

**Aus der Universitätsklinik für Kinder – und Jugendmedizin  
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger**

**Quantifizierung der Minimalen Resterkrankung mittels RQ-PCR der Immunglobuline- und T-Zellrezeptor Rearrangements und deren prognostische Bedeutung für das rezidivfreie Überleben und die Immuntherapie bei Kindern mit Akuter lymphatischer Leukämie nach Stammzelltransplantation**

**Inaugural-Dissertation  
Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Catrin M. Well**

**aus**

**Starnberg**

**2007**

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. P. Bader

2. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. R. Möhle

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1 Synopsis der Akuten lymphatischen Leukämie</b> .....	<b>7</b>
<b>1.2 Synopsis der Stammzelltransplantation</b> .....	<b>9</b>
<b>1.3 Arten der Stammzelltransplantation</b> .....	<b>11</b>
1.3.1 Autologe Stammzelltransplantation .....	11
1.3.2 Allogene Stammzelltransplantation .....	12
<b>1.4 Komplikationen der Stammzelltransplantation</b> .....	<b>13</b>
1.4.1 Graft-Versus-Host-Disease und Graft-Versus-Leukemia Effekt .....	13
1.4.2 Abstoßung des Transplantats.....	15
1.4.3 Infektionen und Toxizität.....	15
<b>1.5 Rezidiv der Grunderkrankung nach Stammzelltransplantation und mögliche therapeutische Intervention</b> .....	<b>16</b>
<b>1.6 Minimale Resterkrankung</b> .....	<b>18</b>
1.6.1 Möglichkeiten des Monitorings der Minimalen Resterkrankung.....	18
1.6.1.1 Flow zytometrische Immunphänotypisierung.....	19
1.6.1.2 Chimärismusanalyse .....	19
<b>1.7 Immunglobulingene, T-Zellrezeptorgene und TAL-1 Gen als molekulare Marker für die Quantifizierung der Minimalen Resterkrankung</b> .....	<b>20</b>
1.7.1 Genloki der Immunglobulin und T-Zellrezeptorgene und des TAL-1 Locus.....	21
1.7.1.1 Immunglobuline .....	21
1.7.1.2 TCR-Rezeptoren .....	22
1.7.1.3 TAL-1 Gen.....	23
1.7.2 Somatische Rekombination.....	24
<b>1.8 Ziel dieser Arbeit</b> .....	<b>28</b>
<b>2. Material</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1 Kontaminationsschutzmaßnahmen</b> .....	<b>29</b>

<b>2.3 Technische Geräte .....</b>	<b>30</b>
<b>2.4 Pipettenspitzen .....</b>	<b>31</b>
<b>2.5 Lösungen und Puffer .....</b>	<b>32</b>
<b>2.6 Kits .....</b>	<b>33</b>
<b>2.7 Spezielle Molekulargenetische Reagenzien.....</b>	<b>33</b>
<b><u>3. Methoden</u> .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Übersicht der Methoden .....</b>	<b>35</b>
<b>3.2 Allgemeine Aufbereitung der Proben .....</b>	<b>36</b>
3.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen und deren Zählung .....	36
3.2.2 DNA-Extraktion.....	38
3.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	41
<b>3.3 Charakterisierung der leukämischen Blasten.....</b>	<b>42</b>
3.3.1 Identifizierung des RQ-PCR-Targets .....	42
3.3.1.1 Primerkollektiv .....	42
3.3.1.2 PCR der Targetidentifikation .....	46
3.3.1.2 Visualisierung der klonalen PCR Produkte.....	48
3.3.2 Sequenzanalyse der IgH, IgK $\delta$ TCR, $\gamma$ TCR und TAL-1 Targets und Identifikation des patientenspezifischen Rearrangements. ....	50
3.3.2.1 Grundprinzip der Sequenzierung.....	50
3.3.2.2 Direktsequenzierung aus dem Target-PCR-Ansatz.....	51
3.3.2.3 Sequenzierung nach Aufreinigung des Target-PCR-Ansatzes.....	53
3.3.2.4 PCR Bedingungen der Sequenzierreaktion.....	55
3.3.2.5 Fällung des Sequenzierproduktes .....	55
3.3.3 Sequenzierung der PCR Produkte im ABI™Prism 310 Genetic Analyzer .....	57
<b>3.4 Quantifizierung der Minimalen Resterkrankung mittels Real-time-PCR .....</b>	<b>57</b>
3.4.1 Grundprinzipien der Real-time-PCR.....	57
3.4.2 Patientenspezifische Primergenerierung.....	59
3.4.3 Sensitivitätstestung der Primer .....	59
3.4.3 RQ-PCR Bedingungen im ABI-Prism™ 7700 Sequence Detector System .....	61

<b>3.5 Analyse der Minimalen Resterkrankung .....</b>	<b>62</b>
<b>3.6 Strategische Kriterien der Target Auswahl .....</b>	<b>62</b>
<b><u>4. Patientenkollektiv .....</u></b>	<b>64</b>
<b><u>5. Ergebnisse .....</u></b>	<b>71</b>
<b>5.1 Allgemeiner Überblick der Patienten .....</b>	<b>71</b>
5.1.1 MRD Verteilung des Patientenkollektivs .....	71
5.1.2 Klinischer Zustand der Patienten innerhalb der MRD Gruppen .....	72
<b>5.2 Ereignisfreies (EFS) und rezidivfreies Überleben (RFS) in Abhängigkeit vom MRD Gesamtstatus .....</b>	<b>74</b>
<b>5.3 Bedeutung der MRD Messung in Regelmäßigen Zeitintervallen nach SZT .....</b>	<b>77</b>
5.3.1 Ereignisfreies (EFS) und rezidivfreies Überleben (RFS) in Abhängigkeit der MRD Last am Tag bis 45 nach SZT .....	79
5.3.2 Ereignisfreies (EFS) und rezidivfreies Überleben (RFS) in Abhängigkeit der MRD Last am Tag 46 – 75 nach SZT .....	81
5.3.3 Ereignisfreies (EFS) und rezidivfreies (RFS) Überleben in Abhängigkeit der MRD Last am Tag 76 – 110 nach SZT .....	83
5.3.4 Ereignisfreies (EFS) und rezidivfreies (RFS) Überleben in Abhängigkeit der MRD Last am Tag 160 – 250 nach SZT .....	85
5.3.5 Ereignisfreies (EFS) und rezidivfreies (RFS) Überleben in Abhängigkeit der MRD Last am Tag > 250 nach SZT .....	87
<b>5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse .....</b>	<b>89</b>
<b>5.5 Individuelle Dynamik der MRD Überwachung bei Patienten .....</b>	<b>92</b>
<b>5.6 Immuntherapie .....</b>	<b>95</b>
5.6.1 Einfluss der MRD Last auf das Ereignis- (EFS) und rezidivfreie Überleben (RFS) zum Zeitpunkt der Immuntherapie .....	96
<b>5.7 Allgemeine Transplantationsdaten .....</b>	<b>98</b>
<b><u>6. Diskussion .....</u></b>	<b>99</b>
<b>6.1 Allgemeines .....</b>	<b>97</b>
<b>6.2 Methoden .....</b>	<b>101</b>
6.2.1 Immunglobulin und T-Zellrezeptor Rearrangements als MRD Marker bei ALL .....	101
6.2.2 Stabilität der Rearrangements .....	102

<b>6.3 Minimale Resterkrankung.....</b>	<b>103</b>
6.3.1 MRD als prognostischer Parameter nach SZT .....	103
6.3.2 MRD als Parameter zum kontinuierlichen Monitoren nach SZT .....	105
<b>6.4 Bedeutung der MRD bei Initiierung einer Immuntherapie .....</b>	<b>108</b>
<b>6.5 Schlussfolgerung.....</b>	<b>109</b>
<b><u>7. Zusammenfassung der Arbeit.....</u></b>	<b>111</b>
<b><u>8. Literaturverzeichnis .....</u></b>	<b>113</b>
<b><u>9. Anhang.....</u></b>	<b>127</b>
<b>9.1 Abbildungsverzeichnis: .....</b>	<b>127</b>
<b>9.2 Tabellenverzeichnis: .....</b>	<b>129</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1 Synopsis der Akuten lymphatischen Leukämie**

Die ALL (Akute lymphatische Leukämie) gehört zu den häufigsten malignen Erkrankungen des Kindesalters. Sie beruht auf einer klonalen Expansion einer lymphopoetischen Vorläuferzelle im KM (Knochenmark). Intensive Forschung hat dazu geführt, dass heute 70% - 80% der Kinder mit ALL in dauerhafter Remission gehalten werden können <sup>(48,96,99,113,114)</sup>, in bis zu 98% der Fälle lässt sich durch intensive Chemotherapie eine erst Remission erzielen. Es bleibt jedoch ein Patientenkollektiv von 20% - 30%, dass trotz intensiver Therapie ein Rezidiv ihrer Grunderkrankung erleidet.

Die einfachste Klassifikation der ALL erfolgt durch die morphologische FAB-Klassifikation (French-American-British-Klassifikation) nach panoptischer Färbung der KM-Ausstriche, in FAB-L1 bis FAB-L3. Der FAB-L3 Typ entspricht dabei einer physiologischen Vorstufe der B-Zellen, die bereits zur Produktion von Oberflächenimmunglobulinen fähig ist. Weitere Klassifikationen sind die Immunphänotypische EGIL-Klassifikation (European Group for the Immunological Characterization of Leukemias) durch Anfärbung mit monoklonalen Antikörpern und anschließender Untersuchung im Durchflusszytometer, die zytochemische Untersuchung und der Nachweis von genetischen Aberrationen. Die EGIL-Klassifikation ist insbesondere für die Subtypbestimmung der ALL von Bedeutung, aus der sich prognostische Parameter ergeben. Eine kleine Übersicht soll Tabelle 1 geben.

EGIL Klassifikation	Häufig Oberflächenmarker	FAB- Typ	Häufige Translokationen und ihre Fusionsgene
<b>B-Linien ALL</b>	Allg. CD 19, CD 79a, CD 22		
<b>Pro-B-ALL</b>	Keine weiteren B-Zellmarker	L1, L2	t(4;11) → AF4-MLL
<b>Common-ALL</b>	CD 10+	L1, L2	t(12;21) → TEL-AML1
<b>Pre-B-ALL</b>	+ für zytoplasmatisches IgM	L1, L2	t( 1;19) → E2A-PBX1
<b>Reife-B-ALL</b>	K XX, λ+	L3	t( 8;14) → c-myc
<b>T-Linien ALL</b>	Allg. CD 3+, CD 34-		Allg. t( 11;14) → TTG1-TTG2 t(1;14) → TAL1/SCL-TCL5
<b>Pro-T-ALL</b>	CD 7+	L1,L2	
<b>Pre-T-ALL</b>	CD2+, CD5+, CD8+	L1,L2	
<b>Kortikale T-ALL</b>	CD1a+	L1,L2	
<b>Reife-T-ALL</b>	CD3+, CD1a-	L3	
<b>α/β+ ALL</b>	Anti-TCR α/βpos.		
<b>λδ + ALL</b>	Anti-TCR γ/δpos.		
<b>ALL mit Nachweis myeloischer Marker</b>	CD 33, CD 13, CD 117, CD41		T(9;22) → BCR-ABL

**Tabelle 1:** Vereinfachte Darstellung der Klassifikation der ALL. Die EGIL-Klassifikation ergibt sich aus dem Nachweis typischer Oberflächenmarker, die mit dem Differenzierungsgrad korrelieren und für die Subtypbestimmung von Bedeutung sind. Zusätzlich besteht ein gewisser Zusammenhang zur rein morphologischen Beurteilung nach der FAB-Klassifikation. Zusätzlich sind häufig nachweisbare Translokationen der einzelnen ALL Subtypen aufgeführt, die jedoch nicht Subtyp spezifisch sind. ALL= Akute lymphatische Leukämie, EGIL= European Group for Immunological Characterization of Leukemias, FAB= French-American-British Classification, CD= Cluster of Differentiation, TCR= T-Zellrezeptor, IgM= Immunglobulin M, c-myc= cellular myelocytomatosis LG 24 oncogene, AF4-MLL= AF4 translocated to myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia drosophila trithorax homolog, TEL-AML1 = ETV6 ets variant gene 6 to acute myeloid leukemia 1, E2A-PBX1= transcription factor 3 to pre-B-cell leukemia transcription factor 1, TTG1= rohmbotin 1, TTG2= rohmbotin 2, TAL1/SCL-TCL5 = T-cell acute lymphocytic leukemia 1, BCR-ABL= breakpoint cluster region to v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1.

Die primäre Therapie der ALL umfaßt meist eine drei Stufen Therapie aus Induktionsphase, Konsolidierungsphase und Erhaltungsphase von bis zu drei Jahren. Gemäß dem ALL-BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) Protokoll 2000 sollte die Erhaltungstherapie über 24 Monate mit MTX und MP (= Methotrexat, 6-Mercaptopurin) durchgeführt werden. Weiterhin sollte für diese Zeit auch eine Pneumocystis carinii Prophylaxe mit z.B. Cotrimoxazol erfolgen. Die prophylaktische ZNS-Bestrahlung mit 1,5 Gy/d (Gray pro Tag) bis zur Kumulativdosis von 12 Gy ist nur noch bei Hochrisikopatienten oder bei T-ALL indiziert (ALL-BFM Protokoll 2000). Die Einteilung in Risikogruppen erfolgt z.B. durch den Nachweis von bestimmten chromosomalen Tanslokationen bzw. ihrer Fusionsgene (z.B. BCR-ABL- Gen, MLL-AF4-Gen, MYC-Gen, E2A-PBX1), dem Differenzierungsgrad der betroffenen Zelllinie, dem Ansprechen auf die

Prednison Monotherapie, sowie nach dem Alter, dem Geschlecht und der anfänglichen Leukozytenzahl. Je nach Risikogruppe erfolgt ein modifizierter Primäransatz der Therapie, die heute überwiegend in klinischen Spezialzentren gemäß dem ALL-BFM Protokoll durchgeführt wird.

Die genaue Pathogenese der ALL ist weitgehend ungeklärt. Häufig finden sich jedoch chromosomale Translokationen deren Fusionsgene zur Überexpression/Fehlexpression von Transkriptionsfaktoren führen <sup>(81)</sup>.

Eine besondere Gruppe scheinen dabei die homeobox Gene zu sein. Sie gehören zur Familie der Transkriptionsfaktoren und spielen innerhalb der Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen (SZ) eine große Rolle <sup>(22,91)</sup>. Bei einigen konnte eine enzymatische Aktivität direkt nachgewiesen werden, z.B. das BCR-ABL Fusionsgen führt zur Überexpression der Thyrosinkinase der Zellen. Die Folgen der genetischen Aberrationen stellen z.B. die Dysregulation der Proliferation der SZ (Stammzelle), Differenzierungsstörungen der SZ oder Fehlregulationen der Apoptose dar. Diese onkogenetischen chromosomalen Translokationen zusammen mit weiteren onkogenetischen Mutation wie z.B. im FLT-3 Rezeptor oder p53 Signaltransduktionsweg tragen entscheidend zur Pathogenese der ALL bei <sup>(48,81,94,95,97,104,106)</sup>.

## **1.2 Synopsis der Stammzelltransplantation**

Die Übertragung hämatopoetischer und immunologischer SZ (Stammzellen) wird als SZT (Stammzelltransplantation) bezeichnet. Früher wurde der Begriff der Knochmarkstransplantation geprägt, da traditionell die SZ aus dem Beckenkamm oder seltener dem Sternum der Spenderperson gewonnen wurden. Heutzutage wird eher von SZT gesprochen, da zunehmend die SZ per Leukapherese nach vorheriger Stimulation des Spenders mit G-CSF (Granulozyten-Colony Stimulating Factor) und gelegentlich auch durch anschließende Anreicherung der CD 34+ (= SZ) Zellen gewonnen werden.

Die SZT ist mittlerweile zu einem etablierten Therapieschema für eine Reihe maligner und nicht-maligner Erkrankungen geworden, insbesondere bei Leukämien und Myelodysplastischen Syndromen. Seltener erfolgt eine SZT auf Grund solider Tumoren, Lymphomen oder kongenitalen Anämien, Immunmangelsyndromen und Stoffwechselerkrankungen

(z.B. Thalassämie, Fanconi-Syndrom, Wiskott-Aldrich-Syndrom, metachromatischer Leukodystrophie und schwere aplastische Anämie) <sup>(4)</sup>.

Die ersten Versuche zur SZT wurden in den 50´er Jahren an Nagetieren durchgeführt. Nach der Bestrahlung der Tiere erfolgte eine Übertragung von KM (Knochenmark) <sup>(82)</sup>. Die ersten Versuche am Menschen erfolgten in den 70´er und 80´er Jahren durch die Arbeitsgruppe um Thomas, E.D <sup>(127)</sup>, der für seine Arbeit mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde. Es gibt jedoch auch einen Fallbericht von einem Patienten mit aplastischer Anämie, der durch tägliche Infusion von KM und Transfusionen seines Bruders behandelt wurde, der in das Jahr 1939 zurück datiert <sup>(89)</sup>. Ein bedeutender Schritt auf dem Gebiet der SZT war die Entdeckung des HLA-Komplexes (Human leukocyte antigen system), seiner Vielfältigkeit, Vererbung und die Tatsache, dass nach Bluttransfusionen Antikörper gegen Leukozyten gebildet werden <sup>(42)</sup>. Durch diese Entdeckungen konnte in den folgenden Jahren die Komplikationsrate der SZT erheblich reduziert werden, indem man z.B. den Spender und Empfänger auf HLA-Kompatibilität testet.

Vor der Durchführung der SZT ist es notwendig, dass hämatopoetisch-immunologische Gewebe des Empfängers zu erradizieren, um schwere immunologische Komplikationen zu vermeiden. Die hierzu verwendeten Methoden sind die TBI (Total body irradiation) mit einer Gesamtdosis von 12 Gy (Gray) kombiniert mit Chemotherapeutika, insbesondere alkylierende Substanzen wie z.B. Cytarabin, Busulfan und Etoposid. Die gängige Konditionierung nach dem ALL-BFM Protokoll 2000 für Patienten >2 Jahre ist die TBI und die zusätzliche Gabe von Etoposid. Bei jüngeren Patienten wird auf die TBI verzichtet und statt dessen die Gabe von Cyclophosphamid, Busulfan und Etoposid empfohlen.

Die Wiederherstellung der hämatopoetischen und immunologischen Fähigkeiten des Empfängers erfolgt durch intravenöse Infusion der SZ.

### **1.3 Arten der Stammzelltransplantation**

#### **1.3.1 Autologe Stammzelltransplantation**

Die auto-SZT (autologe Stammzelltransplantation) erfolgt durch SZ (Stammzelle) Entnahme des Empfängers nach Stimulation mit G-CSF (Granulozyten-Colony Stimulating Factor) mittels Leukapherese im Stadium der Remission, oder bei stabilem Zustand nach Prä-Therapie bei soliden Tumoren und lymphoproliferativen Erkrankungen. Diese SZ werden kryokonserviert, gelegentlich auch CD34+ angereichert und dem Patienten zum entsprechenden Zeitpunkt der Therapie reinfundiert <sup>(60)</sup>.

Die Vorteile der auto-SZT liegen in dem Ausbleiben einer möglichen GVHD-Reaktion (Graft-Versus-Host-Disease) und der kaum möglichen Abstoßung des Transplantates. Der Nachteil liegt in der möglichen Retransfusion von Tumorzellen und damit des Rezidivs. Patienten nach auto-SZT für leukämische Erkrankungen weisen ein signifikant höheres Rezidivrisiko auf, als nach allo-SZT (allogener SZT) <sup>(140)</sup>. Diese Tatsache liegt evtl. darin, dass diese Erkrankungen primär das Knochenmark als Ort der malignen Proliferation der Tumorzellen aufweisen und somit hier die höchste Konzentration an Tumorzellen zu finden ist. Die auto-SZT für ALL Patienten wird vom ALL-BFM Protokoll 2000 als Therapieform bei kompletter erst Remission nicht empfohlen, häufiger ist ihre Anwendung bei Erwachsenen.

In der Erwachsenen Hämatologie und Onkologie wird die auto-SZT gerne bei Patienten mit Multiplen Myelom, Amyloidose, Lymphomen und soliden Tumoren eingesetzt <sup>(60)</sup>.

### 1.3.2 Allogene Stammzelltransplantation

Die SZT (Stammzelltransplantation) wird dann als allo-SZT bezeichnet, wenn der Spender nicht genetisch mit dem Empfänger übereinstimmt, jedoch der selben Spezies angehört. Als Spender der allo-SZT kommen vor allem Geschwister des Empfängers in Frage (MFD-Transplantation= Matched family donor, MMFD-Transplantation= Mismatched family donor), sonst muß die Suche nach einem Fremdspender über die Knochenmarkspenderdateien (MUD-Transplantation= Matched unrelated donor, MMUD= Mismatched unrelated donor) erfolgen. Auf Grund der nie 100% genetischen Kompatibilität muß eine intensive Konditionierung erfolgen. Bei der Auswahl des Spenders ist auf eine möglichst hohe Übereinstimmung der HLA (Human leukocyte antigen system) Merkmale zu achten, insbesondere ist die Nichtübereinstimmung in den HLA-B und D-Loci mit einer erhöhten Abstoßung verbunden, auch die Inzidenz der GVHD (Graft-Versus-Host-Disease) steigt mit abnehmender Kompatibilität. Es wurde jedoch auch schon von erfolgreichen SZT mit Spender-Empfänger-Konstellationen berichtet, die in einem HLA-Merkmal nicht übereinstimmen <sup>(2,6,60)</sup>.

Die Vorteile liegen in einem niedrigerem Rezidivrisiko der Grunderkrankung. Die Nachteile liegen in der höheren TRM (Treatment related mortality) auf Grund intensiverer Konditionierung, erhöhte Infektionsgefahr durch längere Aplasiphasen im Gegensatz zur auto-SZT und einer schweren GVHD, die jedoch durch Cyclosporin Gabe und/oder Cortison Gabe meist gut beherrscht werden kann. Höhere Cyclosporin Gaben sind jedoch mit einer erhöhten Rezidivgefahr verbunden. Wichtige Faktoren, die mit dem Outcome nach allo-SZT assoziiert sind, sind das Alter, die Dauer der CR1 Phase (Complete Remission), das Stadium der Erkrankung, der Immunphänotyp sowie zytogenetische Aberrationen <sup>(138,139,143)</sup>.

Experimentelle Ansätze der SZT umfassen die Haplo-Transplantation (haploidentische Familienspende), die für Patienten mit schlechter Prognose und keinem passenden Fremd- oder nicht vorhandenem Familienspender als letzte Therapiemöglichkeit in Betracht gezogen werden kann. Insbesondere hat

die Universitätskinderklinik Tübingen auf diesem Gebiet große Fortschritte ermöglicht.

## **1.4 Komplikationen der Stammzelltransplantation**

### **1.4.1 Graft-Versus-Host-Disease und Graft-Versus-Leukemia Effekt**

Die GVHD (Graft-Versus-Host-Disease) entsteht durch zytotoxische Schädigung des Empfängers durch immunkompetente Zellen des Spenders. Die Ursache liegt in der antigenen Eigenschaft des Empfängers gegenüber dem Transplantat. Experimentelle Studien sprechen von einem drei Stufenprozeß in der Pathogenese der akuten GVHD. Eine große Rolle spielen dabei die T-Zellen mit ihrer Zytokinbildung, insbesondere IL-2 (Interleukin 2) ist für die Induktion und Proliferation von zytotoxischen T-Zellen und damit für die Schädigung des Organismus verantwortlich <sup>(103)</sup>. Klinisch wird dabei in eine akute GVHD und eine chronische GVHD unterschieden. Die akute GVHD entsteht innerhalb der ersten ein bis zwei Monate nach SZT (Stammzelltransplantation), die chronische etwa nach drei Monaten. Manifestationen der akuten GVHD betreffen vor allem die Haut, Leber und den Gastrointestinaltrakt, welche sich in Erythemen, Anstieg von Bilirubin und Transaminasen und Diarrhöen äußern. Die chronische GVHD ähnelt hingegen eher dem klinischen Bild der Kollagenosen wie z.B. der Sklerodermie und mit chronischen Entzündungen insbesondere der Schleimhäute <sup>(60)</sup>.

Klinisches Stadium	Haut-manifestationsgrad	Leberbeteiligung über das Bilirubin in mg/dL	Gastrointestinale Manifestation über Diarrhö in ml/d
1	Exanthem < 25%	2-3	500-1000
2	Exanthem < 25-50%	3-6	1000-1500
3	Generalisiertes makulo-papulöses Exanthem	6-15	> 1500
4	Desquamation Blasenbildung	> 15	Ileus
<b>Klinischer Grad</b>			
I	1-2	0	0
II	1-3	1	1
III	1-3	2-3	2-3
IV	2-4	2-4	2-4

**Tabelle 2:** Darstellung der Einteilung der akuten GVHD an Hand der Klinischen Symptomatik/Stadien und schließlich ihrer Gradeinteilung. Berücksichtigt werden Hautmanifestationen in Form von Exanthenen, Leberbeteiligung die sich meist als Cholestase über Bilirubin Erhöhung manifestiert, sowie die Beteiligung des Gastrointestinaltraktes. Das klinische Stadium ergibt sich aus der klinischen Ausprägung am Patienten, der klinische Grad durch entsprechende Zuordnung der gesamten Untersuchungsbefunde. (Harrison Internal Medicine Auflage 15, McGraw Hill 2000)

Faktoren, die eine GVHD begünstigen, sind das Konditionierungsschema sowie die Zahl der transfundierten CD34+ SZ und vorhandene allogene T-Zellen im Transplantat.

Die GVHD läßt sich durch T-Zelldepletion des Spendermaterials und Cyclosporin Gabe minimieren. Cyclosporin ist u.a. ein Inhibitor des IL-2. Dass die Hemmung des IL-2 zu einer Reduktion des GVHD Risikos führt, unterstützt die These, dass T-Zellen und insbesondere deren IL-2 Produktion an der Pathogenese einer GVHD maßgeblich beteiligt sind. Allerdings ist eine hohe Cyclosporin Gabe wiederum mit einem erhöhtem Rezidivrisiko verbunden <sup>(7)</sup>, was für einen eindeutigen GVL (Graft-Versus-Leukemia) Effekt der allo-SZT spricht.

Die GVHD bietet Schutz gegenüber einem erneutem Rezidiv nach SZT, was in Studien mit dem Vergleich einer syngenen Transplantation versus allogener Transplantation gezeigt werden konnte <sup>(46,137,138)</sup>. Dieses Phänomen ist offenbar auf die T-Zellen und ihre Interleukine zurückzuführen und wird als GVL-Effekt bezeichnet. Der zytotoxische Effekt von IL-2 aktivierten allogenen Lymphozyten gegen Leukämie- und Lymphomzellen konnte auch schon in vitro

nachgewiesen werden, dabei schienen die Effekte vor allem auf die T-Zellen und NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) rückführbar <sup>(90)</sup>.

#### **1.4.2 Abstoßung des Transplantats**

Dies ist eine relativ seltene Komplikation. Hierbei kommt es zu einer Immunreaktion des Empfängers gegen den Spender. Dies ist dem Therapieversagen gleichzustellen. Als Ursachen des Engraftmentfailures werden hohe T-Zelldepletion, keine TBI (Total body irradiation) als Konditionierung, nicht-maligne Grunderkrankung und eine niedrige Zahl an transplantierten SZ diskutiert, sowie HLA-Inkompatibilität (Human leucocyte antigen system), insbesondere im HLA-B und D-Locus <sup>(2,142)</sup>. Insgesamt liegt die Abstoßungsrate sehr viel niedriger als bei anderen Organtransplantationen, was durch die vorherige immunablative Therapie erklärt werden kann.

#### **1.4.3 Infektionen und Toxizität**

An erster Stelle stehen pulmonale und hepatische Komplikationen. Sie äußern sich klinisch durch Fieber, pulmonale Infiltrate, Hypoxie und respiratorischer Insuffizienz sowie durch das Veno-Okklusiv Syndrom der Leber.

Häufig sind virale Infektionen insbesondere CMV (Cytomegalievirus) für pulmonale Komplikation verantwortlich <sup>(27,45)</sup>, die hauptsächlich aus endogener Reaktivierung resultieren. Risikofaktoren für die Entwicklung einer CMV-Pneumonie sind, allogene SZT, Seropositivität, Virurie, Virämie, Alter und T-Zelldepletion des Transplantates. Die hepatische Komplikation wird eher auf toxische Effekte der Chemotherapie zurück geführt. Deswegen sollte auf strikte CMV Negativität der Transfusionsprodukte geachtet werden, wenn der Patient primär CMV negativ ist, sowie prophylaktisch Ganciclovir verabreicht werden. Hierdurch konnten in den letzten Jahren eine wesentliche Besserung erzielt

werden. Die intensive Therapie, die selbst onkogenes Potential besitzt, führt bei Kindern und Erwachsenen die eine SZT (Stammzelltransplantation) (autolog,allogen) erhalten haben, zu einem signifikant erhöhten Risiko von Sekundärmalignomen insbesondere Non-Hodgkin-Lymphome, AML/MDS, Melanomen und soliden Tumoren <sup>(15)</sup>. Langfristige Nebenwirkungen, die die neuropsychologische Entwicklung der Kinder nach erfolgreicher ALL Therapie betreffen, sind Gegenstand intensiver Forschung. Eine Studie untersuchte die zentralnervöse Toxizität von intrathekaler MTX-Gabe (Methotrexat) und prophylaktischer Bestrahlung. Sie zeigte, dass niedrigere Ergebnisse im Intelligenztest, sowie Defizite der Konzentration, Aufmerksamkeit und Motorik mit der Höhe der MTX-Gabe korrelierten <sup>(69)</sup>.

### **1.5 Rezidiv der Grunderkrankung nach Stammzelltransplantation und mögliche therapeutische Intervention**

Das Rezidiv ist heute eine der Hauptursachen des Therapieversagens nach SZT (Stammzelltransplantation). Es kann bis zu 70% betragen, je nach Konditionierungsregime, Art der Erkrankung oder Zeitpunkt der SZT <sup>(52,109,139,143)</sup>. Für die Pathogenese des Rezidivs werden verschiedene Ursachen diskutiert. Eine Ursache liegt womöglich in dem fehlenden GVL (Graft-Versus-Leukemia) Effekt bei T-Zell depletierter SZT sowie der radio-chemotherapeutischen Resistenz einiger Leukämiezellen. In vitro und in vivo Versuche an den Leukämiezelllinien L1210 konnten eine erhöhte Expression der Aldehyhydrogenase nachweisen <sup>(64)</sup>. Dieses Enzym spielt eine entscheidende Rolle bei der Sensitivität dieser Zellen gegen Cyclophosphamid. Andere Analysen von Genen die in der Metabolisierung und Aktivierung von Chemotherapeutika eine Rolle spielen, zeigten einen genetischen Polymorphismus, der zu einer Reduktion der Effektivität der Chemotherapeutika führt bzw. die Toxizität der Therapie stark erhöht. Ein weiteres Problem scheint auch die akquirierte Resistenz von Leukämiezellen gegen Therapeutika nach erfolgter Therapie zu sein. Ein Bsp. ist hier MTX (Methotrexat), wobei ein

verringerten Transport und eine Veränderung der Amplifikation von der Dihydrofolatreduktase eine mögliche Rolle bei der Resistenzentwicklung spielt<sup>(55)</sup>. Dies ist wichtig bei der Rezidivtherapie oder bei langer Therapiedauer wie z.B. bei ALL. Ein weiteres Problem ist z.B. die mögliche Interaktion der Chemotherapeutika mit Medikamenten zur symptomatischen Behandlung von Nebenwirkungen der Therapie<sup>(97)</sup>. Die Kombination aus Resistenz gegen das Konditionierungsregime und der fehlende Effekt begünstigen dadurch ein Rezidiv.

Eine Möglichkeit ein Rezidiv nach SZT zu therapieren, besteht in der DLI (Donor-Lymphozyten-Infusion) immunkompetenter T-Zellen<sup>(93)</sup> bzw. der Induktion einer GVHD (Graft-Versus-Host-Disease)<sup>(92)</sup>. Diese Zellen können entweder von kryokonservierten T-Zellen des Spenders oder via Leukapherese gewonnen werden. Durchgreifende Erfolge dieser Therapie sind insbesondere für Patienten mit CML (Chronisch Myeloische Leukämie) beschrieben. Die ALL (Akute lymphatische Leukämie) spricht insgesamt sehr viel schlechter auf diese Therapie an. Die großen Probleme der DLI sind die Induktion einer unkontrollierbaren GVHD und die Knochenmarkhypoplasie mit folgender Aplasie, wodurch die Patienten dann sehr häufig an Infektionen versterben<sup>(92,93,110)</sup>. Ähnliche Effekte können durch Reduktion der Cyclosporin Dosis erzielt werden, auch hierbei besteht dann wieder ein GVHD Risiko.

Eine alternative Möglichkeit könnte evt. in der Transfusion einer besonderen T-Zell-Population liegen. Diese zeichnen sich durch die Antigene Vdelta1(+)/CD4(-)/CD8(-)/gammadelta(+) aus. Diese Zellen zeigen Effekte gegen Leukämieblasten, während sie in gemischten Lymphozytenkulturen gegen HLA-mismatched Zellen (Human leucocyte antigen system) kaum Proliferation zeigen. Dies würde bedeuten, dass das Risiko der GVHD nach herkömmlicher DLI auf nahezu 0 reduziert werden könnte<sup>(75)</sup>. Dies ist bisher ein rein experimenteller Ansatz. Klassische Rezidivbehandlungen sind nach wie vor die zweite SZT, oder der Versuch einer erneuten Chemotherapie<sup>(85,109)</sup>. Die zweite SZT ist mit einer sehr großen Morbidität und Mortalität von 30-40% behaftet<sup>(16,86,85,109)</sup>. Die erneute Chemotherapie nach SZT ist ebenfalls mit hohen toxischen Langzeitfolgen behaftet, oft kommt eine Resistenz der Tumorzellen

hinzu, die durch das vorherige Regime selektioniert wurden. Für Patienten, die erst ein Jahr nach SZT rezidivieren, scheint eine Reinduktionstherapie mit 67% Remissionswahrscheinlichkeit eine gute Strategie, während Patienten die innerhalb der ersten 100 Tage nach SZT rezidivieren nur in 7% eine Remission erreichen <sup>(85)</sup>. Damit ist der Zeitpunkt des Auftretens des Rezidivs von essentieller Bedeutung. Rezidive, die innerhalb der ersten 100 Tage post SZT auftreten, sind mit infauster Prognose behaftet.

## **1.6 Minimale Resterkrankung**

Die Minimale Resterkrankung ist definiert als submikroskopischer Nachweis von < 5% Leukämieblasten im Gewebe <sup>(31)</sup>. Das Tumorzellvolumen kann dabei bis zu  $10^{10}$  Zellen betragen <sup>(58)</sup>.

### **1.6.1 Möglichkeiten des Monitorings der Minimalen Resterkrankung**

In den letzten Jahren sind eine Reihe von Methoden entwickelt worden, um die MRD (Minimal residual Disease = Minimale Resterkrankung) eines Patienten während der Therapie seiner Erkrankung zu überwachen <sup>(23)</sup>. Die wichtigsten Möglichkeiten stellen hierbei der Nachweis von chromosomalen Aberrationen bzw. ihrer Genprodukte mittels PCR (Polymerasekettenreaktion) dar. Als einer der bekannteste Beispiele ist hier das BCR-ABL Gen bei CML (Chronische myeloische Leukämie) zu nennen. Weitere Methoden sind die FACS (Flow zytometrische Immunphänotypisierung) sowie die PCR Analyse der Immunoglobulingene <sup>(132)</sup>. Diese Methoden bieten die Möglichkeit, den Leukämieblasten direkt bzw. indirekt nachzuweisen. Eine indirekte Methode bietet die Chimärismusanalyse, die über den Nachweis erneut auftretender Empfängerzellen einen Zusammenhang zwischen autologer Rekonstitution und Rezidiv stellt <sup>(8,9,10,11,12,14)</sup>.

### **1.6.1.1 Flow zytometrische Immunphänotypisierung**

Leukämieblasten unterscheiden sich von nicht malignen Zellen durch das Expressionsmuster der Zelloberflächenmarker. Diese Unterschiede im sogenannten Immunphänotyp der Zellen macht sich die FACS (Flow zytometrische Immunphänotypisierung) Analyse zu Nutze. Oft ist die Kombination der Zelloberflächenmarker auf den Zellen das entscheidende Kriterium zur Diskriminierung zwischen Blast und „normaler Zelle“. Meist erfolgt ein dreifaches Labeling mit Antikörper und anschließender Analyse. Diese Methode lässt sich auf zwei Drittel aller Leukämien anwenden und erreicht Sensitivitäten von einer Leukämiezellen in 10.000 Normalzellen.

Gängige Marker umfassen eine dreifach Kombination aus: CD 10, CD 34, CD 19, CD 20, TdT, z.B. TdT-CD10-CD19. Werden vier oder fünf dreifach Labelings benutzt, so können 98% der B-Vorläufer ALL´s charakterisiert werden (44,83).

