

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

**Inzidenz und prognostische Bedeutung
von *IGH-DUX4* Rearrangements
bei der Akuten Lymphoblastischen Leukämie
im Kindes- und Jugendalter**

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

vorgelegt von
Julia Sophie Müller
aus **Hannover**

Kiel **2020**

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Gunnar Cario, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I

2. Berichterstatter/in:

Priv.-Doz. Dr. Martin Neumann, Klinik für Innere Medizin III mit den Schwerpunkten
Kardiologie und Angiologie

Tag der mündlichen Prüfung:

31.03.2021

Zum Druck genehmigt:

Kiel, den 30.11.2020

gez.:

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Charakterisierung der Akuten Lymphoblastischen Leukämie im Kindes- und Jugendalter	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie	1
1.1.3 Klinische Symptome und Diagnostik	2
1.1.4 Klassifikation der ALL	3
1.2 Therapie der ALL	4
1.2.1 Behandlung nach dem AIEOP-BFM ALL 2009-Studienprotokoll	4
1.2.2 Risikorelevante zytogenetische und molekulargenetische Marker und „B-Others“	7
1.3 Vorstellung des Rearrangements <i>IGH-DUX4</i>	8
1.4 Fragestellungen dieser Promotionsarbeit	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Arbeitsmaterialien	11
2.2 Patienten	13
2.3 Aufbereitung der klinischen Proben	13
2.3.1 Isolierung mononukleärer Zellen	13
2.3.2 DNA-Aufbereitung über QIAGEN	14
2.4 Die Polymerase-Kettenreaktion	15
2.4.1 Übersicht	15
2.4.2 Multiplex-Long-Range PCR	16
2.5 Assaydesign	18
2.6 Reaktionsansatz und -protokoll	18
2.7 (Gel-)Elektrophorese	20
2.8 Durchführung	21
2.9 Sanger Sequenzierung	22
2.10 Statistische Analyse	23

3	Ergebnisse	24
3.1	Darstellung der Versuchsergebnisse	26
3.2	Defizite und Versuche der Optimierung der Multiplex-Long-Range PCR	28
3.3	Gegenüberstellung klinischer Merkmale innerhalb der „B-Others“ Kohorte von <i>IGH-DUX4</i> positiven und negativen Patienten.....	30
3.4	Gegenüberstellung klinischer Merkmale der <i>IGH-DUX4</i> positiven Patienten und 3322 Patienten der AIEOP-BFM ALL 2000-Studie.....	30
3.5	Prognostische Bedeutung des Nachweises der <i>IGH-DUX4</i> Fusion.....	33
3.6	Vergleich des Therapieerfolgs in der intermediären Risikogruppe nach MRD.....	34
3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	35
4	Diskussion.....	36
4.1	Auswahl des Patientenkollektivs nach den „B-Others“ Kriterien	37
4.2	Die Multiplex-PCR als Nachweismethode für das Rearrangement <i>IGH-DUX4</i>	37
4.3	Alternative Nachweismethoden des Rearrangements <i>IGH-DUX4</i>	38
4.4	Einordnung der Ergebnisse in die bisher stattgefundenen Untersuchungen	39
4.5	<i>IGH-DUX4</i> als unabhängiger prognostisch relevanter Marker.....	41
4.6	Ausblick für neue Studien	42
5	Zusammenfassung	43
	Literaturverzeichnis	45
	Danksagung	54
	Veröffentlichung.....	54

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb	Abbildung
AIEOP	L'Associazione Italiana Ematologia ed Oncologia Pediatrica
ALL	Akute Lymphoblastische Leukämie
BCR-ABL1	Breakpoint cluster region-ABL protooncogene 1, non receptor tyrosine kinase; Fusionsgen durch t(9;22) Translokation
BCP	B-cell precursor/ Vorläufer-B-Zell
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
bp	Basenpaare
CDKN	Cyclin-dependent kinase inhibitor/ Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor
Chr	Chromosom
CLEC12A	C-Type Lectin Family 12 Member A
CRI	Cumulative relapse incidence/ Kumulative Rezidivinzidenz
dl	Deziliter
DNA	Deoxyribonucleic acid/ Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DUX4	Double homebox 4
E2A-PBX1	E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47-pre-B-cell leukemia homebox 1; Fusionsgen durch t(1;19) Translokation
EFS	Event free survival/ Ereignisfreies Überleben
ERG	ETS transcription factor
ERG _{alt}	Neue ERG-Isoform; Transkription wird durch DUX4-Bindung initiiert
ETS	E26 transformation specific. Die ETS Sequenz wurde erstmal im Genom des Retrovirs E26 in Vögeln identifiziert
ETV6-RUNX1	ETS variant 6 – runt-related transcription factor 1; Fusionsgen durch t(12;21)Translokation; Alte Bezeichnung: <i>TEL-AML1</i>
FAB	French-American-British Cooperative Group
FCM	Flow cytometry/ Durchflusszytometrie
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
g	Gramm
Häufigk.	Häufigkeit
Hb	Hämoglobin
HR	Hochrisiko
Ig	Immunglobulin
IGH	Immunglobulin heavy chain locus auf Chromosom 14
IKZF1	IKAROS family Zinc finger 1
Kb	Kilobasen
KMT2A-AFF1	Myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia - AF4/FMR2 family member 1; Fusionsgen durch t(4;11) Translokation; Alte Bezeichnung: <i>MLL-AF4</i>
l	Liter
L1	Akute Lymphoblastenleukämie mit kleinen Zellen
L2	Akute Lymphoblastenleukämie mit mittelgroßen Zellen
L3	Akute Lymphoblastenleukämie mit großen Zellen
ml	Milliliter
MLL-AF4	Mixed Lineage Leukemia-ALL-1 fused gene on chromosome 4; Fusionsgen durch t(4;11) Translokation; neue Bezeichnung: <i>KMT2A-AFF1</i>

MNC	Mononuclear cells/ Mononukleäre Zellen
MR	Mittleres Risiko
MRD	Minimal residual disease/ Minimale Resterkrankung
MTX	Methotrexat
N	Anzahl
ng	Nanogramm
NIH3T3	Standard Fibroblasten Zelllinie
NOPHO	Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology
PAR1	Protease-activated Receptor 1
Pat	Patient
PAX5	Paired Box Gene 5
PBS	Phosphate buffered saline; Phosphatpuffer
PCDH17	Protocadherine-17-Gen
PCR	Polymerase chain reaction/ Polymerase-Kettenreaktion
PGR	Prednisone good response/ Gutes Ansprechen auf Prednison
Ph	Philadelphia
PPR	Prednisone poor response/ Schlechtes Ansprechen auf Prednison
PPW	Positiv Prädiktiver Wert
PR	Prednisone response/ Ansprechen auf Prednison
RNA	Ribonucleic acid/ Ribonukleinsäure
SER	Slow early responder/ langsamer Früh-Ansprecher
SNP	Single Nucleotide Polymorphism/ Einzelnukleotid-Polymorphismus
SR	Standardrisiko
STAP1	Signal-Transducing-Adaptor-Protein-1-Gen
T-ALL	T-Zell-Leukämie
Tab	Tabelle
TCF3-HLF	Transcription factor 3-hepatic leukemia factor; Fusionsgen durch t(17;19) Translokation
TE	TRIS-EDTA Puffer; Trometamol-Ethylidiamintetraessigsäure-Puffer
TEL-AML1	Translocation E26 transformin specific leukemia - acute myeloid leukemia 1; Fusionsgen durch t(12;22) Translokation; neue Bezeichnung: <i>ETV6-RUNX1</i>
WES	Whole exome sequencing/ Gesamt-Exom Sequenzierung
WGS	Whole genome sequencing/ Gesamtgenom Sequenzierung
WHO	World Health Organisation/ Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

- Abb. 1 AIEOP-BFM ALL 2009-Studie: Flussdiagramm zur Einordnung der Patienten in die Finalen Risikogruppen
- Abb. 2 Schematische Darstellung des *IGH-DUX4* Rearrangements
- Abb. 3 Erstellung des „B-Others“ Patientenkollektivs
- Abb. 4 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion
- Abb. 5 Prinzip der Multiplex-Long-Range PCR zur Amplifikation des *IGH-DUX4* Rearrangements
- Abb. 6 Beispielhaftes Ergebnis einer Kapillar-Elektrophorese mit dem QIAxcel-Gerät von QIAGEN von PCR B
- Abb. 7 Ergebnis der Sequenzierung der positiven Probe 34480, durchgeführt von eurofinsGenomics
- Abb. 8 Schema zur Darstellung der Versuchsergebnisse
- Abb. 9 Beispielhafte Darstellung der Ergebnisse einer Kapillar-Elektrophorese mit dem QIAxcel-Gerät von PCR A
- Abb. 10 Vergleich des Therapieerfolgs von *IGH-DUX4* positiven und negativen Patienten und dem Kollektiv der AIEOP-BFM ALL 2000-Studie
- Abb. 11 Vergleich des Therapieerfolgs von *IGH-DUX4* positiven und negativen Patienten und dem Kollektiv der AIEOP-BFM ALL 2000-Studie in der mittleren Risikogruppe nach MRD

Tabellen

- Tab. 1 Symptome und Laborparameter bei akuten Leukämien
- Tab. 2 Morphologische Klassifikation der ALL nach FAB
- Tab. 3 Verwendete Materialien und Geräte
- Tab. 4 Verwendete Reagenzien
- Tab. 5 Sequenzen der verwendeten Primer
- Tab. 6 Gegenüberstellung von klinischen und biologischen Charakteristika und des Therapieansprechens von 396 untersuchten Patienten und 3322 nicht untersuchten Patienten mit kindlicher B-Zell ALL der AIEOP-BFM ALL 2000-Studie
- Tab. 7 Gegenüberstellung der klinischen Charakteristika und des Therapieansprechens in Abhängigkeit der *IGH-DUX4* Positivität von insgesamt 396 Patienten der „B-Others“ Kohorte
- Tab. 8 Gegenüberstellung der klinischen Merkmale und des Therapieansprechens von 32 *IGH-DUX4* positiven Patienten und 3322 nicht untersuchten Patienten der AIEOP-BFM ALL 2000-Studie

1 EINLEITUNG

1.1 Charakterisierung der Akuten Lymphoblastischen Leukämie im Kindes- und Jugendalter

1.1.1 Definition und Epidemiologie

„Bei der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) handelt es sich um eine Gruppe von malignen Erkrankungen des lymphatischen Systems, die sich im Knochenmark, im peripheren lymphatischen Gewebe und auch in allen anderen Geweben manifestieren können.“ [1] Hierbei vermehren sich ungehemmt genetisch abnorme hämatopoetische Vorläuferzellen und verdrängen auf diese Weise die physiologische Blutbildung und führen zu einer funktionellen Knochenmarkinsuffizienz. [2] Bei der ALL handelt es sich mit einem Anteil von 80% um die häufigste Form der Leukämie im Kindes- und Jugendalter. Laut Angaben des deutschen Kinderkrebsregisters (Mainz) erkranken circa 450 Kinder und Jugendliche unter 15 Jahren jährlich neu an einer ALL. [3] Der Altersgipfel der Erkrankung wird zwischen dem 1. bis 5. Lebensjahr angegeben, jedoch ist die Diagnose ALL in jeder Altersgruppe möglich. Jungen erkranken im Schnitt etwa 1,3- bis 1,5mal häufiger als Mädchen. [1] Unbehandelt verläuft die ALL innerhalb von Wochen bis wenigen Monaten tödlich. [2]

1.1.2 Ätiologie

Die Ätiologie der ALL ist weitgehend ungeklärt. Allerdings können einige Faktoren mit einer erhöhten Inzidenz in Verbindung gebracht werden. Am wahrscheinlichsten ist, dass ein Zusammenspiel von genetischen und Umweltfaktoren der Entstehung der meisten ALL-Fälle zugrunde liegt.

Angeborene genetische Syndrome können mit etwa 5% aller akuten Leukämien (lymphatische und myeloische) in Verbindung gebracht werden. Ein bekanntes Beispiel für eine angeborene Prädisposition ist die Trisomie 21. Bei Kindern mit Down-Syndrom ist die Inzidenz der Leukämie um das 10- bis 20-fache erhöht. Auch das Klinefelter-Syndrom und hereditäre Syndrome, die mit einer exzessiven chromosomalen Brüchigkeit einhergehen, wie die Fanconi-Anämie, das Bloom-Syndrom und Ataxia teleangiectasia, sind mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für ALL assoziiert. [4]

Eine chronische Strahlenexposition sowie eine Exposition gegenüber myelotoxischen Substanzen, wie dem Umweltgift Benzol oder Zytostatika aus der Gruppe der Alkylantien und Topoisomerase-II-Inhibitoren sind mit einem erhöhten Aufkommen von ALL-Fällen verknüpft. [4,5] Demgegenüber werden Stillen des Kindes sowie Erkrankungen an Neurodermitis und Heuschnupfen als protektive Faktoren für die Genese einer ALL diskutiert. [6,7]

1.1.3 Klinische Symptome und Diagnostik

In zwei Drittel der Fälle entwickeln sich die Symptome innerhalb von vier Wochen. Am Anfang stehen unspezifische Anzeichen, welche an einen Virusinfekt erinnern: Blässe, Abgeschlagenheit, Appetitlosigkeit und wechselnde Schmerzzustände, besonders in den Beinen. Im Verlauf führt die zunehmende Knochenmarkinsuffizienz zu Anämie, Blutungen infolge der Thrombozytopenie und Infektneigung durch Leukopenie. Eine mehr oder minder ausgeprägte Hepatosplenomegalie findet sich bei zwei Drittel der Kinder. Werden die Hirnhäute befallen (Meningeosis leukaemica), kommt es zu Kopfschmerzen, Erbrechen und zu oft irreversiblen Lähmungen peripherer Hirnnerven, meist des siebten Hirnnervs (Nervus facialis).

Tab. 1: Symptome und Laborparameter bei akuten Leukämien [1]

Symptome/ Laborwerte	Häufigkeit (% der Patienten)
Fieber	61
Blutungen (Haut- und Schleimhaut)	48
Knochenschmerzen	23
Splenomegalie/ Hepatomegalie	63/ 68
Lymphknotenvergrößerung	50
Leukozytenzahl [/µl Blut]	
> 50.000	17
< 10.000	53
Hämoglobin [g/dl]	
> 11,0	12
< 7,0	43
Thrombozyten [/µl Blut]	
> 100.000	25
< 20.000	28

Für die Diagnose der ALL beweisend ist eine Knochenmarkpunktion, welche bei Kindern meist am hinteren Beckenkamm durchgeführt wird. Hierbei findet sich eine weitgehend erloschene physiologische Hämatopoese bei einer über 80%igen Metaplasie mit Leukämiezellen. Unbedingt notwendig ist auch eine Lumbalpunktion, um eine Beteiligung des ZNS zu untersuchen. [2]

1.1.4 Klassifikation der ALL

ALL-Zellen werden histologisch klassifiziert auf Basis ihrer Erscheinung unter dem Lichtmikroskop. Die FAB-Klassifikation (French-American-British) beschreibt drei Kategorien von Lymphozyten. Kriterien hierfür sind Zellgröße, Zellkern-Plasma Relation, Prominenz der Nukleoli, Stärke von zytoplasmatischer Basophilie und Vakuolen-Anteil. [4]

Tab. 2: Morphologische Klassifikation der ALL nach FAB [2,4]

L1	Kleine, monomorphe Zellen; Häufigster Subtyp
L2	Große, heterogene Zellen; große Blasten, pleomorph, multiple Nukleoli
L3	Burkitt-like Zelltyp; große, homogene Blasten; weites, basophiles Zytoplasma mit Vakuolen

Von der WHO (World Health Organization) wurde festgelegt, dass ein Knochenmarkbefall von $\geq 25\%$ suffizient ist für die Diagnose ALL und es wurden neue Leitlinien eingeführt, wobei man die Unterscheidung von L1 und L2 Morphologie aufgrund von mangelnder klinischer Relevanz verlassen hat. Der L3-Typ bezeichnet eine „reife“ B-Zellneoplasie und Bedarf als sogenannte Leukämie vom Burkitt-Typ einer völlig anderen Behandlung. [2]

Die größte Bedeutung für Diagnosesicherung und Klassifikation hat die Immunphänotypisierung. Solche Analysen beinhalten die Nutzung von spezifischen monoklonalen Antikörpern für das Erkennen von verschiedenen Oberflächen- und intrazellulären Antigenen. [8,9] Mit Hilfe von Durchflusszytometrie oder Immunhistochemie wird eine Unterscheidung zwischen Zelllinien (myeloisch versus lymphoid und B-Zell- versus T-Zelllinie) sowie eine Auskunft über die Zellreife ermöglicht. [4,8] Die Proben der vorliegenden Arbeit stammen von Patienten mit BCP-ALL (B-Vorläuferzell-ALL), der häufigsten Leukämieform im Kindesalter. [10] In bis zu 85% aller Leukämie-Fälle sind chromosomale Aberrationen vorhanden und erbringen wichtige prognostisch relevante Informationen für die Therapieplanung. [11] Diese Neuaneordnungen der Chromosomen, welche sowohl in struktureller als auch in numerischer Ebene vorhanden sein können, werden detektiert mit konventioneller Karyotypisierung, Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und mit molekularbiologischen Verfahren wie der Polymerasekettenreaktion. [12]

Die WHO aktualisiert regelmäßig ihre Nomenklatur zur ALL, in welcher morphologische, immunologische und genetische Eigenschaften zu einer einheitlichen Klassifikation zusammengefasst werden. In der überarbeiteten Version von 2017 werden besonders die bekannten Genrearrangements und Ploidien und die daraus folgende prognostische Relevanz berücksichtigt. [13]

1.2 Therapie der ALL

1.2.1 Behandlung nach dem AIEOP-BFM ALL 2009-Studienprotokoll

Die Grundlage der Therapie bei kindlicher ALL bildet eine risikoadaptierte Polychemotherapie. In Deutschland findet diese Behandlung in Form von multizentrischen Therapieoptimierungsstudien statt, in 90% der Fälle im Rahmen der AIEOP-BFM ALL-Studie unter Leitung von Professor M. Schrappe. [14] Aktuell läuft die Studie AIEOP-BFM ALL 2017. Im Folgenden wird jedoch auf die Vorgängerstudie eingegangen, da das Patientenkollektiv in dieser Arbeit nach dem Konzept des AIEOP-BFM ALL 2009-Protokolls behandelt wurde. Elemente der Chemotherapie sind Induktionstherapie, Konsolidierung, Extrakompartimenttherapie, Reintensivierung und Erhaltungstherapie. [15]

Zunächst wird die Therapie durch eine „zytoreduktive Vorphase“ eingeleitet. Diese besteht aus einer ca. einwöchigen Behandlung mit Prednison und einer einmaligen intrathekalen Gabe von Methotrexat (MTX). Für die Remissionsinduktion der ALL im Kindesalter werden meist vier Substanzen verwendet: Prednison, L-Asparaginase, Daunorubicin und Vincristin. Durch diese hochdosierte Chemotherapie (Protokoll IA) soll eine komplette Remission erreicht werden, also eine Elimination von Blasten ($<5\%$) im Knochenmark. An Tag 33 (=TP1) folgt eine obligate Remissionskontrolle im Knochenmark. [16–18] Die darauffolgende Konsolidierungsphase (Protokoll IB) dient der Aufrechterhaltung der Remission. Hierfür werden 6-Mercaptopurin (MP), Cytarabin und Cyclophosphamid eingesetzt. [15] Es schließt sich die Extrakompartimenttherapie an, um Organmanifestationen, wie vor allem Hoden und ZNS, zu erreichen. Die Therapie-Intensität richtet sich dabei nach der Risikogruppe des einzelnen Patienten. Bei Standard- und intermediärem Risiko erhalten die Patienten über etwa zwei Monate eine gemäßigte Chemotherapie (Protokoll M). Bei hohem Risiko ist diese Therapie intensiver und dauert circa drei Monate. [17] Besonders Hochdosis-Methotrexat hat sich für die Behandlung des ZNS als wirksam erwiesen. [18,19] Nach mehrwöchigem Abstand wird die Induktionstherapie in ähnlicher Form wiederholt (Protokoll II und III). Dies dient der endgültigen Zerstörung aller Leukämiezellen und minimiert das Risiko eines Krankheitsrückfalls. Bei manchen Patienten muss eine prophylaktische Schädelbestrahlung erfolgen, was vom Immunphänotyp der ALL und der Risikogruppe abhängig gemacht wird. Den letzten Abschnitt der Behandlung bildet die Erhaltungstherapie in Form einer mildereren oral verabreichten Chemotherapie (i.d.R. MTX und MP). Diese wird dann meist so lange verabreicht, bis eine Gesamt-Therapiedauer von zwei Jahren erreicht ist. Bei schlechtem Therapieansprechen und ungünstiger Prognose kann eine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt werden. [15]

Dank der stetigen Forschung und Integration neuer Erkenntnisse in die aktuellen Therapieprotokolle kann bei über 80% der ALL-Patienten eine langfristige Heilung erreicht werden. [19,20] Die Intensität der Therapie richtet sich nach den individuellen Risikoprofilen der Patienten. Hierbei werden die Patienten zu Beginn der Therapie in drei verschiedene Risikogruppen eingeteilt: Standard- (SR), Mittleres (MR, IR) und Hohes Risiko (HR). Kriterien für diese Einteilung sind Immunphänotyp, Therapieansprechen sowie zyto- und molekulargenetische Marker. [14] Parameter für das morphologische Therapieansprechen sind die Anzahl an leukämischen Blasten im Blut nach Beginn der Prednison-Vorphase an Tag 8 (=Prednisone Response, PR) und im Knochenmark an Tag 33; [16,21,22] Ebenso die minimale Resterkrankung (Minimal Residual Disease, MRD) im Knochenmark, welche über zwei verschiedene Analysemethoden bestimmt wird: An Tag 15 der Induktionsbehandlung erfolgt die durchflusszytometrische Bestimmung (FCM-MRD). Ergebnisse der FCM-MRD werden für die Einteilung in die HR-Gruppe verwendet. Zum anderen wird die MRD am Ende der Induktion an Tag 33 (=Zeitpunkt TP1) und nach 12 Wochen (=Zeitpunkt TP2) molekulargenetisch bestimmt über die Quantifizierung von leukämiespezifischen T-Zellrezeptor- und Immunglobulin (Ig)- Genrearrangements (PCR-MRD). [23,24]

Nach dem AIEOP-BFM ALL 2009-Protokoll werden Patienten mit BCP-ALL in die Hochrisikogruppe (HR) eingeteilt, wenn sie eines oder mehrere der folgenden Kriterien erfüllen:

- Nachweis von mindestens 1000 Blasten pro μ l Blut nach der zytoreduktiven Vorphase (Prednisone Poor Response, PPR)
- Keine komplette Remission an Tag 33 (TP1) nach der Induktionstherapie
- Positivität für *MLL-AF4* (neue Bezeichnung: *KMT2A-AFF1*) bzw. Translokation t(4;11) oder Hypodiploidie (<45 Chromosomen)
- MRD basierte Kriterien:
 - PCR-MRD-HR ($\geq 10^{-3}$ zu Woche 12)
 - PCR-MRD-MR SER ($\geq 10^{-3}$ am Tag 33 und MRD-positiv bei einem Level $< 10^{-3}$ zu Woche 12)
 - FCM-MRD am Tag 15 im Knochenmark ist $\geq 10\%$

Patienten der Standard-Risikogruppe (SR) sind negativ für die HR-Kriterien und negativ für PCR-MRD an Tag 33 und Woche 12. In die MR-Gruppe werden alle Patienten eingeteilt, die weder SR- noch HR-Kriterien erfüllen (siehe Abbildung 1).

