

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

Quantitative Analyse der minimalen Resterkrankung mit Hilfe der
real-time PCR vor allogener Stammzelltransplantation bei
Kindern mit ALL

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Carmen Roth
aus Balingen

2006

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Bader

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. P. Brossart

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	<u>DIE ALLOGENE STAMMZELLTRANSPLANTATION</u>	1
1.1.1	<i>Historische Aspekte der Stammzelltransplantation</i>	1
1.1.2	<i>Durchführung</i>	2
1.1.3	<i>Frühe Komplikationen der SZT</i>	4
1.1.3.1	Direkte Toxizität der Chemoradiotherapie	4
1.1.3.2	Infektionen	5
1.1.3.3	GvHD	5
1.1.3.4	Transplantatabstoßung	6
1.1.3.5	Rezidiv	6
1.2	<u>ALLOGENE STAMMZELLTRANSPLANTATION BEI ALL IM KINDESALTER</u>	7
1.2.1	<i>Epidemiologie der akuten lymphatischen Leukämie</i>	7
1.2.2	<i>Therapie und Prognose</i>	7
1.2.2.1	Indikation zur allo-SZT in CR1	8
1.2.2.2	Indikationen zur allo-SZT in CR2	9
1.3	<u>REZIDIVFRÜHERKENNUNG</u>	11
1.3.1	<i>Methoden zur Rezidivfrüherkennung</i>	11
1.3.1.1	Chimärismus	11
1.3.1.2	Bestimmung der minimalen Resterkrankung	12
1.3.2	<i>Bestimmung der minimalen Resterkrankung (MRD) durch PCR-Analyse von patientenspezifischen Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Rearrangements durch die real-time PCR</i>	15
1.3.2.1	Der IgH-Locus	15
1.3.2.2	Der TZR-Locus	16
1.3.2.3	Das V-(D-)J-Joining	17
1.3.2.4	Der Fingerabdruck einer Leukämie	18
1.3.2.5	Immunglobulin- und TZR-Rearrangements in precursor-B-ALL und T-ALL	19
1.3.2.6	Klonale Evolution	20
1.3.2.7	Das Funktionsprinzip der real-time PCR	21
1.4	<u>FRAGESTELLUNG</u>	21

2	MATERIAL	23
2.1	REAGENTIEN	23
2.1.1	<i>Isolierung der mononukleären Zellen</i>	23
2.1.2	<i>DNA-Isolierung</i>	23
2.1.3	<i>Screening-PCR</i>	23
2.1.4	<i>Gel-Elektrophorese</i>	25
2.1.5	<i>Sequenzierung</i>	25
2.1.5.1	Säulenreinigung	25
2.1.5.2	Sequenzierreaktion	25
2.1.5.3	Fällen der DNA	25
2.1.6	<i>Real-time PCR</i>	26
2.2	EINMALARTIKEL UND GERÄTE	27
2.3	SOFTWARE	28
3	METHODEN	29
3.1	LYMPHOZYTENISOLIERUNG DURCH DICHTEGradientenzentrifugation	29
3.2	DNA-ISOLATION AUS MONONUKLEÄREN ZELLEN	30
3.3	DIE SCREENING-PCR	31
3.3.1	<i>Primerkombinationen</i>	31
3.3.2	<i>Reaktionsbedingungen</i>	33
3.3.3	<i>Auftrennung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese</i>	34
3.3.3.1	Herstellung der Polyacrylamidgele	34
3.3.3.2	Durchführung der Gelelektrophorese	35
3.3.3.3	Das Färben und Fotografieren der Gele	35
3.4	SEQUENZIERUNG DER AMPLIFIZIERTEN DNA	36
3.4.1	<i>Aufreinigung der DNA</i>	36
3.4.2	<i>Sequenzierreaktion</i>	37
3.4.3	<i>Ethanol-fällung</i>	38
3.4.4	<i>DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse</i>	38
3.5	PRIMERDESIGN	41
3.6	DIE REAL-TIME PCR (RQ-PCR)	42
3.6.1	<i>Funktionsprinzip</i>	42

3.6.2	<i>Der TaqMan Universal PCR Master Mix</i>	43
3.6.3	<i>Passive und aktive Referenz</i>	43
3.6.4	<i>Die „real-time“ Detektion</i>	44
3.6.5	<i>Standardkurve</i>	45
3.6.6	<i>Durchführung der real-time PCR</i>	46
3.6.6.1	Template-DNA	46
3.6.6.2	Herstellung des Primer-Mixes	47
3.6.6.3	Durchführen eines Sensitivitätsassays	47
3.6.6.4	Durchführung eines TaqMan-Assays	49
3.7	ANWENDUNG DER METHODE IM SINNE DER FRAGESTELLUNG	51
3.8	STATISTISCHE METHODE	52
4	PATIENTENKOLLEKTIV	53
5	ERGEBNISSE	63
5.1	ÜBERBLICK ÜBER DIE UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE ALLER PATIENTEN	63
5.1.1	<i>Rearrangementsequenzen und allelspezifische Oligonukleotide</i>	63
5.1.2	<i>Zuordnung zu MRD-Gruppen</i>	69
5.1.3	<i>MRD-Ergebnisse vor Transplantation in Bezug auf das Outcome</i>	70
5.2	EREIGNISFREIES ÜBERLEBEN ALLER PATIENTEN	72
5.2.1	<i>Ereignisfreies Überleben aller Patienten in Abhängigkeit von der Höhe der MRD-Last vor allo-SZT</i>	73
5.2.1.1	MRD im Knochenmark	73
5.2.1.2	MRD im Peripherblut	75
5.2.2	<i>Einfluß verschiedener prognostischer Faktoren auf das EFS aller Patienten</i>	76
5.2.2.1	Phänotyp der ALL	76
5.2.2.2	HLA-Kompatibilität und Verwandtschaft zwischen Spender und Empfänger	77
5.2.2.3	Konditionierung	78
5.2.2.4	Univariate und multivariate Analyse verschiedener Parameter im Hinblick auf das ereignisfreie Überleben	79
5.3	EREIGNISFREIES ÜBERLEBEN ALLER PATIENTEN \geq CR2	81

5.3.1	<i>EFS aller Patienten nach allo-SZT in CR \geq 2 im Vergleich mit EFS aller Patienten nach allo-SZT in CR1 in Abhängigkeit vom MRD-Status</i>	82
5.3.2	<i>Univariate Analyse verschiedener Merkmale in Hinblick auf das EFS der Patienten in \geq CR2</i>	84
5.3.2.1	Einfluß der MRD-Last auf das Überleben der Strategiegruppen S2-S4	85
5.3.2.2	EFS in Abhängigkeit vom Rezidivzeitpunkt	86
6	DISKUSSION	87
6.1	DIE METHODE	88
6.1.1	<i>Anwendbarkeit</i>	88
6.1.2	<i>Stabilität</i>	89
6.1.3	<i>Sensitivität</i>	89
6.1.4	<i>Quantifikation</i>	89
6.1.5	<i>Standardisierung</i>	90
6.2	MRD VOR ALLO-SZT ALS PROGNOTISCHER FAKTOR	91
6.2.1	<i>Knochenmark</i>	91
6.2.2	<i>Peripherblut</i>	93
6.3	ANDERE PROGNOTISCHE FAKTOREN	93
6.4	EREIGNISFREIES ÜBERLEBEN DER IN \geq CR2 TRANSPLANTIERTEN PATIENTEN	96
6.4.1	<i>MRD als prognostischer Faktor-Vergleich CR1 mit CR2/CR3</i>	96
6.4.2	<i>Bedeutung der MRD-Last vor allo-SZT für das Überleben der Strategiegruppen S2-S4</i>	96
7	ZUSAMMENFASSUNG	98
8	LITERATURVERZEICHNIS	100
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	109

Abbildungen		Seite
<u>Einleitung</u>		
Abbildung 1	Definition der Strategiegruppen S1 bis S4 gemäß ALL-REZ-BFM 95/96.	10
Abbildung 2	Mögliche Kinetik leukämischer Zellen bei verschiedenen ALL Patienten während und nach der Behandlung mit Detektionsgrenzen der verschiedenen Methoden zur MRD Bestimmung. I: induction treatment; C: consolidation treatment; II: re-induction treatment.	13
Abbildung 3	Der IgH-Genlocus	16
Abbildung 4	TZR-Genloci	17
Abbildung 5	Schematische Darstellung eines IgH-Genrearrangements.	17
Abbildung 6	Junctional regions von 17 ALL-Patienten; diese dienen in der MRD Untersuchung als RQ-PCR Targets.	19
<u>Methoden</u>		
Abbildung 7	Klonale Zellproliferationen sind als distinkte Banden zu erkennen.	36
Abbildung 8	Beispiel einer Sequenz eines IgH-Rearrangements.	39
Abbildung 9	Zunächst wurde die Vd2 Germlinesequenz eingefügt und an die gefundene Sequenz angeglichen.	40
Abbildung 10	Dann wurde die Dd3 Germlinesequenz eingefügt und angeglichen-auf diese Weise wurde das Rearrangement analysiert. Pfeile kennzeichnen Anfang und Ende des Rearrangements.	40
Abbildung 11	Beispiel einer Sequenz eines Rearrangements mit Anordnung von TaqMan Sonde und Primer.	41
Abbildung 12	Funktionsprinzip der real-time PCR	42
Abbildung 13	Standardkurve	45
Abbildung 14	Sensitivitätsassay	48
Abbildung 15	Versuchsanordnung eines TaqMan-Assays	49
Abbildung 16	Experiment Report	51
<u>Ergebnisse</u>		
Abbildung 17	Verteilung der Rearrangements auf die ALL-Subtypen.	63
Abbildung 18	MRD-Ergebnisse vor Transplantation gruppiert nach Outcome.	70
Abbildung 19	Ereignisfreies Überleben aller Patienten.	72

Abbildung 20	Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit von der Höhe der MRD-Last im Knochenmark; MRD low-level = $MRD < 10^{-3}$, MRD high-level = $MRD \geq 10^{-3}$.	73
Abbildung 21	EFS der vier Gruppen MRD negativ, $MRD < 10^{-4}$, $MRD 10^{-3}$ bis 10^{-4} und $MRD > 10^{-3}$.	74
Abbildung 22	EFS der Gruppen MRD negativ im Peripherblut und MRD positiv und $> 10^{-4}$ im Peripherblut.	75
Abbildung 23	EFS in Abhängigkeit vom Immunphänotyp der ALL.	76
Abbildung 24	EFS in Abhängigkeit vom Spender; MFD = matched family donor, MUD = matched unrelated donor, MMUD = mismatched unrelated donor, MMFD = mismatched family donor.	77
Abbildung 25	EFS in Abhängigkeit von der Art der Konditionierung.	78
Abbildung 26	EFS nach MRD im KM aller Patienten die in CR1 transplantiert wurden.	82
Abbildung 27	EFS aller Patienten nach MRD im KM, die in \geq CR2 transplantiert wurden.	82
Abbildung 28	EFS der Strategiegruppen S3 und S4 nach MRD-Gruppe.	85
Abbildung 29	EFS von Patienten mit frühen oder sehr frühen Rezidiven in Abhängigkeit von der MRD-Last im Knochenmark.	86

Tabellen	Seite
-----------------	--------------

Material

Tabelle 1	Primer für Screening-PCR und Sequenzanalyse von IgH-, TZRd-, TZRG und IGK-kde Genrearrangements und TAL1 Gendeletionen.	24
Tabelle 2	Germline Primer und TaqMan Sonden für die RQ-PCR Analyse.	26

Methoden

Tabelle 3	25 Primerkombinationen, die in der Screening-PCR eingesetzt wurden.	32
Tabelle 4	Mastermix für die Screening-PCR	33
Tabelle 5	Pipettierschema für zwei Acrylamidgele	34
Tabelle 6	Pipettierschema für die Sequenzierreaktion	37
Tabelle 7	Pipettierschema für Primer-Mix pro Well	47
Tabelle 8	Rezeptur per Well: Sensitivitätsassay	48

Patientenkollektiv

Tabelle 9	Patientendaten zur allo-SZT bei in CR1 transplantierten Patienten mit negativem MRD-Befund im Knochenmark.	55
Tabelle 10	Patientendaten zur allo-SZT bei in CR1 transplantierten Patienten mit negativem MRD-Befund im Peripherblut.	56
Tabelle 11	Patientendaten zur allo-SZT bei in CR1 transplantierten Patienten mit low-level MRD-Befund ($MRD < 10^{-3}$) im Knochenmark.	56
Tabelle 12	Patientendaten zur allo-SZT bei in CR1 transplantierten Patienten mit high-level MRD-Befund ($MRD \geq 10^{-3}$) im Knochenmark.	57
Tabelle 13	Patientendaten zur allo-SZT bei in $> CR1$ transplantierten Patienten mit negativem MRD-Befund im Knochenmark.	58
Tabelle 14	Patientendaten zur allo-SZT bei in $> CR1$ transplantierten Patienten mit negativem MRD-Befund im Knochenmark und low-level MRD ($MRD < 10^{-4}$) im Peripherblut.	59
Tabelle 15	Patientendaten zur allo-SZT bei in $> CR1$ transplantierten Patienten mit low-level MRD-Befund ($MRD < 10^{-3}$) im Knochenmark.	60
Tabelle 16	Patientendaten zur allo-SZT bei in $> CR1$ transplantierten Patienten mit high-level MRD-Befund ($MRD \geq 10^{-3}$) im Knochenmark.	61

Ergebnisse

Tabelle 17	Übersicht über Untersuchungsergebnisse aller Patienten.	64
Tabelle 18	Statistische Daten zum ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit von der Höhe der MRD-Last im Knochenmark.	74
Tabelle 19	Univariate und Multivariate Analyse.	79
Tabelle 20	Rezidivwahrscheinlichkeiten der einzelnen MRD-Gruppen.	83
Tabelle 21	Univariate Analyse verschiedener Merkmale in Hinblick auf das EFS der Patienten in $\geq CR2$.	84
Tabelle 22	EFS der Patienten der Strategiegruppen S3/S4 in Abhängigkeit vom MRD-Status.	85

1 Einleitung

1.1 Die allogene Stammzelltransplantation

1.1.1 Historische Aspekte der Stammzelltransplantation

Die allogene Stammzelltransplantation (allo-SZT) ist ein Verfahren, bei dem nach Auslöschung des Empfänger Knochenmarks durch Ganzkörperbestrahlung und Chemotherapeutika eine intravenöse Transfusion hämatopoetischer Stammzellen eines geeigneten Spenders erfolgt. Die Stammzellen besiedeln das Knochenmark des Empfängers neu und regenerieren so dessen Hämatopoese.

Die allo-SZT ist heute eine wichtige Therapieoption in der Behandlung einer Vielzahl maligner und nichtmaligner Erkrankungen des hämatopoetischen Systems.

Die Geschichte der Stammzelltransplantation beginnt im Jahre 1949, als Jacobson et al. erstmals beobachteten, dass Mäuse eine letale Ganzkörperbestrahlung durch Abschirmung der Milz überleben konnten.⁶⁶ Nur wenig später zeigten Lorenz et al., dass ein Überleben dieser Mäuse auch durch Infusion von Knochenmark anderer Mäuse gesichert werden konnte.⁷²

In der Mitte der 50er Jahre wurde der zytogenetische Beweis dafür erbracht, dass der strahlenprotektive Effekt der Transplantation von Knochenmarkszellen darauf zurückzuführen ist, dass gesunde Spenderzellen das zerstörte hämatopoetische System des Empfängers ersetzen.⁵⁰

Der erste erfolgreiche Versuch einer Stammzelltransplantation zur Behandlung einer Leukämie beim Menschen erfolgte im Jahre 1959 durch Dr. E. Donnell Thomas, dem später für seine Forschungsarbeiten in diesem Bereich der Nobelpreis verliehen wurde.¹¹¹ Es handelte sich hierbei um eine syngene Transplantation, d.h. Spender und Empfänger waren eineiige Zwillinge. Weitere Versuche der Stammzelltransplantation in dieser Zeit blieben jedoch weitgehend erfolglos, was am mangelnden Verständnis des HLA-Systems (Human-Leukocyte-Antigen-System) und dessen Bedeutung für die Histokompatibilität lag. Transplantatabstoßung und Transplantat-gegen-Empfänger-Reaktion (Graft-versus-Host-Disease, GvHD) waren die Folge.¹⁰⁹

In den 60er Jahren zeigten verschiedene Studien an Hunden, dass erst eine Übereinstimmung im DLA-System (dog-leukocyte-antigen) eine erfolgreiche Transplantation möglich machte.⁴⁵ Diese wachsenden Erkenntnisse über das HLA-System und dessen immense Bedeutung für die Transplantation führten zu weiteren Versuchen der Stammzelltransplantation und schließlich zur ersten erfolgreichen allogenen Stammzelltransplantation im Jahr 1968 bei einem Patienten mit schwerem kombinierten Immundefekt.⁵³

Im Laufe der 70er Jahre entwickelte sich die Stammzelltransplantation schließlich zu einem anerkannten Therapieverfahren weiter. Im Jahr 1977 konnte in Seattle das Forschungsteam um Dr. E. Donnell Thomas von 100 Patienten mit Leukämie in fortgeschrittenem Stadium berichten, die eine Konditionierung, bestehend aus Cyclophosphamid und Ganzkörperbestrahlung, und anschließend Knochenmark eines HLA-identischen Geschwisters erhielten. 17 von diesen 100 Patienten waren ein bis drei Jahre nach der Transplantation noch am Leben, 8 von diesen 17 wiederum blieben über 23 Jahre lang in kompletter Remission.^{108,110}

Heutige Schätzungen über die Anzahl von Stammzelltransplantationen belaufen sich auf ca. 50.000 pro Jahr weltweit, mit einer jährlichen Zuwachsrate von 10-15%.⁵⁷

Die Indikationen zur Stammzelltransplantation im Kindesalter erstrecken sich von malignen und nichtmalignen Erkrankungen des Knochenmarks über solide Tumoren, Hämoglobinopathien, Immundefekte bis hin zu selektiven Immunerkrankungen.

1.1.2 Durchführung

An erster Stelle steht die Auswahl eines geeigneten Spenders. Eine allo-SZT kann mit Stammzellen eines HLA-identischen Geschwisterspenders, eines anderen HLA-kompatiblen oder partiell kompatiblen Familienspenders oder eines HLA-kompatiblen nichtverwandten Spenders durchgeführt werden. Als HLA-kompatibel werden Spender-Empfänger-Paare bezeichnet, die bezüglich der transplantationsrelevanten HLA-Merkmale (A, B, DRB1, DQB1) übereinstimmen.

Die Gene für die HLA-Antigene liegen alle auf Chromosom 6 und werden kodominant vererbt, so dass die Wahrscheinlichkeit, dass ein Geschwister HLA-identisch ist, bei 25% liegt.

Ist die Familiensuche nicht erfolgreich wird auf eine Registerspendersuche zurückgegriffen, in der versucht wird, einen HLA-identen Fremdspender zu finden. Bei Patienten mit besonders schlechten prognostischen Parametern sind im Einzelfall auch experimentelle Transplantationen zugelassen (z.B. haploidente SZT).⁸¹

Die besten Ergebnisse werden jedoch mit HLA-identischen Geschwisterspendern erzielt, in allen anderen Fällen ist mit einem erhöhten Risiko einer Graft-versus-Host-Krankheit (GvHD) zu rechnen.¹⁶

Mit der Entdeckung von im Peripherblut zirkulierenden hämatopoetischen Stammzellen ist es nicht mehr unbedingt notwendig, dem Spender operativ Knochenmark zu entnehmen um Stammzellen zu erhalten. Die zirkulierenden hämatopoetischen Stammzellen können durch Gabe von G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) oder GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) im Peripherblut angereichert und aus der Vene entnommen werden.⁵⁴

Eine weitere Quelle für hämatopoetische Stammzellen ist Nabelschnurblut.⁵⁵ Stammzellen aus Nabelschnurblut scheinen immunologisch unreif zu sein und verursachen daher auch bei nicht vollständiger HLA-Identität nicht immer eine GvHD.⁵⁶

Der nächste Schritt ist die Vorbereitung des Patienten auf die Transplantation, die Konditionierung. Sie umfasst die sequentielle Gabe verschiedener Chemotherapeutika, meist Alkylantien (z.B. Cyclophosphamid oder Busulfan), Etoposid oder Cytarabin, mit oder ohne fraktionierte Ganzkörperbestrahlung. Ziel der Konditionierung ist zum einen, die Tumor- bzw. Leukämiezellen möglichst vollständig zu zerstören und zum anderen die Ausschaltung der körpereigenen Immunabwehr des Empfängers, um eine Transplantatabstoßung zu verhindern.

Bei Fremdspendertransplantationen und bei Transplantation von nicht HLA-identischen Familienspendern wird zur Hochdosistherapie Antithymozytenglobulin (ATG) als zusätzliche Prophylaxe gegen eine mögliche Abstoßungsreaktion eingesetzt.

Im Fall einer AB0-Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger werden vor der Transplantation die reifen Erythrozyten aus dem Transplantat entfernt um eine Hämolyse zu verhindern.

T-Zellen sind die Mediatoren der GvHD, eine T-Zell-Depletion stellt somit bei einem nichtverwandten Spender eine Möglichkeit dar, die Ausprägung einer GvHD zu mildern.⁴

Die Transplantation erfolgt durch intravenöse Infusion der Stammzellen über einen zentralvenösen Katheter.

1.1.3 Frühe Komplikationen der SZT

1.1.3.1 Direkte Toxizität der Chemoradiotherapie

Die myeloablative, immunsuppressive Therapie vor allo-SZT führt zu toxischen Schädigungen verschiedener Organsysteme, die die maximal applizierbaren Dosen der Strahlen- und Chemotherapie limitieren.¹⁵

Bei bis zu 70% aller Transplantationen führt die vorbereitende Therapie, insbesondere wenn Cyclophosphamid verwendet wird, zur hämorrhagischen Zystitis. Diese wird durch einen renal ausgeschiedenen Metaboliten, das Acrolein, ausgelöst. Die prophylaktische Gabe von Mesna, dessen Wirkprinzip in der Bildung eines nichttoxischen Additionsproduktes mit Acrolein im Harn besteht, oder Dauerinfusionen können hier erfolgreich zum Einsatz gebracht werden.⁹⁴

Akutes Nierenversagen ist eine weitere häufige Komplikation. Ursachen hierfür sind u.a. das Tumorlyse-Syndrom, die direkte Toxizität der Chemotherapeutika und der Ganzkörperbestrahlung (total body irradiation, TBI) und eine vorbestehende veno-okklusive Erkrankung (veno-occlusive-disease, VOD), ein thrombotischer Teilverschluss der terminalen Lebervenen.⁸⁷

Eine Mukositis des Verdauungstraktes tritt in bis zu 90% der Fälle auf. Schmerzhaftes Schleimhautnekrosen im Mund und im gesamten Gastrointestinaltrakt äußern sich in Diarrhoe, Bauchschmerzen, hämorrhagischer Enterokolitis und einer Dermatitis. Methotrexat zur Prophylaxe einer GvHD verstärkt die Mukositis und Enterokolitis noch zusätzlich. Eine große Gefahr besteht bei der Superinfektion durch lokale Erreger, die aufgrund der Ulzerationen auch leicht in die Blutbahn gelangen und zur Sepsis führen können.¹²⁹

Eine weitere häufige und schwerwiegende Komplikation der zytoreduktiven Therapie ist die oben bereits genannte veno-okklusive Erkrankung (VOD). Ausgelöst wird diese Erkrankung durch einen Endothelzellschaden der terminalen hepatischen Venolen, infolge dessen es zur Obliteration schmaler hepatischer Venolen und damit zur Zerstörung umgebender zentrolobulärer Hepatozyten kommt. Die Erkrankung kann bis zum Multiorganversagen fortschreiten.

Klinisch ist sie charakterisiert durch Hyperbilirubinämie, Ikterus, Gewichtszunahme, Aszites und eine schmerzhafte Lebervergrößerung. Die Letalität ist hoch.^{32,75}

1.1.3.2 Infektionen

Allogene Stammzellempfänger sind für mehrere Monate nach Transplantation stark immundefizient. In der Phase der Aplasie direkt nach der allo-SZT treten neben opportunistischen bakteriellen Infektionen häufig auch fungale Infektionen auf.⁸⁰

Nach erfolgtem Anwachsen des neuen Knochenmarks beginnt die Phase der Immunrestitution, in welcher sich gehäuft virale Infektionen finden. Die Infektion durch das Cytomegalievirus (CMV), die sich klinisch meist als unspezifische Pneumonie manifestiert, gehört zu den bedrohlichsten Komplikationen nach allo-SZT. Bei der akuten GvHD ist das Risiko einer CMV-Infektion am größten.⁷⁶

1.1.3.3 GvHD

Bei jeder allo-SZT ergeben sich Interaktionen zwischen transplantierten immunreaktiven Zellen des Spenders und dem Empfängerorganismus. Ursache dafür sind Differenzen bezüglich der Transplantationsantigene (Major- und Minorhistokompatibilitätsantigene) zwischen Spender und Empfänger, auf die die T-Lymphozyten des Spenders reagieren.⁴⁸

Das entsprechende Krankheitssyndrom, bei dem bevorzugt das Gewebe von Haut, Mund- und Darmschleimhaut, Leber und Bronchien geschädigt wird, ist die Transplantat-gegen-Empfänger-Reaktion (GvHD).¹²⁶

Tritt die GvHD wenige Tage nach erfolgter allo-SZT auf, so spricht man von einer akuten GvHD, die sich in Form eines Exanthems, einer Hepatitis oder einer Diarrhoe

äußert. Nach einer akuten GvHD folgt signifikant häufiger eine chronische GvHD, die definitionsgemäß ab 100 Tage nach Transplantation auftritt.⁷⁶ Sie ist charakterisiert durch Sklerose der Haut, Erythem, Leberenzymhöhung, Sicca-Syndrom mit Mukositis und Polyserositis, Ösophagitis, Enteritis, Myositis und bakterielle Infektionen.⁹⁵

Zur immunsuppressiven Prophylaxe der GvHD wird Cyclosporin A (CSA) kombiniert mit niedrigdosiertem Methotrexat (MTX) oder Prednisolon eingesetzt. Zudem kann durch die Depletion reifer T-Zellen aus dem Transplantat die Rate der schweren akuten GvHD deutlich vermindert werden.⁹⁹

Bei T-Zell-Depletion kommt es jedoch wesentlich häufiger zur Abstoßung oder zum Rezidiv der Grunderkrankung, da die T-Zellen auch für den Graft-versus-Leukämie-Effekt (GvL) verantwortlich sind, der eng mit der GvHD assoziiert ist. Der GvL-Effekt sorgt für die Zerstörung residueller Leukämiezellen im Empfängerorganismus.^{64,106}

1.1.3.4 Transplantatabstoßung

Nach einer allo-SZT kommt es in seltenen Fällen zu einer Abstoßung des Transplantats durch wenige überlebende immunologische Effektorzellen des Empfängerorganismus.