### **1.6.1.2 Chimärismusanalyse**

Das Wort Chimärismus stammt aus der griechischen Mythologie als Bezeichnung für ein Fabelwesen mit Körperteilen mehrerer Tierarten. In der Medizin wird unter Chimär verstanden, dass in einem Organismus Zellen unterschiedlicher Herkunft nebeneinander existieren. Dies bedeutet, dass nach SZT (Stammzelltransplantation) eigentlich die Hämatopoese nur durch Spenderzellen erfolgen sollte, trifft dies nicht zu, so existieren neben den Spenderzellen auch eigene Empfängerzelle. In diesem Fall spricht man vom MC (gemischter Chimerismus) ansonsten vom CC (vollständiger Chimerismus). Innerhalb der zur Chimärismusanalyse durchgeführten Studien herrscht z.T. eine sehr große Diskrepanz zwischen dem Nutzen der Chimärisanalyse zur Überwachung der Patienten nach SZT. In einer Studie mit 30 erwachsenen Patienten mit AML (Akute myeloische Leukämie) und ALL (Akute lymphatische

Leukämie), die einer monatlichen Chimärismusanalyse unterzogen wurden, konnte kein Vorteil der Chimärismusanalyse zur Rezidivfrüherkennung erkannt werden <sup>(33)</sup>. Studien, in denen die Chimärismusanalysen in sehr viel kürzeren Zeitintervallen durchgeführt wurden, hingegen belegten, dass nicht der absolute Nachweis eines MC entscheidend ist, sondern vielmehr die Dynamik des MC. Ein stark ansteigender MC innerhalb weniger Tage oder Wochen ist mit dem Auftreten einer autologen Rekonstitution, oder einem Rezidiv korreliert <sup>(43,101)</sup>. Bader et. al, konnten in mehreren Studien die nahezu 100% Rezidivwahrscheinlichkeit bei zunehmenden Chimärismus zeigen, sodass dieses Verfahren zu einem zunehmend anerkannten und etablierten Überwachungsverfahren wird <sup>(8,9,10,11,12,14)</sup>.

Die heute gängigsten Methoden zur Chimärismusanalyse sind der PCR Nachweis der VNTR-Sequenzen (Variable-number-of-tandem-repeats) oder STR-Sequenzen (Short-Tandem-Repeats) aus peripherem Vollblut oder Knochenmark. Diese Sequenzen sind für jeden Menschen charakteristisch. Dadurch ist eine Diskrimination zwischen autologen Zellen und allogenen Zellen des SZT-Spenders möglich.

### **1.7 Immunglobulingene , T-Zellrezeptorgene und TAL-1 Gen als molekulare Marker für die Quantifizierung der Minimalen Resterkrankung**

Der menschliche Organismus ist in der Lage etwa  $10^{11}$  verschiedene AK (Antikörper) zu produzieren. Wäre jede einzelne Möglichkeit durch ein Gen innerhalb des Genoms kodiert, so müßte das menschliche Genom mehr Gene enthalten als tatsächlich vorhanden sind, außerdem würde das Genom dann ausschließlich Gene für ein funktionierendes Immunsystem enthalten <sup>(70)</sup>.

Heute weiß man, dass die enorme Vielfalt an AK durch somatische Rekombination weniger Gene zu Stande kommt und dass dieser Vorgang in den Zellen von lymphoproliferativen Erkrankungen gleichermaßen vorhanden ist <sup>(67,128,129,133,134)</sup>.

Die Entdeckung durch Tonegawa et. al, dass sich Immunglobulingene während der Reifung von B-Zellen rekombinieren, war der Anstoß für weitere intensive Forschung auf diesem Gebiet. Für seine Arbeiten zu diesem Thema wurde Tonegawa mit dem Nobelpreis ausgezeichnet.

Es konnte gezeigt werden, dass jeder Genlocus (IgH,IgK) sich aus Gensegmenten zusammensetzt. Diese V-,D- und evt. J-Segmente kodieren jeweils für die CDR-3 Region (Complimentary-Determining-Region), die Antigen-spezifische Region eines AK <sup>(70,134,135)</sup>. Diese Entdeckung an B-Zellen, konnte bald auch am TCR (T-Zell-Rezeptor) nachgewiesen werden <sup>(36,61,105)</sup>.

Insgesamt werden vier Mechanismen für die AK-Vielfalt und TCR-Vielfalt verantwortlich gemacht: <sup>(70)</sup>

- somatische Rekombination (gene rearrangement),
- nicht exaktes Zusammenfügen der einzelnen Fragmente,
- die große Anzahl an Möglichen Kombinationen der einzelnen Ketten,
- somatische Hypermutation der CDR3-Region des AK durch Antigenstimulation der B-Zelle.

## **1.7.1 Genloki der Immunglobulin und T-Zellrezeptorgene und des TAL-1 Lokus**

### **1.7.1.1 Immunglobuline**

Der IgH-Lokus liegt auf Chromosom 14q32 und enthält etwa 120 funktionelle VH-Segmente, die auf Grund von Sequenzhomologien in sieben VH-Gensegment-Familien aufgeteilt werden <sup>(35,120)</sup>. Das 3' Ende jedes V-Segments wird von der RSS flankiert (Rekombination-Signal-Sequenz). Dieser RSS-Komplex besteht aus einer heptamer-Sequenz, die durch eine 23 bp

(Basenpaare) lange Spacer-Region von einer nonamer-Sequenz getrennt wird<sup>(107)</sup>. Auf die Bedeutung des RSS-Komplex insbesondere der Länge der Spacer-Regionen wird unten ausführlich eingegangen. Diesen V-Segmenten folgen eine bisher noch unbekannte Anzahl an D-Segmenten und sechs J-Segmenten<sup>(102)</sup>, die ebenfalls von dem RSS-Komplex flankiert werden. Dabei wird das D-Segment am 5' und 3' Ende vom einem RSS-Komplex mit einer 12 bp langen Spacer-Region, das J-Segment am 5' Ende mit einer Spacer-Region von 23 bp umschlossen. Zusätzlich enthält der Locus noch eine Konstanteregion die den jeweiligen AK-Subtyp (Antikörper) bestimmt.

Eine ähnliche Organisation enthalten auch die Leichketten Immunglobulingene IgK und IgL wobei Ihnen die D-Segmente fehlen. Die IgK Locus liegt auf Chromosom zwei und enthält ca. 76 V-Segmente und fünf J-Segmente und ein konstantes Ck-Segment<sup>(111,112)</sup>. Im Bereich des IgK Locus kommt es hauptsächlich zu Deletionen der J-Segmente und oder des Ck-Segments unter dem Einfluß des Kde-Elements, (Kappa deleting element), dass etwa 24 kb downstream des Ck-Segmentes liegt<sup>(116)</sup>.

### 1.7.1.2 TCR - Rezeptoren

Der  $\delta$ TCR Locus (T-Zellrezeptor) ist mitten im  $\alpha$ TCR Locus auf Chromosom 14q11 lokalisiert<sup>(32)</sup>. Bis jetzt sind ca. vier V, drei D und drei J Segmente sowie ein Konstantes C-Segment bekannt<sup>(70)</sup>. Wie die Immunglobulin Gene, so werden auch diese Segmente von dem RSS-Komplex (Recombination-Signal-Sequenz) flankiert, wobei diesmal das D-Segment am 5' Ende eine Spacer-Region mit 12 bp (Basenpaare) und am 3' Ende mit 23 bp aufweist. Da hier sozusagen zwei Loci in einem liegen, existieren noch zwei weitere Gene,  $\delta$ rec und  $\Psi$ Ja, die an der Deletion der  $\delta$ -gene beim  $\alpha$ -Rearrangement und der Rekombination von  $\alpha$  beteiligt sind, so dass eine geregelte  $\alpha$  oder  $\delta$  Bildung möglich wird<sup>(65)</sup>. Der  $\alpha$ TCR Locus und  $\beta$ TCR Locus sind im wesentlichen wie die Immunglobulin Loci aufgebaut<sup>(70)</sup>.

Der  $\gamma$ TCR Locus liegt auf Chromosom 7p15. Er enthält insgesamt 19 Gene, ca. 12 V-Segmente, 5 J-Segmente und 2 C-Regionen <sup>(70)</sup>. Die V-Segmente werden auf Grund von Sequenzhomologien in vier Gruppen, V $\gamma$ I-V $\gamma$ IV, unterteilt.

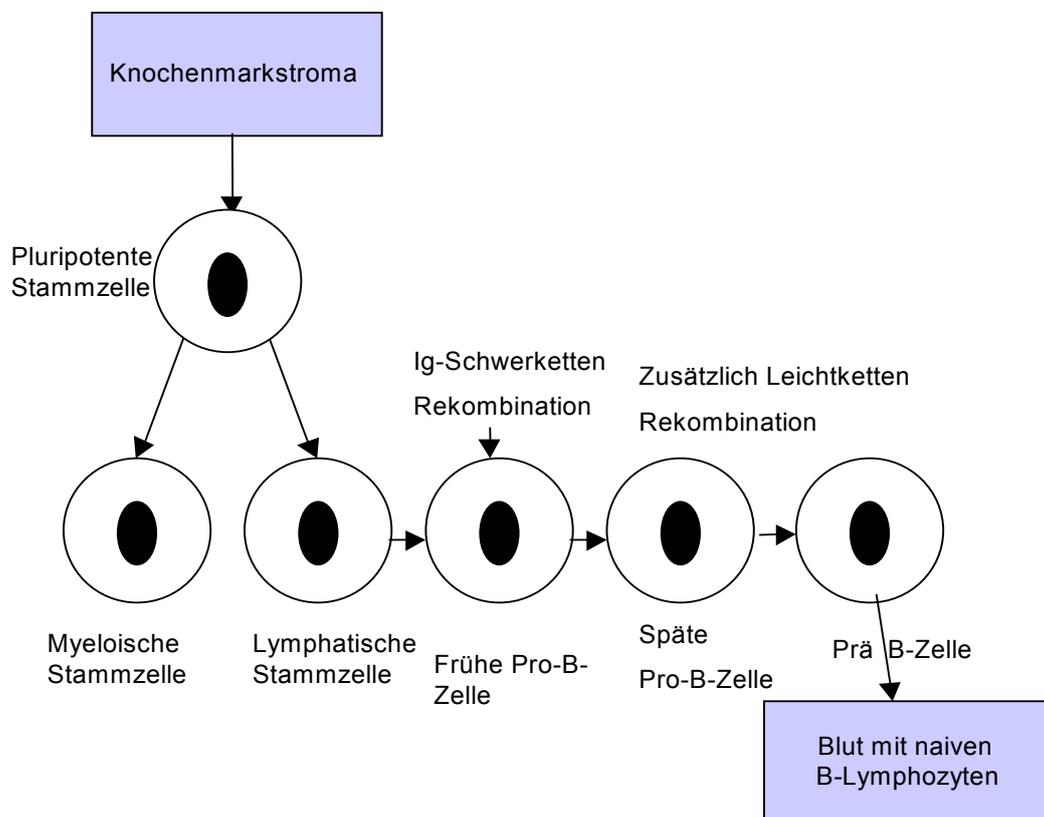
In B-Vorläufer ALL (Akute lymphatische Leukämie) ließen sich in 93% der Fälle Rearrangements im T-Zellrezeptor Bereich nachweisen. Am häufigsten finden sich Rekombination zwischen V $\delta$ 2-D $\delta$ 3 und D $\delta$ 2-D $\delta$ 3 am  $\delta$ TCR Locus und V $\gamma$ I Familien mit J $\gamma$ 1.1/2.1 und J $\gamma$ 1.3/2.3 am  $\gamma$ TCR Locus <sup>(47,121)</sup>.

### 1.7.1.3 TAL-1 Gen

Das TAL-1 Gen (T-cell acute leukemia 1 gene), auch SCL Gen (Stemcell leukemia) genannt, ist auf Chromosom eins p32 lokalisiert. Es zählt zur Familie der Protoonkogene vom Typ der bHLH (basic-helix-loop-helix) Transkriptionsfaktoren. Es wird angenommen, dass es eine wichtige Rolle in der embryonalen Genese des Hämatopoetischen System und bei der embryonalen Angiogenese spielt. Im adulten Organismus ist es an der Differenzierung der erythroiden und megakaryozytischen Vorläuferzellen beteiligt <sup>(19,29,71,131)</sup>. Versuche an transgenen Mäusen <sup>(34)</sup> zeigten, dass eine Überexpression an TAL-1 zur Entwicklung von T-Zell-Lymphomen führt und Differenzierungsstörungen der B- und T- Zellen auftreten <sup>(53)</sup>. In 5%-25% der pädiatrischen T-Zell Leukämien finden sich Deletionen im Bereich des TAL-1 Gens, die zur Fusion mit dem SIL-Lokus führen, oder die Translokation (1;14)(p32;p11), die wahrscheinlich durch falsche V(D)J Rekombinase Aktivität am  $\delta$ -TCR Locus bei der Fusion von D1-Segment mit dem D2-Segment entsteht. Daraus resultiert eine Überexpression des Gens, weshalb ihm eine Rolle in der Onkogenese von T-Zell Lymphomen zugeschrieben wird <sup>(3,18,26,49)</sup>. Hierbei handelt sich um sehr stabile Rekombination deren Detektion durch die selbe Methodik wie die Immunglobulinogene und T-Zellrezeptorgene erfolgen kann <sup>(30,87,141)</sup>.

## 1.7.2 Somatische Rekombination

Sie ist das Herzstück der Antikörpervariabilität, T-Zellrezeptorvielfalt und versetzt damit den menschlichen Organismus in die Lage, sich gegen die vielfältigen Antigene zu behaupten. Sie findet bei den Immunglobulinen gleichermaßen in den schweren und leichten Ketten statt, sowie in den Kettenuntereinheiten des T-Zellrezeptors. Exemplarisch soll hier als Beispiel einer Immunglobulinleichtkette stehen. Sie folgt einer zeitlichen Korrelation zwischen Differenzierungsgrad der Zellen <sup>(70)</sup>. (Siehe Abbildung 1)



**Abbildung 1:** Darstellung der B-Zellreifung im Knochenmark. Das Ig-Schwerketten Rearrangement beginnt bereits im Stadium der frühen Pro-B-Zelle. Ig= Immunglobulin

Die SR (Somatische Rekombination) vollzieht sich in zwei großen Schritten an der Doppelstrang-DNA während der B/T-Zell Reifung im Knochenmark.

Entscheidend für den Vorgang der SR ist die RSS-Sequenz (Recombination-Signal-Sequence), die jedes V-(D)- und J Segment flankiert. Sie besteht aus:

- heptamer-Sequenz: 5' CACAGTG bzw. 3' CACTGTG,
- spacer-Sequenz: aus 12 oder 23 nichtcodierenden Basenpaaren,
- nonamer-Sequenz: Adenin bzw. Thyminreiche Sequenz.

### 1. Schritt der SR:

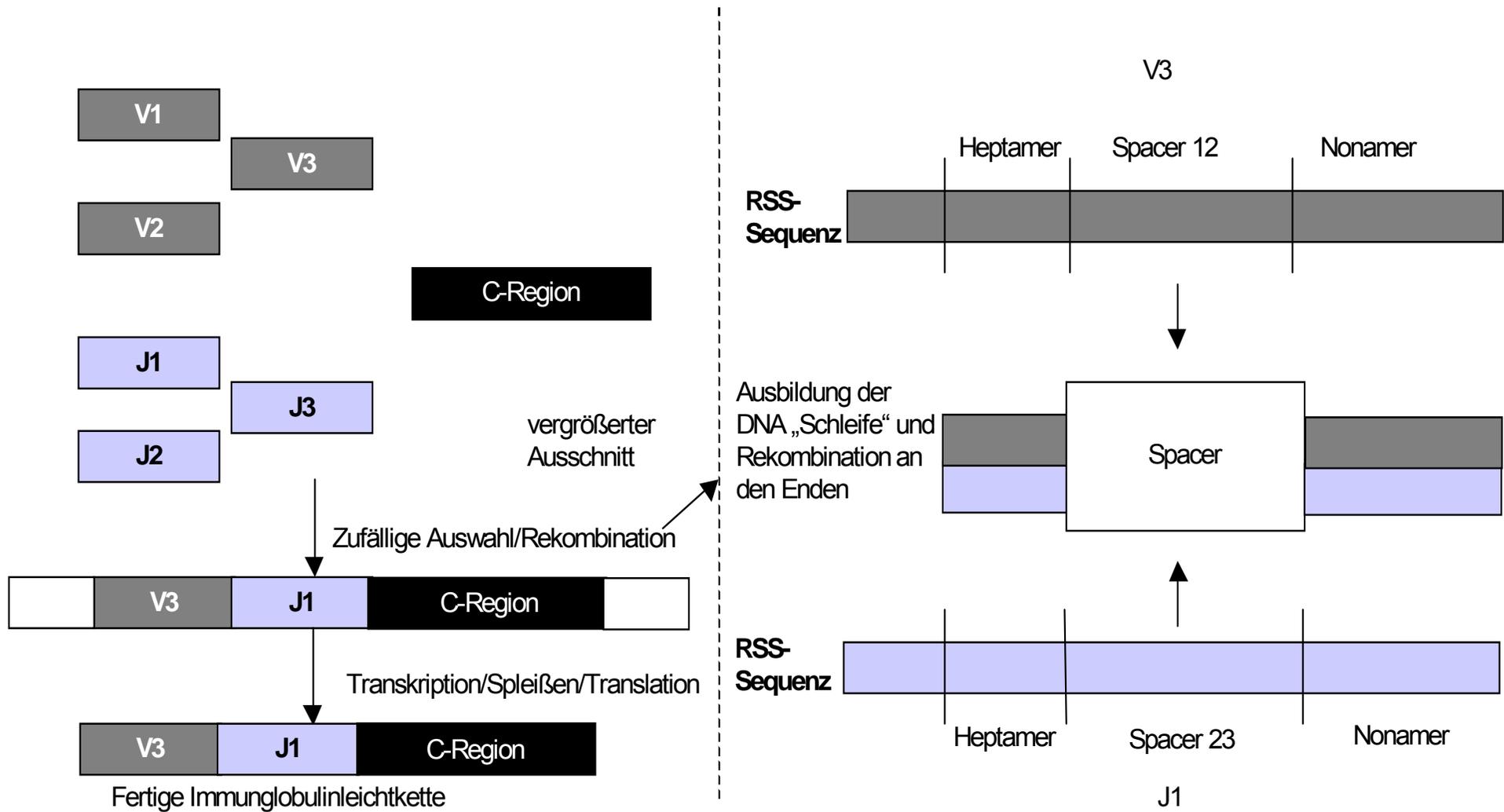
Der wichtigste Schritt der SR ist die Aneinanderlagerung der heptamer und nonamer-Sequenzen unter Ausbildung einer DNA-Schleife (Desoxyribonukleinsäure). Hierbei gilt, wie fast bei allen Rekombinationen die 12/23-Regel der Rekombination <sup>(70)</sup>, d.h., dass ein V-Segment des IgH-Lokus mit einem D-Segment rekombiniert werden kann, aber nicht mit einem J-Segment. Durch die unterschiedlichen Längen der Spacer-Regionen im RSS-Komplex wird also die ordnungsgemäße Rekombination gewährleistet. Die Bindung der DNA-Schleife wird durch RAG-Proteine (RAG 1 und RAG 2 = V (D) J- Rekombinase Enzym, recombination activating genes) induziert und stabilisiert <sup>(1)</sup>. Diese Proteine werden nur während der Reifung einer B-Zelle im Knochenmark exprimiert. Die Endonukleaseaktivität der RAG-Proteine führt im DNA-Dopplestrang am Ende der Heptamer-Sequenz zu einem Strangbruch. Dadurch entsteht an jedem Segment am 3' Ende eine freie OH-Gruppe. Die zwei Bruchstellen werden durch Ausbildung einer DNA-Haarnadel ligiert, die herausgeschnittene DNA bildet einen kleinen extrachromosomalen Ring, der bei der weiteren B-Zell Reifung verloren geht <sup>(70)</sup>.

Die Öffnung der Haarnadel erfolgt wiederum durch die RAG-Proteine <sup>(115)</sup>. Hierbei entsteht eine hohe Variabilität der Schnittenden durch unterschiedliches Ansetzen der RAG's. Durch den Einsatz der TdT (Terminale desoxynucleotid Transferase) können noch zusätzliche Variationen

entstehen. Dies betrifft vor allem die Position 96 der kappa-Leichtkette. Man spricht auch von der hypervariablen Region.

### 2.Schritt der SR:

Die DNA-Ligase IV ligiert nun die freien Enden der Segmente. Damit steht der Weg für die Transkription durch die RNA-Polymerase frei. (siehe Abbildung 2)



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der somatischen Rekombination am Beispiel einer Immunglobulinleichtkette. RSS=Recombination-signal-sequence.

## 1.8 Ziel dieser Arbeit

Die SZT (Stammzelltransplantation) bietet Hochrisikopatienten als primär angestrebte Therapie, häufiger aber als sekundäre Therapie die Chance einer dauerhaften Remission. Sie stellt eine sehr risikoreiche Therapieform dar und trotz dieser Therapie erleiden je nach Indikation und Therapieschemata bis zu 70% der Patienten ein Rezidiv, welches sehr eingeschränkte Therapieoptionen bietet.

Studien haben gezeigt, dass vor einer SZT im KM (Knochenmark) noch bis zu  $10^{10}$  Leukämiezellen vorhanden sein können, die der herkömmlichen Lichtmikroskopie entgehen. Diese Leukämiezellen werden als MRD (Minimal residual disease= Minimale Resterkrankung) bezeichnet und stellen ein potentielles Rezidivrisiko dar.

Folgende Fragestellungen sollen in dieser Arbeit näher bearbeitet werden:

1. Eignet sich die Messung der Minimalen Resterkrankung mittels Analyse der Immunglobulin- und T-Zellrezeptor-Gene mit Hilfe der RQ-PCR für das Monitoring nach allogener Stammzelltransplantation bei Kindern mit Akuter lymphatischer Leukämie?
2. Welche Bedeutung hat die MRD als unabhängiger prognostischer Parameter für die Rezidiventwicklung nach allogener SZT?
3. Gibt es eine kritische MRD Last, die eine zusätzliche Immun-oder Chemotherapie nach allogener SZT impliziert?
4. Wie ist die dynamische Entwicklung der MRD beim Patienten?
5. Besteht ein Zusammenhang zwischen MRD und Erfolg der Immuntherapie?

## **2. Material**

### **2.1 Kontaminationsschutzmaßnahmen**

Latexhandschuhe	Kimberly-Clark
Nitrilhandschuhe	Ansell Medical
KIM WIPES®	Kimberly-Clark
Sterilbank	Heraeus
Antifect® Liquid	Schülbe&Mayer

### **2.2 Reaktionsgefäße/Glaswaren**

Reaktionsgefäß, steril 1,5ml	Eppendorf GmbH
Reaktionsgefäß, steril, 0,5ml	Eppendorf GmbH
Stabpipetten, 5ml, 10ml, 25ml	Greiner GmbH
LeucoSep Röhrchen mit Filter	Greiner GmbH
Pasteur Pipetten	Greiner GmbH
ThermoStrip™ Standard Strip Tubes and Caps	PEQ-Lab

MicroAmp <sup>o</sup> Optical 96 Well Reaction Plate	PE Applied Biosystems
Optical Tubes and Caps	PE Applied Biosystems
ABI Prism <sup>TM</sup> Genetic Analyzer Retainer Cups	PE Applied Biosystems

### 2.3 Technische Geräte

Pipettman <sup>®</sup>	Gilson S.A.
Multipipette Plus	Eppendorf GmbH
Multipipette Research Pro	Eppendorf GmbH
Zentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich
Zentrifuge Micro 22 R	Hettich
Tischzentrifuge für Stripes	NeoLab <sup>®</sup>
Tischzentrifuge für Cups	NeoLab <sup>®</sup>
Vacuum Zentrifuge RVC 2-18	Christ
Vortexer Genie 2	Scientific Industries Inc.
Wasserbad	Memmert GmbH Co.KG
Cellcounter Cobras Micros	Roche AG

Waage BP 1200	Sartorius AG
Gene Quant II	Pharmacia Biotech
Heitzblock	Roth GmbH Co.
AccuJet®	Brand
Hofer Electrophoresis Unit SE 600 Series	Pharmacia Biotech
Raytest	Isoptopenmessgeräte GmbH
GeneAmp™ PCR-System 9700	PE Applied Biosystems
ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer	PE Applied Biosystems
ABI Prism™ 7700 Sequenz Detector	PE Applied Biosystems

## **2.4 Pipettenspitzen**

Pipettenspitzen mit Filter 10, 30, 100, 200, 1000µl	PEQ LAB GmbH
Pipettenspitzen ohne Filter bis zu 100µl	Sartorius
Pipettenspitzen ohne Filter 200-1000µl	Greiner GmbH

Combitips pur 0,5 und 1ml

Eppendorf GmbH

## 2.5 Lösungen und Puffer

Ethanol

Merck KgaA

HPLC-Wasser

Merck KgaA

Ethidiumbromid

Roth GmbH+Co.

Natriumacetat

Roth GmbH+Co.

TBE-Puffer bestehend aus:  
108,0g Tris-Puffer, 70,9g Borsäure,  
7,44g EDTA-Dinatrium

Uni-Apotheke  
Tübingen

Ficoll

Biochrom AG

PBS Dubecco's  
W/O Calcium, Magnesium, Bicarbonat

GIBCO™

Magnesiumchlorid

Roche Inc.

dNTP

MWG- Biotech AG

Rotriphorese Gel 30

Roth GmbH+Co.

TEMED

Roth GmbH+Co.

Glycerin

Roth GmbH+Co.

APS Merck KgaA

Bromphenolblaulösung Merck KgaA

## **2.6 Kits**

QIAmp DNA-Blood MiniKit (250) Quiagen GmbH

QIAmp DNA-Blood Midi-Kit (20) Quiagen GmbH

QIAmp DNA-Blood Maxi-Kit (50) Quiagen GmbH

E.N.Z.A Cyclor-Pur-Kit PEQ-Lab

## **2.7 Spezielle Molekulargenetische Reagenzien**

DNA Molecular Weight Marker VIII Roche Inc.

Primerkollektiv angefertigt über MWG-Biotech AG

BigDye™ Terminator  
Cycle Sequencing Ready-Kit PE Applied Biosystems

Genetic Analyzer  
Performance optimized Polymer 4 PE Applied Biosystems

Platinum® qPCR Supermix-UDG  
InvitrogenLife  
Technologies

Taq-Man® Universal PCR-Mastermix

PE Applied Biosystems

AmpliTaq Gold

PE Applied Biosystems

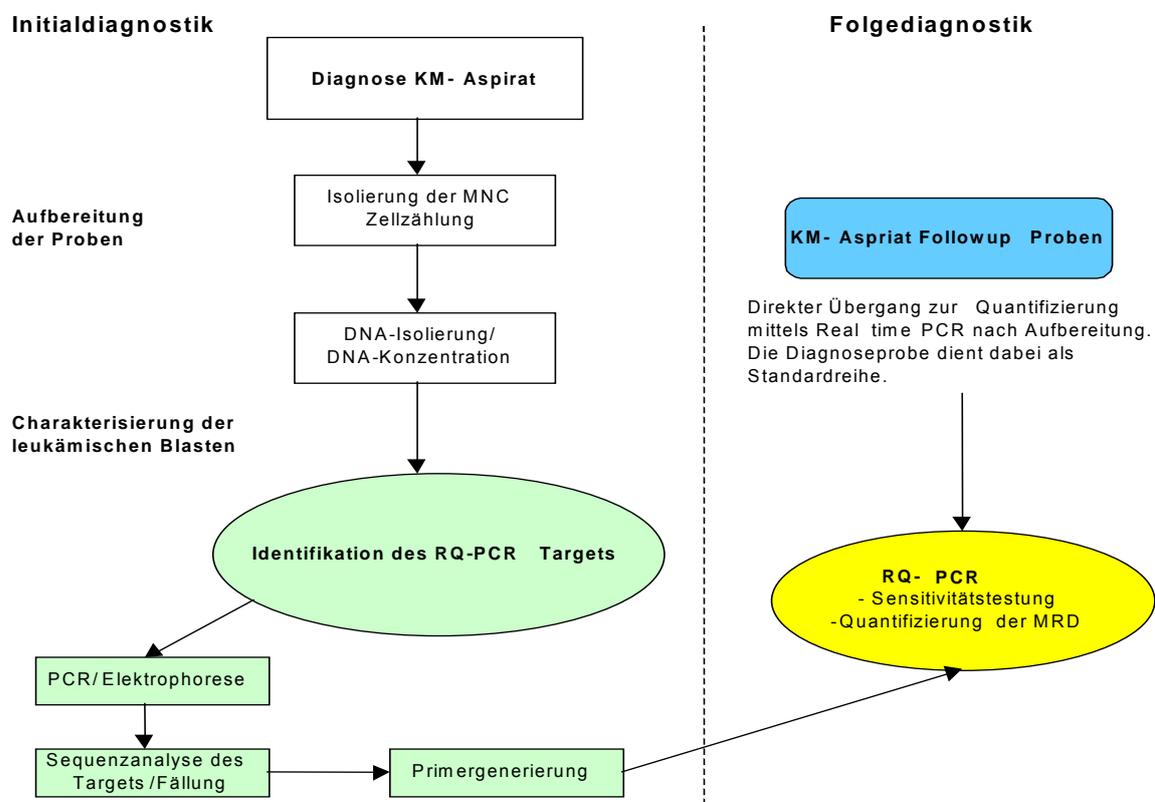
GeneAmp PCR Puffer Gold

PE Applied Biosystems

### 3. Methoden

#### 3.1 Übersicht der Methoden

In Abbildung 3 soll ein kurzer Überblick über die Bearbeitung der Proben gegeben werden. Die einzelnen Schritte werden folgend näher beschrieben.



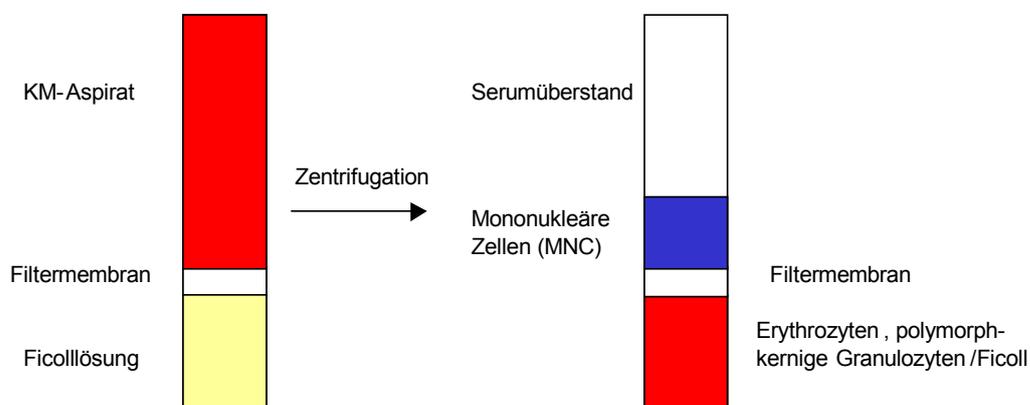
**Abbildung 3:** Flow Schema der Untersuchung der KM-Proben. Grundsätzlich lässt sich die Initialdiagnostik von der Folgediagnostik unterscheiden. Initial erfolgt die Aufbereitung der Diagnoseprobe des Patienten durch Isolierung der MNC-Zellen mit nachfolgender DNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung. Hier schliesst sich nun die Charakterisierung der leukämischen Blasten an. Zunächst muss das Rearrangement und damit das RQ-PCR Target identifiziert werden. Diesem schliesst sich die Primergenerierung an. Nachfolgende KM-Proben können sofort nach Isolierung der MNC-Zellen und DNA-Isolierung der Real Time PCR zugeführt werden. MNC= Mononukleäre Zellpopulation, RQ-PCR = Real-Time Quantitative Polymerasekettenreaktion, KM= Knochenmark, DNA= Desoxyribonukleinsäure, PCR= Polymerasekettenreaktion

## 3.2 Allgemeine Aufbereitung der Proben

### 3.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen und deren Zählung

Ziel dieser Isolierung ist, eine Zellpopulation aus Monozyten-Makrophagen/Lymphozyten unter Abtrennung der polymorphkernigen Granulozyten und Erythrozyten zu erhalten. Dadurch werden nur die der Erkrankung zugrunde liegenden Zellen in die weitere Analyse aufgenommen und störende Faktoren der restlichen Zellen (DNA, Granula Inhalt der Granulozyten) entfernt.

Die Auftrennung folgt dem Prinzip der Dichtezentrifugation. Der notwendige Dichtegradient wird durch eine Kohlehydratpolymerlösung (Ficoll) erzeugt (spezifische Dichte 1,078 g/ml). Die anschließende Zentrifugation trennt die Zellen entsprechend Ihrer Dichte auf (siehe Abbildung 4):



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Ficollreaktion. Links die Zellsuspension vor Zentrifugation, rechts nach der Dichtezentrifugation. KM=Knochenmark

An der Phasengrenze zwischen Ficoll und Serum sammeln sich die mononukleären Zellen an, da sie auf Grund ihrer geringeren Dichte, im Gegensatz zu polymorphkernigen Granulozyten und Erythrozyten nicht durch die Ficollösung diffundieren können.

## Protokoll:

Die Verwendung von Leucosep® Röhren mit eingesetzter Filtermembran führt zur erheblichen Erleichterung der Durchführung der Methodik. Insbesondere ist keine vorherige Verdünnung des KM (Knochenmark) mit PBS (Phosphate buffered Saline) nötig und keine zeitaufwendig, vorsichtige Pipettierung bei der Auftragung des KM zu beachten. Im einzelnen erfolgen folgende Arbeitsschritte:

1. 3 ml Ficolllösung in ein Leucosep® Röhren pipettieren.
2. Zentrifugation bei 1000 rpm (Rotationen pro Minute) für 1 min. zur Diffusion der Ficolllösung durch die Filtermembran.
3. Aufpipettieren des KM auf die Filtermembran (bis zu 6 ml KM auf ein 10ml Leucosep® Röhren).
4. Zentrifugation bei 1000 rpm, Bremse 6 für 10 min..
5. Absaugen des sichtbaren mononukleären Zellringes mit einer sterilen Pipette und Übertragung in ein 15 ml PP-Test Röhren.
6. Resuspension des Zellringes auf 10 ml mit PBS.
7. Zentrifugation bei 450 rpm, Bremse 6 für 12 min..
8. Abnahme des Überstandes und Resuspension des Zellpellets mit 10 ml PBS. Von dieser Suspension werden 250 µl für die Zellzählung abgenommen. Der Rest der Suspension wird wieder auf 10 ml mit PBS pipettiert.

9. Zentrifugation bei 350 rpm, Bremse 6 für 12 min.

10. Abnahme des Überstandes mit einer sterilen Pipette und Resuspension des Pellets in 1 ml PBS.

Die vorher abgenommenen 250 µl im Eppendorfgefäß werden mit 250 µl PBS suspendiert und kurz gevortext. Mit dieser Suspension erfolgt die Zellzählung im Roche Cellcounter Cobas Mikros.

Die Zellsuspension kann je nach Zellzahl auf mehrere Aliquots verteilt werden, um evt. Wiederholungen zu ermöglichen. Jedes Aliquot sollte jedoch mindestens 5 Millionen Zellen enthalten.

Diese Zellen können direkt weiterverarbeitet werden, oder bei -20° C eingefroren werden.

### **3.2.2 DNA-Extraktion**

Die DNA-Extraktion (Desoxyribonukleinsäure) erfolgt mit Kits der Firma Quiagen. Die Zugabe eines Lysepuffers und der Protease K führt zur Zerstörung der Zellen. Diese Suspension wird auf ein Eluatröhrchen mit einem speziellen Filter (Silikamembran) aufpipettiert. Die Silikamembran fungiert dabei als reversibler Bindungspartner für DNA, RNA (Ribonukleinsäure), Proteine u.a. Bestandteile der Suspension.

Die Puffer beeinflussen durch Veränderung des pH Wertes und der Salzkonzentration der Lösung die Bindungsfähigkeit der Moleküle an der Silikamembran. Die DNA bleibt auf Grund ihrer molekularen Struktur gebunden, während die restlichen Moleküle durch Reduktion des pH Wertes und der Salzkonzentration schrittweise ausgewaschen werden. Erst durch Zugabe des mitgelieferten Eluationspuffers oder einfachen HPLC-Wassers (High performance liquid chromatography), verliert die DNA ihre Bindungsfähigkeit und wird freigesetzt.

