem Begriff Next Generation Sequencing (NGS) zusammengefasst werden. Diese basieren alle auf der zyklischen Array-Sequenzierung. Vereinfacht dargestellt werden Millionen von zu sequenzierenden DNA-Fragmenten auf einer Platte immobilisiert und zu jedem simultan ein komplementärer Strang synthetisiert. Der Einbau einer neuen Base führt jeweils zu einer basenspezifischen Fluoreszenz, die mit einer Kamera detektiert wird ³⁴. Hierdurch ist eine Kombination aus qualitativer und quantitativer Sequenzinformation möglich ³⁵.

Das in dieser Arbeit verwendete System *Illumina MiSeq* nutzt eine klonale bridge Polymerase-Kettenreaktion (PCR), bei der forward- und reverse-Primer auf einer Glasplatte immobilisiert werden und somit alle Kopien lokal verbleiben. Mit dieser Methode ist im MiSeq mit der verwendeten Sequenzierchemie eine Sequenzierlänge von zweimal 300 bp mit einem maximalen Durchsatz von 15 Gigabyte (GB) an Ergebnisdaten möglich ^{34,36}.

1.4.3 Allelspezifische PCR

Die allelspezifische PCR (AS-PCR) ist ein einfaches und schnelles Verfahren, um z. B. Punktmutationen oder spezifische Einzelnukleotidpolymorphismen zu detektieren. Die Methode basiert auf sequenzspezifischen Primern, die in Kombination mit einem reversen Primer nur dann zu einer Amplifikation führen, wenn eine bestimmte Sequenz, z.B. eine Punktmutation, vorliegt³⁷. Der Primer wird dabei so designt, dass sein 3'-Ende komplementär zu der zu detektierenden Mutation ist³⁸. Zusätzlich wird ein zweites Primerpaar eingesetzt, welches unabhängig von einer möglichen Mutation zur Amplifikationskontrolle dient. Die entstehenden Fragmente sollten sich in der Größe unterscheiden. Die Auswertung erfolgt über die elektrophoretische Auftrennung auf einem Agarosegel, in dem das Auftreten einer allelspezifischen Bande für die Mutation spricht, während die Kontrollbande bei gelungener PCR immer vorhanden sein sollte^{37,39}.

1.5 Fragestellung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, das Vorkommen und die Bedeutung von Mutationen im NT5C2-Gen bei der rezidierten T-ALL des Erwachsenen zu untersuchen. Hierfür liegen derzeit, im Gegensatz zu pädiatrischen Patienten, keine systematischen Daten vor. Im Zuge dieser Arbeit sollte daher geklärt werden, ob Mutationen im NT5C2-Gen in Rezidiven mit einer ähnlichen Frequenz bei erwachsenen Patienten vorkommen wie bei pädiatrischen, Mutationen im NT5C2-Gen bei erwachsenen Patienten bereits bei Erstdiagnose detektierbar sind und -wie bei pädiatrischen Patienten- gehäuft in purinhaltigen Chemotherapiephasen beobachtet werden.

Des Weiteren sollte das Therapieansprechen NT5C2-mutierter Patienten auf eine Salvage-Therapie mit Nelarabine eruiert und ein Methodenvergleich von NGS und Sanger-Sequenzierung hinsichtlich der Sensitivität in der Detektion von NT5C2-Mutationen durchgeführt werden.

Zur Beantwortung der oben genannten Punkte wurden Protokolle für die Sanger-Sequenzierung, NGS und AS-PCR verschiedener exonischer Bereiche des NT5C2-Gens etabliert, um zwei Kollektive erwachsener rezidivierter T-ALL-Patienten hiermit zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Die untersuchten Materialien stammten von Patienten mit rezidivierter T-ALL, die im Rahmen der GMALL-Studien bzw. des GMALL-Registers behandelt wurden und bei denen Material zur MRD-Diagnostik an das *Hämatologie Labor Kiel* gesendet wurde. Die Patienten hatten der Verwendung des nach Durchführung der vorgesehenen Diagnostik verbliebenen Restmaterials für wissenschaftliche Untersuchungen zugestimmt, welches als extrahierte DNA im Labor vorlag. Eine Zustimmung der Ethik-Kommission der Christian-Albrechts-Universität zur Durchführung des Vorhabens lag vor (Aktenzeichen D 509/14).

2.1.1 Kollektiv I (Nelarabine-Therapie)

Für die Analysen mit NGS und Sanger-Sequenzierung wurden Materialien von rezidivierten T-ALL Patienten verwendet, die im Rahmen einer einarmigen Phase II-Studie Nelarabine als Salvage-Therapie erhielten (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00684619)¹⁶. Einschlusskriterien waren:

- Alter > 18 Jahren,
- Rezidierte T-ALL oder rezidiertes T-Linien Lymphoblastisches Lymphom (T-LBL), > 5% Blasten im KM,
- kein ZNS-Befall,
- Versagen einer ersten Rezidivtherapie, außer bei Rezidiv nach SZT, dann sofortiger Einschluss möglich¹⁶.

Voraussetzung für die molekulare Untersuchung des NT5C2-Gens war die Verfügbarkeit von asservierter DNA von Erstdiagnose und Rezidiv im *Hämatologie Labor Kiel*.

2.1.2 Kollektiv II (erweitertes Screening)

Für das erweiterte Kollektiv, das auf das Vorliegen der beiden häufigsten für die ALL des Kindes beschriebenen NT5C2-Mutationen R238W in Exon 9 und R367Q in Exon 13 untersucht wurde, wurden Rezidivproben erwachsener T-ALL-Patienten der Studie GMALL 06/99, GMALL 07/03 und des GMALL-Registers verwendet, für die im Rahmen der MRD-Referenzdiagnostik Material an das *Hämatologie Labor Kiel* versandt wurde und nach Abschluss der MRD-Untersuchung noch eine ausreichende Menge asservierter DNA verfügbar war. Es wurden nur Rezidivproben

mit einem Blasteninfiltrationsgrad von über 10% untersucht. Eine einheitliche Rezidivtherapie war im Gegensatz zur ersten Kohorte kein Einschlusskriterium.

2.1.3 Positivkontrollen

Zur Validierung der molekularen Assays wurden Rezidivproben von pädiatrischen Patienten mit bekannter NT5C2^{R238W} bzw. NT5C2^{R367Q} Mutation verwendet, bei denen die genannte Mutation mittels NGS und Sanger-Sequenzierung in einem externen Partnerlabor (*Charité Universitätsmedizin Berlin, Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie*) nachgewiesen worden war. In zwei Proben lag die Mutation NT5C2^{R238W} mit einer Allelfrequenz von 31% bzw. 32%, in zwei weiteren Proben die Mutation NT5C2^{R367Q} mit einer Allelfrequenz von 42% bzw. 45% vor.

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze der einzelnen Verfahren wurde diese diagnostischen Proben seriell in polyklonaler DNA gesunder Spender auf die Stufen 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 2%, 1% und 0.5% verdünnt.

2.2 Sanger Sequenzierung

Zunächst wurden Assays für die Sanger-Sequenzierung etabliert. Die Sequenzierung beschränkte sich auf die NT5C2-Exone 9, 13 und 15, da hier in verschiedenen Vorarbeiten die wesentlichen Mutationen nachgewiesen werden konnten²⁸⁻³⁰.

2.2.1 Primerdesign

Die Primer für Exon 9 wurden aus der Literatur übernommen²⁹. Die Primer für Exon 13 und 15 wurden zusätzlich in Anlehnung an Meyer *et. al*²⁹ mit Hilfe des Onlinetools *Primer 3+* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>, {Zugriff am 15.02.2018, 13:45}) neu designt. Sie wurden hinsichtlich Schmelztemperatur, Spezifität und Dimerbildung optimiert und auf eine Amplikonlänge von 350 Basenpaaren (bp) angepasst.

Die Primer wurden mit Kontroll-DNA gesunder Spender in Singleplex-PCR-Ansätzen getestet. Die letztendlich verwendeten Primer sind Tab. 3 zu entnehmen.

Tab. 3: Primer für die Sanger-Sequenzierung der Exone 9, 13 und 15 des NT5C2-Gens

Verwendete Primer für die Sanger Sequenzierung			
Exon	Forward-Sequenz	G/C%	Schmelztemperatur
9	TCCTGTTGTGGACAGAAATCC	47,6	63,9 °C
13	TTGGAATGCTGATTTTAATATAGGG	32	62,7 °C
15	CCAGCCTGAGTGACAGAATG	55	63,6 °C
	Reverse-Sequenz	G/C%	Schmelztemperatur
9	AAATTTGAGAACCACTGTTATCCTG	36	63,1 °C
13	GCCTTTTGACCACCTCTGAC	55	63,7 °C
15	GAAACAGGCTTCCCATCATC	50	63,4 °C

2.2.2 PCR Ansätze

Die Targetregion wurde zunächst mittels PCR amplifiziert, bevor die eigentliche Sequenzierung erfolgte.

Für die PCR wurden Reaktionsbedingungen und Reagenzienkonzentrationen angepasst, um ein möglichst starkes PCR-Signal ohne Hintergrundamplifikation zu generieren. Die verwendeten Mischungsverhältnisse im PCR-Ansatz und das Thermocycler-Programm sind in Tab. 4 und Tab. 5 zusammengefasst. Die Konzentration der verwendeten DNA bewegte sich zwischen 50 und 200 ng/ μ l. Standardmäßig wurde 1 μ l DNA/Ansatz eingesetzt.

Tab. 4: PCR-Ansatz der PCR vor Sanger-Sequenzierung

	Menge/Ansatz	Konzentration/Ansatz
PCR-Puffer (10x)	5 μ l	1x
MgCl ² (25mM)	6 μ l	3 mM
H ₂ O	34,8 μ l	
Forward-Primer	1 μ l	0,4 mM
Reverse-Primer	1 μ l	0,4 mM
Eagle-Taq-Polymerase	0,2 μ l	1U
dNTP-Mix (100mM)	1 μ l	0,2 mM
DNA-Probe	1 μ l	
Summe	50 μl	

Tab. 5: Reaktionsbedingungen der PCR vor der Sanger-Sequenzierung

Temperatur	Dauer	Zykluswiederholungen
96°C	10 min.	1 x
95°C	30 sek.	10 x
63°C	30 sek.	10 x
72°C	30 sek.	10 x
95°C	30 sek.	25 x
58°C	30 sek.	25 x
72°C	30 sek.	25 x
72°C	7 min.	1 x

Für die eigentliche Sequenzierreaktion wurden Reagenzienkonzentrationen und Reaktionsbedingungen so gewählt, wie sie bei anderen Sanger-Sequenzierungen im *Hämatologie Labor Kiel* verwendet werden. Die Parameter sind in Tab. 6 und Tab. 7 dargestellt. Die Sequenzierprimer entsprachen denen der PCR. Diese wurden für die Sequenzier-Reaktion auf 1:20 mit H₂O verdünnt.

Tab. 6: Ansatz der Sequenzier-Reaktion für die Sanger-Sequenzierung

	Menge/Ansatz
Puffer (5x)	7 µl
Big Dye	1 µl
Forward oder Reverse Primer	2 µl
H ₂ O	8 µl
PCR-Produkt	2 µl
Summe	20 µl

Tab. 7: Reaktionsbedingungen der Sequenzier-Reaktion für die Sanger-Sequenzierung

Temperatur	Dauer	Zykluswiederholungen
96°C	5 min.	1 x
96°C	10 sek.	50 x
55°C	5 sek.	50 x
60°C	4 min.	50 x
4°C	10 min.	1 x

2.2.3 Aufreinigung

Nach PCR und Sequenzierreaktion erfolgte jeweils ein Aufreinigungsschritt, um die weiter zu verarbeitende DNA von überschüssigem Mg²⁺, Puffer, Primern und

Nukleotiden zu trennen. Nach der PCR wurde 40 μ l des PCR-Produkts auf eine Siebfilter-Platte gegeben und die DNA durch zweimaliges Spülen mit H₂O und Anlegen eines Vakuums von den Überresten der PCR getrennt.

Nach der Sequenzierreaktion wurden die 20 μ l Sequenzier-Ansätze auf eine Sepharose-Säule gegeben und die zu sequenzierende DNA mittels Zentrifugation herausgefiltert. Diese wurde anschließend zum Schutz vor Verdunstungen in 10 μ l eines HIDI-Formamid-Denaturierungspuffers gegeben.