Obwohl in der Therapie der kindlichen ALL große Fortschritte gemacht werden, erleiden nach wie vor 10-20% der Kinder einen Rückfall und bedürfen dann einer intensivierten Folgetherapie. [25,26]

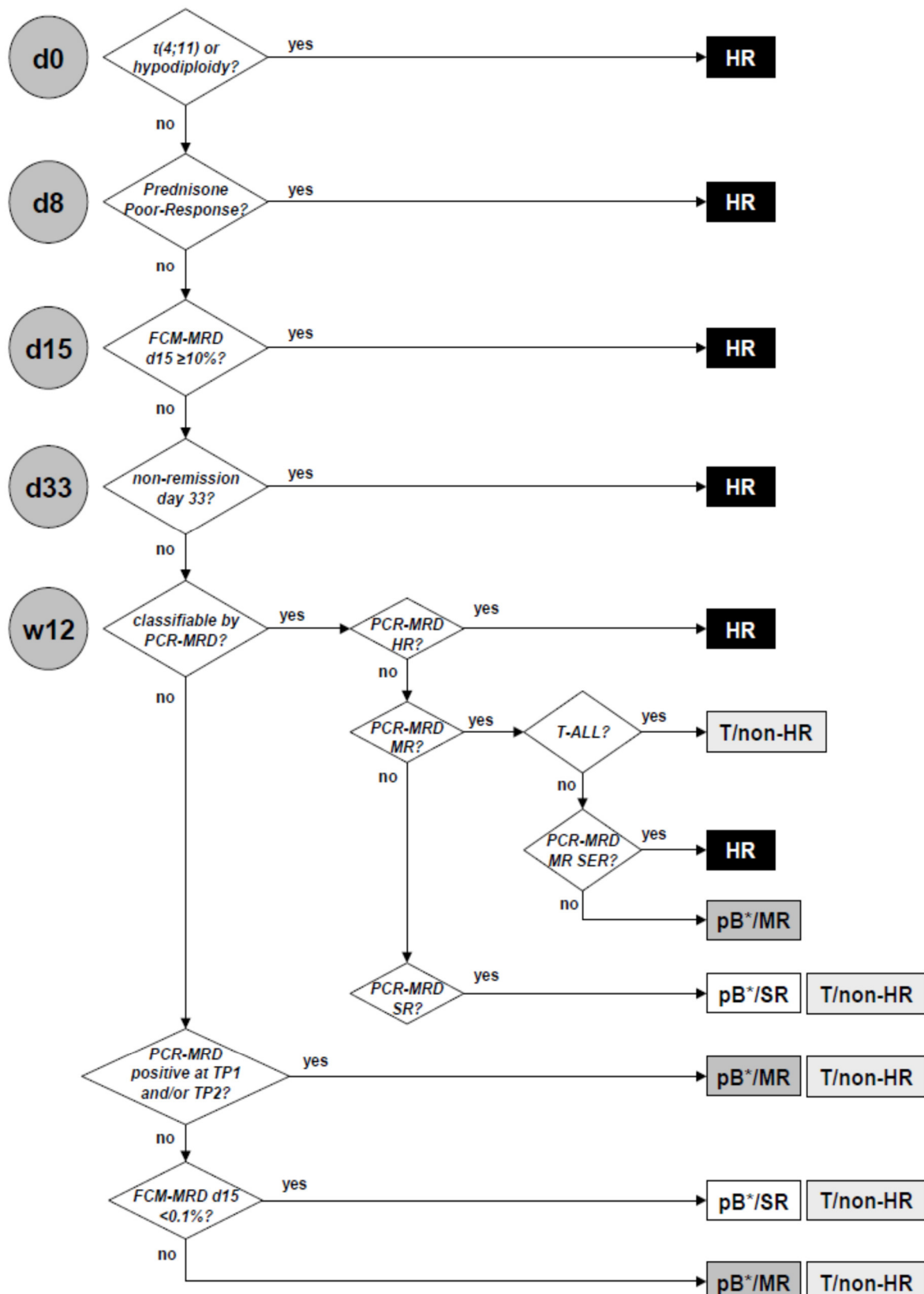


Abb. 1: AIEOP-BFM ALL 2009-Studie: Flussdiagramm zur Einordnung der Patienten in die Finalen Risikogruppen [27]

Erläuterungen:

PCR-MRD: HR: MRD $\geq 10^{-3}$ an TP2; MR: MRD positiv an TP1 u./o. TP2 und MRD-Last $< 10^{-3}$ an TP2; **MR SER** (Slow Early Responders): MRD $\geq 10^{-3}$ an TP1 und MRD $< 10^{-3}$ an TP2 → Behandlung erfolgt nach dem HR-Protokoll; **SR:** keine MRD-Last an TP1 und TP2

*Vorläufer-B-Zell-ALL oder unbekannter Phänotyp

Die höchste Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv haben Patienten der HR-Gruppe. Doch auffällig ist, dass ungefähr 50% der Patienten, die einen erneuten Leukämieschub erleiden, ursprünglich der MR/IR-Gruppe zugeteilt wurden. [28,29]

Die große und zum Teil noch nicht bekannte Heterogenität der ALL ist hier sicherlich die entscheidende Ursache. Es besteht also weiterhin die medizinische Notwendigkeit, neue prognosebestimmende genetische Marker zu identifizieren, um eine bessere personalisierte Therapie zu ermöglichen. [30] Dies ist auch die Basismotivation dieses Promotionsprojektes.

1.2.2 Risikorelevante zytogenetische und molekulargenetische Marker und „B-Others“

Wie dem AIEOP-BFM ALL-Protokoll zu entnehmen ist, sind zytogenetische und molekulargenetische Charakteristika der Leukämiezellen sehr relevant für die Risikostratifizierung.

Die Translokation t(12;21), welche die Fusion *ETV6-RUNX1* bildet, ist ebenso wie Hyperdiploidie assoziiert mit einer günstigen Prognose. Mit einem Anteil von jeweils etwa 25% sind dies die häufigsten Veränderungen bei kindlicher ALL. [31–34] Ebenso zeigen Patienten mit der Fusion *E2A-PBX1*, resultierend aus der Translokation t(1;19), sehr gute Therapie-Langzeitergebnisse, obwohl die Inzidenz von ZNS-Rezidiven in dieser Kohorte erhöht ist. [35] Dem gegenüber steht t(4;11), woraus sich *KMT2A-AFF1* ableitet (Bezeichnung im AIEOP-BFM 2009-Protokoll noch *MLL-AF4*). Diese Aberration geht mit einer schlechten Prognose einher, sodass Patienten mit dieser Veränderung in die HR-Gruppe des AIEOP-BFM ALL-Therapieplans eingeordnet werden. [27,36–39] Da in mehreren Studien die ebenfalls ungünstige Prognose von Hypodiploidie (<45 Chromosomen oder DNA-Index <0,8) gezeigt werden konnte, wurde in die 2009er Studie auch dieses Merkmal als Kriterium für die Einteilung in die HR-Gruppe eingeführt. [40,41] *BCR-ABL1* positive Patienten, welche einen Anteil von etwa 3-5% kindlicher BCP-Leukämien ausmachen, werden seit 2004 nicht mehr nach dem AIEOP-BFM ALL-Protokoll behandelt. [42,43] Sie werden stattdessen in die EsPh-ALL Studie eingeschlossen. [27,44] Durch die Einführung der Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren erreichen bis zu 70% dieser Patienten ein EFS von 5 Jahren, obwohl die Prognose dieser Patienten ursprünglich als sehr schlecht einzuschätzen war. [45]

In ungefähr 30-40% der Fälle lassen sich keine dieser bekannten prognosebestimmenden Marker nachweisen und die zugrunde liegenden Driver-Mutationen sind dann teilweise nicht bekannt. Diese Gruppe wird nachfolgend als „B-Others“ bezeichnet. Die Suche nach den pathogenetischen Veränderungen in dieser Kohorte könnte zum Verständnis der Genese der Leukämie beitragen und neue Ansatzpunkte für eine bessere personalisierte Therapie liefern. Vor Kurzem konnte eine neue Subgruppe von kindlichen BCP-ALL Fällen unter den „B-Others“ identifiziert werden: die ALL mit dem Nachweis des *IGH-DUX4* Rearrangements. [46]

1.3 Vorstellung des Rearrangements *IGH-DUX4*

Mit Hilfe der Nutzung von genomweiter RNA-Sequenzierung und Genexpressionsprofilerstellung konnten *DUX4* Fusionen als eine neue Gruppe von BCP-Leukämien bei Kindern ausgemacht werden. [46]

In den allermeisten Fällen entstehen diese Fusionen durch die Insertion von Wildtyp (WT)-*DUX4* in die Enhancer-Region von *IGH* (Immunglobulin heavy chain region) auf Chromosom 14. [47] *DUX4* befindet sich innerhalb des D4Z4 Locus im Bereich der subtelomerischen Region des langen Arms von Chromosom 4. Ähnliche D4Z4 Repeats liegen auch auf Chromosom 10q. [48] *DUX4* codiert ein Protein mit einer double homebox Domäne (double homebox protein 4). [46] Das Gen wird physiologischer Weise nur in Keimzellen exprimiert und ist in somatischem Gewebe durch epigenetische Prozesse unterdrückt. [49,50] Der Verlust dieser Repression führt zur Entstehung der faszioscapulohumeralen Muskeldystrophie. [51–53]

IGH-DUX4 Translokationen stellen ein frühes Event in der Leukämogenese dieses B-Zell ALL Subtyps dar. [54] In Abbildung 2 ist die Translokation von *DUX4* in den *IGH*-Bereich schematisch dargestellt, wie sie bei Patienten in der Yasuda et al. Studie von 2015 identifiziert wurde. Bei Patient JALSG-001 befand sich *DUX4* zwischen den Regionen von *IGHM* Enhancer und *IGHJ4*. Bei den leukämischen Blasten des zweiten Patienten (JALSG-002) enthielt das Genom zwei Kopien von D4Z4 zusammen mit einem Fragment von mitochondrialer DNA (Chr. M). [48] In den meisten Fällen wird bei der Translokation das 3'Ende von WT-*DUX4* durch ein Fragment von *IGH* oder einem anderen Gen ersetzt, wodurch ein out-of-frame Protein entsteht. [47]

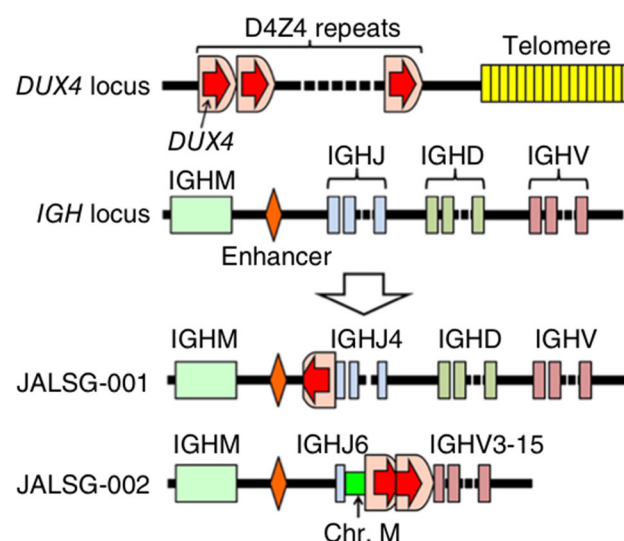


Abb. 2: Schematische Darstellung des *IGH-DUX4* Rearrangements [48]

Obwohl das WT-*DUX4* Protein proapoptotisch wirkt, konnte gezeigt werden, dass eine *IGH-DUX4* Fusion die zelluläre Transformation von NIH3T3 Fibroblasten fördert. In der Yasuda et al. Studie wurde das Leukämie auslösende Potenzial des *IGH-DUX4* Rearrangements untersucht: Das Einschleusen von *IGH-DUX4* in unreife B-Zellen von Mäusen führte zu einer defekten Differenzierung der B-Zellen und leukämischer Umwandlung. [48] Doch nach wie vor ist unklar, auf welche Weise *DUX4* Fusionen zu leukämischen Entwicklungen beitragen. [55] Dong et al. beobachteten, dass die Translokation von *DUX4* in den *IGH*-Lokus zur Überexpression bestimmter Zielgene von *DUX4*, wie zum Beispiel *STAP1*, *ERG_{alt}* oder *PCDH17*, führt. [56] Zhang et al. und Liu et al. konnten in ihren Studien zeigen, dass *DUX4* Fusionen überzufällig häufig zusammen mit Deletionen von *ERG* (*ETS* transcription factor gene) auftreten, sodass geschlussfolgert wurde, dass *IGH-DUX4* Fusionen das vorausgehende Event für *ERG*-Deletionen sein könnten. Aber auch die Rolle von *ERG* in der Entstehung der ALL ist noch unbekannt. Ebenfalls auffällig war das gemeinsame Auftreten von *IGH-DUX4/ERG*-ALL zusammen mit *IKZF1*-Deletionen. Veränderungen von *IKZF1* sind assoziiert mit einer schlechten Prognose bei kindlicher ALL. Doch beim zeitgleichen Vorhandensein einer *ERG*-Deletion konnte eine Assoziation mit der HR-Gruppe nicht mehr gefunden werden. [57–59]

In der Lilljebjörn et al. 2016 Studie wurde *IGH-DUX4* erstmals hinsichtlich klinischer Kriterien und Prognose-Relevanz an 195 BCP-ALL Patienten untersucht, welche nach den Protokollen der Nordic Society of Pediatric Haematology and Oncology (NOPHO) von 1992, 2000 und 2008 behandelt wurden.

1.4 Fragestellungen dieser Promotionsarbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, an die Lilljebjörn et al. 2016 Studie anzuknüpfen. Dabei sollen Inzidenz und prognostische Relevanz des *IGH-DUX4* Rearrangements an einem größeren Patientenkollektiv der AIEOP-BFM ALL 2009-Studie mit Hilfe der Nutzung einer neu entwickelten Methode untersucht werden.

Hierbei sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Ist die Methode valide und anwendbar in der klinischen Praxis?
2. Gibt es Unterschiede zwischen *IGH-DUX4* positiven und negativen Patienten hinsichtlich klinischer Merkmale?
3. Lässt sich ein Zusammenhang finden zwischen Positivität für das Rearrangement und Therapieansprechen?
4. Hat das Vorhandensein von *IGH-DUX4* Fusionen Auswirkungen auf die Prognose der Patienten?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Arbeitsmaterialien

Tab. 3: Verwendete Materialien und Geräte

Bezeichnung	Name (Hersteller)
50, 15 ml Röhrchen	(Eppendorf)
Glaspipette	(Sarstedt)
Pipetten	(Eppendorf)
Pipettenspitzen	Biosphere Filter Tips (Sarstedt)
Zentrifuge	Centrifuge 5415 D (Eppendorf)
Mikroreaktionsgefäße 1000 µl, 500 µl	(Sarstedt)
Neubauer-Zählkammer	(Marienfeld)
Spectrophotometer	Nano-Drop ND 1000 (Thermo Fischer Scientific)
Vortexer	Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)
8er-Streifen	(Sarstedt)
12er-Streifen	QX 0,2 ml 12-Tube Strings (QIAGEN)
Mikrozentrifuge	Galaxy Mini (VWR)
96-well-PCR-Platte	(Sarstedt)
Thermo-Cycler	Mastercycler (Eppendorf) Primus 96 plus (MWG-BIOTECH)
QIAXCEL DNA High Resolution Kit	(QIAGEN)
QIAXcel Advanced Instrument	(QIAGEN)
Elektrophorese Kammer	Whalman (Biometra)
Elektrophorese: Strom-Versorgung	Electrophoresis Power Supply- EPS 601 (amersham pharmacia biotech)
GenUP™ PCR/Gel Cleanup Kit	(biotechrabbit)
Thermomixer	Thermomixer comfort (Eppendorf)
Barcodes für Sequenzierung	LIGHTRUN (eurofinsGenomics)
Kühlschrank	(Liebherr)
Gefrierschrank (-20°C)	(Liebherr)

Tab. 4: Verwendete Reagenzien

Bezeichnung	Name (Hersteller)
PBS (Phosphate Buffer Saline)	(Merck)
Ficoll-Lösung	Biocoll Separating Solution (Biochrom AG)
Türks-Lösung	(Merck)
QIAamp DNA Blood Midi Kit	(QIAGEN)
TE-Puffer	(Sigma Aldrich)
Primer: IGH 327_F IGH Jgenomic_F DUX4 fw_R DUX4 rev_R	(invitrogen by Thermo Fisher Scientific)
QIAGEN Long Range PCR Kit	(QIAGEN)
Q5 High-Fidelity DNA polymerase Kit	(New England BioLabs® Inc.)
dNTPs	(Fermentas)
QIAXCEL DNA High Resolution Kit	(QIAGEN)
PCR-Produktgrößen-Marker	QX Size Marker 250bp-8kb (QIAGEN)
PCR-Größenabgleich-Marker	QX Alignment Marker 15bp/ 10 kb (QIAGEN)
Färbemittel für Elektrophorese	Gel Loading Dye Purple (New England BioLabs® Inc.)
GenUP™ PCR/Gel Cleanup Kit	(biotechrabbit)

2.2 Patienten

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden an kryokonservierten Blut- und Knochenmarkproben durchgeführt. Das Material stammte von an ALL erkrankten Kindern im Alter von 1-18 Jahren, welche nach dem Protokoll der AIEOP-BFM ALL 2009-Studie behandelt wurden (siehe Kapitel 1.2.1). Im Zeitraum von Juni 2010 bis Dezember 2014 erhielten die Patienten die Erstdiagnose. Die Proben wurden mit Zustimmung der Patienten bzw. deren gesetzlichen Vertretern entnommen und die Begleitforschung durch die zuständige Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität Kiel bewilligt. Alle Patienten wurden auf die prognoserelevanten zytogenetischen Marker *ETV6-RUNX1* und *KMT2A-AFF1* getestet und der DNA-Index wurde bestimmt. Die Risikostratifizierung erfolgte nach dem Flussdiagramm, wie es in Kapitel 1.2.1 dargestellt ist.

Um *IGH-DUX4* als einen möglichen unabhängigen prognostisch relevanten Marker zu untersuchen, wurde das Kollektiv für dieses Projekt aus Patienten zusammengestellt, welche negativ für die folgenden biologischen Marker getestet wurden (= „B-Others“):

- *ETV6-RUNX1*
- *KMT2A-AFF1*
- *E2A-PBX1*
- Hyper- und Hypodiploidie

Auch eine Positivität für *BCR-ABL1* stellt ein Ausschlusskriterium für die Zuordnung zum „B-Others“ Kollektiv dar. Jedoch werden *BCR-ABL1* positive Patienten nicht nach dem Protokoll der AIEOP-BFM ALL 2009-Studie behandelt und wurden damit sowieso aus dem untersuchten Kollektiv ausgeschlossen. Die Zusammenstellung des Kollektivs ist im Flussdiagramm in Abbildung 3 dargestellt.

2.3 Aufbereitung der klinischen Proben

2.3.1 Isolierung mononukleärer Zellen

Mit Hilfe der Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation können mononukleäre Zellen (MNC) aus dem antikoagulierten Vollblut von den restlichen Blutbestandteilen fraktioniert werden. Das Blut bzw. das Knochenmark wurde hierfür mit PBS-Puffer (Phosphate buffered saline) ausgewaschen, verdünnt und nachfolgend auf ein Röhrchen mit Ficoll-Lösung pipettiert, wobei sich die beiden Phasen nicht vermischen durften.