## Vorbereitungen:

- Aufbereitung der Protease K gemäß Quiagen Anleitung und Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4°C.
- Den Waschpuffern AW1 und AW2 muß je nach Kit eine entsprechende Menge 100% Ethanol zugegeben werden.
- Der AL Puffer muß im Dunkeln gelagert werden oder in eine Alufolie eingewickelt werden.
- Erwärmen eines Wasserbades auf 70°C.
- Miterwärmen des AE Puffers im Wasserbad.
- Je nach Zellzahl Wahl des entsprechenden Kit:
  - QIAmp® DNA-Blood-Mini-Kit (250) → max. 5 Millionen Zellen/ml,
  - QIAmp® DNA-Blood-Midi-Kit (20) → max. 20 Millionen Zellen/ml,
  - QIAmp® DNA-Blood-Maxi-Kit (50) → > 20 Millionen Zellen/ml.
- Die unten im Protokoll genannten Zellsuspensionsvolumina werden durch die Zugabe von PBS (Phosphate buffered Saline) erreicht.
- Eppendorfgefäße bei Mini-Kit Isolierung, 15ml PP-Test Rörchen bei Midi-Kit Isolierung oder 50ml PP-Test Rörchen bei Maxi-Kit Isolierung.

Protokoll:

Schritte	Mini-Kit	Midi-Kit	Maxi-Kit
Zellzerstörung	20µl Protease K 200µl Zellsuspension	200µl Protease 2ml Zellsuspension	500µl Protease 10ml Zellsuspension
	200µl AL Puffer	2,4ml AL Puffer	12ml AL Puffer
	Vortexen, Inkubation bei 70 °C für 10 min.	Vortexen, Inkubation bei 70 °C für 10 min.	Vortexen, Inkubation bei 70 °C für 10 min.
	200µl 100% Ethanol, Vortexen	2ml 100% Ethanol, Vortexen	10ml 100% Ethanol, Vortexen
	Aufpipettieren auf das Eluatröhrchen	Aufpipettieren auf das Eluatröhrchen	Aufpipettieren auf das Eluatröhrchen
Entfernung der Zelldebris	8000 rpm 1min.	3000 rpm 3 min.	3000 rpm 3 min.
Waschschritte	500µl AW1 Puffer	2ml AW1 Puffer	2ml AW1 Puffer
	8000 rpm 1 min.	5000 rpm 1 min.	5000 rpm 1min.
	500µl AW2 Puffer	2ml AW2 Puffer	2ml AW2 Puffer
	8000 rpm 1 min.	5000 rpm 15 min.	5000 rpm 15 min.
DNA-Eluation	200µl AE Puffer (erhitzt)	300µl AE Puffer (erhitzt)	1ml AE Puffer (erhitzt)
	8000 rpm 1 min.	5000 rpm 5 min.	5000 rpm 5 min.

**Tabelle 3:** Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der Isolierung mit QIAmp® Kits je nach Art des verwendeten Kits, durchgeführt an Hand der Anleitung der Hersteller. rpm= Rotationen pro minute, µl= Mikroliter, ml= Milliliter, DNA= Desoxyribunukleinsäure, min= Minuten

### Vorteile dieser Isolierung:

Die Vorzüge dieser Methode liegen in der schnellen und einfachen Handhabung. Insbesondere kann auf die Verwendung toxischer Substanzen wie Phenol und Chloroform verzichtet werden, und es sind keine aufwendigen Nachbearbeitungen (z.B. Alkoholfällungen) notwendig. Die erhaltene DNA ist sofort weiterverwendbar, frei von Proteinen, Nukleasen und anderen evt. inhibitorisch wirkenden Substanzen und mit einer Größe von 30 kb (Kilobasen) –50 kb optimal durch PCR ( Polymerasekettenreaktion) amplifizierbar.

Eine Ausnahme bilden mit Heparin versetzte Proben. Heparin, ein Proteoglykan, verhält sich ähnlich störend wie Proteine. Deshalb sollten vorzugsweise EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) versetzte Proben verwendet werden.

### **3.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentration**

Die DNA-Konzentration (Desoxyribonukleinsäure) wird photometrisch mit einer 100µl Quarzküvette bei 260nm mit dem Genequant® bestimmt. Vor jeder Messung erfolgt eine Kalibrierung des Gerätes mit 100µl HPLC-Wasser (High performance liquid chromatography).

### **3.3 Charakterisierung der leukämischen Blasten**

#### **3.3.1 Identifizierung des RQ-PCR-Targets**

Die einzigartige Entdeckung, wie bereits in der Einleitung erwähnt, dass während der Reifung hämatopoetischer Stammzellen der lymphatischen Reihe, die Bildung des Immunglobulinrezeptors der B-Zellen und des T-Zellrezeptors der T-Zellen auf chromosomale Organisation der kodierenden Gene, durch genetisches Rearrangement beruht, führte zu einer neuen Möglichkeit der molekulargenetischen Bestimmung der MRD (Minimale Resterkrankung) (37,38,39,56,121,122,123,124,129). Zunächst muß jeder Patient auf die Art des Targets getestet werden, da zwischen dem immunphänotypischen Subtyp der ALL (Akute lymphatische Leukämie) und dem Auftreten von spezifischen Targets keine aussagekräftige Linienspezifität existiert <sup>(57)</sup>.

##### **3.3.1.1 Primerkollektiv**

Hierbei hielten wir uns an die Empfehlungen der BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936 <sup>(41)</sup>.  
(siehe Tabellen 4,5,6)

Target	5'Ende	3'Ende	Ref-size in bp	Vorwärtsprimer (- upstream, + downstream relativ des RSS des gensegments in bp)	Reverserprimer(- upstream, + downstream relativ des RSS des gensegments in bp)	Positivkontrolle
IgH	VH 1	JH-cons	~ 340	5'-TGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGA-3' (-55)	5'-CTTACCTGAGGAGACGGTGCAA-3' (+57)	EHEB
	VH 2	JH-cons	~ 380	5'-CAATGACCAACATGGACCCTGTGGA-3' (-54)	5'-CTTACCTGAGGAGACGGTGCAA-3' (+57)	Pateint
	VH 3	JH-cons	~ 320	5'-TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC-3' (-57)	5'-CTTACCTGAGGAGACGGTGCAA-3' (+57)	DAUDI
	VH 4	JH-cons	~ 320	5'-GAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACG-3' (-48)	5'-CTTACCTGAGGAGACGGTGCAA-3' (+57)	Granta-519
	VH 5	JH-cons	~ 360	5'-CAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGC-3' (-69)	5'-CTTACCTGAGGAGACGGTGCAA-3' (+57)	L428
	VH6	JH-cons	~ 100	5'-GTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTG-3' (-63)	5'-CTTACCTGAGGAGACGGTGCAA-3' (+57)	Patient
IgK	Vk I-5'	Kde-3'	~ 431	5'-GTAGGAGACAGAGTCACCATCACT -3' (-248)	5'-CCCTTCATAGACCCTTCAGGCAC-3' (+185)	ROS 15
	Vk II-5'	Kde-3'	~ 447	5'-TGGAGAGCCGGCCTCCATCTC-3' (-258)	5'-CCCTTCATAGACCCTTCAGGCAC-3' (+185)	380
	Vk III-5'	Kde-3'	~ 429	5'-GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG-3' (-244)	5'-CCCTTCATAGACCCTTCAGGCAC-3' (+185)	REH
	VkIV-5'	Kde-3'	~ 445	5'-GGCGAGAGGGCCACCATCAAC-3' (-260)	5'-CCCTTCATAGACCCTTCAGGCAC-3' (+185)	ROS 5
	Intron-5'	Kde-3'	~ 511	5'-GTTATTCCCAAAGCTCAATCTCAAAG-3' (-326)	5'-CCCTTCATAGACCCTTCAGGCAC-3' (+185)	REH

**Tabelle 4:** Primerpaare zur Target Identifikation der IgH und IgK-Rearrangement mit Name des 5'-3'Ende, der geschätzten Größe des PCR Produktes in bp, Sequenz der verwendeten Primer und der möglichen internen Positivkontrolle mit Namen der entsprechenden Zelllinien. IgH= Immunoglobulin-Schwerkette, IgK= Immunoglobulin Kappa-Kette, bp= Basenpaare, RSS= Recombination-signal-sequence. Die Positivkontrollen sind spezifische Zelllinien, die bestellt werden können.

Target	5' Ende	3' Ende	Ref-Size in bp	Vorwärtsprimer (- upstream reaktiv des RSS des gensegments in bp)	Reverserprimer (+ downstream reaktiv des RSS des gensegments in bp)	Positivkontrolle
γTCR	Vγ1-5'	Jγ1.1/2.1	~ 329	5'-CAGGCCGACTGGGTCATCTGC-3' (-265)	5'-TTACCAGGTGAAGTTACTATGAGC-3' (+64)	MOLT-3
	Vγ1-5'	Jγ1.3/2.3	~ 533	5'-CAGGCCGACTGGGTCATCTGC-3' (-265)	5'-CCGTATATGCACAAAGCCAAATC-3' (+268)	ALL-1
	VγII-5'	Jγ1.1/2.1	~ 318	5'-CAGCCCGCCTGGAATGTGTGG-3' (-254)	5'-TTACCAGGTGAAGTTACTATGAGC-3' (+64)	PATIENT
	VγII-5'	Jγ1.3/2.3	~ 522	5'-CAGCCCGCCTGGAATGTGTGG-3' (-254)	5'-CCGTATATGCACAAAGCCAAATC-3' (+268)	HSB2
	VγIII-5'	Jγ1.3/2.3	~ 522	5'-GACATACCTTGCAAGATATCGAGC-3' (-254)	5'-CCGTATATGCACAAAGCCAAATC-3' (+268)	ALL-1
	VγIV-5'	Jγ1.1/2.1	~ 357	5'-CTGAAATATCTATTTCCAGACCAGC-3' (-290)	5'-TTACCAGGTGAAGTTACTATGAGC-3' (+68)	Patient
	VγIV-5'	Jγ1.3/2.3	~ 561	5'-CTGAAATATCTATTTCCAGACCAGC-3' (-290)	5'-CCGTATATGCACAAAGCCAAATC-3' (+268)	JURKAT
δTCR	Vδ1-5'	Jδ1-3'	~ 452	5'-ACTCAAGCCCAGTCATCAGTATCC-3' (-275)	5'-ACCTCTTCCCAGGAGTCCTCC-3' (+177)	PEER
	Vδ2-5'	Dδ3-3'	~ 501	5'-ACCAAACAGTGCCTGTGTCAATAGG-3' (-266)	5'-GAAATGGCACTTTTGCCCCTGCAG-3' (+74)	REH
	Vδ2-5'	Jδ1-3'	~ 443	5'-ACCAAACAGTGCCTGTGTCAATAGG-3' (-266)	5'-ACCTCTTCCCAGGAGTCCTCC-3' (+177)	Patient
	Vδ3-5'	Jδ1-3'	~ 440	5'-GACCAGACGGTGGCGAGTGGC-3' (-263)	5'-ACCTCTTCCCAGGAGTCCTCC-3' (+177)	Patient
	Dδ2-5'	Dδ3-3'	~ 608	5'-ACTCCATGTTCAAATAGATATAGTATT-3' (-521)	5'-GAAATGGCACTTTTGCCCCTGCAG-3' (+74)	Nalm 16
	Dδ2-5'	Jδ1-3'	~ 550	5'-ACTCCATGTTCAAATAGATATAGTATT-3' (-521)	5'-ACCTCTTCCCAGGAGTCCTCC-3' (+177)	Loucy
TAL-1	Sildb-5'	Tal1db1-3'	~ 300	5'-AAGGGGAGCTAGTGGGAGAAA-3' (-181)	5'-AGAGCCTGTCCGCAAGAA-3' (+119)	ALL-1

**Tabelle 5:** Primerpaare zur Target Identifikation der γ-TCR, δ-TCR –Rearrangement und TAL-1 Gens mit Name des 5'-3'Ende, der geschätzten Größe des PCR Produktes in bp, Sequenz der verwendeten Primer und der möglichen internen Positivkontrolle mit Namen der entsprechenden Zelllinien. TCR = T-Zellrezeptor, TAL-1 = T cell acute leukemia 1 gene, bp= Basenpaare, RSS= Recombination-signal-sequence. Die Positivkontrollen sind spezifische Zelllinien, die bestellt werden können.

Target	5'Ende	Vorwärtsprimer (- upstream relativ des RSS des gensegments in bp)
γTCR	Vγ2-3'	5'-GATCTTGCTGAAGGAAGTAA-3' (-231)
	Vγ3-3'	5'-GTACTATGACGTCTCCACCG-3' (-157)
	Vγ4-3'	5'-ATGACTCCTTACACCTCCAAGC-3' (-152)
	Vγ5-3'	5'-GACGTCTCCAACCTCAAAGGA-3' (-150)
	Vγ7-3'	5'-TCCATACTATGACCCCTACT-3' (-159)
	Vγ8-3'	5'-GTAGAAAATGCCGTCTACAC-3' (-222)

**Tabelle 6:** Primerpaare für die Erweiterung des VγI Targets, mit Sequenz des Primers. RSS= Recombination-signal-sequence.  
bp= Basenpaare

### 3.3.1.2 PCR der Targetidentifikation

Die Unterscheidung ob Zellen polyklonaler oder monoklonaler Herkunft sind, ist mit herkömmlichen PCR (Polymerasekettenreaktion) Methoden oft schwierig. Zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse hinsichtlich der Monoklonalität durch Amplifikation ähnlicher Rearrangements wird eine PCR Heteroduplex Analyse durchgeführt <sup>(54)</sup>. Ihr Prinzip beruht auf der Induktion zur Duplexbildung durch Denaturierung und Renaturierung der DNA (Desoxyribonukleinsäure) während schnellem Erhitzen und schneller Abkühlung. Klonale Produkte führen zur Homoduplex Bildung während polyklonale Produkte eher zur Heteroduplex Bildung neigen <sup>(76)</sup>. Anschließende Polyacrylamidgelelektrophorese erlaubt eine Auftrennung durch die unterschiedlichen Laufeigenschaften der Homo- und Heteroduplexe.

#### Reaktionsansatz der PCR:

Materialien	Reaktionsvolumina / Ansatz
<b>DNA Template</b>	10 ng/10 µl
<b>Master-Mix:</b>	
PCR Puffer Gold	10 µl
Magnesiumchlorid	3 µl
dNTP	4 µl
Taq- Polymerase	0,5 µl
HPLC Wasser	52,5 µl
<b>Primerpaar (100 mM)</b>	20 µl
<b>Endvolumen</b>	<b>100 µl</b>

**Tabelle 7:** Auflistung der Materialien und deren Menge/Konzentration für einen PCR Reaktionsansatz pro Primerpaar zur Target Identifikation. ng= Nanogramm, µl= Mikroliter, mM= Millimol, NTP= Nukleosidtriphosphat, PCR= Polymerasekettenreaktion, HPLC= High performance liquid chromatography

Cycler Bedingungen:

Temperatur	Zeit
Hold 1 95°C	11 min.
Hold 2 96°C	1 min.
<b>10 Cycle a:</b>	
94°C	45 sek.
55°C	30 sek.
70°C	45 sek.
<b>28 Cycle a:</b>	
90°C	30 sek.
55°C	30 sek.
70°C	45 sek.
72°C	7 min.
95°C	5 min.
Abkühlung auf 4°C	

**Tabelle 8:** Cycler Bedingungen für die PCR zur Target Identifikation. Links sind die jeweiligen Temperaturen, sowie die Cycle Anzahl aufgeführt, rechts die jeweilige Dauer des Cycle. sek= sekunden, min= Minuten

Die Proben können direkt weiterverarbeitet werden, sonst sollte eine Lagerung bei -20°C vorgenommen werden.

### 3.3.1.2 Visualisierung der klonalen PCR Produkte

Die Auftrennung der PCR-Produkte (Polymerasekettenreaktion) erfolgt durch Polyacrylamidgelelektrophorese in Hoefer Electrophoresis Unit Gelkammern, die Visualisierung durch anschließende Färbung mit Ethidiumbromid und Untersuchung des Gels unter UV-Bestrahlung.

Die Gelzusammensetzung für ein 8% Polyacrylamidgel ist in Tabelle 9 dargestellt:

Materialien	Reaktionsvolumina/Ansatz
Acrylamid	10,7 ml = 8% Gel
HPLC Wasser	25,3 ml
10 x TBE Puffer	4 ml
TEMED	40 µl
APS	180 µl
<b>Endvolumen</b>	<b>40,22 ml</b>

**Tabelle 9:** Darstellung der Materialien und deren Menge für die Zusammensetzung eines 8% Polyacrylamidgeles. Die Mengen werden den angelieferten Chemikaliengefäßen ohne Verdünnung direkt entnommen. TBE=Tris-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure, TEMED=N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin, APS=Ammoniumpersulfat, HPLC= High performance liquid chromatography, ml= Milliliter, µl= Mikroliter

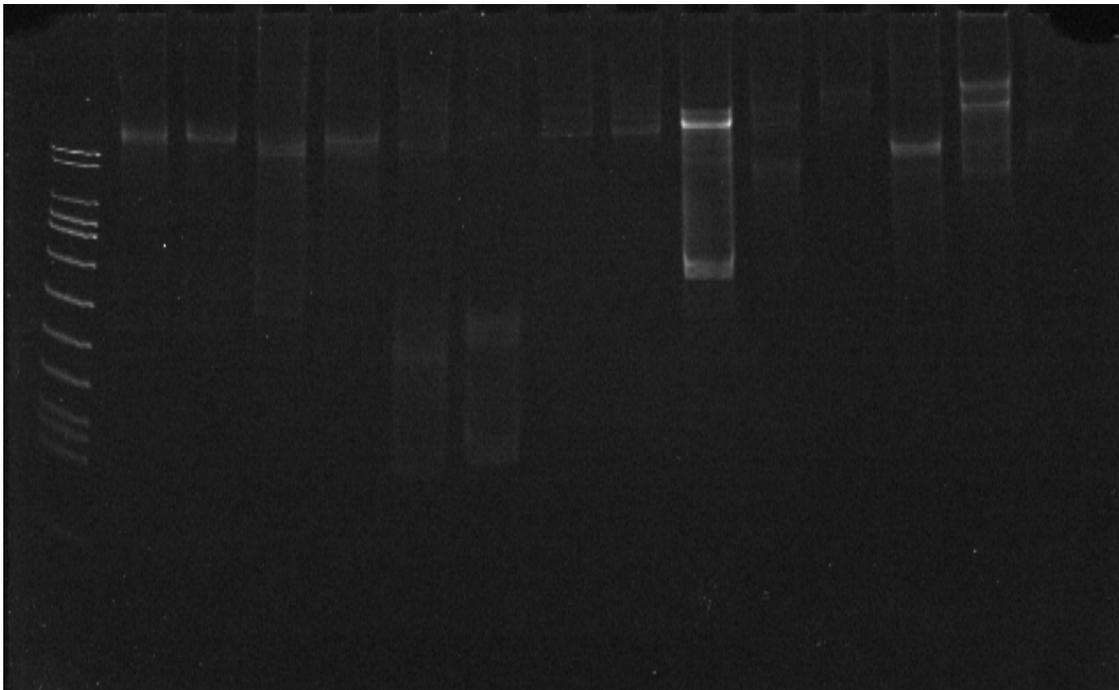
Wichtig ist, dass die Zugabe von TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin) und APS (Ammoniumpersulfat) als letztes erfolgt, da sie durch Radikalbildung die Initiatoren der Polymerisation der Lösung sind.

Diese Lösung wird in die vorher zusammengesetzten Gelkammern pipettiert. Das Einbringen des Kamms an der oberen Seite der Kammer führt zur Ausbildung kleiner Taschen, die das spätere Auftragen der Proben ermöglichen. Die Dauer der Polymerisation variiert zwischen 30 und 60 min. Eine Möglichkeit zur Überprüfung ist, dass der Kamm vorsichtig angehoben wird und dabei beobachtet wird, ob eine Taschenbildung stattgefunden hat. Ein Gel enthält 15 Taschen, sodass pro Patient zwei Gele erforderlich sind.

50µl des PCR-Ansatzes werden in neue Strips überführt und mit 15 µl Bromphenolblau versetzt. Diese 65 µl werden in die oberen Taschenleisten des polymerisierten Gels aufgetragen. Zusätzlich wird pro Gel 4µl (=0,25 µg/µl) eines DNA-High-Molekular-Weight-Marker (Desoxyribonukleinsäure) in eine Tasche pipettiert um das späterer Abschätzen der Produktgröße zu erleichtern. Die anschließende Elektrophorese findet bei 450V (Volt) für 60 min. statt, dabei erfolgt ständig eine Kühlung der Gelkammern mit Wasser, um ein Überhitzen der Gele zu vermeiden.

Die fertigen Gele werden dann nach Entfernen der umgebenden Glasplatten in eine Ethidiumbromidlösungen (1µg/ml) überführt und 10 min. eingefärbt. Während des Färbevorgangs sollte alle zwei bis drei Minuten vorsichtig die Färbeschale hin und her bewegt werden, um ein gleichmäßiges Anfärben zu ermöglichen.

Die Aufnahme der Gele erfolgt mit einer Fotodokumentationsanlage der Firma Raytest.



**Abbildung 5:** Darstellung einer Gelfotodokumentation. Links der Molekular-Weight-Marker, rechts die jeweiligen Patientenproben mit einem Beispiel einer satten monoklonalen Bande an Position 9, sowie einer schwachen monoklonalen Bande an Position 3.

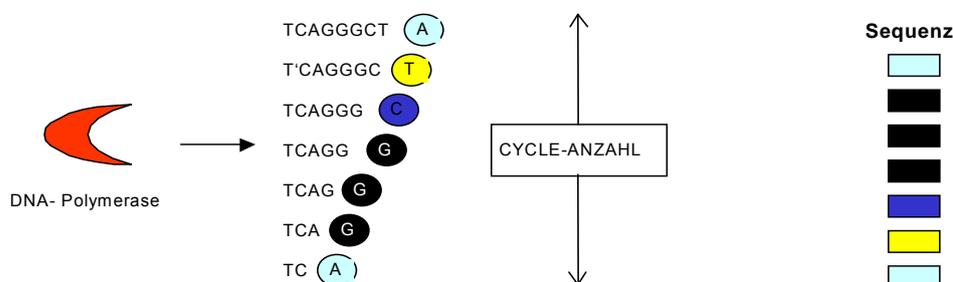
### 3.3.2 Sequenzanalyse der IgH, IgK $\delta$ TCR $\gamma$ TCR und TAL-1 Targets und Identifikation des patientenspezifischen Rearrangements.

#### 3.3.2.1 Grundprinzip der Sequenzierung

Die Sequenzanalyse eines Gens entspricht einer PCR (Polymerasekettenreaktion), allerdings wird nur ein Primer eingesetzt (Strangspezifität). Zusätzlich zu den „normalen Nukleotiden“ der DNA (Desoxyribonukleinsäure) wird eine definierte Menge an chemisch modifizierten Nukleotiden hinzugegeben. Diese chemisch modifizierten Nukleotide induzieren einen Kettenabbruch nach ihrem Einbau. Die Konzentration wird so gewählt, dass dies statistisch gesehen an jeder Position des zu sequenzierenden DNA-Stranges geschieht. Die vier verschiedenen chemisch modifizierten Basen weisen zusätzlich noch eine Fluoreszenzfarbstoff Markierung auf:

- Thymin: **ROT**
- Adenin: **GRÜN**
- Guanin: **SCHWARZ**
- Cytosin: **BLAU**

Dadurch entstehen Fragmente unterschiedlicher Größe und Fluoreszenz, die durch Kapillarelektrophorese mit einer Trennleistung von einem Nukleotidpaar mittels Laserdetektionssystem aufgetrennt und analysiert werden.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Sequenzierreaktion. Die farblich markierten Nukleotide entsprechen den chemisch modifizierten Basen, die zum Kettenabbruch führen. Diese Fragmente werden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt, die Sequenz ist bei dieser Methode damit dann sofort ablesbar. T= Thymin, C=Cytosin, G= Guanin, A= Adenin, DNA= Desoxyribonukleinsäure

Die Sequenzierung der analysierten Targets durch Elektrophorese erfolgt getrennt jeweils in Vorwärtssequenzierung und Rückwärtssequenzierung. Sie erfolgt mit den selben Primerpaaren, die für die Identifikation des RQ-PCR (Real-time Quantitative Polymerasekettenreaktion) Targets verwendet wurden, in einer Konzentration von 100 µM. Die Durchführung der Sequenzierung erfolgt mit einem Fertigkit der Firma Applied Biosystems.

Das Big Dye™ Terminator ready reaction mix Kit Version 1.1 enthält alle notwendigen Bestandteile für die Sequenzierung bereits gebrauchsfertig. Anstatt von dGTP (Desoxyguanintriphosphat) und dTTP (Desoxythymintriphosphat) enthält das Kit dITP (Desoxyinosintriphosphat), das eine bessere Bandenauflösung ermöglicht und dUTP (Desoxyuraciltriphosphat), das den Einbau des T Terminators erleichtert. Die AmpliTaq-DNA-Polymerase ist eine Variante der *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase, sie weist ihr gegenüber zwei Mutationen auf. Eine Mutation liegt direkt im aktiven Zentrum des Moleküls und führt zur einer Desensibilisierung des Enzyms gegenüber Dideoxynukleotiden. Die andere liegt in der terminalen Aminoregion und führt zum Verlust der 5´-3´ Exonuklease Aktivität des Enzyms.

(Applied Biosystems, Protokolle im Literaturverzeichnis)

### **3.3.2.2 Direktsequenzierung aus dem Target-PCR-Ansatz**

Die Direktsequenzierung aus dem PCR-Ansatz (Polymerasekettenreaktion) erbringt im Hinblick des Routineeinsatzes in der Klinik vor allem den Vorteil der Zeitersparnis und der Kostenersparnis gegenüber der Sequenzierung nach Aufreinigung des PCR-Ansatzes.

Allerdings ist hierbei zu beachten, dass die Qualität und Quantität der Sequenzierleistung durch eine Reihe von Einflüssen erhebliche Unterschiede aufweisen kann. Es kann vor allem zu einem Qualitäts und Quantitäts Verlustes kommen auf Grund von:

- residuellen dNTP's → Konkurrenz mit den chemisch modifizierten Basen,
- Salze → Ladungsveränderungen, Veränderung des Bindungscharakters der Primer, Inaktivierung der Polymerase,
- residuelle Primer → Dimerbildung, Gegenstrangsequenzierung.

Diese Methode bietet die höchsten Erfolgsaussichten bei monoklonalen PCR-Produkten.

Reaktionsansatz für die Direktsequenzierung:

Materialien	Reaktionsvolumina / Ansatz
Big Dye™ Terminator ready reaction mix	2 µl
Primer (1µM)	2 µl
DNA Template	1 µl
HPLC-Wasser	5 µl
<b>Endvolumen</b>	10 µl

**Tabelle 10:** Auflistung der Materialien und deren Volumina für einen Reaktionsansatz zur Direktsequenzierung. DNA=Desoxyribonukleinsäure, HPLC= High performance liquid chromatography, µl= Mikroliter, µM= Mikromol

### 3.3.2.3 Sequenzierung nach Aufreinigung des Target-PCR-Ansatzes

Der wesentliche Vorteil dieser Methode ist, dass durch Reinigung des PCR-Ansatzes (Polymerasekettenreaktion) vor der Sequenzierreaktion die Inhibitionsmechanismen eliminiert werden. Es kommt zur Auswaschung kleinerer und größere Störfragmente, zur Entfernung residueller dNTP (Desoxytrinukleosidtriphosphat) und Primern. Mit dieser Methode lassen sich auch schwächere Banden zuverlässig sequenzieren. Gleichzeitig kann sie auch als zweiter Versuch nach dem Scheitern der Direktsequenzierung genutzt werden. Allerdings besteht hier ein wesentlich größerer Kostenaufwand.

Die Aufreinigung erfolgt mit dem **E.N.Z.A. Cyclor Pure Kit** der Firma PEQ-LAB. Das Prinzip gleicht hierbei der DNA Isolierung. Die DNA wird an die HiBind®-Silikamatrix gebunden, die je nach pH und Salzbedingungen das reversible Binden und Freisetzen erlaubt. Proteine, residuelle dNTP's und andere Kontaminationen werden Schrittweise ausgewaschen.

(PEQ-LAB, Protokolle im Literaturverzeichnis)

#### Reaktionsansatz:

Materialien	Reaktionsvolumina/Ansatz
CP-Puffer	200 µl
PCR Ansatz	50 µl
Waschpuffer	500 µl
Elutionspuffer	40µl

**Tabelle 11:** Auflistung der Materialien und deren Volumina zur Aufreinigung einer Probe mittels des E.N.Z.A. Cyclor Pure Kits. Die Chemikalien werden unverdünnt direkt verwendet. PCR= Polymerasekettenreaktion, µl= Mikroliter

Protokoll:

1. Der PCR-Ansatz wird mit dem CP-Puffer versetzt und gevortext.
2. Diese Suspension wird auf die HiBind®-Silikamatix aufpipettiert und bei 10 000 rpm (Rotationen pro Minute) 1 min. zentrifugiert.
3. Diesem Schritt schließen sich 2 Waschrunde mit dem Waschpuffer bei 10 000 rpm für jeweils 1 min. an.
4. Trockenzentrifugation bei 10 000 rpm für 1 min.  
Eluation der DNA mit dem Eluationspuffer durch Zentrifugation bei 10 000 rpm für 1 min..
5. Trocknung des Eluats in der Vaccumzentrifuge bei 40° C für 15 min., um die DNA-Konzentrations des Eluats zu erhöhen.
6. Diesem Aufreinigen schließt sich die Sequenzierreaktion an.

Reaktionsansatz der Sequenzierreaktion nach Aufreinigung:

Materialien	Reaktionsvolumina/Ansatz
Big Dye™ Terminator ready reaction mix	2µl
Primer (1µM)	2µl
DNA Template	6µl
<b>Endvolumen</b>	10 µl

**Tabelle 12:** Auflistung der Materialien und deren Volumina für einen Reaktionsansatz zur Sequenzierreaktion nach Aufreinigung mittels E.N.Z.A. Cyclor Pure Kit. µM= Mikromol, DNA= Desoxyribonukleinsäure.

### 3.3.2.4 PCR Bedingungen der Sequenzierreaktion

Die Sequenzierreaktion erfolgt im Gene Amp PCR-System 9700 nach dem von Applied Biosystems erstellten Protokoll.

Temperatur	Zeit
Erster Hold 94°C	10 sek.
<b>25 Cycle a:</b>	
96°C	10 sek.
55°C	5 sek.
60°C	50 sek.
Zweiter Hold 72°C	5 min.
Abkühlung auf 4°C	Bis zur Weiterverarbeitung / oder Einfrieren bei -20°C

**Tabelle 13:** Darstellung der Cycle Anzahl sowie deren Dauer und Temperatur für die PCR-Sequenzierreaktion. sek= Sekunden, min= Minuten

### 3.3.2.5 Fällung des Sequenzierproduktes

Die Fällung dient der Reinigung der Probe von residuellen Basen, DNA-Polymerasen (Desoxyribonukleinsäure), Proteinen und anderen Inhibitoren. Ohne Fällung wäre eine saubere, lesbare Sequenzierung nicht möglich. Die Ethanol/Natriumazetat Präzipitation erfolgt in Anlehnung an das von Applied Biosystems beschriebene Protokoll.

### Reaktionsansatz:

Materialien	Reaktionsvolumina/Ansatz
PCR-Produkt	10 µl
HPLC Wasser	90µl
Natriumacetat (3 M)	10 µl
Ethanol 70 %	250 µl
Ethanol 100%	250 µl

**Tabelle 14:** Auflistung der Materialien und deren Volumina für die Fällung des Sequenzierproduktes. PCR= Polymerasekettenreaktion, HPLC= High performance liquid chromatography, µl= Mikroliter, M= Mol

### Protokoll:

1. Das Natriumazetat wird zunächst mit 70% Ethanol in einem Eppendorfgesäß angesetzt. Der PCR-Ansatz wird mit HPLC-Wasser (High performance liquid chromatography) versetzt.
2. Diese beiden Suspensionen werden in ein weiteres Eppendorfgesäß pipettiert und kurz gevortext.
3. Inkubation bei Raumtemperatur der Lösung für 20 min., um eine optimale Ausbeute zu gewährleisten.
4. Zentrifugation der Lösung bei 15 000 rpm (Rotationen pro Minute) für 15 min. und Entfernen des Überschusses durch einmaliges schnelles Abkippen um einen Verlust des nicht sichtbaren Pellets zu vermeiden.
5. Zugabe von 100% Ethanol und Zentrifugation für 5 min. bei 15 000 rpm.

Trocknung in der Vaccumzentrifuge bei 50°C für 15 min. um den Restethanol zu entfernen, der die Analyse im ABI™Prism Genetic Analyzer inhibiert.

6. Resuspension des Pellets in 16 µl HPLC Wasser.

### **3.3.3 Sequenzierung der PCR Produkte im ABI™Prism 310 Genetic Analyzer**

Die Analyse der in Wasser resuspendierten Pellets erfolgt im ABI™Prism 310 Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems. Die Einstellungen des Mobility Files und Matrix Files erfolgte dabei nach Vorgaben des Herstellers. Als Gel verwendeten wir das Polymer Pop4. Die Analyse erfolgte dann bei 15kV (Kilovolt) mit einer Laufzeit von 30 min. mit einer Vorerhitzung des Gels auf 50C°. (Applied Biosystems)

## **3.4 Quantifizierung der Minimalen Resterkrankung mittels Real-time-PCR**

### **3.4.1 Grundprinzipien der Real-time-PCR**

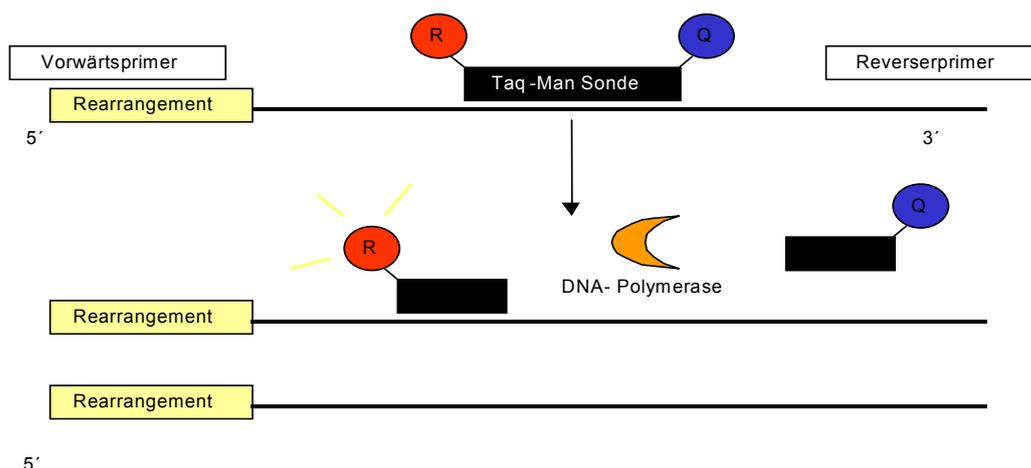
Bisherige PCR (Polymerasekettenreaktion) Methoden ermöglichten nur nach aufwendiger Nachbearbeitung der PCR-Produkte eine Quantifizierung. Zwei wesentliche Systeme wurden etabliert, um eine Quantifizierung der sich akkumulierenden PCR-Produkte während der PCR zu ermöglichen. Das eine verwendete Ethidiumbromid als Interkalator. Ethidiumbromid bindet dabei an Doppelstrang-DNA (Desoxyribonukleinsäure), durch UV Licht läßt sich die ansteigende Fluoreszenz mittels CCD-Kamera (charge coupled device) messen <sup>(62,63)</sup>. Der Nachteil dieses Systems liegt in der geringen Spezifität, da jeder DNA Doppelstrang ob spezifisch oder nicht spezifisch zu einem Signal

führt. Das andere System nutzt die 5'-3' -Exonuklease Aktivität der DNA-Polymerase <sup>(66)</sup> in Kombination mit einer Sonde, die während der PCR gespalten wird. Dieses System hat den Vorteil der wesentlich höheren Sensitivität, da nur ein Signal generiert wird, wenn ein Annealing der Primer und der Sonde an die DNA stattfindet. Trotzdem war immer noch eine relativ aufwendige Nachbearbeitung erforderlich. Die Entwicklung doppelt fluoreszenzmarkierter Sonden erlaubte eine direkte Auswertung ohne Nachbearbeitung, sowie eine Diskriminierung zwischen verschiedenen DNA Produkten <sup>(77,78,80)</sup>.

Die Sonde liegt zwischen den Vorwärtsprimer und dem Reversenprimer.

An ihrem 5' Ende ist sie mit einem fluoreszierenden Reporter markiert, an ihrem 3' Ende mit einem Quencher. Ist die Sonde intakt, so absorbiert der Quencher die Fluoreszenz des Reporters. Wird die Sonde während der PCR gespalten, so kommt es zu Trennung des Reporters vom Quencher, die Fluoreszenz kann dann als Signal gemessen werden.

Der Reverseprimer entspricht dabei dem selben wie in der initialen Targetindifikations PCR/Sequenzierreaktion. Die Sequenzen der Taq-Sonden sind dabei komplementär zur Germlinesequenz und liegen zwischen Vorwärts- und Reverseprimer.