Prädisponierend für eine solche Abstoßungsreaktion können ein zu schwach immunsuppressiv wirkendes Konditionierungsregime, ein T-Zell-depletiertes oder ein nicht HLA-identisches Transplantat sein.^{33,104}

Präventiv kann eine Intensivierung der Immunsuppression, z.B. durch Gabe von Antithymozytenglobulin (ATG), durchgeführt werden. ATG bewirkt beim Empfänger durch Suppression der zirkulierenden T-Lymphozyten eine Abnahme der Lymphozytenzahl (Lymphozytopenie) und hemmt so die zelluläre Transplantatabstoßung.

Als Therapie einer Abstoßungsreaktion kommt eine immunologische Rekonditionierung mit einer anschließenden zweiten Transplantation in Frage.¹⁰⁵

1.1.3.5 Rezidiv

Das Wiederauftreten der malignen Grunderkrankung ist im Kindesalter die häufigste Todesursache nach zunächst erfolgreicher allo-SZT.⁹¹

Es entsteht aus einer persistierenden leukämischen Subpopulation (minimale Resterkrankung, minimal residual disease, MRD), welche durch die Induktions- und Postremissionsbehandlung nicht vernichtet werden konnte.

Patienten, bei denen nach Transplantation wieder autologe Zellen auftreten, haben ein signifikant erhöhtes Rezidivrisiko.⁷³

Für Patienten mit akuten Leukämien konnte gezeigt werden, dass das rezidivfreie Überleben wesentlich durch die Höhe der Leukämieast zum Zeitpunkt der Transplantation und durch das Krankheitsstadium bestimmt wird.^{51,98}

1.2 Allogene Stammzelltransplantation bei ALL im Kindesalter

1.2.1 Epidemiologie der akuten lymphatischen Leukämie

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist die häufigste maligne Erkrankung des Kindesalters.

Jährlich erkranken in Deutschland etwa 650 Kinder unter 15 Jahren an Leukämie, davon entfallen 83% auf die ALL. Der Häufigkeitstyp liegt zwischen dem 2. und dem 5. Lebensjahr, das Verhältnis Jungen zu Mädchen beträgt bei der ALL 1,3 zu 1.²

Während vor 25 Jahren noch über 90% der erkrankten Kinder starben, kann heute durch den Einsatz moderner Therapieprotokolle bei 70-80% der Kinder mit ALL eine lang anhaltende Remission erzielt werden.⁴⁴

1.2.2 Therapie und Prognose

Der Hauptgrund für das Therapieversagen bei ALL ist das Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation. Die Prognose nach einem Rezidiv ist schlecht.⁸⁵

Da die Prognose auch ganz entscheidend vom ALL-Subtyp und von verschiedenen Risikofaktoren abhängig ist, wird in aktuellen Behandlungsprotokollen, wie z.B. dem ALL-REZ-BFM 2002-Protokoll (Protokoll zur Behandlung von Kindern mit Rezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie), eine Risikostratifizierung durchgeführt, d.h. die Patienten werden in verschiedene Risikogruppen eingestuft. Ziel ist es, die Patienten

mit hohem Rezidivrisiko zu erkennen und einer Therapieintensivierung zuzuführen, während die Patienten mit geringem Rezidivrisiko eine weniger intensive und damit auch weniger toxische Therapie bei gleicher Heilungschance erhalten.⁹⁶

Trotz dieser Verbesserungen im Therapiemanagement erleiden 20-30% der Patienten ein Rezidiv der Grunderkrankung.¹¹⁶ Eine intensive Rezidivchemotherapie kann in den meisten Fällen eine zweite komplette Remission (CR2) herbeiführen, die jedoch oft nicht von langer Dauer ist. Verschiedene Studien konnten in den letzten Jahren zeigen, dass durch den Einsatz der allo-SZT in CR2 die Überlebensrate deutlich erhöht werden kann. Mit einer allo-SZT kann ein ereignisfreies Überleben (event-free-survival, EFS) zwischen 45 und 55% erreicht werden.^{12,117}

1.2.2.1 Indikation zur allo-SZT in CR1

Eine allo-SZT ist für Patienten mit ALL in erster kompletter Remission (CR1) grundsätzlich nicht indiziert. Es gibt jedoch Patienten, die aufgrund von Hochrisikofaktoren eine besonders schlechte Prognose haben und deren Wahrscheinlichkeit, ein Rezidiv zu erleiden, von 20 bis 30% auf bis zu 50% ansteigen kann.¹¹⁶ Diese Patienten können von einer allo-SZT in erster kompletter Remission profitieren. Zugehörig zur Hochrisikogruppe (high-risk, HR) sind gemäß dem Therapieprotokoll ALL-REZ-BFM 2000 Patienten, die inadäquat auf die Prednison-Vorphase ansprechen (poor prednisone response), zytomorphologisch keine komplette Remission an Tag 33 erreichen (Non-response an Protokolltag 33), bei denen entweder die Translokation t(9;22) bzw. das Fusionsgen BCR/ABL (Philadelphia-Chromosom) oder die Translokation t(4;11) bzw. das Fusionsgen MLL/AF4 nachgewiesen wird oder die zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Induktionstherapie (vor Protokoll M) ein hohes Niveau an Resterkrankung aufweisen ($MRD \geq 10^{-3}$). Diese Patienten sind aufgrund ihrer schlechten Prognose auch für eine HLA-mismatch Familienspende zugelassen.

Durch Bestimmung der Oberflächenmarker (z.B. Bestimmung von CD oder HLA-DR mittels Durchflußzytometrie oder Immunfluoreszenz) kann der Immunphänotyp einer ALL bestimmt werden. Bei der ALL werden aufgrund verschiedener Differenzierungsmerkmalen folgende Immunphänotypen definiert:²³

1. B-Vorläuferzell-ALL: Prä-prä-B-ALL (pro-B-ALL), Common ALL, Prä-B-ALL (80%)
2. B-ALL (1-2%)
3. T-ALL: Frühe T-ALL (pro- und prä-T), intermediäre (kortikal T-ALL), reife T-ALL. (15-20%)

Bei den akuten lymphoblastischen Leukämien im Kindesalter handelt es sich in 12-15% um T-Linien-ALLs und in 2-5% um reife B-ALLs. Bei den restlichen 75% handelt es sich um B-Vorläufer-Leukämien, am häufigsten um common-ALL.²² Die T-ALL ist häufig mit einem höheren Erkrankungsalter, hoher initialer Leukozytenzahl, extramedullären Krankheitsherden und einer schlechten Prognose assoziiert und ist daher auch Indikation zur allo-SZT in CR1.⁸⁶ Weitere Indikationen zur allo-SZT in CR1 mit HLA-identischem Geschwisterspender (matched sibling donor, MSD) sind der pro-B-ALL Phänotyp mit schlechtem Ansprechen auf Chemotherapie, PPR (prednisone poor response) mit Koexpression myeloischer Marker, Leukozytenzahl $\geq 100 \times 10^9/l$, Kleinkinder unter 1 Jahr mit t(4;11) oder CD 10- Phänotyp.⁴³

1.2.2.2 Indikationen zur allo-SZT in CR2

Gemäß den Indikationsrichtlinien, die die „European Group for Blood and Marrow Transplantation“ (EBMT) 1996 veröffentlicht hat, besteht eine Indikation zur allo-SZT mit HLA-identischem Geschwisterspender (matched sibling donor, MSD) in CR2 bei Patienten, die ein frühes Knochenmarkrezidiv erleiden (bis zu sechs Monate nach Ende der Therapie), Patienten, die ein frühes ZNS-Rezidiv erleiden und Patienten, die ein spätes Knochenmarkrezidiv erleiden (Rezidiv, das später als sechs Monate nach Ende der Therapie auftritt). Ist bei CR2-Patienten nach frühem Knochenmarkrezidiv kein HLA-identischer Geschwisterspender vorhanden, kann auch auf einen HLA-identischen unverwandten Spender (matched unrelated donor, MUD) oder eine haploidentische Transplantation zurückgegriffen werden.⁴³

In Anbetracht der hohen transplantationsassoziierten Morbidität und Mortalität, die v.a. bei nichtidentischen Spendern und Fremdspendern auftritt, ist eine sorgfältige Indikationsstellung vor jeder Transplantation notwendig. Dazu dient das risikoadaptierte Therapiekonzept der ALL-Rezidiv-Studien der Studiengruppe Berlin-Frankfurt-Münster (BFM), die seit 1983 in multizentrischen Studien Therapieansätze für die Behandlung von ALL-Rezidiven bei Kindern erprobt. Das Therapiekonzept der Studie ALL-REZ BFM 95/96 beruht auf einer Einteilung der Patienten in vier strategische Risikogruppen (S1-S4), die die prognostischen Faktoren Zeitpunkt, Lokalisation und Immunphänotyp des Rezidivs berücksichtigen:

Lokalisation Zeitpunkt	Immunphänotyp: non - T			Immunphänotyp: (prä-) T		
	Extramedullär isoliert	Knochenmark kombiniert	Knochenmark isoliert	Extramedullär isoliert	Knochenmark kombiniert	Knochenmark isoliert
sehr früh	S2	S4	S4	S2	S4	S4
früh	S2	S2	S3	S2	S4	S4
spät	S1	S2	S2	S1	S4	S4

Abbildung 1: Definition der Strategiegruppen S1 bis S4 gemäß ALL-REZ-BFM 95/96.

Retrospektiv auf vorangegangene Studien angewandt hatten nach alleiniger Chemotherapie Patienten der Gruppe S1 eine befriedigende Prognose, während die Gruppen S3 und S4 ein EFS von nur 5% hatten. Die größte und heterogenste Gruppe S2 zeichnete sich durch eine intermediäre Prognose aus. Zur Therapiegruppe S2 gehören Patienten mit sehr frühen oder frühen isoliert extramedullären Rezidiven sowie späten non-T-Knochenmarkrezidiven und Patienten mit kombinierten, frühen oder späten non-T-Rezidiven. In dieser Gruppe soll eine Verbesserung der Prognose durch eine höhere initiale Therapiedichte und eine differenzierte Indikation zur allo-SZT durch Bestimmung weiterer Risikofaktoren (beispielsweise durch MRD-Monitoring) erreicht werden.

Auch die Ergebnisse anderer Studien zeigen eine Überlegenheit der allo-SZT über eine konventionelle Chemotherapie mit signifikanten Unterschieden bezüglich der Überlebenswahrscheinlichkeit. Gemäß diesen Studien liegt die EFS-Rate der

transplantierten Patienten nach einem Rezidiv zwischen 37 und 58% während das EFS der mit Chemotherapie behandelten Patienten zwischen 10 und 18% liegt.^{46,113,136}

1.3 Rezidivfrüherkennung

Um eine Therapieintensivierung möglichst früh und gezielt einsetzen zu können, ist es notwendig, ein drohendes Rezidiv so früh wie möglich zu erkennen. Dies kann entweder durch eine kontinuierliche Chimärismusanalyse nach allo-SZT oder durch die Bestimmung der minimalen Resterkrankung (MRD) vor allo-SZT erreicht werden.

1.3.1 Methoden zur Rezidivfrüherkennung

1.3.1.1 Chimärismus

Im nicht-codierenden Bereich des menschlichen Chromosoms gibt es eine große Anzahl von repetitiven Sequenzen, den VNTRs (variable number of tandem repeats), die bei einzelnen Individuen in Länge und Struktur unterschiedlich sind. Dieser genetische Polymorphismus dient dazu, einzelne Individuen genetisch voneinander zu unterscheiden. Durch Wahl geeigneter Amplimere, die solche Regionen einschließen, ist es möglich, mit Hilfe einer VNTR-PCR DNA-Abschnitte zu amplifizieren, deren Größe für einen Organismus spezifisch sind. In dieser Weise kann eine molekulare Analyse von Spender- und Empfänger-Blutzellen nach allo-SZT durchgeführt werden. Der Begriff Chimärismus beschreibt hier den Zustand der Vermischung der genetischen Muster zweier Individuen, wobei bei einem vollständigen Chimärismus (complete chimerism, CC) zu 100% Spenderzellen detektiert werden und bei einem gemischten Chimärismus (mixed chimerism, MC) sowohl Spender- als auch Empfängeranteile gefunden werden. Die autologe Rekonstitution (AR) ist mit einer Transplantatabstoßung gleichzusetzen.

VNTR-PCR-Analysen, die in kurzen Zeitabständen nach allo-SZT durchgeführt werden, bieten eine verlässliche und schnelle Screeningmethode zur Bestimmung des

Chimärismusstatus und zur Überwachung der Dynamik eines gemischten Chimärismus. Verschiedene Studien von Bader et al. konnten zeigen, dass bei Kindern mit akuten Leukämien und Myelodysplastischem Syndrom (MDS) eine signifikante Korrelation zwischen gemischtem Chimärismus und späterem Rezidiv besteht.^{5,8,11}

Patienten, die kurz nach dem Anwachsen der Stammzellen (Engraftment) zunächst einen gemischten Chimärismus zeigen, danach aber sich verringernde autologe Anteile aufweisen (decreasing MC) haben eine hohe Wahrscheinlichkeit, einen vollständigen Chimärismus zu entwickeln und in kompletter Remission zu bleiben.

Das höchste Risiko, ein Rezidiv zu erleiden, haben Patienten, bei denen der Anteil an autologen Zellen nach allo-SZT kontinuierlich zunimmt (increasing MC).^{8,77,88}

Eine wirksame Behandlungsmöglichkeit zur Unterdrückung eines drohenden Rezidivs bei akuten Leukämien und MDS auf der Basis eines zunehmenden MC ist die prophylaktische Immuntherapie. Durch Gabe von Spenderlymphozyten (donor lymphocyte infusion, DLI) oder Absetzen der immunsuppressiven Therapie nach allo-SZT kann die Anzahl der Rezidive durch Induzieren eines GvL-Effektes signifikant gesenkt werden. Der gemischte Chimärismus wird durch die Immunmodulation in einem frühen Stadium des Anstiegs der autologen Anteile in einen vollständigen Chimärismus umgewandelt um so im Idealfall das Rezidiv zu verhindern.^{6,9,17,82}

1.3.1.2 Bestimmung der minimalen Resterkrankung

Die allo-SZT ist eine effektive Therapieform für Kinder mit ALL, die ein frühes Knochenmarkrezidiv erleiden oder Hochrisikofaktoren präsentieren. Obwohl in hämatologischer Remission transplantiert wird, erleiden aktuell trotzdem 30-40% der Transplantatempfänger ein Rezidiv.^{12,13,130,131} In fast allen Fällen wird dieses Rezidiv

von einem Leukämiezellklon verursacht, der entweder identisch oder verwandt mit dem ursprünglich diagnostizierten Zellklon ist, was zeigt, dass die malignen Zellen die Behandlung in mikroskopisch nicht detektierbaren Mengen überlebt haben müssen.⁷⁸

Die hämatologische Remission ist nach zytomorphologischen Kriterien durch einen Blastenanteil von 5% im Knochenmark definiert, da hier die lichtmikroskopische Detektionsgrenze liegt. Demzufolge kann ein Patient, der sich in kompletter klinischer

Remission befindet, trotzdem noch eine leukämische Last von bis zu 10^{10} leukämischen Zellen haben, ohne dass dies lichtmikroskopisch erkennbar wäre.³⁷

Es wird deutlich, dass klinische und morphologische Kriterien alleine nur sehr begrenzte Informationen über die Effektivität der Behandlung geben können, da nur Patienten erkannt werden, die gar nicht in klinische Remission kommen, also eine sehr schlechte Prognose haben. Mehrere Studien haben gezeigt, dass Kinder mit ALL, die zum Zeitpunkt der Transplantation nicht in hämatologischer Vollremission waren, eine deutlich ungünstigere Prognose haben.^{12,52,79,131} Bei Patienten, die die klinische Remission erreichen, werden demnach sensitivere Methoden benötigt, um auch eine submikroskopische Menge maligner Zellen, also eine minimale Resterkrankung (minimal residual disease, MRD), detektieren und quantifizieren zu können. So könnte auch eine genaue Therapiestratifizierung vorgenommen werden. Abbildung 2 zeigt die mögliche Kinetik leukämischer Zellen mit den Detektionsgrenzen der verschiedenen Methoden zur MRD-Bestimmung.

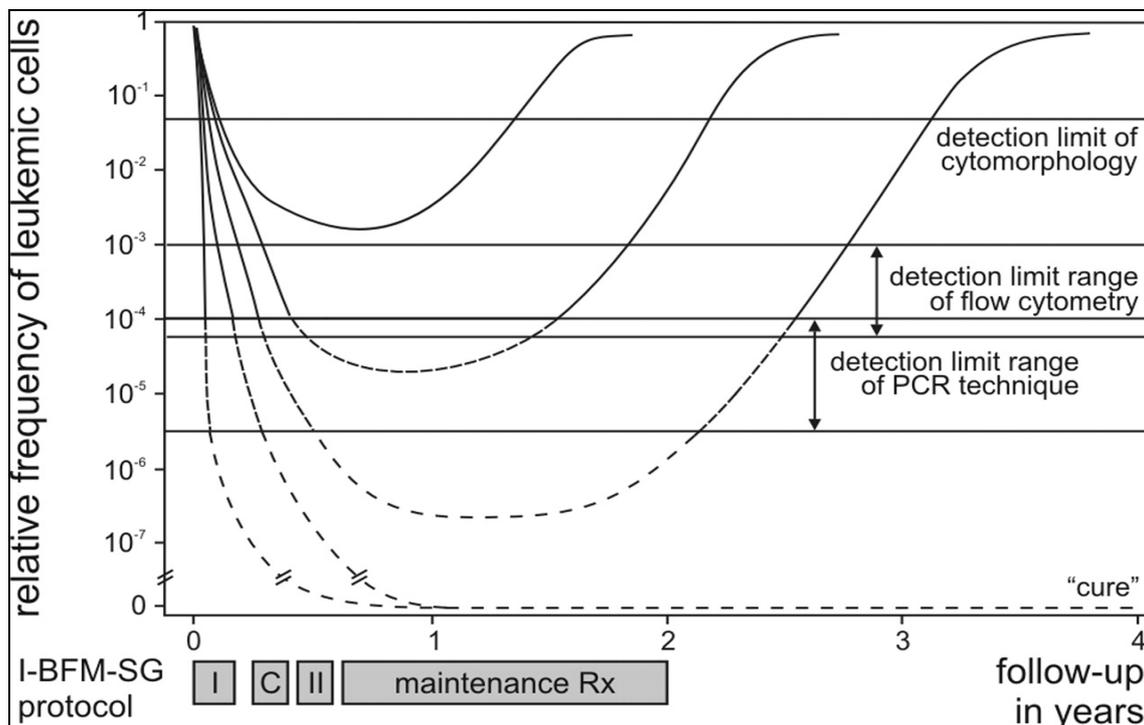


Abbildung 2: Mögliche Kinetik leukämischer Zellen bei verschiedenen ALL Patienten während und nach der Behandlung mit Detektionsgrenzen der verschiedenen Methoden zur MRD Bestimmung. I: induction treatment; C: consolidation treatment; II: re-induction treatment; aus Willemse et al. (2002).

Verlässliche Methoden zur MRD Bestimmung sollten folgende Voraussetzungen erfüllen:¹⁰⁷

- Sensitivität von mindestens 10^{-3} , besser noch 10^{-4} bis 10^{-6}
- Fähigkeit, zwischen malignen und normalen Zellen zu unterscheiden, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden
- stabile leukämiespezifische Marker, um falsch-negative Resultate zu verhindern
- Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Laboren für die Erstellung multizentrischer Behandlungsprotokolle
- einfache Standardisierung und schnelle Verfügbarkeit von Resultaten
- MRD muß quantifizierbar sein

Derzeit werden drei verschiedenen Methoden angewandt um Informationen über die minimale Resterkrankung zu erhalten:⁶³

- Immunophänotypisierung durch Durchflußzytometrie: abberante oder „leukämie-assoziierte“ Phänotypen werden detektiert
- PCR-Analyse von Fusionsgentranskripten, die ihre Ursache in Chromosomenabberationen haben (z.B. TEL-AML1, BCR-ABL, SIL-TAL1) oder von abberant exprimierten spezifischen Transkripten (wie HOX11L2 und WT1)
- PCR-Analyse von patientenspezifischen Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptorarrangements

Die dritte ist die derzeit am weitesten verbreitete Methode zur Bestimmung der MRD bei Patienten mit ALL. Sie macht sich die enorme Diversität der antigenspezifischen Rezeptoren (min. 10^9) zunutze, durch die das menschliche Immunsystem in der Lage ist, Millionen verschiedener Antigene zu erkennen.

1.3.2 Bestimmung der minimalen Resterkrankung (MRD) durch PCR-Analyse von patientenspezifischen Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Rearrangements durch die real-time PCR

Die Fähigkeit des menschlichen Immunsystems, Millionen verschiedener Antigene zu erkennen, beruht auf der enormen Diversität der antigenspezifischen Rezeptoren (min. 10^9). Wäre jedes der Immunglobulin (Ig)- und T-Zell-Rezeptorproteine (TZR) individuell im Genom kodiert, würde dies bedeuten, dass nahezu das gesamte menschliche Genom für das Immunsystem zuständig wäre. Vielmehr werden sowohl Immunglobulin- als auch T-Zell-Rezeptor-Proteine durch eine Reihe diskontinuierlich angeordneter Germline-Gensegmente kodiert. Es gibt die variable (V), diversity (D) und joining (J) Segmente, die sich im Laufe der B- und T-Zellreifung neu anordnen. Beinahe alle ALLs haben während ihrer Zellreifung ein Rearrangement auf wenigstens einem der IgH, TZR γ oder TZR δ Loci erfahren.^{47,124,127,133}

1.3.2.1 Der IgH-Locus

Immunglobulinmoleküle bestehen aus zwei identischen schweren Ketten (IgH) von denen 5 verschiedene Isotypen existieren und zwei identischen leichten Ketten (IgL), die in κ - und λ -Ketten unterteilt werden. Die variable Domäne der Immunglobulinmoleküle, die für die Antigenerkennung zuständig ist, entsteht bei dem Prozeß des Genrearrangements.

Der IgH-Locus ist auf dem Chromosom 14 q 32 lokalisiert.³⁶ Er enthält ungefähr 120 funktionelle variable V_H Segmente, die aufgrund von Sequenzhomologien in sieben Familien eingeteilt werden können.^{103,112} Außerdem enthält er verschiedene diversity (D_H) Segmente, die sechs verschiedenen D_H -Familien angehören, gefolgt von der joining Region mit ebenfalls sechs J_H Familien.⁸⁹ Darauf folgen konstante Segmente, die die konstante Region des Ig-Moleküls kodieren und den Isotyp bestimmen.

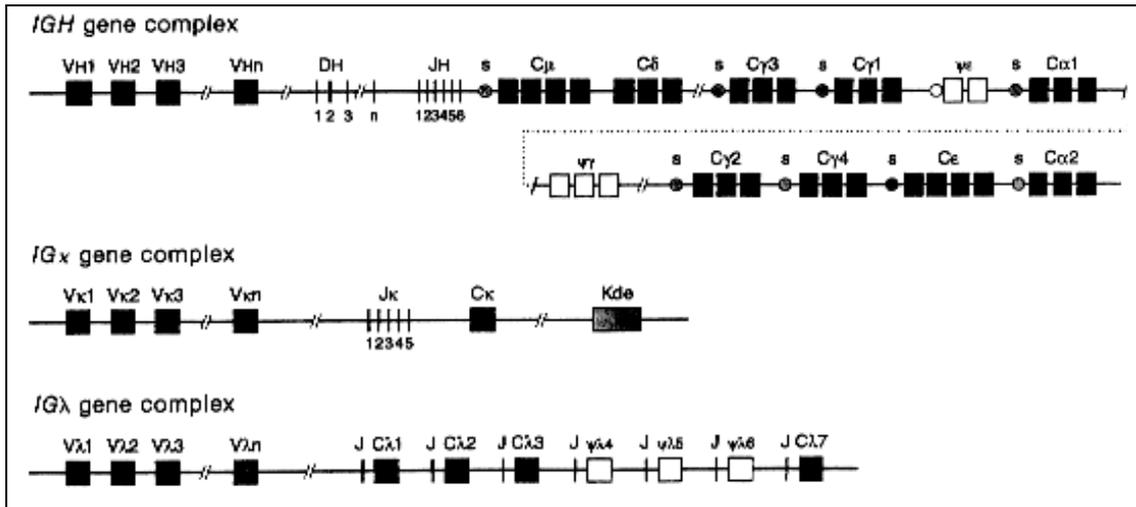


Abbildung 3: Der IgH-Genlocus; aus Leukemia, 6th edition, Van Dongen JJM, Adriaansen HJ, Immunobiology of Leukemia, 1996, 100, mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlages.