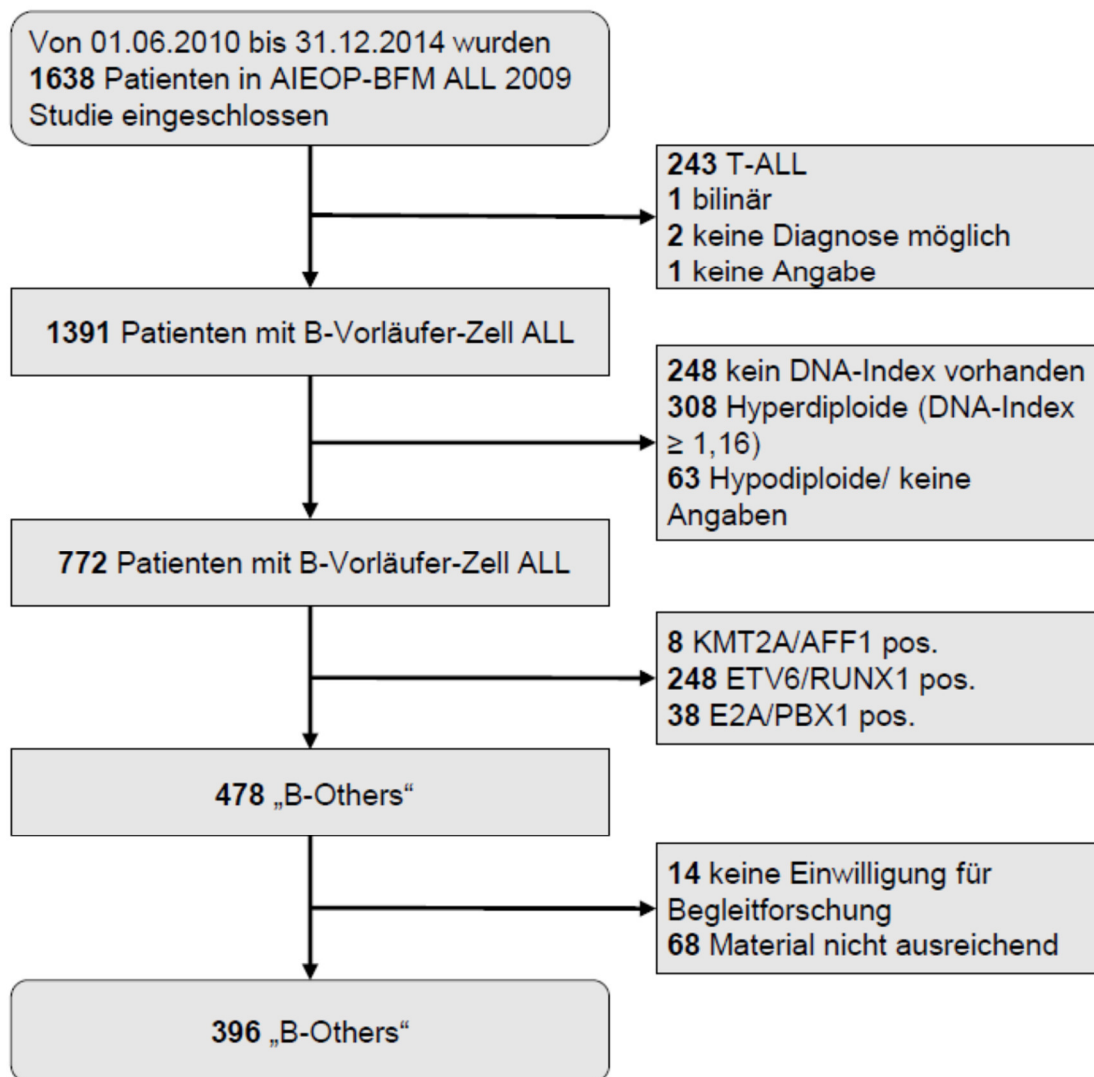


Abb. 3: Erstellung des „B-Others“ Patientenkollektivs

Das synthetische Polysaccharid Ficoll besitzt eine geringere Dichte als die von Erythrozyten und Granulozyten, aber eine größere als die von Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten. Nach einer Zentrifugation reichern sich also die mononukleären Zellen in der Interphase zwischen Plasma und Ficoll an, während Erythrozyten und Granulozyten am Boden des Röhrchens ein Sediment bilden. [60] Die MNC-Schicht wurde vorsichtig abpipettiert, zentrifugiert, mit PBS ausgewaschen und nochmals herunterzentrifugiert.

2.3.2 DNA-Aufbereitung über QIAGEN

Zur Herstellung und Aufreinigung eines DNA-Lysates wurde das Protokoll des QIAGEN QIAamp DNA blood midi kits befolgt. Hierbei wurde das entstandene Pellet mit PBS und Al-buffer, einem Lyse Puffer, und Proteinase K versetzt. Nach einigen Waschschritten und durch

Elution mit TE-Puffer (wässrige Lösung aus Trometamol und Ethylendiamintetraessigsäure) konnte hierdurch hochkonzentrierte DNA gewonnen werden. Die genaue Konzentration an Nukleinsäuren wurde durch ein Spectrophotometer (NanoDrop) ermittelt. Für die PCR wurde die DNA mit TE-Puffer auf 20 ng/µl verdünnt.

2.4 Die Polymerase-Kettenreaktion

2.4.1 Übersicht

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt und wurde seitdem stetig modifiziert. Die grundlegenden Komponenten für die *in vitro* Amplifikation von DNA bzw. spezifischen Abschnitten sind hierbei:

- das Template (Ausgangs-DNA),
- spezifische Oligonucleotidmoleküle, die sich am 3'- und 5'-Ende des zu vervielfältigenden Bereichs anlagern (Primer),
- eine thermostabile DNA-Polymerase mit ihrem Kofaktor Magnesium,
- die Desoxyribonukleotid-Monophosphate (dNTPs), die den vier Basen Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin entsprechen
- sowie ein Puffer als Medium für die Reaktion.

Die PCR wird in drei Schritte unterteilt. Der erste Schritt ist durch die Denaturierung des DNA-Doppelstranges gekennzeichnet, wobei die Wasserstoffbrückenbindungen gesprengt werden. Dieser Prozess sollte bei 95°C ablaufen und dauert nur wenige Sekunden. Es folgt die Primer-Anlagerung (Annealing) nach einer Abkühlung auf 50-60°C, wobei die optimale Annealing-Temperatur zuvor bestimmt werden muss. Ist die Temperatur zu hoch, findet keine Anlagerung statt und somit entsteht kein PCR-Produkt. Ist die Temperatur zu niedrig, entstehen Fehlpaarungen und damit unspezifische Produkte. Der angelagerte Forward-Primer fungiert als Startpunkt für die DNA-Polymerase. Diese arbeitet bei etwa 68-75°C und verlängert den DNA-Strang um etwa 1000 Basenpaare (bp) pro 60 Sekunden. Die Elongation wird abgebrochen, wenn der rückwärtsgerichtete Primer (Reverse-Primer) erreicht ist. Der neu synthetisierte DNA-Strang dient nun ebenfalls als Matrize im nächsten Zyklus. Im Idealfall steigt also die Anzahl an Kopien des spezifischen DNA-Abschnittes exponentiell. [61,62]

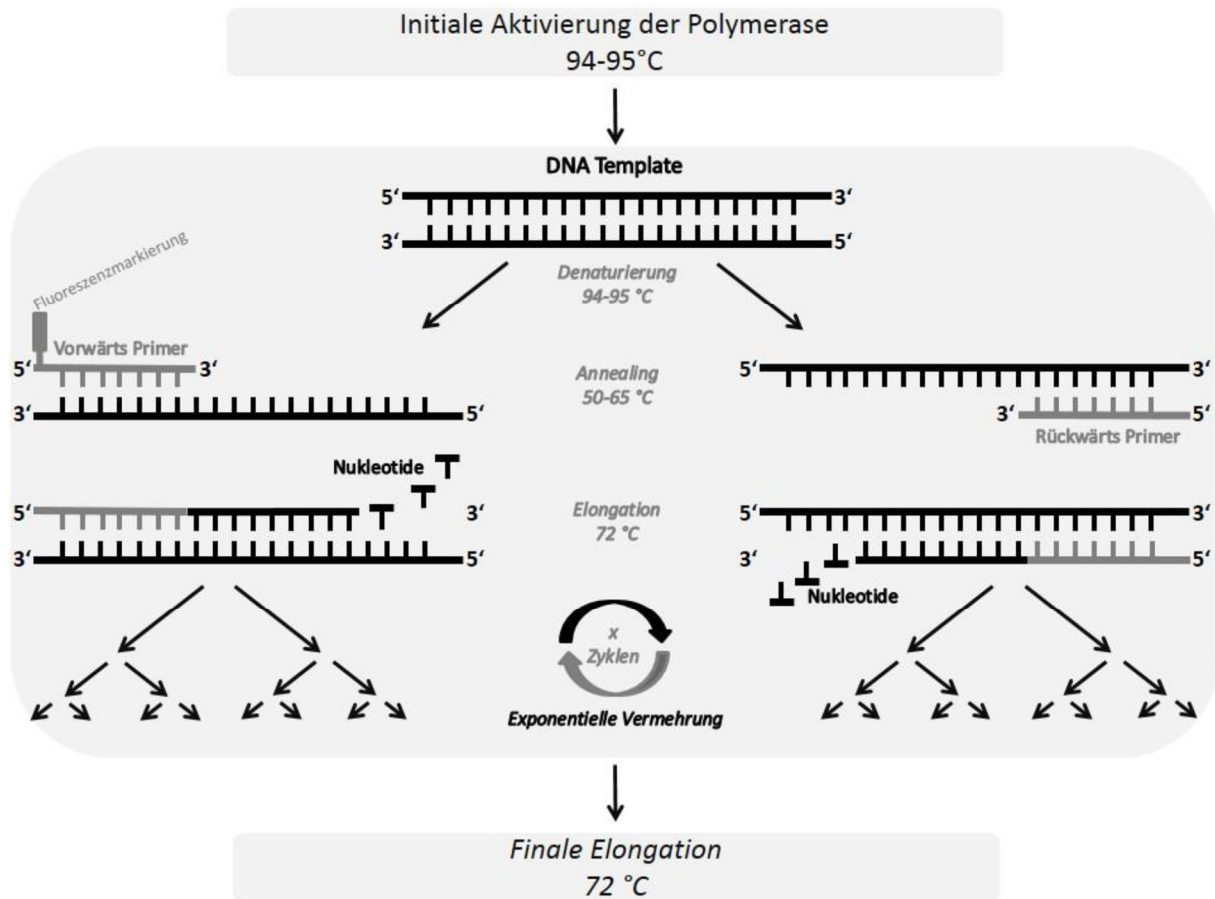


Abb. 4: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion [63]

2.4.2 Multiplex-Long-Range PCR

Mit speziellen Enzym-Mixen können mit einer PCR, wie sie im vorherigen Kapitel beschrieben ist, auch DNA-Fragmente >40kb amplifiziert werden. Dies wird dann als Long-Range/ Distance PCR bezeichnet. Von diversen Herstellern werden verschiedene Kombinationen von hochprozessiven und Proofreading-DNA-Polymerasen angeboten, wobei für unterschiedliche PCR-Protokolle jeweils andere Polymerase-Mischungen die besten Ergebnisse erzielen können. Essenziell für die Vervielfältigung solch großer DNA-Fragmente ist die genaue Einhaltung des PCR-Protokolls und der Pufferkonzentration. [64]

Lilljebjörn et al. konnten die Bruchpunkte von allen 19 bisher publizierten *IGH-DUX4* positiven Fällen analysieren und eine gemeinsame 10kb große Bruchpunkt-Region mit einer Insertion entweder des 3' oder des 5' Endes von *DUX4* identifizieren. Hiervon ließ sich ein PCR-Assay ableiten, welches theoretisch die Amplifikation aller *IGH-DUX4* fusionierten Fälle ermöglichen sollte. Dieses Assay bestand aus zwei unterschiedlichen Primer-Sets: PCR A und B (siehe Abb. 5). Beide Sets enthielten zwei gemeinsame Primer, die an der *IGH*-Bruchpunkt-Region ansetzten: IGH-327F und IGH-JF (= Forward-Primer).

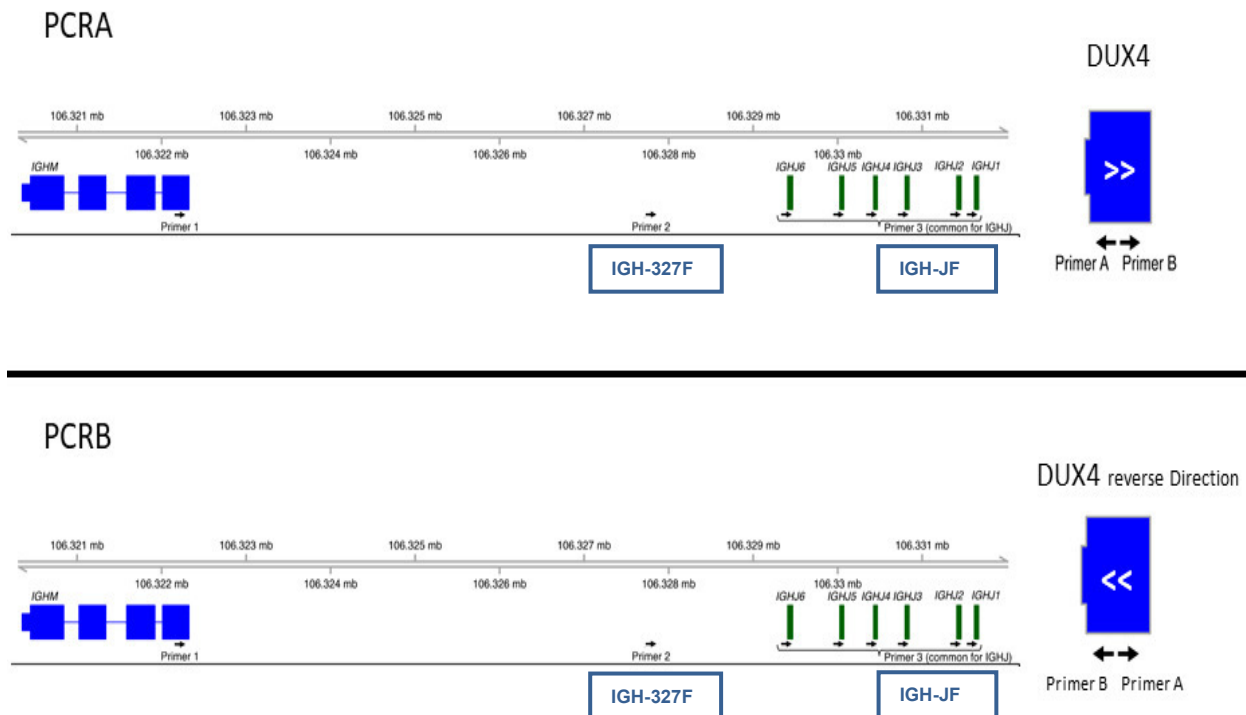


Abb. 5: Prinzip der Multiplex-Long-Range PCR zur Amplifikation des *IGH-DUX4* Rearrangements [65]

PCR A beinhaltet zusätzlich einen Primer, der sich an die 5'-Region von *DUX4* anlagerte (=Vorwärts-Reverse-Primer, DUX4 A fw_R-Primer) und PCR B einen für die 3'-Region von *DUX4* (=Rückwärts-Reverse-Primer, DUX4 B rev_R-Primer). [65] Bei der Etablierung der Methode zeigte sich kein Vorteil bei der Nutzung des Primers IGHM (wie in der Abbildung dargestellt), sodass in den Versuchsreihen auch nur die beiden o.g. Primer (Primer 2 und 3) verwendet wurden. Für PCR A wurde das QIAGEN Long Range PCR Kit verwendet und für PCR B das Q5 High-Fidelity DNA polymerase Set von NEB (New England BioLabs® GmbH). Alle Proben mit einer Bande in einem der beiden Ansätze sollten durch eine demultiplexte PCR validiert werden. Hierfür wurden die PCR-Assays mit jeweils nur einem der beiden Vorwärtsprimer durchgeführt. *IGH-DUX4* Positive mussten dann in mindestens einem der demultiplexten PCR-Assays eine Bande ergeben.

2.5 Assaydesign

Das in Kapitel 1.3 vorgestellte Rearrangement *IGH-DUX4* wurde auf seine Anwesenheit in der DNA leukämischer Blasten aus Blut-/ Knochenmarkproben von 396 Patienten untersucht. Die Primer wurden von Lilljebjörn et al. der Lund Universität Schweden entworfen und wurden für die Versuchsreihen synthetisiert und bezogen von der Firma invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Carlsbad in Kalifornien. Bei der Etablierung der Methode wurden die Reaktionsbedingungen der zwei verschiedenen PCR-Assays durch die Ermittlung der idealen Annealing-Temperatur, Zyklusanzahl sowie Konzentration der Primer und DNA optimiert. Für die PCR-Ansätze wurden die Primer Stich-Lösungen jeweils frisch auf 25 µM mit Wasser verdünnt.

Tab. 5: Sequenzen der verwendeten Primer

Name	Primer	Sequenz (5' nach 3')
IGH 327_F	Forward	CCA CAG TCC TGT CTT CAG CA
IGH Jgenomic_F	Forward	CTG AGG AGA CGG TGA CC
DUX4 A fw_R	Reverse	CTG GCG TGA CCT CTC ATT CT
DUX4 B rev_R	Reverse	CAG AGG GGG TCT CCC AAC

2.6 Reaktionsansatz und -protokoll

Die zwei PCR-Assays wurden jeweils in 8er Streifen mit einem Reaktionsvolumen von je 50 µl angesetzt, bestehend aus 45 µl Mastermix und 5 µl DNA (20 ng/µl).

45 µl Mastermix von PCR A (Multiplex) enthielten:

- 34,7 µl Wasser
- 5 µl 10x Long Range Buffer (QIAGEN Long Range PCR Kit)
- 2,5 µl dNTPs (QIAGEN Long Range PCR Kit)
- 0,8 µl IGH 327_F (25 µM)
- 0,8 µl IGH J_F (25 µM)
- 0,8 µl DUX4 fw_R (25 µM)
- 0,4 µl LongRange Enzyme (QIAGEN Long Range PCR Kit)

45 µl Mastermix von PCR A (demultiplext) enthielten:

- 35,3 µl Wasser
- 5 µl 10x Long Range Buffer (QIAGEN Long Range PCR Kit)
- 2,5 µl dNTPs (QIAGEN Long Range PCR Kit)
- 0,8 µl IGH 327_F (25 µM) oder 0,8 µl IGH J_F (25 µM)
- 0,8 µl DUX4 fw_R (25 µM)
- 0,4 µl LongRange Enzyme (QIAGEN Long Range PCR Kit)

45 µl Mastermix von PCR B (Multiplex) enthielten:

- 20,5 µl Wasser
- 10 µl 5x Q5 Reaction Buffer (Q5 High-Fidelity DNA polymerase Kit, NEB)
- 10 µl 5x Q5 High GC Enhancer (Q5 High-Fidelity DNA polymerase Kit, NEB)
- 1 µl dNTPs
- 1 µl IGH 327_F (25 µM)
- 1 µl IGH J_F (25 µM)
- 1 µl DUX4 rev_R (25 µM)
- 0,5 µl Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase (Q5 High-Fidelity DNA polymerase Kit, NEB)

45 µl Mastermix von PCR B (demultiplext) enthielten:

- 21,5 µl Wasser
- 10 µl 5x Q5 Reaction Buffer (Q5 High-Fidelity DNA polymerase Kit, NEB)
- 10 µl 5x Q5 High GC Enhancer (Q5 High-Fidelity DNA polymerase Kit, NEB)
- 1 µl dNTPs
- 1 µl IGH 327_F (25 µM) oder 1 µl IGH J_F (25 µM)
- 1 µl DUX4 rev_R (25 µM)
- 0,5 µl Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase (Q5 High-Fidelity DNA polymerase Kit, NEB)

Sowohl bei PCR A als auch bei PCR B wurden jeweils zwei Positiv-Kontrollen sowie Wasser und eine definitiv negative Patientenprobe als Negativ-Kontrollen verwendet. Für die Durchführung von PCR A wurde der Mastercycler von Eppendorf und für PCR B der Primus 96 plus von MWG-BIOTECH genutzt. Die einzelnen Schritte der PCR sind in Kapitel 2.4.1 aufgeführt. Hier diente der erste Zyklus der Aktivierung der Polymerase und der dritte Zyklus der Festigung der PCR-Produkte.

Die folgenden PCR-Protokolle ergaben die aussagekräftigsten Ergebnisse:

PCR A:

1. 1 Zyklus bei 93°C für 3 Minuten
2. 35 Zyklen bei 93°C für 15 Sekunden, 62°C für 30 Sekunden und 68°C für 3 Minuten und 20 Sekunden
3. 1 Zyklus bei 68°C für 2 Minuten
4. Kühlung auf 10°C bis die PCR-Produkte aus dem Cyclor in den Kühlschrank gestellt oder direkt verwendet wurden

PCR B:

1. 1 Zyklus bei 98°C für 30 Sekunden
2. 35 Zyklen bei 98°C für 10 Sekunden, 64°C für 30 Sekunden, 72°C für 1 Minute und 30 Sekunden
3. 1 Zyklus bei 72°C für 2 Minuten
4. Kühlung auf 10°C bis die PCR-Produkte aus dem Cyclor in den Kühlschrank gestellt oder direkt verwendet wurden

2.7 (Gel-)Elektrophorese

Um das Vorhandensein der amplifizierten PCR-Produkte und damit der *IGH-DUX4* Fusion feststellen zu können, wurde im nächsten Schritt eine Elektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde das QIAxcel Advanced System (siehe Abb. 6) verwendet, welches eine voll automatische Kapillar-Elektrophorese durchführen kann. [66] Hierzu wurde 15 µl PCR-Produkt aus jedem Tube in 12er Streifen (QX 0,2 ml 12-Tube-Strings, QIAGEN) und darauf ein Tropfen Öl (QX Mineral Oil, QIAGEN) pipettiert. In das erste Röhrchen des 12er Streifens wurden 6 µl QX Size Marker 250 bp-8kb (QIAGEN) plus 6 µl QX DNA Dilution Buffer (QIAGEN) und ebenfalls ein Tropfen Öl gegeben. Des Weiteren brauchte man für die Analyse im QIAxcel noch den QX Alignment-Marker 15bp/10kb (QIAGEN) für die Produktgrößen-Kalibrierung des Geräts.