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der RQ-PCR. Der Vorwärtsprimer wird für jeden Patienten individuell generiert. Reverserprimer und Taq-Sonde sind jeweils komplementär zur Germlinesequenz. Durch die 5'-3' Exonuklease Aktivität der DNA Polymerase wird die Taq-Sonde degradiert, dadurch entfernen sich Reporter und Quencher voneinander. Die nun freiwerdende Fluoreszenz kann detektiert werden. R=Reporter, Q=Quencher, DNA= Desoxyribonukleinsäure

### 3.4.2 Patientenspezifische Primergenerierung

Die Primergenerierung erfolgt mit Hilfe des von Applied Biosystems erstellten Computerprogramms Primerexpress. Falls hier kein Ergebnis erzielt werden kann, kann selbst mit Hilfe des Computerprogramms Oligo 6 (W.Rychilk, National Biosciences, Plymouth MN USA) ein Primer erstellt werden. Die Schmelztemperatur des Primers sollte bei ca. 60°C liegen.

### 3.4.3 Sensitivitätstestung der Primer

Die Sensitivitätstestung erfolgte nach den BIOMED1 und BIOMED2 konsensus Protokollen mit Hilfe des ABI-PRISM™ 7700 Sequenz Detector System der Firma Applied Biosystems. Die Standardverdünnungsreihe wird mit Hilfe von Spender-DNA erstellt. Der TaqMan Universal PCR-Mastermix (Polymerasekettenreaktion) ist in gebrauchsfertiger Lösung erhältlich. (Applied Biosystems, Protokoll im Literaturverzeichnis) Die Bestimmung erfolgt jeweils doppelt für jeden zu testenden Primer.

Zusätzlich wird noch eine zweifache Albuminkontrolle durchgeführt.

Materialien	Konzentration
Spender DNA	100ng/µl
Templete DNA ( Diagnoseprobe)	100ng/µl
Vorwärtsprimer	100pmol/µl
Rückwärtsprimer	100pmol/ µl
Taq-Sonde	5pmol/ µl
Albumin HPLC Wasser	2mg/ml
TaqMix	

**Tabelle 15:** Auflistung der Materialien und deren Konzentration für einen Ansatz zur Durchführung der Real-Time-Quantitative-PCR zur Primersensitivitätstestung. DNA= Desoxyribonukleinsäure, pmol= Picomol, mg= Milligramm,  $\mu$ l= Mikroliter, ng= Nanogramm, HPLC= High performance liquid chromatography

Protokoll:

1. Erstellung der Verdünnungsreihe. Initial werden 22,5 $\mu$ l Spender DNA und 2,5 $\mu$ l Patienten DNA in einem Well pipettiert. Diese Ausgangslösung ( $10^{-1}$ ) wird dann schrittweise bis  $10^{-5}$  verdünnt.
2. Erstellung des Primermix. Pro Well Ansatz werden jeweils 0,17 $\mu$ l des Vorwärts- und Rückwärtstprimers sowie 0,38 $\mu$ l der TaqSonde und 5,28 $\mu$ l HPLC-Wassers (High performamnce liquid chromatography) in einem neuen Eppendorfgefäß pipettiert.
3. Pro Well Ansatz werden 10 $\mu$ l TaqMix verwendet.
4. Diese Lösungen werden dann auf die Reaktionsplatte aufgetragen und festverschlossen. Falls es sich um eine heparinisierte KM-Probe (Knochenmark) bei dem Patienten gehandelt hat, sollte dem Primer Mix 0,2 $\mu$ l einer 0,2% BSA-Lösung (Bovine serum albumine) hinzugefügt werden und die HPLC Wasser Menge auf 5,1 $\mu$ l reduziert werden. Durch die BSA Zugabe wird die PCR inhibierende Wirkung des Heparins reduziert.

### 3.4.3 RQ-PCR Bedingungen im ABI-Prism™ 7700 Sequence Detector System

Temperatur	Zeit
Erster Hold 50°C	2 min.
Zweiter Hold 95°C	10 min.
50 Cycle a:	
95°C	15 sek.
60°C	60 sek.

**Tabelle 16:** Darstellung der Cycle Anzahl sowie deren Temperatur und Dauer für die RQ-PCR zur Primersensitivitätstestung. sek= Sekunden, min= Minuten

Die Analyse erfolgt durch das von Applied Biosystems mitgelieferte Computer Softwareprogramm.

### 3.5 Analyse der Minimalen Resterkrankung

Die Analyse der Minimalen Resterkrankung erfolgt mit dem selben Protokoll wie die Sensitivitätstestung der Primer. Die Proben werden dabei mit einer dreifachen Kontrolle gemessen. Zusätzlich erfolgt eine NTC (Non-Template Control) um etwaige Verunreinigungen der Lösungen auszuschliessen, sowie die bereits erwähnten Albuminkontrollen.

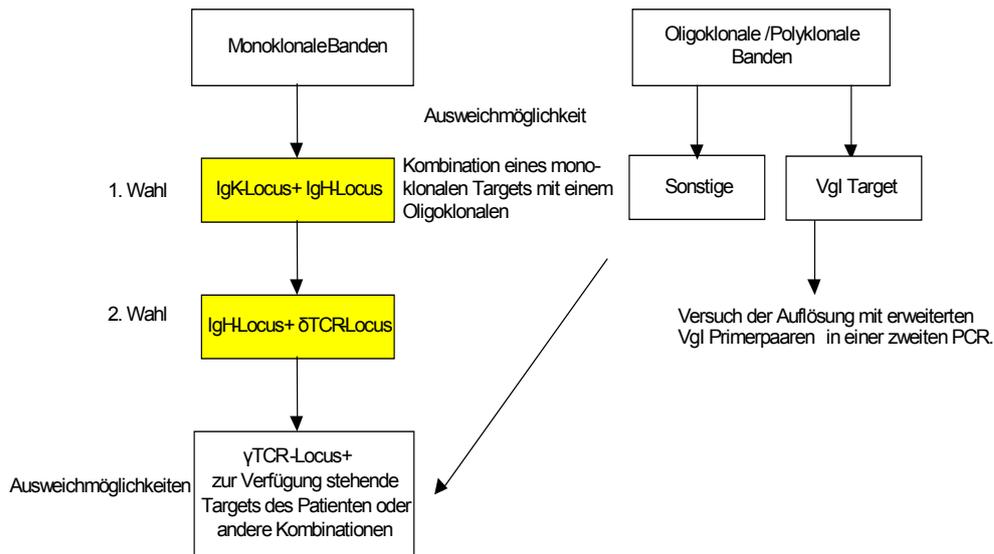
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1 10 <sup>-1</sup>	P1 10 <sup>-1</sup>	P2 10 <sup>-1</sup>	P2 10 <sup>-1</sup>	Probe P1	Probe P1	Probe P1	Probe P2	Probe P2	Probe P2	Albumin P1	Albumin P2
B	P1 10 <sup>-2</sup>	P1 10 <sup>-2</sup>	P2 10 <sup>-2</sup>	P2 10 <sup>-2</sup>								
C	P1 10 <sup>-3</sup>	P1 10 <sup>-3</sup>	P2 10 <sup>-3</sup>	P2 10 <sup>-3</sup>								
D	P1 10 <sup>-4</sup>	P1 10 <sup>-4</sup>	P2 10 <sup>-4</sup>	P2 10 <sup>-4</sup>								
E	P1 10 <sup>-5</sup>	P1 10 <sup>-5</sup>	P2 10 <sup>-5</sup>	P2 10 <sup>-5</sup>								
F	0	0	0	0								
G	NTC	NTC	NTC	NTC								
H	Alb	Alb	Alb	Alb	Alb	Alb						

**Abbildung 8:** Darstellung einer fertig pipettieren Reaktionsplatte in der eine Nachprobe eines Patienten mit zwei Targets gemessen wird. Alb= Albumin, NTC= Non Template Control

### 3.6 Strategische Kriterien der Target Auswahl

Die differenzierte Auswahl des späteren RQ-PCR (Real-time Quantitative Polymerasekettenreaktion) Targets ist zur Vermeidung falscher negativer Ergebnisse durch klonale Evolution der Zellen und sekundären Veränderungen der Rearrangementstruktur durch persistierende Aktivität der V(D)J-Rekombinase sehr wichtig. Insbesondere scheinen B-Vorläufer ALL (Akute lymphatische Leukämie) von diesen sekundären Veränderungen betroffen zu sein <sup>(17,118,119)</sup>.

Rearrangements im Bereich des IgK-Lokus (Immunglobulinkappa) und DH-JH-Rearrangements im Bereich des IgH-Lokus (Immunglobulinschwerkette) gelten als besonders stabil. Grundsätzlich gilt, je monoklonarer die Bande auf dem Gel erscheint, um so geringer ist die Wahrscheinlichkeit sekundärer struktureller Veränderungen <sup>(125)</sup>.



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung der primären Target-Auswahl. Rechts beim Vorliegen monoklonaler Banden an Hand des Gels, links wenn diese Banden oligoklonal bzw. polyklonal erscheinen. IgK= Immunglobulinkappa, IgH= Immunglobulinschwerkette, TCR= T-Zellrezeptor

#### **4. Patientenkollektiv**

Die in dem Untersuchungszeitraum gemessenen Patienten stammen nicht nur aus dem Transplantationszentrum der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen sondern auch aus folgenden Transplantationszentren:

- Universitätskinderklinik Berlin
- Universitätsklinik Dresden
- Kinderklinik Düsseldorf
- Universitätsklinik für Kinder und Jugendliche Erlangen
- Universitätsklinik Essen
- Universitätskinderklinik Freiburg
- Medizinische Hochschule Hannover – Kinderklinik
- Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena – Klinik für Kinder- und Jugendmedizin „Jussuf Ibrahim“
- Von Haunersche Klinik München
- Kinderklinik der Poliklinik der Ludwigs-Maximilians-Universität München
- Kinderklinik der TU München
- Universitätskinderklinik und Poliklinik Ulm

Ein Überblick über wichtige Daten der Patienten wird in der Tabelle 17 gegeben. Diese Daten stellen die Grundlage unserer Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit.

Im folgendem einige Erläuterungen zu der Tabelle 17:

Insgesamt konnte bei allen 100 Patienten eine initiale Target Charakterisierung vorgenommen werden, sowie folgende Messungen der MRD (Minimal residual

disease = Minimalen Resterkrankung) im Knochenmark an mindestens einem Tag. Die Messung der MRD erfolgte ausschließlich im Knochenmark. Alle Patienten wurden allogene transplantiert. 33 wurden in CR1 (Complete Remission) transplantiert, 51 in CR2 und 16 Patienten in >CR2. 10 Patienten erhielten eine Haplo-Identische, 39 eine MUD (Matched unrelated donor), 36 eine MFD (Matched family donor), 4 eine MMFD (Mismatched family donor) und 11 eine MMUD (Mismatched unrelated donor)– Transplantation. Insgesamt wurden 32 Transplantate T-Zelldepletiert. 25 Patienten erhielten eine Immuntherapie auf der Basis eines IMC (Increasing mixed Chimerism). Desweiteren enthält die Tabelle Informationen über den ALL-Subtyp, das Konditionierungsschema, den Chimärismus, die GVHD (Graft-Versus-Host-Disease), die Initialen Targets, den Follow-up Zeitraum, die MRD Gesamtgruppe eines Patienten und den aktuellen Zustand des Patienten zum Zeitpunkt des Abschlusses der Untersuchung, sowie weitere Charakteristika. Bei allen Patienten hatte ein Target eine Sensitivität von mindestens  $1 \times 10^{-4}$ , 31 Patienten wiesen ein Target auf, 69 zwei.

Jedem Patient wurde ein MRD Gesamtstatus zugeordnet. Die Zuordnung erfolgte anhand des höchst gemessenen Wertes innerhalb des Untersuchungszeitraums. Die Einteilung der MRD Last wurde wie folgt definiert:

- MRD High bei einer Blastenlast von  $\geq 1 \times 10^{-3}$
- MRD Low bei einer Blastenlast von  $< 1 \times 10^{-3} \geq 1 \times 10^{-4}$
- MRD Positiv bei einer Blastenlast von  $< 1 \times 10^{-4}$
- MRD Negativ bei keinem Blastennachweis = 0

Zusätzlich wurde jede gemessene Probe ebenfalls einer dieser Gruppen zugeordnet.

UPN	G	CR	ALL-Typ	Donor	Konditionierung	Tdepl	CH	MRD G	ITH	GvHD Ev.	St.	FU d	Target 1	Target2	Sens.1	Sens. 2
1272	m	CR 2	c-ALL	MUD	TBI+Eto+Cyc+ATG	Nein	CC	high		Nein	190 Rlps	794	Vk2-Kde	keinen	1,00E-05	
1282	m	CR >2	B-ALL	MUD	TBI+Eto+Cyc	Nein	CC	pos.		Ja	45 Rlps	45	Vg1-Jg1.3/2.3	keinen	1,00E-05	
1566	m	CR >2	c-ALL	MMFD	Bus+Cyc+Thio+OKT3	Ja	CC	neg.		Nein	31 TRM	31	Vk3-Kde	Vg2-Jg1.3/2.1	1,00E-05	1,00E-05
1615	w	CR 2	c-ALL	MUD	TBI+Thio+Eto+ATG	Nein	CC	neg.		Ja	Rem.	1120	Vd2-Dd3	keinen	1,00E-04	
1718	w	CR 2	c-ALL	MFD	TBI+Thio+Eto+ATG	Ja	CC	low		Nein	Rem.	1216	VH4-JH4	keinen	1,00E-04	
1737	w	CR 2	c-ALL	MMUD	TBI+Thio+Eto+ATG	Ja	IMC	neg.	CSA	Nein	Rem.	1469	Vk1-Kde	Vd2-Dd3	1,00E-05	1,00E-05
1753	w	CR 1	T-ALL	MFD	TBI+Eto	Nein	CC	neg.		Ja	Rem.	1463	Vg1-Jg1.3/2.1	Dd2-Jd1	1,00E-05	1,00E-05
1756	w	CR >2	c-ALL	Haplo	Bus+Cyc+Flu+OKT3	Ja	IMC	high	DLI	Ja	132 Rlps	133	Vk4-Kde	keinen	1,00E-04	
1776	w	CR 2	B-ALL	MUD	Bus+Cyc+Eto+ATG	Ja	IMC	high	DLI	Nein	133 Rlps	133	Dd2-Dd3	keinen	1,00E-04	
1793	m	CR 2	c-ALL	MUD	TBI+Thio+Eto+ATG	Ja	IMC	high	DLI	Nein	182 Rlps	182	VH3-JH5	VH4-JH5	1,00E-04	1,00E-04
1816	m	CR 2	c-ALL	MFD	TBI+Eto	Nein	DMC	pos.		Ja	Rem.	1112	Vd2-Dd3	keinen	1,00E-04	
1820	m	CR >2	c-ALL	MMUD	TBI+Cyc+Eto	Ja	CC	high		Ja	100 Rlps	386	Vg1-Jg1.3/2.1	Vg2-Jg1.3/2.1	1,00E-04	1,00E-05
1825	m	CR 2	B-ALL	MFD	TBI+Eto	Nein	CC	neg.		Ja	Rem.	1121	Vg2-Jg1.3/2.1	Vd2-Dd3	1,00E-03	1,00E-03
1829	m	CR >2	c-ALL	MFD	TBI+Flu	Ja	DMC	low		Ja	Rlps	209	VH4-JH4	Vd2-Dd3	1,00E-05	1,00E-05
1836	m	CR 2	c-ALL	MFD	TBI+Eto	Nein	LMC	neg.		Ja	Rem.	1087	Vk3-Kde	Vg1-Jg1.3/2.1	1,00E-04	1,00E-05
1839	m	CR 2	c-ALL	MFD	TBI+Eto	Nein	DMC	neg.		Ja	245 TRM	245	VH3-JH5	Dd2-Dd3	1,00E-05	1,00E-03
1849	w	CR >2	c-ALL	MUD	TBI+Flu	Ja	DMC	neg.		Ja	Rem.	1113	VH3-JH6	intron5-Kde	1,00E-05	1,00E-05
1882	w	CR 2	B-ALL	MFD	TBI+Eto	Nein	CC	high		Ja	94 Rlps	94	Vd2-Jd1	VH4-JH6	1,00E-04	1,00E-03
1888	m	CR 1	T-ALL	MUD	TBI+Thio+Eto+ATG	Ja	IMC	neg.	DLI	Nein	Rem.	1280	Vg1-Jg1.1	keinen	1,00E-04	
1889	w	CR 1	T-ALL	MUD	TBI+Eto	Nein	CC	low		Nein	Rem.	973	Vd1-Jd1	Dd2-Jd1	1,00E-04	1,00E-04
1891	w	CR 2	c-ALL	MFD	TBI+Eto	Nein	DMC	high		Ja	352 Rlps	352	VH3-JH4	Vg1-Jg1.3/2.1	1,00E-05	1,00E-05
1906	m	CR 1	c-ALL	MFD	TBI+Eto	Nein	LMC	neg.		Ja	Rem.	1079	VH3-JH6	Vd2-Dd3	1,00E-05	1,00E-03
1908	m	CR 1	T-ALL	MFD	TBI+Eto	Nein	CC	neg.		Ja	Rem.	1116	Vg3-Jg1.3/2.1	keinen	1,00E-04	
1913	m	CR 1	T-ALL	MMFD	TBI+Thio+Eto+ATG	Ja	LMC	neg.		Ja	Rem.	1238	Vg3-Jg1.3/2.3	Vd1-Jd1	1,00E-05	1,00E-05
1965	m	CR >2	c-ALL	MUD	TBI+Thio+Eto+ATG	Ja	IMC	high	DLI	Nein	617 Rlps	617	VH1-JH6	Vd2-Dd3	1,00E-04	1,00E-04
1969	m	CR 2	c-ALL	MUD	TBI+Eto	Nein	LMC	high		Ja	113 Rlps	113	VH3-JH5	Vk1-Kde	1,00E-02	1,00E-05
1980	w	CR 2	B-ALL	MFD	TBI+Eto	Nein	LMC	neg.		Nein	Rem.	1066	VH3-JH5	Vd2-Dd3	1,00E-05	1,00E-05
1991	m	CR 1	c-ALL	MUD	TBI+Cyc+Eto	Nein	LMC	neg.		Ja	352 TRM	352	Vg1-Jg1.1/2.1	Vd2-Dd3	1,00E-05	1,00E-05
2011	w	CR >2	c-ALL	MFD	TBI+Eto+Cyc	Nein	CC	neg.		Ja	134 TRM	134	Vg1-Jg1.3/2.3	Vd2-Dd3	1,00E-03	1,00E-04
2014	m	CR 2	c-ALL	MUD	TBI+Eto+ALG	Nein	IMC	pos.	CSA	Ja	159 TRM	159	VH4-JH6	Vg1-Jg1.1/2.1	1,00E-05	1,00E-05
2020	m	CR 2	c-ALL	MUD	TBI+Eto+ATG	Nein	IMC	neg.	DLI	Nein	96 TRM	96	VH4-JH4	Vg1-Jg1.3/2.1	1,00E-05	1,00E-05
2043	m	CR 1	c-ALL	MUD	TBI+Eto+Cyc+Pred+OKT3	Ja	LMC	high		Nein	523 Rlps	523	Vg1.Jg1.1/2.1	keinen	1,00E-04	

2049	m	CR 2	c-ALL MFD	TBI+Eto	Nein	LMC	neg.		Ja	Rem.	882	VH4-JH4	keinen	1,00E-05	
2050	m	CR >2	c-ALL Haplo	TBI+Thio+Eto+ATG	Ja	CC	neg.		Nein	Rem.	765	VH3-JH4	Vk2-Kde	1,00E-04	1,00E-04
2052	m	CR 2	c-ALL Haplo	TBI+Eto+ATG	Ja	IMC	neg.	DLI	Nein	49 Abs	49	Vk1-Kde	Vg1-Jg1.3/2.3	1,00E-04	1,00E-04
2056	m	CR 1	c-ALL MMUD	Eto+Thio+ATG	Ja	IMC	high	DLI	Nein	65 Rlps	65	VH3-JH6	Vd2-Dd3	1,00E-04	1,00E-04
2057	w	CR 2	B-ALL MUD	TBI+Thio+Eto+ATG	Nein	IMC	neg.	DLI	Ja	235 TRM	235	VH1-JH6	Vd1-Kde	1,00E-02	1,00E-04
2059	m	CR 1	T-ALL MUD	TBI+Eto+Cyc+ATG	Nein	IMC	neg.	DLI	Nein	Rem.	983	Vg3-Jg1.3/2.3	Vg5-1.3/2.3	1,00E-03	1,00E-04
2060	w	CR 1	T-ALL MFD	TBI+Eto	Nein	LMC	neg.		Ja	Rem.	870	Dd2-Dd3	Dd2-Jd1	1,00E-05	1,00E-05
2064	w	CR 2	c-ALL MFD	TBI+Eto+ATG	Ja	IMC	pos.	DLI	Nein	Rem.	944	IGH-FR3	IGH-FR3/2	1,00E-04	1,00E-05
2071	w	CR 2	c-ALL MMUD	TBI+Thio+Eto+ATG	Nein	DMC	pos.		Nein	72 TRM	72	VH4-JH4	Vg1-Jg1.3/2.1	1,00E-04	1,00E-04
2077	m	CR 1	T-ALL MUD	TBI+Thio+Eto+ATG	Nein	LMC	neg.		Nein	Rem.	825	VH1-JH1	Vd1-Jd1	1,00E-05	1,00E-05
2087	m	CR 1	T-ALL MFD	TBI+Eto	Nein	DMC	neg.		Ja	Rem.	772	Vg1-Jg1.3/2.1	Vd1-Jd1	1,00E-03	1,00E-05
2101	m	CR 1	c-ALL MFD	TBI+Eto+Flu+OKT3	Nein	LMC	neg.		Nein	Rem.	948	Vk1-Kde	Vk2-Kde	1,00E-03	1,00E-03
2102	m	CR 1	c-ALL MMFD	TBI+Eto+Cyc+OKT3	Nein	CC	neg.		Ja	39 TRM	39	VH4-JH6	keinen	1,00E-04	
2105	m	CR 2	T-ALL MFD	TBI+Eto	Nein	DMC	high		Ja	182 Rlps	182	Vg3-Jg1.3/2.1	Vg3-Jg1.3/2.3	1,00E-04	1,00E-04
2114	m	CR 2	c-ALL Haplo	TBI Flu ATG Eto	Ja	IMC	high	DLI	Nein	117 Rlps	117	Vk2-Kde	keinen	1,00E-05	
2116	m	CR 2	c-ALL MMFD	TBI+Eto+Flu+OKT3	Ja	IMC	high	DLI	Nein	201 Rlps	201	Vg2-Jg1.3/2.3	Dd2-Dd3	1,00E-04	1,00E-05
2119	m	CR 1	c-ALL MFD	TBI+Eto	Nein	IMC	high	CSA	Nein	421 Rlps	421	Vk2-Kde	Vd2-Dd3	1,00E-05	1,00E-05
2122	m	CR >2	c-ALL MUD	TBI+Eto	Ja	CC	high		Nein	152 Rlps	152	VH1-JH4	keinen	1,00E-05	
2123	m	CR 1	c-ALL MUD	TBI+Eto+ATG	Nein	CC	neg.		Ja	Rem.	754	Vd1-Jd1	Dd2-Jd1	1,00E-04	1,00E-04
2125	m	CR >2	B-ALL Haplo	TBI+Thio+Eto+ATG+	Ja	LMC	pos.		Nein	115 TRM	115	Vd2-Dd3	keinen	1,00E-04	
2130	m	CR 1	T-ALL MMUD	TBI + Eto	Nein	LMC	high		Ja	32 Rlps	32	Vd1-Jd1	keinen	1,00E-05	
2164	m	CR 1	c-ALL MUD	TBI+Eto+ATG	Nein	CC	neg.		Nein	Rem.	724	Vk2-Kde	keinen	1,00E-03	
2208	m	CR 1	T-ALL Haplo	Thio+Eto+Flu+ATG	Nein	CC	neg.		Ja	Rem.	640	Vg1-Jg1.3/2.3	keinen	1,00E-04	
2217	m	CR >2	B-ALL MMUD	TBI+Eto+ATG	Ja	CC	high		Ja	100 Rlps	100	Vk1-Kde	Vg1-Jg1.1/2.1	1,00E-04	1,00E-05
2231	w	CR 2	B-ALL MFD	TBI+Eto	Nein	LMC	neg.		Ja	275 Rlps	275	VH2-JH4	Vk2-Kde	1,00E-05	1,00E-04
2237	m	CR >2	B-ALL MFD	TBI+Eto	Nein	LMC	high		Ja	492 Rlps	492	Vg1-Jg1.3/2.1	Vg2-Jg1.1/2.1	1,00E-04	1,00E-05
2239	m	CR >2	c-ALL MUD	TBI+Eto+ATG	Ja	CC	pos.		Ja	Rem.	811	VH4-JH6	Dd2-Dd3	1,00E-05	1,00E-04
2244	m	CR >2	B-ALL MUD	TBI+Thio+Eto+ATG	Ja	IMC	neg.	DLI	Ja	Rem.	637	Vg1-Jg1.3/2.3	keinen	1,00E-04	
2250	m	CR 2	c-ALL MUD	TBI+Eto+ATG	Ja	LMC	neg.		Ja	102 TRM	102	Vd2-Dd3	keinen	1,00E-05	
2266	w	CR 2	c-ALL Haplo	TBI+Fludara+ATG+Eto	Ja	IMC	high	DLI	Nein	41 Rlps	41	VH4-JH5	Vg1-Jg1.3/2.1	1,00E-05	1,00E-04
2273	m	CR 1	B-ALL MMUD	TBI+Eto+Cyc+OKT3	Nein	IMC	high	DLI	Ja	135 Rlps	135	VH3-JH4	keinen	1,00E-04	
2276	w	CR 2	B-ALL MFD	TBI+Eto	Nein	DMC	neg.		Ja	Rem.	378	VH4-JH6	Vg2-Jg1.3/2.1	1,00E-05	1,00E-04
2287	m	CR 1	c-ALL Haplo	TBI+Thio+Eto+ATG	Nein	LMC	pos.		Nein	165 TRM	165	Vg1-Jg1.3/2.1	Vd1-Jd1	1,00E-04	1,00E-05
2295	w	CR 1	c-ALL MUD	TBI+Eto+ATG	Nein	CC	high		Nein	251 Rlps	251	VH3-JH3	Vg3-Jg1.3/2.3	1,00E-04	1,00E-05

2298	m	CR 1	T-ALL Haplo	TBI+Flu+ATG+Eto	Ja	LMC	high		Nein	419	Rlps	419	Vg4-Jg1.3/2.1	Dd2-Jd1	1,00E-04	1,00E-05
2311	w	CR 1	B-ALL MFD	TBI+Eto	Ja	CC	neg.		Nein		Rem.	700	VH3-JH4	Vg1-Jg1.3/2.3	1,00E-03	1,00E-03
2324	w	CR 1	T-ALL MMUD	TBI+Eto+ATG	Nein	CC	neg.		Ja		Rem.	104	Vg3-Jg1.3	Dd2-Dd3	1,00E-05	1,00E-04
2342	m	CR 2	T-ALL MUD	TBI+Eto+ATG	Nein	LMC	neg.		Ja		Rem.	658	Vg1-Jg1.3/2.1	Vg2-Jg1.3/2.1	1,00E-02	1,00E-05
2346	w	CR 1	c-ALL MUD	TBI+Eto+ATG	Nein	LMC	high		Nein	106	Rlps	106	Vd2-Jd1	Vd3-Jd1	1,00E-05	1,00E-04
2366	m	CR 2	c-ALL MFD	TBI+Eto	Nein	LMC	low		Nein		Rem.	481	VH2-D6	Vg2-Jg1.2/2.1	1,00E-04	1,00E-04
2413	m	CR 2	c-ALL MFD	Bu-Cyc	Nein	IMC	high	DLI	Nein	346	Rlps	346	Vd2-Dd3	V1-JG12	1,00E-04	1,00E-04
2432	m	CR 2	c-ALL MUD	TBI+Eto	Nein	CC	neg.		Ja		Rem.	588	VH3-JH6	VH4-JH6	1,00E-04	1,00E-04
2433	m	CR 2	T-ALL MUD	TBI+Eto+ATG	Nein	CC	neg.		Nein		Rem.	125	Vg3-Jg1.3/2.3	Vd1-Jd1	1,00E-05	1,00E-03
2445	m	CR 2	B-ALL MUD	TBI+Eto+ATG	Ja	IMC	neg.	DLI	Nein	386	Rlps	386	VH1-JH4	Vd2-Dd3	1,00E-05	1,00E-04
2451	m	CR 2	c-ALL Haplo	TBI+Eto+Flu+ATG	Ja	LMC	high		Ja	319	Rlps	319	Dd2-Dd3	keinen	1,00E-05	
2452	m	CR 2	B-ALL MFD	TBI+Eto	Nein	CC	neg.		Ja		Rem.	173	VH4-JH6	keinen	1,00E-05	
2478	w	CR 1	B-ALL MFD	TBI+Eto	Nein	CC	high		Nein	142	Rlps	142	VH2-JH6	Vg2-Jg1.3/2.3	1,00E-05	1,00E-04
2488	w	CR 2	c-ALL MFD	TBI+ Ltopo	Ja	DMC	neg.		Ja		Rem.	482	VH5-JH4	V2-D3A	1,00E-05	1,00E-05
2491	m	CR >2	c-ALL MFD	TBI+Eto	Nein	LMC	neg.		Ja		Rem.	379	VH1-JH5	Vd2-Dd3	1,00E-03	1,00E-04
2495	w	CR 2	c-ALL MUD	TBI+Eto+ATG	Nein	DMC	pos.		Nein		Rem.	468	VH1-JH6	Vg1-Jg1.3/2.1	1,00E-05	1,00E-03
2504	w	CR 1	c-ALL MFD	TBI+Eto	Nein	CC	neg.		Ja		Rem.	474	VK3-Kde	Vg2-Jg1.3	1,00E-04	1,00E-03
2541	m	CR 2	T-ALL MMUD	Eto+TBI+ATG	Nein	CC	neg.		Ja		Rem.	363	Vg2-Jg1.3/2.3	keinen	1,00E-04	
2560	m	CR 2	B-ALL MUD	TBI+Eto+ATG	Nein	CC	high		Ja	214	Rlps	214	VH4-JH4	keinen	1,00E-04	
2562	m	CR 2	c-ALL MUD	TBI+Eto+ATG	Ja	CC	neg.		Nein		Rem.	105	VH3-JH4	Vk4-Kde	1,00E-05	1,00E-04
2582	m	CR 2	c-ALL MUD	TBI+Eto+ATG	Nein	CC	high		Nein	162	Rlps	162	VH5-JH4	Igk3-A	1,00E-05	1,00E-04
2610	m	CR 1	c-ALL MMUD	Eto ATG	Nein	CC	pos.		Nein		Rem.	348	Vg2-Jg1.3/2.1	VH3-JH4	1,00E-04	1,00E-05
2613	m	CR 2	c-ALL MFD	TBI Eto	Nein	CC	high		Nein	60	Rlps	60	Vg1-Jg1.3/2.1	keinen	1,00E-05	
2617	m	CR 1	c-ALL MFD	TBI+Eto	Nein	DMC	high		Ja	204	Rlps	204	Vk2-Kde	keinen	1,00E-03	
2643	w	CR 1	c-ALL MUD	TBI+Eto+ATG	Nein	CC	neg.		Nein		Rem.	154	VH3-JH6	keinen	1,00E-05	
2670	w	CR 2	c-ALL MUD	TBI+Eto+ATG	Nein	CC	pos.		Nein		Rem.	75	VH2-JH4	VH3-JH4	1,00E-05	1,00E-05
2671	m	CR 2	c-ALL MFD	TBI+Eto	Nein	IMC	neg.	CSA	Nein		Rem.	275	VKII-Kde	keinen	1,00E-04	
2688	m	CR 2	c-ALL MMUD	TBI+Eto+ATG	Nein	IMC	neg.	DLI	Nein		Rem.	225	VH1-JH5	Dd2-Dd3	1,00E-04	1,00E-03
2701	w	CR 2	c-ALL MFD	TBI+Eto	Nein	LMC	neg.		Nein		Rem.	155	VH5-JH4	V1-JP12	1,00E-04	1,00E-05
2743	w	CR 2	c-ALL MUD	TBI+Eto+ATG	Nein	CC	low		Nein		Rem.	64	VH1-JH1	keinen	1,00E-04	
2750	w	CR 1	c-ALL MUD	TBI+Eto+ATG	Nein	LMC	pos.		Nein		Rem.	29	VH3-JH1	Vd2-Dd3	1,00E-04	1,00E-04
2760	m	CR 2	B-ALL MUD	TBI+Eto+ATG	Nein	CC	high		Ja	95	Rlps	95	Igk	Igk-3-B	1,00E-04	1,00E-04
2788	m	CR 2	c-ALL MFD	TBI+Eto	Nein	IMC	high	DLI	Nein	151	Rlps	151	VG2-J1	VG4-J1	1,00E-05	1,00E-04
2794	w	CR 2	c-ALL MUD	TBI+Eto+ATG	Nein	IMC	neg.	CSA	Ja		Rem.	62	VH1-JH4	keinen	1,00E-04	

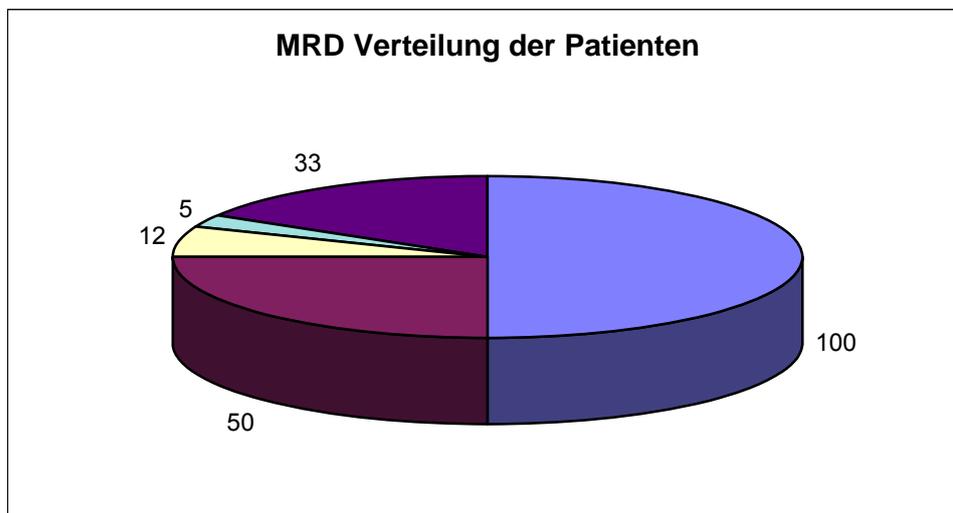
**Tabelle 17:** Übersicht über die Patienten. Darstellung der wichtigsten Charakteristika der analysierten Patienten. UPN= Verschlüsselungsnummer des Patienten, G= Geschlecht, m= männlich, w= weiblich, CR= Complete Remission, ALL= Akute lymphatische Leukämie, MFD= Matched family donor, MUD= Matched unrelated donor, MMFD= Mismatched family donor, MMUD= Mismatched unrelated donor, TBI= Total body irradiation, Eto= Etoposid, Bus= Busulfan, Flu= Fludarabin, Pred= Prednisolon, Cyc=Cyclophosphamid, ATG= Antithymozytenglobulin, ALG= Antilymphozytenglobulin, OKT 3= Antikörper, Thio= Thiotepa, Tdepl= T-Zelldepletion, CH= Chimerismus, CC= Kompletter Chimerismus, IMC= Zunehmend gemischter Chimerismus, DMC= Abnehmend gemischter Chimerismus, LMC= Konstant gemischter Chimerismus, MRD G= Minimale Resterkrankung Gesamtgruppe, neg= negativ, pos= positiv ITH= Immuntherapie, CSA= Cyclosporin A, DLI= Donor lymphozyten Infusion, GVHD= Graft Versus Host Disease, Ev= Tag des Events, St= Status, Rem= Remission, Rlps= Rezidiv, TRM= Treatment related mortality, Abs= Abstoßung, FU d= Follow-up in Tagen nach SZT, Igk= Immunglobulin kappa, Sens= Sensitivität.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Allgemeiner Überblick der Patienten

Im folgenden soll ein Überblick über die Patienten gegeben werden.