1.3.2.2 Der TZR-Locus

Das T-Zell-Rezeptormolekül besteht aus zwei Proteinketten. Es gibt den klassischen T-Zell-Rezeptor (TZR), der aus einer α - und einer β -Kette besteht und den selteneren TZR, der aus einer γ - und einer δ -Kette besteht. Analog zum Immunglobulinmolekül entsteht die variable Domäne des TZR durch Rekombination von V-, D- und J-Segmenten.

Der TZR δ -Locus ist inmitten des TZR α -Locus auf dem Chromosom 14q11 lokalisiert. Es sind wenigstens 6V, 3D, 4J und ein konstantes Segment (C) bekannt.²⁸ Der TZR β -Locus enthält mindestens 25 variable Segmente, zwei homologe C β Gene, denen eine einzige D Region und ein J Cluster vorangeht. Der TZR γ -Locus (Chromosom 7p15) enthält 15 variable Gene, von denen acht funktionell sind und zwei Pseudogene (V γ 7 und V γ 12), die am Rearrangementprozeß beteiligt sind. Aufgrund von Sequenzhomologien werden die variablen Gene in Gruppen von V γ I bis IV eingeteilt.³⁴ Die J γ -Segmente liegen in zwei Clustern vor. Das am weitesten upstream gelegene enthält drei Segmente, die entweder als J γ 1.1, J γ 1.2 und J γ 1.3 oder J γ P1, J γ P und J γ 1 bezeichnet werden. Zwei Mitglieder des zweiten Clusters sind identifiziert als J γ 2.1 und J γ 2.3 oder J γ P2 und J γ 2.⁶⁵

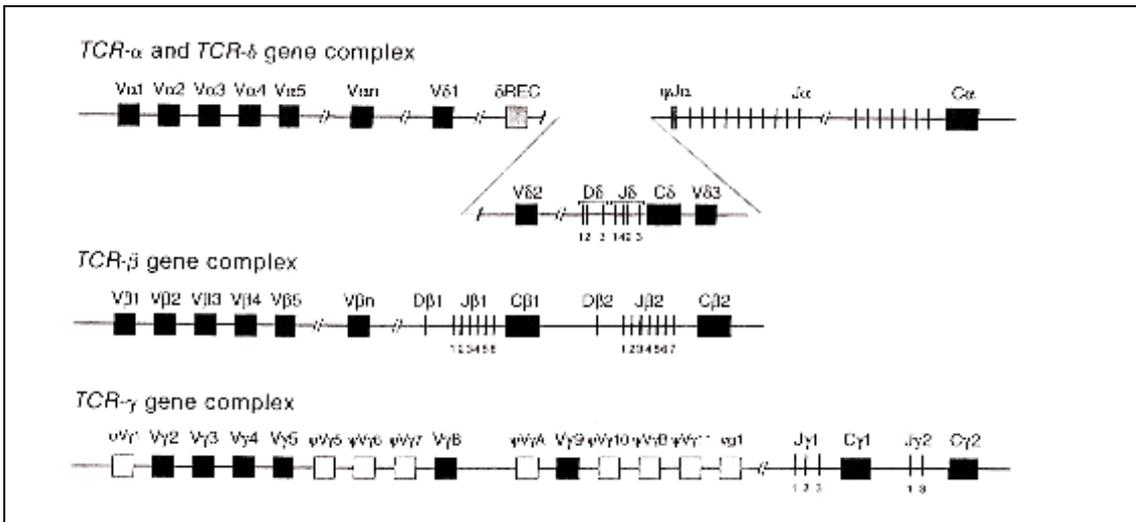


Abbildung 4: TZR-Genloci; aus Leukemia, 6th edition, Van Dongen JJM, Adriaansen HJ, Immunobiology of Leukemia, 1996, 101, mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlages.

1.3.2.3 Das V-(D-)J-Joining

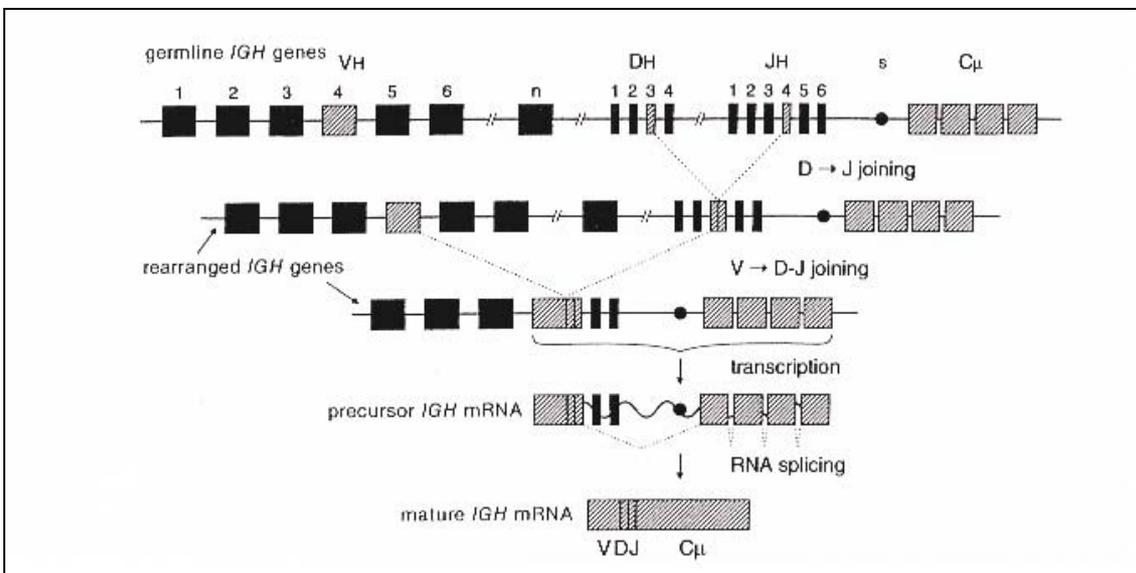


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines IgH-Genrearrangements; aus Leukemia, 6th edition, Van Dongen JJM, Adriaansen HJ, Immunobiology of Leukemia, 1996, 102, mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlages.

Abbildung 5 zeigt ein Beispiel eines IgH-Genrearrangements. Zunächst wird eines der J-Segmente mit einem der D-Segmente verbunden (J to D-joining), danach wird ein V-Segment mit dem DJ-Segment verbunden (V to DJ-joining). Die dazwischenliegenden Sequenzen werden deletiert. Dieser Prozeß des Rearrangements wird mit Hilfe zweier Rekombinase-Enzyme, die durch die „recombinase activating genes“ RAG-1 und RAG-2 codiert werden, gesteuert.¹³⁵ Der Rekombinasekomplex erkennt spezifische „recombination signal sequences“ (RSS), die aus einer palindromischen Heptamer- und Nonamer-Sequenz bestehen, die durch Spacerregionen, bestehend aus 12 oder 23 Basenpaaren, voneinander getrennt liegen.

Durch Kombination verschiedener V-, D- und J-Segmente entsteht die kombinatorische Diversität, die im Falle des IgH-Locus beispielsweise min. 180.000 verschiedene Kombinationen ermöglicht. Einschränkend muß gesagt werden, dass fetale B-Zellen nur ausgewählte VH- und JH-Gene und periphere TZR $\gamma\delta$ + Zellen, bevorzugt V γ 9-J γ 1.2 und V δ 2-J δ 1 Gensegmente, benutzen.^{25,92}

1.3.2.4 Der Fingerabdruck einer Leukämie

Die Verknüpfung zwischen zwei Gensegmenten erfolgt ungenau, dies führt zu einer weiteren Vergrößerung der Vielfalt. Diese Ungenauigkeit beinhaltet einerseits das zufällige Kürzen der Enden der rekombinierten Gensegmente durch Deletion von Nukleotiden und andererseits die zufällige Insertion von Nukleotiden zwischen die verbundenen Segmente. Diese Insertionen werden durch das Enzym TdT (Terminaldesoxynucleotidyltransferase) katalysiert. Es ist in der Lage, ohne Vorhandensein eines Templates Nukleotide am 3' Ende einer DNA einzufügen.³ Diese Verbindungsstellen oder „junctional regions“ der Ig- und TZR-Gene kodieren die sogenannte „third complementary region“ (CDR3), die wesentlich zur Antigenerkennung beiträgt und stellt außerdem eine fingerabdruckähnliche Sequenz dar, d.h. eine Sequenz, die in jedem Lymphozyten oder Lymphozytenklon unterschiedlich ist. Jede ALL hat demnach als klonale Zellproliferation einen eigenen, patientenspezifischen Fingerabdruck, der bei der quantitativen Bestimmung der MRD als PCR-Target dient.^{39,67,134}

Folgende Abbildung zeigt im Vergleich die Sequenzen der Verbindungsstellen („junctional regions“) der $V\gamma$ -Rearrangements 17 verschiedener Patienten:

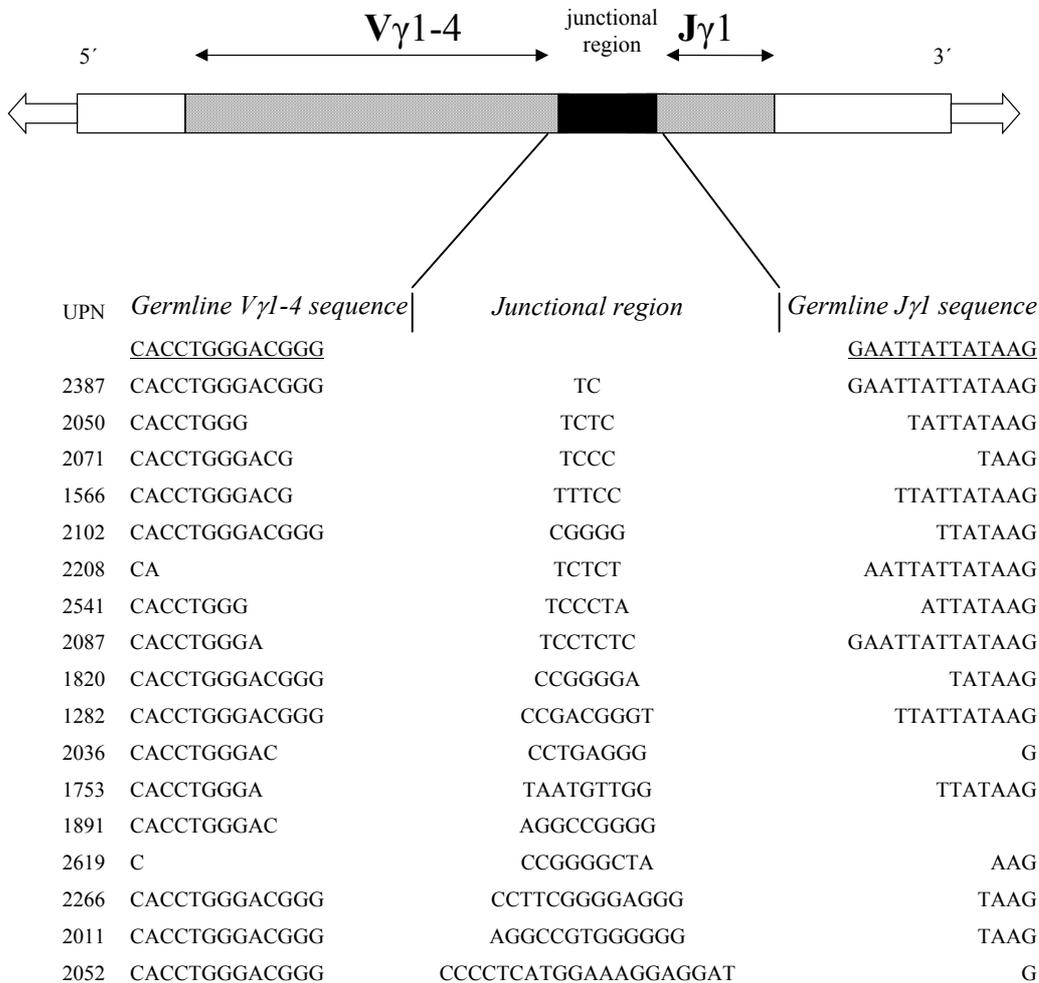


Abbildung 6: Junctional regions von 17 ALL-Patienten; diese dienen in der MRD Untersuchung als RQ-PCR Targets.

1.3.2.5 Immunglobulin- und TZR-Rearrangements in precursor-B-ALL und T-ALL

Der Rearrangementprozeß läuft geordnet ab. Ein erfolgreiches IgH-Rearrangement eines Locus führt beispielsweise automatisch zur Inhibierung desselben Locus auf dem anderen IgH-Allel und zur Durchführung eines Rearrangements für die Immunglobulinleichtkette auf dem Igκ-Gen.⁶⁸ Ist das Igκ-Gen nichtproduktiv wird das

Ig λ -Gen rearrangiert.⁹³ Ig κ -produzierende B-Zellen belassen normalerweise ihr Ig λ in genuiner Konfiguration während in den meisten Ig λ -produzierenden B-Zellen die Ig κ -Gene auf einem oder beiden Allelen deletiert werden.⁶² Dieser Deletionsprozeß wird durch ein spezifisches Rearrangement des sogenannten „kappa-deleting-element“(kde), das ungefähr 24 kb downstream des C κ -Gensegments liegt, vermittelt.⁹⁷ Das durch das kde organisierte Rearrangement unterliegt keiner weiteren Rekombination und ist somit ein sogenanntes „end-stage“ Rearrangement, welches zwischen Diagnose und Rezidiv stabil bleibt. Dies ist ein großer Vorteil dieses molekularen Targets.¹²² Verschiedene Studien zeigen, dass bei über 95% der precursor-B-ALLs im Kindesalter IgH-Rearrangements gefunden werden und dass außerdem ein Großteil von ihnen Ig κ -Rearrangements (30%) oder Deletionen (50%) vorweisen. 20% der precursor-B-ALLs haben Ig λ -Rearrangements.^{19,20,114,123}

Cross-lineage TZR-Rearrangements, d.h. Rearrangements, die den TZR-Genkomplex betreffen und bei B-ALLs gefunden werden, treten mit großer Häufigkeit in precursor-B-ALLs auf: in 35% der Fälle werden TZR β -, in 55% der Fälle TZR γ - und in 90% der Fälle TZR δ -Rearrangements gefunden.⁴⁷ Alle Fälle von TZR $\gamma\delta$ + T-ALLs haben TZR γ - und TZR δ -Genrearrangements, 95% von ihnen enthalten außerdem TZR β -Rearrangements.^{28,29} Alle Fälle von TZR $\alpha\beta$ + T-ALLs enthalten TZR β und TZR γ -Rearrangements und haben zumindest ein deletiertes TZR δ -Allel, was einem TZR α -Rearrangement gleichkommt.

Cross-lineage Ig-Genrearrangements sind bei T-ALLs selten (10-15%) und beinhalten nur IgH-Gene.¹²³ Durch die Analyse der hier genannten Loci lassen sich in über 95% aller B- und T-Zell Leukämien wenigstens zwei molekulare Targets finden.

1.3.2.6 Klonale Evolution

Ig- und TZR-Rearrangements entstehen durch komplexe Prozesse mit Ungenauigkeiten an den Verbindungsstellen. Ungefähr zwei von drei Verknüpfungen sind daher „out-of-frame“, d.h. das Leseraster ist verschoben, was zur Folge hat, dass nichtproduktive mRNA entsteht. Dies führt zu weiteren, sekundären Rearrangements (DH-JH-Replacements, VH-JH-Replacements oder V κ -J κ -Replacements), die die nichtproduktiven ersetzen. Im Rahmen von Selektionsprozessen werden durch

sekundäre Rearrangements aber auch produktive Rearrangements, wie z.B. V α -J α -Rearrangements, ersetzt.^{49,74} Diese sog. klonale Evolution kann auch im Laufe einer Leukämieerkrankung zwischen Diagnosestellung und Rezidiv auftreten, was einen Verlust des MRD-Targets und somit falsch-negative Resultate verursachen würde.^{21,24} Das Risiko, dass sich ein solcher klonaler Selektionsprozess nach Diagnose vollzieht, nimmt mit der Zeitdauer zwischen Diagnose und Rezidiv zu, kann aber auch schon in frühen Behandlungsphasen auftreten.⁴² Um dieses Problem zu umgehen sind monoklonale PCR-Targets zu bevorzugen.

1.3.2.7 Das Funktionsprinzip der real-time PCR

Die patientenspezifischen Rearrangements dienen als PCR-Targets für die ‚real-time‘ quantitative PCR (RQ-PCR), die eine akkurate Quantifikation während der exponentiellen Phase der PCR-Amplifikation möglich macht. Die RQ-PCR Technik basiert auf der TaqMan-Technologie, die die 5' \rightarrow 3' Nukleaseaktivität der Taq-Polymerase ausnutzt, um spezifische PCR-Produkte während der Reaktion zu quantifizieren.^{30,84,125} Für die genaue Quantifizierung der minimalen Resterkrankung wird eine Verdünnungsreihe der DNA der initialen Diagnoseprobe hergestellt, mit Hilfe derer eine Standardkurve ermittelt wird. Anhand dieser Standardkurve kann die Menge residueller Leukämiezellen in jeder Probe eines Patienten zu jedem Zeitpunkt während und nach der Therapie mit einer Sensitivität von 10^{-4} bis 10^{-6} errechnet werden.⁸⁴

1.4 Fragestellung

Die allogene Stammzelltransplantation ist eine hocheffektive Therapie für Kinder mit akuter lymphatischer Leukämie. In Anbetracht der hohen transplantationsassoziierten Morbidität und Mortalität ist eine sorgfältige Indikationsstellung vor jeder Transplantation notwendig. Hochrisikofaktoren, schlechtes Ansprechen auf die Erstbehandlung und Rezidiv sind die häufigsten Indikationen.

Trotz der Intensität einer allo-SZT erleiden ungefähr 40% der Kinder nach allo-SZT ein Rezidiv. Eine große Bedeutung kommt demnach prognostischen Faktoren zu, mit denen

möglichst frühzeitig zwischen den Kindern, die von einer allo-SZT profitieren und denen, für die andere Therapiemodalitäten von größerem Vorteil wären, zu unterscheiden.

In der vorliegenden Arbeit soll nun die Bedeutung des MRD-Levels vor allo-SZT als prognostischem Marker im Vergleich mit anderen prognostischen Faktoren untersucht werden. Betrachtet wird zunächst das gesamte Patientenkollektiv, dann gesondert nur die Patienten, die nach erfolgtem Rezidiv transplantiert wurden. Folgende Fragen sollen diskutiert werden:

- 1) Welche Bedeutung kommt der Höhe der MRD-Last vor allo-SZT im Vergleich mit anderen prognostischen Faktoren in Bezug auf das Wiederauftreten der Grunderkrankung zu?
- 2) Lässt sich eine Grenzkonzentration bestimmen, die für ein Rezidiv nach allo-SZT prädiktiv ist?
- 3) Wie unterscheiden sich die Risikogruppen S2-S4 bezüglich des MRD-Status im ereignisfreien Überleben (event-free-survival, EFS)?

2 Material

2.1 Reagentien

2.1.1 Isolierung der mononukleären Zellen

Biocoll Separating Solution

Biochrom AG, Berlin

PBS Dulbecco's

GIBCO/ BRL, Eggenstein

2.1.2 DNA-Isolierung

QIAamp® DNA Mini Kit:

Qiagen GmbH, Hilden

QIAamp spin columns

Sammeltubes (2ml)

Buffer AL

Buffer AW1

Buffer AW2

Buffer AE

QIAGEN Protease

Ethanol 100%

Universitätsapotheke, Tübingen

PBS Dulbecco's

GIBCO/BRL, Eggenstein

2.1.3 Screening-PCR

AmpliTaq Gold® Polymerase

Applied Biosystems, Foster City/USA

mit GeneAmp 10x PCR Gold Buffer

& MgCl₂ Solution

d TTP-Li-salt 2,5 µmol

Roche Applied Science, Mannheim

d GTP-Li-salt 2,5 µmol

d ATP-Li-salt 2,5 µmol

d CTP-Li-salt 2,5 µmol

Li Chrosolv® Aqua

Merck, Darmstadt

Screening-Primer

MWG Biotech AG, Ebersberg

Tabelle 1: Primer für Screening-PCR und Sequenzanalyse von IgH-, TZRd-, TZRG und IGK-kde Genrearrangements und TAL1 Gendeleitionen.

Genlocus	Primer	Sequenz (5'-3')
IGH	VH1/7	TCTGGGGCTGAGGTGAAGAA
	VH2	ACCTTGAAGGAGTCTGGTCCT
	VH3	GGGGGTCCCTGAGACTCTC
	VH4	GCCCAGGACTGGTGAAGC
	VH5	CTGGTGCAGTCTGGTGAAGC
	FR3 A	ACACGGYSTGTATTACTGT (S=G,C/Y=C,T)
	JHcons	ACCTCTTCCCAGGA
	TZRD	Vδ1-5'
Vδ2-5'		ACCAAACAGTGCCTGTGTCAATAGG
Vδ3-5'		GACCAGACGGTGGCGAGTGCC
Dδ2-5'N		ACTCCATGTTCAAATAGATATAGTATT
Dδ3-3'N		CTTCCTGCTATCCCTTCCAGG
Jδ1-3'		ACCTCTTCCCAGGAGTCCTCC
TZRG	VγI-5'	CAGGCCGACTGGGTCACTGTC
	VγII-5'	CAGCCCGCCTGGAATGTGTGG
	VγIII-5'	GACATACCTTGCAAGATATCGAGC
	VγIV-5'	CTGAAATATCTATTCCAGACCAGC
	Jγ1.1/2.1-3'	TTACCAGGTGAAGTTACTATGAGC
	Jγ1.3/2.3-3'	CCGTATATGCACAAAGCCAAATC
IGK-kde	VκI-5'	GTAGGAGACAGAGTCACCATCACT
	VκII-5'	TGGAGAGCCGGCCTCCATCTC
	VκIII-5'	GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG
	VκIV-5'	GGCGAGAGGGCCACCATCAAC
	Intron-5'	GTTATTCCCAAAAGCTCAATCTCAAAG
	Kde-3'	CCCTTCATAGACCCTTCAGGCAC
SIL-TAL1	Sildb-5'	AAGGGGAGCTAGTGGGAGAAA
	Tal1db1-3'	AGAGCCTGTCGCCAAGAA

2.1.4 Gel-Elektrophorese

Acrylamid, Rotiphorese® GEL 30, 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Temed (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin)	Roth, Karlsruhe
APS 10%	Merck, Darmstadt
10X TBE-Puffer pH 8	Universitätsapotheke, Tübingen
Bromphenolblau	Sigma, München
Molecular Weight Marker	Roche, Mannheim
Ethidiumbromid 1%	Roth, Karlsruhe

2.1.5 Sequenzierung

2.1.5.1 Säulenreinigung

E.Z.N.A. Cycle Pure Kit:	PEQLAB Biotechnologie GMBH,
HiBind®-DNA-Säulen	Erlangen
2 ml Sammel-Tubes	
CP-Puffer	
DNA-Waschpuffer	

2.1.5.2 Sequenzierreaktion

DNA Sequencing Kit:	Applied Biosystems, Foster City/USA
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction	

2.1.5.3 Fällern der DNA

Ethanol 70%	Universitätsapotheke, Tübingen
-------------	--------------------------------

Ethanol 100%	Universitätsapotheke, Tübingen
NaAc pH 4,6 3 M	Merck, Darmstadt
Li Chrosolv® Aqua	Merck, Darmstadt

2.1.6 Real-time PCR

TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City/USA
Patientenspezifischer Forward Primer	MWG Biotech AG, Ebersberg
Reverse Primer	MWG Biotech AG, Ebersberg
TaqMan Sonde	MWG Biotech AG, Ebersberg

Tabelle 2: Germline Primer und TaqMan Sonden für die RQ-PCR Analyse. T = TaqMan Sonde; R = reverser Primer, a = Position des Primers relativ zum RSS (recombination signal sequence) des Gensegments, das das Oligonukleotid beinhaltet.