2.2.4 Agarosegel

Die Amplifikationskontrolle der PCR erfolgte in einem mit Ethidiumbromid gefärbten 2%-igen Agarosegel. Hierzu wurden 7 μ l des PCR-Produkts mit 3 μ l Bromphenolblau als Auftragspuffer vermischt und auf das Gel gegeben. Als Laufpuffer diente TBE-Puffer und es wurde eine Spannung von 130 V angelegt. Eine 50-1500 bp DNA-Leiter wurde als Längenstandard verwendet. Die Darstellung und Dokumentation der Banden erfolgte photographisch unter UV-Durchleuchtung.

2.2.5 Sequenzierung und Auswertung

Nach Abschluss der Vorbereitungen wurden die zu sequenzierenden Amplicons durch den automatischen Kapillarsequenzierer *3130 Genetic Analyser* von *Applied Biosystems* sequenziert. Die Sequenz wurde hierbei durch die Analysesoftware automatisch ermittelt und digital ausgegeben.

Die Auswertung erfolgte auf zwei Wegen. Zum einen wurde die ermittelte Sequenz in das Programm *BioEdit* geladen und mit dem Onlinetool *nBlast* (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch, {Zugriff am 16.02.2018, 14:00 Uhr}) gegen eine Referenz verglichen. Zum anderen wurde die graphisch dargestellte Nukleotidsequenz manuell auf Abweichungen gegenüber der Referenz, besonders an zu erwarteten Mutationspunkten, untersucht.

2.3 NGS

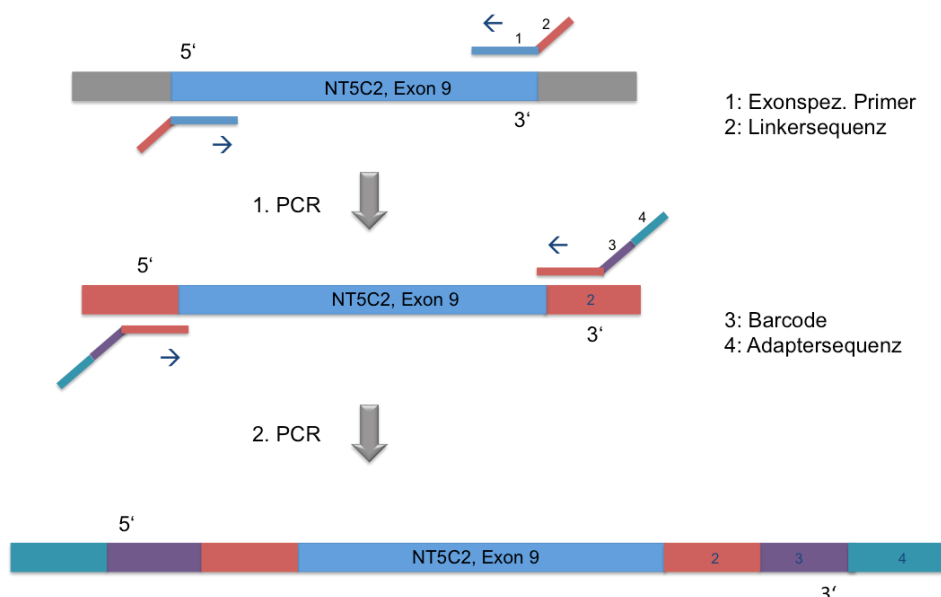
Das NGS liefert die Möglichkeit, gleichzeitig alle exonischen Bereiche des NT5C2-Gens nach Mutationen untersuchen zu können. Es wurden daher alle 17 kodierenden Exone des Gens mit NGS sequenziert ²⁵.

In den vorherigen Arbeiten wurde mit dem Humangenom 18 (hg18) das 2013 gültige Referenzgenom verwendet, um die Daten zu analysieren ^{31,40}. Dieses fand in dieser Arbeit noch in der Sanger-Sequenzierung Verwendung, für das NGS wurde mit dem

Humangenom 19 (hg19) auf die zum Zeitpunkt der Arbeit aktuelle Variante zurückgegriffen.

Zur Vorbereitung der eigentlichen Sequenzierung wurde eine 2-Schritt-PCR etabliert. Hierbei wurde in einer ersten PCR die zu untersuchende Sequenz amplifiziert und eine Linkersequenz eingebracht, indem diese Sequenz dem exonspezifischen Primer angehängt wurde. Die Linkersequenz diente als Template für die Primerbindung in einer darauffolgenden zweiten PCR. In dieser wurden der Linkersequenz eine Adaptersequenz zur Bindung an die Flowcell im Gerät und eine Barcodesequenz hinzugefügt (siehe hierzu auch Abb. 6). Die Barcodesequenz entspricht einer definierten Basenabfolge von 20-40 bp, deren Sequenz durch den Hersteller (*Illumina*) festgelegt ist und die zur korrekten Zuordnung der Reads erforderlich sind. Es standen acht Barcodes für die Forward-Sequenz (501-508) und 12 Barcodes für die Reverse-Sequenz (701-712) zur Verfügung. Eine feste Kombination aus Forward und Reverse Barcode wurde an jeden untersuchten Patienten vergeben und erlaubte in der Auswertung die genaue bioinformatische Zuordnung der entstehenden DNA-Sequenzen zu den einzelnen Proben.

Abb. 6: Vorbereitende PCR-Schritte für das NGS beispielhaft am Primersystem für Exon 9



2.3.1 Primerdesign

Die Primer korrespondierten jeweils mit intronischen Sequenzen, die unmittelbar 5' (forward Primer) bzw. 3' (reverser Primer) des zu sequenzierenden Exons lagen (Abb. 7). Als Sequenzvorlage diente die Referenzsequenz des Chromosom 10 der

NCBI-Homepage

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000010.10?report=genbank&from=104847774&to=104953063&strand=true, {Zugriff am 16.02.2018, 14:30 Uhr}), die Exongrenzen wurden anhand des Humangenom 19 bestimmt. Kriterien für das Primerdesign waren eine Primerlänge von 20-25 bp, eine Schmelztemperatur von 55-60°C und ein Anteil der Basen Guanin und Cytosin von >50% ⁴¹.

Abb. 7: Beispielhafte Darstellung der Primerauswahl für NGS an Exon 1

```
1  gtggtttttag tgccttttct agaatctagg attagagtaa ttactggcag ccatgcttaa
61  ttatttgaa gtatatgta tttttcggg ttgaaattac catatgaaat ttttttcca
121 acttttagatt attgagaagt gtcagtataa ttttcagcat atttactgta ttoagtggt
181 tttaataggt aattatatta ggcagtttgc aagctggagt ttttctgatt tttaaaaaa
241 tcagatgtca gtatacagat gccaatatta agttactaaa ttaatgattt tttttctag
301 aatacaaaat acagttaaaa taaaatgtca acctcctgga gtgatcgggtt acagaatgca
361 gcagatatgc ctgetaacat ggataagcat gccctgaaaa agtatcgtcg agaagcctat
421 catcggtaag tttttgtct atttaactct caaaacccct ctatgaagtg ggacttatt
481 ttacagatga tgaattaat gtacagagag gttaagtaa taaccagat cgtatgtcta
541 gtacatgta caaatctagt tctaagtoga gacttttaac tactagtaca ccatactgct
601 ttgtgtatct actagtaaaa gtatttaaga gaaaaatgct tttggttgc agaaaattgc
661 acctaaagta ataaaaattt tttttcttt ctttttttga gggagtgctg gatggacaga
721 gtctt
```

Gelb: Exon, Grün: Ausgewählte Primersequenzen

Die ausgewählten Primersequenzen wurden mit Hilfe des Onlinetools *OligoAnalyzer* (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>, {Zugriff am 16.02.2018, 14:30 Uhr}) auf die oben genannten Eigenschaften sowie auf die Neigung zu Selfdimer- und Hairpin-Bildung untersucht. Zur Sicherstellung der Spezifität wurden die präferierten Bindungsstellen mit *nBlast* abgeglichen.

Die um die Linkersequenz erweiterten Primer (Tab. 8) wurden jeweils in Singleplex-PCR-Ansätzen mit Patienten DNA unter Routine PCR-Bedingungen des *Hämatologie Labor Kiel* getestet, um die Funktionsfähigkeit der Primer zu testen und für die späteren Versuche zu gewährleisten.

Tab. 8: Linkersequenzen für die exonspezifischen Primer im 2-step Verfahren mit dem *Illumina Miseq*

Linkersequenz Forward Primer	GTAAAACGACGGCCAGT
Linkersequenz Reverse Primer	TAATACGACTCACTATAGGG

2.3.2 PCR-Ansätze

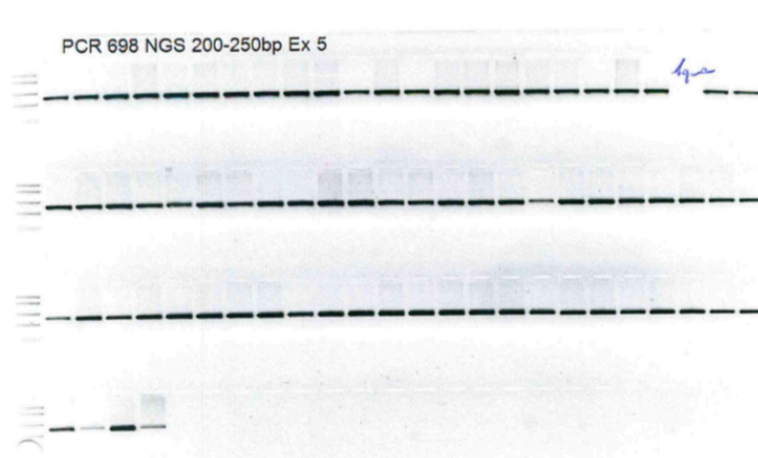
Für die vorbereitenden PCR-Schritte wurden Standard-NGS-Protokolle des *Hämatologie Labor Kiel* herangezogen und nach einer Testung für die weiteren Untersuchungen verwendet. Für Erst- und Zweitunden-PCR konnten identische Protokolle mit Ausnahme der Primer und der Template-DNA verwendet werden.

Für die 1. PCR wurden die mit einer Linkersequenz versehenen spezifischen Primer verwendet, für die 2. PCR dienten die Barcodes mit ihrer jeweiligen Linkersequenz als Primer.

In der 1. PCR wurde patientenspezifisch exonweise pipettiert, das heißt, pro Lauf wurde pro Tube ein Exon eines Patienten amplifiziert. Für die 2. PCR wurden je 5 µl des Erstrunden-PCR-Produktes patientenweise gepoolt.

Zwischen den beiden PCR-Schritten erfolgte eine Amplifikationskontrolle mittels Agarosegel (Abb. 8), wie in 2.1.4 beschrieben.

Abb. 8: Beispielhafte Darstellung eines Agarosegels zur Amplifikationskontrolle nach der 1. PCR für das NGS



Die Mischungsverhältnisse und Reaktionsbedingungen sind in Tab. 9 und Tab. 10 beschrieben. Die exonspezifischen Primer wurden auch hier von 100 mM auf eine Stammkonzentration von 10mM verdünnt.