#### 5.1.1 MRD Verteilung des Patientenkollektivs

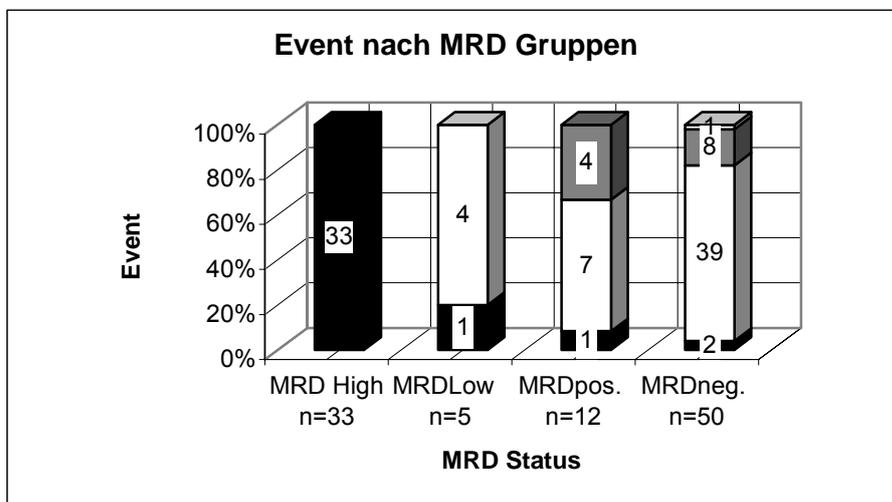


**Abbildung 10:** Darstellung der Verteilung der Patienten. 100 = Gesamtpatienten, 50= MRD negative Patienten, 33 = MRD High, 12= MRD positiv, 5= MRD Low  
MRD= Minimale Resterkrankung

Abbildung 10 zeigt die Verteilung der einzelnen MRD (Minimale Resterkrankung) Gesamtgruppen. Insgesamt konnten 100 Patienten gemessen werden. Von diesen Patienten waren 50 Patienten im gesamten Verlauf MRD negativ d.h. keine MRD Last nachweisbar im Untersuchungszeitraum, 33 Patienten wiesen zu einem Zeitpunkt bei einer Messung eine MRD Last  $\geq 1 \times 10^{-3}$  auf = MRD High, 12 Patienten hatten zu keinem Zeitpunkt der Messung eine MRD Last von größer  $< 1 \times 10^{-4}$  = MRD pos. und 5 Patienten hatten zu

keinem Zeitpunkt der Messung eine MRD Last von größer  $< 1 \times 10^{-3} / \geq 1 \times 10^{-4} =$  MRD Low. Die Zuteilung zu der jeweiligen MRD Gesamtgruppe erfolgte damit durch den am höchsten gemessenen Wert während des Untersuchungszeitraums. Im folgendem wird im Text von MRD High bei einer Last von  $\geq 1 \times 10^{-3}$ , von MRD Low bei einer Last von  $< 1 \times 10^{-3} / \geq 1 \times 10^{-4}$ , von MRD positiv (pos.) bei einer Last von  $< 1 \times 10^{-4}$  und von MRD negativ (neg.) bei keinem Nachweis gesprochen.

### 5.1.2 Klinischer Zustand der Patienten innerhalb der MRD Gruppen



**Abbildung 11:** Darstellung der MRD Gruppen mit Eventverteilung innerhalb der Gruppen. Schwarz = Rezidiv, Weiss = Remission, Dunkelgrau = TRM und Hellgrau = Abstoßung. MRD= Minimale Resterkrankung, TRM= Treatment related mortality

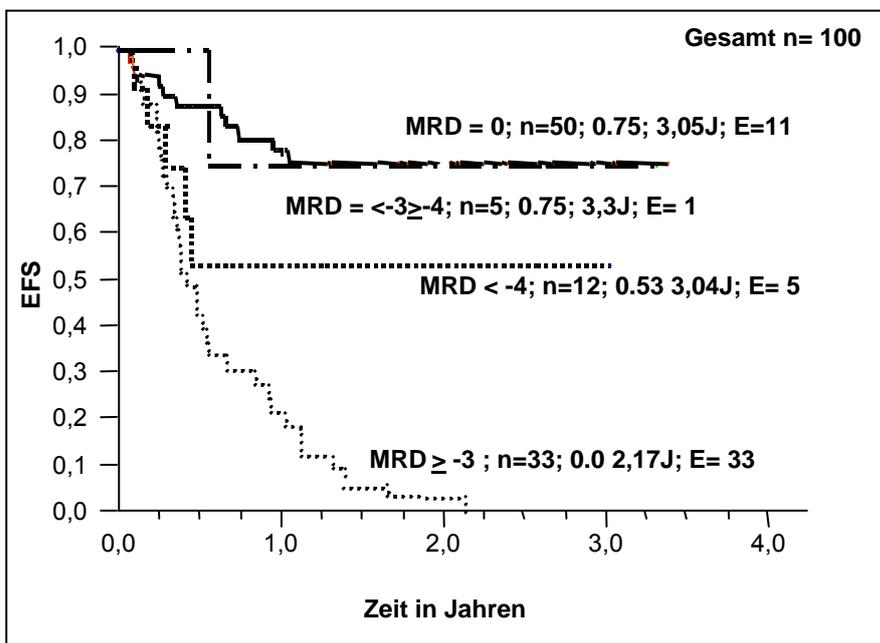
Die obige Grafik gibt einen Überblick über den aktuellen klinischen Zustand der Patienten (=Event). Als Event gelten hierbei das Rezidiv, TRM und Abstoßung. Auffallend ist die hohe Rezidivrate innerhalb der Gruppe der MRD High Patienten. 33 von 33 Patienten erlitten hier ein Rezidiv. In der Gruppe der MRD Low Patienten sind 80% (4/5) der Patienten in Remission, einer erlitt ein Rezidiv (20%), keiner verstarb an TRM, keiner stieß das Transplantat ab. In der Gruppe der MRD pos. sind 58,33% (7/12) der Patienten in Remission, 33,33% (4/12) verstarben an TRM, 8,33% (1/12) erlitten ein Rezidiv, keiner stieß das

Transplantat ab. Bei der Gruppe der MRD neg. sind 78% der (39/50) Patienten in Remission, 16% (8/50) verstarben an TRM, 4% (2/50) erlitten ein Rezidiv, 2% (1/50) erlangten kein Engraftment. Somit stellen sich für das rezidivfreie Überleben, in dieser vereinfachten Übersichtsgrafik die Gruppe der MRD Low Patienten mit 80% Remission, gefolgt von der MRD neg. Gruppe mit 78% Remission, als günstigste Gruppen dar.

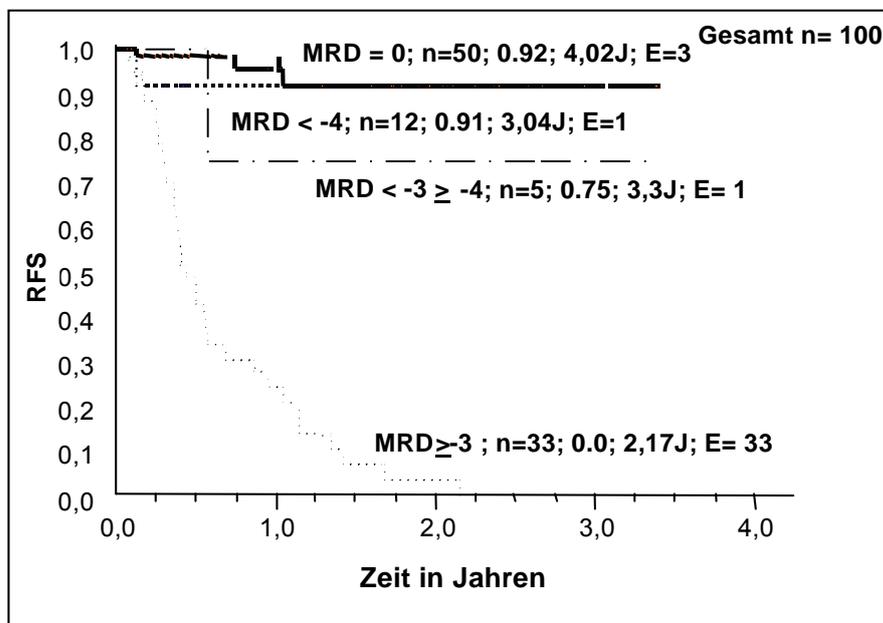
Nach diesem vereinfachtem Überblick der Patientendaten soll nun eine statistische Analyse mit Hilfe der Kaplan-Meier-Analyse durchgeführt werden.

Im folgenden Abschnitt soll näher auf die Bedeutung der MRD als Parameter für die Überwachung und Prognose der Patienten nach SZT (=Stammzelltransplantation) eingegangen werden. Es soll zum einen die individuelle Dynamik der MRD des einzelnen Patienten näher untersucht werden, zum anderen die Bedeutung der MRD Messung aus Sicht der einzelnen MRD Werten zu definierten Zeitpunkten nach SZT, um evt. einen spezifischen Tag zur Analyse der MRD zu identifizieren und die quantitative/prospektive Bedeutung der MRD zu bestimmen.

## 5.2 Ereignisfreies (EFS) und rezidivfreies (RFS) Überleben in Abhängigkeit vom MRD Gesamtstatus



**Abbildung 12:** Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit der MRD Last. MRD = 0 = MRD neg., MRD  $\geq$  -3= MRD High, MRD < -4 = MRD pos., MRD < -3/> -4 = MRD Low. MRD= Minimale Resterkrankung, EFS= ereignisfreies Überleben



**Abbildung 13:** Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit der MRD Last. MRD = 0 = MRD neg., MRD  $\geq$  -3= MRD High, MRD < -4 = MRD pos., MRD < -3/> -4 = MRD Low. MRD= Minimale Resterkrankung, RFS= rezidivfreies Überleben

Betrachtet man die MRD Gesamtgruppe (Minimale Resterkrankung) eines Patienten, die über den jeweils höchst gemessenen Wertes während der Analyse definiert wurde, so fallen erhebliche Unterschiede des EFS (ereignisfrei Überleben) sowie des RFS (rezidivfreies Überleben) zwischen den Gruppen auf.

Das EFS der MRD High Gruppe betrug 18,18% (SE 0,067) bei einem Jahr und 0% bei zwei Jahren, das RFS betrug 18,18% (SE 0,067) bei einem Jahr und 0% bei zwei Jahren. Hierbei muß berücksichtigt werden, dass ein Patient erst am Tag 619 post-SZT erstmalig gemessen werden konnte und zu diesem Zeitpunkt erstmalig eine MRD High Messung vorlag, so dass das rezidivfreie Überleben nach einer MRD High Messung wahrscheinlich weit unterhalb von zwei Jahren liegt. Dies bestätigen auch die weiteren Kaplan-Meier Analysen.

Innerhalb der Gruppe der MRD Low Patienten ergab sich ein EFS von 75,00% (SE 0,217) nach einem Jahr und 75,00% (SE 0,217) nach drei Jahren, das RFS lag ebenfalls bei 75,00% (SE 0,217) nach einem Jahr und 75,00% (SE 0,217) nach drei Jahren. Die MRD pos. Patienten hatten ein EFS von 52,91% (SE 0,157) bei einem Jahr und 52,91% (SE 0,157) bei drei Jahren. Das RFS dieser Gruppe lag bei 91,67% (SE 0,080) nach einem Jahr und 91,67% (SE 0,080) nach drei Jahren. Die Gruppe der MRD neg. Patienten wies ein EFS von 77,90% (SE 0,062) bei einem Jahr und 75,12% (SE 0,066) bei drei Jahren auf. Ihr RFS lag bei 95,04% (SE 0,034) bei einem Jahr und 91,64% (SE 0,047) bei drei Jahren. Insgesamt läßt sich zeigen, dass ein Patient, der zu irgendeinem Zeitpunkt eine MRD High Messung aufweist, zu 100% innerhalb der nächsten zwei Jahre nach erster MRD High Messung rezidivieren wird.

Insgesamt stellten sich die Gruppen der MRD neg. Patienten und MRD pos. Patienten bezüglich des RFS am günstigsten dar. Bezüglich des dreijährigen RFS stellten sich diese Gruppen mit 91,67% bzw. 91,64% sogar als gleichwertig dar. Bezüglich des EFS stellt sich damit die Gruppe der MRD pos. Patienten als intermediär und die MRD High Patienten als ungünstig dar. MRD Low Patienten und MRD neg. Patienten sind bezüglich des EFS nahezu gleichwertig. Ein durchgeführter Log-Rank-Test ergab  $p < 0,001$  sowohl für das

EFS als auch für das RFS. Dies beweist den hochsignifikanten Unterschied innerhalb der MRD Gruppen.

Insgesamt ergab sich bei den 100 Patienten ein EFS von 54,41% (SE 0,053) nach einem Jahr und 42,80% (SE 0,056) bei drei Jahren. Das RFS lag insgesamt bei 66,0% (SE 0,052) nach einem Jahr und 51,92% (SE 0,061) nach drei Jahren.

Es stellt sich nun die Frage, ob ein Patient innerhalb einer MRD Gruppe verbleibt, oder ob es sich um eine dynamische Entwicklung handelt und ob zu definierten Zeitpunkten eine Vorhersage über die Entwicklung eines Patienten getroffen werden kann, falls eine bestimmte MRD Last gemessen wird.

### **5.3 Bedeutung der MRD Messung in Regelmäßigen Zeitintervallen nach SZT**

Die vorausgegangenen Analysen basierten auf der MRD Gesamtgruppe (Minimale Resterkrankung) eines Patienten, die durch retrospektive Betrachtung der Patientengruppe nach Beendigung der Analyse ermittelt wurde. Hier soll nun auf die prospektiv prognostische Bedeutung der MRD Last zu bestimmten Zeitpunkten nach SZT (Stammzelltransplantation) eingegangen werden.

Durchgeführt wurden diese Untersuchungen mit Hilfe der Kaplan-Meier-Analyse. Angegeben wird jeweils das ein- und dreijährige EFS (ereignisfreies Überleben) bzw. RFS (rezidivfreie Überleben).

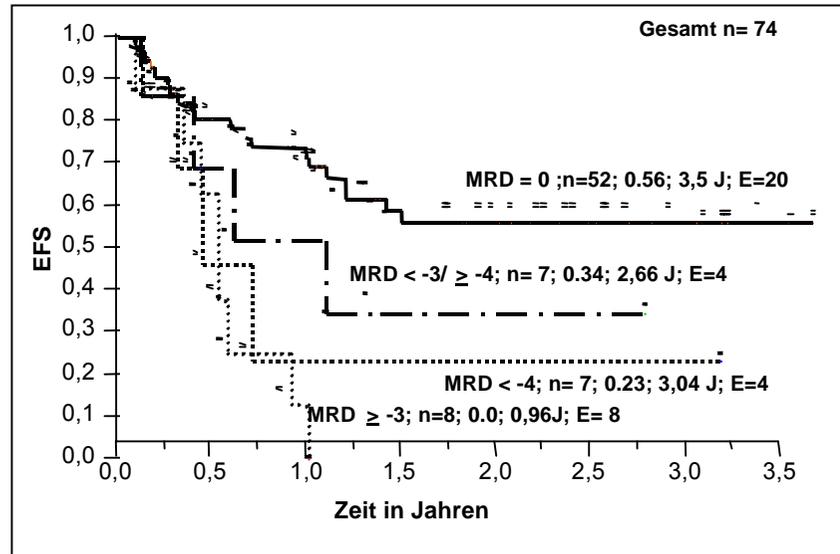
Als Messintervalle wurden hier definiert:

- Messung bis zum Tag 45 nach SZT
- Messung vom Tag 46 – 75 nach SZT
- Messung vom Tag 76 – 110 nach SZT
- Messung vom Tag 160 – 250 nach SZT
- Messung vom Tag > 250 nach SZT

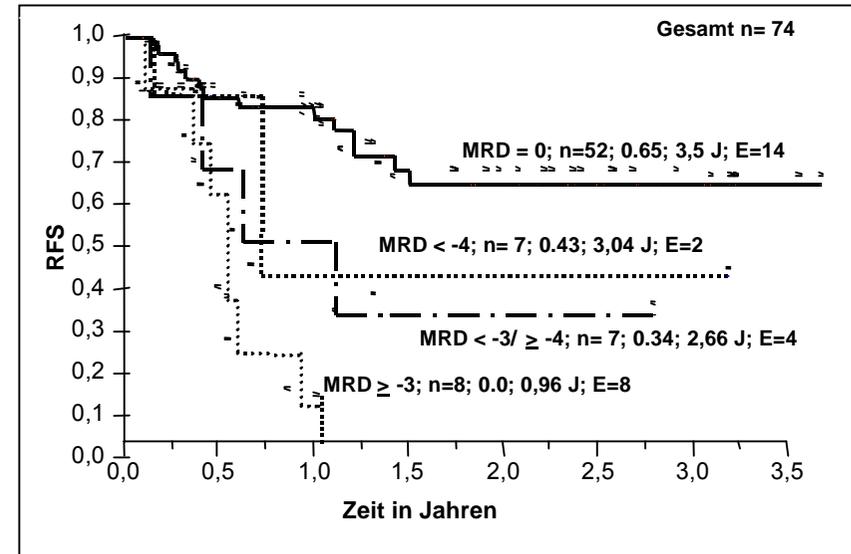
Die Einteilung in diese Zeitintervalle ergab sich aus den vorhandenen Proben zur Untersuchung der Patienten, so wie aus der Erfahrung, dass die meisten Rezidive innerhalb der ersten 100 Tage nach SZT auftreten und dann mit dem

zweiten Gipfel von  $> 200$  Tagen nach SZT. So lag das Intervall zwischen den einzelnen Messungen zwischen 29 und 90 Tagen, wobei die Zeitpunkte innerhalb der ersten 100 Tage zwischen 29 und 45 Tagen lagen. In den folgenden Abbildungen werden diese Ergebnisse gezeigt.

### 5.3.1 Ereignisfreies (EFS) und rezidivfreies Überleben (RFS) in Abhängigkeit der MRD Last am Tag bis 45 nach SZT



**Abbildung 14:** Darstellung des ereignisfreien Überlebens bei Messung der MRD Last am Tag bis 45 nach SZT. MRD 0 = MRD neg, MRD  $\geq$  -3 = MRD High, MRD < -4 = MRD pos., MRD < -3/ $\geq$  -4 = MRD Low. MRD= Minimale Resterkrankung, EFS= ereignisfreies Überleben



**Abbildung 15:** Darstellung des rezidivfreien Überlebens bei Messung der MRD Last am Tag bis 45 nach SZT. MRD 0 = MRD neg., MRD  $\geq$  -3 = MRD High, MRD < -4 = MRD pos., MRD < -3/ $\geq$  -4 = MRD Low. MRD= Minimale Resterkrankung, RFS= rezidivfreie Überleben

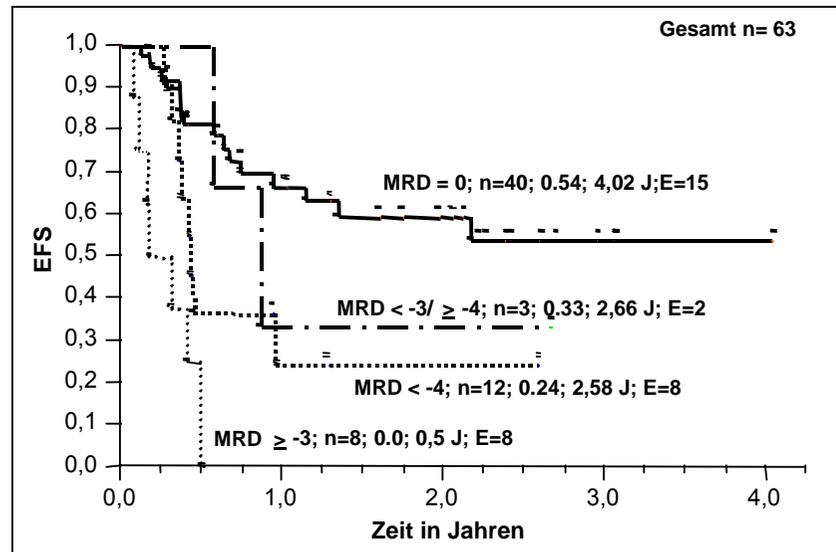
Von 100 Patienten konnten 74 am Tag bis 45 nach SZT (Stammzelltransplantation) gemessen werden. 52 dieser 74 Patienten waren in diesem Zeitraum MRD neg., sieben MRD Low, sieben MRD pos. und acht MRD High. Ein durchgeführter Log-Rank-Test ergab  $p < 0,0001$ .

<b>Gesamt n= 74</b>	<b>MRD High; n=8</b>	<b>MRD Low; n=7</b>	<b>MRD pos.; n=7</b>	<b>MRD neg.; n=52</b>
<b>1 J RFS/EFS</b>	<b>0%/0%</b>	<b>34,29%/34,29%</b>	<b>42,86%/22,86%</b>	<b>80,43%/69,07%</b>
<b>3 J RFS/EFS</b>		<b>34,29%/34,29% (2,66J)</b>	<b>42,86%/22,86%</b>	<b>65%/55,81%</b>

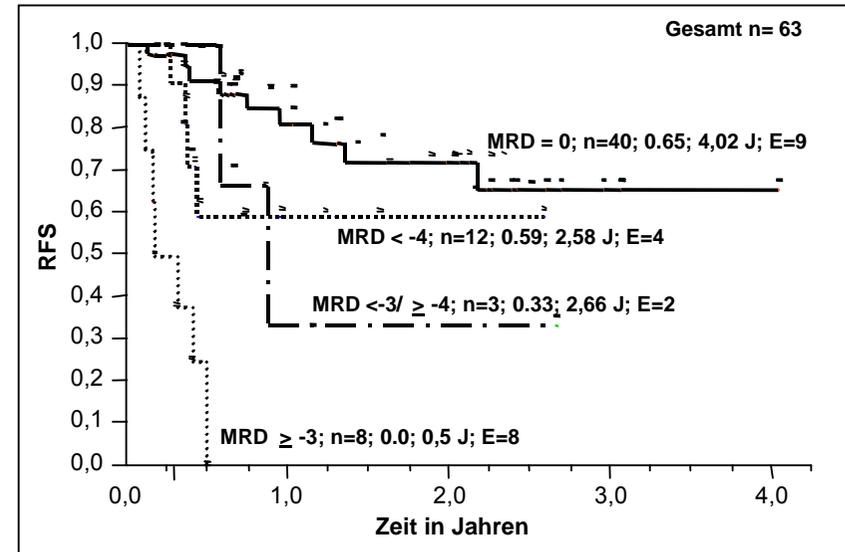
**Tabelle 18:** Darstellung des rezidiv- und ereignisfreien Überlebens in% in Abhängigkeit der MRD Last nach ein und drei Jahren. RFS= rezidivfreies Überleben, EFS= ereignisfreies Überleben, J= Jahre, MRD= Minimale Resterkrankung

Das Risiko an einem Rezidiv innerhalb eines Jahres zu erkranken ist bei MRD pos. zu diesem Zeitpunkt ca. doppelt so hoch wie das der MRD neg. Patienten. Bei MRD Low Patienten etwas mehr als doppelt so hoch und das der MRD High Patienten liegt bei 100%. Interessant ist, dass sich die MRD Low Patienten in bezug auf das RFS von den MRD pos. Patienten nicht erheblich unterscheiden. Außerdem fällt hier das Übereinstimmen von EFS und RFS innerhalb der MRD Low Gruppe auf.

### 5.3.2 Ereignisfreies (EFS) und rezidivfreies Überleben (RFS) in Abhängigkeit der MRD Last am Tag 46 – 75 nach SZT



**Abbildung 16:** Darstellung des ereignisfreien Überlebens bei Messung der MRD Last am Tag 46-75 nach SZT. MRD 0 = MRD neg., MRD  $\geq -3$  = MRD High, MRD  $< -4$  = MRD pos., MRD  $< -3/\geq -4$  = MRD Low. MRD= Minimale Resterkrankung, EFS= ereignisfreies Überleben



**Abbildung 17:** Darstellung des rezidivfreien Überlebens bei Messung der MRD Last am Tag 46-75 nach SZT. MRD 0 = MRD neg., MRD  $\geq -3$  = MRD High, MRD  $< -4$  = MRD pos., MRD  $< -3/\geq -4$  = MRD Low. MRD= Minimale Resterkrankung, EFS= rezidivfreie Überleben

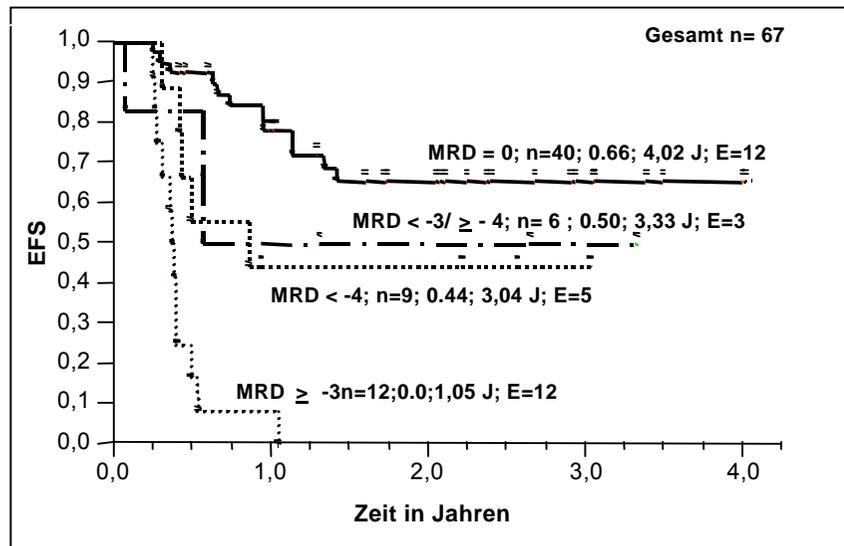
In dem Zeitraum von 46 – 75 Tagen nach SZT (Stammzelltransplantation) hatten 63 der insgesamt 100 Patienten eine Knochenmarksnachprobe. 40 waren zu diesem Zeitpunkt MRD neg., 3 MRD Low, 12 MRD pos. und 8 MRD High. Der Log-Rank-Test ergab  $p < 0,0001$ .

<b>Gesamt n= 63</b>	<b>MRD High; n=8</b>	<b>MRD Low; n=3</b>	<b>MRD pos.; n=12</b>	<b>MRD neg.; n=40</b>
<b>1 J RFS/EFS</b>	<b>0%/0%</b>	<b>33,33%/66,67%</b>	<b>58,92%/24,24%</b>	<b>80,71%/66,32%</b>
<b>3 J RFS/EFS</b>		<b>33,33%/33,33% (2,66J)</b>	<b>58,92/24,24% (2,58J)</b>	<b>65,42%/53,76%</b>

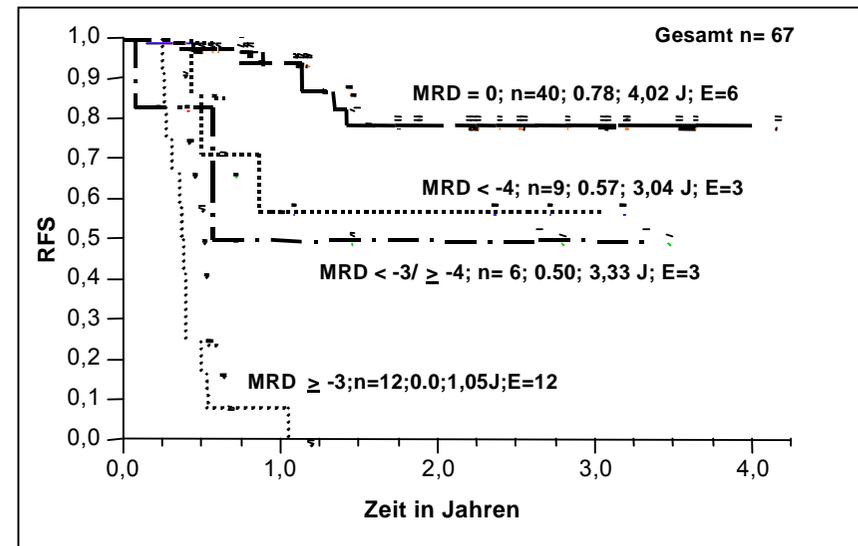
**Tabelle 19:** Darstellung des rezidiv- und ereignisfreien Überlebens in% in Abhängigkeit der MRD Last nach ein und drei Jahren. RFS= rezidivfreies Überleben, EFS= ereignisfreies Überleben, J= Jahre, MRD= Minimale Resterkrankung

Hier ist ebenfalls wieder zu sehen, dass der Nachweis einer MRD Last mit einem signifikant höherem Rezidivrisiko einhergeht. Zusätzlich fällt hier das RFS von nur 33,33% bei den MRD Low Patienten auf. Das RFS der MRD High Patienten liegt wiederum bei 0%.

### 5.3.3 Ereignisfreies (EFS) und rezidivfreies (RFS) Überleben in Abhängigkeit der MRD Last am Tag 76 – 110 nach SZT



**Abbildung 18:** Darstellung des ereignisfreien Überlebens bei Messung der MRD Last am Tag 76-110 nach SZT. MRD 0 = MRD neg., MRD  $\geq -3$  = MRD High, MRD  $< -4$  = MRD pos., MRD  $< -3/\geq -4$  = MRD Low. MRD= Minimale Resterkrankung, EFS ereignisfreies Überleben



**Abbildung 19:** Darstellung des rezidivfreien Überlebens bei Messung der MRD Last am Tag 76-110 nach SZT. MRD 0 = MRD neg., MRD  $\geq -3$  = MRD High, MRD  $< -4$  =MRD pos., MRD  $< -3/\geq -4$  = MRD Low. MRD= Minimale Resterkrankung, RFS= rezidivfreie Überleben

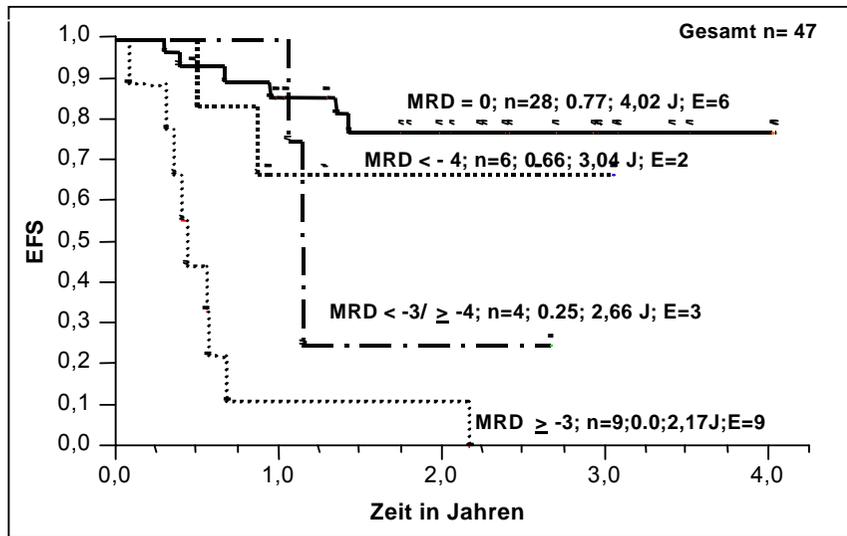
In dem Zeitraum Tag 76-110 nach SZT (Stammzelltransplantation) hatten 67 der 100 Patienten eine Knochenmarksnachprobe. 40 der Proben waren zu diesem Zeitpunkt MRD neg., 6 MRD Low, 9 MRD pos. und 12 MRD High. Der Log-Rank-Test ergab  $p < 0,001$ .

<b>Gesamt n= 67</b>	<b>MRD High; n=12</b>	<b>MRD Low; n=6</b>	<b>MRD pos.; n=9</b>	<b>MRD neg.; n=40</b>
<b>1 J RFS/EFS</b>	<b>0%/0%</b>	<b>50%/50%</b>	<b>57,14%/44,44%</b>	<b>94,23%/78,32%</b>
<b>3 J RFS/EFS</b>		<b>50%/50%</b>	<b>57,14%/44,44%</b>	<b>78,81%/65,51%</b>

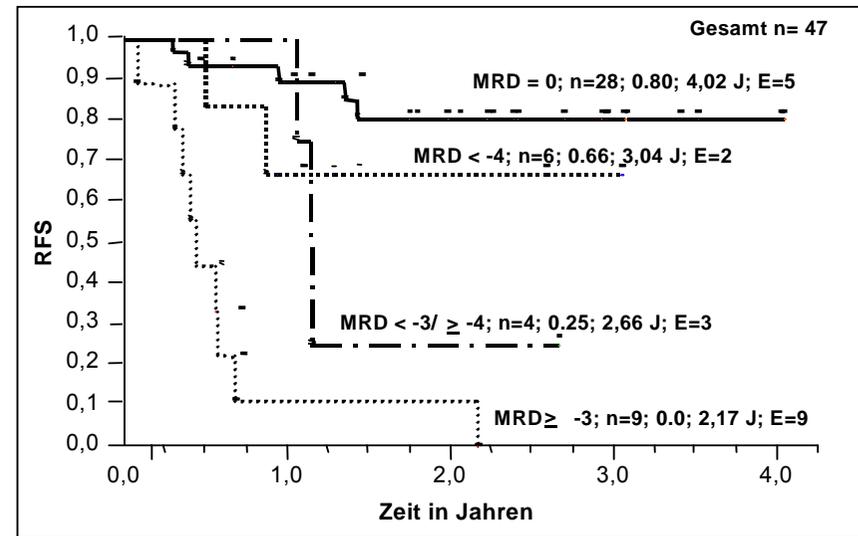
**Tabelle20:** Darstellung des rezidiv- und ereignisfreien Überlebens in% in Abhängigkeit der MRD Last nach ein und drei Jahren. RFS= rezidivfreies Überleben, EFS= ereignisfreies Überleben, J= Jahre, MRD= Minimale Resterkrankung

Insgesamt fällt auch hier die ca. doppelt so hohe Rezidivwahrscheinlichkeit bei MRD Low oder MRD pos. im Gegensatz zu MRD neg. Patienten auf. Außerdem fällt hier das Übereinstimmen von EFS und RFS innerhalb der Gruppen MRD Low auf. Das RFS der MRD High Patienten ist wiederum 0%.

### 5.3.4 Ereignisfreies (EFS) und rezidivfreies (RFS) Überleben in Abhängigkeit der MRD Last am Tag 160 – 250 nach SZT



**Abbildung 20:** Darstellung des ereignisfreien Überlebens bei Messung der MRD Last am Tag 160-250 nach SZT. MRD 0 = MRD neg., MRD  $\geq$  -3 = MRD High, MRD < -4 = MRD pos., MRD < -3/  $\geq$  -4 = MRD Low. MRD= Minimale Resterkrankung, EFS= ereignisfreies Überleben



**Abbildung 21:** Darstellung des rezidivfreien Überlebens bei Messung der MRD Last am Tag 160-250 nach SZT. MRD 0 = MRD neg., MRD  $\geq$  -3 = MRD High, MRD < -4 = MRD pos., MRD < -3/  $\geq$  -4 = MRD Low. MRD= Minimale Resterkrankung, RFS= rezidivfreie Überleben

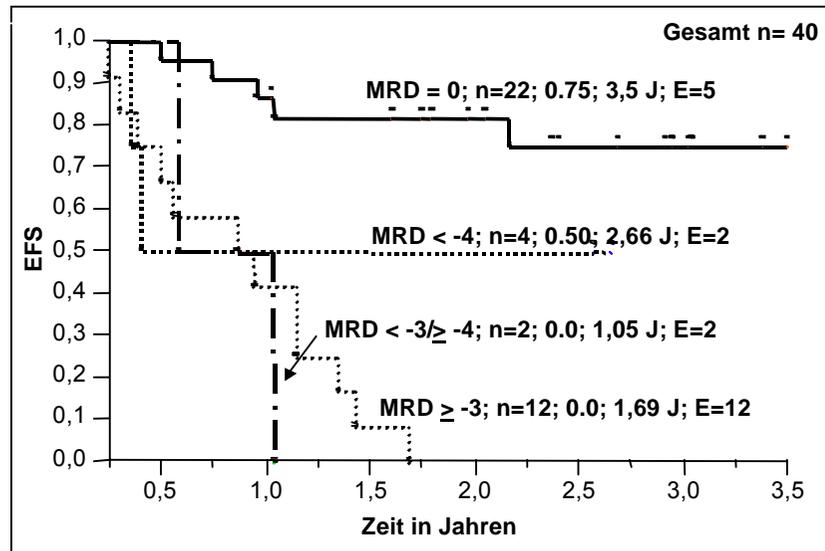
In dem Zeitraum Tag 160-250 nach SZT (Stammzelltransplantation) hatten 47 der 100 Patienten eine Knochenmarksnachprobe. 28 der Proben waren zu diesem Zeitpunkt MRD neg., 4 MRD Low, 6 MRD pos. und 9 MRD High. Ein durchgeführter Log-Rank-Test ergab  $p < 0,0001$ .