Genlocus	Primer	a	Sequenz
IGH	T-JH1.2.4.5	+31/32/27/30	CCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTG
	T-JH3	+20	CAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA
	T-JH6	+43	CACGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAA
	R-JH1-intron	+25	CGCTATCCCCAGACAGCAGA
	R-JH2-intron	+47	GGTGCCTGGACAGAGAAGACT
	R-JH3-intron	+23	AGGCAGAAGGAAAGCCATCTTAC
	R-JH4-intron	+36	CAGAGTTAAAGCAGGAGAGAGGTTGT
	R-JH5-intron	+24	AGAGAGGGGGTGGTGAGGACT
	R-JH6-intron	+35	GCAGAAAACAAAGGCCCTAGAGT
IGK	T-kde-cons1	+75	AGCTGCATTTTTGCCATATCCACTATTTGGAGT
	R-kde-cons2	+143	TACAGACAGGTCCTCAGAGGTCAG
TZRD	T-JD1-cons1	+62	CCCGTGTGACTGTGGAACCAAGTAAGTAACTC
	R-JD1-cons1	+105	TTAGATGGAGGATGCCTTAACCTTA
	T-DD3-cons2	+41	ATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAGAGACCT
	R-DD3-cons4	+62	TTGCCCTGCAGTTTTTGTAC
TZRG	T-JG1.3/2.3-cons3	+78	TGTCACAGGTAAGTATCGGAAGAATACAACATTTCC
	R-JG1.3/2.3-cons2	+112	TTCCTGCCTTCCCTCTATTACCT
	Tr-JG1.1/2.1-cons1	+61	ACCAGGTGAAGTTACTAGTAGCTTAGTCCCTTCAG
	R-JG1.1/2.1-cons1	+171	TATACTGAGGCCAGGAATGTGACATA
Albumin	T-Albumin		TGCTGAAACATTACCTTCCATGCAGA
	F-Albumin		TGAAACATACGTTCCTCCAAAGAGTTT
	R-Albumin		CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT

2.2 Einmalartikel und Geräte

ABI PRISM 7700 Sequence Detector	Applied Biosystems, Foster City/USA
ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City/USA
Accu-jet®	Brand, Wertheim
Combitips plus 0,5 ml, 1 ml, 5 ml, 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg
GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems, Foster City/USA
Glasplatten	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hoefer Electrophoresis Unit SE 600 Series	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Isotopenmessgerät	Raytest, Straubenhardt
Laborwischtücher Kimwipes®	Kimberly-Clark, Roswell/USA
LeucoSep Röhrchen für 3-6 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Foster City/USA
Mikro-Zentrifuge für Reaktionsgefäße oder PCR-Strips	Neolab, Heidelberg
Multipette® pro	Eppendorf AG, Hamburg
Optical Caps	Applied Biosystems, Foster City/USA
Optical Tubes	Applied Biosystems, Foster City/USA
Photometer GeneQuant II	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Pipetten 2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson, Middleton, WI/USA
Pipettenspitzen 100 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht/D
Pipettenspitzen 10 µl, 30 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen
PP-Test tubes 15 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Präzisions-Küvette aus Quarzglas	Hellma, Müllheim
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
SafeSkin-Latex-Handschuhe	Kimberly-Clark, Roswell/USA

Spacer Mate	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Stripetten 5 ml, 10 ml	Costar, New York/USA
Tischzentrifuge Mikro 22R	Hettich, Tuttlingen
Vortex-Genie 2	Roth, Karlsruhe
Vortex Reax top	Neolab, Heidelberg
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge Rotixa 50RS	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge RVC 2-18	Heraeus- Christ, Hanau

2.3 Software

Sequence Navigator	Perkin Elmer, Wellesley, MA/USA
ABI PRISM 310 Collection	Perkin Elmer, Wellesley, MA/USA
ABI PRISM 310 Sequence Detector v 1.7	Perkin Elmer, Wellesley, MA/USA
Primer Express™ 1.5	Perkin Elmer, Wellesley, MA/USA

3 Methoden

3.1 Lymphozytenisolierung durch Dichtegradientenzentrifugation

Zellen mit unterschiedlicher Dichte und Größe können durch Zentrifugation im Gradienten fraktioniert werden. Am häufigsten wird der Ficoll-Isopaque-Gradient mit einem spezifischen Gewicht von 1,077 g/ml verwendet. Während Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihres größeren spezifischen Gewichts den Gradienten passieren und auf den Boden des Zentrifugationsgefäßes sedimentieren, sammeln sich Lymphozyten, Thrombozyten und Monozyten wegen ihres spezifischen Gewichts <1,077 g/ml an der Plasma-Gradientenphase, wo sie für die Weiterverarbeitung gewonnen werden. Dabei bewirkt das Ficoll als hochpolymerer Zucker eine Agglutination der Erythrozyten und somit eine Sedimentationsbeschleunigung, wohingegen das Röntgenkontrastmittel Isopaque für die Dichte des Trennmediums verantwortlich ist.

Zunächst wurde das Knochenmark 1 zu 3 mit PBS (Phosphatpuffer) verdünnt. Für jede Knochenmarkprobe wurde je ein 15 ml Falcon-Röhrchen vorbereitet, in das jeweils 4 ml Ficoll-Isopaque Lösung vorgelegt wurden. Nun wurde das verdünnte Knochenmark vorsichtig über den Ficoll-Isopaque-Gradienten geschichtet, die Röhrchen wurden austariert und 20 min bei 800 g zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation zeigten sich die mononukleären Zellen (MNC) als distinkte Bande zwischen Plasma und Ficoll, von oben nach unten ergab sich folgende Schichtung: Plasma-MNC-Ficoll-Erythrozyten. Der Lymphozytenring wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein sauberes Zentrifugationsröhrchen transferiert. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS. Die erhaltenen mononukleären Zellen wurden nach Zellzahl aliquotiert und bis zur DNA-Isolation bei -80°C gelagert.

3.2 DNA-Isolation aus mononukleären Zellen

Die Isolation genomischer DNA aus mononukleären Zellen aus EDTA-Knochenmark erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA Blood Mini Kit gemäß den Herstellerangaben. Das Kit zur DNA-Isolation basiert auf einem Säulensystem. In nur 20 Minuten erhält man reine DNA zur direkten PCR-Amplifikation. Das QIAamp DNA Blood Mini Kit wurde für die Isolierung von etwa 6 µg Gesamt-DNA bzw. für bis zu 5 mal 10^6 Lymphozyten entwickelt

Nach dem Lysieren der Zellen mit QIAGEN Protease folgte das Binden des Lysats an die Membran. Dabei binden die negativ geladenen Phosphatreste der DNA an die positiv geladenen Gruppen der Silikamembran. Salz und pH-Bedingungen im Lysat stellen sicher, dass weder Proteine noch andere Kontaminationen, die eine PCR hemmen könnten, auf der Membran zurückbleiben. Die an die QIAamp Membran gebundene DNA wurde nun in zwei Zentrifugationsschritten gewaschen. Die gereinigte DNA wurde mit 50 µl Buffer AE, der zuvor auf 70 °C erhitzt wurde, von der QIAamp Spinsäule eluiert.

Zuletzt wurden Konzentration und Reinheit der DNA photometrisch bestimmt. Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen Wasser als Referenzwert photometrisch vermessen. Um eine möglichst genaue Messung zu erhalten sollte die gemessene Extinktion im Bereich von 0,1 bis 1 liegen. Zusätzlich wurden die Proben bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen, wobei das Verhältnis der DNA-Absorptionswerte von 260 nm zu 280 nm ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäure darstellte. Reine DNA hat ein Absorptionsverhältnis von 1,7-1,9.

Die gereinigte DNA konnte dann direkt in nachfolgenden Anwendungen eingesetzt werden oder längerfristig bei -20 °C gelagert werden.

3.3 Die Screening-PCR

3.3.1 Primerkombinationen

Um eine MRD-Analyse durchführen zu können, müssen zunächst die PCR-Targets, d.h. die patientenspezifischen Rearrangements, identifiziert werden. Dazu wurden die Diagnoseproben der Patienten mit Hilfe eines limitierten Sets von Primerkombinationen auf klonale Rearrangements gescreent. Die Entwicklung dieser PCR-Primer und Protokolle wurde 1999 in einem Bericht der BIOMED-1 Concerted Action „Investigation of minimal residual disease in acute leukemia“ beschrieben.⁸³

Um alle ALL-Patienten abzudecken und damit falsch-negative Ergebnisse zu verhindern, wurden PCR-Primer für multiple Targets entwickelt.

Komplette IgH-Genrearrangements wurden mit VH-family-specific framework region 1 (FR1) Primern, VH1/7, VH2, VH3, VH4/6, VH5 und einem consensus FR3-Primer in Kombination mit einem consensus-joining-Primer (JHcons) amplifiziert. Der VH4-Primer erkennt hierbei auch die VH6-Gensequenz.¹²⁵

Ig κ -Rearrangements wurden als sog. end-stage-rearrangements als alternatives PCR-Target zu IgH-Rearrangements bei precursor-B-ALLs gewählt, da IgH-Rearrangements häufig oligoklonal und instabil sind.^{14,35,101,102,128} Für den Ig κ -Genkomplex wurden Primer für das kappa-deleting-element (kde) und für Segmente, die sich mit dem kde-Segment rekombinieren, nämlich consensus V κ -family und J κ -C κ intron Primer, entwickelt.¹⁸ Außerdem wurden Primer für alle V-, D- und J-Segmente entwickelt, die bekanntermaßen häufig an TZR δ - und TZR γ -Rearrangements beteiligt sind. TZR δ - und TZR γ -Rearrangements wurden als PCR-Targets ausgewählt, da sie sowohl bei precursor-B-ALLs als auch bei T-ALLs häufig zu finden sind.

Ein zusätzliches PCR-Target für die T-ALL ist die TAL1 Deletion, die in 5-15% aller T-ALLs auftritt.²⁷ Diese Deletion resultiert aus der Verbindung des SIL Gens mit dem TAL1 Gen auf Chromosom 1, wobei eine einzigartige Gensequenz ähnlich den Ig- und TZR-Genrearrangements entsteht.²⁶

Tabelle 3: 25 Primerkombinationen, die in der Screening-PCR eingesetzt wurden.

	Gen Locus	Forward Primer	Reverse Primer	Grösse des PCR-Produkts	erwartete Häufigkeit
1	IGH	VH1/7	JH cons	~340	90-95% in precursor-B-ALL und T- ALL
2		VH2	JH cons	~380	
3		VH3	JH cons	~320	
4		VH4	JH cons	~320	
5		VH5	JH cons	~360	
6		FR3A	JH cons	~100	
7	IGK	VkI-5'	kde-3'	431	~50% in precursor-B-ALL
8		VkII-5'	kde-3'	447	
9		VkIII-5'	kde-3'	429	
10		VkIV-5'	kde-3'	445	
11		intron-5'	kde-3'	511	
12	TZRG	VgI-5'	Jg1.1/2.1-3'	329	~55% in precursor-B-ALL 90-95% in T-ALL
13		VgI-5'	Jg1.3/2.3-3'	533	
14		VgII-5'	Jg1.1/2.1-3'	318	
15		VgII-5'	Jg1.3/2.3-3'	522	
16		VgIII-5'	Jg1.3/2.3-3'		
17		VgIV-5'	Jg1.1/2.1-3'	357	
18		VgIV-5'	Jg1.3/2.3-3'	561	
19	TZRD	Vd1-5'	Jd1-3'	452	~40% in precursor-B-ALL ~50% in T-ALL
20		Vd2-5'	Dd3-3' new	501	
21		Vd2-5'	Jd1-3'	443	
22		Vd3-5'	Jd1-3'	440	
23		Dd2-5' n	Dd3-3' new	608	
24		Dd2-5' n	Jd1-3'	550	
25	TAL1	Sildb-5' n	tal1db1-3'	300	10-20% in T-ALL

3.3.2 Reaktionsbedingungen

Eine Screening-PCR besteht aus 25 PCR-Reaktionen. Der Reaktionsansatz besteht aus 80 µl Mastermix und 20 µl Primermix. Der Mastermix setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 4: Mastermix für die Screening-PCR

PCR-AMPLITAQ-GOLD	PCR-Mix pro Reaktion	Mastermix
Volumen (in µl)	100	27mal100
Puffer	10	270
dNTP	4	108
MgCl ₂ (25 mM)	6	162
AmpliTaqGoldPolymerase	0,5	13,5
Template (1,3-2,6 µgDNA) in H ₂ O	59,5	1606,5

Die 20 µl Primermix bestehen aus jeweils 10 µl 5'-Primer und 10 µl 3'-Primer je nach Primerkombination mit einer Konzentration von 5 pmol/µl.

Nach Durchnummerierung der PCR-Gefäße von 1-25 wurden zunächst 80 µl des Mastermix vorgelegt, dazu wurden 20 µl der jeweiligen Primerkombination pipettiert.

Die Gefäße wurden gut verschlossen und in den PCR-Cycler gestellt.

Die PCR Reaktionsbedingungen waren dabei wie folgt:

- Initialer Denaturierungsschritt 95 °C für 11 min und 96 °C für 1 min
- 8 Cycles mit
 - Denaturation 94 °C für 45 sek
 - Annealing 63 °C für 30 sek
 - Extension 70 °C für 45 sek
- 37 Cycles mit
 - Denaturation 90 °C für 30 sek
 - Annealing 56 °C für 30 sek
 - Extension 70 °C für 45 sek
- finaler Extensionsschritt 72 °C für 7 min
- Heteroduplexanalyse 95 °C für 5 min, dann Abkühlen auf 4 °C

Die Reduktion der Annealingtemperatur innerhalb der ersten Zyklen („Touchdown-PCR“) hat zur Folge, dass sich die Primer v.a. zu Beginn der PCR nur an Sequenzen mit perfekter Sequenzhomologie anlagern.

Der größte Nachteil der PCR-basierten Detektion klonaler Ig- und TZR-Rearrangements ist das Risiko falsch-positiver Resultate aufgrund einer Amplifikation von ähnlichen Rearrangements polyklonaler, reaktiver Lymphozyten.⁷¹

Am Schluß der PCR wurde deshalb eine Heteroduplexanalyse durchgeführt, nach welcher man aufgrund des Laufverhaltens in der Gelelektrophorese zwischen polyklonalen und monoklonalen PCR-Produkten unterscheiden konnte.

3.3.3 Auftrennung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese

3.3.3.1 Herstellung der Polyacrylamidgele

Zunächst wurde mit Hilfe von jeweils zwei Glasplatten und Spacern, die zwischen den Glasplatten befestigt wurden, ein Gelrahmen hergestellt. Die Spacer halten einen 1,5 mm hohen Raum zwischen den beiden Glasplatten frei, in den später die noch flüssige Gelmasse gegossen wird. Pro Patient und durchgeführtem Screening wurden jeweils zwei Gele benötigt.

Pipettierschema für zwei Gele:

Tabelle 5: Pipettierschema für zwei Acrylamidgele

Acrylamid	26,6 ml
TBE-Puffer	10 ml
Aqua	63 ml
Temed	120 µl
APS	700 µl

Das Tetramethylethylenediamin (Temed) diente der Quervernetzung zwischen den Polyacrylamidsträngen, diese Reaktion wurde durch das zuletzt zuzugebende Ammoniumpersulfat (APS) katalysiert.

Die noch flüssige Gelmasse sollte dann möglichst blasenfrei in die Gelrahmen gegossen werden. In die obere Öffnung des Gelrahmens wurde ein Kamm eingesetzt. Nach einer

Härtezeit von ca. 30 min wurde dieser entfernt und die so entstandenen Taschen mit Wasser ausgespült.

3.3.3.2 Durchführung der Gelelektrophorese

Die fertigen Gele wurden nun in die Elektrophoresekammer, die als leitendes Element TBE-Puffer (10x TBE-Puffer 1:10 auf 1x TBE-Puffer verdünnt) enthält, eingespannt. Von den insgesamt 100 µl der amplifizierten DNA-Probe wurden 50 µl entnommen und vor dem Auftragen auf das Gel mit 14 µl einer Mischung aus Bromphenolblau und Glycerol vermischt, die aus 15 ml Glycerol (99%), 35 ml Aqua und einer Spatelspitze Bromphenolblau hergestellt wurde. Diese Lösung sorgte einerseits dafür, dass die DNA in den mit TBE-Puffer gefüllten Taschen auf den Boden absinkt und diente andererseits der besseren Sichtbarkeit des aufzutragenden Flüssigkeitsvolumens.

In die jeweils erste Tasche eines Gels wurde ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen, der es später ermöglichte, die Länge der amplifizierten DNA-Stücke, d.h. die ungefähre Basenpaar-Anzahl, zu bestimmen.

In die restlichen Taschen wurden die 25 DNA-Bromphenolblau-Proben, die mit Hilfe der 25 verschiedenen Primerkombinationen hergestellt wurden, aufgetragen. Die Gele wurden dann für eine Stunde bei 400 Volt elektrophoresiert.

3.3.3.3 Das Färben und Fotografieren der Gele

Zum Färben der Gele wurde eine 1%ige Ethidiumbromidstammlösung (10 mg/ml) mit Aqua dest. verdünnt (1:10 000). Nachdem die Gele von den Glasplatten entfernt wurden, wurden sie für 7 min in diese Färbelösung gelegt. Die Gele sollten dabei vollständig von der Lösung bedeckt sein.

Zum Schluss wurden die gefärbten Gele mit UV-Licht angeregt, fotografiert und digital gespeichert.

Klonale Zellproliferationen waren dann als distinkte Banden zu erkennen.

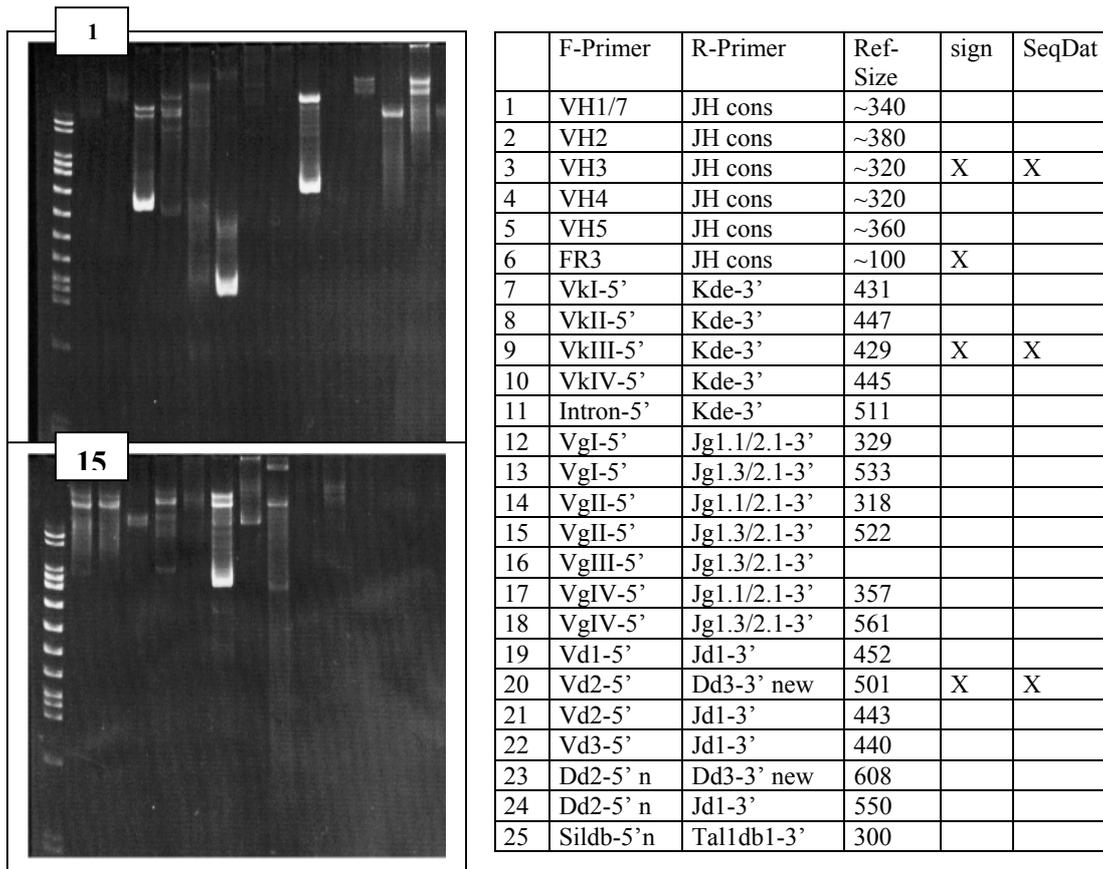


Abbildung 7: Klonale Zellproliferationen sind als distinkte Banden zu erkennen.

3.4 Sequenzierung der amplifizierten DNA

Der nächste Schritt bestand darin, die DNA-Fragmente, die zur Generierung einer Bande geführt haben und damit eine klonale Zellproliferation repräsentieren, zu sequenzieren und damit die Basenabfolge des Rearrangements der zugrundeliegenden Lymphozyten zu erhalten.

3.4.1 Aufreinigung der DNA

Vor der Sequenzierung der DNA-Fragmente wurde die amplifizierte DNA mit Hilfe des E.Z.N.A.[®] Cycle-Pure-Kit der Firma PeqLab gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt. Die Grundlage dieses Funktionsprinzips ist eine Silikamatrix, die unter bestimmten optimierten Bedingungen das spezifische und reversible Binden von DNA

erlaubt, wodurch Proteine und andere Kontaminationen aus der Probe entfernt werden können.

Die übrigen 50 µl des Screening-PCR-Ansatzes wurden mit Hilfe dieses Kits von Verunreinigungen befreit. Zum Schluß wurde die DNA mit 40 µl sterilem, deionisiertem Wasser von der Säulenmatrix eluiert und stand dann für die Sequenzierreaktion zur Verfügung.

3.4.2 Sequenzierreaktion

Die Sequenzierreaktion wurde mit Hilfe des ABI PRISM® BigDye™ Terminator v 3.0 Cycle Sequencing Kits gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. BigDye Terminator v3.0, Desoxynucleosidtriphosphate, AmpliTaq® FS Enzym, Magnesiumchlorid und ein Reaktionspuffer standen als fertiger Reaktionsmix zur Verfügung.

Die eingesetzten Primer entsprechen den Screening-Primern, sie wurden hier jedoch in geringerer Konzentration (1 pmol/µl) und in separaten Reaktionen eingesetzt.

Tabelle 6: Pipettierschema für die Sequenzierreaktion

Sequenzierprimer (1 pmol)	2 µl
BigDye Terminator	2 µl
DNA (Säulen-Eluat)	4 µl
Reaktionsvolumen	8 µl

Reaktionsbedingungen:

- Initialer Denaturationsschritt 94°C für 10 sek
- 25 Cycles mit

Denaturation	96°C für 10 sek
Annealing	55°C für 5 sek
Extension	60°C für 50 sek
- finaler Extensionsschritt mit

2 Holds jeweils	72°C für 5 min
-----------------	----------------

Danach wurde die DNA bei -20°C gelagert oder sofort für die Analyse im ABI 310 aufgearbeitet.

3.4.3 Ethanolfällung

Die Ethanolfällung diente dazu, die bei der Sequenzierreaktion entstandenen DNA-Fragmente von den Resten der anderen Reaktionskomponenten, vor allem von überschüssigen, mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten ddNTPs (Dye-Terminatoren), zu reinigen.

Die DNA wurde zur Fällung zunächst mit $80\ \mu\text{l H}_2\text{O}$ verdünnt und dann mit $250\ \mu\text{l 100\% EtOH}$ und $10\ \mu\text{l NaAc}$ (3 M, pH 4,6) versetzt und vorsichtig durchmischt. Die Probe wurde nach einer Inkubationszeit von mindestens 15 min bei Raumtemperatur bei $15.000\ \text{g}$ für 15 min zentrifugiert, wodurch sich die DNA als Pellet gewinnen ließ. Danach wurde der ethanolische Überstand verworfen, wobei auf die Orientierung des Reaktionsgefäßes in der Zentrifuge zu achten war, da das Pellet mit bloßem Auge nicht sichtbar ist. Das Pellet wurde mit $750\ \mu\text{l 70\% EtOH}$ (Lagerung bei 4°C) gewaschen und wiederum bei $15.000\ \text{g}$ für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Das Pellet wurde anschließend für 5 min in der Vakuumzentrifuge bei 50°C getrocknet und in $16\ \mu\text{l H}_2\text{O}$ gelöst und war dann für die Sequenzermittlung im ABI 310 Genetic Analyzer bereit.

3.4.4 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator v 3.0 Cycle Sequencing Kits am ABI 310 Genetic Analyzer.

In der heutigen, automatisierten DNA-Sequenzierung wird ein Verfahren angewandt, bei dem zu einem Replikationsansatz geringe Mengen aller vier ddNTPs (Didesoxynucleotide) gegeben wird, wobei die Didesoxynukleotide fluoreszenzmarkiert sind und als Terminatoren eingesetzt werden. Sie absorbieren im selben Frequenzbereich, emittieren jedoch bei verschiedener Wellenlänge. Das gewonnene Gemisch wird über Kapillarelektrophorese getrennt. Die unterschiedlichen

Kettenfragmente wandern also nach Kettenlänge geordnet durch den Strahl und emittieren die Fluoreszenz des jeweiligen ddNTP-Farbstoffs.