Tab. 9: PCR-Ansatz der 1. Vorbereitungs-PCR für das NGS

	Menge/Ansatz	Konzentration/Ansatz
PCR-Puffer (10x)	1 μ l	1x
MgCl ² (25mM)	6 μ l	3 mM
H ₂ O	36,6 μ l	
Forward-Primer	1 μ l	0,2 mM
Reverse-Primer	1 μ l	0,2 mM
High-fidelity-Polymerase	0,2 μ l	1U
dNTP-Mix (100mM)	1 μ l	0,2 mM
DNA-Probe	1 μ l	
Summe	50 μ l	

Tab. 10: Reaktionsbedingungen der beiden Vorbereitungs-PCR für das NGS

Temperatur	Dauer	Zykluswiederholungen
94°C	10 min.	1 x
94°C	1 min.	35 x
63°C	1 min.	35 x
72°C	30 sek.	35 x
72°C	30 min.	1 x
12 °C	∞	

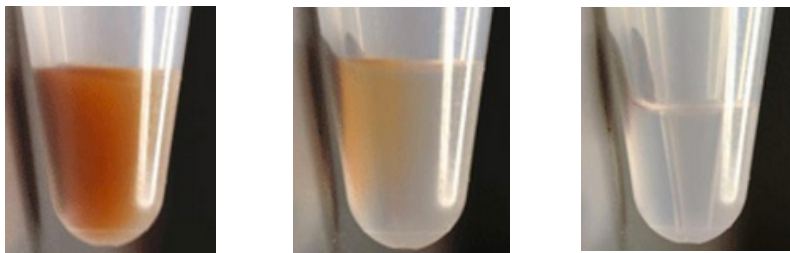
2.3.3 Aufreinigung der PCR-Produkte

Vor der abschließenden Sequenzierung wurden die Proben aufgereinigt, um überschüssige DNA, unspezifische Amplifikate und Primerdimere sowie andere nicht mehr verwendete Substanzen zu entfernen und eine möglichst genaue Sequenzierung zu ermöglichen. Es wurden magnetische Beads verwendet, die entsprechend der Fragmentlänge und des GC-Gehalts der zuvor amplifizierten Sequenzen an diese binden. Welche Fragmentlänge an die Beads bindet, ist von der Menge der eingesetzten Beads im Verhältnis zu der DNA- Menge abhängig. Es wurden mehrere Mischungsverhältnisse von Beads zu eingesetzter DNA getestet, wovon zwei Verhältnisse die besten Resultate zeigten:

- Fragmente > 300 bp: 0,9/1 → 72 μ l Beads + 40 μ l DNA + 40 μ l H₂O
- Fragmente < 300 bp: 1,2/1 → 72 μ l Beads + 30 μ l DNA + 30 μ l H₂O

Nach Vermischung und Bindung der DNA wurden die Beads durch Einsetzen des Tubes in einen magnetischen Ständer an die Wand gezogen (Abb. 9). Überschüssiges Material wurde anschließend durch insgesamt viermaliges Waschen mit 70%-igem Ethanol entfernt.

Abb. 9: Übergang der Beads von gelöst (links) zu fest an der Tubewand haftend (rechts)



Der klare Überstand mit überschüssigem Material kann nach Anhaftung abpipettiert werden.

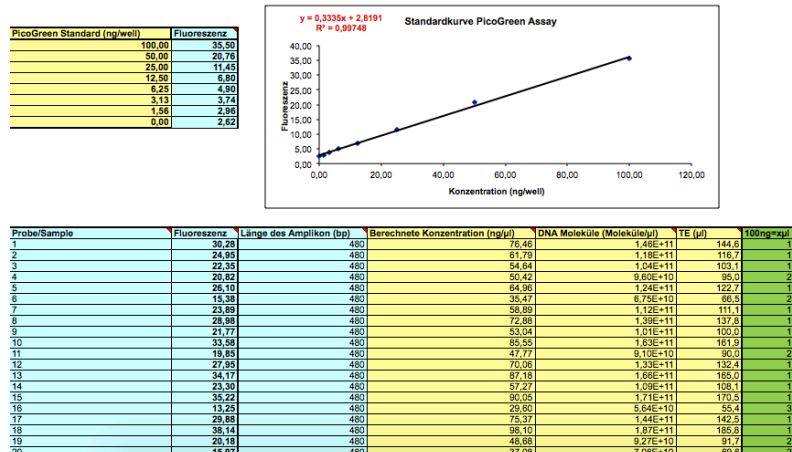
Zur Lösung der DNA-Bindung wurden die Beads zunächst bei 40°C getrocknet, um letzte Ethanolreste zu entfernen. Durch die anschließende Zugabe von TE-Puffer wurde die Bead-DNA Bindung gebrochen, so dass die nun aufgereinigte DNA in gelöster Form zur weiteren Verarbeitung vorlag.

2.3.4 Sequenzierung

Um eine für die Sequenzierung ausreichende DNA-Konzentration nach der Aufreinigung sicherzustellen, wurde die DNA-Menge in den aufgereinigten Patientenpools bestimmt. Hierzu wurde das Quantifizierungskit *PicoGreen* verwendet, mit diesem wurde eine festgelegte Verdünnungsreihe als Standard angelegt. Die Proben wurden anhand dieser Referenz mittels Real-Time-PCR im Lightcycler quantifiziert. Anschließend wurde die identische DNA-Menge jedes Patientenpools in einen neuen gemeinsamen Sequenzier-Pool gegeben, die eingesetzten Volumina unterschieden sich hierbei je nach Ergebnis der Quantifizierung. Der gemeinsame Pool wurde erneut gegen die *PicoGreen* Referenz quantifiziert (Abb. 10). Es folgte eine Verdünnung der nun in einem Tube gebündelten Proben auf 2 mM.

Abb. 10: Beispielhafte Darstellung der Standardkurve für die DNA-Quantifizierung via PicoGreen

Amplicon Library Preparation Method Manual; Step 3.3. Library Quantification mit PicoGreen Assay



Um eine Überladung des Sequenzierers zu vermeiden, wurde die Konzentration nach der Maßgabe von *Illumina* weiter mit HT1-Puffer auf 4-14 pM verdünnt. Zuvor wurde die DNA durch Zugabe von 0,2% NaOH denaturiert. Die genaue Endkonzentration richtete sich nach der Charge der verwendeten Chemikalien und den Erfahrungen aus vorangegangenen NGS-Läufen. Für die Sequenzierreaktion im *Illumina MiSeq* wurde für längere Fragmente >300 bp das V3-Chemie-Kit verwendet, für Fragmente <300 bp das V2-Chemie-Kit ⁴².

2.3.5 Bioinformatische Auswertung

Die bioinformatische Analyse der NGS-Daten für NT5C2-Mutationen wurde mit dem *Burrows-Wheeler-Aligner* (BWA) durchgeführt, um die generierten Sequenzen gegen das menschliche Referenzgenom abzugleichen ⁴³. Die Qualitätswerte der detektierten Basen wurden zuvor mit dem *Genome Analysis Tool Kit* (GATK) kalibriert. Dies diente der Maximierung der Spezifität, da sich die verschiedenen Varianten-Caller-Algorithmen auf die Qualitätswerte der einzelnen Basendetektionen in den jeweiligen Sequenzen stützen ⁴⁴.

Abweichungen von der Referenzsequenz, beispielsweise einzelne Nukleotidvarianten und Insertionen oder Deletionen, wurden mit den Variant-Callern *HaplotypeCaller* und *VarScan* detektiert. Die ausgegebenen Dateien mit den gesammelten Sequenz-Varianten pro Patient (.vcf) wurden nach Allelhäufigkeit (5% Cut off) und intronischen Varianten gefiltert, um eine möglichst geringe Anzahl falsch-positiver Ergebnisse zu erzielen ⁴⁵. Es wurden zusätzlich nur Varianten berücksichtigt, die nicht das "LowQual"-Zeichen in der .vcf-Datei enthielten. Exonische Regionen von NT5C2 wurden zusätzlich mit dem *Integrative Genome Viewer* (IGV) manuell auf Mutationen untersucht.

2.4 Allelspezifische PCR

Für die Bestimmung der NT5C2-Mutationsfrequenz bei der rezidierten T-ALL des Erwachsenen wurde mittels AS-PCR nach den beiden häufigsten Mutationen in der pädiatrischen ALL gesucht. Es wurde ein Screening auf die Mutationen NT5C2^{R238W} in Exon 9 und NT5C2^{R367Q} in Exon 13 durchgeführt.

2.4.1 Primerdesign

Die Forward-Primer wurden so gelegt, dass ihr 3'-Ende auf die jeweilige Punktmutation fiel und nur mit dieser kompatibel und somit allelspezifisch war. Ein zweiter Forward-Primer diente als Kontrollprimer und wurde jeweils so designt, dass

er etwas 5' der zu untersuchenden Stelle bindet und somit unabhängig von einer Mutation ein etwas größeres Fragment als die AS-PCR bildet. Die Spannbreite der Fragmente wurde so gewählt, dass ein gemeinsamer reverser Primer für das allelspezifische und das Kontrollfragment verwendet werden konnte und zwei unterschiedlich große Fragmente entstanden.

Die Primer wurden in Single- und Multiplexansätzen an Patienten-DNA getestet. Das gemeinsame Amplifizieren beider Loci zeigte dabei gleichwertige Ergebnisse zu einer Aufteilung und wurde für das weitere Vorgehen übernommen.

2.4.2 PCR

Die PCR-Bedingungen wurden aus der Sanger Sequenzierung übernommen, jedoch an die veränderte Primer-Konstellation angepasst. Es wurden insgesamt sechs Primer pro Tube eingesetzt, die Mischungsverhältnisse für die PCR sind in Tab. 11 aufgelistet. Die Reaktionsbedingungen entstammen vorherigen Arbeiten mit AS-PCR und sind in Tab. 12 zusammengefasst.

Tab. 11: PCR-Ansatz der AS-PCR

	Menge/Ansatz	Konzentration/Ansatz
PCR-Puffer (10x)	5 μ l	1x
MgCl ² (25mM)	6 μ l	3 mM
H ₂ O	34,7 μ l	
Exon 9 Mutation Forward	0,25 μ l	
Exon 9 Kontrolle Forward	0,25 μ l	
Exon 9 Reverse	0,5 μ l	
Exon 13 Mutation Forward	0,25 μ l	
Exon 13 Kontrolle Forward	0,25 μ l	
Exon 13 Reverse	0,5 μ l	
Eagle-Taq-Polymerase	0,2 μ l	1U
dNTP-Mix (100mM)	1 μ l	0,2 mM
DNA-Probe	1 μ l	
Summe	50 μ l	

Tab. 12: Reaktionsbedingungen der AS-PCR

Temperatur	Dauer	Zykluswiederholungen
95°C	10 min.	1 x
95°C	30 sek.	10 x
63°C	30 sek.	10 x
72°C	30 sek.	10 x
95°C	30 sek.	25 x
58°C	30 sek.	25 x
72°C	30 sek.	25 x
72°C	7 min.	1 x
12 °C	10 min.	1 x

2.4.3 Auswertung und Verifizierung

Für die Auswertung der PCR wurde ein Agarosegel verwendet, welches wie in 2.2.4 beschrieben angefertigt wurde. Dabei wurde anhand der Gel-Fotografie zuerst der Erfolg der PCR anhand der Kontrollbande überprüft. Anschließend wurde auf der Fotografie nach möglichen allelspezifischen Banden gesucht. Eine genaue Zuordnung einer potentiell allelspezifischen Bande zu einem Exon war auf Grund der ähnlichen Fragmentgröße nicht möglich. Daher wurde zur Verifizierung der Ergebnisse bei Verdacht auf eine Mutation eine Sanger-Sequenzierung der Exone 9 und 13 der entsprechenden Probe nach dem in 2.2 beschriebenen Verfahren durchgeführt.

2.5 Geräte und Reagenzien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tab. 13 alphabetisch sortiert aufgelistet. Die verwendeten Chemikalien finden sich nach Anwendung in Tab. 14.