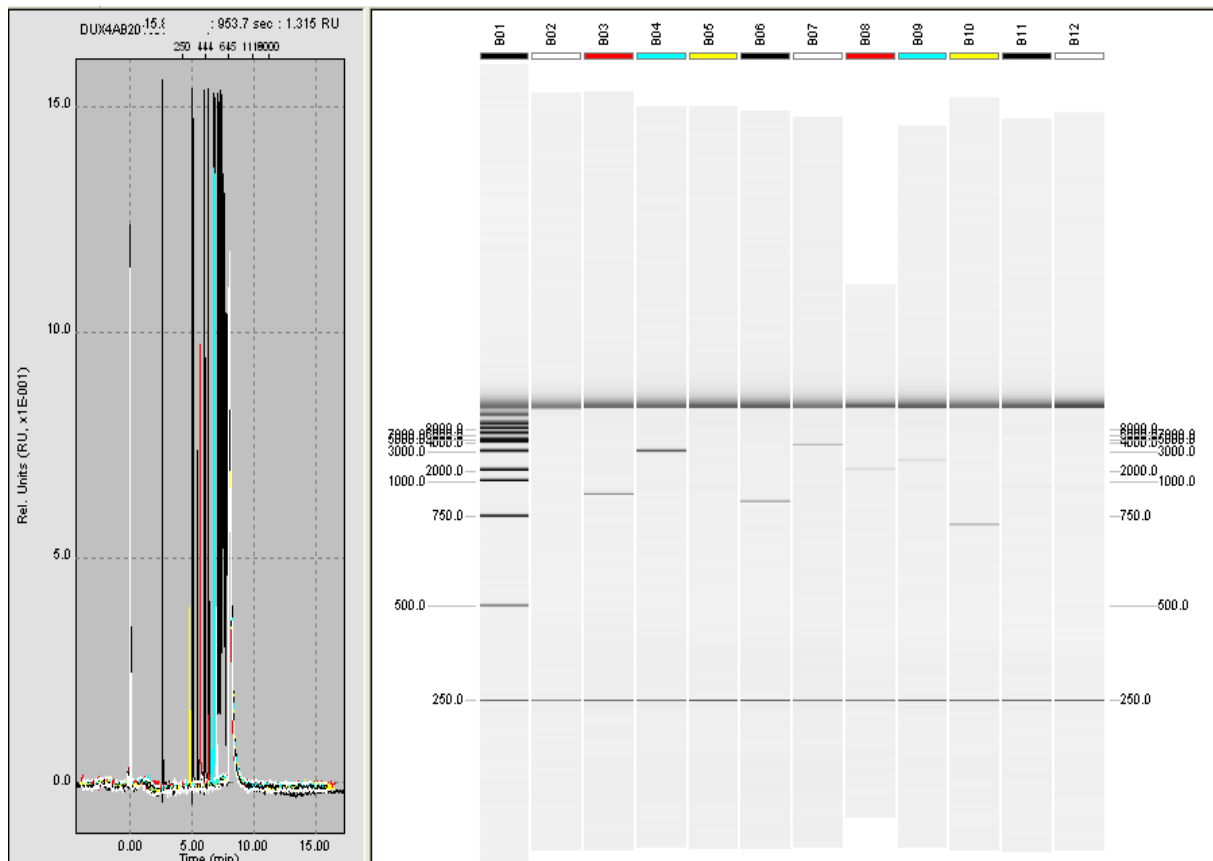


Abb. 6: Beispielhaftes Ergebnis einer Kapillar-Elektrophorese mit dem QIAxcel Gerät von QIAGEN von PCR B

Erläuterungen: B01: DNA-Size Marker; B02: Negativ-Kontrolle H₂O; B03: Positiv-Kontrolle Probe N14; B04: Positiv-Kontrolle Probe WG4; B05: Negativ-Kontrolle Probe F23; B06: Pat. 34063; B07: Pat. 36630; B08: Pat. 37393; B09: Pat. 38350; B10: Pat. 38693; B11: Pat. 30107; B12: Pat. 30195. B06-B10: *IGH-DUX4* positive Proben; B11-B12: *IGH-DUX4* negative Proben

2.8 Durchführung

Pro Lauf wurde in der Regel die DNA von jeweils 19 bis 31 Proben in den beiden PCR-Ansätzen vervielfältigt und anschließend im QIAxcel Gerät auf das Vorhandensein von Banden und damit *IGH-DUX4* untersucht. Die PCR-Produkte von PCR A erwiesen sich als sehr instabil, sodass bei einigen Messungen die Positiv-Kontrollen keine Bande zeigten und diese damit nicht aussagekräftig waren. In diesen Fällen wurde die PCR wiederholt. Nach der Messung aller Proben wurde der Versuch für alle als positiv befundenen Proben erneut durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Banden reproduzierbar waren. Im Anschluss wurden die demultiplexten PCR-Assays für die Validierung angefertigt.

2.9 Sanger Sequenzierung

Da die Methode noch neu war und sich besonders PCR A in der Elektrophorese sehr wechselhaft präsentierte, wurde entschieden, alle für positiv befundenen Proben der Multiplex- und demultiplexten PCR durch Sequenzierung zu bestätigen (siehe Abb. 7). Die Firma GATC biotech als Teil von eurofinsGenomics bietet die Dienstleistung des Next Generation Sequencing an. Hierfür wurden jeweils 25 µl PCR Produkt mit 5 µl Gel Loading Dye, Purple (NEB) angefärbt und auf ein Gel gegeben. Es wurde nun eine konventionelle Gelelektrophorese durchgeführt mit einer Laufzeit von 45 Minuten in der Elektrophorese-Kammer Whatman (Biometra) und mit der Stromversorgung EPS 601 (amersham pharmacia biotech). Die entstandenen Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und nach dem Protokoll des GenUp™ PCR/Gel Cleanup Kits von biotechrabbit aufbereitet.

Von dem entstandenen DNA-Lysat wurden dann 5 µl mit je 5 µl Primer (5 µM) in ein mit einem Barcode versehenes Mikroreaktionsgefäß gegeben und an das Sequencing Department von Eurofins GATC in Köln gesandt.

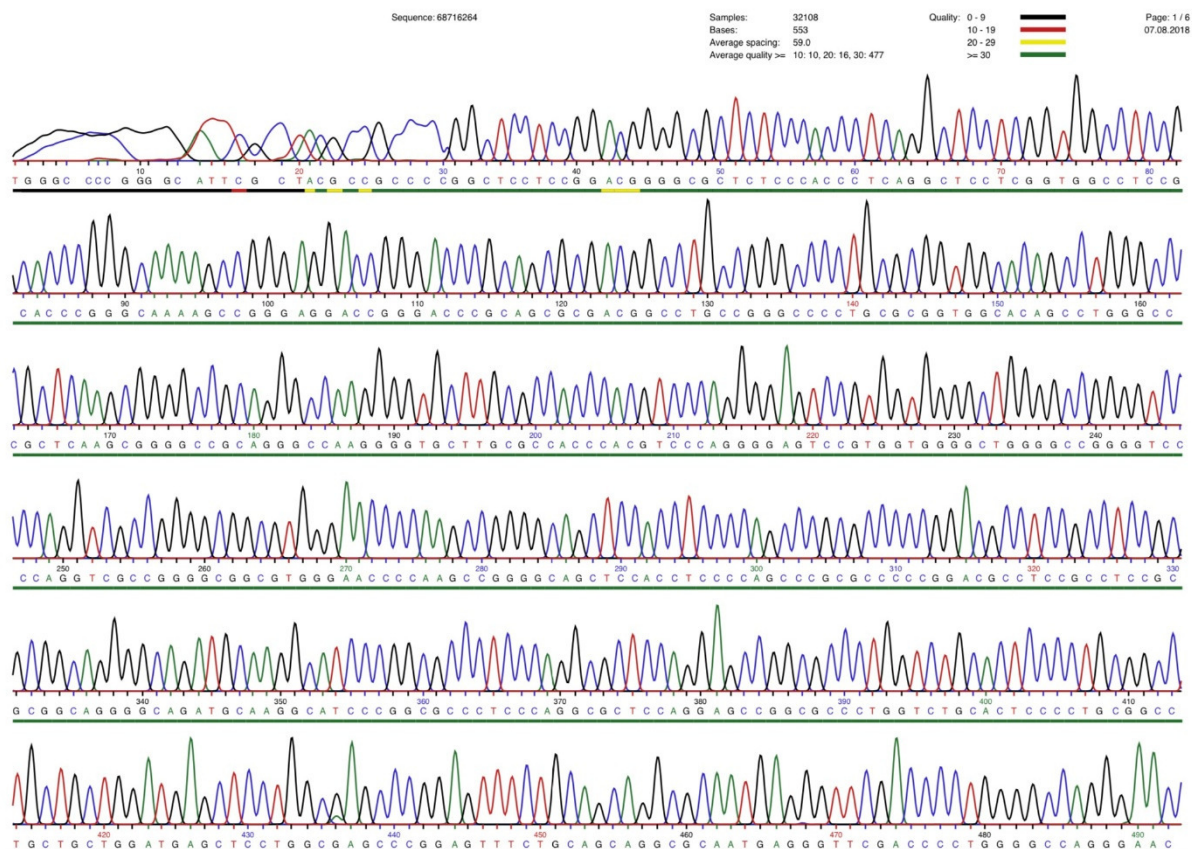


Abb. 7: Ergebnis der Sequenzierung der positiven Probe 34480, durchgeführt von eurofinsGenomics

Das Ergebnis der Sequenzierung einer positiven Probe ist in Abbildung 7 beispielhaft dargestellt. In diesem Fall konnte die folgende Sequenz bestimmt werden:

```
CGCCGCCCGGCTCCTCCGGACGGGGCGCTCTCCCACCCTCAGGCTCCTCGGTGGCC
TCCGCACCCGGGCAAAAGCCGGGAGGACCGGGACCCGCAGCGCGACGGCCTGCCGG
GCCCCTGCGCGGTGGCACAGCCTGGGCCCGCTCAAGCGGGGCCGCAGGGCCAAGGG
GTGCTTGCGCCACCCACGTCCCAGGGGAGTCCGTGGTGGGGCTGGGGCCGGGGTCC
CCAGGTCGCCGGGGCGGCGTGGAACCCCAAGCCGGGGCAGCTCCACCTCCCCAGC
CCGCGCCCCCGGACGCCTCCGCCTCCGCGCGGCAGGGGCAGATGCAAGGCATCCCG
GCGCCCTCCCAGGCGCTCCAGGAGCCGGCGCCCTGGTCTGCACTCCCCTGCGGCCTG
CTGCTGGATGAGCTCCTGGCGAGCCCGGAGTTTCTGCAGCAGGCGCAATGAGGGTTC
GACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCA
```

Diese Basenabfolge konnte in der Datenbank Standard Nucleotide BLAST auf der Seite von NCBI (National Center for Biotechnology Information; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Protein>) eingegeben werden.

Ergab das Blasting einerseits einen Teil der genomischen Sequenz von Chromosom 4 oder 10 (hier gelb markiert) und zum anderen der von Chromosom 14 (grau markiert), so konnte das Vorhandensein des *IGH-DUX4* Rearrangements mit hoher Sicherheit angenommen werden.

2.10 Statistische Analyse

Für die Betrachtung der prognostischen Relevanz des *IGH-DUX4* Rearrangements wurden Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen durchgeführt. Für den Vergleich des Ereignis-freien Überlebens (Event free survival, EFS) und des Gesamt-Überlebens zwischen *IGH-DUX4* Positiven und Negativen wurde der Log-Rank-Test verwendet. Die EFS umfasst den Zeitraum der Diagnosestellung der B-Zell ALL bis zum letzten Nachuntersuchungstermin oder bis zum Ereignis (inkomplette Remission, Rezidiv, Zweitmalignom oder Tod jeglicher Ursache) und das Gesamtüberleben den Zeitraum bis zum Tod jedweder Ursache. Des Weiteren wurde die kumulative Rezidiv-Inzidenz (cumulative relapse incidence, CRI) berechnet. Für den Vergleich dieser zwischen *IGH-DUX4* positiven und negativen Patienten wurde der Gray-Test verwendet. Obwohl die Patienten des untersuchten Kollektivs nach dem Protokoll der AIEOP-BFM ALL 2009-Studie behandelt wurden, mussten als Referenzdaten die Ergebnisse der 2000er Studie verwendet werden. Dies hat den Grund, dass zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit die Auswertung der 2009er Studie noch nicht veröffentlicht war.

3 ERGEBNISSE

Im Zeitraum vom 01.06.2010 bis 31.12.2014 wurden 1638 Patienten in die AIEOP-BFM ALL 2009er Studie eingeschlossen. Hiervon konnten 478 Patienten den „B-Others“ zugeordnet werden. Für 396 der 478 (82,8%) „B-Others“ war initiales Restmaterial vorhanden, sodass diese in die hier vorgestellte Promotionsarbeit eingeschlossen werden konnten. In Tabelle 6 werden die klinischen und biologischen Kriterien der untersuchten „B-Others“ Kohorte mit denen von 3322 nicht untersuchten Patienten, behandelt nach dem Protokoll der AIEOP-BFM 2000-Studie, gegenübergestellt. Da die Auswertung der 2009er Studie zum Zeitpunkt der Untersuchung noch nicht veröffentlicht war, wurde das Gesamtkollektiv der 2000er Studie als Vergleichskohorte herangezogen.

Es fällt auf, dass die „B-Others“ einen höheren Anteil von Patienten im Alter von 10 Jahren und älter aufweisen als das Gesamtkollektiv der 2000er Studie (29,3% vs. 22,1%; $p = 0,001$). Auch sind die „B-Others“-Fälle mit einer initial höheren Leukozytenzahl ($\geq 50000/\mu\text{l}$) verbunden (23% vs. 15,1%; $p < 0,001$). Unterschiede bezüglich des Geschlechts und des ZNS-Status lassen sich nicht beobachten. Hinsichtlich des Therapieansprechens ist festzustellen, dass mehr „B-Others“-Fälle einen PPR zeigen (8,8% vs. 5,7 %; $p = 0,02$) und häufiger der mittleren Risikogruppe nach MRD zugeordnet wurden (58,8% vs. 40,9%; $p < 0,001$).

Tab. 6: Gegenüberstellung von klinischen und biologischen Charakteristika und des Therapieansprechens von 396 untersuchten Patienten und 3322 nicht untersuchten Patienten mit kindlicher B-Zell ALL der AIEOP-BFM ALL 2000-Studie

	Untersuchte „B-Others“		Nicht untersuchte		p-Wert***
	N	%	N	%	
Gesamt	396	100	3322	100	
Geschlecht					0,43785
Männlich	217	54,8	1752	52,7	
Weiblich	179	45,2	1570	47,3	
Alter bei Diagnose					0,00126
< 10 Jahre	280	70,7	2588	77,9	
≥ 10 Jahre	116	29,3	734	22,1	
Leukozytenzahl/μL					< 0,0001
< 10.000	144	36,4	1711	51,5	
10.000 - < 50.000	160	40,4	1109	33,4	
50.000 - < 100.000	49	12,4	284	8,6	
≥ 100.000	43	10,9	218	6,6	
ZNS Status					0,76900
Positiv	9	2,3	83	2,5	
Negativ	369	93,2	3066	92,3	
Kein Ergebnis	18	4,5	173	5,2	
ETV6-RUNX1					< 0,0001
Negativ	396	100	2300	69,2	
Positiv	0	0	826	24,9	
Kein Ergebnis	0	0	196	5,9	
KMT2A-AFF1					0,11442
Negativ	396	100	3017	90,8	
Positiv	0	0	19	0,6	
Kein Ergebnis	0	0	286	8,6	
Prednisone Response*					0,01613
PGR	361	91,2	3116	93,8	
PPR	35	8,8	191	5,7	
Kein Ergebnis	0	0	15	0,5	
Risikogruppe nach MRD**					< 0,0001
Standardrisiko	112	28,3	1249	37,6	
Mittleres Risiko	233	58,8	1359	40,9	
Hohes Risiko	21	5,3	172	5,2	
Kein Ergebnis	30	7,6	542	1,6	

Erläuterungen:

* Prednisone Response: PGR: < 1000 Blast/μl Blut an Therapietag 8; PPR: ≥1000 Blast/μl Blut an Therapietag 8

** Risikogruppe nach MRD: Standardrisiko: keine MRD-Last an Zeitpunkt TP1 (Tag 33 der Induktion) und TP2 (12 Wochen nach Therapiebeginn); Mittleres Risiko: MRD-Last < 10⁻³ an TP2; Hohes Risiko: MRD-Last an TP2 ≥ 10⁻³

*** Vergleich der beiden Gruppen durch den χ^2 -Test

3.1 Darstellung der Versuchsergebnisse

In dieser Untersuchung wurden 396 Patienten, welche die Kriterien der „B-Others“ Patienten erfüllten, mit Hilfe zwei verschiedener PCR-Assays auf das Vorhandensein des *IGH-DUX4* Rearrangements getestet. Die Durchführung erfolgte nach den in Kapitel 2.8 beschriebenen Schritten. In Abbildung 8 sind die einzelnen Schritte des Versuchs schematisch dargestellt. Unter allen Proben fanden sich 17 Positive in Multiplex-PCR A und 28 Positive in Multiplex-PCR B. Bei PCR A kam es jedoch trotz des mehrmaligen Durchführens der Messungen und Optimierung der PCR-Bedingungen vor, dass die Positiv-Kontrollen keine Banden in der Elektrophorese aufwiesen, während aber untersuchte Proben in der gleichen Messung durchaus Banden zeigten und auch in 16 von 17 Fällen reproduzierbar waren. Aufgrund der unzuverlässigen Detektion der Positiv-Kontrollen muss davon ausgegangen werden, dass in PCR A wahrscheinlich nicht alle *IGH-DUX4* positiven Patienten erfasst wurden.

Mit den 16 Multiplex-A-Positiven und den 28 Multiplex-B-Positiven wurden die entsprechenden Einzel-PCR-Ansätze angefertigt mit jeweils nur einem *IGH*-Primer. Hierbei zeigten jedoch nur 5 der 16 bzw. 22 der 28 Multiplex-PCR-Positiven ebenfalls Banden, sodass entschieden wurde, Sequenzierungen von allen Proben anzufertigen. Alle 5 Positiven der Einzel-PCR A und 19 der 22 Positiven der Einzel-PCR B konnten durch die Sequenzierung als *IGH-DUX4* fusioniert bestätigt werden. Die übrigen elf Proben der Multiplex-PCR A und sechs Proben der Multiplex-PCR B wurden ebenfalls sequenziert. Auf diese Weise konnten noch insgesamt neun Positive gefunden werden. In jeweils zwei Fällen in PCR A und B konnte durch Sequenzierung nur Chromosom 14 (*IGH*-Lokus) nachgewiesen werden. Diese Proben wurden nicht zu den Positiven gezählt, da hier keine Fusion von *IGH* und *DUX4* bewiesen werden konnte. So wurden insgesamt 32 *IGH-DUX4* positive Patienten (ein Patient war positiv in PCR A und B) gefunden, was einem Anteil von etwa 8% an allen „B-Others“ Patienten entspricht.

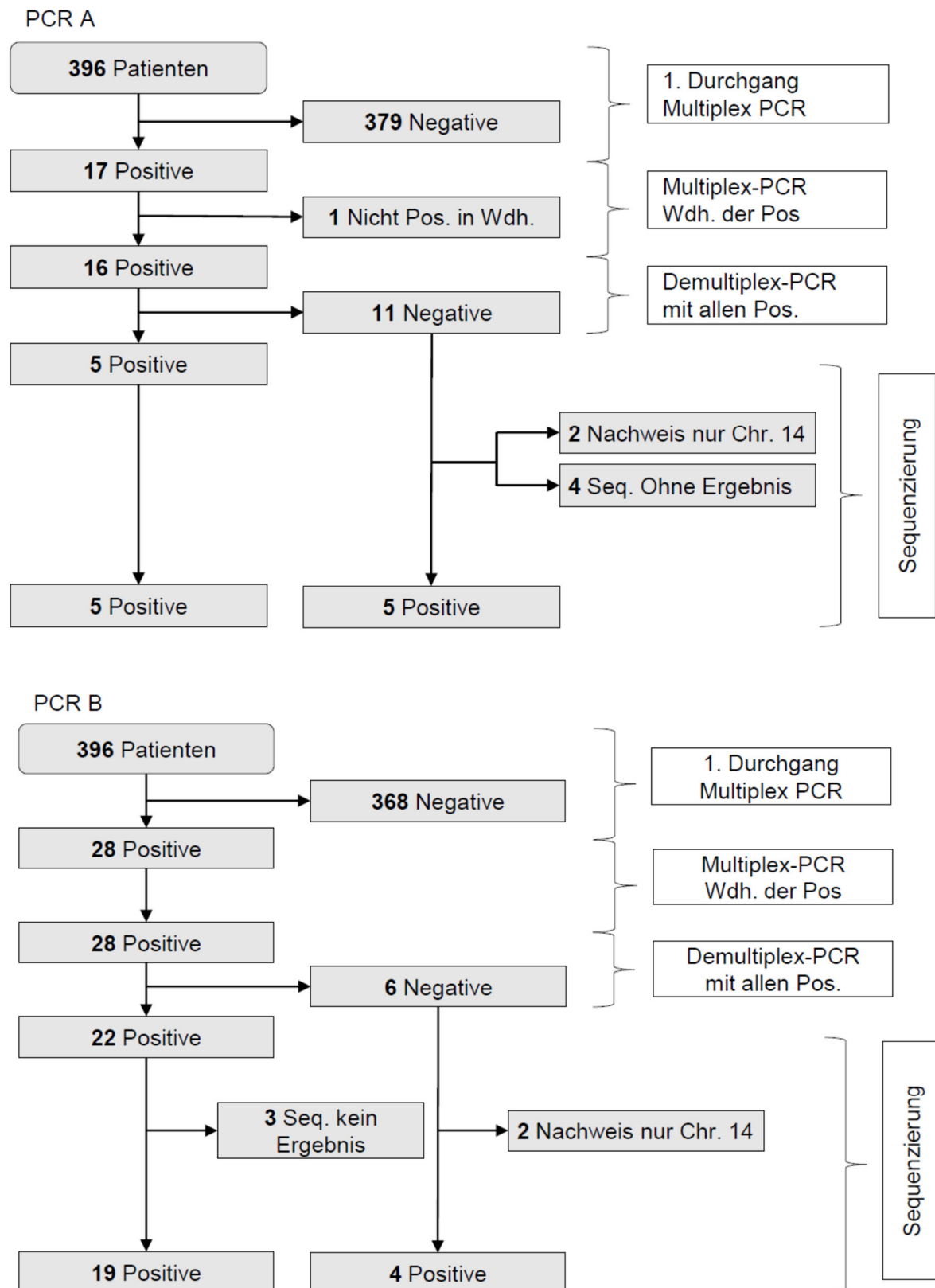


Abb. 8: Schema zur Darstellung der Versuchsergebnisse

3.2 Defizite und Versuche der Optimierung der Multiplex-Long-Range PCR

Die Multiplex-PCR B zeigte konstant deutlich erkennbare Banden in den Positiv-Kontrollen und niemals unspezifische Produkte in den Negativ-Kontrollen (siehe Abb.6). Dadurch konnten positive Proben eindeutig identifiziert werden und waren auch in den Wiederholungsmessungen reproduzierbar. Multiplex-PCR A zeigte hingegen sehr wechselhafte Ergebnisse, was die Anwendung schwierig gestaltete. Oft musste die PCR mehrfach wiederholt werden, da die Positiv-Kontrollen keine Banden in der Elektrophorese zeigten. In Abbildung 9 sieht man beispielsweise, dass die Positiv-Kontrolle SN8 in jener Messung keine Bande ergab, aber die andere Positiv-Kontrolle L5 sowie einige Proben Banden zeigten. In A09 befindet sich die positive Probe 42624, welche in dieser Wiederholungsmessung als negativ erscheint. Im Laufe dieser Arbeit wurden deshalb die folgenden Optimierungs-Versuche von Multiplex-PCR A durchgeführt: Beständigere Ergebnisse konnten erreicht werden durch die Erhöhung der vom schwedischen Team vorgeschlagenen Zykluszahl von 30 auf 35 sowie das Heruntersetzen der Kühlungstemperatur von anfänglichen 72°C auf 68°C. Eine Verdopplung der zugegeben DNA-Menge führte zwar zum ständigen Vorhandensein von Banden bei den Positivkontrollen, aber auch zu einer starken Zunahme von Fehlpaarungen und damit unspezifischen Produkten. Aufgrund dessen wurde die Anhebung der Annealing-Temperatur versucht, wobei jedoch gar keine PCR-Produkte mehr entstanden. Deshalb wurden hier die anfänglichen Bedingungen (100 ng DNA [5 µl von 20ng/µl] auf 45µl Mastermix und 62°C Annealing Temperatur) beibehalten. Das frische Verdünnen der Primer-Stich-Lösungen auf 25µM vor jeder Messung hatte ebenfalls einen sehr positiven Einfluss auf das Gelingen der PCR A. Doch auch mit diesen Maßnahmen konnten nicht in jeder Messreihe eindeutige Ergebnisse erzielt werden. So muss davon ausgegangen werden, dass nicht alle positiven Proben durch die Multiplex-PCR A erfasst wurden.