Werden die Intensitätsverläufe der vier Spektrallinien gegen die Laufzeit übereinander aufgetragen, kann die Sequenz durch den Verlauf der jeweiligen Maxima bei den Emissionswellenlängen bestimmt werden. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Software Sequence Navigator ausgewertet

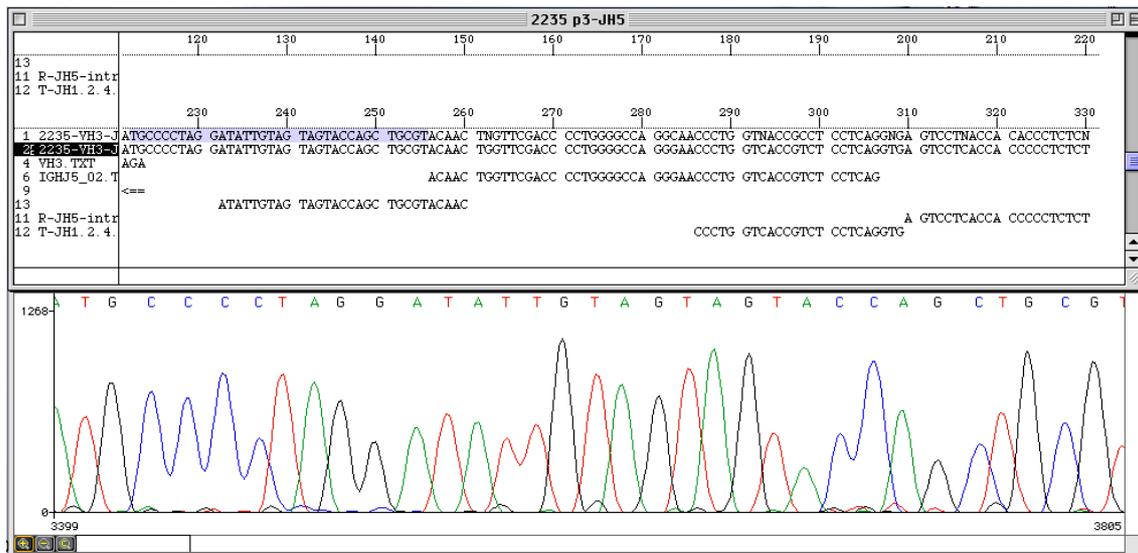


Abbildung 8: Beispiel einer Sequenz eines IgH-Rearrangements.

Um das jeweilige Rearrangement zu identifizieren, mußte die erhaltene Sequenz mit den Germlinesequenzen verglichen werden. Im folgenden Beispiel wurde beim Screening durch die Primerkombination Vd2-5' und Dd3-3' eine Bande generiert, die Sequenz wurde folglich mit den Germlinesequenzen Vd2 und Dd3 abgeglichen:

Sequenzanalyse P28 R'ment1										
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1 Pass P20-F	T-ANGTGTCT	N-TGAAGGAG	AAGCGATCGG	TAACTACT-A	TATCAACTGG	TACAGGAAGA	CCCAAGGTAA	CACAATCACT	TTCATATACC	GAGAAAAGGA
2 Pass P20-R	TCAGGTGCTC	CATGAAAGAG	AAGCGATCGG	TAACTACTTA	TATCAACTGG	-ACAG-AAGA	CCCAAGGTAA	CACAATCACT	TTCATATACC	GAGAAAAGGA
3 TRDV2*01.T										
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
1 Pass P20-F	CATCTATGGC	CCTGGTTTCA	AAGACAATTT	CCAAGGTGAC	ATTGATATTG	CAAAGAACCT	GGCTGTACTT	AAGATACTTG	CACCATCAGA	GAGAGATGAA
2 Pass P20-R	CATCTATGGC	CCTGGTTTCA	AAGACAATTT	CCAAGGTGAC	ATTGATATTG	CAAAGAACCT	GGCTGTACTT	AAGATACTTG	CACCATCAGA	GAGAGATGAA
3 TRDV2*01.T										
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
1 Pass P20-F	GGGTCTTACT	ACTGTGCCTG	TGCCCTCCCG	GTGACAGTGC	TACAAAAACCT	ACAGAGACCT	GTACAAAAAC	TGCAGGGGCA	AAAGTGCCAT	TTCCTGGGA
2 Pass P20-R	GGGTCTTACT	ACTGTGCCTG	TGCCCTCCCG	GTGACAGTGC	TACAAAAACCT	ACAGAGACCT	GTACAAAAAC	TGCAGGGGCA	AAAGTGCCAT	TTCCTGGGA
3 TRDV2*01.T										
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
1 Pass P20-F	TATCCTCACC	CTGGGTCCCA	TGCCTCAGGA	GACAAACACA	GCAAGCAGCT	TCCCTCCCTG	CTTTGGGGCC	TGGAAGGGAT	AGCAGGAAGT	TGACTGGACC
2 Pass P20-R	TATCCTCACC	CTGGGTCCCA	TGCCTCAGGA	GACAAACACA	GCAAGCAGCT	TCCCTCCCTG	CTTTGGGGCC	-GGAAGGGAT	AGCAGGAAGT	TNACNG-ACC
3 TRDV2*01.T										
	410	420	430	440	450	460	470	480		
1 Pass P20-F	AGGGAGATGA	CCACAGCTGC	TGACCTCTCA	CTCACTGCTG	GTITNCCTGG	GG				
2 Pass P20-R	AGGGAGANAA	CCACAGN-GC	N-----A	CT-----						
3 TRDV2*01.T										

Abbildung 9: Zunächst wurde die Vd2 Germlinesequenz eingefügt und an die gefundene Sequenz angeglichen.

Sequenzanalyse P28 R'ment2										
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1 Pass P20-F	T-ANGTGTCT	N-TGAAGGAG	AAGCGATCGG	TAACTACT-A	TATCAACTGG	TACAGGAAGA	CCCAAGGTAA	CACAATCACT	TTCATATACC	GAGAAAAGGA
2 Pass P20-R	TCAGGTGCTC	CATGAAAGAG	AAGCGATCGG	TAACTACTTA	TATCAACTGG	-ACAG-AAGA	CCCAAGGTAA	CACAATCACT	TTCATATACC	GAGAAAAGGA
3 TRDV2*01.T										
4 DD3.TXT										
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
1 Pass P20-F	CATCTATGGC	CCTGGTTTCA	AAGACAATTT	CC-CTGAC	ATTGATATTG	CAAAGAACCT	GGCTGTACTT	AAGATACTTG	CACCATCAGA	GAGAGATGAA
2 Pass P20-R	CATCTATGGC	CCTGGTTTCA	AAGACAATTT	CC-CTGAC	ATTGATATTG	CAAAGAACCT	GGCTGTACTT	AAGATACTTG	CACCATCAGA	GAGAGATGAA
3 TRDV2*01.T										
4 DD3.TXT										
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
1 Pass P20-F	GGGTCTTACT	ACTGTGCCTG	TGCCCTCCCG	GTGACAGTGC	TACAAAAACCT	ACAGAGACCT	GTACAAAAAC	TGCAGGGGCA	AAAGTGCCAT	TTCCTGGGA
2 Pass P20-R	GGGTCTTACT	ACTGTGCCTG	TGCCCTCCCG	GTGACAGTGC	TACAAAAACCT	ACAGAGACCT	GTACAAAAAC	TGCAGGGGCA	AAAGTGCCAT	TTCCTGGGA
3 TRDV2*01.T										
4 DD3.TXT										
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
1 Pass P20-F	TATCCTCACC	CTGGGTCCCA	TGCCTCAGGA	GACAAACACA	GCAAGCAGCT	TCCCTCCCTG	CTTTGGGGCC	TGGAAGGGAT	AGCAGGAAGT	TGACTGGACC
2 Pass P20-R	TATCCTCACC	CTGGGTCCCA	TGCCTCAGGA	GACAAACACA	GCAAGCAGCT	TCCCTCCCTG	CTTTGGGGCC	-GGAAGGGAT	AGCAGGAAGT	TNACNG-ACC
3 TRDV2*01.T										
4 DD3.TXT										
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
1 Pass P20-F	AGGGAGATGA	CCACAGCTGC	TGACCTCTCA	CTCACTGCTG	GTITNCCTGG	GG				
2 Pass P20-R	AGGGAGANAA	CCACAGN-GC	N-----A	CT-----						
3 TRDV2*01.T										
4 DD3.TXT										

Abbildung 10: Dann wurde die Dd3 Germlinesequenz eingefügt und angeglichen-auf diese Weise wurde das Rearrangement analysiert. Pfeile kennzeichnen Anfang und Ende des Rearrangements.

Mit Hilfe der Online-Datenbank „V-Quest search“⁴¹ wurde bei den IgH-Rearrangements außer den VH- und Jhcons-Germlinesequenzen noch die entsprechenden D-Segmente eingefügt, um zu verhindern, dass der Primer komplementär zum D-Segment designed wird.

3.5 Primerdesign

Anhand der gefundenen Sequenzen wurden nun für jeden Patienten mit Hilfe der Primer Express Software patientenspezifische Vorwärtsprimer (forward-Primer, F-Primer) hergestellt. Dabei waren folgende Punkte zu beachten:

- Der patientenspezifische Primer wird im Bereich des gefundenen Rearrangements platziert und sollte dieses im Idealfall um zwei Basen überlappen
- Der Primer sollte so nahe wie möglich bei der Sonde sein ohne diese zu überlappen
- Der G-C Gehalt sollte im Bereich von 30-80% liegen
- Abfolgen eines gleichen Nukleotids sollten vermieden werden, dies gilt insbesondere für Guanin, von dem nicht mehr als drei aufeinander folgen sollten
- Die Schmelztemperatur des Oligonukleotids sollte zwischen 58°C und 62°C liegen
- Innerhalb der letzten fünf Basen am 3'Ende sollten nicht mehr als zwei G und/oder C Basen liegen

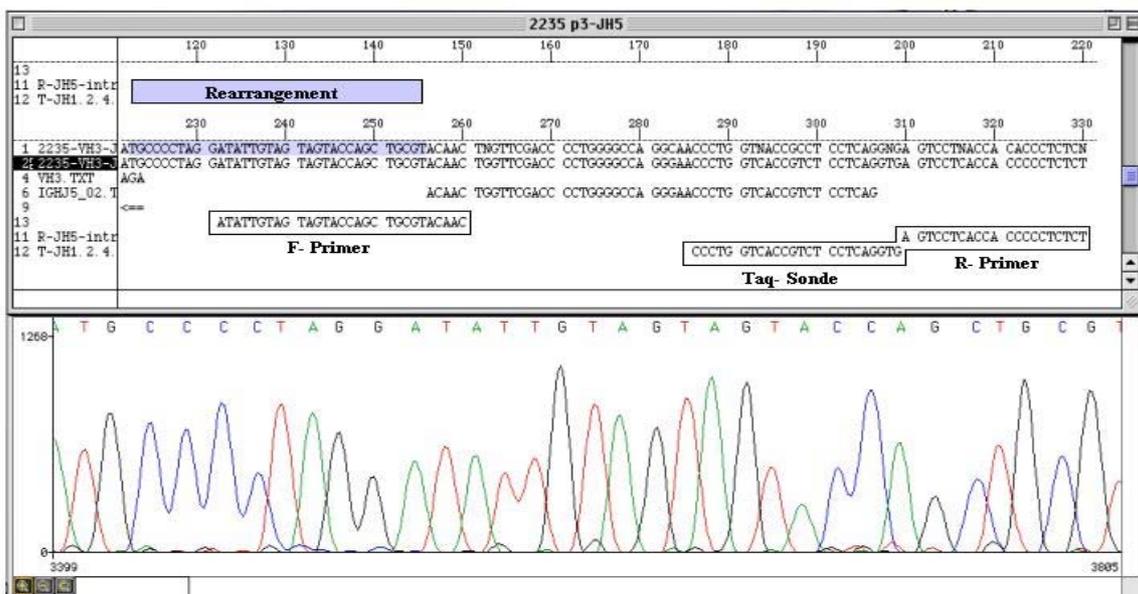


Abbildung 11: Beispiel einer Sequenz eines Rearrangements mit Anordnung von TaqMan Sonde und Primern.

3.6 Die Real-time PCR (RQ-PCR)

3.6.1 Funktionsprinzip

Die TaqMan Methode basiert auf der 5'-3' Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase, mit deren Hilfe während der DNA-Amplifizierung eine zweifach fluoreszenzmarkierte Sonde, die an der Zielgenesequenz bindet, entfernt wird. Der PCR-Reaktionsmix enthält jeweils einen F-Primer und einen R-Primer und die Sonde, wobei die Sonde und der R-Primer komplementär zur Germlinesequenz sind während der F-Primer wie oben beschrieben komplementär zum patientenspezifischen Rearrangement ist. Die Sonde enthält einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff am 5'-Ende (6-carboxyfluorescein, 6-FAM; emission $\leftrightarrow_{\max} = 518 \text{ nm}$) und einen Empfängerfarbstoff (Quencher) am 3'-Ende (6-carboxytetramethylrhodamine, TAMRA; Emission $\leftrightarrow_{\max} = 582 \text{ nm}$).

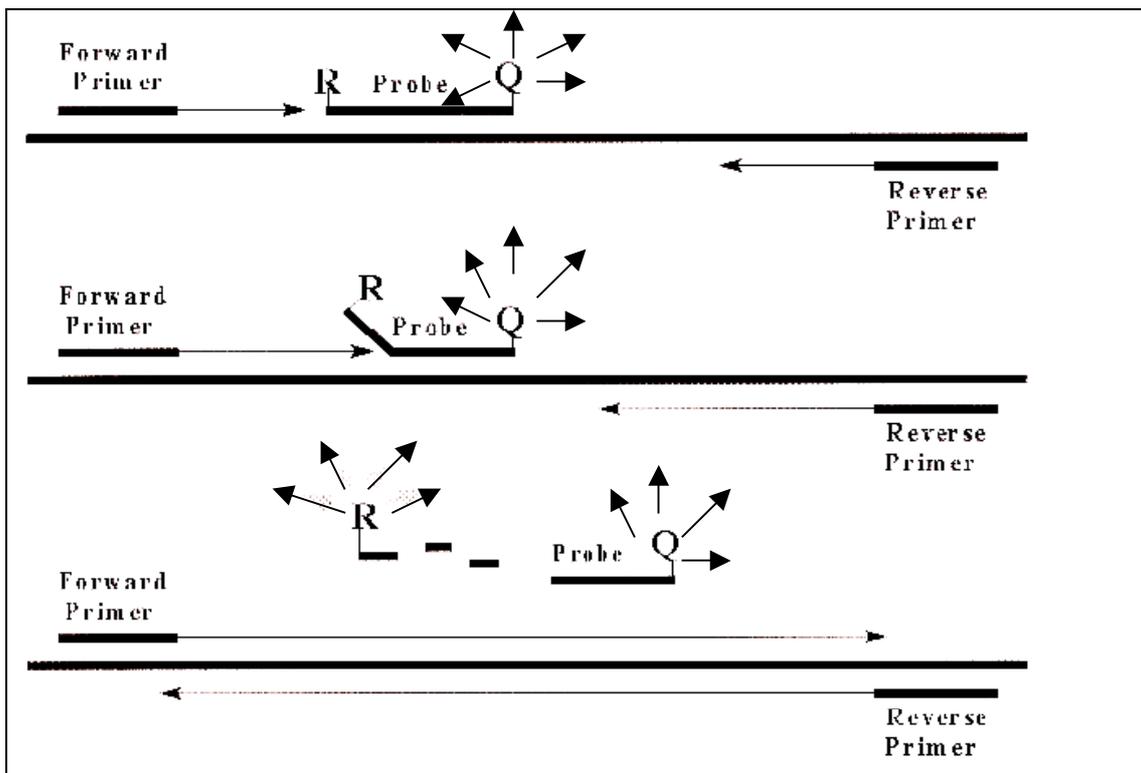


Abbildung 12: Funktionsprinzip der real-time PCR; aus www.vu-wien.ac.at/i123/VIROKURS/RT-PCRkurs.html (Oktober 2004).

Solange sowohl der Reporter- als auch der Quencherfarbstoff noch an der Sonde befestigt sind, d.h. solange die Sonde noch intakt ist, wird die Energie des Reporterfarbstoffes, die nach Anregung durch einen Argon-Laser emittiert wird, auf den Quencherfarbstoff übertragen und nur dieser emittiert Licht. Während der Amplifizierungsphase der PCR werden die Primer durch die Taq-Polymerase verlängert und spalten die Sonde mit Hilfe der 5'-3' Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase vom DNA Strang ab. Dadurch wird der Reporter- vom Quencherfarbstoff getrennt und ist nun in der Lage, seine eigene charakteristische Fluoreszenz zu emittieren. Die Stärke dieser Fluoreszenz ist proportional zur gebildeten DNA-Menge. Ein Fluoreszenzsignal kann nur dann detektiert werden, wenn eine zu Sonde und patientenspezifischem Oligonukleotid komplementäre Sequenz vorhanden ist, das bedeutet, dass jegliche unspezifische Amplifizierung nicht detektiert wird.

3.6.2 Der TaqMan Universal PCR Master Mix

Der TaqMan Universal PCR Master Mix ist optimiert für TaqMan Reaktionen und enthält AmpliTaq Gold DNA Polymerase, AmpErase UNG, dNTPs mit dUTP, passive Referenz (ROX) und optimierte Pufferkomponenten. AmpErase[®] uracil-N-glycosylase (UNG) kann die Reamplifizierung von carryover-PCR-Produkten verhindern, indem das in Doppelstrang-DNA eingebaute Uracil entfernt wird.

3.6.3 Passive und aktive Referenz

Die passive Referenz ist ein Farbstoff, der nicht am 5' Nuklease Assay teilnimmt und somit eine interne Referenz, mit der das Reportersignal während der Datenanalyse normalisiert werden kann. Nicht-PCR bedingte Schwankungen des Fluoreszenzsignals aufgrund Veränderungen des Volumens oder der Konzentration können so normalisiert werden.

Zu diesem Zweck wird die Emissionsintensität des Reporterfarbstoffes durch diejenige der passiven Referenz dividiert um einen Quotienten zu erhalten, der als R_n (normalisierter Reporter) definiert ist. R_{n+} ist der R_n -Wert einer Reaktion, die alle Komponenten einschließlich Template enthält. R_{n-} ist der R_n -Wert aus frühen Zyklen

der Reaktion oder aus Proben ohne Template. Delta Rn ist die Differenz zwischen Rn+ und Rn- und gibt verlässlich die Größe des Signals aus den gegebenen PCR-Bedingungen wieder.

Sowohl die Menge an DNA, die zu jedem Reaktionsgefäß zugefügt wird, als auch ihre Qualität sind keine verlässlichen Parameter um die Ausgangsmenge an Template zu bestimmen. Daher werden die Transkripte eines sog. Housekeeping-Gens, hier Albumin, mit Hilfe eines Sets aus Albumin-Primern und einer Albumin-Sonde als endogene aktive Referenz quantifiziert.

Die aktive Referenz ist also ein Signal, das als Ergebnis der PCR entsteht. Durch den Einsatz einer endogenen Kontrolle als aktive Referenz kann die Menge an GesamtdNA (basierend auf photometrischer Bestimmung), die pro Reaktionswell eingesetzt wurde, normalisiert werden. Für jede Probe wird sowohl der Wert des Targetgens als auch der Wert des Housekeeping-Gens aus der jeweiligen Standardkurve extrapoliert, der Targetwert wird dann durch den Wert des Housekeeping-Gens dividiert um einen Wert zu erhalten, der von der Ausgangsmenge an eingesetzter DNA unabhängig ist.

3.6.4 Die „real-time“ Detektion

Das Fluoreszenzsignal wird während der PCR kontinuierlich von einem Sequenzdetektor (TaqMan ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, Perkin Elmer, Foster City, CA) detektiert und diese Daten werden in kurzen Zeitabständen von einem Computer mit spezieller Software analysiert. Die PCR-Cycle Nummer, bei der die Fluoreszenz einen Grenzwert von 10mal der Standardabweichung der Baseline-Emission erreicht, dient der Quantifizierung der DNA. Diese Cycle Nummer wird „Cycle threshold“ (Ct) genannt und ist umgekehrt proportional zur Ausgangsmenge der Ziel DNA.

3.6.5 Standardkurve

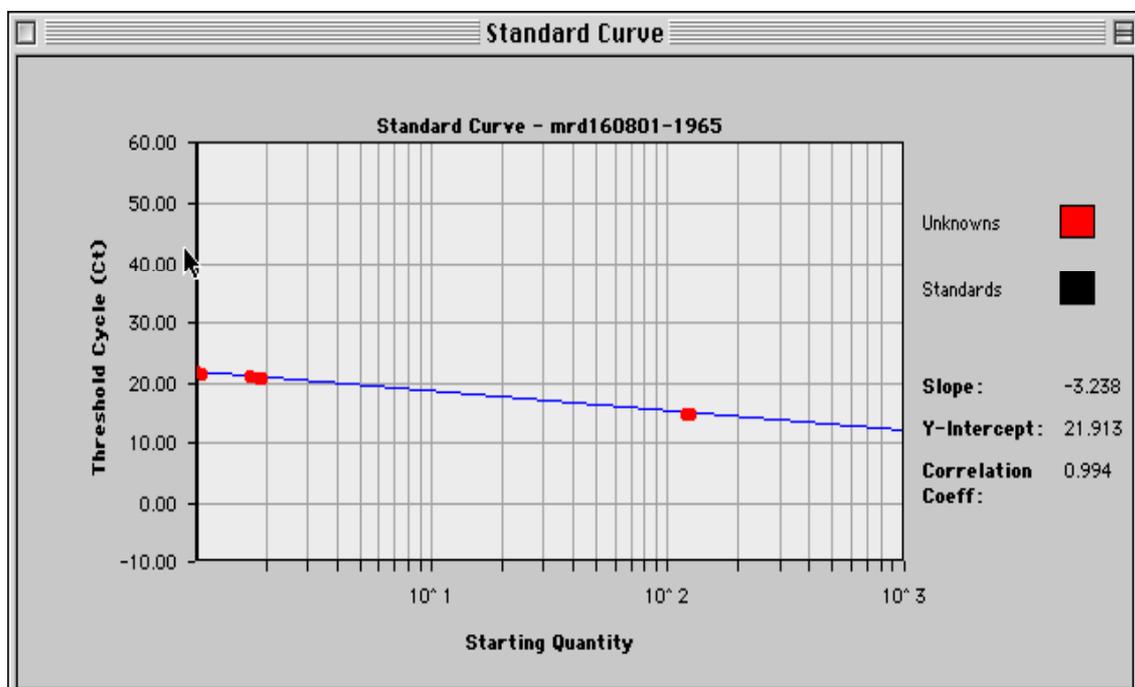
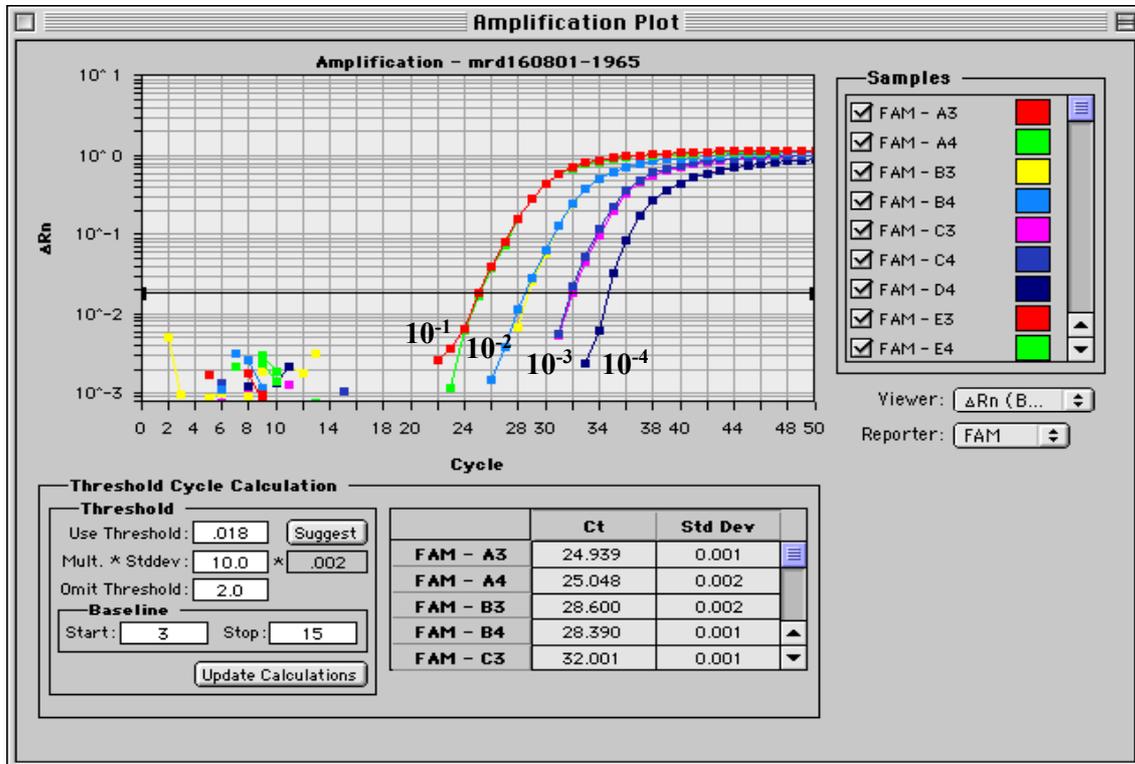


Abbildung 13: Standardkurve

Um eine genspezifische Standardkurve zu erstellen wird mit einer Verdünnungsreihe einer Probe mit bekannter Template-DNA-Konzentration eine real-time-PCR durchgeführt. Optimale Standardkurven entstehen aus einer PCR mit 90-100% Effizienz, wobei 100% Effizienz eine Verdopplung des Templates nach jedem PCR Zyklus bedeuten. Werden die bekannten Konzentrationen der eingesetzten Proben der Verdünnungsreihe in logarithmischer Form gegen die korrespondierenden Ct-Werte aufgetragen ergibt sich eine Gerade, die die lineare Korrelation zwischen diesen beiden Parametern darstellt. Die Steigung dieser Geraden (Slope) beträgt im Idealfall $-3,322$, der Korrelationskoeffizient (R^2) sollte $> 0,98$ sein.