Tab. 13: Alphabetische Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Modell
Abzug/Pipettierbench	Heraeus	HeraSafe
Automatischer Sanger-Sequenzierer	Applied Biosystems	ABI-3130 Genetic Analyser
Beads-Magnetständer	Invitrogen	Dynal
Doppelplatten-Zentrifuge	Beckmann Coulter	Alegria X-12 Centrifuge
Gelelektrophoresekammer	Preqlab	40-2314
Laborwaage	Sartorius	BL-3100

Next Generation Sequencer	Illumina	MiSeq
PCR-Vakuumaufreinigungsplatte	Sarstedt	96 PCR Platte
Pipetten	Eppendorf Reference	verschiedene
Real Time PCR	Roche	Light Cycler 480 II
Rotationsmischer	Bender + Hobein	Vortex Genie 2
Sepharose-Platten	Merck	Multiscreen Filter Plates
Spannungsgeber	Preqlab	PeqPower 300W
Thermo Block	VWR	Digital Heat Block
Thermozycler	Applied Biosystems	GeneAmp-PCR-9700
Thermozycler	SensoQuest	Labcycler
Tischzentrifuge	Sarstedt	MC6-Centrifuge
Tube-Zentrifuge	ThermoScientific	Hareaus Pico 17
Unterdruckrahmen	Millipore	
UV-Transluminator + Kamera	Cell-Biosciences	Alphamanager HP
Vakuumpumpe	Millipore	

Tab. 14: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien nach Anwendungsgebiet

Bezeichnung	Hersteller	Anwendung
PCR Puffer	Roche	PCR Ansätze
MgCl ₂	Roche	PCR Ansätze
DNTP Mix	Roche	PCR Ansätze
Primer	Sigma Aldrich	PCR Ansätze
Eagle Taq Polymerase	Roche	PCR Ansätze
High fidelity Polymerase	Roche	PCR Ansätze
TE-Puffer	Sigma Aldrich	PCR Ansätze
Buffy Code	Roche	Positivkontrollen-Verdünnungsreihe
Agarose	VWR Life science	Gelelektrophorese
10x TBE Puffer	Pan Reak	Gelelektrophorese
Ethidiumbromid 95%	Sigma Aldrich	Gelelektrophorese
Bromphenolblau 0,2%	Sigma Aldrich	Gelelektrophorese
Fast Ruler Ladder	Thermo Scientific	Gelelektrophorese
Sephadex 50 Sepharose	GE-Healthcare	Aufreinigung Sanger
Big Dye 1.1 Sequencing Kit	Applied Biosystems	Sanger Sequenzierung
HiDi Formamid	Applied Biosystems	Sanger Sequenzierung
Sequenzier Polymer	Applied Biosystems	Sanger Sequenzierung

Agentcourt AMPure Beads	Beckmann Coulter	Aufreinigung NGS
Ethanol 100%	Merck	Aufreinigung NGS
Aqua	Merck	Aufreinigung NGS
EDTA	Sigma Aldrich	Aufreinigung NGS
NaOH 0,2%	Merck	Quantifizierung NGS
PicoGreen dsDNA Assay Kit	Invitrogen	Quantifizierung NGS
V2-Sequenzier-Kit	Illumina	NGS
V3-Sequenzier-Kit	Illumina	NGS

3. Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristika des Kollektivs I

Nach Auswertung der Studienunterlagen konnten 60 Patienten mit rezidivierter T-ALL identifiziert werden, die im Rahmen der GMALL-Phase II mit Nelarabine im Rezidiv therapiert wurden und von denen ausreichend Restmaterial von ED und Rezidiv im *Hämatologie Labor Kiel* vorhanden war. Nähere Informationen zu diesen Patienten sind Tab. 15 zu entnehmen.

Tab. 15: Patientencharakteristika des Kollektivs I

Patientencharakteristika (n=60)		
Alter bei Diagnose	Mittelwert	32,2 Jahre
	Bereich	18-75 Jahre
Geschlecht	Männlich	44 (73%)
	Weiblich	16 (27%)
Zeit bis zum Rezidiv	Very early	43 (73%)
	Early	16 (26 %)
	Late	1 (1%)

Very early: < 18 Monate nach ED, early: 18-30 Monate, late: >30 Monate

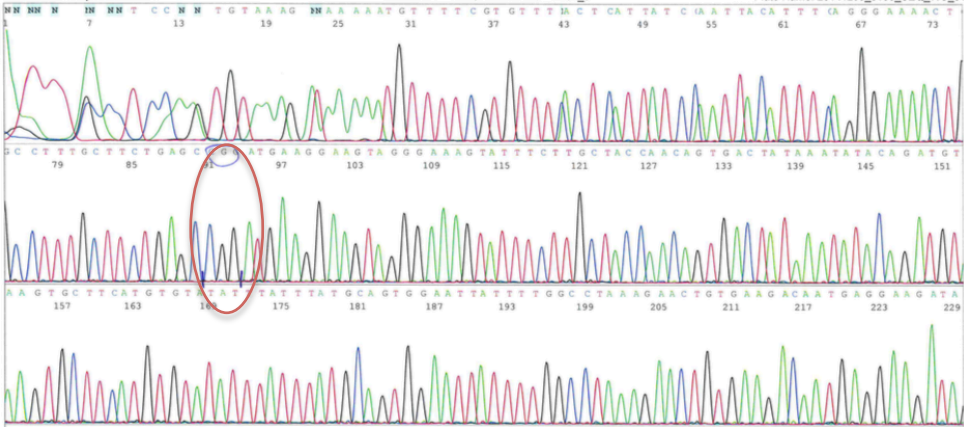
nach Gökbuget N et al. ¹⁶

Bei diesen 60 Patienten wurden jeweils in ED- und Rezidivmaterialien die Exone 1-17 mit NGS sowie die Exone 9, 13 und 15 mit Sanger-Sequenzierung auf Mutationen im NT5C2-Gen untersucht.

3.2 Sanger Sequenzierung

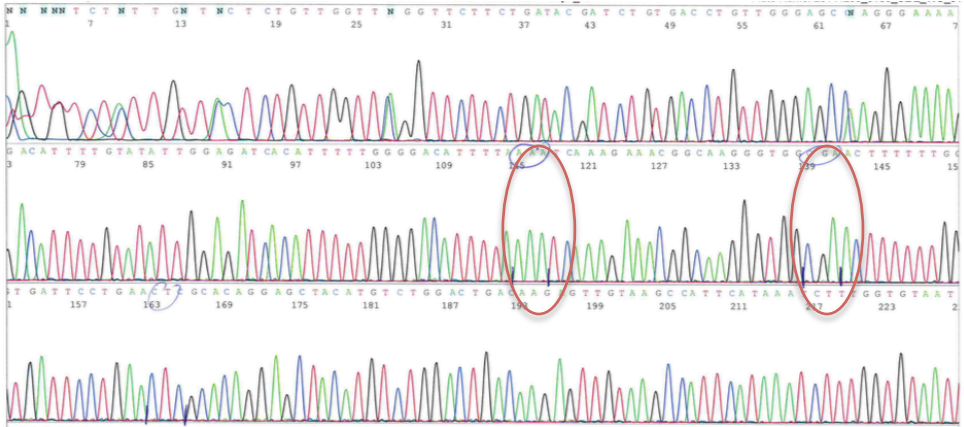
Mittels Sanger-Sequenzierung konnten bei keiner der 60 untersuchten ED-Proben und bei keiner der 60 untersuchten Rezidivproben Mutationen in den Exonen 9, 13 und 15 im NT5C2-Gen festgestellt werden (Abb. 11-13). Jede untersuchte Probe zeigte in den 3 Exonen, besonders an den zu erwartenden pädiatrischen Mutationsstellen, 100% Übereinstimmung mit der Wildtyp-Referenz. Auch eine optische Kontrolle der graphisch dargestellten Sequenz ergab keinen Hinweis auf Punktmutationen.

Abb. 11: Graphische Darstellung von Exon 9 eines exemplarischen Patienten ohne Mutation, sequenziert mit Forward Primer



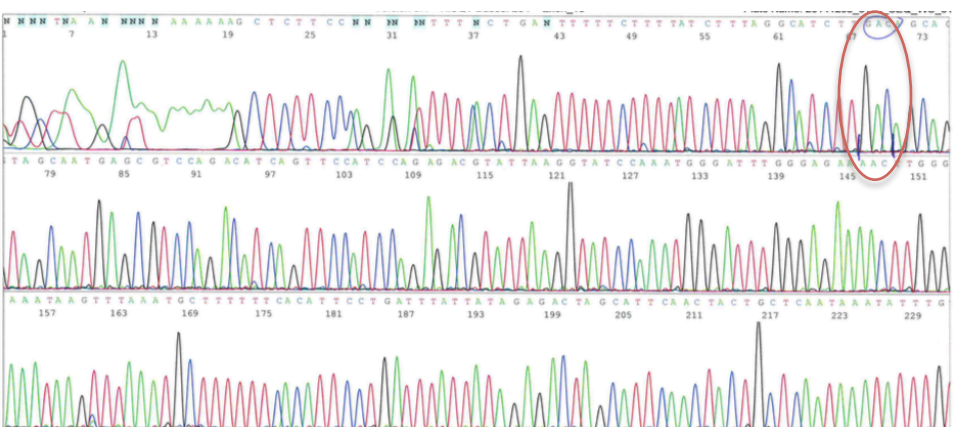
Eingekreist und mit Strichen markiert: erwartete Mutationsstelle.

Abb. 12: Graphische Darstellung von Exon 13 eines exemplarischen Patienten ohne Mutation, sequenziert mit Forward Primer



Eingekreist und mit Strichen markiert: erwartete Mutationsstellen.

Abb. 13: Graphische Darstellung von Exon 15 eines exemplarischen Patienten ohne Mutation, sequenziert mit Forward Primer



Eingekreist und mit Strichen markiert: erwartete Mutationsstelle.

3.3 NGS

Für das NGS wurden die Primer in mehreren Schritten optimiert, bevor die eigentlichen Analysen zufriedenstellend durchgeführt werden konnten. Diese werden im Folgenden kurz dargelegt. Im Anschluss werden die Ergebnisse der Sequenzierung gezeigt.

3.3.1 Optimierungsschritte und finales Primerset

Die Primer für die NGS-Untersuchungen wurden zunächst so gelegt, dass konstant große Fragmente von 400-450 bp entstanden. Diese Größe war nötig, um alle Exonlängen mit einzubeziehen. Darüber hinaus versprach eine konstante Fragmentgröße eine Erleichterung in der praktischen Arbeit und bei der bioinformatischen Auswertung.

Die Primer wurden nach dem in 2.3.1 dargestellten Ablauf ausgewählt. Anschließend wurden die 120 Proben (60 initialdiagnostische und 60 Rezidivproben) der 60 Patienten nach dem in 2.3.2-2.3.4 dargestellten Verfahren sequenziert.

Bei der bioinformatischen Auswertung fiel eine teilweise schlechte Qualität der erhobenen Daten auf. Aufgrund der vergleichsweise langen Fragmente wurde die Wahrscheinlichkeit eines Sequenzierfehlers in langen Exonen im Verlauf der Sequenzierung so groß, dass eine zufriedenstellende Sensitivität nicht mehr gewährleistet wurde. Dies war bei forward- und reverse-Strang der Fall, sodass der mittige, überlappende und für die Fragestellung interessante Teil, qualitativ nicht ausreichend war.

Nach diesen Erkenntnissen wurden die Primer überarbeitet und eine Fragmentlänge von max. 200-250 bp festgelegt. Bei den Exonen 13, 16 und 17 war diese Länge zu kurz, um das ganze Exon zu erfassen. Daher wurden für diese Exone zwei Primerpaare entwickelt, deren entstehende Fragmente sich überlappten (siehe Abb. 14), so dass das gesamte Exon abgedeckt werden konnte. Die Fragmente wurden im Anschluss an die Sequenzierung bioinformatisch zusammengefügt.

Abb. 14: Primerdesign mit zwei überlappenden Primerpaaren für ein großes Exon, hier beispielhaft an Exon 16

```

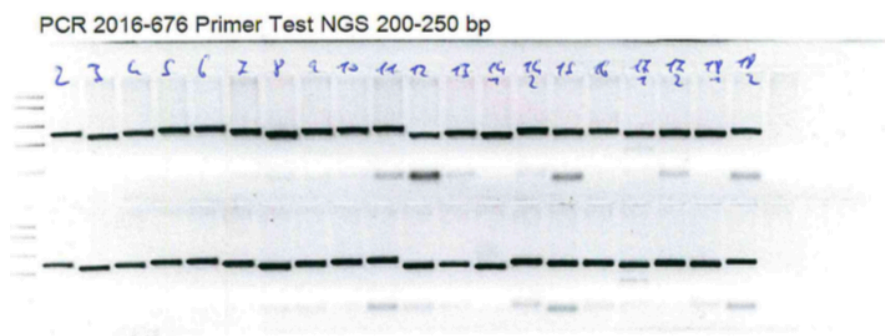
1 actccagcct gagtgacaga atgagactgt cttaaagaat aaaaaaagc tcttcccaga
61 gattttcaact gagttttct tttatcttta ggcacottga cagcagtagc aatgagcgtc
121 cagacatoag ttocatccag agacgtatta aggtatccaa atgggatttg ggagaaaact
181 tgggaataa gtttaaatgc tttttcaca ttctgattt attatagaga ctagcattca
241 actactgctc aataaatatt tgttgaatga gccaagaato aatcttgcto tttgtttag
301 aaagtaactc atgacatgga catgtgctat gggatgatgg gaagcctgtt tcgcagtggc
361 ccccggcaga cctttttgc cagtcaagtg atgcggtatg ctgaccteta tgcagcatct
421 tcatcaacc tgcgttatta cctttcago taacctttca gggctgccc tgtottggtg
481 agttaagct gtaatggaca gccaagatgt actotaagcc cagggtcago aaccacottt
541 gtgagatggc acaggagata gtttgaacat ttctttctga tgtacagago ccagggcgag
601 gttatatggt tgcataagaa ggggtctttg agaaaagtaga accaacattg gaagttaaga
661 gtgtaacttt actctctgaa gtctactcta ttaaaagctg tatgtgggcc aggcattggtg
721 gctcatgctc gtaaccccag aacttttagag gctgaggtgg gaggattgat tgagccc

```

Gelb: Exon, Grün: Primerpaar 1, Türkis: Primerpaar 2.