Da dem schwedischen Team aufgefallen war, dass die beiden forward-Primer IGH-327F und IGH-JF teilweise miteinander interagierten und zu fehlerhaften PCR-Produkten führen konnten, wurde die demultiplexte PCR eingeführt. Hiermit sollten die positiven Proben aus der Multiplex-PCR verifiziert werden. Mit dieser Methode konnten jedoch nur 22 von ursprünglich 28 Multiplex-PCR-B-Positiven und 5 von 16 Multiplex-PCR-A-Positiven verifiziert werden. Auch bei der Demultiplex-PCR A traten wiederholt keine Banden in der Elektrophorese auf. Optimierungsversuche wurden hierbei jedoch nicht mehr unternommen. Stattdessen wurde entschieden, Sanger-Sequenzierungen zur Bestätigung aller positiven Proben durchzuführen.

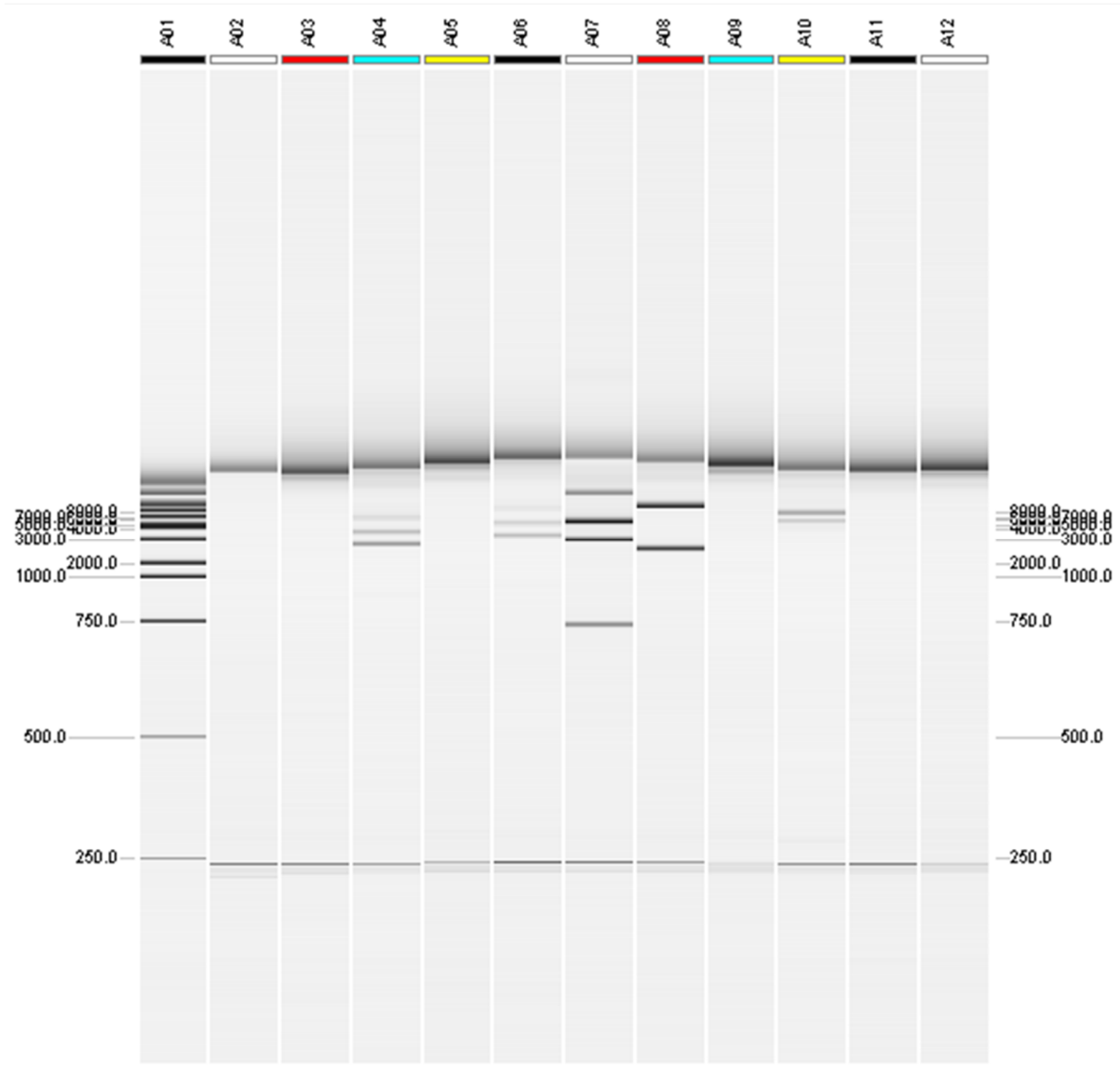


Abb. 9: Beispielhafte Darstellung der Ergebnisse einer Kapillar-Elektrophorese mit dem QIAxcel-Gerät von PCR A

Erläuterungen: A01: DNA-Size Marker; A02: Negativ-Kontrolle H₂O; A03: Positiv-Kontrolle Probe SN8 zeigt keine Bande; A04: Positiv-Kontrolle Probe L5; A05: Negativ-Kontrolle Probe Mu27; A06: Pat. 30107; A07: Pat. 32160; A08: Pat. 34659; A09: Pat. 42624; A10: Pat. 42492; A11: Pat. 30196; A12: Pat. 30234.

A06-A10: *IGH-DUX4* positive Proben – Alle konnten durch Sanger-Sequenzierung bestätigt werden; A09: positive Probe, aber keine Bande in diesem Lauf; A11-A12: *IGH-DUX4* negative Proben

3.3 Gegenüberstellung klinischer Merkmale innerhalb der „B-Others“ Kohorte von *IGH-DUX4* positiven und negativen Patienten

Um die Auswirkungen der *IGH-DUX4* Positivität aufzuzeigen, werden in Tabelle 7 die klinischen Merkmale von 32 Fusions-Positiven und 364 -Negativen gegenübergestellt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Geschlechterverteilung, des Alters bei Diagnosestellung, der initialen Leukozytenzahl, des ZNS-Status und der PR beobachtet. Hinsichtlich der MRD-Risikogruppe und der finalen Risikogruppe zeigten die *IGH-DUX4* positiven Patienten eine stärkere Assoziation zum mittleren Risikoprofil als die negativen (87,5% vs. 59,1%; $p = 0,00540$ bzw. 53,1% vs. 40,9%; $p = 0,01786$).

3.4 Gegenüberstellung klinischer Merkmale der *IGH-DUX4* positiven Patienten und 3322 Patienten der AIEOP-BFM ALL 2000-Studie

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war es, die klinischen Charakteristika von *IGH-DUX4* positiven Patienten nicht nur im Vergleich zu den nicht als *IGH-DUX4* positiv getesteten „B-Others“-Fällen, sondern auch im Vergleich zur Gesamtkohorte aller BCP-ALL-Fälle zu betrachten. Außerdem muss aufgrund der technischen Schwierigkeiten der angewandten Assays angenommen werden, dass sich unter den 364 Patienten von 3.2 noch falsch Negative befinden. Deshalb wurden die positiven Patienten mit dem gesamten Kollektiv der AIEOP-BFM ALL 2000-Studie verglichen. Auch hier ließen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Geschlechts, des Alters bei Diagnose, initialer Leukozytenzahl und ZNS-Status feststellen (siehe Tab. 8). Bei den Fusions-Positiven Patienten fand sich ein höherer Anteil an Prednison-Poor Respondern (15,6% vs. 5,7%; $p = 0,01833$). Auch hier konnte die eindeutige Verknüpfung mit dem intermediären Risikoprofil nach MRD gezeigt werden (87,5% vs. 40,9%; $p < 0,0001$).

Tab. 7: Gegenüberstellung der klinischen Charakteristika und des Therapieansprechens in Abhängigkeit der IGH-DUX4 Positivität von insgesamt 396 Patienten der „B-Others“ Kohorte

	IGH-DUX4 Positive		IGH-DUX4 Negative		p-Wert
	N	%	N	%	
Gesamt	32	100	364	100	
Geschlecht					0,84278
Männlich	17	53,1	200	54,9	
Weiblich	15	46,9	164	45,1	
Alter bei Diagnose					0,79971
< 10 Jahre	22	68,8	258	70,9	
≥ 10 Jahre	10	31,3	106	29,1	
Leukozytenzahl/μL					0,14421
< 10.000	15	46,9	129	35,4	
10.000 - < 50.000	9	28,1	151	41,5	
50.000 - < 100.000	2	6,3	47	12,9	
≥ 100.000	6	18,8	37	10,2	
ZNS Status					0,36512
Positiv	0	0	9	2,5	
Negativ	31	96,9	338	92,9	
Kein Ergebnis	1	3,1	17	4,7	
Prednisone Response*					0,15833
PGR	27	84,4	334	91,8	
PPR	5	15,6	30	8,2	
Risikogruppe nach MRD**					0,00540
Standardrisiko	2	6,3	115	31,6	
Mittleres Risiko	28	87,5	215	59,1	
Hohes Risiko	0	0	21	6,8	
Kein Ergebnis	2	6,3	13	3,6	
Finale Risikogruppe***					0,01786
Standardrisiko	2	6,3	108	29,7	
Mittleres Risiko	17	53,1	147	40,9	
Hohes Risiko	13	13	109	29,9	

Erläuterungen:

*Prednisone Response: PGR: < 1000 Blast/μl Blut an Therapietag 8; PPR: ≥1000 Blast/μl Blut an Therapietag 8

** Risikogruppe nach MRD: Standardrisiko: keine MRD-Last an Zeitpunkt TP1 (Tag 33 der Induktion) und TP2 (12 Wochen nach Therapiebeginn); Mittleres Risiko: MRD-Last < 10⁻³ an TP2; Hohes Risiko: MRD-Last an TP2 ≥ 10⁻³

*** Finale Risikogruppe: siehe Kapitel 1.2.1

Vergleich der beiden Gruppen durch den χ^2 -Test

Tab. 8: Gegenüberstellung der klinischen Merkmale und des Therapieansprechens von 32 IGH-DUX4 positiven Patienten und 3322 nicht untersuchten Patienten der AIEOP-BFM ALL 2000-Studie

	IGH-DUX4 Positive		Nicht untersuchte Patienten der BFM 2000er Studie		p-Wert
	N	%	N	%	
Gesamt	32	100	3322	100	
Geschlecht					0,96531
Männlich	17	53,1	1752	52,7	
Weiblich	15	46,9	1570	47,3	
Alter bei Diagnose					0,21478
< 10 Jahre	22	68,8	2588	77,9	
≥ 10 Jahre	10	31,3	734	22,1	
Leukozytenzahl/μL					0,05417
< 10.000	15	46,9	1711	51,5	
10.000 - < 50.000	9	28,1	1109	33,4	
50.000 - < 100.000	2	6,3	284	8,6	
≥ 100.000	6	18,8	218	6,6	
ZNS Status					0,35969
Positiv	0	0	83	2,5	
Negativ	31	96,9	3066	92,3	
Kein Ergebnis	1	3,1	173	5,2	
Prednisone Response*					0,01833
PGR	27	84,4	3116	93,8	
PPR	5	15,6	191	5,7	
Kein Ergebnis	0	0	15	0,5	
Risikogruppe nach MRD**					< 0,0001
Standardrisiko	2	6,3	1249	37,6	
Mittleres Risiko	28	87,5	1359	40,9	
Hohes Risiko	0	0	172	5,2	
Kein Ergebnis	2	6,3	542	1,6	

Erläuterungen:

*Prednisone Response: PGR: < 1000 Blast/μl Blut an Therapietag 8; PPR: ≥1000 Blast/μl Blut an Therapietag 8

** Risikogruppe nach MRD: Standardrisiko: keine MRD-Last an Zeitpunkt TP1 (Tag 33 der Induktion) und TP2 (12 Wochen nach Therapiebeginn); Mittleres Risiko: MRD-Last < 10⁻³ an TP2; Hohes Risiko: MRD-Last an TP2 ≥ 10⁻³
Vergleich der beiden Gruppen durch den χ^2 -Test

3.5 Prognostische Bedeutung des Nachweises der *IGH-DUX4* Fusion

Die zentrale Zielsetzung dieses Projektes war es, die prognostische Relevanz des *IGH-DUX4* Rearrangements herauszuarbeiten und dabei die Ergebnisse der Lilljebjörn et al. 2016 Studie zu untermauern oder in Frage zu stellen. Hierfür wurden Kaplan-Meier-Überlebenskurven zu der 5-Jahres-EFS Rate und 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate ausgearbeitet und ein nach dem Log-Rank-Test berechneter p-Wert von $\leq 0,05$ als signifikant betrachtet. Die zugehörige CRI galt bei einem p-Wert von $\leq 0,05$, ermittelt durch den Gray-Test, als signifikant.

Bei Betrachtung der Ergebnisse (siehe Abb. 10) konnte ein tendenziell, aber nicht signifikant schlechteres 5-Jahres-Gesamtüberleben der *IGH-DUX4* positiven Patienten gezeigt werden ($83,9 \pm 6,6\%$ vs. $92,6\% \pm 0,5\%$; $p = 0,09$). Hinsichtlich der 5-Jahres-EFS konnten keine signifikanten Unterschiede gesehen werden ($84,4 \pm 6,4\%$ vs. $83,9 \pm 0,6\%$; $p = 0,38$). Dementsprechend gab es auch keine signifikanten Auffälligkeiten bei der kumulativen Inzidenz von Rezidiven und behandlungsassoziierter Mortalität.

Insgesamt lässt sich kein prognostischer Wert des *IGH-DUX4* Rearrangements beschreiben.

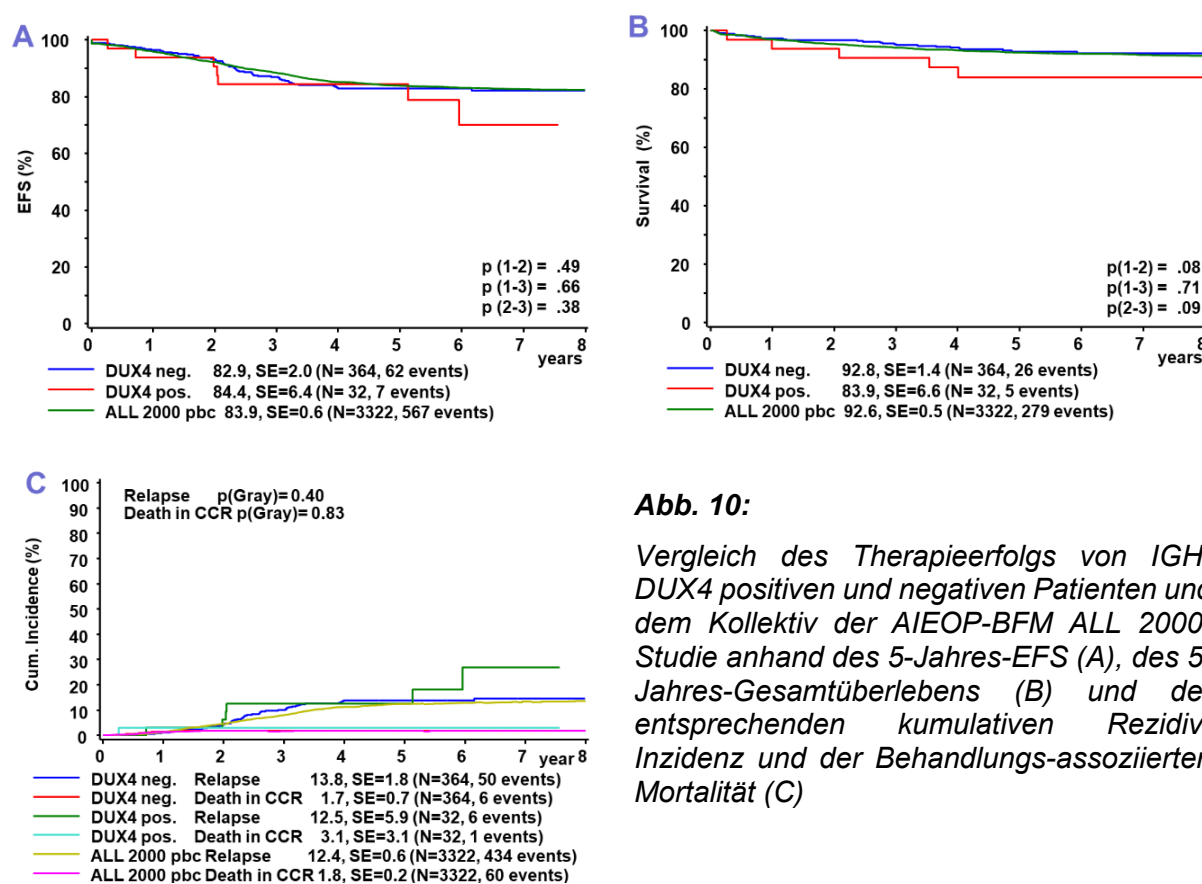


Abb. 10:

Vergleich des Therapieerfolgs von *IGH-DUX4* positiven und negativen Patienten und dem Kollektiv der AIEOP-BFM ALL 2000-Studie anhand des 5-Jahres-EFS (A), des 5-Jahres-Gesamtüberlebens (B) und der entsprechenden kumulativen Rezidiv-Inzidenz und der Behandlungs-assoziierten Mortalität (C)

3.6 Vergleich des Therapieerfolgs in der intermediären Risikogruppe nach MRD

Die Minimale Resterkrankung gibt Aufschlüsse über das Therapieansprechen und spielt damit eine wesentliche Rolle bei der Risikostratifizierung kindlicher ALL (siehe Kapitel 1.2.1). Obwohl Patienten mit HR-Profil das höchste Risiko für ein Rezidiv aufweisen, entstammt der größte Anteil von Rückfall-Patienten dem mittleren Risikoprofil. Besonders für diese Risikogruppe besteht daher großer Bedarf, neue prognostisch relevante Marker zu finden, um das Rezidiv-Risiko besser einschätzen zu können. Da die Fusion *IGH-DUX4* eindeutig dem mittleren Risikoprofil nach MRD zugeordnet werden kann (siehe Tab. 8), war der Vergleich des Therapieerfolgs entsprechend auch nur in der MR-Gruppe sinnvoll.

Sowohl im Vergleich der *IGH-DUX4* positiven zu den negativen Patienten als auch zum Gesamtkollektiv der BFM 2000er Studie konnte kein signifikanter Unterschied im 5-Jahres-EFS beobachtet werden ($85,7 \pm 6,6\%$ vs. $81,2 \pm 1,1\%$; $p = 0,67$ bzw. $85,7\% \pm 6,6\%$ vs. $82,6 \pm 2,6\%$; $p = 0,6$). Dementsprechend konnten auch keine signifikanten Unterschiede bei der CRI und der behandlungsassoziierten Mortalität ausgemacht werden (siehe Abb. 11). Das Gesamtüberleben ist bei den *IGH-DUX4* positiven Patienten etwas, aber nicht signifikant schlechter als bei dem 2000er Patientenkollektiv ($85,1 \pm 6,9\%$ vs. $94,3 \pm 0,6\%$; $p = 0,06$).