Eine lineare Regressionsanalyse der Standardkurve dient nun zur Berechnung der DNA-Menge von Proben mit unbekannter Templatemenge.

Abbildung 13 zeigt ein Beispiel einer solchen Standardkurve mit Amplifikationsplot und Regressionsgerade.

3.6.6 Durchführung der real-time PCR

Die real-time PCR wurde mit einem 20 μ l Reaktionsansatz durchgeführt, der TaqMan-Mastermix (Perkin Elmer), patientenspezifische F-Primer, TaqMan-Sonde und R-Primer mit optimierten Konzentrationen enthielt. Zu beachten war, dass das Vorbereiten der Proben, das Pipettieren eines PCR-Ansatzes, die PCR Amplifikation und die Analyse der PCR-Produkte räumlich getrennt voneinander durchzuführen sind.

3.6.6.1 Template-DNA

Die Diagnoseprobe, die DNA mit der Zielsequenz enthält und alle zu messenden Follow-up Proben des Patienten wurden zunächst auf eine Konzentration von 100 ng/ μ l eingestellt. Pro Reaktionswell wurden 4 μ l Template-DNA eingesetzt, ein Well enthielt demnach 400 ng DNA. Eine Verdünnungsreihe in 10er Schritten von 10^{-1} bis 10^{-5} wurde hergestellt. Dazu wurde zunächst in 5 durchnummerierte Reaktionsgefäße jeweils 22,5 μ l neutrale Spenderprobe (100 ng/ μ l) vorgelegt. In das erste Reaktionsgefäß pipettierte man dann 2,5 μ l der Diagnoseprobe, dies entspricht einer 1:10 Verdünnung (10^{-1}). Nach Durchmischen der Probe entnahm man wiederum einen Teil (2,5 μ l) des ersten

Verdünnungsschritt und pipettierte ihn ins zweite Reaktionsgefäß, was einer 1:100 Verdünnung entspricht (10^{-2}). Die nächsten drei Verdünnungsschritte wurden auf gleiche Weise hergestellt.

Außerdem als Template eingesetzt wurden voreingestellte neutrale Spenderproben mit Konzentrationen von 150 ng/ μ l, 30 ng/ μ l und 3 ng/ μ l, die zur Generierung der Standardkurve der endogenen aktiven Referenz Albumin dienten.

3.6.6.2 Herstellung des Primer-Mixes

Pro Well werden 6 μ l Primer-Mix eingesetzt, der sich wie folgt zusammensetzt:

Tabelle 7: Pipettierschema für Primer-Mix pro Well

F-Primer 900 nm:	0,17 μ l (100 pmol/ μ l)
R-Primer 900 nm:	0,17 μ l (100 pmol/ μ l)
TaqSonde 100 nm:	0,38 μ l (5 pmol/ μ l)
Wasser:	5,3 μ l

3.6.6.3 Durchführen eines Sensitivitätsassays

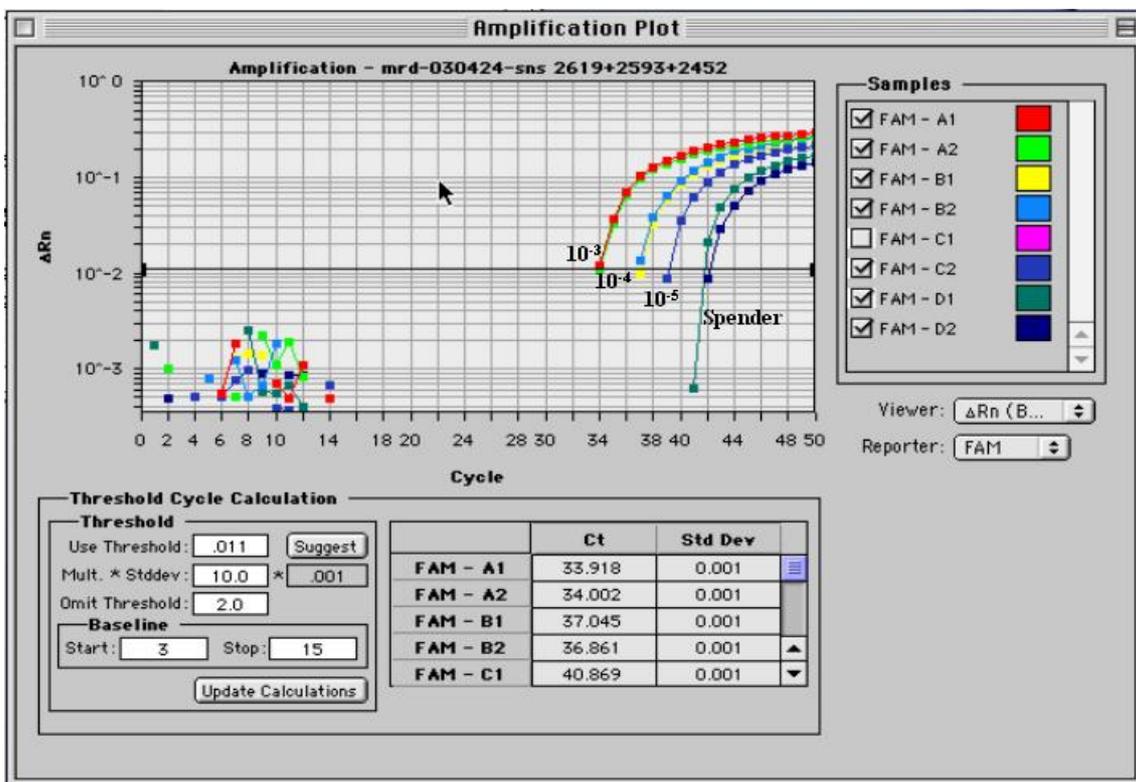
Bevor ein patientenspezifisches Oligonukleotid (Allelspezifisches Oligonukleotid, ASO) bei einem TaqMan-Ansatz eingesetzt wurde, mußte zunächst dessen Sensitivität auf das patientenspezifische Target getestet werden. Der ASO-Primer sollte eine Sensitivität von min 10^{-3} , besser 10^{-4} oder 10^{-5} aufweisen. Dazu wurde wie oben beschrieben eine Verdünnungsreihe mit der betreffenden Diagnoseprobe und entsprechende Primer-Mix Ansätze mit dem patientenspezifischen F-Primer, dem dazugehörigen R-Primer und der TaqMan-Sonde hergestellt. Von den Verdünnungsschritten 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5} und der Spender-DNA wurden jeweils Doppelbestimmungen angefertigt. Dann wurde ein Reaktionsansatz mit dem ASO, der entsprechenden TaqMan-Sonde und dem entsprechenden R-Primer nach folgender Rezeptur pipettiert und im ABI PRISM 7700 Sequence Detector analysiert.

Tabelle 8: Rezeptur per Well: Sensitivitätsassay

TaqMix (Applied Biosyst)	10,0 µl
Template-DNA (400 ng)	4,0 µl
Primer-Mix	6,0 µl

Reaktionsbedingungen

- Holds: 2 min 50°C
10 min 95°C
- Zyklen 50x: 15 sek 95°C
60 sek 60°C

**Abbildung 14:** Sensitivitätsassay

Die Auswertung erfolgt mit der Software ABI PRISM 310 Sequence Detector v 1.7. Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, sollten zwischen den einzelnen log-Stufen idealerweise 2 Ct-Werte liegen.

3.6.6.4 Durchführung eines TaqMan-Assays

Wenn ein patienten- bzw. allelspezifisches Oligonukleotid (ASO) gefunden wurde, das über ausreichende Sensitivität verfügte, konnte anhand diesem die Ausgangsmenge an Template einer Knochenmarkvorprobe quantifiziert werden.

Abbildung 15 zeigt ein Beispiel einer 96-Well-Platte mit einem TaqMan-Ansatz bei dem DNA aus einer Knochenmarkvorprobe mit zwei ASOs gemessen wurde:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-1	-1	-1	-1	Vor-	Pro	be	Vor-	Pro	be	Vor-	Probe
B	-2	-2	-2	-2								
C	-3	-3	-3	-3								
D	-4	-4	-4	-4								
E	-5	-5	-5	-5								
F	Spender	Spender	Spender	Spender								
G	NTC	NTC	NTC	NTC								
H	150	30	3									

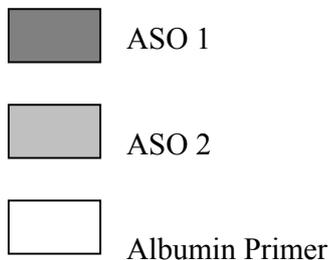


Abbildung 15: Versuchsanordnung eines TaqMan-Assays

Zunächst wurden pro Well 10 μ l TagMan Universal Mix vorgelegt. Dazu wurden pro Well 4 μ l Template-DNA, die gemäß der photometrischen Konzentrationsbestimmung 400 ng DNA enthielt, pipettiert. Dazu wurden pro Well 6 μ l des jeweiligen Primermixes pipettiert, wobei darauf zu achten war, dass die DNA nicht von einem Well zum nächsten verschleppt wurde.

Die Standardreihen wurden in Doppelbestimmungen gemessen, die Patientenvorproben in Dreifachbestimmungen. Vier Wells enthielten kein Template (NTC = no template control)

Die 96-Well Platte wurde mit einem Deckel fest verschlossen und im ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems) unter folgenden Reaktionsbedingungen analysiert:

- Holds: 2 min 50°C
10 min 95°C
- Zyklen 50x: 15 sek 95°C
60 sek 60°C

Die Auswertung erfolgte wiederum mit der Software ABI PRISM Sequence Detector v 1.7, die Anhand einer linearer Regressionsanalyse der Standardkurve für jeden Ct-Wert die entsprechende Ausgangsmenge an Template der einzelnen Proben errechnete:

Experiment Report							
PE Applied Biosystems				Sequence Detection Systems 1.7			
File Name : mrd160801-1965				Plate Type : 7700 Single Reporter			
User :				PCR Volume : 24			
Date : Die, 30. Mär 2004				Comments :			
Thermal Cycle Conditions							
Cycle	Temperature	Time	Repeat	Ramp Time	Auto Increment		
Hold	50.00	2:00		Auto			
Hold	95.00	10:00		Auto			
Cycle	95.00	0:15	50	Auto			
	60.00	1:00		Auto			
Standard Curve							
Slope : -3.24				Threshold : 0.02			
Intercept : 21.91				Baseline Range : (3 , 15)			
Fit R : 0.99							
Sample Information							
Well	Type	Sample Name	Replicate	Ct	Quantity	Std. Dev.	Mean
C1	STND	P1 /2		36.54		0.00	0.00
C2	STND	P1 /2		36.57		0.00	0.00
C3	STND	P20		32.00	1.0e-03	0.00	0.00
C4	STND	P20		31.77	1.0e-03	0.00	0.00
C5	UNKN	13124 P1 /2		37.96	1.1e-05	0.00	0.00
C6	UNKN	13124 P1 /2		37.11	2.0e-05	0.00	0.00
C7	UNKN	13124 P1 /2		37.09	2.1e-05	0.00	0.00
C8	UNKN	13124 P20		35.32	7.2e-05	0.00	0.00
C9	UNKN	13124 P20		35.36	7.0e-05	0.00	0.00
C10	UNKN	13124 P20		34.51	1.3e-04	0.00	0.00
C11	UNKN	13124 alb		21.01	1.9e+00	0.00	1.90
C12	UNKN	13124 alb		21.04	1.9e+00	0.00	1.86
D1	STND	P1 /2		38.15		0.00	0.00
D2	STND	P1 /2		39.92		0.00	0.00
D4	STND	P20		34.45	1.0e-04	0.00	0.00
D5	UNKN	14477 P1 /2		50.00		0.00	0.00
D6	UNKN	14477 P1 /2		37.51	1.5e-05	0.00	0.00
D7	UNKN	14477 P1 /2		39.57	3.5e-06	0.00	0.00
D8	UNKN	14477 P20		34.41	1.4e-04	0.00	0.00
D9	UNKN	14477 P20		35.36	7.0e-05	0.00	0.00
D10	UNKN	14477 P20		34.61	1.2e-04	0.00	0.00

Abbildung 16: Experiment Report

3.7 Anwendung der Methode im Sinne der Fragestellung

Die MRD-Bestimmung beginnt mit dem Screening der Diagnoseprobe des Patienten auf TZR- und IgH-Rearrangements und dem anschließenden Generieren patienten- bzw. allelspezifischer Oligonukleotide (ASOs). Um falsch-negative MRD-Befunde aufgrund möglicher klonaler Evolution zwischen Diagnose- und Rezidivzeitpunkt zu vermeiden, wurden pro Patient jeweils zwei Targets untersucht.

Zu einem Zeitpunkt vor Transplantation wird dem ALL-Patienten Knochenmark entnommen, in welchem dann die Höhe der MRD-Last bestimmt wurde.

Untersucht werden sollte, ob die Höhe der MRD-Last vor Transplantation Bedeutung für das Outcome des Patienten hat und ob und wie der Remissionsstatus vor SZT und die Dauer der ersten Remission die Prognose beeinflussen.

3.8 Statistische Methode

Zur Erörterung der Fragestellung dieser Arbeit wurde neben rein beschreibender Statistik die Kaplan-Meier-Methode (Log-Rank-Test), der Fishers-t-Test und das Cox-Regressionsmodell (Proportional hazards fit) zur univariaten und multivariaten Analyse eingesetzt.

4 Patientenkollektiv

In dieser Studie wurde die MRD-Last vor allo-SZT bei insgesamt 108 ALL-Patienten bestimmt, bei denen zwischen Dezember 1996 und Oktober 2003 in einem der folgenden Zentren eine SZT vorgenommen wurde:

- Universitätskinderklinik Tübingen
- Universitätskinderklinik Freiburg
- Universitätsklinik für Kinder und Jugendliche Erlangen
- Universitätsklinik Essen
- Medizinische Hochschule Hannover-Kinderklinik
- Universitätskinderklinik Ulm
- Kinderklinik der TU München
- Kinderklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Dr. von Haunersches Kinderspital München
- Universitätskinderklinik Halle
- Universität Frankfurt am Main-Kinderklinik
- Kinderklinik Düsseldorf
- Kinderklinik Münster
- Universität Leipzig-Kinderklinik
- Zentrum für Kinderheilkunde Gießen

Von den 108 untersuchten Patienten haben 22 einen prä-B-Phänotyp, 68 eine c-ALL, 17 eine T-ALL und ein Patient einen bi-Phänotyp. Das mediane Alter bei Transplantation war 9,82 Jahre innerhalb einem Bereich von 0,76 bis 22,58 Jahren.

In erster kompletter Remission wurden 35 Patienten transplantiert, 53 in zweiter kompletter Remission und 20 in dritter kompletter Remission.

Insgesamt 55 Patienten erhielten Stammzellen eines Familienspenders, 39 davon waren HLA-identisch, 16 hatten ein HLA-Mismatch.

52 Patienten erhielten Stammzellen eines nichtverwandten Spenders, darunter 42 HLA-identische und 10 mit einem HLA-Mismatch.

Die Stammzellen stammten in 50 Fällen aus dem Knochenmark, in 55 Fällen aus dem Peripherblut und wurden in drei Fällen aus Nabelschnurblut gewonnen.

33 Patienten erhielten ein T-Zell depletiertes, 74 ein nicht T-Zell depletiertes Transplantat.

Die Konditionierung basierte in 103 Fällen auf einer TBI, in 5 Fällen auf der Gabe von Busulfan.

Um die einzelnen Patienten näher zu charakterisieren folgt nun eine Tabelle mit relevanten Daten zur allogenen SZT aller untersuchten Patienten geordnet nach Remissionsstatus vor allo-SZT, MRD-Befund und Outcome. Diese Daten sind Grundlage unserer Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit.

Tabelle 9: Patientendaten zur allo-SZT bei in CR1 transplantierten Patienten mit negativem MRD-Befund im Knochenmark; Phän = Phänotyp, w =weiblich, m = männlich, MFD = matched family donor, MMFD = mismatched family donor, MUD = matched unrelated donor, MMUD = mismatched unrelated donor, TBI = Radiatio, Eto = Etoposid, Flu = Fludarabin, Thio = Thiotepa, ATG = Antithymozytenglobulin, Cyc = Cyclophosphamid, Tdepl = T-Zell-Depletion, IT = Immuntherapie, CSAab = vorzeitiges Absetzen von Cyclosporin A, DLI = Donor Lymphozyten Infusion, aGvH = akute Graft-versus-Host-Reaktion, GvHchron = chronische Graft-versus-Host-Reaktion, CR = komplette Remission, rlps = Rezidiv.

Nr.	Untergruppe	Sex	Alter	Donor	CR	Konditionierung	S-Gruppe	Tdepl	IT	aGvH grad	GvH chron	MRD-vor	Outcome	Follow-up (Tage)
1	T-Phänotyp	w	11,2	MFD	1	TBI+Eto	-	nein	nein	2	nein	0,00E+00	CR	1463
2	prä-T Phän.	m	5,4	MFD	1	TBI+Eto	-	nein	nein	1	nein	0,00E+00	CR	1116
3	T-Phänotyp	m	18,3	MMFD	1	Thio+Eto+Flu+ATG	-	nein	nein	1	nein	0,00E+00	CR	640
4	pre-B-Phän.	w	4,7	MFD	1	TBI+Eto	-	ja	nein	-	nein	0,00E+00	CR	700
5	common	w	7,3	MFD	1	TBI+Eto	-	nein	nein	2	nein	0,00E+00	CR	474
6	common	m	14,4	MUD	1	TBI+Eto+ATG	-	nein	nein	2	nein	0,00E+00	CR	305
7	T-Phänotyp	m	7,0	MFD	1	TBI+Eto	-	nein	nein	2	nein	0,00E+00	CR	772
8	T-Phänotyp	m	5,8	MUD	1	TBI+Eto+Cyc+ATG	-	nein	DLI	1	nein	0,00E+00	CR	983
9	bi-phänotyp	w	11,5	MFD	1	TBI+Eto	-	nein	CSAab	-	nein	0,00E+00	CR	39
10	common	w	8,9	MUD	1	TBI+Eto+ATG	-	ja	CSAab	1	unbekannt	0,00E+00	CR	159
11	T-Phänotyp	m	8,9	MUD	1	TBI+Thio+Eto+ATG	-	nein	nein	1	nein	0,00E+00	CR	825
12	common	m	8,2	MFD	1	TBI+Eto	-	nein	CSAab	1	nein	0,00E+00	rlps	421

Tabelle 10: Patientendaten zur allo-SZT bei in CR1 transplantierten Patienten mit negativem MRD-Befund im Peripherblut; Phän = Phänotyp, w = weiblich, m = männlich, MFD = matched family donor, MMFD = mismatched family donor, MUD = matched unrelated donor, MMUD = mismatched unrelated donor, TBI = Radiatio, Eto = Etoposid, Thio = Thiotepa, ATG = Antithymozytenglobulin, Cyc = Cyclophosphamid, OKT 3 = Anti-CD3-Antikörper, Pred = Prednisolon, Tdepl = T-Zell-Depletion, IT = Immuntherapie, aGvH = akute Graft-versus-Host-Reaktion, GvHchron = chronische Graft- versus-Host-Reaktion, CR = komplette Remission, rlps = Rezidiv, TRM = transplantationsassoziierte Mortalität.

Nr.	Untergruppe	Sex	Alter	Donor	CR	Konditionierung	S-Gruppe	Tdepl	IT	aGvH grad	GvH chron	MRD-vor	Outcome	Follow-up (Tage)
13	Common	m	3,6	MUD	1	TBI+Eto+ATG	-	nein	nein	2	nein	0,00E+00	CR	754
14	Common	m	7,2	MUD	1	TBI+Eto+ATG	-	nein	nein	-	nein	0,00E+00	CR	724
15	Common	w	13,5	MMUD	1	Eto+ ATG	-	nein	nein	-	nein	0,00E+00	CR	348
16	Common	w	15,5	MUD	1	TBI+Eto+ATG	-	nein	nein	-	unbekannt	0,00E+00	CR	154
17	Common	m	6,1	MFD	1	TBI+Eto	-	nein	nein	2	nein	0,00E+00	CR	1079
18	pre-B-Phän	m	7,6	MMUD	1	TBI+Eto+Cyc+OKT3	-	nein	nein	-	nein	0,00E+00	Rlps	135
19	Common	m	11,6	MUD	1	TBI+Eto+Cyc+Pred+OKT3	-	ja	nein	-	nein	0,00E+00	Rlps	523
20	Common	m	14,9	MMFD	1	TBI+Thio+Eto+ATG	-	nein	nein	-	nein	0,00E+00	TRM	165

Tabelle 11: Patientendaten zur allo-SZT bei in CR1 transplantierten Patienten mit low-level MRD-Befund ($MRD < 10^{-3}$) im Knochenmark; Phän = Phänotyp, w = weiblich, m = männlich, MFD = matched family donor, MMFD = mismatched family donor, MUD = matched unrelated donor, MMUD = mismatched unrelated donor, TBI = Radiatio, Eto = Etoposid, Thio = Thiotepa, ATG = Antithymozytenglobulin, Tdepl = T-Zell-Depletion, IT = Immuntherapie, aGvH = akute Graft-versus-Host-Reaktion, GvHchron = chronische Graft-versus-Host-Reaktion, CR = komplette Remission, rlps = Rezidiv.