<b>Gesamt n= 47</b>	<b>MRD High; n=9</b>	<b>MRD Low; n=4</b>	<b>MRD pos.; n=6</b>	<b>MRD neg.; n=28</b>
<b>1 J RFS/EFS</b>	<b>11,11%/11,11%</b>	<b>75%/75%</b>	<b>66,67%/66,67%</b>	<b>88,99%/85,43%</b>
<b>3 J RFS/EFS</b>	<b>0%/0% (2,17J)</b>	<b>25%/25% (2,66J)</b>	<b>66,67%/66,67%</b>	<b>80,09/76,89%</b>

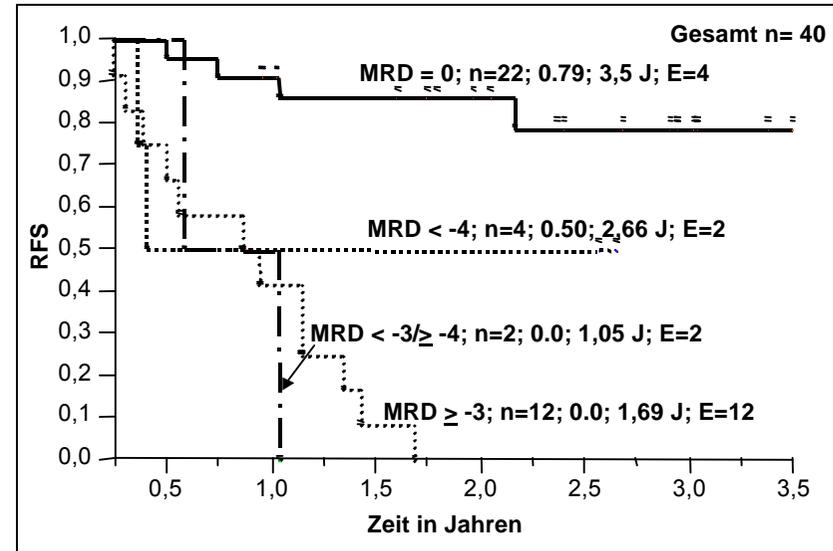
**Tabelle 21:** Darstellung des rezidiv- und ereignisfreien Überlebens in% in Abhängigkeit der MRD Last nach ein und drei Jahren. RFS= rezidivfreies Überleben, EFS= ereignisfreies Überleben, J= Jahre, MRD= Minimale Resterkrankung

Im Gegensatz zu vorher gezeigten Daten, fällt hier das hohe RFS von 75,00% bei den MRD Low Patienten auf, jedoch liegt das RFS von den MRD Low Patienten nach 2,66 J nur noch bei 25%.

### 5.3.5 Ereignisfreies (EFS) und rezidivfreies (RFS) Überleben in Abhängigkeit der MRD Last am Tag > 250 nach SZT



**Abbildung 22:** Darstellung des ereignisfreien Überlebens bei Messung der MRD Last am Tag > 250 nach SZT. MRD 0 = MRD neg., MRD  $\geq -3$  = MRD High, MRD  $< -4$  = MRD pos., MRD  $< -3/\geq -4$  = MRD Low. MRD= Minimale Resterkrankung, EFS= ereignisfreies Überleben



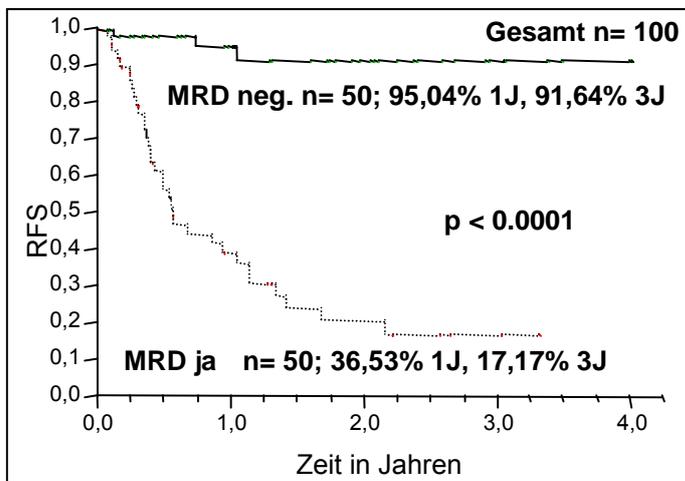
**Abbildung 23:** Darstellung des rezidivfreien Überlebens bei Messung der MRD Last am Tag > 250 nach SZT. MRD 0 = MRD neg., MRD  $\geq -3$  = MRD High, MRD  $< -4$  = MRD pos., MRD  $< -3/\geq -4$  = MRD Low. MRD= Minimale Resterkrankung, RFS= rezidivfreie Überleben

In dem Zeitraum Tag >250 nach SZT (Stammzelltransplantation) hatten 40 der 100 Patienten eine Knochenmarknachprobe. 22 der Proben waren zu diesem Zeitpunkt MRD neg., 2 MRD Low, 4 MRD pos. und 12 MRD High. Der Log-Rank-Test ergab  $p < 0,0001$ .

<b>Gesamt n= 40</b>	<b>MRD High n= 12</b>	<b>MRD Low n=2</b>	<b>MRD pos. n=4</b>	<b>MRD neg. n= 22</b>
<b>1 J RFS/EFS</b>	<b>0%/0%</b>	<b>0%/0%</b>	<b>50%/50%</b>	<b>90,91%/86,36%</b>
<b>3 J RFS/EFS</b>			<b>50%50% (2,66 J)</b>	<b>78,70%/74,77%</b>

**Tabelle 22:** Darstellung des rezidiv- und ereignisfreien Überlebens in% in Abhängigkeit der MRD Last nach ein und drei Jahren. RFS= rezidivfreies Überleben, EFS= ereignisfreies Überleben, J= Jahre

## 5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse



**Abbildung 24:** Zusammenfassende Darstellung des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit ob eine MRD Last vorhanden war oder nicht ohne auf die Höhe einzugehen. MRD= Minimale Resterkrankung, J= Jahre RFS= rezidivfreie Überleben

Zusammenfassend ist in Abbildung 24 nochmals die Bedeutung einer MRD (Minimale Resterkrankung) Last dargestellt, ohne die Höhe MRD Last zu berücksichtigen.

	<b>1 J RFS</b>	<b>3 J RFS</b>
MRD ja n= 50	36,53 %	17,17%
MRD nein n=50	95,04%	91,64%

**Tabelle 23:** Rezidivfreies Überleben in %. J= Jahr. RFS= rezidivfreies Überleben. MRD= Minimale Resterkrankung, RFS= rezidivfreie Überleben

Bei einer nachweisbaren MRD nach SZT (Stammzelltransplantation) ist die Rezidivwahrscheinlichkeit mehr als doppelt so hoch nach einem Jahr und mehr als viermal so hoch nach 3 Jahren.

Zusätzlich soll nochmals zusammenfassend die EFS/RFS (ereignisfreies/rezidivfreies Überleben) der einzelnen Risikogruppen in Tabelle 24 in Abhängigkeit des Messzeitpunktes dargestellt werden.

	MRD High	MRD Low	MRD pos.	MRD neg.
<b>Gesamt EFS/RFS 1 J</b>	18,18%/ <b>18,18%</b>	75,00%/ <b>75,00%</b>	52,91%/ <b>91,67%</b>	77,9%/ <b>95,04</b>
<b>Tag bis 45 EFS/RFS 1 J</b>	0%/ <b>0%</b>	34,29%/ <b>34,29%</b>	22,86%/ <b>42,86%</b>	69,07%/ <b>80,43%</b>
<b>Tag 46-75 EFS/RFS 1 J</b>	0%/ <b>0%</b>	33,33%/ <b>33,33%</b>	24,24%/ <b>58,92%</b>	66,32%/ <b>80,71%</b>
<b>Tag 76-110 EFS/RFS 1 J</b>	0%/ <b>0%</b>	50,00%/ <b>50,00%</b>	44,44%/ <b>57,14%</b>	78,32%/ <b>94,23%</b>
<b>Tag 160-250 EFS/RFS 1 J</b>	11,11%/ <b>11,11%</b>	75,00%/ <b>75,00%</b>	66,67%/ <b>66,67%</b>	85,43%/ <b>88,99%</b>
<b>Tag &gt; 250 EFS/RFS 1 J</b>	0%/ <b>0%</b>	0%/ <b>0%</b>	50,00%/ <b>50,00%</b>	86,36%/ <b>90,01</b>
<b>Gesamt EFS/RFS 3 J</b>	0%/ <b>0%</b>	75,00%/ <b>75,00%</b>	52,91%/ <b>91,67%</b>	75,12%/ <b>91,64%</b>
<b>Tag bis 45 EFS/RFS 3 J</b>	0%/ <b>0%</b>	34,29%/ <b>34,29%</b>	22,86%/ <b>42,86%</b>	69,07%/ <b>65,00%</b>
<b>Tag 46-75 EFS/RFS 3 J</b>	0%/ <b>0%</b>	33,33%/ <b>33,33%</b>	24,24%/ <b>58,92%</b>	66,32%/ <b>80,71%</b>
<b>Tag 76-110 EFS/RFS 3 J</b>	0%/ <b>0%</b>	50,00%/ <b>50,00%</b>	44,44%/ <b>57,14%</b>	65,51%/ <b>78,81%</b>
<b>Tag 160-250 EFS/RFS 3 J</b>	0%/ <b>0%</b>	25,00%/ <b>25,00%</b>	66,67%/ <b>66,67%</b>	76,89%/ <b>80,09%</b>
<b>Tag &gt; 250 EFS/RFS 3 J</b>	0%/ <b>0%</b>	0%/ <b>0%</b>	50,00%/ <b>50,00%</b>	74,77%/ <b>78,70%</b>

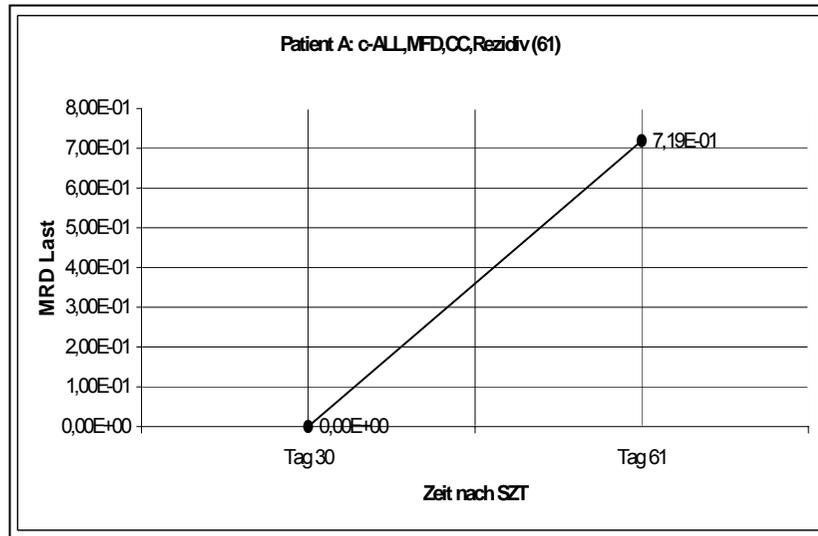
**Tabelle 24:** Übersicht über das ein- und dreijahres EFS/RFS zu definierten Zeitpunkten nach SZT. Fett jeweils das RFS. EFS=ereignisfreies Überleben, RFS= rezidivfreies Überleben, MRD= Minimale Resterkrankung, J= Jahre

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass ein MRD Nachweis mit einem signifikant höheren Rezidivrisiko einhergeht. Insbesondere bei einer MRD High Last, liegt das Rezidivrisiko bei 100%.

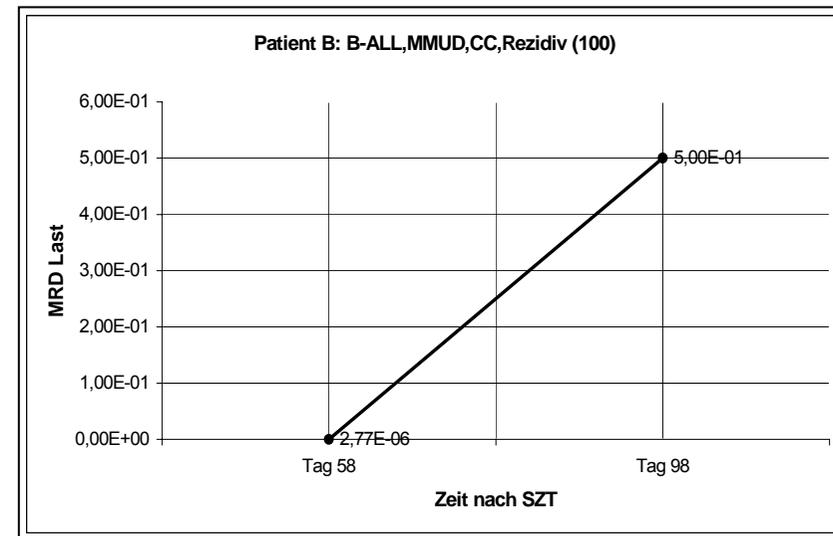
Auffällig ist die Diskrepanz des RFS bei MRD Low und MRD pos. Patienten. In der retrospektiven Betrachtung der Patienten, die im gesamten Verlauf nie eine MRD Last von größer MRD Low aufwiesen (n=5), lag das RFS bei 75%, während bei der Betrachtung von den Patienten, die zum Zeitpunkt bis 45 Tage nach SZT eine MRD Low Messung (n=7) aufwiesen, das RFS nur bei 34,29% lag.

Patienten wechseln offensichtlich die MRD Gruppen im Verlauf, was auf eine dynamische Entwicklung hindeutet, dies erklärt den Unterschied zwischen EFS/RFS bei der Gesamtgruppen Betrachtung und der Einzelbetrachtung nach SZT. Folgend sollen exemplarisch einige Patientenbeispiele gezeigt werden. Das EFS bzw. RFS von 18,18%/18,18% innerhalb der MRD High Gruppe nach einem Jahr ist durch den bereits erwähnten Patienten zu erklären, der erst am Tag 619 post-SZT erstmalig gemessen werden konnte.

## 5.5 Individuelle Dynamik der MRD Überwachung bei Patienten



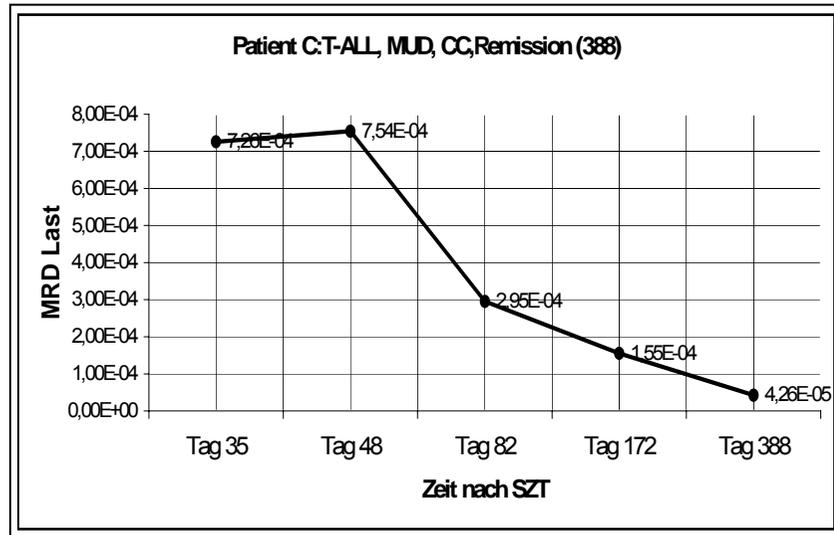
**Abbildung 25:** Patient A mit Matched family donor SZT, vollständigem Chimärismus und Rezidiv am Tag 61 nach SZT. Darstellung seiner MRD Messungen im Verlauf.  
c-ALL= common Akute lymphatische Leukämie, MFD= Matched family donor, CC= kompletter Chimerismus, SZT= Stammzelltransplantation, MRD= Minimale Resterkrankung



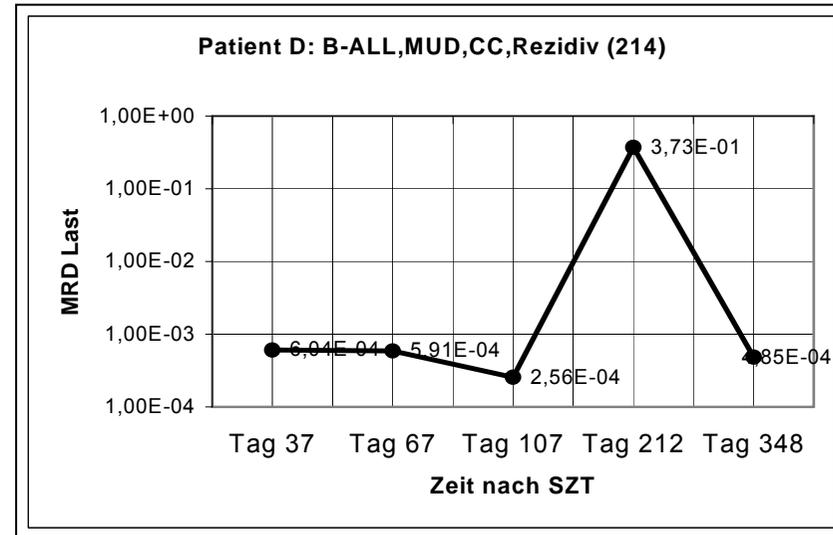
**Abbildung 26:** Patient B mit Mismatched unrelated donor SZT, vollständigem Chimärismus und Rezidiv am Tag 100 nach SZT. Darstellung seiner MRD Messung im Verlauf.  
B-ALL= Akute lymphatische Leukämie, MMUD= Mismatched unrelated donor, CC= kompletter Chimärismus, SZT = Stammzelltransplantation  
MRD= Minimale Resterkrankung

Aus Abbildung 25 und 26 wird ersichtlich, dass zwischen der Entwicklung vom MRD (Minimale Resterkrankung) neg. Status zum MRD High Status und damit zum fulminanten Rezidiv nur wenige Tage vergehen können, ohne dass die MRD Messung vorher einen Hinweis auf diese Entwicklung gibt. Patient A war am Tag 30 nach SZT (Stammzelltransplantation) MRD neg. um

dann innerhalb von nur 31 Tagen am Tag 61 ein fulminantes Rezidiv zu erleiden. Patient B war am Tag 58 MRD pos. und entwickelte innerhalb von 42 Tagen sein Rezidiv.

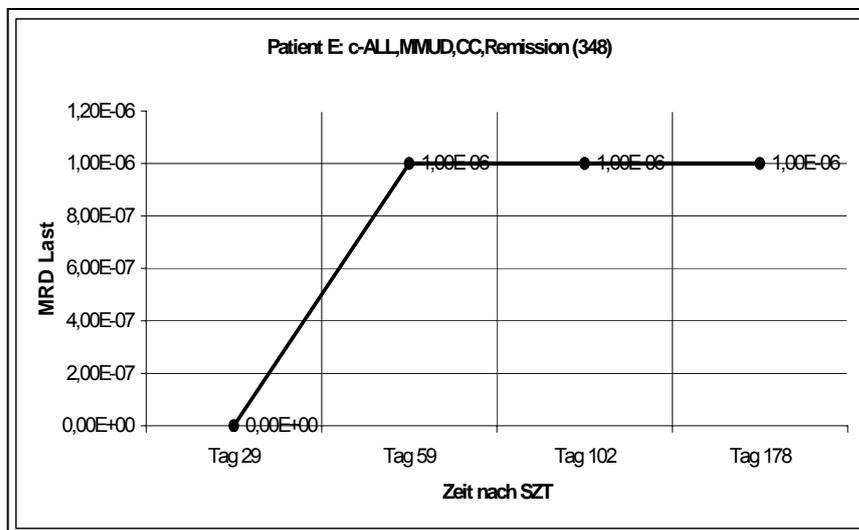


**Abbildung 27:** Patient C mit Matched unrelated donor SZT, vollständigem Chimärismus und Remission am Tag 388 nach SZT. Darstellung seiner MRD Messungen im Verlauf.  
 ALL= Akute lymphatische Leukämie, MUD= Matched unrelated donor  
 CC= kompletter Chimärismus, SZT= Stammzelltransplantation  
 MRD= Minimale Resterkrankung



**Abbildung 28:** Patient D mit Matched unrelated donor SZT, vollständigem Chimärismus und Rezidiv am Tag 214 nach SZT. Darstellung seiner MRD Messungen im Verlauf.  
 ALL= Akute lymphatische Leukämie, MUD= Matched unrelated donor,  
 CC= kompletter Chimärismus, SZT= Stammzelltransplantation, MRD= Minimale Resterkrankung

Dies Abbildungen 27 und 28 zeigen die unterschiedliche Entwicklung von zwei Patienten, die jeweils beide früh nach SZT eine MRD Low Last aufwiesen. Patient C hatte am Tag 35 nach SZT eine MRD Last von  $7,255 \times 10^{-4}$ . Diese stieg bis zum Tag 48 nach SZT noch etwas an, um dann stetig abzufallen bis zu einer Last von  $4,26 \times 10^{-5}$  am Tag 388 nach SZT mit einem Meßintervall der letzten beiden Proben von >100 Tagen. Trotz dieser anfangs relativ hohen MRD Last verblieb der Patient in Remission. Patient D hingegen, wies am Tag 37 nach SZT eine Last von  $6,04 \times 10^{-4}$  auf, fiel dann bis zum Tag 107 auf  $2,56 \times 10^{-4}$  ab, um dann am Tag 212 ein Rezidiv zu entwickeln, auch hier lag das Meßintervall der vorletzten beiden Messungen >100 Tage. Diese beiden Patienten verdeutlichen, dass die Vorhersage des individuellen Verlaufs nur schwer zu stellen ist. Diese beiden Patienten sind auch gleichzeitig ein Beispiel für eine innerhalb der ersten 100 nach SZT regelmäßig erfolgte KM (Knochenmark) Untersuchung. Diese Intervalle entsprechen auch in etwa den empfohlenen Untersuchungszeitpunkten während der Therapie.



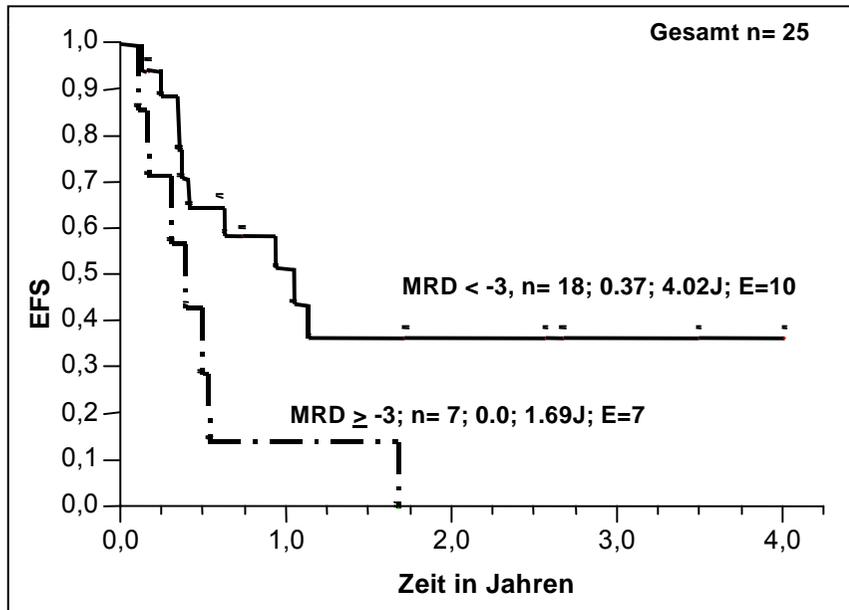
**Abbildung 29:** Patient E mit Mismatched unrelated donor (MMUD) vollständiger Chimärismus und Remission am Tag 348 nach SZT. Darstellung seiner MRD Messungen im Verlauf, ALL= Akute lymphatische Leukämie, CC= kompletter Chimärismus, SZT= Stammzelltransplantation, MRD= Minimale Resterkrankung

Patient E zeigt am Tag 29 keine MRD Last, am Tag 50, 102 und 178 weist er eine geringe MRD Last auf, trotzdem verbleibt er bis zum Tag 348 nach SZT in Remission ohne zusätzliche Immun-oder Chemotherapie.

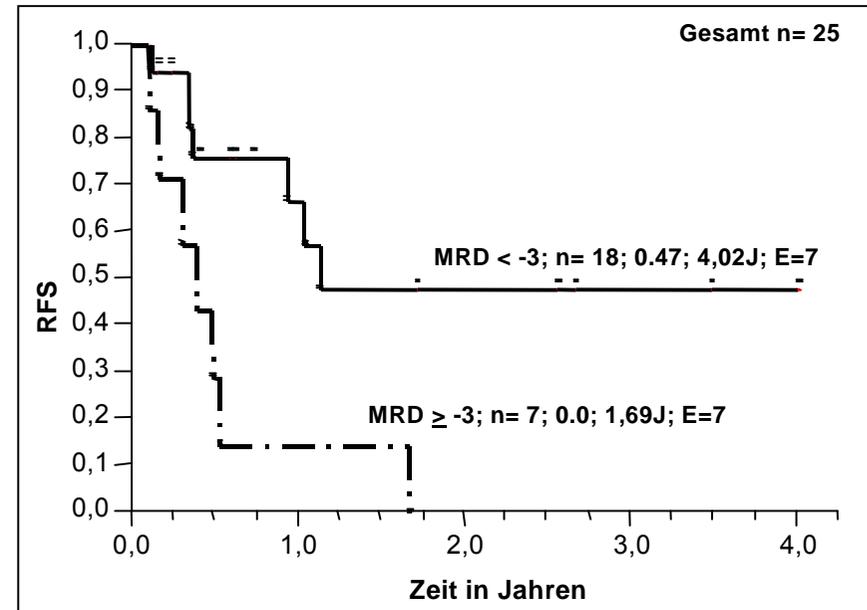
## **5.6 Immuntherapie**

Bei dem hier untersuchtem Patientenkollektiv, wurde die Entscheidung zur Immuntherapie auf der Basis der Chimärismusedwicklung gestellt. Alle Patienten erhielten bei einem IMC (zunehmend gemischter Chimärismus) ein Therapie, die entweder durch Gabe von DLI (Donor Lymphozyten Infusion) oder durch die Reduktion der CSA (Cyclosporin) Dosis erfolgte. Der Einfluß der MRD (Minimale Resterkrankung) zum Zeitpunkt der Immuntherapie soll hier nun näher betrachtet werden. Insgesamt erhielten 20 Patienten DLI's und 5 eine CSA Reduktion als Immuntherapie. Eine Kaplan-Maier Analyse über den Vorteil der DLI bzw. CSA ergab keinen signifikanten Unterschied. ( $p=0,2926$ ). Tendenziell zeigte sich jedoch ein Vorteil der CSA Reduktion gegenüber der DLI Gabe beim RFS (50% 4,02J versus 27,35% 3,5J).

### 5.6.1 Einfluss der MRD Last auf das Ereignis- (EFS) und rezidivfreie (RFS) Überleben zum Zeitpunkt der Immuntherapie



**Abbildung 30:** Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit der MRD Last zum Zeitpunkt der Immuntherapie. EFS= ereignisfreies Überleben, MRD= Minimale Resterkrankung



**Abbildung 31:** Rezidivsfreies Überleben in Abhängigkeit der MRD Last zum Zeitpunkt der Immuntherapie. RFS= rezidivfreies Überleben, MRD= Minimale Resterkrankung

Die in Abbildung 30 und 31 dargestellten Kurven zeigen eindeutig, dass wenn eine Immuntherapie zum Zeitpunkt einer MRD Last (Minimale Resterkrankung) von  $\geq 1 \times 10^{-3}$  durchgeführt wurde, keine Langzeitremission durch DLI (Donor lymphozyten infusion) Gabe bzw. CSA (Cyclosporin) Reduktion erreicht werden konnte. Dies könnte ein Hinweis auf die prognostische Wichtigkeit der MRD Messung zum Zeitpunkt der Immuntherapie sein, und Hinweis, dass diese Patienten evt. von einer zusätzlichen Chemotherapie profitieren könnten. Das EFS (ereignisfreies Überleben) betrug 0% nach 1,69 Jahren für Patienten, die zum Zeitpunkt der Immuntherapie eine MRD High Last aufwiesen, ihr RFS (rezidivfreies Überleben) betrug ebenfalls 0% nach 1,69 Jahren. Bei den Patienten, deren MRD Last hingegen kleiner war, betrug das EFS 43,83%% (SE 0,127) nach einem Jahr und 36,52% (SE 0,125) nach 4,02 Jahren. Ihr RFS betrug 56,67% (SE 0,141) nach einem Jahr und 47,22% nach 4,02 Jahren (SE 0,145). Ein durchgeführter Log-Rank Test ergab einen statistisch nachweisbaren Unterschied für diese Beobachtung ( $p= 0,0057$  für das RFS und  $p= 0,0270$  für das EFS).

## 5.7 Allgemeine Transplantationsdaten

### Univariate Analyse (Kaplan-Meier-Analyse)

Subgruppe	Anzahl der Patienten	3 J EFS (%)	Log-Rank P
ALL-Subtyp			< 0,011
c-ALL	64	37,02	
Prä-B-ALL	19	27,02	
T-ALL	17	80,11	
Donor			< 0,029
MUD	39	38,89	
MFD	36	57,53	
MMUD	11	26,52	
MMFD	4	25,00	
Haplo	10	20,00	

**Tabelle 25:** Kaplan-Meier-Analysen allgemeiner Transplantationsdaten. ALL= Akute lymphoblastische Leukämie, EFS= ereignisfreies Überleben, MUD= Matched unrelated Donor, MFD= Matched family Donor, MMUD= Mismatched unrelated Donor, MMFD= Mismatched family Donor, Haplo= Haploidentische Familienspende

Kaplan-Meier-Analysen zum CR Status, T-Zelldepletion, Geschlecht, Konditionierung und Chimärismusstandes ergaben keine signifikanten Ergebnisse.

## **6. Diskussion**

### **6.1 Allgemeines**

Die allo-SZT (allogene Stammzelltransplantation) bei ALL (Akute lymphatische Leukämie) im Kindesalter ist zur einer wichtigen Therapieoption geworden. Das Rezidiv nach SZT ist einer der wichtigsten Ursachen für Therapieversagen (52,104,139,143). Bisher stand nur die zweite SZT und die erneute Chemotherapie als Therapie eines Rezidivs zur Verfügung. Diese ist aber mit einer sehr hohen Mortalität und Morbidität verbunden (16,85,86,109). Die Entwicklung von Methoden um submikroskopisch Blasten nachzuweisen und damit eine Therapie zu initiieren bevor es zum „lichtmikroskopischen“ Rezidiv kommt, hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. In dieser Arbeit soll auf die Bedeutung der MRD (Minimale Resterkrankung) Messung mittels Immunglobulin- und T-Zellrezeptorrearrangements eingegangen werden.

Bereits in den 90'er Jahren wurden von d'Auriol et. al, Hansen-Haag et. al, McIntyre und andere, die invitro Amplifikation von Genrearrangements als Möglichkeit zum Monitoren der MRD bei ALL beschrieben (5,59,72,84,144). Mit Hilfe der Entwicklung der RQ-PCR (Real-time quantitative Polymerasekettenreaktion) konnte die Quantifizierung und deren Anwendbarkeit auf große Patientkollektive erleichtert werden. Insbesondere die Arbeitsgruppe um van Dongen et. al, hat zur Standardisierung der MRD Detektion mit Hilfe der Immunglobulin und T-Zellrezeptor Rearrangements beigetragen (24,37,38,39,41,122,123,124).

Bisherige Untersuchungen zur MRD bei ALL im Kindesalter erfolgten überwiegend während den Standardpolychemotherapieprotokollen zur Erstbehandlung einer Leukämie. Einige Zentren bieten auf Grund dieser Ergebnisse bereits experimentelle Therapieansätze zur Intensivierung der Therapie an. Die Aufnahme der MRD als eigener Risikofaktor in Studienprotokollen gewinnt zunehmend an Bedeutung und es gibt Versuche, Modelle zur Therapiestratifizierung zu entwickeln (25,98).

Exemplarisch soll hier kurz von einer älteren Studie berichtet werden, da sie zu den ersten prospektiven Studien mit einem großen Patientenkollektiv gehörte. In der Studie von Cave et. al.<sup>(28)</sup>, wiesen ca. 40% der Patienten während der Induktionsphase eine MRD Last auf. Das Risiko zur Rezidiventwicklung lag hier bei MRD pos. Patienten ca. 5,7 x höher im Vergleich zur MRD neg. Patientengruppe. Bei einer Last von  $10^{-2}$  war es sogar 16 x höher im Vergleich zu Patienten mit einer Last von  $<10^{-3}$ . Ähnliche z.T. auch kontrovers diskutierte Ergebnisse für die MRD als unabhängiger prognostischer Parameter lieferten weitere Studien<sup>(21,23,40,50,88,117,136)</sup>.

MRD als individueller prognostischer Parameter während der Chemotherapie zur Erstbehandlung einer ALL im Kindesalter ist zu einem unabhängigen zunehmend anerkannten Parameter geworden.

Die Auswirkung der MRD auf die zukünftige Stratifizierung der Induktionstherapie, Konsolidierungstherapie und Erhaltungstherapie wird sich in den nächsten Jahren zeigen.

Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine MRD Last vor SZT mit einem signifikant erhöhtem Risiko des Rezidivs einhergeht<sup>(13,56,74)</sup>.

Die Untersuchung der MRD nach SZT hingegen wird sehr kontrovers diskutiert, auch ist die Datenlage hierzu nicht all zu groß. Hierauf soll unten noch näher eingegangen werden. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit wurden auch keine Analysen bei größeren Patientenkollektiven durchgeführt. Die serielle Untersuchung der MRD als prognostischer Parameter nach SZT bei Kindern ALL ist Gegenstand dieser Doktorarbeit. Unsere Ergebnisse und deren Bedeutung für zukünftige Therapiestrategien soll im folgendem diskutiert werden.

## 6.2 Methoden

### 6.2.1 Immunglobulin und T-Zellrezeptor Rearrangements als MRD Marker bei ALL

Es stehen mittlerweile eine große Anzahl an verschiedenen Primerkollektiven für die Target Analyse zur Verfügung <sup>(20,24,41,84,121,124,141)</sup>. Insgesamt verwendeten wir 25 Primerpaare aus der Kollektion für die Analyse, sechs IgH (Immunglobulinschwerkette), fünf IgK (Immunglobulinleichtkette), sieben  $\gamma$ TCR (T-Zellrezeptor), sechs  $\delta$ TCR und ein TAL-1 Primerpaar. Ansatzpunkte der Primer sind die Germlinesequenzen Upstream oder Downstream der Verknüpfungsregionen innerhalb der Gensegmente. Einige Patienten wiesen Polyklonalitäten im Bereich des  $V_{\gamma 1}$  Targets auf. Wenn bei diesen Patienten sonst keine ausreichenden Targets zur Verfügung standen, verwendeten wir weitere sechs spezifische  $V_{\gamma 1}$  Vorwärtsprimer mit demselben Reversenprimer aus der vorangegangenen PCR (Polymerasekettenreaktion), so ließ sich in den meisten Fällen eine Auftrennung erreichen.

Mit diesen Primern lassen sich nahezu alle B- und T-Zelleukämien im Kindesalter charakterisieren <sup>(41)</sup>. Alle unsere Patienten konnten charakterisiert werden.

Um eine ausreichende Sensitivität der Primer zu gewährleisten, wurde vor Messung der MRD (Minimale Resterkrankung) ein Testlauf mit verdünnter Diagnoseprobe durchgeführt. Hierbei forderten wir mindestens eine Sensitivität von  $10^{-4}$  bei einem Primer. Dies konnte auch für die überwiegende Anzahl der Patienten erreicht werden. Zusätzlich wurde bei jeder Messung einer Nachprobe für jeden Primer eine Standardverdünnungsreihe mit der Diagnoseprobe mitgemessen.

Gleichzeitig wurden für die Reinheitskontrollen jeweils Wasserproben und für die adäquate Quantifizierung standardisierte Albuminkontrollen mitgeführt.

## 6.2.2 Stabilität der Rearrangements

Die Klonale Instabilität der Genrearrangements stellt eine Möglichkeit für Falsch-neg. PCR (Polymerasekettenreaktion) Ergebnisse dar. In einer Studie von Li et. al,<sup>(79)</sup> wurden 41 Kinder mit ALL (Akuter lymphatischer Leukämie) auf die Stabilität der Gensequenzen zwischen initialer Diagnose und Rezidiv seriell im KM (Knochenmark) untersucht. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass bei 42% der Patienten alle bei Diagnose identifizierter Rearrangements auch beim Rezidiv konserviert blieben. 24% der Patienten behielten eines der Diagnose Targets bei, 14% hatten sowohl alte als auch neu Entwicklungen. Bei 20% der Patienten war zum Zeitpunkt der Diagnose keines der alten Targets konserviert worden. Eine andere Studie von Germano et. al,<sup>(51)</sup> untersuchte 53 Kinder mit Prä-B-ALL auf die klonale Stabilität. Hier konnten insgesamt bei 71% der Patienten die diagnostischen PCR-Targets beim Rezidiv konserviert werden. In dieser Patientengruppe entwickelten 3 Patienten komplette de novo Targets. Jedoch wiesen auch hier 94% der Patienten mindestens ein stabiles Target bei Rezidiv auf. Szczepanski et. al,<sup>(126)</sup> untersuchte 28 Kinder mit T-ALL, auch hier konnten in 65% der Fälle alle initialen Targets konserviert dargestellt werden und in 27% der Fälle blieb mindestens eines stabil. Diese Studien zeigen, dass eine klonale Instabilität nicht ausgeschlossen werden kann, dass jedoch auch gleichzeitig die überwiegende Anzahl der Patienten auch bei Rezidivdiagnose mindestens ein stabiles Target aufweisen. Um die Möglichkeit der Falsch-neg. PCR-Ergebnisse durch klonale Instabilität möglichst gering zu halten, versuchten wir bei jedem Patienten zwei Targets mit eindeutiger Monoklonalität zu verwenden. Dies gelang bei 69 der 100 Patienten.