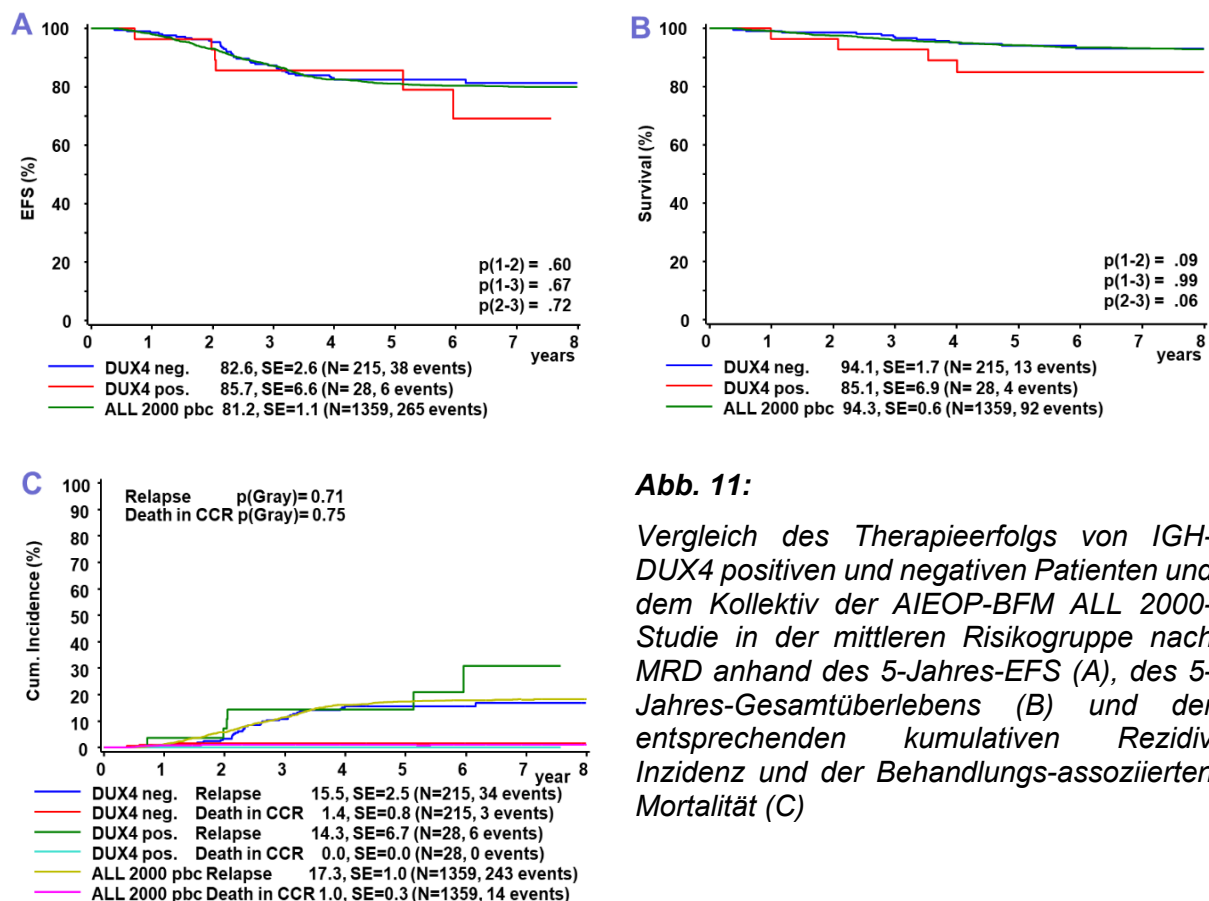


Abb. 11:

Vergleich des Therapieerfolgs von *IGH-DUX4* positiven und negativen Patienten und dem Kollektiv der AIEOP-BFM ALL 2000-Studie in der mittleren Risikogruppe nach MRD anhand des 5-Jahres-EFS (A), des 5-Jahres-Gesamtüberlebens (B) und der entsprechenden kumulativen Rezidiv Inzidenz und der Behandlungs-assoziierten Mortalität (C)

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Untersuchung wurden 396 Patienten, welche die Kriterien der „B-Others“ erfüllten, auf das Vorhandensein des *IGH-DUX4* Rearrangements mit Hilfe einer von Lilljebjörn et al. entwickelten Multiplex-PCR getestet. [65] Bei 44 Patienten ergab die PCR positive Ergebnisse, von denen allerdings nur 32 mit Hilfe einer Sequenzierung bestätigt werden konnten. Aufgrund der nicht konstanten Ergebnisse von Multiplex-PCR A muss zugleich davon ausgegangen werden, dass nicht alle *IGH-DUX4* positiven Patienten des untersuchten „B-Others“ Kollektivs detektiert werden konnten. Es können deshalb keine endgültigen Aussagen über die Inzidenz des neuen Rearrangements getroffen werden.

Als wesentliches Ziel dieser Arbeit wurde die Frage nach einer prognostischen Relevanz der *IGH-DUX4* Fusion formuliert. Das Ansprechen auf Prednison war bei den *IGH-DUX4* Positiven im Vergleich zum Gesamtkollektiv der AIEOP-BFM ALL 2000-Studie schlechter. Hinsichtlich der Einteilung in die Risikogruppen konnte eine verstärkte Assoziation der positiven Patienten zur mittleren Risikogruppe nach MRD gefunden werden. In den übrigen klinischen Charakteristika (Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose, Initiale Leukozytenzahl und ZNS-Status) konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

Eine Verknüpfung des *IGH-DUX4* Rearrangements mit einem bestimmten Therapieerfolg konnte nicht festgestellt werden.

4 DISKUSSION

Aufgrund stetiger Forschung und Weiterentwicklung der Therapien können heutzutage nahezu 80% aller Kinder und Jugendliche mit ALL eine langfristige Heilung erfahren. Doch nach wie vor erleiden 20% ein Rezidiv. Die Wahrscheinlichkeit einer dauerhaften Genesung ist dann sehr viel geringer. Die relative Häufigkeit von Rückfällen ist in der HR-Gruppe am höchsten. Dennoch rezidivieren zahlenmäßig die meisten Patienten, welche ursprünglich der MR-Gruppe zugeordnet wurden und damit nicht die intensive Chemotherapie bekommen, die sie bräuchten. [26,67,68] Es besteht also besonders für diese Gruppe von Patienten die medizinische Notwendigkeit, neue prognostisch relevante Marker zu finden, welche frühzeitig erkennen lassen, ob die Therapie intensiviert werden muss. Auf der anderen Seite stehen die teilweise schwerwiegenden unerwünschten Nebenwirkungen einer Chemotherapie, wie beispielsweise die Entwicklung von lebensbedrohlichen Infektionen, Zweitmalignomen, Infertilität, hormonellen Störungen und psychischen Erkrankungen. [69–71] Es muss also unbedingt auch ein Übertherapieren der Patienten vermieden werden. Mit dem Ziel, neue Marker für eine bedürfnisgerechte Therapie zu finden, wurden bereits zahlreiche Studien initiiert. [72–74] So werden mittlerweile über 20 verschiedene Subgruppen (Stand Februar 2019) von BCP-ALL unterschieden, definiert aufgrund von Genexpressionsprofilen, chromosomaler Neuaneordnungen, Sequenz-Mutationen oder anderer heterogener genetischer Veränderungen. [75–77] Bisher ist die prognostische Relevanz von vielen dieser Aberrationen noch nicht an aussagekräftigen Patientenkollektiven untersucht worden. Dennoch lassen die vielfältigen Untersuchungen auf eine Verbesserung der Prognose von an ALL erkrankten Kindern hoffen: Zum einen durch eine bessere Risikostratifizierung mit einhergehender Anpassung der Therapieintensität und zum anderen durch die Entdeckung möglicher Angriffspunkte neuartiger Immuntherapeutika. [78] So konnten bereits einige neu erforschte Marker zur Einteilung in die verschiedenen Risikogruppen in das Protokoll der aktuell laufenden AIEOP-BFM ALL 2017-Studie integriert werden. [79] Beispielsweise *t(17;19)* bzw. *TCF3-HLF* und *IKZF1^{plus}* gelten nun als Kriterien für die Zuordnung zu der HR-Gruppe. [80,81] *IGH-DUX4* stellt einen neuen, möglicherweise prognostisch relevanten Marker dar. Dies und die tatsächliche Inzidenz des Rearrangements wurde in dieser Arbeit an einem einheitlich behandelten Patientenkollektiv mit Hilfe einer klinisch bisher nicht erprobten Methode untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden in den folgenden Kapiteln diskutiert und der bisherigen Forschung gegenübergestellt.

4.1 Auswahl des Patientenkollektivs nach den „B-Others“ Kriterien

Patienten, welche negativ sind für die bekannten Aberrationen *BCR-ABL1*, *ETV6-RUNX1*, *KMT2A-AFF1*, *E2A-PBX1* sowie Hyper- und Hypodiploidie werden als „B-Others“ bezeichnet. [82] Diese Patientengruppe ist stark verknüpft mit der Einteilung in die MR-Gruppe. Aus den oben genannten Gründen ist die Identifizierung von Markern, welche das Therapieansprechen vorhersagen, besonders bei diesen Patienten bedeutsam. Die Auswahl des Kollektivs für diese Untersuchung nach den „B-Others“ Kriterien hatte folgende Hintergründe:

Laut Lilljebjörn et al. und Yasuda et al. sind *IGH-DUX4* positive BCP-Leukämien dadurch charakterisiert, dass sie negativ für die bekannten Aberrationen sind und ein spezifisches Genexpressionsprofil aufweisen. [46,48] Ziel dieser Studie war es, zu prüfen, ob der Nachweis des *IGH-DUX4* Rearrangements eine prognostische Bedeutung hat. Des Weiteren werden die Ergebnisse dieser Studie mit denen von Lilljebjörn et al. 2016 unter 4.3 verglichen. Deshalb orientierte sich die Auswahl des Patientenkollektivs an der Kontrollgruppe jener Untersuchung.

Boer et al. untersuchten 153 „B-Others“, um die Charakteristik der sog. Philadelphia-Chromosom like (Ph-like) oder *BCR-ABL1* like ALL zu untersuchen. Diese Aberration findet sich in 50% der „B-Others“ und ist verbunden mit einer schlechten Prognose. [83,84] Die Assoziation zu einer höheren Leukozytenzahl lässt sich auch im „B-Others“ Kollektiv jener Studie von 2016 nachweisen. Außerdem findet sich auch dort die deutliche Assoziation zum mittleren bis hohen Risikoprofil. Mit 33% ist der Anteil der mindestens 10-jährigen Patienten an dem „B-Others“ Kollektiv sehr ähnlich zu dem dieser Untersuchung.

4.2 Die Multiplex-PCR als Nachweismethode für das Rearrangement *IGH-DUX4*

Lilljebjörn et al. haben ein Multiplex-PCR-Assay entwickelt, welches theoretisch die Amplifikation aller bisher beschriebenen *IGH-DUX4* Rearrangements erlaubt. [65] Diese Methode wäre bei ausreichender Sensitivität und Spezifität, verglichen mit den bisherigen Verfahren für deren Nachweis, kostengünstig und einfacher in der Durchführung.

Neben der Frage nach Inzidenz und prognostischer Relevanz der neuen Fusion war es auch Ziel dieser Arbeit, durch die erstmalige Anwendung der Methode an einer großen Probenanzahl ihre Zuverlässigkeit und Aussagekraft zu beurteilen. Unter 3.1 sind die Ergebnisse der beiden Assays dargestellt. Trotz der Verbesserungsversuche konnte PCR A nicht vollständig optimiert werden. Ein Lösungsansatz könnte die Verwendung eines neuen

PCR-Kits mit einer anderen DNA-Polymerase sein. Dies wurde in dieser Arbeit jedoch nicht mehr versucht. Letzten Endes muss bei PCR A davon ausgegangen werden, dass nicht alle *IGH-DUX4* positiven Patienten des Kollektivs detektiert werden konnten und es damit eine nicht bekannte Anzahl an falsch negativen Patienten gibt.

In nur 62,5% der Fälle konnte ein positives Ergebnis der Multiplex-PCR A mit Hilfe der Sequenzierung bestätigt werden, bei PCR B waren es 82%. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass eine Interaktion der beiden *IGH*-Primer ebenfalls zu einem PCR-Produkt führen könnte. Mit dem Zwischenschritt der demultiplexten PCR wurde diese Fehlerquelle ausgeschlossen. Ein Vorteil für die Detektion konnte hierdurch trotzdem nicht erbracht werden. Zwar war hier der PPW von PCR A 100% und von B 86%, doch der Anteil an falsch Negativen (Demultiplex-PCR A: 5 von 11 Negativen: 45% und Demultiplex-PCR B: 4 von 6 Negativen: 67%) war zu hoch. Über Sensitivität und Spezifität der Methode können aufgrund der unbekannten Anzahl falsch negativer Proben nur begrenzt Rückschlüsse gezogen werden.

Es muss geschlussfolgert werden, dass die Multiplex-PCR-Assays, wie sie für diese Arbeit verwendet wurden, nicht für die Diagnostik des Rearrangements geeignet sind. Für folgende Studien zu *IGH-DUX4* sollte deshalb auf andere Methoden zurückgegriffen werden.

4.3 Alternative Nachweismethoden des Rearrangements *IGH-DUX4*

Die genomische Region, in welche *DUX4* transloziert, stellt sich außerordentlich komplex dar und lässt sich dadurch sehr schwer untersuchen. Aufgrund der kleinen Größe der Insertion lässt sich das Rearrangement nicht mit Hilfe von G-Bänderung oder Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) detektieren. In den bisherigen Studien wurde vor allem RNA-Sequenzierung auf Grundlage von Next-Generation-Sequencing als Methode der Detektion verwendet. [46,48,54,57] Hierbei kann *IGH-DUX4* nicht direkt nachgewiesen werden, sondern lediglich über die *DUX4* Überexpression und die Anwesenheit von *DUX4*-Fusions-Transkripten. In der Studie von Zhang et al. kamen Genexpressionsanalysen und SNP-Microarrays zusammen mit Gesamt-Genom-Sequenzierung (Whole-Genome Sequencing; WGS), Exom-Analyse (Whole-Exome Sequencing; WES) und/ oder Transkriptom-Analyse (transcriptome sequencing) zum Einsatz. [58] Nordlund et al. verwendeten „linked-read WGS“ als Methode zur Detektion chromosomaler Rearrangements. Durch diese spezielle Form der Sequenzierung lassen sich Genom-Regionen im Megabasen-Bereich identifizieren. [85] Selbst mit diesen leistungsstarken Sequenzierungsmethoden ist die Identifikation von *IGH-DUX4* äußerst schwierig. Des Weiteren sind diese Methoden für umfangreiche Screening-Studien noch nicht geeignet und in vielen Studienzentren nicht durchführbar. Schab und

Harrison fassen in ihrer Veröffentlichung von 2018 zusammen, dass die genomweite RNA-Sequenzierung die genaueste Methode zur Detektion von BCP-Leukämien mit *DUX4* Rearrangements darstellt. Auch postulieren sie die Möglichkeit, *DUX4* veränderte Patienten über die spezifische Assoziation mit *ERG*-Deletionen zu detektieren. [86] Zwar sind *ERG*-Deletionen ein sensibler Marker für *IGH-DUX4* Rearrangements. Allerdings finden sie sich nur bei 30-70% aller positiven Patienten. Somit schließt das Nicht-Vorhandensein der *ERG*-Deletion eine Positivität für *IGH-DUX4* nicht aus. [58,87]

Ein interessanter neuer Ansatz von Schumich et al. ist die Detektion der *DUX4* Fusion über das Zelloberflächenprotein CD371 durch Durchflusszytometrie. In ihrer Studie von 2019 konnten sie zeigen, dass das Vorhandensein von CD371 als pathognomonisch für *DUX4* veränderte B-Zell ALL anzusehen ist, da das kodierende Gen *CLEC12A* durch die *IGH-DUX4* Fusion überexprimiert wird. [88]

Alle diese Methoden können *IGH-DUX4* nicht direkt nachweisen. Somit muss mit einem geringen Anteil an falsch negativen Proben gerechnet werden. Dennoch sind diese Methoden dem direkten Nachweis des Rearrangements durch die Multiplex-Long-Range PCR dieser Arbeit überlegen und deshalb zu bevorzugen.

4.4 Einordnung der Ergebnisse in die bisher stattgefundenen Untersuchungen

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit waren die biologischen Merkmale des Rearrangements schon sehr gut erforscht. Über Inzidenz, klinische Charakteristik und prognostische Relevanz war jedoch sehr wenig bekannt. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse dieser Arbeit mit den bisher stattgefundenen Untersuchungen verglichen.

Lilljebjörn et al. untersuchten in ihrer Studie von 2016 195 Patienten mit kindlicher BCP-ALL; 50 Patienten dieses Kollektivs waren negativ für bekannte chromosomale Aberrationen (= „B-Others“). Das Rearrangement *IGH-DUX4* wurde in sieben Fällen (3,6%) gefunden. Alle sieben Patienten konnte den „B-Others“ zugeordnet werden, was einem Anteil von 14% des „B-Others“ Subkollektivs entsprach. In ihrer Kontrollgruppe von 49 „B-Others“ Patienten konnten zudem noch 19 *IGH-DUX4* Positive gefunden werden (38,8%). Die Patienten dieser Studie erhielten zwischen Januar 1992 und Januar 2013 ihre Erstdiagnose und wurden zum größten Teil nach den Protokollen NOPHO 1992, 2000 und 2008 behandelt. [46] In einer anderen Analyse von Li et al. wurde ebenfalls unter anderem die Inzidenz und prognostische Relevanz von *DUX4* Rearrangements beurteilt. Hier wurden 1223 Fälle aus sechs unterschiedlichen Kohorten, welche im Rahmen anderer Studien untersucht wurden und damit auch nach

voneinander abweichenden Protokollen behandelt wurden, nochmals aufgearbeitet. In insgesamt 63 Fällen (5% aller Patienten) wurden *DUX4* Rearrangements gefunden, 78% davon waren *IGH-DUX4* transloziert. [89] Dieses Ergebnis lässt sich jedoch schlecht mit der vorliegenden Arbeit vergleichen, da unter den 63 Positiven auch erwachsene Patienten waren. Auch fanden die hier als Datenquellen verwendeten Studien über deutlich längere Zeiträume statt.

Der wesentliche Unterschied dieser Arbeit gegenüber den oben genannten Studien ist, dass die untersuchten Patienten alle nach dem gleichen Protokoll (AIEOP-BFM ALL 2009) therapiert wurden. Damit erfüllt diese Untersuchung die Forderung nach einer Kohorte mit einheitlich behandelten Patienten. Dies ist notwendig für eine Aussage über das Therapieansprechen und den Therapieerfolg. Außerdem ist der Zeitraum, in welchem die Patienten ihre Erstdiagnose erhielten (Juni 2010-Dezember 2014), viel geringer.

Die Fusion *IGH-DUX4* wurde in dieser Arbeit in 32 Fällen gefunden, was einem Anteil von 8% der „B-Others“ des untersuchten Zeitraumes entspricht. Damit wurde die Inzidenz im Vergleich zur Lilljebjörn et al. 2016 Studie deutlich relativiert. Die Ergebnisse sind jedoch aufgrund der sehr unterschiedlichen Kollektiv-Zusammenstellung und Patientenzahl nur bedingt vergleichbar. Es muss des Weiteren eingeräumt werden, dass aufgrund einer nicht bekannten Anzahl von falsch negativen Patienten aus Multiplex-PCR A die tatsächliche Inzidenz wahrscheinlich höher ist. Endgültige Aussagen über Inzidenz des *IGH-DUX4* Rearrangements unter den „B-Others“ können auch nach diesem Promotions-Projekt nicht getroffen werden.

In den bisherigen Studien wird von einer Assoziation des Rearrangements zu einer höheren Altersgruppe der pädiatrischen Patienten berichtet, wenn man von einem Altersgipfel der Erkrankung an ALL von zwei bis fünf Jahren ausgeht. [91] Lilljebjörn et al. beobachteten ein medianes Alter bei Erstdiagnose von 8,5 Jahren, in der Untersuchung von Marincevic-Zuniga et al. waren es 9,3 Jahre und bei Yasuda et al. wurden *DUX4* Fusionen nur in der AYA-Generation (adolescents and young adults, Alter: 15-39 Jahre) gefunden. [46,48,90] Das mediane Alter der *IGH-DUX4* positiven Patienten dieser Untersuchung liegt bei 8 Jahren, was die Hypothese dieser Arbeiten stützt. Allerdings zeigen sich keine signifikanten Auffälligkeiten hinsichtlich des Alters bei Erstdiagnose beim Vergleich der Positiven sowohl mit den Negativen als auch mit dem AIEOP-BFM ALL 2000-Gesamtkollektiv. Es ist also vielmehr von einer Assoziation der gesamten „B-Others“ Kohorte zu einer höheren Altersgruppe von Patienten auszugehen (siehe Tab. 6). Das Rearrangement kommt aber auch bei jüngeren Patienten vor. Im Kollektiv dieser Untersuchung war der jüngste *IGH-DUX4* positive Patient 3 Jahre alt. In den weiteren untersuchten klinischen Charakteristika (Geschlechterverteilung, initiale Leukozytenzahl, ZNS-Status) zeigen die Patienten mit positivem *IGH-DUX4* Status keine signifikanten Tendenzen.

Li et al. berichten von einer guten Prognose und damit einer Assoziation zur niedrigen Risikogruppe von *DUX4* Rearrangements (einschließlich *IGH-DUX4*) bei kindlicher ALL und von einem mittleren Risikoprofil bei erwachsenen Patienten. [89] Auch Marincevic-Zuniga et al. ermittelten unter den neun *IGH-DUX4* positiven Patienten ihrer Untersuchung von 2017 nur einen Rückfall und schlussfolgerten daraus ebenso eine gute Prognose. [90]

Die Ergebnisse dieser Arbeit können jene Bewertungen der *IGH-DUX4* Fusion nicht stützen. Bei Gegenüberstellung der *IGH-DUX4* Positiven zum Gesamtkollektiv der AIEOP-BFM ALL 2000-Studie zeigte sich ein verhältnismäßig schlechteres Ansprechen auf Prednison und hinsichtlich der Einteilung in die MRD-Risikogruppen eine eindeutige Assoziation des Rearrangements zum mittleren Risikoprofil (siehe Tab. 8). Ebenso konnten keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich des Therapieerfolgs der Fusions-Positiven und des 2000er Gesamtkollektivs in der mittleren Risikogruppe nach MRD (siehe Abb. 10) festgestellt werden. Schlussfolgernd stellen die Ergebnisse dieser Promotions-Arbeit die bisherige Bewertung von *IGH-DUX4* in Frage. Die Fusion ist eher dem mittleren Risikoprofil zuzuordnen.