Nr.	Untergruppe	Sex	Alter	Donor	CR	Konditionierung	S-Gruppe	Tdepl	IT	aGvH grad	GvH chron	MRD-vor	Outcome	Follow-up (Tage)
21	common	2	8,8	MUD	1	TBI+Eto+ATG	-	nein	nein	-	nein	1,00E-06	Rlps	251
22	T-Phän	1	16,9	MMFD	1	TBI+Thio+Eto+ATG	-	ja	nein	1	nein	1,00E-06	CR	1238
23	prä-T Phän	2	11,0	MUD	1	TBI+Eto	-	nein	nein	1	nein	1,56E-04	CR	973
24	pre-B-Phänp	w	7,2	MFD	1	TBI+Eto	-	nein	nein	4	nein	<1E-03	CR	834
25	T-Phänotyp	2	8,3	MFD	1	TBI+Eto	-	nein	nein	2	nein	3,00E-04	CR	870

Tabelle 12: Patientendaten zur allo-SZT bei in CR1 transplantierten Patienten mit high-level MRD-Befund ($MRD \geq 10^{-3}$) im Knochenmark; Phän = Phänotyp, w = weiblich, m = männlich, MFD = matched family donor, MMFD = mismatched family donor, MUD = matched unrelated donor, MMUD = mismatched unrelated donor, TBI = Radiatio, Eto = Etoposid, Thio = Thiotepa, ATG = Antithymozytenglobulin, OKT3 = Anti-CD3-Antikörper, Cyc = Cyclophosphamid, DLI = Donorlymphozyteninfusion, Tdepl = T-Zell-Depletion, IT = Immuntherapie, aGvH = akute Graft-versus-Host-Reaktion, GvHchron = chronische Graft-versus-Host-Reaktion, CR = komplette Remission, rlps = Rezidiv, TRM = transplantationsassoziierte Mortalität

Nr.	Untergruppe	Sex	Alter	Donor	CR	Konditionierung	S-Gruppe	Tdepl	IT	aGvH grad	GvH chron	MRD-vor	Outcome	Follow-up (Tage)
26	T-Phänotyp	m	5,8	MUD	1	TBI+Thio+Eto+ATG	-	ja	DLI	-	nein	2,05E-03	CR	1280
27	common	m	11,9	MMUD	1	Eto+Thio+ATG	-	ja	DLI	-	nein	1,50E-03	Rlps	65
28	T-Phänotyp	m	5,4	MMUD	1	TBI + Eto	-	nein	nein	3	nein	1,50E-03	Rlps	TBI+Eto
29	common	w	5,8	MUD	1	TBI+Eto+ATG	-	nein	nein	-	nein	2,46E-03	Rlps	106
30	pre-B-Phän	w	6,6	MFD	1	TBI+Eto	-	nein	nein	--	0	3,54E-03	Rlps	142
31	pre-B-Phän	w	9,8	MFD	1	TBI+Eto	-	nein	unbek	-	nein	6,60E-03	Rlps	122
23	T-Phänotyp	m	9,0	MMFD	1	TBI+Flu+ATG+Eto	-	ja	nein	-	nein	8,36E-03	Rlps	419
33	common	m	16,6	MUD	1	TBI+Cyc+Eto	-	nein	nein	-	ja	1,00E-03	TRM	352
34	common	m	16,2	MMFD	1	TBI+Eto+Cyc+OKT3	-	nein	nein	2	nein	2,67E-03	TRM	39
35	common	m	7,1	MMUD	1	TBI+Thio+Eto+ATG	-	nein	nein	1	nein	7,00E-02	TRM	72

Tabelle 13: Patientendaten zur allo-SZT bei in > CR1 transplantierten Patienten mit negativem MRD-Befund im Knochenmark; Phän = Phänotyp, w = weiblich, m = männlich, MFD = matched family donor, MMFD = mismatched family donor, MUD = matched unrelated donor, MMUD = mismatched unrelated donor, TBI = Radiatio, Bus = Busulfan, Eto = Etoposid, Flu = Fludarabin, Thio = Thiotepa, ATG = Antithymozytenglobulin, OKT3 = Anti-CD3-Antikörper, Cyc = Cyclophosphamid, CSAab = vorzeitiges Absetzen von Cyclosporin A, DLI = Donorlymphozyteninfusion, Tdepl = T-Zell-Depletion, IT = Immuntherapie, aGvH = akute Graft-versus-Host-Reaktion, GvHchron = chronische Graft-versus-Host-Reaktion, CR = komplette Remission, rlps = Rezidiv, TRM = transplantationsassoziierte Mortalität

Nr.	Untergruppe	Sex	Alter	Donor	CR	Konditionierung	S-Gruppe	Tdepl	IT	aGvH grad	GvH chron	MRD-vor	Outcome	Follow-up (Tage)
36	common	w	4,0	MUD	2	TBI+Thio+Eto+ATG	3	nein	nein	2	nein	0,00E+00	CR	1120
37	common	m	1,9	MUD	2	TBI+Eto	4	nein	nein	2	nein	0,00E+00	CR	588
38	T-Phänotyp	m	8,3	MUD	2	TBI+Eto+ATG	4	nein	nein	-	nein	0,00E+00	CR	125
39	common	m	9,7	MFD	2	TBI+Eto	2	nein	nein	2	ja	0,00E+00	CR	1112
40	pre-B-Phän	w	5,7	MFD	2	TBI+Eto	4	nein	nein	2	nein	0,00E+00	CR	378
41	common	w	7,0	MUD	2	TBI+Eto+ATG	3	nein	nein	-	nein	0,00E+00	CR	468
42	common	w	9,8	MMUD	2	TBI+Thio+Eto+ATG	3	ja	CSAab	1	nein	0,00E+00	CR	1469
43	common	w	19,0	MFD	2	TBI+Eto+ATG	2	ja	DLI	1	nein	0,00E+00	CR	944
44	common	m	12,3	MFD	2	TBI+Eto	2	nein	CSAab	-	unbekannt	0,00E+00	CR	275
45	common	m	8,2	auto	2	TBI+Eto	2	nein	unbek	-	nein	0,00E+00	CR	365
46	common	w	9,7	MFD	2	TBI+Eto	2	nein	unbek	-	nein	0,00E+00	CR	51
47	common	m	14,7	MFD	2	TBI+Eto	2	nein	nein	3	nein	0,00E+00	CR	1078
48	common	m	9,2	MUD	2	TBI+Eto	3	nein	nein	2	nein	0,00E+00	CR	113
49	common	m	7,2	MFD	2	TBI+Eto+Flu+OKT3	2	nein	nein	-	nein	0,00E+00	CR	948
50	T-Phänotyp	m	17,6	MUD	2	TBI+Eto+ATG	4	nein	nein	2	nein	0,00E+00	CR	658
51	common	m	13,8	MFD	3	TBI+Eto	2	nein	nein	1	nein	0,00E+00	CR	379
52	pre-B-Phän	w	1,5	MUD	2	Bus+Cyc+Eto+ATG	4	ja	DLI	-	nein	0,00E+00	Rlps	133
53	pre-B-Phän	w	20,5	MFD	2	TBI+Eto	2	nein	nein	4	nein	0,00E+00	TRM	94
54	common	m	14,3	MFD	2	TBI+Eto	4	nein	nein	1	ja	0,00E+00	TRM	245
55	common	m	12,0	MUD	2	TBI+Eto+ATG	2	nein	DLI	-	nein	0,00E+00	TRM	96
56	common	m	12,3	MFD	3	Bu+Cyc+Eto	2	nein	nein	-	nein	0,00E+00	TRM	30

Tabelle 14: Patientendaten zur allo-SZT bei in > CR1 transplantierten Patienten mit negativem MRD-Befund im Knochenmark und low-level MRD (MRD < 10⁻⁴) im Peripherblut; Phän = Phänotyp, w = weiblich, m = männlich, MFD = matched family donor, MMFD = mismatched family donor, MUD = matched unrelated donor, MMUD = mismatched unrelated donor, TBI = Radiatio, Eto = Etoposid, Flu = Fludarabin, Thio = Thiotepa, ATG = Antithymozytenglobulin, Cyc = Cyclophosphamid, CSAab = vorzeitiges Absetzen von Cyclosporin A, Tdepl = T-Zell-Depletion, IT = Immuntherapie, aGvH = akute Graft-versus-Host-Reaktion, GvHchron = chronische Graft-versus-Host-Reaktion, CR = komplette Remission, rlps = Rezidiv, TRM = transplantationsassoziierte Mortalität

Nr.	Untergruppe	Sex	Alter	Donor	CR	Konditionierung	S-Gruppe	Tdepl	IT	aGvH grad	GvH chron	MRD-vor	Outcome	Follow-up (Tage)
57	common	m	4,3	MMFD	2	TBI+Eto+ATG	3	ja	nein	-	unbekannt	0,00E+00	Abstoßung	49
58	common	w	13,6	MFD	2	TBI+Thio+Eto+ATG	3	ja	nein	1	nein	0,00E+00	CR	1216
59	pre-B-Phän	m	6,0	MFD	2	TBI+Eto	2	nein	nein	3	ja	0,00E+00	CR	1121
60	common	m	4,7	MUD	2	TBI+Eto+ATG	2	nein	CSAab	2	nein	0,00E+00	CR	62
61	common	m	11,6	MMFD	3	TBI+Thio+Eto+ATG	4	ja	nein	-	unbekannt	0,00E+00	CR	765
62	common	w	14,5	MUD	3	TBI+Flu	2	ja	nein	3	ja	0,00E+00	CR	1113
63	common	m	10,0	MUD	2	TBI+Eto+Cyc+ATG	2	nein	nein	1	nein	0,00E+00	Rlps	190
64	pre-B-Phän	m	15,2	MUD	2	TBI+Eto+ATG	3	nein	nein	2	nein	0,00E+00	Rlps	95
65	pre-B-Phän	w	5,7	MFD	2	TBI+Eto	3	nein	nein	3	ja	3,40E-05	Rlps	275
66	pre-B-Phän	m	12,4	MUD	2	TBI+Eto+ATG	3	nein	nein	1	nein	6,18E-05	Rlps	214
67	pre-B-Phän	m	4,5	MUD	2	TBI+Eto+ATG	3	ja	nein	-	nein	<1E-04	Rlps	386
68	common	w	4,2	MUD	2	TBI+Eto+ATG	3	nein	nein	-	nein	0,00E+00	TRM	83
69	common	m	5,1	MUD	2	TBI+Eto+ATG	2	ja	nein	4	nein	0,00E+00	TRM	102
70	common	w	9,7	MFD	3	TBI+Eto+Cyc	4	nein	nein	4	unbekannt	0,00E+00	TRM	134
71	pre-B-Phän	m	12,7	MMUD	3	TBI+Eto+Flu+ATG	4	nein	nein	1	nein	1,05E-05	TRM	46

Tabelle 15: Patientendaten zur allo-SZT bei in > CR1 transplantierten Patienten mit low-level MRD-Befund ($MRD < 10^{-3}$) im Knochenmark; Phän = Phänotyp, w = weiblich, m = männlich, MFD = matched family donor, MMFD = mismatched family donor, MUD = matched unrelated donor, MMUD = mismatched unrelated donor, TBI = Radiatio, Bus = Busulfan, Eto = Etoposid, Flu = Fludarabin, Thio = Thiotepe, ATG = Antithymozytenglobulin, OKT3 = Anti-CD3-Antikörper, Cyc = Cyclophosphamid, DLI = Donorlymphozyteninfusion, CSAab = vorzeitiges Absetzen von Cyclosporin A, Tdepl = T-Zell-Depletion, IT = Immuntherapie, aGvH = akute Graft-versus-Host-Reaktion, GvHchron = chronische Graft-versus-Host-Reaktion, CR = komplette Remission, rIps = Rezidiv, TRM = transplantationsassoziierte Mortalität

Nr.	Untergruppe	Sex	Alter	Donor	CR	Konditionierung	S-Gruppe	Tdepl	IT	aGvH grad	GvH chron	MRD-vor	Outcome	Follow-up (Tage)
72	pre-B-Phän	M	21,4	MMFD	2	TBI+Eto+ALG	3	ja	unbek	-	nein	1,00E-06	Abstoßung	22
73	pre-B-Phän	M	22,6	MUD	3	TBI+Thio+Eto+ATG	2	ja	DLI	1	nein	1,00E-06	CR	637
74	pre-B-Phän	W	6,5	MFD	2	TBI+Eto	2	nein	nein	-	nein	5,00E-06	CR	1066
75	common	W	4,3	MUD	2	TBI+Eto+ALG	3	nein	unbek	-	0	1,00E-05	CR	75
76	common	M	9,3	MUD	3	TBI+Eto+ATG	2	nein	nein	3	ja	1,00E-04	CR	729
77	common	M	20,9	MMUD	2	TBI+Eto+ATG	2	nein	DLI	-	nein	1,15E-04	CR	225
78	common	M	10,3	MUD	2	TBI+Eto+ATG	2	ja	nein	-	nein	3,40E-04	CR	105
79	common	M	22,2	MUD	3	TBI+Thio+Eto+ATG	2	ja	nein	-	nein	1,00E-04	Rlps	617
80	T-Phäno	M	15,1	MFD	2	TBI+Eto	4	nein	nein	2	0	1,40E-04	Rlps	182
81	common	W	9,9	MMFD	3	Bus+Cyc+Flu+OKT3	4	ja	DLI	3	nein	1,52E-04	Rlps	133
82	common	M	10,6	MFD	3	TBI+Flu	2	ja	nein	1	nein	4,93E-04	Rlps	209
83	common	M	17,3	MFD	2	TBI+Eto	2	nein	nein	1	nein	1,00E-06	TRM	26
84	common	M	4,4	MUD	2	TBI+Eto+ALG	3	nein	CSAab	3	nein	1,42E-05	TRM	159
85	common	M	17,9	MMFD	3	Bus+Cyc+Thio+OKT3	4	ja	nein	-	nein	1,60E-04	TRM	31
86	common	W	13,6	MFD	2	TBI+Eto	3	nein	nein	2	nein	4,00E-04	TRM	352

Tabelle 16: Patientendaten zur allo-SZT bei in > CR1 transplantierte Patienten mit high-level MRD-Befund (MRD $\geq 10^{-3}$) im Knochenmark; Phän = Phänotyp, w = weiblich, m = männlich, MFD = matched family donor, MMFD = mismatched family donor, MUD = matched unrelated donor, MMUD = mismatched unrelated donor, TBI = Radiatio, Bus = Busulfan, Eto = Etoposid, Flu = Fludarabin, Thio = Thiotepa, ATG = Antithymozytenglobulin, OKT3 = Anti-CD3-Antikörper, Cyc = Cyclophosphamid, DLI = Donorlymphozyteninfusion, Tdepl = T-Zell-Depletion, IT = Immuntherapie, aGvH = akute Graft-versus-Host-Reaktion, GvHchron = chronische Graft-versus-Host-Reaktion, CR = komplette Remission, rlps = Rezidiv, TRM = transplantationsassoziierte Mortalität

Nr.	Untergruppe	Sex	Alter	Donor	CR	Konditionierung	S-Gruppe	Tdepl	IT	aGvH grad	GvH chron	MRD-vor	Outcome	Follow-up (Tage)
87	common	m	12,4	MFD	2	TBI+Eto	2	nein	nein	-	nein	1,08E-03	CR	481
88	common	w	13,8	MFD	2	TBI+ Ltopo	2	ja	nein	1	nein	2,50E-03	CR	482
89	common	m	18,4	MUD	2	TBI+Eto+ATG	2	nein	nein	-	nein	5,30E-03	CR	64
90	common	m	4,9	MFD	2	TBI+Eto	3	nein	nein	-	nein	5,94E-03	CR	882
91	T-Phänotyp	m	3,7	MMUD	2	Eto+TBI+ATG	4	nein	nein	-	unbekannt	7,58E-03	CR	363
92	common	m	14,9	MUD	3	TBI+Eto+ATG	4	ja	nein	1	nein	2,20E-01	CR	811
93	common	m	9,8	MUD	2	TBI+Thio+Eto+ATG	2	ja	nein	-	nein	1,02E-03	Rlps	182
94	common	m	4,7	MMFD	2	TBI+Eto+Flu+OKT3	3	ja	nein	-	nein	2,01E-03	Rlps	201
95	common	m	15,1	MUD	3	TBI+Eto	2	unbek	nein	-	nein	2,11E-03	Rlps	152
96	pre-B-Phän	m	8,4	MFD	3	TBI+Eto	4	nein	nein	2	nein	3,90E-03	Rlps	492
97	common	w	0,8	MFD	2	TBI+Eto	3	nein	nein	2	nein	4,50E-03	Rlps	204
98	common	w	11,1	MMFD	2	TBI+Fludara+ATG+Eto	4	ja	DLI	-	nein	6,42E-03	Rlps	41
99	common	m	13,5	MFD	2	TBI Eto	4	nein	nein	-	unbekannt	1,41E-02	Rlps	60
100	common	m	7,5	MFD	2	Bus-Cyc	3	nein	nein	-	nein	2,89E-02	Rlps	346
101	common	m	10,5	MMFD	2	TBI Flu ATG Eto	3	ja	DLI	-	nein	3,98E-02	Rlps	117
102	common	m	15,4	MMFD	2	TBI+Eto+Flu+ATG	2	ja	nein	4	nein	9,26E-02	Rlps	319
103	common	m	11,3	MMUD	3	TBI+Cyc+Eto	4	ja	nein	1	nein	1,50E-01	Rlps	386
104	pre-B-Phän	m	6,4	MMUD	3	TBI+Eto+ATG	4	ja	nein	4	nein	3,50E-01	Rlps	100
105	pre-B-Phän	m	2,9	MUD	3	TBI+Eto+Cyc	4	nein	nein	3	nein	3,90E+01	Rlps	45
106	pre-B-Phän	w	11,6	MUD	2	TBI+Thio+Eto+ATG	2	nein	nein	4	ja	1,00E-03	TRM	235
107	T-Phänotyp	m	5,3	MUD	3	TBI+Thio+Cyc+ALG	4	nein	nein	3	nein	1,65E-02	TRM	387
108	pre-B-Phän	m	16,9	MMFD	3	TBI+Thio+Eto+ATG+	4	ja	nein	-	nein	3,70E-02	TRM	115

54 Patienten befinden sich am Ende des Untersuchungszeitraums in kompletter Remission mit einer medianen Beobachtungsdauer von 23,7 Monaten (range: 39 Tage bis 49 Monate) seit allo-SZT.

33 Patienten rezidierten nach allo-SZT mit einer medianen Zeit von 6 Monaten bis zum Rezidiv (range: 1 Monat bis 20,6 Monate). Von diesen 33 Patienten wurden 23 in \geq CR2 transplantiert, 7 davon nach einem sehr frühen, 9 nach einem frühen und weitere 7 nach einem späten Rezidiv.

19 Patienten starben an anderen therapieassoziierten Komplikationen außer Rezidiv.

Zwei Patienten haben das Transplantat abgestoßen.

5 Ergebnisse

5.1 Überblick über die Untersuchungsergebnisse aller Patienten

5.1.1 Rearrangementsequenzen und allelspezifische Oligonukleotide

Beim Screening der Patientendiagnoseproben konnten insgesamt 236 Rearrangementsequenzen identifiziert werden, davon 71 IgH-, 34 Igκ-kde-, 80 TZRγ- und 51 TZRδ-Sequenzen.

Das folgende Diagramm zeigt die Verteilung der Rearrangements auf die ALL-Subtypen:

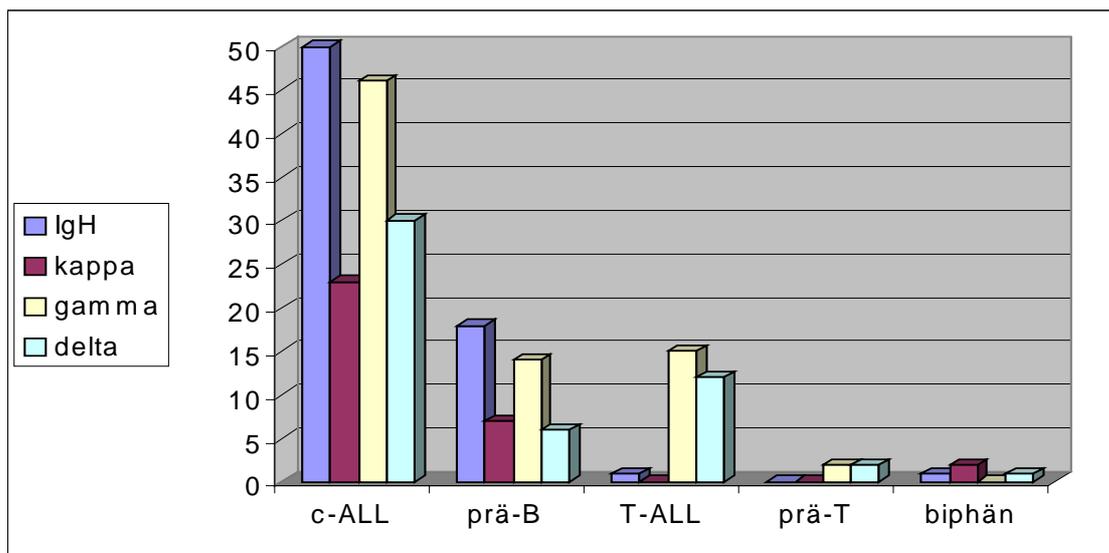


Abbildung 17: Verteilung der Rearrangements auf die ALL-Subtypen.

Mit Hilfe der gefundenen Sequenzen wurden 236 ASOs (allelspezifische Oligonukleotide) nach oben genannten Kriterien generiert. 150 von diesen 236 Primern erreichten eine Sensitivität von 10^{-4} , d.h. sie sind in der Lage, eine maligne Zelle unter 10 000 gesunden Zellen zu erkennen. Zwei ASOs waren sensitiv bis 10^{-5} , 38 bis 10^{-3} und sechs bis 10^{-2} . 40 der Primer waren unspezifisch. Für insgesamt 76 Patienten konnte so die MRD-Bestimmung mit zwei ASOs mit einer Mindestsensitivität von 10^{-3}

erfolgen, bei 32 Patienten wurde nur ein Primer eingesetzt. Bei insgesamt 101 Patienten hatte mindestens ein Primer eine Sensitivität von 10^{-4} .

Die Knochenmarkpunktionen bzw. Blutentnahmen wurden zwischen 3 und 104 Tage vor Transplantation durchgeführt, im Median 15 Tage vor allo-SZT.

In folgender Tabelle sind für jeden Patienten Screeningergebnisse, gefundene Sequenzen, Sensitivität des dazugehörigen Primers, Tag der Probenentnahme vor allo-SZT und MRD-Befund aufgeführt:

Tabelle 17: Übersicht über Untersuchungsergebnisse aller Patienten; die Spalte mit den Screenergebnissen beinhaltet die Nummer der Primerkombinationen (siehe Tabelle 3), mit denen Banden generiert werden konnten; bei Patienten mit (*) wurden die Sequenzdaten in Hannover bestimmt (Medizinische Hochschule Hannover-Kinderklinik, Pädiatrische Hämatologie und Onkologie); bei Patienten mit (**) wurden die Sequenzdaten in Berlin bestimmt (Charité; Otto-Heubner-Centrum für Kinder- und Jugendmedizin); UPN = Patientennummer, KM = Knochenmark, PB = Peripherblut, d = Tage vor allo-SZT.

UPN	Screen	Sequenz	Sensitivität	KM/ PB	d	MRD-Last
1272	4-6-9-11-15-2	VkIII-kde	1,00E-04	PB	-3	0,00E+00
1282	3-4-6-13	IgHVH3-D2-JH3	0	PB	-9	3,90E+01
		IgHVH4-D7-JH2	0			
		TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-04			
1566	9-13-15	TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-04	PB	-10	1,60E-04
		TZRVgII-Jg1.3/2.1	1,00E-04			
1615	3-6-11-14-20	IgHVH3-JH6	0	KM	-13	0,00E+00
		intron-5'-kde	0			
		TZRVd2-DD3	1,00E-04			
1718	4-6-8	IgHVH4-D6-JH4	1,00E-04	PB	-9	0,00E+00
1753	9-12-13-24	TZRVgI-Jg1.1/2.1	0	KM	-17	0,00E+00
		TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-04			
		TZRDd2-Jd1	1,00E-04			
1820	3-8-13-15	IgHVH3-D3-JH6	1,00E-04	PB	-12	1,50E-01
		VkII-kde	0			
		TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-04			
		TZRVgII-Jg1.3/2.1	1,00E-04			
1825	4-8-12-15-20	VkII-kde	0	PB	-7	0,00E+00
		TZRVgI-Jg1.1/2.1	0			
		TZRVgII-Jg1.3/2.1	1,00E-03			
		TZRVd2-DD3	1,00E-03			
1865	2-3-13-15	VH2-JH5	1,00E-04	PB	-104	1,00E-04
		VH3-JH5	0			
		TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-04			
		TZRVgII-Jg1.3/2.1	0			
1882	4-20	IgHVH4-D2-JH6	1,00E-03	KM	-39	0,00E+00
		TZRVd2-DD3	1,00E-04			
1889	*	TZRVd1-Jd1	1,00E-04	KM	-13	1,56E-04
	*	TZRDd2-Jd1	1,00E-04			
1908	13-16	13(Vg3)-16	1,00E-04	KM	-14	0,00E+00

2003	15-21-22	TZRVgII-Jg1.3/2.1 TZRVd2-Jd1	1,00E-03 1,00E-04	PB	-44	1,65E-02
2011	4-5-6-13-20	TZRVgI-Jg1.3/2.1 TZRVd2-DD3	1,00E-03 0	PB	-8	0,00E+00
2036	3-9-13	IgHVH3-D1-JH5 TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-03 1,00E-04	PB	-18	1,05E-05
2050	2-3-6-8-13-22	IgHVH3-D2-JH4 VkII-kde TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-04 1,00E-04 1,00E-03	PB	-13	0,00E+00
2102	1-12-13-20	IgHVH1/7-JH6 TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-04 1,00E-03	PB	-18	2,67E-03
2122	1-18	IgHVH1/7-JH4	1,00E-04	PB	-15	2,11E-03
2123	*	TZRVd1-Jd1 TZRDd2-Jd1	1,00E-04 1,00E-04	PB	-7	0,00E+00
2164	*	VkII-kde	1,00E-03	PB	-34	0,00E+00
2208	13	TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-04	KM	-15	0,00E+00
2217	2-7-12	IgHVH2-D3-JH4 Vki-kde TZRVgI-Jg1.1/2.1	0 1,00E-04 1,00E-04	KM	-6	3,50E-01
2239	4-23	IgHVH4-D3-JH6 TZRDd2-Dd3	1,00E-04 1,00E-04	KM	-7	2,20E-01
2295	*	IgHVH3-JH3 TZRVgIII-Jg1.3/2.1	1,00E-04 1,00E-05	KM	-12	1,00E-06
2311	3-4-13	IgHVH3-D1-JH4 IgHVH4-D2-JH4 TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-04 1,00E-04 1,00E-04	KM	-13	0,00E+00
2432	1-3-4-5-7-13	IgHVH3-D3-JH6 IgHVH4-D3-JH6	1,00E-04 1,00E-03	KM	-11	0,00E+00
2433	2-13-16-19	TZRVgI-Jg1.3/2.1 TZRVgIII-Jg1.3/2.1 TZRVd1-Jd1	0 1,00E-04 1,00E-03	KM	-31	0,00E+00
2478	2-15	IgHVH2-JH6 TZRVgII-Jg1.3/2.1	1,00E-04 1,00E-04	PB	-34	3,54E-03
2504	*	VkIII-kde TZRVgII-Jg1.3/2.1	1,00E-04 1,00E-03	KM	-15	0,00E+00
2541	13	TZRVg1-Jg1.3/ TZRVg2-Jg1.3	1,00E-03 0	PB	-9	7,58E-03
2560	1-4	VH1-JH4 VH4D3JH4	0 1,00E-04	PB	-25	6,18E-05
2562	3-10-12	IgHVH3-JH4 VkIV-kde TZRVgI-Jg1.1/2.1	1,00E-04 1,00E-03 0	KM	-50	3,40E-04
2610	*	IgHVH3-JH4 TZRVgII-Jg1.3/2.1	1,00E-05 1,00E-04	PB	-23	0,00E+00
2613	**	TZRVgI-Jg1.1/2.1 TZRVgI-Jg1.3/2.1	0 1,00E-04	PB	-21	1,41E-02
2643	*	VH3-JH6 TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-04 1,00E-02	PB	-14	0,00E+00
2657	*	TZRVgI-Jg1.1/2.1 TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-03 0	KM	-7	0,00E+00
2743	3	IgHVH3-D2-JH6	1,00E-04	KM	-14	5,30E-03
2760	**	VkIII-kde	1,00E-04	PB	-38	0,00E+00