Nach einer erneuten Testung (siehe Abb. 15) wurden die Analysen mit diesem Primerset wiederholt. Die letztendlich verwendeten Primer für das NGS sind den Tabellen 16 und 17 zu entnehmen.

Abb. 15: Agarosegel des Primertests der finalen NGS Primer nach Exon aufgeteilt



Oben Patient A, unten Patient B.

Tab. 16: Für das NGS verwendete Forward Primer ohne Linkersequenz

Exon	Forward-Primer	G/C %	Schmelztemperatur
1	TCA GAT GTC AGT ATA CAG ATG CCA	41,7 %	55,3 °C
2	ACT TGA GAA TTT ATT TTC CAG TGT TGA G	32,1 %	54,2 °C
3	GGC TGT TCT TTC TGC TAA CTA ATG	41,7 %	54 °C
4	GGA CAT ACT TTG AGT TGG TAC AAA GC	42,3 %	56,1 °C
5	CGG AAT TCT GTC TTG CAC ATA GC	47,8 %	56,3 °C
6	CCA TTA GTC TGT ATT CAA GGG AGG T	44,0 %	56 °C
7	GTT TAC CCT GTT TTG GAT CCC C	50,0 %	56 °C
8	GCA ACA GGG TGA CCT TGT CTC	57,1 %	58,2 °C
9	CCT GTT GTG GAC AGA AAT CCA GT	47,8 %	57,2 °C
10	GAA TGT GGT GAG TCC TAT GTT GA	43,5 %	54,5 °C

11	TGC CTT AAG GTA AGG AGT GAT GT	43,5 %	55,7 °C
12	GGG GAG GAT TGT GAT AGG ATG AT	47,8 %	55,9 °C
13 – 1	GGG ACA GTT TTC TCA TTG TTC ACT C	44,0 %	56°C
13 – 2	TGG AGA TCA CAT TTT TGG GGA C	45,5 %	55,2 °C
14	GCA GCA GTT AAG AAC TAG GTG C	50,0 %	56 °C
15	GCT CTT CCC AGA GAT TTT CAC TGA G	48,0 %	57,3 °C
16 – 1	GAG ACT AGC ATT CAA CTA CTG CTC	45,8 %	54,9 °C
16 – 2	GCA GAC CCT TTT TGC CAG TCA A	50,0 %	58,4 °C
17 – 1	AGC TAC TTT GCT CTG CCT GC	55,0 %	57,9 °C
17 – 2	ACC GCA CAT CAG TGG ATT TCA	47,6 %	57 °C

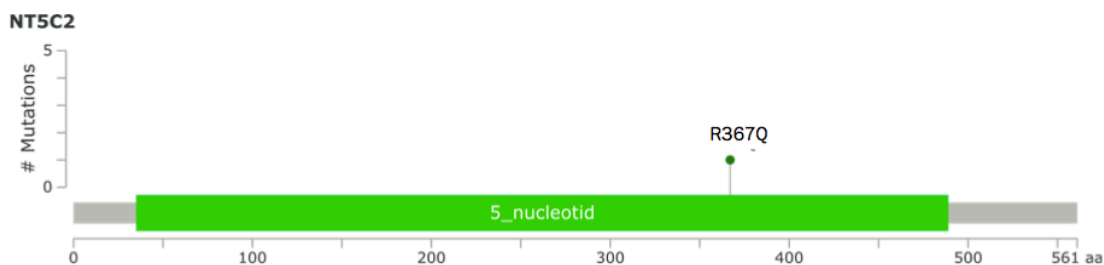
Tab. 17: Für das NGS verwendete Reverse Primer ohne Linkersequenz

Exon	Reverse (Reverse-complement) Primer	G/C %	Schmelztemperatur
1	GAA GTC CCA CTT CAT AGA GGG G	54,5 %	56,6 °C
2	CCT ACT GTG AAC CCA CTG TG	55,0 %	55,2°C
3	GAG GGG TAA GGA AAG TAG TCT TAA TC	42,3 %	54,4 °C
4	AGA GGC TAA AGG TTC TCT GTA CTC	45,8 %	55,6 °C
5	GTC ACA GAA GGG AAA GCA TCA G	50,0 %	55,8 °C
6	GAC CTA CAA TGG CCA GTT CTC	52,4 %	55,4 °C
7	CCA CGC CAT AAA ATA CAT GCC AG	47,8 %	56,7 °C
8	GAG CTA TTA TGC AGA TCT ATT TTC CCC	40,7 %	55,3 °C
9	GTC TTC ACA GTT CTT TAG GCC AA	43,5 %	55,1 °C
10	CTG GGT GGG TTC TGA CCA ATT C	54,5 %	58 °C
11	GTG CTA GCA AGA CAG ATC ATT CTC	45,8 %	55,4 °C
12	TGC TGA GAG ATT ACC AAA GCT TTC	41,7 %	55,3 °C
13 – 1	TGC GAG TTC AGG AAT CAC CA	50,0 %	56,5 °C
13 – 2	CCT TTT GAC CAC CTC TGA CTT CC	52,2 %	57.6 °C
14	TGG GAT TAC TGG CCT GGA AAG	52,4 %	57 °C
15	GAG CAG TAG TTG AAT GCT AGT CTC	45,8 %	54,9 °C
16 – 1	GCA TAG AGG TCA GCA TAA CGC AT	47,8 %	57,3 °C
16 – 2	ACT ATC TCC TGT GCC ATC TCA C	50,0 %	56,1 °C
17 – 1	CTC ACT AAT TGA CCG TGT CAG C	50,0 %	55,7 °C
17 – 2	GTG AGT CCT GCC AGG ACT TG	60,0 %	57,8 °C

3.3.2 Detektierte Mutationen

Bei der Analyse der initialdiagnostischen Materialien wurden mittels NGS keine Mutationen detektiert. In den untersuchten Rezidivproben zeigte sich bei einem von 60 Patienten eine Mutation (1,7%). Diese entsprach der aus der Literatur bekannten NT5C2^{R367Q} in Exon 13, dem Basenaustausch c1100G>A (Abb. 16). Die Mutation lag mit einer Allelfrequenz von 4,7% vor.

Abb. 16: Lollipop-Plot der mit NGS detektierten NT5C2-Mutationen im Patienten X



3.4 AS-PCR

Für das Mutationsscreening im NT5C2-Gen mittels AS-PCR wurde eine größere Kohorte von 344 Proben von 251 Patienten mit rezidivierter T-ALL des GMALL-Registers ausgewählt, für die mindestens ein Rezidivmaterial mit einem Blastenteil von mehr als 10% im *Hämatologie Labor Kiel* verfügbar war. Der Blasteninfiltrationsgrad wurde anhand des Ergebnisses der molekularen MRD-Analyse bestimmt. Nähere Informationen zum Kollektiv sind Tab. 18 zu entnehmen. Es wurden jeweils eine oder mehrere Rezidivproben pro Patient untersucht.

Tab. 18: Patientencharakteristika des Kollektivs II für die Suche auf die Hotspotmutationen (NT5C2^{R238W} und NT5C2^{R367Q}) mit AS-PCR

Patientencharakteristika (n=251)		
Alter bei Diagnose	Mittelwert	39,4 Jahre
	Bereich	18-78 Jahre
Geschlecht	Männlich	172 (68,5%)
	Weiblich	79 (31,5%)

In dieser Kohorte zeigte sich bei vier Patienten (1,2%) eine mutationsspezifische Bande im Agarosegel (Abb. 17). Bei einer anschließenden Sanger-Sequenzierung dieser Proben wurde in allen vier untersuchten Proben die Mutation NT5C2^{R367Q}

nachgewiesen werden (Abb. 18). Der Basenaustausch war auch hier c1100G>A. Die ebenfalls untersuchte Hotspot-Mutation NT5C2^{R238W} konnte in keiner Probe nachgewiesen werden.

Abb. 17: Ausschnitt eines Agarosegels mit Doppelbande als Hinweis auf das Vorliegen einer Mutation (rot eingekreist)

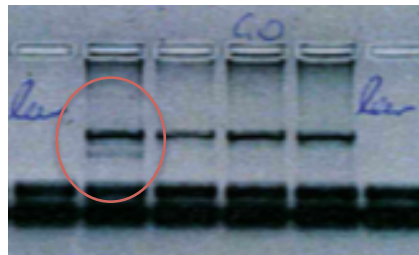
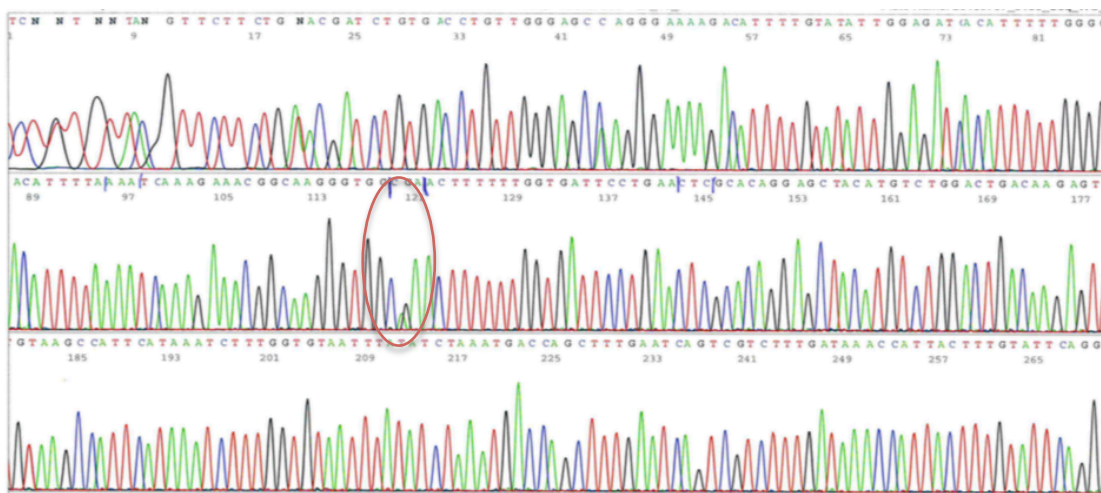


Abb. 18: Graphische Darstellung von Exon 13 eines exemplarischen Patienten mit der Mutation NT5C2^{R367Q}, sequenziert mit Forward Primer

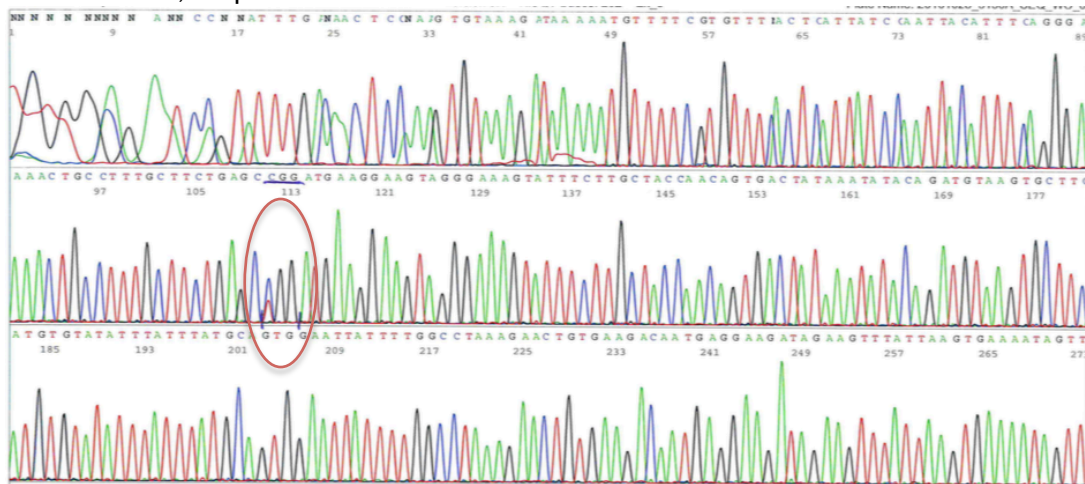


Rot eingekreist: Mutationsstelle.