## 6.3 Minimale Resterkrankung

### 6.3.1 MRD als prognostischer Parameter nach SZT

Die Bedeutung der MRD (Minimale Resterkrankung) als prognostischer Parameter nach SZT (Stammzelltransplantation) wird in der Literatur z.T. kontrovers diskutiert <sup>(68,100,130)</sup>. Zunächst soll nur betrachtet werden, ob MRD vorhanden war oder nicht, ohne auf die Höhe der Last einzugehen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Vorhandensein einer MRD Last das RFS (rezidivfreies Überleben) bei einem Jahr bei 36,53% im Gegensatz zu 95,04% bei keiner MRD Last lag. Bei drei Jahren lag das RFS bei nachweisbarer MRD Last nur bei 17,17% im Gegensatz zu 91,64% bei keiner MRD Last. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass eine nachweisbare MRD Last nach SZT signifikant ( $p < 0,001$ ) mit dem Auftreten eines Rezidivs korreliert ist und der Nachweis von MRD als prognostischer Parameter von signifikanter Bedeutung ist. Von den 50 Patienten die zu einem Zeitpunkt eine MRD Last aufwiesen, erlitten 35 ein Rezidiv, 11 verblieben in Remission und 4 verstarben an TRM. Diese Ergebnisse deuten eindeutig daraufhin, dass bei einem Nachweis von MRD im KM (Knochenmark) nach SZT eine Immuntherapie oder weitere Chemotherapie indiziert sein könnte und dass dabei 15 Patienten einer unnötig weiteren toxischen Therapie unterzogen werden würden, bzw. 11 unter Ausschluss der TRM Patienten. Ähnliche Ergebnisse erzielte auch Radich et. al,<sup>(100)</sup> in einer Studie an 20 Patienten. In dieser Studie lag das RFS bei Nachweis von MRD innerhalb der ersten 100 Tage nach SZT bei 0%. Knechtli et. al,<sup>(73)</sup> untersuchte 71 Kinder nach SZT. Auch hier wiesen nur 8/36 der in Remission bleibenden Kinder zu irgendeinem Zeitpunkt eine MRD Last auf. Von diesen 8 Kindern wiesen 5 eine Grad I-II akute GVHD (Graft Versus Host Disease) auf, die bei diesen Patienten einen GVL (Graft Versus Leukemia) Effekt unterstützt. Unzel et. al,<sup>(130)</sup> untersuchten 32 Patienten, wovon 23 Kinder waren. In Ihrer Studie zeigte sich auch eine deutliche Korrelation zwischen MRD Nachweis und Rezidiv.

Auch hier würden nur eine geringe Anzahl an Patienten einer zusätzlichen Toxizität durch weitere Therapie erleiden. Bei uns wiesen 2 der 11 Patienten in Remission eine GVHD Grad I-II auf. Ein Patient wies einen IMC auf und erhielt daraufhin eine DLI als Immuntherapie.

Es stellt sich nun die Frage, ob es eine kritische MRD Last gibt, bei der sich mit nahezu 100% Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv voraus sagen läßt.

In unserer Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass das RFS innerhalb der nächsten zwei Jahre nach SZT, bei einer MRD Last von  $\geq 1 \times 10^{-3}$  bei 0% lag. Es ist anzunehmen, dass dieser Zeitraum weit unter zwei Jahren liegt, da ein Patient erst am Tag 619 erstmalig gemessen werden konnte und zu diesem Zeitpunkt bereits eine MRD Last von  $> 1 \times 10^{-3}$  hatte. Diese Patienten konnten auch nicht von einer zusätzlichen Immuntherapie profitieren, wie unten nochmals gezeigt wird. Für diese Patienten ist anzunehmen, dass sie wahrscheinlich von einer zusätzlichen experimentellen Chemotherapie nach SZT profitieren könnten. In einer Studie von Knechtli et. al,<sup>(74)</sup> zur Untersuchung der MRD Last vor SZT bei Kindern mit ALL ergab sich ebenfalls als kritischer Wert eine MRD Last von  $1 \times 10^{-2} - 1 \times 10^{-3}$ .

Zwei Patienten waren MRD neg. zum Zeitpunkt des Rezidivs. Dies stellt möglicherweise einen Hinweis auf Klonalevolution oder Meßfehler dar.

Für MRD Lasten die unterhalb von  $1 \times 10^{-3}$  liegen sind die Ergebnisse in unserer Arbeit bei Betrachtung der retrospektiv ermittelten Gesamtgruppen nicht ganz so eindeutig.

	MRD Low n=5	MRD pos. n=12	MRD neg. n=50
<b>Gesamt</b>	<b>75,00%</b>	<b>91,67%</b>	<b>95,04</b>
<b>RFS 1 J</b>			
<b>Gesamt</b>	<b>75,00%</b>	<b>91,67%</b>	<b>91,64%</b>
<b>RFS 3 J</b>			

**Tabelle 26:** Ein- und dreijähriges rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der MRD Gesamtgruppe. RFS= rezidivfreies Überleben, MRD= Minimale Resterkrankung

Hier zeigt sich, dass insgesamt auch bei einer MRD Low Last, das RFS immer noch 75,00% nach ein und drei Jahren betrug. Hier muss allerdings beachtet werden, dass diese Analyse retrospektiv nach Beendigung der Untersuchung erhoben wurde, und die Patienten über den ganzen Untersuchungszeitraum diese MRD Last als Maximum behielten. Auch ist das Patientenkollektiv, das über den gesamten Untersuchungszeitraum MRD Low war, sehr gering (5 Patienten). Deswegen soll nun auf die Bedeutung der seriellen MRD Analyse nach SZT eingegangen werden und untersucht werden, ob Entwicklungen über die individuelle Dynamik der MRD eines Patienten möglich sind.

Natürlich muß bei den Studienvergleichen auch beachtet werden, dass diese nicht alle untereinander standardisiert durchgeführt wurden.

### 6.3.2 MRD als Parameter zum kontinuierlichen Monitoren nach SZT

	MRD High	MRD Low	MRD pos.	MRD neg.
Tag bis 45 RFS 1 J	12,5% (8)	34,29% (7)	42,86 (7)%	80,43% (52)
Tag 46-75 RFS 1 J	0% (8)	33,33% (3)	58,92% (12)	80,71% (40)
Tag 76-110 RFS 1 J	0% (12)	50,00% (6)	57,14% (9)	94,23% (40)
Tag 160-250 RFS 1 J	11,11% (9)	75,00% (4)	66,67% (6)	88,99% (28)
Tag > 250 RFS 1 J	0% (12)	0% (2)	50,00% (4)	90,01 (22)
Tag bis 45RFS 3 J	0%	34,29%	42,86%	65,00%
Tag 46-75 RFS 3 J	0%	33,33%	58,92%	80,71%
Tag 76-110 RFS 3 J	0%	50,00%	57,14%	78,81%
Tag 160-250 RFS 3 J	0%	25,00%	66,67%	80,09%
Tag > 250 RFS 3 J	0%	0%	50,00%	78,70%

**Tabelle 27:** Ein- und dreijähriges rezidivfreie Überleben in Abhängigkeit von der MRD Gruppe an verschiedenen Zeitpunkten nach SZT. RFS= rezidivfreies Überleben, MRD= Minimale Resterkrankung, J= Jahr

Bei diesen Ergebnissen ist zu beachten, dass nicht alle 100 Patienten kontinuierlich zu jedem dieser Zeitpunkte gemessen werden konnten. Auch hier zeigt sich deutlich, dass eine MRD (Minimale Resterkrankung) Last von  $\geq 1 \times 10^{-3}$

mit einer 100% Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs einhergeht. Dies bedeutet, dass unabhängig vom Zeitpunkt dieses Wertes, der Patient eine weitere Therapie erhalten sollte. Bereits eine MRD Low Last am Tag bis 45 nach SZT (Stammzelltransplantation) führt nur zu einem RFS (rezidivfreies Überleben) von 34,39% im Gegensatz zu 75,00% wenn der Patient über den gesamten Untersuchungszeitraum MRD Low bleibt. Wie unter den einzelnen Patienten Beispielen verdeutlicht, ist es schwierig, die Entwicklung der MRD Last bei einem einzelnen Patienten vorherzusagen. Ein MRD Low Patient kann sowohl ein Rezidiv erleiden, als auch in Remission bleiben.

Jedoch sind alle RFS Zahlen kleiner als in vorheriger Tabelle, dies beweist, dass Patienten die MRD Gruppe im Verlauf wechseln und damit die Dynamik der MRD Last nach SZT mit hoher Wahrscheinlichkeit ein wichtiger prognostischer Parameter ist.

Allerdings ist das Patientenkollektiv der konstant MRD Low Patienten mit 5 Patienten sehr gering. Am Tag bis 45 nach SZT hingegen waren es auch nur 7 Patienten. Dennoch würde dies eine zusätzliche Therapie möglicherweise gerechtfertigen, da die einzelne Entwicklung nicht vorhersehbar ist und bei einem fulminanten Rezidiv die therapeutischen Möglichkeiten sehr eingeschränkt wären. Es würden ca. 1/3 der Patienten hier einem unnötigem zusätzlichem Risiko ausgesetzt werden. Insgesamt liegt in dieser Gruppe bei jedem Messzeitpunkt (ausser Tag 160 – 250) das RFS bei  $\leq 50\%$ .

Auch bei den MRD pos. Patienten zeigt sich, dass insgesamt gesehen das RFS nahezu gleich ist wie bei MRD neg. (91,67% versus 95,04%) Patienten. Betrachtet man aber den Tag bis 45 nach SZT, so liegt es nur 42,86% für ein Jahr. Dies würde allerdings auch bedeuten, dass hier fast 50% der Patienten einer unnötigen Belastung durch weitere Therapie erfahren würden. Für die weitere Entwicklung zeigt sich, dass bis zum Tag 250 nach SZT das RFS in dieser Gruppe relativ zunimmt und damit auch die Anzahl der unnötig zusätzlich therapierter Patienten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass MRD Lasten von  $< 10^{-4}$  bei Patienten mit GVHD (Graft Versus Host Disease und ohne IMC (ansteigend gemischter Chimärismus) eventuell abwartend betrachtet werden könnten, bei engmaschiger Kontrolle im Knochenmark.

Auch hier ist wieder zu beachten, dass die Vorhersehbarkeit der Entwicklung nicht eindeutig möglich ist. Dies könnte die Diskrepanz der Ergebnisse zwischen Gesamt-MRD Gruppe und Serieller Einzelanalyse erklären.

Die Untersuchungszeiträume lagen zwischen 29 und 45 Tage innerhalb der ersten 100 Tage. Die Frage, ob eine engmaschigere Kontrolle eine Verlaufsaussage zutreffen läßt, läßt sich nur vermuten. Dennoch ist eine wöchentliche Analyse der MRD Last aus dem Knochenmark nicht denkbar auf Grund der damit großen Belastung der Kinder.

Eine Studie von Imashuku et. al, <sup>(68)</sup> an Kindern mit ALL, untersuchte Knochenmark nach SZT an vier Zeitpunkten: 1 Monat, 3 Monate 6 Monate und 12 Monate. Hier ergab sich keine Korrelation mit dem Rezidiv. Bei ihnen wiesen eine hohe Anzahl an Patienten eine Klonale Evolution auf, dies wurde für das „versagen“ verantwortlich gemacht. Diese Möglichkeit muß zusätzlich in Betracht gezogen werden.

Auffallend ist jedoch, dass ein MRD Nachweis am Tag bis 45 nach SZT ein schlechteres RFS aufweist als an den folgenden Tagen, bis es dann wieder ab dem Tag > 250 abfällt. Dies würde Bedeuten, dass insbesondere in den ersten 100 Tagen nach SZT eine engmaschige Kontrolle der MRD von Bedeutung ist.

Zusammenfassend läßt sich damit sagen, dass MRD Lasten von  $\geq 1 \times 10^{-3}$  in unserer Arbeit eindeutig sind und eine weitere Therapie gerechtfertigen. Für Lasten  $< 1 \times 10^{-3}$  sind die Ergebnisse nicht eindeutig, auch wenn bei Betrachtung der Frage MRD ja oder nein sich signifikante Unterschiede zwischen dem RFS zeigten. Dies könnte damit erklärt werden, dass eine relativ hohe Anzahl der Patienten MRD High waren und nur ein geringes Kollektiv kleinere Lasten aufwies. Insgesamt waren in der Patientenpopulation 33 Patienten MRD High, 12 MRD pos. 5 MRD Low und 50 MRD neg. Dies verdeutlicht, dass nahezu doppelt so viele Patienten eine Last  $\geq 1 \times 10^{-3}$  aufwiesen und nur 17 niedrigere Lasten hatten. Diese Verteilung könnte das insgesamt sehr niedrige RFS bei der einfachen Betrachtung von MRD vorhanden bzw. nicht vorhanden erklären. Um die Frage der MRD Bedeutung bei Lasten  $< 1 \times 10^{-3}$  zu beantworten, wären Untersuchungen mit größeren

Patientengruppen in diesem Bereich sehr hilfreich. Dennoch gibt es starke Hinweise, dass MRD Lasten von  $\geq 1 \times 10^{-4}$  eine zusätzliche Therapie bei sehr hohem Rezidivrisiko und insgesamt geringe Zahl unnötig zusätzlich therapierten Patienten gerechtfertigen.

Diese Ergebnisse stützen die prognostische Bedeutung der MRD als Parameter für das Überleben nach SZT. Die zusätzliche MRD Untersuchung der im ALL-BFM Protokoll an den Tagen 30, 60 und 100 vorgesehenen KM-Punktionen könnte damit zur Risikostratifizierung beitragen.

Im Vergleich zur seriellen Chimärismusanalyse im peripheren Blut im wöchentlichen Abstand ist die MRD Analyse für die Entscheidung für eine zusätzliche Therapie im KM jedoch wahrscheinlich unterlegen.

In dieser Arbeit erhielten auch 25 Patienten auf der Basis eines IMC eine Immuntherapie. Die Bedeutung der MRD Last zu Zeitpunkt der Immuntherapie soll nun näher betrachtet werden.

#### **6.4 Bedeutung der MRD bei Initiierung einer Immuntherapie**

Die Immuntherapie entwickelte sich aus der Tatsache, dass eine zweite SZT (Stammzelltransplantation) mit einer sehr hohen Morbidität und Mortalität verbunden ist <sup>(16,52,109)</sup>. Man ging von der Annahme aus, dass DLI (Donor Lymphozyten Infusion) oder CSA (Cyclosporin) Reduktion einen GVL-Effekt (Graft Versus Leukemia) über eine GVHD (Graft Versus Host Disease) Reaktion induzieren <sup>(7,46,92,93,137,138)</sup>. Insbesondere bei CML (Chronisch myeloische Leukämie) scheint dies eine sehr erfolgversprechende Therapieoption.

Die Arbeitsgruppe um Bader et. al konnte in den letzten Jahren zeigen, dass die serielle Chimärismusanalyse im peripheren Blut ein wichtiger Parameter für die Entscheidung zur Immuntherapie darstellt. Ein IMC (ansteigend gemischter Chimärismus) hat eine nahezu 100% Rezidivwahrscheinlichkeit und lässt sich durch frühzeitige Immuntherapie signifikant senken <sup>(8,9,10,11,12,14)</sup>. In einer Studie von Bader et. al, 2004 erlitten 48% der immuntherapierten Patienten trotzdem

ein Rezidiv. Bisher wurden noch keine großen Studien zur MRD (Minimale Resterkrankung) Last vor Initiierung einer Immuntherapie durchgeführt. Eine Studie mit 40 Patienten von Sanchez et.al, <sup>(108)</sup> dass die MRD mittels FACS (Flow zytometrische Immunphänotypisierung) quantifizierte, sprach von dem möglichen Nutzen der MRD für den Zeitpunkt einer Immuntherapie mittels DLI, der sich zufällig in dieser Studie ergab. In unserer Arbeit war es möglich, auch die 25 Patienten mit IMC einer seriellen MRD Analyse zu unterziehen.

Es zeigte sich eindeutig, dass Patienten die zum Zeitpunkt der Immuntherapie eine MRD Last von  $\geq 1 \times 10^{-3}$  aufwiesen ein RFS (rezidivfreies Überleben) von 0% nach 1,69 Jahren hatten, während die Gruppe der Patienten, die zum Zeitpunkt  $< 1 \times 10^{-3}$  waren, ein RFS von 56,67% nach einem Jahr und 47,22% nach drei Jahren hatten. Diese signifikant eindeutigen Ergebnisse eröffnen zusätzlich einen prognostisch äußerst wichtigen Bereich der MRD Analyse und könnten auch das eher schlechte Ansprechen der ALL durch DLI, CSA Reduktion erklären, indem das Tumorburden zu diesem Zeitpunkt bereits zu groß ist. Diese Ergebnisse würden bedeuten, dass Patienten, die zum Zeitpunkt der Immuntherapie eine entsprechende MRD Last aufweisen von dieser nicht profitieren und somit als Kandidaten für zusätzliche experimentelle Therapien in Frage kämen, bzw. bei Ihnen eine zweite SZT trotz des hohen Risikos eine therapeutische Option wäre.

Bisher gibt es allerdings noch keine Untersuchung an großen Patientenkollektiven, die diese Ergebnisse unterstützen.

## 6.5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend lassen unsere Arbeiten folgende Kernaussagen und Zukunftsperspektiven für die MRD (Minimale Resterkrankung) Messung nach SZT (Stammzelltransplantation) zu:

- MRD als prognostischer Parameter nach SZT ist von signifikanter Bedeutung.

- Eine MRD Last von  $\geq 1 \times 10^{-3}$  führt in 100% der Fälle zum Rezidiv und eine in diesem Stadium eingeleitete Immuntherapie ist auf lange Sicht nicht erfolgversprechend.
- Die Bedeutung der MRD Last von  $< 1 \times 10^{-3}$  ist nicht abschließend geklärt, dennoch gibt es starke Hinweise das auch eine MRD Last von  $\geq 1 \times 10^{-4}$  eine Indikation zur Therapie darstellt mit relativ gering unnötig zusätzlich therapierter Patienten.
- Eine MRD Last von  $< 1 \times 10^{-4}$  kann evt. bei nicht vorhandenem IMC (ansteigend gemischter Chimärismus) und gleichzeitiger akuter GVHD (Graft Versus Host Disease) engmaschig kontrolliert werden und abgewartet werden, da hier die Zahl der unnötig therapierten Patienten relativ hoch wäre.
- Eine individuelle Vorhersage über die Entwicklung der MRD Last ist in diesen Zeitabständen nicht sicher möglich.
- Die MRD Analyse könnte gerade Patienten mit CC (kompletter Chimärismus), DMC (absteigend gemischter Chimärismus) und LMC (low-level Chimärismus), die bisher kein geeignetes Monitoren haben, eine mögliche Alternative darstellen.
- Eine MRD Analyse an den Tag 30, 60, 100 und  $> 250$  könnte eine Hilfe zur Therapiestratifizierung zu dem Zeitpunkt sein, insbesondere für evt. Immuntherapien.

Zukünftig könnte die Entwicklung der MRD Messung aus dem peripherem Blut, ähnlich der Chimärismusanalyse eine Möglichkeit zur Überwindung der großen Messabstände darstellen und damit die Dynamik der MRD Entwicklung besser sichtbar werden und die Bedeutung der MRD Low und MRD pos. Lasten genauer untersucht werden.

## **7. Zusammenfassung der Arbeit**

Heute können durch konventionelle standardisierte Polychemotherapie 70%-80% der Kinder mit ALL (Akute lymphatische Leukämie) in dauerhafter Remission gehalten werden. Es bleiben jedoch 20%-30% der Kinder, die Rezidive ihrer Leukämie erleiden. Für diese Kinder stellt die SZT (Stammzelltransplantation) eine etablierte Therapieoption dar.

Das Rezidiv ist aber auch hier eine der häufigsten Ursachen für das „versagen“ der Therapie. In den letzten Jahren sind eine Reihe von Methoden entwickelt worden, um submikroskopisch Leukämieblasten nachzuweisen. Diese Blasten sind möglicherweise „resistent“ gegenüber der Konditionierungstherapie und stellen damit einen möglichen Ursprung für ein Rezidiv dar. Diese submikroskopische Blasten werden MRD (Minimale Resterkrankung) genannt.

Die Untersuchung und Quantifizierung dieser Blasten mittels RQ-PCR (Real-time quantitative Polymerasekettenreaktion) der Immunglobulin- und T-Zellrezeptor Rearrangements bei Kindern mit ALL nach SZT ist Gegenstand dieser Arbeit.

Die MRD als eigenständiger prognostischer Parameter im KM (Knochenmark) während der Induktionstherapie der ALL ist bereits gut etabliert. Die Bedeutung der MRD nach SZT wird noch kontrovers diskutiert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von MRD nach SZT mit einem signifikant niedrigerem RFS (rezidivfreies Überleben) einhergeht. Für Patienten mit MRD Nachweis betrug das RFS nach einem Jahr nur 36,53% im Gegensatz zu 95,04% bei Patienten ohne MRD Nachweis. Dieser Unterschied zeigte sich bei drei Jahren noch deutlicher. Weiterhin sollte untersucht werden, ob es eine kritische MRD gibt, bei der es zum Rezidiv kommt. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer MRD Last von  $\geq 1 \times 10^{-3}$  100% der Patienten innerhalb der nächsten zwei Jahre nach Messung ein fulminantes Rezidiv erlitten. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass Patienten, die zum Zeitpunkt ihrer Immuntherapie (entweder Donor Lymphozyten oder Cyclosporin Reduktion) eine MRD Last von  $\geq 1 \times 10^{-3}$  aufwiesen, von dieser nicht profitierten. Bei diesen Patienten lag das RFS bei 0%. Bei den Patienten, deren MRD Last

zu diesem Zeitpunkt  $< 1 \times 10^{-3}$  war, lag das RFS bei 56,67% nach einem Jahr. Diese Ergebnisse deuten auf die erhebliche prognostische Bedeutung der MRD Messung nach SZT. Insbesondere auch für die Stratifizierung der weiterführende Therapie dieser Kinder.

Die Bedeutung von MRD Lasten die  $< 1 \times 10^{-3}$  sind, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden, dennoch gibt es auch hier starke Hinweise, dass Patienten mit MRD Lasten von  $\geq 1 \times 10^{-4} / < 1 \times 10^{-3}$ , von einer zusätzlichen Therapie profitieren könnten. Patienten, die im gesamten Verlauf der Untersuchung MRD Lasten von  $\geq 1 \times 10^{-4} / < 1 \times 10^{-3}$  hatten, hatten ein RFS von 75,00%. Patienten, die jedoch zu den seriellen KM-Untersuchungszeitpunkten eine MRD Last von  $\geq 1 \times 10^{-4} / < 1 \times 10^{-3}$  hatten ein deutlich niedrigeres RFS (34,29%) auf. Dies beweist den offensichtlich dynamischen Verlauf der MRD. Ein Problem, dass in dieser Arbeit dargestellt werden konnte, scheint die schnelle dynamische Entwicklung der MRD zum fulminanten Rezidiv zu sein, andererseits auch die Schwierigkeit den genauen Verlauf eines einzelnen Patienten vorherzusagen. An zwei exemplarischen Patientenbeispielen erfolgte die Rezidiventwicklung innerhalb von ca. 30 Tagen, obwohl die vorherige MRD Messung keinen Hinweis auf diese Entwicklung lieferte. Ob sich diese Probleme durch häufigere KM-Punktionen eliminieren ließen, bleibt spekulativ, da dies klinisch nicht durchführbar wäre. Dies wäre auch gleichzeitig ein Ansatzpunkt für zukünftige Untersuchungen der MRD aus peripherem Blut, wie es z.B. bei der Chimärismusanalyse gemacht wird. Für die abschließende Bedeutung von MRD Lasten von  $< 1 \times 10^{-3}$  müssten weitere Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven durchgeführt werden.

## **8. Literaturverzeichnis**

### **Literaturverzeichnis in Alphabetischer Reihenfolge**

1. Agrawal, A., Schatz, D.G. (1997)  
RAG 1 and RAG 2 form a stable postcleavage synaptic complex with DNA containing signal ends in V (D) J recombination.  
Cell, 89 (1), 43-53
2. Anasetti, C., Amos, D., Beatty, P.G., Appelbaum, F.R., Bensinger, W., Buckner, C.D., Clift. R., Doney, K., Martin, P.J., Mickelson, E., Nisperos, B., O'Quigley, J., Ramberg, R., Sanders, J.E., Stewart, P., Storb, R., Sullivan, K.M., Witherspoon, R.P., Thomas, E.D., Hansen, J.A. (1989)  
Effect of HLA compatibility on engraftment of Bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma.  
N Engl J Med, 320 (4), 197-204
3. Aplan, P.D., Lombardi, D.P., Ginsberg, A.M., Cossmann, J., Bertness, V.L., Kirsch, I.R., (1990)  
Disruption of the human SCL locus by „illegitimate“ V-(D)-J recombinase activity.  
Science, 250 (4986), 1426-1429
4. Armitage, J.O. (1994)  
Bone marrow transplantation.  
N Engl J Med, 330 (12), 827-838
5. d'Auriol, L., Macintyre, E., Galibert, F., Sigaux, F. (1989)  
In vitro amplification of T-cell  $\gamma$  gene rearrangements: a new tool for the assessment of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemias.  
Leukemia, 3 (2), 155-158
6. Aversa, F., Tablio, A., Verlardi, A., Cunningham, I., Terenzi, A., Falzetti, F., Ruggeri, L., Barbabietola, G., Aristei, C., Latini, P., Reisner, Y., Martinelli, M.F. (1998)  
Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype.  
N Engl J Med, 339 (17), 1186-1193
7. Bacigalupo, A., van Lint, M.T., Occhini, D., Gulandi, F., Lamparelli, T., Sogno, G., Tedone, E., Frassoni, F., Tong, J., Marmont, A.M. (1991)  
Increased risk of leukemia relapse with high-dose cyclosporine A after allogeneic marrow transplantation for acute leukemia.  
Blood, 77 (7), 1423-1428
8. Bader, P., Holle, W., Klingebiel, T., Handgretinger, R., Niethammer, D., Beck, J. (1996)  
Quantitative assessment of mixed hematopoietic chimerism by polymerase chain reaction after allogeneic BMT.  
Anticancer Res, 16 (4A), 1759-1763
9. Bader, P., Holle, W., Klingebiel, T., Handgretinger, R., Bend, N., Schlegel, P.G., Niethammer, D., Beck, J. (1997)  
Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation: The impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse and graft rejection in children.  
Bone Marrow Transplant, 19 (7), 697-702

10. Bader, P., Beck, J., Frey, A., Schlegel, P.G., Hebarth, H., Handgretinger, R., Einsele, H., Niemeyer, C., Benda, N., Faul, C., Kanz, L., Niethammer, D., Klingebiel, T. (1998)  
Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT.  
*Bone Marrow Transplant*, 21 (5), 487-495
11. Bader, P., Klingebiel, T., Schaudt, A., Theurer-Mainka, U., Handgretinger, R., Lang, P., Niethammer, D., Beck, J.F. (1999)  
Prevention of relapse in pediatric patients with acute leukemias and MDS after allogeneic SCT by early immunotherapy initiated on the basis of increasing mixed chimerism: A single center experience of 12 children.  
*Leukemia*, 13 (12), 2079-2086
12. Bader, P., Stoll, K., Huber, S., Geiselhart, A., Handgretinger, R., Niemeyer, C., Einsele, H., Schlegel, P.G., Niethammer, D., Beck, J., Klingebiel, T. (2000)  
Characterization of lineage-specific chimerism in patients with acute leukaemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation before and after relapse.  
*Br J Haematol*, 108 (4), 761-768
13. Bader, P., Hancock, J., Kreyenberg, H., Goulden, N.J., Niethammer, D., Oakhill, A., Steward, C.G., Handgretinger, R., Beck, J.F., Klingebiel, T. (2002)  
Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL.  
*Leukemia*, 16 (9), 1668-1672
14. Bader, P., Kreyenberg, H., Hoelle, W., Dueckers, G., Handgretinger, R., Lang, P., Kremens, B., Dilloo, D., Sykora, K.W., Schrappe, M., Niemeyer, C., von Stackelberg, A., Gruhn, B., Henze, G., Greil, J., Niethammer, D., Dietz, K., Beck, J.F. and Klingebiel, T. (2004)  
Increasing Mixed Chimerism Is an Important Prognostic Factor for Unfavorable Outcome in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia After Allogeneic Stem-Cell Transplantation: Possible Role For Pre-Emptive Immunotherapy?  
*J Clin Oncol*, 22 (9), 1696-1705
15. Baker, K.S., De For, T.E., Burns, L.J., Ramsay, N.K.C., Neglia, J.P., Robinson, L.L. (2003)  
New Malignancies After Blood or Marrow Stem-cell Transplantation in Children and Adults. Incidence and Risk Factors.  
*J Clin Oncol*, 21 (7), 1352-1358
16. Barret, A.J., Locatelli, F., Treleaven, J.G., Gratwohl, A., Szydlo, R., Zwaan, F.E. (1991)  
Second transplants for leukaemic relapse after bone marrow transplantation: High early mortality but favorable effect of chronic GVHD on continued remission-A report by the EBMT Leukaemia Working Party.  
*Br J Haematol*, 79 (4), 567-574
17. Baruchel, A., Cayuela, J.M., MacIntyre, E., Berger, R., Sigaux, F. (1995)  
Assessment of clonal evolution at Ig/TCR loci in acute lymphoblastic leukaemia by single-strand conformation polymorphism studies and highly resolutive PCR derived methods: implication for a general strategy of minimal residual disease detection.  
*Br J Haematol*, 90 (1), 85-93
18. Bash, R.O., Hall, S., Timmons, C.F., Crist, W.M., Amylon, M., Smith, R.G., Baer, R. (1995)  
Does activation of the TAL 1 gene occur in a majority of patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia? A pediatric oncology group study.  
*Blood*, 86 (2), 666-676
19. Begley, C.G., Aplan, P.D., Denning, S.M., Haynes, B.F., Waldmann, T.A., Kirsch, I.R. (1989)  
The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation – related DNA-binding motif.

Proc Natl Acad Sci USA, 86 (24), 10128-10132

20. Beishuizen, A., de Bruijn, M.A.C., Pongers- Willemse, M.J., Verhoeven, M., van Wering, E.R., Hählen, K., Breit, T.M., De Bruin- Versteeg, S., Hooijkaas, H., van Dongen, J.J.M. (1997)  
Heterogeneity in junctional regions of immunoglobulin kappa deleting element rearrangement in B cell leukemias: A new molecular target for detection of minimal residual disease.  
Leukemia, 11 (12), 2200-2207

21. Brisco, M.J., Condon, J., Hughes, E., Neoh, S.H., Sykes, P.J., Seshardi, R., Toogood, I., Waters, K., Tauro, G., Ekert, H. (1994)  
Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukaemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction.  
Lancet, 343 (8891), 196-200

22. Buske, C., Humphries, R.K. (2000)  
Homeobox genes in leukemogenesis.  
Int J Hematol, 71 (4), 301-308

23. Campana, D., Pui, C.H. (1995)  
Detection of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia: Methodologic Advances and Clinical significance.  
Blood, 85 (6), 1416-1434

24. Campbell, M.J., Zelenetz, A.D., Levy, S., Levy, R. (1992)  
Use of family specific leader region primers for PCR amplification of the human heavy chain variable region gene repertoire.  
Mol Immunol, 29 (2), 193-203

25. Campbell, P.J., Morley, A.A. (2003)  
Modelling a minimal residual disease-based treatment strategy in childhood acute lymphoblastic leukaemia.  
Br J Haematol, 122 (1), 30-38

26. Carlotti, E., Pettenella, F., Amaru, R., Slater, S., Lister, T.A., Barbui, T., Basso, G., Cazzangia, G., Rambaldi, A., Biondi, A. (2002)  
Molecular characterization of a new recombination of the SIL/TAL-1 locus in a child with T-cell acute lymphoblastic leukemia.  
Br J Haematol, 118 (4), 1011-1018

27. Castagnada, E., Capelli, B., Erba, D., Rabagliati, A., Lanino, E., Dini, G. (2004)  
Cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation in children.  
Hum Immunol, 65 (5), 416-422

28. Cave, H., van der Werff ten Bosch, J., Suci, S., Guidal, C., Waterkeyn, C., Otten, J., Bakkus, M., Thieleman, K., Grandschamp, B., Vilmer, E., Nelken, B., Fournier, M., Boutard, P., Lebrun, E., Mechinaud, F., Garand, R., Rober, A., Dastugue, N., Plouvier, E., Racadot, E., Ferster, A., Gyselinck, J., Fenneteau, O., Duval, M., Sobul, G., Manel, A.M. (1998)  
Clinical Significance of Minimal Residual Disease in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia.  
N Engl J Med, 339 (9), 591-598

29. Chen, Q., Cheng, J.T., Tasi, L.H., Schneider, N., Buchanan, G., Carrol, A., Christ, W., Ozanne, B., Siciliano, M.J., Baer, R. (1990)  
The tal gene undergoes chromosome translocation in T cell leukemia and potentially encodes a helix-loop-helix protein.  
EMBO J, 9 (2), 415-424

30. Chen X., Pan, Q., Stow, P., Behm, F.G., Goorha, R., Pui, C.H., Neale, G.A. (2001)

Quantification of minimal residual disease in T-lineage acute lymphoblastic leukemia with TAL-1 deletion using standardized real-time PCR assay.  
*Leukemia*, 15 (1), 166-170

31. Cheson, B.D., Cassileth, P.A., Head, D.R., Schiffer, C.A., Bennett, J.M., Bloomfield, C.D., Brunning, R., Gale, R.D., Grever, M.R., Keating, M.J. (1990)  
Report of the National Cancer Institute – Sponsered workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia.  
*J Clin Oncol*, 8 (5), 813-819

32. Chien, Y.H., Iwashima, M., Kaplan, K.B., Elliott, J.F., Davis, M.M. (1987)  
A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation.  
*Nature*, 327 (6124), 677-682

33. Choi S.J., Lee, K.H., Lee, J.H., Kim, S., Chung, H.J., Lee, J.S., Kim, S.H., Park, C.J., Chi, H.S., Kim, W.K. (2000)  
Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study.  
*Bone Marrow Transplant*, 26 (3), 327-332

34. Condorelli, G.L., Facchiano, F., Valtieri, M., Proietti, E., Vitelli, L., Lulli, V., Huebner, K., Peschle, C., Croce, C.M. (1996)  
T-cell-directed TAL-1 expression induces T-cell malignancies in transgenic mice.  
*Cancer Res*, 56 (22), 5113-5119

35. Cook, G.P., Tomlinson, I.M. (1995)  
The human immunoglobulin VH repertoire.  
*Immunol Today*, 16 (5), 237-242

36. Davis, M.M., Björkman, P.J. (1988)  
T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition.  
*Nature*, 334 (6181), 395-402

37. van Dongen, J.J.M., Wolvers-Tettero, I.L.M., Wassenaar, F., Borst, J., van Den Elsen, P. (1989)  
Rearrangement and expression of T cell receptor delta genes in T-cell acute lymphoblastic leukemias.  
*Blood*, 74 (1), 334-342

38. van Dongen, J.J., Wolvers-Tettero, I.L. (1991a)  
Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes.  
Part I: Basic and technical aspects.  
*Clin Chim Acta*, 198 (1-2), 1-91

39. van Dongen, J.J., Wolvers-Tettero, I.L. (1991b)  
Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes.  
Part II: Possibilities and limitations in the diagnosis and management of lymphoproliferative diseases and related disorders.  
*Clin Chim Acta*, 198, 93-174

40. van Dongen, J.J., Seriu, T., Panzer-Grumayer, E.R., Biondi, A., Pongers-Willems, M.J., Correl, L., Stolz, F., Schrappe, M., Masera, G., Kamps, W.A., Gadner, H., Van Wering, E.R., Ludwig, W.D., Basso, G., de Bruijn, M.A.C., Cazzangia, G., Hettlinger, K., van der Dose-van der Berg, A., Hop, W.C.J., Riehm, H., Bartram, C.R. (1998)  
Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood.  
*Lancet*, 352 (9142), 1731-1738

