

Julia Seemann
Dr. med.

Untersuchung einer Patientenkohorte mit T-ALL im Kindesalter auf Kopienzahlveränderungen in ausgewählten Genen und Korrelation mit Therapieansprechen und Prognose

Fach/Einrichtung: Kinderheilkunde
Doktorvater: Prof. Dr. med. Andreas Kulozik, PhD

Die ALL ist die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter. 10-15% dieser jungen Leukämiepatienten leiden an einer T-ALL, welche auf einer malignen Transformation der T-Progenitorzellen beruht (Ferrando *et al.*, 2002). Dank intensiver Chemotherapien, die über die letzten Jahrzehnte stetig verbessert wurden, können heutzutage ungefähr 80% der pädiatrischen Patienten mit T-ALL dauerhaft geheilt werden (Pui *et al.*, 2008). Jedoch weisen Rezidive häufig Therapieresistenzen auf und gehen mit hohen Sterberaten von bis zu 70% einher (Einsiedel *et al.*, 2005; Gaynon *et al.*, 2006; Henze *et al.*, 1991; Herold *et al.*, 2004; Parker *et al.*, 2010).

Im Gegensatz zur pB-Zell ALL, bei der schon verschiedene klinische und genetische Faktoren, wie z.B. das *BCR-ABL* Fusionsgen (Nagarajan, 1995), als Biomarker für eine frühe Risikostratifizierung benutzt werden, gibt es bei der T-ALL keine genetischen Marker, die eine Risikostratifizierung erlauben. Bis dato lässt sich das Rezidivrisiko nur durch das klinische Therapieansprechen vorhersagen, das erst nach der Induktionstherapie deutlich wird. Deshalb ist es von großem Interesse molekulargenetische Biomarker zu finden, die das Rezidivrisiko beeinflussen und somit schon zum Zeitpunkt der Diagnose für die Risikostratifizierung zur Verfügung stehen.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Patientenkohorte auf CNA in den Genen *STAT5B*, *CNOT3* und *CNOT6*, *CTCF*, *ABCA5*, *PDGFRB*, *MYC*, *PTK2B* und *AKT1* zu untersuchen, um deren prognostische Relevanz herauszufinden. Von besonderem Interesse hierbei waren rezidivspezifische Alterationen und rekurrente Kombinationen der verschiedenen Gene.

Zusätzlich wurden nachgewiesene genetische Signaturen mit klinischen Parametern und häufigen Mutationen, wie z.B. *NOTCH1*, korreliert. Zum Schluss wurden diese Ergebnisse mit Follow-up Daten assoziiert, um herauszufinden, ob diese CNA als Marker für eine zukünftige Risikostratifizierung in der T-ALL benutzt werden können.

Es wurde eine Patientenkohorte, bestehend aus 382 jungen Patienten mit T-ALL als Ersterkrankung und 66 T-ALL Rezidive, mittels MLPA auf Amplifikationen und Deletionen der Gene *STAT5B*, *CNOT3* und *CNOT6*, *CTCF*, *ABCA5*, *PDGFRB*, *MYC*, *PTK2B* und *AKT1* untersucht.

Dafür wurden 18 eigene Sonden hergestellt (2 Sonden pro Gen), die zusammen mit den Referenzsonden des SALSA MLPA P200-A1/B1 Mix eingesetzt wurden.

Zu Beginn wurden die beiden Methoden der MLPA und der zielgerichteten Sequenzierung anhand von 80 parallel untersuchten DNA-Proben (53 T-ALL Ersterkrankung und 27 T-ALL

Rezidive) validiert. Beide Methoden zeigten eine hohe Übereinstimmung (Spezifität und Sensitivität > 95%) und eignen sich somit für den Nachweis von CNA. Als Goldstandard kann der Vergleich mit WES, aufgeführt im Supplement von (Richter-Pechanska *et al.*, 2017), angenommen werden.

Es ist festzuhalten, dass sowohl bei der MLPA als auch der zielgerichteten Sequenzierung nur einzelne Gene betrachtet werden können, die zu großen CNA gehören. Somit kann nicht zwischen T-ALL Driver Genen und Markern unterschieden werden, die nur co-amplifiziert oder co-deletiert vorliegen. Dennoch können diese Marker, möglicherweise auch in Kombination mit konventionellen Risikomarkern, zur Verbesserung der Risikostratifizierung bei der T-ALL beitragen.

Insgesamt zeigten 29% (128/448) der Patientenkohorte mindestens eine Amplifikation oder Deletion in den 9 Genen. Dabei war das *CTCF*-Gen (37/448=8.3%) am häufigsten deletiert und *MYC* (32/448=8.4%) am häufigsten amplifiziert.

Rezidiv-spezifische Amplifikationen konnten bei den Genen *ABCA5* und *STAT5B*, d.h. in der Region 17q11.2-24.3, nachgewiesen werden und somit die Ergebnisse von Richter-Pechanska *et al.*, 2017 bestätigen.

Bei dem Therapieansprechen konnte eine Korrelation mit einzelnen Genen gezeigt werden. Sowohl *PDGFRB*-Deletionen als auch *CNOT3*-Amplifikationen gehen mit einem ungünstigen MRD-Niveau an Tag 78 einher. Das Kriterium "Nachweis mindestens einer CNA in einem der 9 Gene" weist ebenfalls eine Korrelation mit einem ungünstigen MRD-Niveau an Tag 78 auf.

Die Gene einzeln betrachtet, zeigte keines in der gesamten Kohorte einen signifikanten Einfluss auf die Prognose. Erst in Kombination mit anderen Genen oder bei Betrachtung verschiedener Subgruppen konnten wichtige Ergebnisse erzielt werden. Der Nachweis von mindestens einer Amplifikation zeigte einen Trend ($p=0.14$) zu einer erhöhten pCIR von 0.18 im Vergleich zu einer pCIR von 0.11 bei Patienten ohne eine Amplifikation. In der MRD-HR Gruppe, bestehend aus Patienten mit einem ungünstigen MRD-Level an Tag 78 ($n=37$), ging dieses Kriterium mit einer signifikant ($p=0.005$) höheren Rezidivrate einher. Diese war wesentlich bedingt durch den ungünstigen Effekt der *CNOT3*-Amplifikationen (5 Rezidive bei 6 Patienten mit *CNOT3*-Amplifikationen in der MRD-HR-Gruppe, $p=0.02$).

In einer unabhängigen Validierungskohorte, bestehend aus 220 T-ALL Proben, konnten diese Ergebnisse zum Teil bestätigt werden. Es zeigte sich ein Trend zu einem erhöhten Rezidivrisiko ($p=0.08$) für Patienten mit einem Nachweis von mindestens einer Amplifikation in den 9 Genen. In der MRD-HR Gruppe jedoch konnte kein signifikantes Ergebnis erzielt werden, was auch an der geringen Anzahl der Rezidive in dieser Gruppe liegen könnte.

Insgesamt ergab sich aus dieser Arbeit somit der Befund, dass Kombinationen verschiedener CNA, insbesondere Amplifikationen, Signaturen für das Auftreten eines Rezidives darstellen können. Des Weiteren können möglicherweise 5q-Deletionen bei der T-ALL in Verbindung mit myeloischen Marker gebracht werden und spezifische Therapieoptionen eröffnen.