4.5 *IGH-DUX4* als unabhängiger prognostisch relevanter Marker

Um die prognostische Relevanz des Rearrangements *IGH-DUX4* einzuschätzen, wurden Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Fusions-Positiven, -Negativen und der Patienten der AIEOP-BFM ALL 2009-Studie angefertigt. Es muss hierbei angemerkt werden, dass sich unter den 352 Patienten, welche keine Banden in der Elektrophorese zeigten und damit nicht sequenziert wurden, vermutlich noch einige Positive befinden. Für eine endgültige Schlussfolgerung müsste das „B-Others“ Patientenkollektiv nochmal mit einer alternativen Methode (siehe 2.3) auf das Vorhandensein von *IGH-DUX4* gescreent werden. Es lassen sich trotzdem aussagekräftige Rückschlüsse auf die Prognose ziehen. In dem als *IGH-DUX4* negativen Subkollektiv dieser Arbeit befinden sich sehr wahrscheinlich noch positive Patienten. Um dennoch die Auswirkung von *IGH-DUX4* auf den Therapieerfolg zu screenen, wurde das *IGH-DUX4* positive Subkollektiv den gesamten Patienten der AIEOP-BFM ALL 2000-Studie gegenübergestellt. Und auch im Vergleich hierzu konnten keine Unterschiede hinsichtlich des EFS und der CRI, wobei ein Zeitraum von bis zu acht Jahren verfolgt wurde, gesehen werden. Somit lässt sich schlussfolgern, dass *IGH-DUX4* als alleiniger Marker keinen prognosebestimmenden Wert hat für Patienten, welche nach dem AIEOP-BFM ALL 2009-Protokoll behandelt werden. Nach jetzigem Erkenntnisstand bringt es damit keinen Mehrwert, diese Aberration in die Routine-Diagnostik der kindlichen ALL einzuführen.

4.6 Ausblick für neue Studien

In dieser Untersuchung konnte *IGH-DUX4* als unabhängigem Marker keine prognostische Bedeutung beigemessen werden. Zur endgültigen Bestätigung muss dies an einem noch größeren Patientenkollektiv untersucht werden. Als Methode hierfür sollte die genomweite RNA-Sequenzierung zum Einsatz kommen, da bislang keine auflösungsstärkere Methode zur Detektion des Rearrangements entwickelt werden konnte. [86,90]. Sehr interessant könnte es sein, das untersuchte „B-Others“-Kollektiv auf den Oberflächenmarker CD371 über Durchflusszytometrie zu screenen und hierbei die neue Methode an einem großen Patientenkollektiv zu testen. Könnte diese Verknüpfung von CD371 und *DUX4*-veränderter ALL verifiziert werden, ergäbe sich hier auch eine Möglichkeit für neue Antikörper-Therapien. [88] Weiterhin könnte das untersuchte Kollektiv auch auf *ERG*-Deletionen untersucht werden. Denn sowohl Lilljebjörn et al. als auch Zhang et al. und Dong et al. vermuten, dass die Translokation von *DUX4* in den *IGH*-Lokus das vorausgehende Event für *ERG*-Deletionen darstellt. [46,56,58] Mögliche Methoden hierfür wären eine Multiplex-PCR mit anschließender Sanger-Sequenzierung, SNP-Arrays, Analyse der *ERG_{alt}*-Expression über RNA-Sequenzierung oder Amplifikations-Sequenzierung. [87,92] So könnte man sowohl bestätigen, dass die *IGH-DUX4* Translokation das vorausgehende Event für *ERG*-Deletionen darstellt, als auch Aussagen darüber treffen, ob die *ERG*-Deletion die prognostische Relevanz von *IGH-DUX4* verändert. Stanulla et al. stellen in ihrer Veröffentlichung von 2018 das prognostische Profil *IKZF1^{plus}* vor, welches sich zusammensetzt aus *IKZF1*-Deletionen mit zusätzlichen Deletionen von *CDKN2A*, *CDKN2B*, *PAX5* oder *PAR1* bei gleichzeitigem Fehlen von *ERG*-Deletionen. Dieses Profil ist assoziiert mit einer außerordentlich schlechten Prognose, geprägt von deutlich mehr Rezidiven als beim alleinigen Vorhandensein von *IKZF1*-Deletionen. [81] Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass *IGH-DUX4* mit der daraus resultierenden Deregulation von *ERG* das schlechte Outcome von Aberrationen, wie zum Beispiel *IKZF1*-Deletionen, verbessert. Eine weitere Studie über das gemeinsame Auftreten von *IGH-DUX4* und *IKZF1*-Deletionen könnte ein Ansatz für die Erstellung eines neuen prognostischen Profils sein, ähnlich dem von *IKZF1^{plus}*.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Jährlich erkranken etwa 500 Kinder und Jugendliche an einer Akuten Lymphoblastischen Leukämie (ALL), was sie zur häufigsten Krebserkrankung des Kindesalters macht. Trotz stetiger Forschung und Anpassung der Therapien erleiden 15-20% der Patienten ein Rezidiv ihrer Erkrankung. Auch stellen die Nebenwirkungen sowie die Langzeitfolgen der intensiven Therapie eine Herausforderung der medizinischen Versorgung dar. Daher muss es weiterhin ein wichtiges Ziel der Forschung sein, die Therapie noch mehr zu individualisieren. Einen Meilenstein hierfür stellt die Identifikation neuer prognostisch relevanter Marker dar. Bereits zum Diagnosezeitpunkt könnten so Patienten identifiziert werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit rezidivieren und damit frühzeitig in die HR-Gruppe mit resultierender intensivierter Therapie eingeteilt werden. Zum jetzigen Zeitpunkt sind mehr als 20 verschiedene Subgruppen mit chromosomalen Aberrationen, Sequenz-Mutationen oder anderen heterogenen genetischen Veränderungen der B-Vorläuferzell-ALL bekannt. Einigen dieser Marker konnte eine prognostische Relevanz zugeschrieben werden und deshalb werden sie routinemäßig in der initialen Diagnostik einer neu entdeckten ALL bestimmt. In circa 30-40% können jedoch die standardmäßig bestimmten prognoserelevanten Marker *ETV6-RUNX1*, *KMT2A-AFF1*, *BCR-ABL1*, High-Hyperdiploidie und Hypodiploidie nicht gefunden werden. Diese „B-Others“ Patienten sind geprägt von einem mittleren Risikoprofil. Lilljebjörn et al. konnten das Rearrangement *IGH-DUX4* als einen Subtyp der „B-Others“ identifizieren. Studien mit einer ausreichend großen Fallzahl für Aussagen über Inzidenz und prognostische Relevanz des Rearrangements gab es bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht. So war es das wesentliche Ziel dieser Arbeit, an die Lilljebjörn et al. Studie anzuknüpfen und die Fusion näher hinsichtlich dieser Kriterien zu untersuchen. Hierfür wurde ein Patientenkollektiv von 396 „B-Others“ Patienten auf das Vorhandensein von *IGH-DUX4* getestet und retrospektiv der Verlauf der Erkrankung betrachtet. Für die Detektion wurde ein neu entwickelter Multiplex-Long-Range PCR-Ansatz (bestehend aus „PCR A“ und „PCR B“) verwendet, welcher theoretisch den Nachweis aller möglichen bisher beschriebenen *IGH-DUX4* Translokationen erlauben sollte. Hierbei zeigte sich, dass diese Methode allein nicht zur Identifikation des Rearrangements geeignet ist. Nur mit Hilfe von zusätzlichen Sequenzierungsmethoden können falsch positive Ergebnisse erkannt werden. Außerdem ist von einer nicht bekannten Anzahl falsch negativer Befunde in PCR A auszugehen. Für zukünftige Studien zu diesem neuen „B-Others“-Subtyp sollte auf andere Ansätze, beispielsweise die genomweite RNA-Sequenzierung, zurückgegriffen werden.

Allerdings ist selbst mit solch leistungsstarken Sequenzierungsmethoden die Detektion von *IGH-DUX4* aufgrund seiner Komplexität schwierig.

Mit einem Anteil von etwa 8% an der „B-Others“ Kohorte wäre die Inzidenz laut dieser Untersuchung deutlich geringer als in der Grundlagen-Studie dieses Projektes. Doch endgültige Aussagen über die Inzidenz können aufgrund der unbekannten Anzahl von falsch negativen Patienten nicht getroffen werden. Die Assoziation zu eher älteren Patienten (medianes Alter etwa acht Jahren) ließ sich bestätigen. Dennoch kann dies nicht als charakteristisch für das *IGH-DUX4* Rearrangement eingeschätzt werden, da ebenso das gesamte „B-Others“-Kollektiv ein eher höheres Alter bei Erstdiagnose aufzeigt. Die in der bisherigen Literatur beschriebene günstige Prognose des Rearrangements wird durch diese Arbeit in Frage gestellt. Die *IGH-DUX4* positiven Patienten zeigten im Vergleich zum Gesamtkollektiv der AIEOP-BFM ALL 2000-Studie ein schlechteres Ansprechen auf Prednison sowie eine eindeutige Verknüpfung mit dem mittleren Risikoprofil nach MRD. Eine Auswirkung auf den Therapieerfolg ließ sich für die Fusions-Positiven nicht nachweisen.

Zusammenfassend konnte dem Rearrangement *IGH-DUX4* als unabhängiger Marker keine prognostische Bedeutung für Patienten, welche gemäß dem AIEOP-BFM ALL 2009-Protokoll behandelt wurden, beigemessen werden.

Äußerst interessant könnte es sein, das untersuchte Kollektiv auf CD371 zu screenen und die für dieses Oberflächen-Antigen Positiven mit den durch Sequenzierung bestätigten *IGH-DUX4* Positiven abzugleichen. Hierbei könnte nicht nur eine weitere Methode zur Detektion von *DUX4* veränderter ALL etabliert werden, sondern auch ein möglicher Angriffspunkt für neue Antikörper-Therapien gefunden werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Bader P., Borkhardt A., Klingebiel T. (2014). Leukämien. In: Pädiatrie. Grundlagen und Praxis, 4. Aufl. Schaub, J., Schulte, F.-J., Hoffmann, G. F., Lentze, M. J., Spranger, J., Zepp, F. (Hrsg.). Springer, Berlin, Heidelberg, 1510–1518.
- [2] Henze, G. (2019). Leukämien. In: Pädiatrie, 5. Aufl. Speer, C. P., Gahr, M., Dötsch, J. (Hrsg.). Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 572–577.
- [3] Spix, C., Kaatsch, P., Grabow, D. Deutsches Kinderkrebsregister: Lymphatische Leukämien- Stand 2016 (2006-2015). Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz.
- [4] Odenike, O. M., Michaelis, L. C., Stock, W. (2006). Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Oncology. An Evidence-Based Approach. Chang, A. E., Ganz, P. A., Hayes, D. F., Kinsella, T. J., Pass, H. I., Schiller, J. H., Stone, R. M., Strecher, V. J. (Hrsg.). Springer Science+Business Media Inc, New York, NY, 1173–1200.
- [5] Kaatsch, P., Spix, C., Jung, I., Blettner, M. (2008). Childhood leukemia in the vicinity of nuclear power plants in Germany. *Deutsches Arzteblatt international* 105/42, 725–732.
- [6] Linabery, A. M., Jurek, A. M., Duval, S., Ross, J. A. (2010). The association between atopy and childhood/adolescent leukemia: a meta-analysis. *American journal of epidemiology* 171/7, 749–764.
- [7] Amitay, E. L., Keinan-Boker, L. (2015). Breastfeeding and Childhood Leukemia Incidence: A Meta-analysis and Systematic Review. *JAMA pediatrics* 169/6, e151025.
- [8] Bene, M. C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W. D., Matutes, E., Orfao, A., van't Veer, M. B. (1995). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 9/10, 1783–1786.
- [9] Bain, B. J., Barnett, D., Linch, D., Matutes, E., Reilly, J. T. (2002). Revised guideline on immunophenotyping in acute leukaemias and chronic lymphoproliferative disorders. *Clinical and laboratory haematology* 24/1, 1–13.
- [10] Moorman, A. V. (2016). New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 101/4, 407–416.
- [11] Faderl, S., Kantarjian, H. M., Talpaz, M., Estrov, Z. (1998). Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 91/11, 3995–4019.
- [12] Starý, J., Zuna, J., Zaliouva, M. (2018). New biological and genetic classification and therapeutically relevant categories in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *F1000Research* 7.
- [13] Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., Stein, H., Thiele, J. (Hrsg.) (2017). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 4. Aufl. International Agency for Research on Cancer, Lyon.

- [14] Buchmann, S. (2015). Prognostische Bedeutung der Expression der P2RY8-CRLF2-Fusions-assoziierten Gene LRRC32, BMP6 und VPB1 für die Akute Lymphoblastische Leukämie im Kindes- und Jugendalter. Med. Diss., Kiel.
- [15] Schrappe, M., Möricke, A., Attarbaschi, A., Stackelberg, A. von (2018). Akute lymphoblastische Leukämie. In: Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, 2. Aufl. Niemeyer, C., Eggert, A. (Hrsg.). Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 269–292.
- [16] Schrappe, M., Beck, J., Brandeis, W. E., Feickert, H. J., Gadner, H., Graf, N., Havers, W., Henze, G., Jobke, A., Kornhuber, B. (1987). Die Behandlung der akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindes- und Jugendalter: Ergebnisse der multizentrischen Therapiestudie ALL-BFM 81. Klinische Padiatrie 199/3, 133–150.
- [17] Yiallourous, M. (2018). Ablauf nach AIEOP-BFM ALL-Studie/-Register. https://www.kinderkrebsinfo.de/erkrankungen/leukaemien/pohpatinfoall120060414/therapie/ablauf_der_chemotherapie/nach_aieop_bfm_all/index_ger.html (letzter Zugriff am 26.3.2020).
- [18] Reiter, A., Schrappe, M., Ludwig, W. D., Hiddemann, W., Sauter, S., Henze, G., Zimmermann, M., Lampert, F., Havers, W., Niethammer, D. (1994). Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. Blood 84/9, 3122–3133.
- [19] Schrappe, M., Camitta, B., Pui, C. H., Eden, T., Gaynon, P., Gustafsson, G., Janka-Schaub, G. E., Kamps, W., Masera, G., Sallan, S., Tsuchida, M., Vilmer, E. (2000). Long-term results of large prospective trials in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 14/12, 2193–2194.
- [20] Vrooman, L. M., Silverman, L. B. (2016). Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Prognostic Factors and Clinical Advances. Current hematologic malignancy reports 11/5, 385–394.
- [21] van Dongen, J. J., Seriu, T., Panzer-Grümayer, E. R., Biondi, A., Pongers-Willems, M. J., Corral, L., Stolz, F., Schrappe, M., Masera, G., Kamps, W. A., Gadner, H., van Wering, E. R., Ludwig, W. D., Basso, G., Bruijn, M. A. de, Cazzaniga, G., Hettinger, K., van der Does-van den Berg, A., Hop, W. C., Riehm, H., Bartram, C. R. (1998). Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. Lancet (London, England) 352/9142, 1731–1738.
- [22] Coustan-Smith, E., Sancho, J., Hancock, M. L., Boyett, J. M., Behm, F. G., Raimondi, S. C., Sandlund, J. T., Rivera, G. K., Rubnitz, J. E., Ribeiro, R. C., Pui, C. H., Campana, D. (2000). Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 96/8, 2691–2696.
- [23] van Dongen, J. J. M., van der Velden, V. H. J., Brüggemann, M., Orfao, A. (2015). Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. Blood 125/26, 3996–4009.
- [24] Berry, D. A., Zhou, S., Higley, H., Mukundan, L., Fu, S., Reaman, G. H., Wood, B. L., Kelloff, G. J., Jessup, J. M., Radich, J. P. (2017). Association of Minimal Residual Disease With Clinical Outcome in Pediatric and Adult Acute Lymphoblastic Leukemia: A Meta-analysis. JAMA oncology 3/7, e170580.

- [25] Pierro, J., Hogan, L. E., Bhatla, T., Carroll, W. L. (2017). New targeted therapies for relapsed pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Expert review of anticancer therapy* 17/8, 725–736.
- [26] Conter, V., Bartram, C. R., Valsecchi, M. G., Schrauder, A., Panzer-Grümayer, R., Möricke, A., Aricò, M., Zimmermann, M., Mann, G., Rossi, G. de, Stanulla, M., Locatelli, F., Basso, G., Niggli, F., Barisone, E., Henze, G., Ludwig, W.-D., Haas, O. A., Cazzaniga, G., Koehler, R., Silvestri, D., Bradtke, J., Parasole, R., Beier, R., van Dongen, J. J. M., Biondi, A., Schrappe, M. (2010). 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* 115/16, 3206–3214.
- [27] Schrappe, M., Möricke, A., Alten, J., Bleckmann, K., Meyer-Schell, K., Bauer, L., Zimmermann, M. (2015). AIEOP-BFM ALL 2009. Internationales kooperatives Behandlungsprotokoll für Kinder und Jugendliche mit akuter lymphoblastischer Leukämie. Fassung für BFM-Teilnehmerkliniken. Protokollversion 1.4.
- [28] Vora, A., Goulden, N., Wade, R., Mitchell, C., Hancock, J., Hough, R., Rowntree, C., Richards, S. (2013). Treatment reduction for children and young adults with low-risk acute lymphoblastic leukaemia defined by minimal residual disease (UKALL 2003): a randomised controlled trial. *The Lancet Oncology* 14/3, 199–209.
- [29] Cario, G., Rhein, P., Mitlöhner, R., Zimmermann, M., Bandapalli, O. R., Romey, R., Moericke, A., Ludwig, W.-D., Ratei, R., Muckenthaler, M. U., Kulozik, A. E., Schrappe, M., Stanulla, M., Karawajew, L. (2014). High CD45 surface expression determines relapse risk in children with precursor B-cell and T-cell acute lymphoblastic leukemia treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. *Haematologica* 99/1, 103–110.
- [30] Hammond, D., Sather, H., Nesbit, M., Miller, D., Coccia, P., Bleyer, A., Lukens, J., Siegel, S. (1986). Analysis of prognostic factors in acute lymphoblastic leukemia. *Medical and pediatric oncology* 14/3, 124–134.
- [31] Zhang, X., Rastogi, P., Shah, B., Zhang, L. (2017). B lymphoblastic leukemia/lymphoma: new insights into genetics, molecular aberrations, subclassification and targeted therapy. *Oncotarget* 8/39, 66728–66741.
- [32] Neveu, B., Caron, M., Lagacé, K., Richer, C., Sinnett, D. (2018). Genome wide mapping of ETV6 binding sites in pre-B leukemic cells. *Scientific reports* 8/1, 15526.
- [33] Shurtleff, S. A., Buijs, A., Behm, F. G., Rubnitz, J. E., Raimondi, S. C., Hancock, M. L., Chan, G. C., Pui, C. H., Grosveld, G., Downing, J. R. (1995). TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia* 9/12, 1985–1989.
- [34] Moorman, A. V., Ensor, H. M., Richards, S. M., Chilton, L., Schwab, C., Kinsey, S. E., Vora, A., Mitchell, C. D., Harrison, C. J. (2010). Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *The Lancet. Oncology* 11/5, 429–438.
- [35] Jeha, S., Pei, D., Raimondi, S. C., Onciu, M., Campana, D., Cheng, C., Sandlund, J. T., Ribeiro, R. C., Rubnitz, J. E., Howard, S. C., Downing, J. R., Evans, W. E., Relling, M. V., Pui, C.-H. (2009). Increased risk for CNS relapse in pre-B cell leukemia with the t(1;19)/TCF3-PBX1. *Leukemia* 23/8, 1406–1409.

- [36] Rubnitz, J. E., Look, A. T. (1998). Molecular genetics of childhood leukemias. *Journal of pediatric hematology/oncology* 20/1, 1–11.
- [37] Pui, C. H., Crist, W. M., Look, A. T. (1990). Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 76/8, 1449–1463.
- [38] Marschalek, R. (2015). MLL leukemia and future treatment strategies. *Archiv der Pharmazie* 348/4, 221–228.
- [39] Iacobucci, I., Mullighan, C. G. (2017). Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 35/9, 975–983.
- [40] Nachman, J. B., Heerema, N. A., Sather, H., Camitta, B., Forestier, E., Harrison, C. J., Dastugue, N., Schrappe, M., Pui, C.-H., Basso, G., Silverman, L. B., Janka-Schaub, G. E. (2007). Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 110/4, 1112–1115.
- [41] Heerema, N. A., Nachman, J. B., Sather, H. N., Sensel, M. G., Lee, M. K., Hutchinson, R., Lange, B. J., Steinherz, P. G., Bostrom, B., Gaynon, P. S., Uckun, F. (1999). Hypodiploidy with less than 45 chromosomes confers adverse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the children's cancer group. *Blood* 94/12, 4036–4045.
- [42] Mullighan, C. G. (2012). Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of clinical investigation* 122/10, 3407–3415.
- [43] Pui, C.-H., Carroll, W. L., Meshinchi, S., Arceci, R. J. (2011). Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29/5, 551–565.
- [44] Biondi, A., Schrappe, M., Lorenzo, P. de, Castor, A., Lucchini, G., Gandemer, V., Pieters, R., Stary, J., Escherich, G., Campbell, M., Li, C.-K., Vora, A., Aricò, M., Röttgers, S., Saha, V., Valsecchi, M. G. (2012). Imatinib after induction for treatment of children and adolescents with Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia (EsPhALL): a randomised, open-label, intergroup study. *The Lancet Oncology* 13/9, 936–945.
- [45] Madhusoodhan, P. P., Carroll, W. L., Bhatla, T. (2016). Progress and Prospects in Pediatric Leukemia. *Current problems in pediatric and adolescent health care* 46/7, 229–241.
- [46] Lilljebjörn, H., Henningsson, R., Hyrenius-Wittsten, A., Olsson, L., Orsmark-Pietras, C., Palffy, S. von, Askmyr, M., Rissler, M., Schrappe, M., Cario, G., Castor, A., Pronk, C. J. H., Behrendtz, M., Mitelman, F., Johansson, B., Paulsson, K., Andersson, A. K., Fontes, M., Fioretos, T. (2016). Identification of ETV6-RUNX1-like and DUX4-rearranged subtypes in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature communications* 7, 11790.
- [47] Tanaka, Y., Kawazu, M., Yasuda, T., Tamura, M., Hayakawa, F., Kojima, S., Ueno, T., Kiyoi, H., Naoe, T., Mano, H. (2018). Transcriptional activities of DUX4 fusions in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 103/11, e522-e526.
- [48] Yasuda, T., Tsuzuki, S., Kawazu, M., Hayakawa, F., Kojima, S., Ueno, T., Imoto, N., Kohsaka, S., Kunita, A., Doi, K., Sakura, T., Yujiri, T., Kondo, E., Fujimaki, K., Ueda, Y., Aoyama, Y., Ohtake, S., Takita, J., Sai, E., Taniwaki, M., Kurokawa, M., Morishita, S.,