41. van Dongen, J.J.M., Langerak, A.W., Brüggemann, M., Evans, P.A.S., Hummel, M., Lavender, F.L., Delabesse, E., Davi, F., Schuurin, E., Garcia-Sanz, R., van Krieken, J.H.J.M., Droese, J., Gonzalez, D., Bastard, C., White, H.E., Spaargaren, M., Gonzalez, M., Parreira, A., Smith, J.L., Morgan, G.J., Kneba, M., Macintyre, E.A. (2003)  
Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936.  
*Leukemia*, 17 (12), 2257 – 2317
42. Dousset, J. (1958)  
Iso-leuco-anticorps.  
*Acta. Haematol*, 20, 156-166
43. Dubovsky, J., Daxberger, H., Fritsch, G., Printz, D., Peters, C., Matthes, S., Gadner, H., Lion, T., Miller-Bevast, N. (1999)  
Kinetics of chimerism during the early post-transplant period in pediatric patients with malignant and non-malignant hematologic disorders: implications for timely detection of engraftment, graft failure and rejection.  
*Leukemia*, 13 (12), 2059-2069
44. Dworzak, M.N., Fröschl, G., Printz, D., Mann, G., Pötschger, U., Mühlegger, N., Fritsch, G., Gadner, H. for the Austrian Berlin-Frankfurt-Münster Study Group. (2002)  
Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia.  
*Blood*, 99 (6), 1952-1958
45. Enright, H., Haake, R., Weisdorf, D., Ramsay, N., McGlave, P., Kersey, J., Thomas, W., McKenzie, D., Miller, W. (1993)  
Cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation: Risk factors and response to therapy.  
*Transplantation*, 55(6), 1339-1346
46. Fefer, A., Sullivan, K.M., Weiden, P., Buckner, C.D., Schoch, G., Storb, R., Thomas, E.D. (1987)  
Graft versus leukemia effect in man: the relapse rate of acute leukemia is lower after allogeneic than after syngeneic marrow transplantation.  
*Prog Clin Biol Res*, 244, 401-408
47. Felix, C.A., Wright, J.J., Poplack, D.G., Reamann, G.H., Cole, D., Goldman, P., Korsmeyer, S.J. (1987)  
T cell receptor alpha-, $\beta$ , and gamma-genes in T cell and pre-B acute lymphoblastic leukemia.  
*J Clin Invest*, 80 (2), 545-556
48. Felix, C.A., Lange, B.J., Chessells, J.M. (2000)  
Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: Challenges and Controversies in 2000.  
*Hematology*, 285-302 (Am Soc Hemtol Edu Programm)
49. Finger, L.R., Kagan, J., Christopher, G., Kurtzberg, J., Hershfield, M.S., Nowell, P.C., Croce, C.M. (1989)  
Involvement of the TCL5 gene on human chromosome 1 in T-cell leukemia and melanoma.  
*Proc Natl Acad Sci USA*, 86 (13), 5039-5043
50. Gameiro, P., Moreira, I., Yetgin, S., Papaioannou, M., Potter, M.N., Prentice, H.G., Hoffbrand, A.V., Foroni, L. (2002)  
Polymerase chain reaction (PCR)- and reverse transcription PCR-based minimal residual disease detection on long-term follow-up of childhood acute lymphoblastic leukaemia.  
*Br J Haematol* 119 (3), 685-696

51. Germano, G., del Giudice, L., Palatron, S., Giarin, E., Cazzangia, G., Biondi, A., Basso, G. (2003)  
Clonality profile in relapsed precursor-B-ALL children by GeneScan and sequencing analyses. Consequences on minimal residual disease.  
*Leukemia*, 17 (8), 1573-1582
52. Giralt, S.A., Champlin, R.E. (1994)  
Leukemia relaps after allogenic bone marrow transplantation: A review.  
*Blood*, 84 (11), 3603-3612
53. Goardon, N., Schuh, A., Hajar, I., Ma, X., Jouault, H., Dzierzak, E., Romeo, P.H., Maouche-Chretien, L. (2002)  
Ectopic expression of TAL-1 protein in Ly-6E.1-htal-1 transgenic mice induces defects in B-and T-lymphoid differentiation.  
*Blood*, 100 (2), 491-500
54. Gonzalez, M., Gonzalez, D., Lopez-Perez, R., Garcia-Sanz, R., Chillon, M.C., Balanzategui, A., Mateos, M.V., Alaejos, I., Langerak, A.W., Orfao, A., Van Dongen, J.J.M., San Miguel, J.F. (1999)  
Heteroduplex analysis of VDJ amplified segments from rearranged IgH genes for clonality assessments in B - cell non - Hodgkin´s lymphoma. A comparison between different strategies.  
*Haematologica*, 84 (9), 779-784
55. Gorlick, R., Goker, E., Tripett, T., Waltham, M., Banerjee, D. and Bertino, J.R. (1996)  
Intrinsic and Acquired Resistance to Methotrexate in Acute Leukemia.  
*N Eng J Med*, 335 (14), 1041-1048
56. Goulden, N., Steward, C. (2002)  
Clinical relevance of MRD in children undergoing allogenic stem cell transplantation for ALL.  
*Best Prac Res Clin Haemato*, 15 (1) , 59-70
57. Greaves, M.F., Chan, L.C., Furley, A.J., Watt, S.M., Molgaard, H.V. (1986)  
Lineage promiscuity in hemopoietic differentiation and leukemia.  
*Blood*, 67 (1), 1-11
58. Hagenbeek, A., Martens, A.C. (1991)  
Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia: Preclinical studies in a relevant rat model.(BNTL)  
*Bailliere´s Clin Haematol*, 4 (3), 609-635
59. Hansen-Hagge, T., Yokoto, S., Bartram, C.R. (1989)  
Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by in vitro amplification of rearranged T-cell receptor  $\delta$  chain sequences.  
*Blood*, 74 (5), 1762-1767
60. *Harrisons Internal Medicine*  
Mc Graw Hill, 15. Auflage, 2000
61. Hayday, A.C., Saito, H., Gillies, S.D., Kranz, D.M. Tanigawa, G., Eisen, H.N., Tonegawa, S. (1985)  
Structure, organization, and somatic rearrangement of T cell gamma genes.  
*Cell*, 40 (2), 259-269
62. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsch, P.S., Griffith, R. (1992)  
Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences.  
*Biotechnology (N Y)*, 10 (4), 413-417
63. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. (1993)

Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.  
*Biotechnology (N Y)*, 11 (9), 1026-1030

64. Hilton, J. (1984)

Role of aldehyde dehydrogenase in cyclophosphamide-resistant L1210 leukemia.  
*Cancer Res*, 44 (11), 5156-5160

65. Hockett, R.D., de Villartay, J.P., Pollack, K., Poplack, D.G., Cohen, D.I., Karsmeyer, S.J. (1988)

Human T-cell antigen receptor (TCR) delta chain locus and elements responsible for its deletion are within the TCR alpha-chain locus.  
*Proc Natl Acad Sci USA*, 85 (24), 9694-9698

66. Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. (1991)

Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase.  
*Proc Natl Acad Sci USA*, 88 (16), 7276-7280

67. Hozumi, N., Tonegawa, S. (1976)

Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions.

*Proc Natl Acad Sci USA*, 73 (10), 3628-3632

68. Imashuku, S., Terui, K., Matsuyama, T., Asami, K., Tsuchiya, S., Ishii, E., Kawa, K., Kosaka, Y., Eguchi, H., Tsuchida, M., Ikuta, K., Kato, S., Koizumi, S., Odamura, J., Morimoto, A., Hibi, S., Hamaoka, K.; multi-institutional collaborative study Japan. (2003)

Lack of clinical utility of minimal residual disease detection in allogeneic stem cell recipients with childhood acute lymphoblastic leukemia: multi-institutional collaborative study Japan.

*Bone Marrow Transplant*, 31 (12), 1127-1135

69. Iuvone, L., Mariotti, P., Colosimo, C., Guzzetta, F., Ruggiero, A., Riccardi, R. (2002)

Long-term cognitive outcome, brain computed tomography scan, and magnetic resonance imaging in children cured for acute lymphoblastic leukemia.

*Cancer*, 95 (12), 2562-2570

70. Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2001)

*Immunobiology 5*

Churchill Livingstone Verlag

71. Kallianpur, A.R., Jordan, J.E., Brandt, S.J. (1994)

The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis.

*Blood*, 83 (5), 1200-1208

72. Kitchingman, G.R., Rovigatti, U., Mauer, A.M., Melvin, S., Murphy, S.B., Stass, S. (1985)

Rearrangement of immunoglobulin heavy chain genes in T cell acute lymphoblastic leukemia.

*Blood*, 65 (3), 725-729

73. Knechtli, C.J., Goulden, N.J., Hancock, J.P., Harris, E.L., Garland, R.J., Jones, C.G., Grandage, V.L., Rowbottom, A.W., Green, A.F., Clarke, E., Lankester, A.W., Potter, M.N., Cornish, J.M., Pamphilon, D.H., Steward, C.G., Oakhill, A. (1998)

Minimal residual disease status as a predictor of relapse after allogeneic bone marrow transplantation for children with acute lymphoblastic leukaemia.

*Br J Haematol*, 102 (3), 860-871

74. Knechtli, C.J., Goulden, N.J., Hancock, J.P., Grandage, V.L.G., Harris, E.L., Garland, R.J., Jones, C.G., Rowbottom, A.W., Hunt, L.P., Green, A.F., Clarke, E., Lankester, A.W., Cornish, J.M., Pamphilon, D.H., Steward, C.G. and Oakhill, A. (1998)

Minimal Residual Disease Status Before Allogeneic Bone Marrow Transplantation Is an Important Determinant of Successful Outcome for Children and Adolescents With Acute Lymphoblastic Leukemia.  
*Blood*, 92 (11), 4072-4079

75. Lamb, L.S., Musk, P., Ye, Z., van Rhee, F., Geier, S.S., Tong, J.J., King, K.M., Henslee-Downey, P.J. (2001)  
Human gammadelta(+) T lymphocytes have in vitro graft vs leukemia activity in the absence of an allogeneic response.  
*Bone Marrow Transplant*, 27 (6), 601-606

76. Langerak, A.W., Szczepanski, T., van der Burg, M., Wolvers-Tettero, I.L.M., van Dongen, J.J.M. (1997)  
Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations.  
*Leukemia*, 11 (12), 2192-2199

77. Lee, L.G., Connell, C.R., Bloch, W. (1993)  
Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes.  
*Nucleic Acids Res*, 21 (16), 3761-3766

78. Lee, L.G., Livak, K.J., Mullah, B., Graham, R.J., Vinayak, R.S., Woudenberg, T.M. (1999)  
Seven-color, homogeneous detection of six PCR products.  
*Biotechniques*, 27 (2), 342-349

79. Li, A., Zhou, J., Zuckerman, D., Rue, M., Dalton, V., Lyons, C., Silverman, L.B., Salla, S.E., Gribben, J.G. (2003)  
Sequence analysis of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in children with acute lymphoblastic leukemia at diagnosis and at relapse: implication for pathogenesis and for the clinical utility of PCR-based methods of minimal residual disease detection.  
*Blood*, 102 (13), 4520-4526

80. Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K. (1995)  
Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization.  
*PCR Methods Appl*, 4 (6), 357-362

81. Look, A.T. (1997)  
Oncogenic Transcription Factors in the Human Acute Leukemias.  
*Science*, 278 (5340), 1059-1064

82. Lorenz, E. Uphoff, D., Reid, T.R., Shelton, E. (1951)  
Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections.  
*J Nat Cancer Inst*, 12 (1), 197-201

83. Luci, P., Gaipa, G., van Lochem, E.G., van Wering, E.R., Porwit-Mac Donald, A., Faira, T., Bjorklund, E., Biondi, A., van den Beemd, M.W., Baars, E., Vidrialis, B., Parreira, A., van Dongen, J.J., San Miguel, J.F., Orfao, A.; BIOMED-I (2001)  
BIOMED-I concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings. BIOMED-I Concerted Action Investigation of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia: International Standardization and Clinical Evaluation.  
*Leukemia*, 15 (8), 1185-1192

84. MacIntyre, E.A., d'Auriol, L., Dupar, N., Leverger, G., Galibert, F., Sigaux, F. (1990)  
Use of oligonucleotide probes directed against T cell antigen receptor gamma delta variable-(diversity)-joining junctional sequences as a general method for detecting minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemias.

J Clin Invest, 86 (6), 2125-2135

85. Mortimer, J., Blinder, M.A., Schulmann, S., Applebaum, F.R., Buckner, C.D., Clift, R.A., Sanders, J.E., Storb, R., Thomas, E.D. (1989)

Relapse of acute leukemia after marrow transplantation: natural history and results of subsequent therapy.

J Clin Onc, 7 (1), 50-57

86. Munoz, A., Badell, I., Olive, T., Verdegner, A., Gomez, P., Bureo, E., Spanish Working Party for bone marrow transplantation in children (GETMON). (2002)

Second allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in hematologic malignancies in children: Long-term results of a multicenter study of the Spanish Working Party for Bone Marrow Transplantation in Children (GETMON).

Haematologica, 87 (3), 331-342

87. Nirmla, K., Rajalekshmy, K.R., Raman, S.G., Shanta, V., Rajkumar, T. (2002)

PCR-Heteroduplex analysis of TCR gamma, delta and TAL-1 deletions in T-acute lymphoblastic leukemias: implications in the detection of minimal residual disease.

Leuk Res, 26 (4), 335-343

88. Okamoto, T., Yokota, S., Katano, N., Seriu, T., Nakao, M., Taniwaki, M., Watanabe, A., Asami, K., Kikuta, A., Koizumi, S., Kawakami, T., Ohta, S., Miyake, M., Watanebe, T., Iwai, A., Kamitamari, A., Ijichi, O., Hyakuna, N., Mimaya, J., Fujimoto, T., Tsurusawa, M. (2002)

Minimal residual disease in early phase of chemotherapy reflects poor outcome in children with acute lymphoblastic leukemia—a retrospective study by the Children's Cancer and Leukemia Study Group in Japan.

Leuk Lymphoma, 43 (5), 1001-1006

89. Osgood, E.E., Riddle, M.C., Mathews, T.J. (1939)

Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow: case report.

Ann Intern Med, 13, 357-367

90. Oshimi, K., Oshimi, Y., Akutsu, M., Takei, Y., Saito, H., Okada, M., Mizoguchi, H. (1986)

Cytotoxicity of interleukin 2 activated lymphocytes for leukemia and lymphoma cells.

Blood, 68 (4), 938-438

91. Owens, B.M., Hawley, R.G. (2002)

HOX and non-HOX homeobox genes in leukemic hematopoiesis.

Stem Cell, 20 (5), 364-379

92. Porter, D.L., Roth, M.S., Mc Garigle, C., Ferrara, J.L., Antin, J.H. (1994)

Induction of graft-versus-host disease as immunotherapy for relapsed chronic myeloid leukemia.

N Engl J Med, 330 (2), 100-106

93. Porter, D.L., Collins jr, R.H., Hardy, C., Kernan, N.A., Drobyski, W.R., Giral, S., Flowers, M.E.D., Casper, J., Leahey, A., Parker, P., Mick, R., Bate-Boyle, B., King, R., Antin, J.H. (2000)

Treatment of relapsed leukemia after unrelated donor marrow transplantation with unrelated donor leukocyte infusions.

Blood, 95 (4), 1214-1221

94. Pui, C.H., (1995)

Childhood leukemias.

N Engl J Med, 332 (24), 1618-1630

95. Pui, C.H., Evans, W.E. (1998)

Acute lymphoblastic leukemia.

N Engl J Med, 339 (9), 605-615

96. Pui, C.H., Campana, D., Evans, W.E. (2001)  
Childhood acute lymphoblastic leukaemia—current status and future perspectives.  
*Lancet Oncol*, 2 (10), 597-607
97. Pui, C.H., Relling, M.V., Pharm, D. and Dowing, J.R. (2004a)  
Acute Lymphoblastic Leukemia.  
*N Engl J Med*, 350 (15), 1535-1548
98. Pui, C.H., Relling, M.V., Sandlund, J.T., Downing, J.R., Campana, D., Evans, W.E. (2004b)  
Rationale and design of Total Therapy Study XV for newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia.  
*Ann Hematol* 83 Suppl 1:S124-126
99. Pui, C.H., Sandlund, J.T., Pei, D., Campana, D., Rivera, G.K., Ribeiro, R.C., Rubnitz, J.E., Razzouk, B.I., Howard, S.C., Hudson, M.M., Cheng, C., Kun, L.E., Raimondi, S.C., Behm, F.G., Downin, J.R., Relling, M.V., Evans, W.E.; Total Therapy Study XIII B at St Jude Children's Research Hospital. (2004c)  
Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII B at St Jude Children's Research Hospital.  
*Blood*, 104 (9), 2690-2696
100. Radich, J., Ladne, P., Gooley, T. (1995)  
Polymerase chain reaction-based detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia predicts relapse after allogeneic BMT.  
*Biol Blood Marrow Transplant*, 1 (1), 24-31
101. Ramirez, M., Diaz, M.A., Garcia-Sanchez, F., Velasco, M., Casando, F., Villa, M., Vicario, J.L., Madero, L. (1996)  
Chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation in childhood acute lymphoblastic leukemia.  
*Bone Marrow Transplant*, 18 (6), 1161-1165
102. Ravetch, J.V., Siebenlist, U., Korsmeyer, S., Waldmann, T., Leder, P. (1981)  
Structure of the human immunoglobulin mu locus: Characterization of embryogenic and rearranged J and D genes.  
*Cell*, 27 (3Pt2), 583-591
103. Reddy, P. (2003)  
Pathophysiology of acute graft-versus-host disease.  
*Hematol Oncol*, 21 (4), 149-161
104. Rivera, G.K., Pinkel, D., Simone, J.V., Hancock, M.L., Christ, W.M. (1993)  
Treatment of acute lymphoblastic leukemia – 30 year's Experience at St. Jude Children's Research Hospital.  
*N Engl J Med*, 329 (18), 1289-1295
105. Rowen, L., Koop, B.F., Hood, L. (1996)  
The complete 685-kilobase DNA sequence of the human  $\beta$  T cell receptor locus.  
*Science*, 272 (5269), 1755-1762
106. Rubnitz, J. E., Christ, W.M. (1997)  
Molecular Genetics of Childhood Cancer: Implications for Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment.  
*Pediatrics*, 100 (1), 101-108
107. Sakano, H., Huppi, K., Heinrich, G., Tonegawa, S. (1979)  
Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light - chain genes.  
*Nature*, 280 (5720), 288-294

108. Sanchez, J., Serrano, J., Gomez, P., Martinez, F., Martin, C., Madero, L., Herrera, C., Garcia, J.M., Casano, J., Torres, A. (2002)  
Clinical value of immunological monitoring of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic transplantation.  
Br J Haematol, 116(3), 686-694
109. Sander, J.E., Buckner, C.D., Clift, A., Fefer, R., Mc Guffin, R., Storb, F., Appelbaum, F., Bensinger, W., Beatty, P., Doney, K., Durnam, D., Martin, P., Sullivan, K., Stewart, P., Witherspoon, R.P., Thomas, E.D. (1988)  
Second marrow transplants in patients with leukemia who relapse after allogenic marrow transplantation.  
Bone Marrow Transplant, 3 (1), 11-19
110. Sanz-Rodriguez, R.C., Steegmann, J.L., Granada, A., de la Camara, R., Figuera, A., Arranz, R., Gomez-Garcia de Soria, V., Alegre, A., Fernandez-Ranada, J.M. (1999)  
Treatment of leukemia relapsed after allogenic bone marrow transplantation with donor lymphocyte infusion: report of 11 cases.  
Sangre (Barc), 44 (6), 456-463
111. Schäble, K.F., Zachau, H.G. (1993)  
The variable genes of the human immunoglobulin  $\kappa$  locus.  
Biol Chem Hoppe-Seyler, 374 (11), 1001-1022
112. Schäble, K.F., Thiebe, R., Flügel, A., Meindl, A., Zachau, H.G. (1994)  
The human immunoglobulin  $\kappa$  locus: pseudogenes, unique and repetitive sequences.  
Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 375 (3), 189-199
113. Schrappe, M., Reiter, A., Ludwig, W.D., Harbott, J., Zimmermann, M., Hiddemann, W., Niemeyer, C., Henze, G., Feldges, A., Zintl, F., Kornhuber, B., Ritter, J., Welte, K., Gadner, H., Riehm, H. (2000a)  
Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90.  
Blood, 95 (11), 3310-3322
114. Schrappe, M., Reiter, A., Zimmermann, M., Harbott, J., Ludwig, W.D., Henze, G., Gadner, H., Odenwald, E., Riehm, H. (2000b)  
Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Munster.  
Leukemia, 14 (12), 2205-2222
115. Shockett, P.E., Schatz, D.G. (1999)  
DNA hairpin opening mediated by the RAG 1 and RAG 2 proteins.  
Mol Cell Biol, 19 (6), 4159-4166
116. Siminovitch, K.A., Bakhschi, A., Goldman, P., Korsmeyer, S.J. (1985)  
A uniform deleting element mediates the loss of  $\kappa$  genes in human B cell.  
Nature, 316 (6025), 260-262
117. Couston-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), 2691-2700
118. Steenberg, E.J., Verhagen, O.J., van Leeuwen, E.F., van der Berg, H., von dem Borne, A.E., van der Schoot, C.E. (1995)  
Frequent ongoing T-cell receptor rearrangements in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: implication for monitoring minimal residual disease.  
Blood, 86, 692-707

119. Steward, C.G., Goulden, N.J., Katz, F., Baines, D., Martin, P.G., Langlands, K., Porter, M.N., Chessels, J.M., Oakhill, A. (1994)  
A polymerase chain reaction study of the stability of Ig heavy-chain and T-cell receptor delta gene rearrangements between presentation and relapse of childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia.  
*Blood*, 83 (5), 1355-1362
120. Stewart, A.K., Schwartz, R.S. (1994)  
Immunoglobulin V regions and the B cell.  
*Blood*, 83 (7), 1717-1730
121. Szczepanski, T., Beishuizen, A., Pongers- Willemse, M.J., Hählen, K., van Wering, E.R., Tibbe, G.J.M., de Bruijn, M.A.C., van Dongen, J.J.M. (1999)  
Cross-lineage T cell receptor gene rearrangement occur in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease.  
*Leukemia*, 13 (2), 196-205
122. Szczepanski, T., Pongers- Willemse, M.J., Langerak, A.W., Wietske, A., Harts, A., Wijkhuijs, J.M., van Wering, E.R., van Dongen, J.J.M. (1999)  
Ig Heavy Chain gene rearrangement in T- Cell acute lymphoblastic leukemia exhibit predominant DH6-19 and DH7-27 gene usage, can result in complete V-D-J rearrangements, and are rare in T cell receptor alpha,beta lineage.  
*Blood*, 93 (12), 4079-4085
123. Szczepanski, T., Pongers- Willemse, M.J., Langerak, A.W., van Dongen, J.J.M. (1999)  
Unusual immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangement patterns in acute lymphoblastic leukemias.  
*Curr Top Microbiol Immunol*, 246, 205-213; discussion 214-5
124. Szczepanski, T., Langerak, A.W., Pongers- Willemse, M.J., Wolvers-Tettero, I.L.M., van Wering, E.R., van Dongen, J.J.M. (2000)  
T cell receptor gamma (TCRG) gene rearrangements in T cell acute lymphoblastic leukemia reflect 'end-stage' recombinations: implications for minimal residual disease monitoring.  
*Leukemia*, 14 (7), 1208-1214
125. Szczepanski, T., Willemse, M.J., Brinkhof, B., van Wering E.R., van der Burg, M., van Dongen, J.J.M. (2002)  
Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease.  
*Blood*, 99 (7), 2315-2323
126. Szczepanski, T., van der Velden, V.H., Raff, T., Jacobs, D.C., van Wering, E.R., Bruggemann, M., Kneba, M., van Dongen, J.J. (2003)  
Comperative analysis of T-cell receptor gene rearrangements at diagnosis and relapse of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) shows high stability of clonal markers for monitoring of minimal residual disease and reveals the occurrence of second T-ALL.  
*Leukemia*, 17 (11), 2149-2156
127. Thomas, E.D., Storb, R., Clift, R.A., Fefer, A., Johnson, F.L., Neiman, P.E., Lerner, K.G., Glucksberg, H., Buckner, C.D. (1975)  
Bone marrow transplantation.  
*N Engl J Med*, 292 (17), 895-902
128. Tonegawa, S., Brack, C., Hozumi, N., Pirotta, V. (1978)  
Organization of Immunoglobulin genes.  
*Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 42 (pt2), 921-931

129. Tonegawa, S. (1983)  
Somatic generation of antibody diversity.  
*Nature*, 302 (5909), 575-581
130. Uzunel, M., Jaksch, M., Mattsson, J., Ringden, O. (2003)  
Minimal residual disease detection after allogeneic stem cell transplantation is correlated to relapse in patients with acute lymphoblastic leukaemia.  
*Br J Haematol*, 122 (5), 788-794
131. Valtieri, M., Tocci, A., Gabbianelli, M., Luchetti, L., Masella, B., Vitelli, L., Botta, R., Testa, U., Condorelli, G.L., Peschle, C. (1998)  
Enforced TAL-1 expression stimulates primitive, erythroid and megakaryocytic progenitors but blocks the granulopoietic differentiation program.  
*Cancer Res*, 58 (3), 562-569
132. Verhagen, O.J., Willemsse, M.J., Breunis, W.B., Wijkhuijs, A.J., Jacobs, D.C., Joosten, S.A., van Wering, E.R., van Dongen, J.J., van der Schoot, C.E. (2000)  
Application of germline IGH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia.  
*Leukemia*, 14 (8), 1426-1435
133. Waldmann, T.A., Davis, M.M., Bongiovanni, K.F., Korsmeyer, S.J. (1985)  
Rearrangements of genes for the antigen receptor on T cells as markers of lineage and clonality in human lymphoid neoplasms.  
*N Engl J Med*, 313 (13), 776-783
134. Waldmann, T.A. (1987)  
The arrangement of immunoglobulin and T-cell receptor genes in human lymphoproliferative disorders.  
*Adv Immunol*, 40, 247-321
135. Walter, M.A., Surti, U., Hofker, M.H., Cox, D.W. (1990)  
The physical organization of the human immunoglobulin heavy chain gene complex.  
*EMBO J*, 9 (10), 3303-3313
136. Wasserman, R., Galili, N., Ito, Y., Silber, J.H., Reichard, B.A, Shane, S., Womer, R.B., Lange, B., Rovera, G. (1992)  
Residual disease at the end of induction therapy as a predictor of relapse during therapy in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia.  
*J Clin Oncol*, 10 (12), 1879-88
137. Weiden, P.L., Flournoy, N., Thomas, E.D., Prentice, R., Fefer, A., Buckner, C.D., Storb, R. (1979)  
Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts.  
*N Engl J Med*, 300 (19), 1068-1073
138. Weisdorf, D.J., Nesbit, M.E., Ramsay, N.K., Woods, W.G., Goldman, A.I., Kim, T.H., Hurd, D.D., Mc Glave, P.B., Kersey, J.H. (1987)  
Allogeneic bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia in remission: prolonged survival associated with acute graft-versus-host disease.  
*J Clin Oncol*, 5 (9), 1348-1355
139. Weisdorf, D.J., Woods, W.G., Nesbit, M.E.J., Uckun, F., Dusenbery, K., Kim, T., Haake, R., Thomas, W., Kersey, J.H., Ramsay, N.K. (1994)  
Allogeneic bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia: Risk factors and clinical outcome.  
*Br J Haematol*, 86 (1), 62-69

140. Weisdorf, D.J., Billett, A.L., Hannan, P., Ritz, J., Sallan, S.E., Steinbuch, M., Ramsay, N.K.C. (1997)  
Autologous versus unrelated donor allogeneic marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia.  
*Blood*, 90 (11), 2962-2968
141. Pongers- Willemse, M.J., Seriu, T., Stolz, F., d'Aniello, E., Gameiro, P., Pisa, P., Gonzalez, M., Bartram, C.R., Panzer-Grünmayer, E.R., Biondi, A., San Miguel, J.F., van Dongen, J.J.M. (1999)  
Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets. report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia.  
*Leukemia*, 13 (1), 110-118
142. Woodard, P., Tong, X., Richardson, S., Srivastara, D.K., Horwitz, E.M., Benaim, E., Geiger, T., Hale, G., Leung, W., Turner, V, Yusuf, U., Cunningham, J., Handgretinger, R. (2003)  
Etiology and outcome of graft failure in pediatric hematopoietic stem cell transplantation.  
*J Pediatr Hematol Oncol*, 25 (12), 955-959
143. Woolfrey, A.E., Anasetti, C., Storer, B., Doney, K., Milner, L.A., Sievers, E.L., Carpenter, P., Paul, M., Petersdorf, E., Appelbaum, F.R., Hansen, J.A., Sanders, J.E. (2002)  
Factors associated with outcome after unrelated marrow transplantation for treatment of acute lymphoblastic leukemia in children.  
*Blood*, 99 (6), 2002-2008
144. Wright, J.J., Poplack, D.G., Bakhshi, A., Reamann, G., Cole, D., Jensen, J.P., Korsmeyer, S.J. (1987)  
Gene rearrangements as markers of clonal variation and minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia.  
*J Clin Oncol*, 5 (5), 735-741

### **Protokolle**

1. ALL-BFM Protokoll 2000
2. Quiagen Handbuch für QIAamp® DNA Mini Kits und QIAamp® DNA Blood Mini Kits, 1999
3. TaqMan® Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, Protocol, 2001
4. ABI PRISM® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits, Version 2.0, Applied Biosystems, Protocol, 2000
5. PEQ-LAB, E.N.Z.A Cyclor Pure Kit, Protocol, 2000

## 9. Anhang

### 9.1 Abbildungsverzeichnis:

**Abbildung 1:** Darstellung der B-Zellreifung im Knochenmark.

**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der somatischen Rekombination am Beispiel einer Immunglobulinleichtkette.

**Abbildung 3:** Flow Schema der Untersuchung der KM-Proben.

**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Ficollreaktion.

**Abbildung 5:** Darstellung einer Gelfotodokumentation.

**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Sequenzierreaktion.

**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der RQ-PCR.

**Abbildung 8:** Darstellung einer fertig pipettieren Reaktionsplatte in der eine Nachprobe eines Patienten mit zwei Targets gemessen wird.

**Abbildung 9:** Schematische Darstellung der primären Target-Auswahl.

**Abbildung 10 :** Darstellung der Verteilung der Patienten.

**Abbildung 11:** Darstellung der MRD Gruppen mit Eventverteilung innerhalb der Gruppen.

**Abbildung 12:** Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit der MRD Last.

**Abbildung 13:** Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der MRD Last.

**Abbildung 14:** Darstellung des ereignisfreien Überlebens bei Messung der MRD Last am Tag bis 45 nach SZT.

**Abbildung 15:** Darstellung des rezidivfreien Überlebens bei Messung der MRD Last am Tag bis 45 nach SZT.

**Abbildung 16:** Darstellung des ereignisfreien Überlebens bei Messung der MRD Last am Tag 46 – 75 nach SZT.

**Abbildung 17:** Darstellung des rezidivfreien Überlebens bei Messung der MRD Last am Tag 46 – 75 nach SZT.

**Abbildung 18:** Darstellung des ereignisfreien Überlebens bei Messung der MRD Last am Tag 76 – 110 nach SZT.

**Abbildung 19:** Darstellung des rezidivfreien Überlebens bei Messung der MRD Last am Tag 76 – 110 nach SZT.

**Abbildung 20:** Darstellung des ereignisfreien Überlebens bei Messung der MRD Last am Tag 160 – 250 nach SZT.

**Abbildung 21:** Darstellung des rezidivfreien Überlebens bei Messung der MRD Last am Tag 160 – 250 nach SZT.

**Abbildung 22:** Darstellung des ereignisfreien Überlebens bei Messung der MRD Last > 250 nach SZT.

**Abbildung 23:** Darstellung des rezidivfreien Überlebens bei Messung der MRD Last am Tag > 250 nach SZT.

**Abbildung 24:** Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit ob eine MRD vorhanden ist oder nicht.

**Abbildung 25:** Patient A

**Abbildung 26:** Patient B

**Abbildung 27:** Patient C

**Abbildung 28:** Patient D

**Abbildung 29:** Patient E

**Abbildung 30:** Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit der MRD Last zum Zeitpunkt der Immuntherapie.

**Abbildung 31:** Rezidivsfreies Überleben in Abhängigkeit der MRD Last zum Zeitpunkt der Immuntherapie.

## 9.2 Tabellenverzeichnis:

**Tabelle 1:** Vereinfachte Darstellung der Klassifikation der ALL.

**Tabelle 2:** Darstellung der Einteilung der akuten GVHD an Hand der Klinischen Symptomatik/Stadien und schließlich ihrer Gradeinteilung.

**Tabelle 3:** Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der Isolierung mit QIAmp® Kits.

**Tabelle 4:** Primerpaare zur Target Identifikation der IgH und IgK-Rearrangement.

**Tabelle 5:** Primerpaare zur Target Identifikation der  $\gamma$ -TCR,  $\delta$ -TCR – Rearrangement

**Tabelle 6:** Primerpaare für die Erweiterung des V $\gamma$ l Targets

**Tabelle 7:** Auflistung der Materialien und deren Menge/Konzentration für einen PCR Reaktionsansatz pro Primerpaar zur Target Identifikation.

**Tabelle 8:** Cycler Bedingungen für die PCR zur Target Identifikation

**Tabelle 9:** Darstellung der Materialien und deren Menge für die Zusammensetzung eines 8% Polyacrylamidgeles.

**Tabelle 10:** Auflistung der Materialien und deren Volumina für einen Reaktionsansatz zur Direktsequenzierung.

**Tabelle 11:** Auflistung der Materialien und deren Volumina zur Aufreinigung einer Probe mittels des E.N.Z.A. Cycler Pure Kits

**Tabelle 12:** Auflistung der Materialien und deren Volumina für einen Reaktionsansatz zur Sequenzierreaktion nach Aufreinigung mittels E.N.Z.A. Cycler Pure Kit.

**Tabelle 13:** Darstellung der Cycle Anzahl sowie deren Dauer und Temperatur für die PCR- Sequenzierreaktion.

**Tabelle 14:** Auflistung der Materialien und deren Volumina für die Fällung des Sequenzierproduktes.

**Tabelle 15:** Auflistung der Materialien und deren Konzentration für einen Ansatz zur Durchführung der Real-Time-PCR zur Primersensitivitätstestung.

**Tabelle 16:** Darstellung der Cycle Anzahl sowie deren Temperatur und Dauer für die RQ-PCR zur Primersensitivitätstestung.

**Tabelle 17:** Übersicht über die Patienten.

**Tabelle 18 :**Darstellung des rezidiv- und ergebnisfreien Überlebens in% in Abhängigkeit der MRD Last nach ein und drei Jahren.

**Tabelle 19 :**Darstellung des rezidiv- und ergebnisfreien Überlebens in% in Abhängigkeit der MRD Last nach ein und drei Jahren.

**Tabelle20 :**Darstellung des rezidiv- und ergebnisfreien Überlebens in% in Abhängigkeit der MRD Last nach ein und drei Jahren.

**Tabelle 21:**Darstellung des rezidiv- und ergebnisfreien Überlebens in% in Abhängigkeit der MRD Last nach ein und drei Jahren.

**Tabelle 22:**Darstellung des rezidiv- und ergebnisfreien Überlebens in% in Abhängigkeit der MRD Last nach ein und drei Jahren.

**Tabelle 23:** Rezidivfreies Überleben in %. J= Jahr

**Tabelle 24:** Übersicht über die ein- und dreijahres EFS/RFS zu definierten Zeitpunkten nach SZT.

**Tabelle 25:** Kaplan-Meier-Analysen allgemeiner Transplantationsdaten.

**Tabelle 26:** Ein- und dreijähriges Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der MRD Gesamtgruppe.

**Tabelle 27:** Ein- und dreijähriges Rezidivfreie Überleben in Abhängigkeit von der MRD Gruppe an verschiedenen Zeitpunkten nach SZT.

## **Danksagung**

Ich möchte mich ganz herzlich bei H. Prof. Dr. Bader für die Bereitstellung des Themas und die äußerst hilfreiche und intensive Betreuung während dieser Arbeit bedanken, ebenso bei H. Dr. Kreyenberg für die Laboreinführung und die tägliche Unterstützung bei dem Arbeiten im Labor und der Analyse der Daten. Mein bester Dank gilt auch den MTA's des Chimärismus- und MRD-Labors der Universitätskinderklinik Tübingen für deren tägliche Hilfe im Labor.

Bei meinen Eltern und meinen Freunden möchte ich mich ebenfalls für all die Unterstützung während der gesamten Zeit dieser Arbeit bedanken.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name                    Catrin M. Well  
Familienstand        ledig  
Geburtsdatum        09.02.1980  
Geburtsort            Starnberg a. Ammersee

### Schulbildung

1986-1989            Grundschule Landsberg a. Lech  
1989-1990            Harding Avenue Elementary School, Virginia, USA  
1990-1996            Johann-Winkelhofer Realschule, Landsberg a. Lech  
1996-1999            Laura-Schradin-Gymnasium, Reutlingen

### Hochschulbildung

1999-2006            Studium der Humanmedizin, Eberhard-Karls Universität  
Tübingen  
2002                    Forschungssemester bei H. Prof. Dr. Bader, Kinderklinik  
Tübingen  
2003                    Studium der Humanmedizin an der Brown-University  
Medical School, Rhode Island, USA  
2004                    Pädiatrischer Studententutor an der Universitätskinderklinik  
Tübingen

### Praktisches Jahr

2005-2006            Chirurgie, Kreisklinikum Reutlingen  
Pädiatrie, Universitätskinderspital bei der Basel, Schweiz  
Innere Medizin, Kreisklinikum Reutlingen

**29. 11. 2006        3. Staatsexamen**