3.5 Positivkontrollen

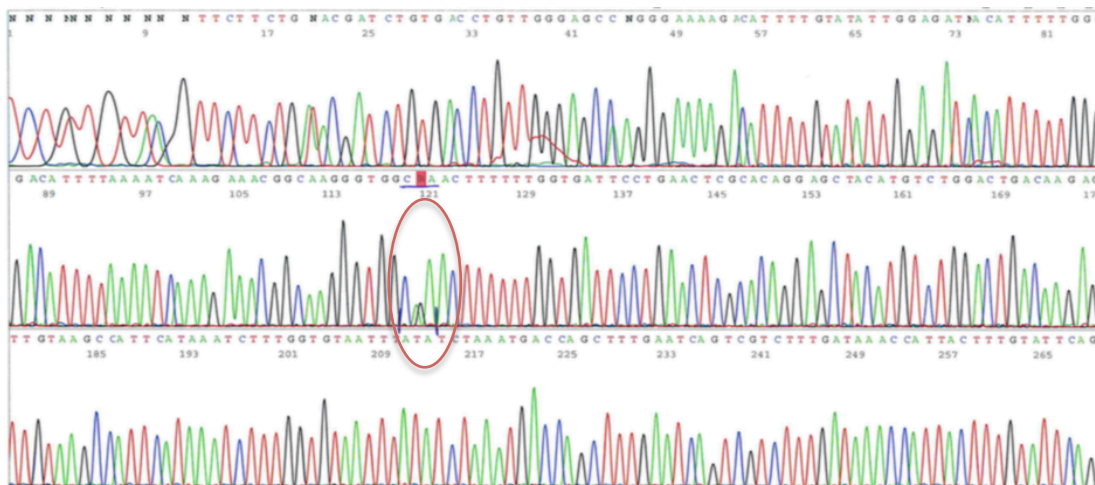
Anhand der Positivkontrollen mit bekannter NT5C2-Mutation konnten die jeweils angegebenen Mutationen mit allen drei verwendeten Verfahren bestätigt werden (Abb. 19, 20).

Abb. 19: Graphische Darstellung von Exon 9 einer Positivkontrolle mit der Mutation NT5C2^{R238W}, sequenziert mit Forward Primer



Rot eingekreist: Mutationsstelle.

Abb. 20: Graphische Darstellung von Exon 13 einer Positivkontrolle mit der Mutation NT5C2^{R367Q}, sequenziert mit Forward Primer



Rot eingekreist: Mutationsstelle.

3.5.1 Sensitivitätstestungen

Die Mutationen NT5C2^{R238W} und NT5C2^{R367Q} konnten in der verwendeten Verdünnungsreihe der Positivkontrollen mit NGS mittels automatischer Calling-Analyse bis zu einer Allelfrequenz von 5% sicher identifiziert werden, mit AS-PCR bis zu einer Allelfrequenz von 2%. Bei der manuellen Überprüfung der NGS-Daten gegen eine Referenz mit dem IG-Viewer konnte ebenfalls eine Sensitivität von 2% erreicht werden. In den Verdünnungsstufen 0,5% und 1% konnten mögliche Mutationen nicht mehr vom Hintergrundrauschen der Daten unterschieden werden (Tab. 19).

Tab. 19: Zusammenfassung der Ergebnisse der Verdünnungsreihe

Verdünnungsstufen	Detektionsmethode		
	AS-PCR	NGS automatisch	NGS manuell
25 %	✓	✓	✓
20 %	✓	✓	✓
15 %	✓	✓	✓
10 %	✓	✓	✓
5 %	✓	✓	✓
2 %	✓	⊖	✓
1 %	⊖	⊖	⊖
0,5 %	⊖	⊖	⊖

✓: Mutation detektiert, ⊖: Mutation nicht detektiert.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, das Vorkommen und die Bedeutung von Mutationen im NT5C2-Gen bei der rezidierten T-ALL des Erwachsenen zu untersuchen. Für dieses Patientenkollektiv liegen bisher, im Gegensatz zu pädiatrischen Patienten, keine systematischen Daten vor. Bei der rezidierten T-ALL des Kindes wurden NT5C2-Mutationen bei 19-22% der Patienten nachgewiesen. Entgegen der Erwartungen war die Mutationshäufigkeit des im Rahmen der Dissertation untersuchten Patientenkollektivs erwachsener Patienten mit rezidivierter T-ALL deutlich geringer. Mittels NGS wurde in lediglich 1,7% der Fälle eine NT5C2-Mutation im Rezidiv nachgewiesen. Diese Ergebnisse wurden an einem größeren Kollektiv von 251 Patienten mit rezidivierter T-ALL bestätigt, von denen insgesamt 344 Rezidivproben mittels allelspezifischer PCR auf das Vorliegen einer der beiden häufigsten Hotspotmutationen untersucht wurden (siehe auch Tab. 20). Die Mutationshäufigkeit liegt damit deutlich unter dem Wert pädiatrischer Daten.

Tab. 20: Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit früheren Arbeiten zum Thema NT5C2

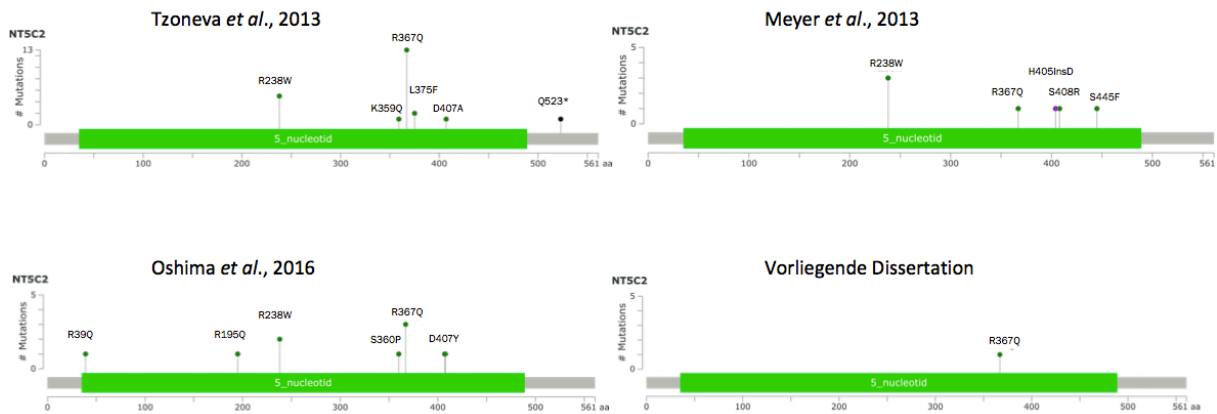
	Untersuchte Kohorte	Anzahl und Immunphänotyp	Detektierte Mutationen	
			Rezidierte T-ALL	Rezidierte B-ALL
AS-PCR	Erwachsene	251 T-ALL	1,2%	
NGS	Erwachsene	60 T-ALL	1,7%	
<i>Tzoneva et al, 2013</i> ²⁸	Kinder	103 T-ALL; 35 B-ALL	19%	3%
<i>Meyer et al, 2013</i> ²⁹	Kinder	71 B-ALL		16%
<i>Oshima et al, 2016</i> ³⁰	Kinder	33 T-ALL; 22 B-ALL	22%	5%

Die Allelfrequenz der Mutation und die Anzahl der detektierten Mutationen unterscheiden sich ebenfalls von den pädiatrischen Erhebungen. Bei Kindern traten Mutationen bei Erstdiagnose mit einer Frequenz von 0,01-0,02% auf und wurden unter Therapie selektioniert, sodass zum Rezidivzeitpunkt Allelfrequenzen von 20-50% nachgewiesen werden konnten. Die in dieser Arbeit mittels NGS detektierte Mutation im Rezidiv eines Patienten zeigte eine Allelfrequenz von lediglich 4,7%.

Interessanterweise betrafen alle im Rahmen der Promotionsarbeit nachgewiesenen Mutationen die R367Q-Mutation, während in Arbeiten zur ALL des Kindes insgesamt

12 verschiedene NT5C2-Hotspot-Mutationen beschrieben wurden (siehe auch Abbildung 21).

Abb. 21: Häufigkeit und Anzahl von detektierten Mutationen im Vergleich zu früheren Arbeiten zur pädiatrischen ALL, dargestellt in Lollipop-Plots



Am wahrscheinlichsten ist diese Diskrepanz auf die biologischen Unterschiede zwischen pädiatrischer und adulter T-ALL zurückzuführen.

Diese zeigen sich schon bei oberflächlicher Betrachtung anhand der epidemiologischen Daten. Während pädiatrische ALL-Patienten nach Therapie in ca. 20% ein Rezidiv erleiden, liegt diese Rate bei erwachsenen Patienten bei mehr als 50%, obwohl das primäre Therapieansprechen mit >90% CR nach Induktionstherapie vergleichbar ist. Auch ist die Prognose des Rezidivs bei erwachsenen Patienten deutlich schlechter: Kinder mit rezidivierender ALL können durch eine Salvage-Therapie je nach Risikoprofil noch in 30-50% geheilt werden^{46,47}, während das Langzeitüberleben von erwachsenen Patienten mit rezidivierender ALL bei lediglich 10-25% liegt^{48,49}. Somit unterscheiden sich auch die Gesamt-Langzeitüberlebensraten mit 85% bei pädiatrischen und 27-54% bei erwachsenen Patienten deutlich^{4,50}.

Möglicherweise ist eine 6-Mercaptopurinresistenz, die als wesentlicher Mechanismus zur Selektion NT5C2-mutierter Subklone postuliert wird, für das Rezidiv der pädiatrischen ALL bedeutender als für das des Erwachsenen.

6-MP ist neben Methotrexat das relevante Chemotherapeutikum in der Erhaltungstherapie sowohl der ALL des Erwachsenen als auch der des Kindes. Für pädiatrische Patienten konnten die Bedeutung der Erhaltungstherapie durch verschiedene Analysen eindrucksvoll belegt werden: So scheint die Einnahmecompliance von 6-MP einen großen Einfluss auf das Outcome zu haben

^{51,52}. In einer Studie der *Children's Oncology Group* war eine 6-MP-Adhärenz von <95% mit einem 2,7fach erhöhten Rezidivrisiko verbunden ⁵³. Dieser deutliche Zusammenhang ist bisher für die ALL des Erwachsenen nicht beschrieben.

Auch liefern molekulare Analysen zu Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) von Genen, die für den 6-MP-Metabolismus verantwortlich sind, indirekte Daten für die Bedeutung von 6-MP innerhalb der pädiatrischen Therapieprotokolle. *Stanulla et al.* ⁵⁴ konnten zeigen, dass Polymorphismen der Thiopurin-Methyltransferase (TPMT), die zu einem verzögerten 6-MP-Abbau führen, assoziiert sind mit einem besseren MRD-Ansprechen unter 6-MP-haltiger Therapie ⁵⁴. Eine ähnliche Studie an erwachsenen ALL-Patienten zeigte zwar auch eine Assoziation zwischen TPMT-Polymorphismen und MRD-Response, allerdings bereits in Therapiephasen, in denen noch kein 6-MP verabreicht wurde, so dass in diesem Patientenkollektiv ein 6-MP-unabhängiger Mechanismus anzunehmen ist ⁵⁵. Außerdem konnte ein Effekt nur für B-Vorläufer-ALLs, nicht aber für T-ALLs gezeigt werden.

Tulstrup et al. ⁵⁶ wiesen ähnliche Effekte für SNPs im NT5C2-Gen bei adulten und pädiatrischen ALL Patienten nach. Spezifische genomische Varianten ließen sich mit höheren Blutspiegeln von 6-MP-Metaboliten assoziieren, was die tragende Rolle dieses Gens im 6-MP-Metabolismus unterstreicht. In einer pädiatrischen Subgruppe konnte zudem ein SNP detektiert werden, welcher im Verlauf mit einem höheren Risiko für das Auftreten einer somatischen, rezidivspezifischen Mutation verbunden ist, welche zu einer 6-MP-Resistenz führt ⁵⁶. Als Mechanismus der Resistenzbildung wurde eine allosterische Starre im aktiven Zustand durch die beschriebenen rezidivspezifischen Mutationen detektiert. Hierdurch wird keine ATP-Bindung zur Aktivierung des Enzyms benötigt und deutlich mehr Substrat, darunter 6-MP, umgesetzt. Der Grad der Aktivierung unterscheidet sich je nach vorliegender Mutation ⁵⁷.

Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung von 6-MP-Resistenzen für das Rezidiv der NT5C2-mutierten ALLs ist der Rezidivzeitpunkt in pädiatrischen Kollektiven: In dem von *Meyer et al.* ²⁹ untersuchten Patientenkollektiv umfasste die rezidivfreie Zeit 516 Tage, wenn im Rezidiv eine NT5C2-Mutation nachweisbar war, hingegen 930 bei Rezidiven ohne eine solche Mutation. Das Rezidiv der NT5C2-mutierten Patienten trat somit vornehmlich in der Phase der 6-MP-haltigen Erhaltungstherapie auf ²⁹.

In dem von uns untersuchten Patientenkollektiv erwachsener T-ALL Patienten war das Rezidiv insgesamt deutlich früher feststellbar, nach durchschnittlich 413 Tagen

oftmals während der Erstjahrestherapie, in der 6-MP eine nur untergeordnete Rolle spielt. Somit führen möglicherweise bei erwachsenen Patienten Resistenzen gegen andere Chemotherapeutika zu einem Rezidiv, bevor 6-MP-Resistenzen relevant werden können.

Möglicherweise fehlen bei Kindern mit spätem Rezidiv andere, die Prognose verschlechternde Faktoren, so dass sich spezifisch NT5C2-Mutationen und Resistenzen entwickeln können, ohne dass zuvor durch eine andere Ursache ein Rezidiv entstanden ist.

Diese Hypothese unterstützen Erkenntnisse von *Tzoneva et al.*⁵⁸ aus 2018: Zellen mit der NT5C2-Hotspotmutation R367Q zeigten, verglichen mit dem NT5C2-Wildtyp, eine geringere Proliferationsrate *in vitro* und ein langsames Tumorwachstum *in vivo*. Die Autoren schlossen daraus eine Negativselektion der NT5C2-mutierten Klone in der initialen und proliferationsaktiven Phase des Tumorwachstums sowie eine Umkehrung unter dem Selektionsdruck einer 6-MP Erhaltungstherapie⁵⁸. Für diesen Mechanismus bedarf es gemäß der o.g. Arbeiten eines längerem Zeitraums ohne sonstige Rezidivtrigger, was bei adulten T-ALL Patienten nicht der Fall zu sein scheint.

Insgesamt deuten die Daten der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass grundlegende Unterschiede zwischen adulter und pädiatrischer T-ALL hinsichtlich der Bedeutung von NT5C2-Mutationen vorliegen. Im Unterschied zu pädiatrischen Patienten, bei denen in 20% der Rezidive Mutationen im Gen NT5C2 eine dominante Rolle einnehmen, spielen diese in der Rezidiventstehung von erwachsenen Patienten keine oder eine sehr untergeordnete Rolle.

Diese Erkenntnisse werfen die Frage auf, ob es weitere objektivierbare genetische Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen gibt. Hierfür wären ggf. weitere Untersuchungen von Interesse. Eine Möglichkeit der Vertiefung wären beispielsweise exom- oder genomweite Analysen der in dieser Arbeit untersuchten Proben mit der Frage, ob sich in den adulten Patienten eine Häufung von Mutationen im Rezidiv finden lässt, die in pädiatrischen Patienten nicht vorkommen. Dies wäre ein weiterer Beleg für die biologischen Unterschiede in den Patientengruppen und ein weiterer Schritt bei der Suche nach spezifischen Rezidivtriggern in der adulten T-ALL.

Eine weitere Möglichkeit zur Validierung der Ergebnisse dieser Arbeit wäre eine Erweiterung des Patientenkollektivs auf erwachsene Patienten mit B-Vorläufer-ALL (bis zu 16% NT5C2-Mutationen im pädiatrischen Rezidiv bei *Meyer et al.*) oder auf

erwachsene Patienten mit einem Spätrezidiv, die lediglich 1% der Patienten dieser Arbeit ausmachten. Untersuchungen an diesen Patientengruppen könnten die Frage klären, ob die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse subgruppenspezifisch sind oder sich auch auf andere Populationen übertragen lassen. Damit ließe sich die Rolle von NT5C2-Mutationen im adulten ALL-Rezidiv noch genauer charakterisieren, als es mit den Ergebnissen dieser Arbeit möglich ist.

Referenzen

1. Gökbuget N, Baldus C, Brüggemann M, Hauswirth A, Schanz U. Leitlinie - Akute Lymphatische Leukämie (ALL). 2018.
2. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995;9(10):1783–1786.
3. Eigendorff E, Hochhaus A. Akute Leukämien des Erwachsenen. *Pathologe*. 2015;36(5):503–519.
4. Gökbuget N, Hoelzer D. Treatment of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Semin. Hematol.* 2009;46(1):64–75.
5. Bassan R, Hoelzer D. Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2011.
6. Hoelzer D. Personalized medicine in adult acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2015.
7. Fielding AK, Rowe JM, Buck G, et al. UKALLXII / ECOG2993: addition of imatinib to a standard treatment regimen enhances long-term outcomes in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014;123(6):843–850.
8. Maury S, Chevret S, Thomas X, et al. Rituximab in B-Lineage Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2016.
9. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N. Engl. J. Med.* 2015;373(16):1541–1552.
10. Kunz JB, Rausch T, Bandapalli OR, et al. Pediatric T-cell lymphoblastic leukemia evolves into relapse by clonal selection, acquisition of mutations and promoter hypomethylation. *Haematologica*. 2015;100(11):1442–1450.
11. Dinner S, Lee D, Liedtke M. Current therapy and novel agents for relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Lymphoma*. 2014;55(8):1715–1724.
12. Kaplan JB, Grischenko M, Giles FJ. Blinatumomab for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Invest. New Drugs*. 2015;33(6):1271–1279.
13. Park JH, Rivière I, Gonen M, et al. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2018;378(5):449–

- 459.
14. Buie LW, Epstein SS, Lindley CM. Nelarabine: A novel purine antimetabolite antineoplastic agent. *Clin. Ther.* 2007;29(9):1887–1899.
 15. Curbo S, Karlsson A. Nelarabine: a new purine analog in the treatment of hematologic malignancies. *Rev Recent Clin Trials.* 2006;1(3):185–192.
 16. Gökbüget N, Basara N, Baurmann H, et al. High single-drug activity of nelarabine in relapsed T-lymphoblastic leukemia/lymphoma offers curative option with subsequent stem cell transplantation. *Blood.* 2011;118(13):3504–11.
 17. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood.* 1995;85(6):1416–1434.
 18. Brüggemann M, Raff T, Flohr T, et al. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2006; 107:1116-23.
 19. Campana D. Progress of minimal residual disease studies in childhood acute leukemia. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 2010.
 20. Bassan R, Spinelli O, Oldani E, et al. Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood.* 2009;113(18):4153–4162.
 21. Šálek C, Folber F, Froňková E, et al. Early MRD response as a prognostic factor in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Eur. J. Haematol.* 2016;96(3):276–284.
 22. Zhang M, Fu H, Lai X, et al. Minimal residual disease at first achievement of complete remission predicts outcome in adult patients with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One.* 2016;11(10):e0163599.
 23. Brüggemann M, Kotrova M. Minimal residual disease in adult ALL: technical aspects and implications for correct clinical interpretation. *Blood Adv.* 2017;1(25):2456–2466.
 24. NT5C2 5'-nucleotidase, cytosolic II [Homo sapiens (human)] - Gene.
 25. Transcript: CHD5-001 (ENST00000262450.3) - Exons - Homo sapiens - GRCh37 Archive browser 88.

26. Bianchi V, Sychala J. Mammalian 5'-nucleotidases. *J. Biol. Chem.* 2003;278(47):46195–8.
27. Cividini F, Filoni DN, Pesi R, et al. IMP–GMP specific cytosolic 5'-nucleotidase regulates nucleotide pool and prodrug metabolism. *Biochim Biophys Acta - Gen. Subj.* 2015;1850:1354–1361.
28. Tzoneva G, Perez-Garcia A, Carpenter Z, et al. Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL. *Nat. Med.* 2013;19(3):368–71.
29. Meyer JA, Wang J, Hogan LE, et al. Relapse-specific mutations in NT5C2 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* 2013;45(3):290–4.
30. Oshima K, Khiabani H, da Silva-Almeida AC, et al. Mutational landscape, clonal evolution patterns, and role of RAS mutations in relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016;113(40):11306–11311.
31. Meyer JA, Wang J, Hogan LE, et al. Relapse-specific mutations in NT5C2 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* 2013.
32. Oh HR, Choi YJ, Yoo NJ, Lee SH. Leukemia Relapse-Associated Mutation of NT5C2 Gene is Rare in de Novo Acute Leukemias and Solid Tumors. *Pathol. Oncol. Res.* 2016;22(1):223–224.
33. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1977;74(12):5463–5467.
34. Shendure JA, Porreca GJ, Church GM, et al. Overview of DNA Sequencing Strategies. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2011.
35. Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. *J. Appl. Genet.* 2011;52(4):413–35.
36. Chang F, Li MM. Clinical application of amplicon-based next-generation sequencing in cancer. *Cancer Genet.* 2013;206:413–419.
37. Little S. Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 2001;Chapter 9:Unit 9.8.
38. Twyman RM. Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysis. *Analysis.* 2010;871–875.
39. Mamotte CDS. Genotyping of single nucleotide substitutions. *Clin. Biochem. Rev.* 2006;27(1):63–75.
40. University of California Santa Cruz. UCSC Genome Browser Gateway.

41. Chuang L-Y, Cheng Y-H, Yang C-H. Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol. Lett.* 2013;35(10):1541–1549.
42. Illumina. Preparing Libraries for Sequencing on the MiSeq®. 2013.
43. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14):1754–1760.
44. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, et al. Current Protocols in Bioinformatics. NIH Public Access; 2002.
45. Warden CD, Adamson AW, Neuhausen SL, Wu X. Detailed comparison of two popular variant calling packages for exome and targeted exon studies. *PeerJ.* 2014;2:e600.
46. Oskarsson T, Söderhäll S, Arvidson J, et al. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia in the Nordic countries: Prognostic factors, treatment and outcome. *Haematologica.* 2016;101(1):68–76.
47. Tallen G, Ratei R, Mann G, et al. Long-term outcome in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia after time-point and site-of-relapse stratification and intensified short-course multidrug chemotherapy: Results of trial ALL-REZ BFM 90. *J. Clin. Oncol.* 2010;28(14):2339–2347.
48. Gökbüget N, Stanze D, Beck J, et al. Outcome of relapsed adult lymphoblastic leukemia depends on response to salvage chemotherapy, prognostic factors, and performance of stem cell transplantation. *Blood.* 2012.
49. Fielding AK, Richards SM, Chopra R, et al. Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study. *Blood.* 2007;109(3):944–50.
50. Escherich G, Schrappe M, Creutzig U. S1-Leitlinie 025/014: Akute lymphoblastische- (ALL) Leukämie im Kindesalter (German Guidelines Childhood Acute Lymphatic Leukemia). 2016.
51. Relling M V, Hancock ML, Boyett JM, Pui CH, Evans WE. Prognostic importance of 6-mercaptopurine dose intensity in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1999;93(9):2817–2823.
52. Schmiegelow K, Nielsen SN, Frandsen TL, Nersting J. Mercaptopurine/methotrexate maintenance therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia: Clinical facts and fiction. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2014;36(7):503–517.
53. Bhatia S, Landier W, Hageman L, et al. Systemic exposure to thiopurines and

- risk of relapse in children with acute lymphoblastic leukemia: A Children's Oncology Group study. *JAMA Oncol.* 2015;1(3):287–295.
54. Stanulla M, Schaeffeler E, Flohr T, et al. Thiopurine methyltransferase (TPMT) genotype and early treatment response to mercaptopurine in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Am. Med. Assoc.* 2005;293(12):1485–1489.
 55. Raff T, Kaiser M, Gökbuget N, et al. Uncovering early, lineage-dependent effects of TPMT genotype in adult acute lymphoblastic leukemia by minimal residual disease. *Leukemia.* 2013;27(4):989–992.
 56. Tulstrup M, Grosjean M, Nielsen SN, et al. NT5C2 germline variants alter thiopurine metabolism and are associated with acquired NT5C2 relapse mutations in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia.* 2018.
 57. Hnízda A, Fábry M, Moriyama T, et al. Relapsed acute lymphoblastic leukemia-specific mutations in NT5C2 cluster into hotspots driving intersubunit stimulation. *Leukemia.* 2018;32(6):1393–1403.
 58. Tzoneva G, Dieck CL, Oshima K, et al. Clonal evolution mechanisms in NT5C2 mutant-relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature.* 2018;553(7689):511–514.