- Fukayama, M., Kiyoi, H., Miyazaki, Y., Naoe, T., Mano, H. (2016). Recurrent DUX4 fusions in B cell acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults. *Nature genetics* 48/5, 569–574.
- [49] Zeng, W., Greef, J. C. de, Chen, Y.-Y., Chien, R., Kong, X., Gregson, H. C., Winokur, S. T., Pyle, A., Robertson, K. D., Schmiesing, J. A., Kimonis, V. E., Balog, J., Frants, R. R., Ball, A. R., Lock, L. F., Donovan, P. J., van der Maarel, S. M., Yokomori, K. (2009). Specific loss of histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1gamma/cohesin binding at D4Z4 repeats is associated with facioscapulohumeral dystrophy (FSHD). *PLoS genetics* 5/7, e1000559.
- [50] Hendrickson, P. G., Doráis, J. A., Grow, E. J., Whiddon, J. L., Lim, J.-W., Wike, C. L., Weaver, B. D., Pflueger, C., Emery, B. R., Wilcox, A. L., Nix, D. A., Peterson, C. M., Tapscott, S. J., Carrell, D. T., Cairns, B. R. (2017). Conserved roles of mouse DUX and human DUX4 in activating cleavage-stage genes and MERV1/HERV1 retrotransposons. *Nature genetics* 49/6, 925–934.
- [51] Wallace, L. M., Garwick, S. E., Mei, W., Belayew, A., Coppee, F., Ladner, K. J., Guttridge, D., Yang, J., Harper, S. Q. (2011). DUX4, a candidate gene for facioscapulohumeral muscular dystrophy, causes p53-dependent myopathy in vivo. *Annals of neurology* 69/3, 540–552.
- [52] Geng, L. N., Yao, Z., Snider, L., Fong, A. P., Cech, J. N., Young, J. M., van der Maarel, S. M., Ruzzo, W. L., Gentleman, R. C., Tawil, R., Tapscott, S. J. (2012). DUX4 activates germline genes, retroelements, and immune mediators: implications for facioscapulohumeral dystrophy. *Developmental cell* 22/1, 38–51.
- [53] Dixit, M., Ansseau, E., Tassin, A., Winokur, S., Shi, R., Qian, H., Sauvage, S., Mattéotti, C., van Acker, A. M., Leo, O., Figlewicz, D., Barro, M., Laoudj-Chenivresse, D., Belayew, A., Coppée, F., Chen, Y.-W. (2007). DUX4, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy, encodes a transcriptional activator of PITX1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104/46, 18157–18162.
- [54] Tian, L., Shao, Y., Nance, S., Dang, J., Xu, B., Ma, X., Li, Y., Ju, B., Dong, L., Newman, S., Zhou, X., Schreiner, P., Tseng, E., Hon, T., Ashby, M., Li, C., Easton, J., Gruber, T. A., Zhang, J. (2019). Long-read sequencing unveils *IGH-DUX4* translocation into the silenced IGH allele in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature communications* 10/1, 2789.
- [55] Lilljebjörn, H., Fioretos, T. (2017). New oncogenic subtypes in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 130/12, 1395–1401.
- [56] Dong, X., Zhang, W., Wu, H., Huang, J., Zhang, M., Wang, P., Zhang, H., Chen, Z., Chen, S.-J., Meng, G. (2018). Structural basis of DUX4/IGH-driven transactivation. *Leukemia* 32/6, 1466–1476.
- [57] Liu, Y.-F., Wang, B.-Y., Zhang, W.-N., Huang, J.-Y., Li, B.-S., Zhang, M., Jiang, L., Li, J.-F., Wang, M.-J., Dai, Y.-J., Zhang, Z.-G., Wang, Q., Kong, J., Chen, B., Zhu, Y.-M., Weng, X.-Q., Shen, Z.-X., Li, J.-M., Wang, J., Yan, X.-J., Li, Y., Liang, Y.-M., Liu, L., Chen, X.-Q., Zhang, W.-G., Yan, J.-S., Hu, J.-D., Shen, S.-H., Chen, J., Gu, L.-J., Pei, D., Li, Y., Wu, G., Zhou, X., Ren, R.-B., Cheng, C., Yang, J. J., Wang, K.-K., Wang, S.-Y., Zhang, J., Mi, J.-Q., Pui, C.-H., Tang, J.-Y., Chen, Z., Chen, S.-J. (2016). Genomic Profiling of Adult and Pediatric B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *EBioMedicine* 8, 173–183.
- [58] Zhang, J., McCastlain, K., Yoshihara, H., Xu, B., Chang, Y., Churchman, M. L., Wu, G., Li, Y., Wei, L., Iacobucci, I., Liu, Y., Qu, C., Wen, J., Edmonson, M., Payne-Turner, D.,

- Kaufmann, K. B., Takayanagi, S.-I., Wienholds, E., Waanders, E., Ntziachristos, P., Bakogianni, S., Wang, J., Aifantis, I., Roberts, K. G., Ma, J., Song, G., Easton, J., Mulder, H. L., Chen, X., Newman, S., Ma, X., Rusch, M., Gupta, P., Boggs, K., Vadodaria, B., Dalton, J., Liu, Y., Valentine, M. L., Ding, L., Lu, C., Fulton, R. S., Fulton, L., Tabib, Y., Ochoa, K., Devidas, M., Pei, D., Cheng, C., Yang, J., Evans, W. E., Relling, M. V., Pui, C.-H., Jeha, S., Harvey, R. C., Chen, I.-M. L., Willman, C. L., Marcucci, G., Bloomfield, C. D., Kohlschmidt, J., Mrózek, K., Paietta, E., Tallman, M. S., Stock, W., Foster, M. C., Racevskis, J., Rowe, J. M., Luger, S., Kornblau, S. M., Shurtleff, S. A., Raimondi, S. C., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Dick, J. E., Hunger, S. P., Loh, M. L., Downing, J. R., Mullighan, C. G. (2016). Deregulation of DUX4 and ERG in acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics* 48/12, 1481–1489.
- [59] Mullighan, C. G., Su, X., Zhang, J., Radtke, I., Phillips, L. A. A., Miller, C. B., Ma, J., Liu, W., Cheng, C., Schulman, B. A., Harvey, R. C., Chen, I.-M., Clifford, R. J., Carroll, W. L., Reaman, G., Bowman, W. P., Devidas, M., Gerhard, D. S., Yang, W., Relling, M. V., Shurtleff, S. A., Campana, D., Borowitz, M. J., Pui, C.-H., Smith, M., Hunger, S. P., Willman, C. L., Downing, J. R. (2009). Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *The New England journal of medicine* 360/5, 470–480.
- [60] Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., Myrtek, D. (2014). Zellseparation. In: *Der Experimentator: Immunologie*, 4. Aufl. Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., Myrtek, D. (Hrsg.). Springer Spektrum, Berlin, 51–72.
- [61] Mülhardt, C. (2009). *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*, 6. Aufl. Spektrum Akad. Verl.; Springer, Heidelberg.
- [62] Ableitner, O. (2018). *Einführung in die Molekularbiologie*. Springer Fachmedien Wiesbaden, Wiesbaden.
- [63] Modrow, J.-H. (2014). *Entwicklung molekularbiologischer Methoden und Aufbau einer Datenbank zur Identitäts-, Mischlings und Abstammungsanalyse ausgewählter Tierarten*. Med. Diss., Kiel.
- [64] Müller, H.-J., Prange, D. R. (2016). Long-Distance PCR. In: *PCR - Polymerase-Kettenreaktion*, 2. Aufl. Müller, H.-J., Prange, D. R. (Hrsg.). Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 111–113.
- [65] Lilljebjörn, H., Orsmark-Pietras, C., Rissler, M., Castor, A., Schrappe, M., Cario, G., Fioretos, T. (2016). Detection of *IGH-DUX4* Rearrangement in BCP-ALL by a Genomic PCR Assay. Accepted as a poster presentation at the 58th ASH Annual Meeting and Exposition. San Diego, California. (retracted by the authors as an oral presentation was intended).
- [66] QIAGEN (2019). QIAxcel Advanced System.
https://www.qiagen.com/us/products/instruments-and-automation/quality-control-fragment-analysis/qiaxcel-advanced-system/?cmpid=PC_WEB_instrumentation_SEA_GA_qiaxcel-brand&kwid=qiaxcel&gclid=CjwKCAjwx_boBRA9EiwA4kIELuiVqrbk1i7SAPgsgH1VfsSK eN9BfoABWM5H7acn2r-NIokwWNO2PBoCQpQQA vD_BwE&clear=true#orderinginformation (letzter Zugriff am 4.7.2019).
- [67] Schrappe, M., Valsecchi, M. G., Bartram, C. R., Schrauder, A., Panzer-Grümayer, R., Möricke, A., Parasole, R., Zimmermann, M., Dworzak, M., Buldini, B., Reiter, A., Basso, G., Klingebiel, T., Messina, C., Ratei, R., Cazzaniga, G., Koehler, R., Locatelli, F., Schäfer,

- B. W., Aricò, M., Welte, K., van Dongen, J. J. M., Gadner, H., Biondi, A., Conter, V. (2011). Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. *Blood* 118/8, 2077–2084.
- [68] Möricke, A., Zimmermann, M., Valsecchi, M. G., Stanulla, M., Biondi, A., Mann, G., Locatelli, F., Cazzaniga, G., Niggli, F., Aricò, M., Bartram, C. R., Attarbaschi, A., Silvestri, D., Beier, R., Basso, G., Ratei, R., Kulozik, A. E., Lo Nigro, L., Kremens, B., Greiner, J., Parasole, R., Harbott, J., Caruso, R., Stackelberg, A. von, Barisone, E., Rössig, C., Conter, V., Schrappe, M. (2016). Dexamethasone vs prednisone in induction treatment of pediatric ALL: results of the randomized trial AIEOP-BFM ALL 2000. *Blood* 127/17, 2101–2112.
- [69] Essig, S., Li, Q., Chen, Y., Hitzler, J., Leisenring, W., Greenberg, M., Sklar, C., Hudson, M. M., Armstrong, G. T., Krull, K. R., Neglia, J. P., Oeffinger, K. C., Robison, L. L., Kuehni, C. E., Yasui, Y., Nathan, P. C. (2014). Risk of late effects of treatment in children newly diagnosed with standard-risk acute lymphoblastic leukaemia: a report from the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *The Lancet Oncology* 15/8, 841–851.
- [70] Lund, B., Åsberg, A., Heyman, M., Kanerva, J., Harila-Saari, A., Hasle, H., Söderhäll, S., Jónsson, Ó. G., Lydersen, S., Schmiegelow, K. (2011). Risk factors for treatment related mortality in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pediatric blood & cancer* 56/4, 551–559.
- [71] Oeffinger, K. C., Mertens, A. C., Sklar, C. A., Kawashima, T., Hudson, M. M., Meadows, A. T., Friedman, D. L., Marina, N., Hobbie, W., Kadan-Lottick, N. S., Schwartz, C. L., Leisenring, W., Robison, L. L. (2006). Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *The New England journal of medicine* 355/15, 1572–1582.
- [72] Golub, T. R., Slonim, D. K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J. P., Coller, H., Loh, M. L., Downing, J. R., Caligiuri, M. A., Bloomfield, C. D., Lander, E. S. (1999). Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science (New York, N.Y.)* 286/5439, 531–537.
- [73] Lugthart, S., Cheok, M. H., den Boer, M. L., Yang, W., Holleman, A., Cheng, C., Pui, C.-H., Relling, M. V., Janka-Schaub, G. E., Pieters, R., Evans, W. E. (2005). Identification of genes associated with chemotherapy crossresistance and treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer cell* 7/4, 375–386.
- [74] Moorman, A. V., Richards, S. M., Robinson, H. M., Strefford, J. C., Gibson, B. E. S., Kinsey, S. E., Eden, T. O. B., Vora, A. J., Mitchell, C. D., Harrison, C. J. (2007). Prognosis of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21). *Blood* 109/6, 2327–2330.
- [75] Gu, Z., Churchman, M. L., Roberts, K. G., Moore, I., Zhou, X., Nakitandwe, J., Hagiwara, K., Pelletier, S., Gingras, S., Berns, H., Payne-Turner, D., Hill, A., Iacobucci, I., Shi, L., Pounds, S., Cheng, C., Pei, D., Qu, C., Newman, S., Devidas, M., Dai, Y., Reshmi, S. C., Gastier-Foster, J., Raetz, E. A., Borowitz, M. J., Wood, B. L., Carroll, W. L., Zweidler-McKay, P. A., Rabin, K. R., Mattano, L. A., Maloney, K. W., Rambaldi, A., Spinelli, O., Radich, J. P., Minden, M. D., Rowe, J. M., Luger, S., Litzow, M. R., Tallman, M. S., Racevskis, J., Zhang, Y., Bhatia, R., Kohlschmidt, J., Mrózek, K., Bloomfield, C. D., Stock, W., Kornblau, S., Kantarjian, H. M., Konopleva, M., Evans, W. E., Jeha, S., Pui, C.-H., Yang, J., Paietta, E., Downing, J. R., Relling, M. V., Zhang, J., Loh, M. L., Hunger, S. P., Mullighan, C. G. (2019). PAX5-driven subtypes of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics* 51/2, 296–307.

- [76] Mohseni, M., Uludag, H., Brandwein, J. M. (2018). Advances in biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL) and therapeutic implications. *American Journal of Blood Research* 8/4, 29–56.
- [77] Pui, C.-H., Yang, J. J., Hunger, S. P., Pieters, R., Schrappe, M., Biondi, A., Vora, A., Baruchel, A., Silverman, L. B., Schmiegelow, K., Escherich, G., Horibe, K., Benoit, Y. C. M., Izraeli, S., Yeoh, A. E. J., Liang, D.-C., Downing, J. R., Evans, W. E., Relling, M. V., Mullighan, C. G. (2015). Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33/27, 2938–2948.
- [78] Mullighan, C. G. (2019). How advanced are we in targeting novel subtypes of ALL? Best practice & research. *Clinical haematology* 32/4, 101095.
- [79] Schrappe, M., Zimmermann, M., Valsecchi, M. G., Möricke, A. (2018). AIEOP-BFM ALL 2017. International collaborative treatment protocol for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. A randomized phase III study conducted by the AIEOP-BFM study group.
- [80] Fischer, U., Forster, M., Rinaldi, A., Risch, T., Sungalee, S., Warnatz, H.-J., Bornhauser, B., Gombert, M., Kratsch, C., Stütz, A. M., Sultan, M., Tchinda, J., Worth, C. L., Amstislavskiy, V., Badarinarayan, N., Baruchel, A., Bartram, T., Basso, G., Canpolat, C., Cario, G., Cavé, H., Dakaj, D., Delorenzi, M., Dobay, M. P., Eckert, C., Ellinghaus, E., Eugster, S., Frismantas, V., Ginzl, S., Haas, O. A., Heidenreich, O., Hemmrich-Stanisak, G., Hezaveh, K., Höll, J. I., Hornhardt, S., Husemann, P., Kachroo, P., Kratz, C. P., Te Kronnie, G., Marovca, B., Niggli, F., McHardy, A. C., Moorman, A. V., Panzer-Grümayer, R., Petersen, B. S., Raeder, B., Ralser, M., Rosenstiel, P., Schäfer, D., Schrappe, M., Schreiber, S., Schütte, M., Stade, B., Thiele, R., Weid, N. von der, Vora, A., Zaliouva, M., Zhang, L., Zichner, T., Zimmermann, M., Lehrach, H., Borkhardt, A., Bourquin, J.-P., Franke, A., Korb, J. O., Stanulla, M., Yaspo, M.-L. (2015). Genomics and drug profiling of fatal TCF3-HLF-positive acute lymphoblastic leukemia identifies recurrent mutation patterns and therapeutic options. *Nature genetics* 47/9, 1020–1029.
- [81] Stanulla, M., Dagdan, E., Zaliouva, M., Möricke, A., Palmi, C., Cazzaniga, G., Eckert, C., Te Kronnie, G., Bourquin, J.-P., Bornhauser, B., Koehler, R., Bartram, C. R., Ludwig, W.-D., Bleckmann, K., Groeneveld-Krentz, S., Schewe, D., Junk, S. V., Hinze, L., Klein, N., Kratz, C. P., Biondi, A., Borkhardt, A., Kulozik, A., Muckenthaler, M. U., Basso, G., Valsecchi, M. G., Izraeli, S., Petersen, B.-S., Franke, A., Dörge, P., Steinemann, D., Haas, O. A., Panzer-Grümayer, R., Cavé, H., Houlston, R. S., Cario, G., Schrappe, M., Zimmermann, M. (2018). IKZF1plus Defines a New Minimal Residual Disease-Dependent Very-Poor Prognostic Profile in Pediatric B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 36/12, 1240–1249.
- [82] Izraeli, S. (2016). Deciphering "B-others": Novel fusion genes driving B-cell acute lymphoblastic leukemia. *EBioMedicine* 8, 8–9.
- [83] Tasian, S. K., Loh, M. L., Hunger, S. P. (2017). Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 130/19, 2064–2072.
- [84] Boer, J. M., Steeghs, E. M. P., Marchante, J. R. M., Boeree, A., Beaudoin, J. J., Beverloo, H. B., Kuiper, R. P., Escherich, G., van der Velden, V. H. J., van der Schoot, C. E., Groot-Kruseman, H. A. de, Pieters, R., den Boer, M. L. (2017). Tyrosine kinase fusion genes in pediatric BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget* 8/3, 4618–4628.

- [85] Nordlund, J., Marincevic-Zuniga, Y., Cavelier, L., Raine, A., Martin, T., Lundmark, A., Abrahamsson, J., Norén-Nyström, U., Lönnerholm, G., Syvänen, A.-C. (2020). Refined detection and phasing of structural aberrations in pediatric acute lymphoblastic leukemia by linked-read whole-genome sequencing. *Scientific reports* 10/1, 2512.
- [86] Schwab, C., Harrison, C. J. (2018). Advances in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Genomics. *HemaSphere* 2/4, e53.
- [87] Zaliouva, M., Potuckova, E., Hovorkova, L., Musilova, A., Winkowska, L., Fiser, K., Stuchly, J., Mejstrikova, E., Starkova, J., Zuna, J., Sary, J., Trka, J. (2019). ERG deletions in childhood acute lymphoblastic leukemia with DUX4 rearrangements are mostly polyclonal, prognostically relevant and their detection rate strongly depends on screening method sensitivity. *Haematologica* 104/7, 1407–1416.
- [88] Schumich, A., Zaliouva, M., Fortschegger, K., Nebral, K., Attarbaschi, A., Fiser, K., Kauer, M. O., Popitsch, N., Haslinger, S., Inthal, A., Buldini, B., Basso, G., Bourquin, J.-P., Gaipa, G., Brüggemann, M., Feuerstein, T., Maurer-Granofszky, M., Panzer-Grümayer, R., Trka, J., Mann, G., Haas, O. A., Hrusak, O., Dworzak, M. N., Strehl, S. (2019). CD371 cell surface expression: a unique feature of DUX4-rearranged acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 104/8, e352-5.
- [89] Li, J.-F., Dai, Y.-T., Lilljebjörn, H., Shen, S.-H., Cui, B.-W., Bai, L., Liu, Y.-F., Qian, M.-X., Kubota, Y., Kiyoi, H., Matsumura, I., Miyazaki, Y., Olsson, L., Tan, A. M., Ariffin, H., Chen, J., Takita, J., Yasuda, T., Mano, H., Johansson, B., Yang, J. J., Yeoh, A. E.-J., Hayakawa, F., Chen, Z., Pui, C.-H., Fioretos, T., Chen, S.-J., Huang, J.-Y. (2018). Transcriptional landscape of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia based on an international study of 1,223 cases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115/50, E11711-E11720.
- [90] Marincevic-Zuniga, Y., Dahlberg, J., Nilsson, S., Raine, A., Nystedt, S., Lindqvist, C. M., Berglund, E. C., Abrahamsson, J., Cavelier, L., Forestier, E., Heyman, M., Lönnerholm, G., Nordlund, J., Syvänen, A.-C. (2017). Transcriptome sequencing in pediatric acute lymphoblastic leukemia identifies fusion genes associated with distinct DNA methylation profiles. *Journal of hematology & oncology* 10/1, 148.
- [91] Pui, C.-H., Robison, L. L., Look, A. T. (2008). Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet* 371/9617, 1030–1043.
- [92] Zaliouva, M., Zimmermannova, O., Dörge, P., Eckert, C., Möricke, A., Zimmermann, M., Stuchly, J., Teigler-Schlegel, A., Meissner, B., Koehler, R., Bartram, C. R., Karawajew, L., Rhein, P., Zuna, J., Schrappe, M., Cario, G., Stanulla, M. (2014). ERG deletion is associated with CD2 and attenuates the negative impact of IKZF1 deletion in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 28/1, 182–185.

DANKSAGUNG

Ich danke vielmals meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Gunnar Cario für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, die exzellente Betreuung und die Korrektur der Dissertation.

Frau Birthe Fedders danke ich für das Einführen in das laborexperimentelle Arbeiten und die vielseitige Hilfe im Laufe des gesamten Projektes.

Bei Herrn Dr. Martin Zimmermann bedanke ich mich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Herrn Prof. Dr. med. Martin Schrappe danke ich für die Möglichkeit zur Verrichtung dieser Arbeit.

Allen Labormitgliedern des ALL-Studienlabors Kiel danke ich für die freundliche Aufnahme und das angenehme Arbeitsklima. Fotini Vogiatzi und Lennart Lenk danke ich hierbei speziell für die Unterstützung bei der Vorbereitung des Vortrages für die 32. Kind-Philipp-Tagung in Wilsede.

Ebenfalls bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mich auf so vielen Weisen unterstützt haben und ohne die mein Weg zum Medizinstudium und dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Auch meiner Schwester möchte ich sehr herzlich für die gemeinsame Überarbeitung der Dissertationsschrift danken.

VERÖFFENTLICHUNG

Müller, J., Fedders, B., Lilljebjörn, H., Fioretos, T., Möricke, A., Stannulla, M., Schewe, D., Zimmermann, M., Schrappe, M., Cario, G. (2019). Stratification and prognosis of *IGH-DUX4* positive acute lymphoblastic leukemia in children. In: 32. Jahrestag der Kind-Philipp-Stiftung für pädiatrisch onkologische Forschung. Georg Thieme Verlag KG.