Zusammenfassung

Die akute T-lymphoblastische Leukämie (T-ALL) ist eine aggressive hämatologische Neoplasie, die aus der klonalen Proliferation lymphatischer Vorläuferzellen resultiert und 15% der pädiatrischen und 25% der erwachsenen ALL-Fälle ausmacht. Im Vergleich zu pädiatrischen Patienten zeigen Erwachsene eine schlechtere Prognose mit einer Fünfjahresüberlebensrate von nur 27%-54%.

Für die ALL des Kindes zeigten verschiedene Studien einen Zusammenhang von Chemoresistenzen gegenüber Purinanaloga (z.B. 6-Mercaptopurin) und Fokusmutationen in der cytosolischen 5'-Nukleotidase-II, dem NT5C2-Gen. Diese Mutationen waren rezidivspezifisch in 3-16% der B-Vorläufer ALL und 19-22% der T-ALL nachweisbar und traten präferentiell während der Erhaltungstherapie auf, in der 6-Mercaptopurin eine tragende Rolle in der Behandlung einnimmt. Es wurde der Schluss gezogen, dass subklonale NT5C2-Mutationen im Kindesalter während der Therapie mit Purinanaloga selektiert werden und zum Rezidiv führen. Als häufigste Hotspot-Mutationen wurden NT5C2^{R238W} und NT5C2^{R367Q} detektiert.

Bislang lagen keine Daten zur Rolle von NT5C2-Mutationen in der rezidierten T-ALL des Erwachsenen vor. Ziel dieser Arbeit war es festzustellen, in welchem Ausmaß NT5C2-Mutationen zur Rezidiventstehung der adulten T-ALL beitragen.

Es wurde DNA von Erstdiagnose und Rezidiv von 60 erwachsenen Patienten mit rezidivierter/refraktärer T-ALL analysiert, welche als Salvage-Therapie im Rahmen einer Phase II-Studie das Purinanalogon Nelarabine erhielten.

Es wurden alle Exone des NT5C2-Gens mittels ampliconbasierter Next Generation Sequenzierung sequenziert. Die Exone 9, 13 und 15, in denen die pädiatrischen Hotspotmutationen liegen, wurden ergänzend mit Sanger-Sequenzierung auf die Mutationen hin untersucht.

Zusätzlich wurde in einer erweiterten Kohorte von 344 Proben von 251 Erwachsenen mit rezidivierter T-ALL ein Screening auf die häufigsten Hotspot-Mutationen im Exon 9 (R238W) und 13 (R367Q) durch allelspezifische PCR (AS-PCR) durchgeführt.

Zur Assay-Validierung wurden vier positive pädiatrische Kontrollen, die die Hotspot-Mutationen NT5C2^{R238W} und NT5C2^{R367Q} aufwiesen, in polyklonaler DNA seriell verdünnt und ebenfalls mit NGS und AS-PCR untersucht. Die NGS-Nachweisgrenze lag hier bei 5%, die der AS-PCR bei 2%.

Im Gegensatz zu Analysen an pädiatrischen ALLs war die NT5C2-Mutationsfrequenz bei Erwachsenen mit rezidivierter T-ALL in dieser Arbeit gering. Nur 1 von 60

untersuchten Patienten (1,7%) wies im Rezidiv eine NT5C2-Mutation auf. Es handelte sich um die NT5C2^{R367Q}-Mutation mit einer Allelfrequenz von 4,7%. In dem erweiterten Kollektiv von 251 Patienten wurden mittels AS-PCR 4 Mutationen nachgewiesen, entsprechend einer Mutationsfrequenz von 1,2%. Die nachfolgende Sanger-Sequenzierung bestätigte die NT5C2^{R367Q}-Mutation in allen vier Fällen.

Insgesamt deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass NT5C2-Mutationen in der Rezidiventstehung bei erwachsenen T-ALL-Patienten eine untergeordnete Rolle spielen und altersabhängige Unterschiede in Biologie der Erkrankung bestehen. Entweder ist 6-Mercaptopurin im Vergleich zu anderen eingesetzten Chemotherapeutika bei Erwachsenen von untergeordneter Bedeutung oder alternative Mechanismen führen zu einem Rezidiv der Erkrankung, bevor eventuelle NT5C2-Mutationen unter Erhaltungstherapie selektioniert werden können. Im untersuchten Kollektiv traten 73% der Rezidive zu einem frühen Zeitpunkt unter intensiver Polychemotherapie oder nach einer allogenen Stammzelltransplantation auf, wenn 6-Mercaptopurin nur von begrenzter Bedeutung ist.

Weitere vergleichende Untersuchungen zur genomischen Landschaft von Erwachsenen und Kindern mit T-ALL sind wünschenswert, um mögliche Unterschiede in der Rezidiventstehung genauer aufzuklären.

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsnummer	Titel und ggf. Quelle	Seite
1	Ablauf der ALL-Therapie des Erwachsenen Quelle: Gökbüget N et al. Leitlinie - Akute Lymphatische Leukämie (ALL). 2018.	4
2	Aktivierungsschritte von Nelarabine und Ara-G Quelle: Curbo S, Karlsson A. Nelarabine: a new purine analog in the treatment of hematologic malignancies. <i>Rev Recent Clin Trials</i> . 2006;1(3):185–192.	5
3	IMP-Metabolismus mit gekoppelten Enzymen Quelle: Cividini F, Filoni DN, Pesi R, et al. IMP–GMP specific cytosolic 5'-nucleotidase regulates nucleotide pool and prodrug metabolism. <i>BBA - Gen. Subj</i> . 2015;1850:1354–1361.	7
4	Verteilung und Häufigkeit von Mutationen im NT5C2-Gen bei der rezidierten T-ALL des Kindes Quelle: Tzoneva G, Perez-Garcia A, Carpenter Z, et al. Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL. <i>Nat. Med</i> . 2013;19(3):368–71.	8
5	CnII-Enzymaktivität WT und mit den Mutationen NT5C2 ^{K359Q} , NT5C2 ^{R367Q} und NT5C2 ^{D407A} Quelle: Tzoneva G, Perez-Garcia A, Carpenter Z, et al. Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL. <i>Nat. Med</i> . 2013;19(3):368–71.	8
6	Vorbereitende PCR-Schritte für das NGS beispielhaft am Pimersystem Exon 9	16
7	Beispielhafte Darstellung der Primerauswahl für NGS an Exon 1	17
8	Beispielhafte Darstellung eines Agarosegels zur Amplifikationskontrolle nach der 1. PCR für das NGS	18
9	Übergang der Beads von gelöst zu fest an der Tubewand haftend	20
10	Beispielhafte Darstellung der Standardkurve für die DNA-Quantifizierung via PicoGreen	20
11	Graphische Darstellung von Exon 9 eines exemplarischen Patienten ohne Mutation, sequenziert mit Forward Primer	27
12	Graphische Darstellung von Exon 13 eines exemplarischen Patienten ohne Mutation, sequenziert mit Forward Primer	27
13	Graphische Darstellung von Exon 15 eines exemplarischen Patienten ohne Mutation, sequenziert mit Forward Primer	27
14	Primerdesign mit zwei überlappenden Primerpaaren für ein großes Exon, hier beispielhaft an Exon 16	29
15	Agarosegel des Primertests der finalen NGS Primer nach Exon aufgeteilt	29

16	Lollipop-Plot der mit NGS detektierten NT5C2-Mutationen im Patienten X	31
17	Ausschnitt eines Agarosegels mit Doppelbande als Hinweis auf das Vorliegen einer Mutation	32
18	Graphische Darstellung von Exon 13 eines exemplarischen Patienten mit der Mutation NT5C2 ^{R367Q}	32
19	Graphische Darstellung von Exon 9 einer Positivkontrolle mit der Mutation NT5C2 ^{R238W}	33
20	Graphische Darstellung von Exon 13 einer Positivkontrolle mit der Mutation NT5C2 ^{R367Q}	33
21	Häufigkeit und Anzahl von detektierten Mutationen im Vergleich zu früheren Arbeiten zur pädiatrischen ALL, dargestellt in Lollipop-Plots	36

Tabellenverzeichnis

Tabellennummer	Titel und ggf. Quelle	Seite
1	Typische Symptome der hämatopoetischen Insuffizienz Nach Gökbüget et al. Leitlinie - Akute Lymphatische Leukämie (ALL). 2018.	1
2	Einteilung der ALL in den GMALL-Studien nach Immunphänotyp Nach Gökbüget et al. Leitlinie - Akute Lymphatische Leukämie (ALL). 2018.	2
3	Primer für die Sanger-Sequenzierung der Exone 9, 13 und 15 des NT5C2-Gens	13
4	PCR-Ansatz der PCR vor Sanger-Sequenzierung	13
5	Reaktionsbedingungen der PCR vor der Sanger- Sequenzierung	14
6	Ansatz der Sequenzier-Reaktion für die Sanger- Sequenzierung	14
7	Reaktionsbedingungen der Sequenzier-Reaktion für die Sanger-Sequenzierung	14
8	Linkersequenzen für die exonspezifischen Primer im 2- step Verfahren mit dem Illumina Miseq	17
9	PCR-Ansatz der 1. Vorbereitungs-PCR für das NGS	19
10	Reaktionsbedingungen der beiden Vorbereitungs-PCR für das NGS	19
11	PCR-Ansatz der AS-PCR	22
12	Reaktionsbedingungen der AS-PCR	23
13	Alphabetische Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte	23-24
14	In dieser Arbeit verwendete Chemikalien nach Anwendungsgebiet	24-25
15	Patientencharakteristika des Kollektives I Eigene Darstellung nach Gökbüget N, Basara N, Baurmann H, et al. High single-drug activity of nelarabine in relapsed T-lymphoblastic leukemia. <i>Blood</i> . 2011;118(13):3504–11.	26
16	Für das NGS verwendete Forward Primer ohne Linkersequenz	29-30
17	Für das NGS verwendete Reverse Primer ohne Linkersequenz	30
18	Patientencharakteristika des Kollektivs II für die Suche auf die Hotspotmutationen (NT5C2 ^{R238W} und NT5C2 ^{R367Q}) mit AS-PCR	31
19	Zusammenfassung der Ergebnisse der Verdünnungsreihe	34

20	Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit früheren Arbeiten zum Thema NT5C2	35
----	--	----

Danksagungen

Mein Dank gilt allen beteiligten Personen, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Monika Brüggemann, für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung.

Herrn Dr. Henrik Knecht gilt besonderer Dank für die Einführung in die Thematik, für die Hilfe bei der Konzeptionierung der Arbeit und bei der Erstellung der bioinformatischen Auswertung sowie für das unermüdliche Beantworten aller Fragen.

Herrn Martin Schwarz und Herrn Dietrich Herrmann danke ich für die Lösung aller EDV-Probleme und für die Erstellung der bioinformatischen Auswertung des NGS.

Ich danke dem gesamten Laborteam für die freundliche Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der praktischen Versuche, hierbei besonders Frau Petra Chall und Frau Birgit Fricke für die vielen Tipps und die tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung der NGS-Libraries.

Von ganzem Herzen danke ich Elisabeth und meiner Familie, die mir während der Erstellung der Dissertation jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Veröffentlichungen zum Dissertationsthema

Wolf S., Knecht H., Schwarz M., Herrmann D., Füllgrabe M., Trautmann H., Hoelzer D., Kneba M., Gökbuget N., Brüggemann M.

NT5C2 mutations are rare in adults with relapsed T-ALL. *Oncol Res Treat* 2017;40(suppl 3):1–82; P207

Posterpräsentation auf der Gemeinsamen Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie 2017, Stuttgart.