1816	9-12-20	TZRVd2-DD3	1,00E-04	KM	-13	0,00E+00
1829	4-6-13-14-20	IgHVH4-JH4	1,00E-04	KM	-8	4,93E-04
		TZRVd2-DD3	1,00E-04			
1839	3-6-8-22-23	IgHVH3-JH5	1,00E-04	KM	-23	0,00E+00
		VkII-kde	0			
		TZRDd2-Dd3	1,00E-04			
1849	3-6-11	IgHVH3-D6-JH6	1,00E-03	PB	-8	0,00E+00
		intron-5'-kde	1,00E-04			
1891	3-13-15	IgHVH3-JH4	1,00E-04	PB	-5	4,00E-04
		TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-04			
1965	1-3-20	IgHVH1/7-D2-JH6	1,00E-04	KM	-30	1,00E-04
		TZRVd2-DD3	1,00E-04			
2018	4-6-8-9-20-23	IgHVH4-D6-JH4	1,00E-03	PB	-12	0,00E+00
		VkII-kde	1,00E-03			
		TZRVd2-DD3	1,00E-04			
2071	4-5-7-12-13	IgHVH4-JH4	1,00E-04	KM	-28	7,00E-02
		TZRVgI-Jg1.1/2.1	0			
		TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-04			
2087	9-13-19-22	TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-04	KM	-12	0,00E+00
		TZRVd1-Jd1	1,00E-04			
		TZRVd3-Jd1	0			
2105	5-9-16-24	TZRVgIII-Jg1.3/2.1	1,00E-04	KM	-19	1,40E-04
2276	3-4-15-23	IgHVH4-D3-JH6	1,00E-04	KM	-25	0,00E+00
		TZRVgII-Jg1.3/2.1	1,00E-03			
2488	**	VH5-D3-JH4	1,00E-04	PB	-39	2,50E-03
		TZRVd2-DD3	1,00E-04			
2495	**	VH1-D1-JH6	1,00E-04	KM	-40	0,00E+00
		TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-03			
2617	8-9-18-20	VkII-kde	1,00E-03	KM	-7	4,50E-03
		TZRVd2-DD3	1,00E-03			
1737	1-6-7-20	IgHVH1/7-D2-JH5	0	KM	-21	0,00E+00
		VkI-kde	1,00E-04			
		TZRVd2-DD3	1,00E-04			
1756	3-9-10-15	VkIII-kde	0	PB	-7	1,52E-04
		VkIV-kde	1,00E-04			
1776	4-23	TZRDd2-Dd3	1,00E-04	KM	-12	0,00E+00
1793	3-4-9	IgHVH3-JH5	1,00E-04	PB	-8	1,02E-03
		IgHVH4-D3-JH5	1,00E-02			
1888	12-22	TZRVgI-Jg1.1/2.1	1,00E-03	KM	-30	2,05E-03
		TZRVd3-Jd1	1,00E-04			
2014	1-4-5-6-9-12-20	IgHVH1/7-D7-JH1	0	KM	-13	1,42E-05
		IgHVH4-D5-JH4	1,00E-04			
		IgHVH4-JH4	1,00E-04			
2020	4-6-13-14-15-20	IgHVH4-JH4	1,00E-04	KM	-9	0,00E+00
		TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-04			
		TZRVgII-Jg1.1/2.1	0			
		TZRVd2-DD3	1,00E-02			
2052	3-7-12-13	VkI-kde	0	PB	-56	0,00E+00
		TZRVgI-Jg1.1/2.1	0			
		TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-04			
2056	3-6-7-20	IgHVH3-D2-JH6	1,00E-04	KM	-13	1,50E-03
		TZRVd2-DD3	1,00E-04			

2057	7-13	VkI-kde TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-04 1,00E-04	KM	-14	1,00E-03
2059	10-13(Vg1/2/4)	TZRVg2-Jg1.3 TZRVg4-Jg1.3	1,00E-03 1,00E-04	KM	-13	0,00E+00
2064	6	FR3-JHcons	1,00E-04	KM	-26	0,00E+00
2114	3-4-6-812-22	VkII-kde TZRVgI-Jg1.1/2.1	1,00E-04 0	KM	-17	3,98E-02
2116	8-10-14-15-23	VkII-kde VkIV-kde TZRVgII-Jg1.1/2.1 TZRVgII-Jg1.3/2.1 TZRDd2-DD3	0 1,00E-03 0 1,00E-03 1,00E-03	PB	-30	2,01E-03
2119	8-12-20	VkII-kde TZRVd2-DD3	1,00E-04 1,00E-04	KM	-53	0,00E+00
2244	13	TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-04	KM	-15	1,00E-06
2266	4-13-20-23	IgHVH4-D3-JH5 TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-04 1,00E-04	KM	-22	6,42E-03
2273	3-4-15	IgHVH3-D2-JH4 TZRVgII-Jg1.3/2.1	1,00E-04 1,00E-03	PB	-20	0,00E+00
2750	3-9-10-20	IgHVH3-JH1 VkIII-kde VkIV-kde TZRVd2-DD3	1,00E-04 1,00E-03 1,00E-03 1,00E-04	KM	-26	0,00E+00
2413	7-8-9-13-15-20	TZRVgI-Jg1.3/2.1 TZRVgII-Jg1.3/2.1 TZRVd2-DD3	1,00E-04 1,00E-04 0	KM	-13	2,89E-02
2445	1-8-20	IgHVH1-D2-JH4 TZRVd2-DD3	1,00E-04 1,00E-04	PB	-18	0,00E+00
2619	7-13-20-23	TZRVgI-Jg1.3/2.1 TZRVd2-DD3	1,00E-04 1,00E-03	KM	-36	0,00E+00
2671	**	VkII-kde	1,00E-04	KM	-7	0,00E+00
2688	**	VH1-D2-JH5 TZRVd2-DD3	1,00E-04 1,00E-04	KM	-43	1,15E-04
2794	**	VH1-D2D1-JH4 TZRVd2-DD3	1,00E-04 0	PB	-57	0,00E+00
1926	4-6-9-15	VH4-JH4 TZRVgII-Jg1.3/2.1	1,00E-04 1,00E-04	PB	-10	6,60E-03
2061	3-6-9-20	VkIII-kde TZRVd2-DD3	1,00E-04 1,00E-04	KM	-15	1,00E-06
2564	2-3-13-15	VH2-D1-JH4 VH3-D5-JH6 TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-04 1,00E-04 1,00E-03	KM	-12	0,00E+00
2670	**	VH2-D2-JH4 VH3-D4-JH4	1,00E-04 1,00E-04	KM	-36	1,00E-05
2701	**	VH4-D5D3-JH4 TZRVgI-Jg1.1/2.1	1,00E-04 1,00E-04	KM	-13	0,00E+00
1836	9-11-13-22	VkIII-kde TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-04 1,00E-04	KM	-11	0,00E+00
1906	*	IgHVH3-JH6 Vd2-Dd3	1,00E-04 1,00E-03	PB	-7	0,00E+00
1913	15-16-19	TZRVgIII-Jg1.3/2.1 TZRVd1-Jd1	1,00E-04 1,00E-04	KM	-6	1,00E-06

1969	3-7-12-15	IgHVH3-JH5 Vkl-kde	0 1,00E-04	KM	-20	0,00E+00
1980	3-20	IgHVH3-JH5 TZRVd2-DD3	1,00E-04 1,00E-04	KM	-12	5,00E-06
1991	12-20	TZRVgI-Jg1.1/2.1 TZRVd2-DD3	1,00E-04 1,00E-04	KM	-12	1,00E-03
2043	12-14	TZRVgI-Jg1.1/2.1 TZRVgII-Jg1.1/2.1	1,00E-04 1,00E-02	PB	-24	0,00E+00
2049	4-20	IgHVH4-JH4	1,00E-04	PB	-47	5,94E-03
2060	23-24	TZRDd2-Dd3 TZRDd2-Jd1	1,00E-04 1,00E-04	KM	-17	3,00E-04
2074	2-3-8-11-15	VkII-kde	1,00E-04	PB	-22	<1E-03
2077	1-13-19	IgHVH1-D6-JH1 TZRVd1-Jd1	1,00E-04 1,00E-04	KM	-13	0,00E+00
2101	7-8-13	Vkl-kde Vkl-kde	0 1,00E-04	KM	-18	0,00E+00
2125	9-11-12-13-15-20	TZRVgI-Jg1.3/2.1 TZRVd2-DD3	1,00E-02 1,00E-04	KM	-13	3,70E-02
2130	13(Vg1/2)-19	TZRVgI-Jg1.3/2.1 TZRVd1-Jd1	0,00E+00 1,00E-04	PB	-56	1,50E-03
2231	2-3-9-15-20	IgHVH2-D2-JH4 IgHVH3-D2-JH6 VkIII-kde	1,00E-04 1,00E-03 1,00E-03	PB	-48	3,40E-05
2237	3-6-13-14	IgHVH3-D2-JH6 TZRVgI-Jg1.3/2.1 TZRVgII-Jg1.1/2.1	0 1,00E-03 1,00E-04	KM	-13	3,90E-03
2250	9-20	TZRVd2-DD3	1,00E-04	PB	-28	0,00E+00
2287	*	TZRVgIV- Jg1.3/2.1 TZRVd1-Jd1	1,00E-04 1,00E-04	PB	-8	0,00E+00
2298	9-13-24	TZRVgI-Jg1.3/2.1 TZRDd2-Jd1	1,00E-04 1,00E-04	KM	-24	8,36E-03
2342	2-4-13-15-20	TZRVgI-Jg1.3/2.1 TZRVgII-Jg1.3/2.1	1,00E-02 1,00E-04	KM	-25	0,00E+00
2346	*	TZRVd2-Jd1 TZRVd3-Jd1	1,00E-04 1,00E-04	PB	-20	2,46E-03
2366	2-11-12-13	VH2D6/D3JH6 TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-04 1,00E-04	PB	-15	1,08E-03
2387	3-4-9-10-13	IgHVH3-D2-JH6 TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-04 1,00E-04	KM	-7	1,00E-06
2451	1-20-23	IgHVH1/7-D6-JH6 TZRDd2-Dd3	0 1,00E-04	KM	-16	9,26E-02
2491	1-8-20-23	IgHVH1/7-D6-JH5 Vkl-kde TZRVd2-DD3	1,00E-02 0 1,00E-04	KM	-10	0,00E+00
2552	1-3-12-13	VH1-D3-JH4 VH3-D2-JH5 TZRVgI-Jg1.1/2.1 TZRVgI-Jg1.3/2.1	1,00E-04 1,00E-04 0 1,00E-03	KM	-12	0,00E+00

5.1.2 Zuordnung zu MRD-Gruppen

Die Patienten wurden gemäß ihres MRD-Ergebnisses in fünf verschiedene Gruppen eingeteilt:

- MRD high-level KM (MRD $\geq 10^{-3}$ im Knochenmark)
- MRD low-level KM (MRD $< 10^{-3}$ im Knochenmark)
- MRD-negativ KM
- MRD-negativ PB (Peripherblut)
- MRD $< 10^{-4}$ PB

Zur Erläuterung: Patienten, von denen nur eine Peripherblutprobe zur Verfügung stand und die in dieser Probe eine MRD-Last von 10^{-4} und grösser aufwiesen, wurden in folgender Auswertung als Patienten mit high-level-MRD (MRD $\geq 10^{-3}$) berücksichtigt. Dies stützt sich auf die Erkenntnisse von Van der Velden et al. und Coustan-Smith et al., die in ihren Studien Paare von Knochenmark- und Peripherblutproben von Kindern mit ALL vergleichend auf MRD untersucht haben.^{38,119} Sie fanden heraus, dass die MRD-Levels in Knochenmark und Peripherblut von Kindern mit einer T-ALL eine starke Korrelation aufweisen. Da T-ALL-Zellen aus dem Thymus stammen, scheint ihre Verteilung in Knochenmark und Peripherblut gleichmäßig zu sein. Hier könnten Peripherblutproben Knochenmarkproben als Untersuchungsmaterial ersetzen. Die MRD-Levels im Knochenmark von pre-B-ALL Patienten waren hingegen mindestens 10 und bis zu 1000 mal höher als in den entsprechenden Peripherblutproben. Coustan-Smith fand auch, dass bei 67 von 72 untersuchten Paaren MRD nur im Knochenmark gefunden wurde. Negativ gemessene Peripherblutproben haben demnach nur geringe Aussagekraft und werden in der folgenden Auswertung gesondert betrachtet.

Bei vier Patienten (UPN 1865, 1756, 1566, 1891) wurde im Peripherblut eine MRD-Last von 10^{-4} gemessen. Da es sich bei diesen vier Patienten nicht um T-ALLs handelt wurde aufgrund dieser Erkenntnisse davon ausgegangen, dass die MRD-Last im Knochenmark um mindestens eine log-Stufe höher liegt, sie wurden daher in die high-level-MRD KM (MRD $\geq 10^{-3}$) Gruppe eingeordnet. Genauso wurde mit allen Patienten ungeachtet ihres ALL-Subtyps verfahren, die im Peripherblut eine MRD-Last $\geq 10^{-3}$

aufwiesen. Bei vier pre-B-ALL Patienten wurde im Peripherblut eine MRD-Last $< 10^{-4}$ gemessen. Diese Patienten sind weder der MRD-high-level noch der MRD-low-level (MRD $< 10^{-3}$) Gruppe klar zuzuordnen, und werden daher in der folgenden Auswertung separat betrachtet.

5.1.3 MRD-Ergebnisse vor Transplantation in Bezug auf das Outcome

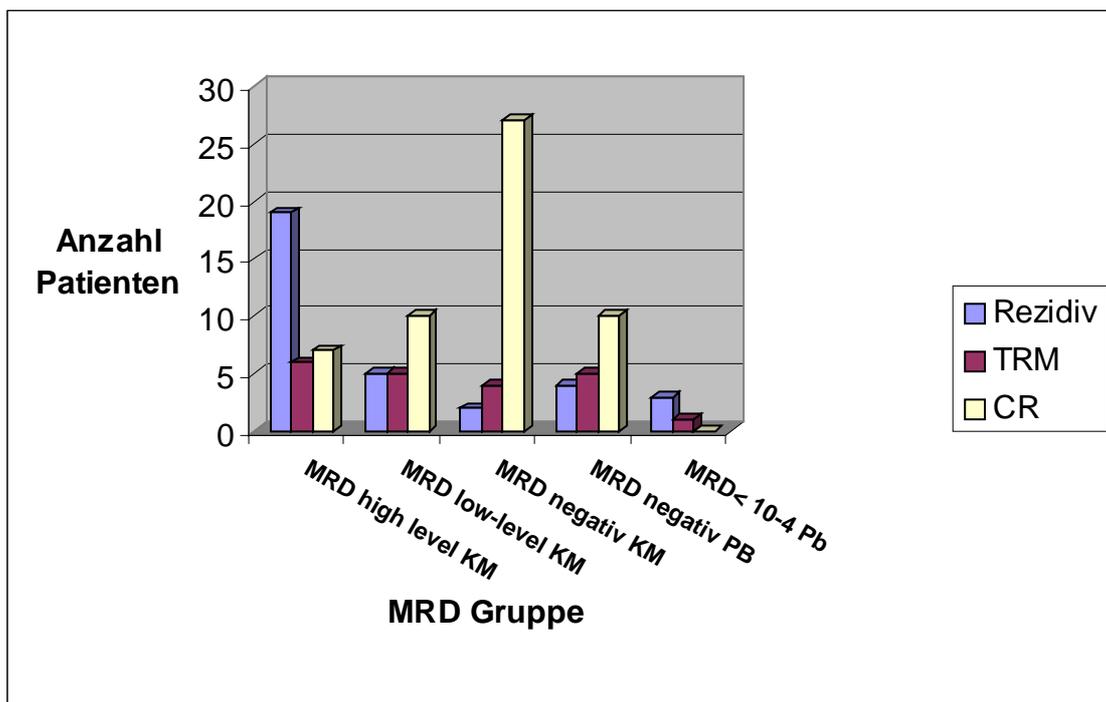


Abbildung 18: MRD-Ergebnisse vor Transplantation gruppiert nach Outcome.

Die obige Grafik gibt einen Überblick über die MRD-Ergebnisse der einzelnen Gruppen in Bezug auf das Outcome der Patienten. Dabei fällt auf, dass sich der größte Anteil an Patienten in kompletter Remission (complete remission, CR) in der Gruppe „MRD-negativ KM“ befindet. Außerdem fällt auf, dass sich die Rezidivhäufigkeiten zwischen den Gruppen „high-level-MRD“ (n = 19), „low-level-MRD“ (n = 5) und „MRD-negativ“ (n = 2) erheblich unterscheiden. Bezüglich des Auftretens eines Rezidivs stellt sich die Gruppe „negativ MRD KM“ am günstigsten dar. Nur 2 von 33 Patienten (6%) innerhalb dieser Gruppe erleiden im Beobachtungszeitraum ein Rezidiv, während 27 (79%) sich am Ende des Beobachtungszeitraums in kompletter Remission befinden.

In der Gruppe „low-level MRD KM“ mit 20 Patienten erleiden fünf Patienten (25%) ein Rezidiv während 10 (50%) in kompletter Remission bleiben.

32 Patienten sind vor allo-SZT high-level MRD-positiv. Von diesen Patienten erleiden 19 (59%) ein Rezidiv, sieben (22%) bleiben in kompletter Remission.

Diese Verteilung soll, auch in Abhängigkeit weiterer Patientencharakteristika und Parameter der allo-SZT, im folgenden genauer untersucht werden. Eventuell vorhandene signifikante Unterschiede zwischen den Patientengruppen sollen anhand univariater und multivariater Analyse sichtbar gemacht werden.

5.2 Ereignisfreies Überleben aller Patienten

Bei folgenden Betrachtungen wird als Ereignis angenommen:

- a) Rezidiv
- b) TRM (GvHD, Toxizität, Infektion)

Ein ereignisfreies Überleben ist somit der Erhalt der kompletten Remission nach allo-SZT. Die kombinierte 3-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit des gesamten betrachteten Patientenkollektivs liegt bei 44%, d.h. 44% der Patienten sind 3 Jahre nach allo-SZT am Leben und befinden sich in kompletter Remission.

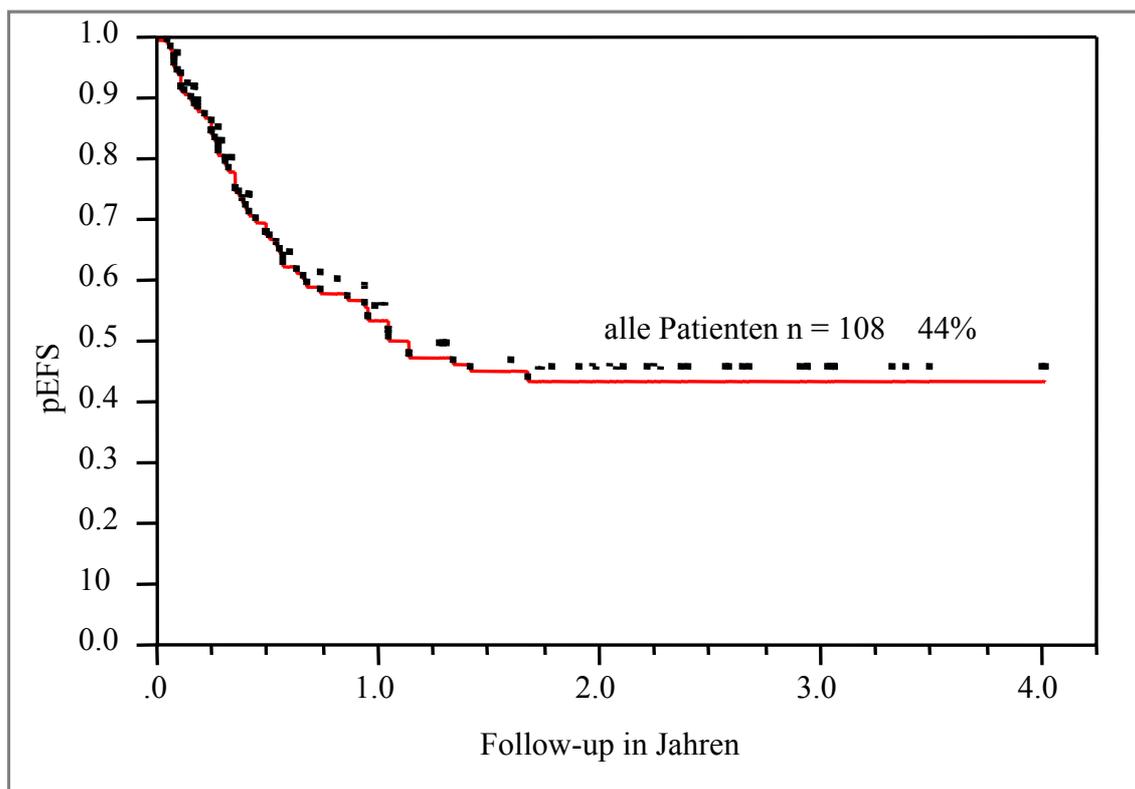


Abbildung 19: Ereignisfreies Überleben aller Patienten

5.2.1 Ereignisfreies Überleben aller Patienten in Abhängigkeit von der Höhe der MRD-Last vor allo-SZT

Um einen Anhalt dafür zu bekommen, inwiefern die Höhe der MRD-Last vor allo-SZT das ereignisfreie Überleben beeinflusst, wird im folgenden das Überleben der verschiedenen MRD-Gruppen getrennt voneinander betrachtet.

5.2.1.1 MRD im Knochenmark

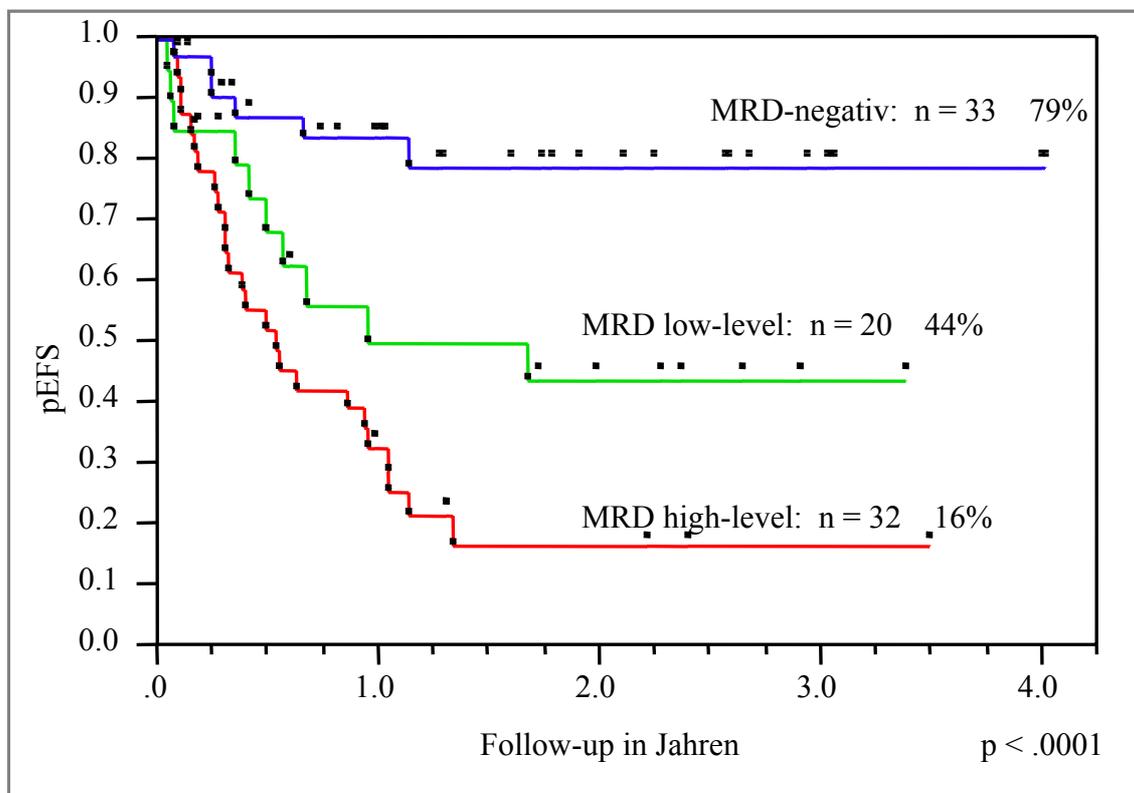


Abbildung 20: Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit von der Höhe der MRD-Last im Knochenmark; MRD low-level = $MRD < 10^{-3}$, MRD high-level = $MRD \geq 10^{-3}$.

Der hier durchgeführte Log-Rank-Test ergibt einen p-Wert von < 0.0001 , das bedeutet zwischen den drei betrachteten Gruppen besteht ein extrem hoch signifikanter Unterschied in Bezug auf das EFS. Die beste Prognose hat die Gruppe „MRD-negativ“ mit einer 3-Jahres-Überlebensrate von 79%, gefolgt von der Gruppe „low-level MRD“

(pEFS = 44%). Die schlechteste Prognose haben Patienten mit einer high-level MRD vor allo-SZT, sie haben eine 3-Jahres-Überlebensrate von 16%.

Um die Bedeutung eines positiven MRD-Befundes im Knochenmark von weniger als 10^{-3} Zellen genauer zu untersuchen, wird die Gruppe „low-level MRD“ weiter unterteilt in die Gruppen MRD $< 10^{-4}$ und MRD 10^{-3} bis 10^{-4} . Das Ergebnis zeigt die folgende Abbildung:

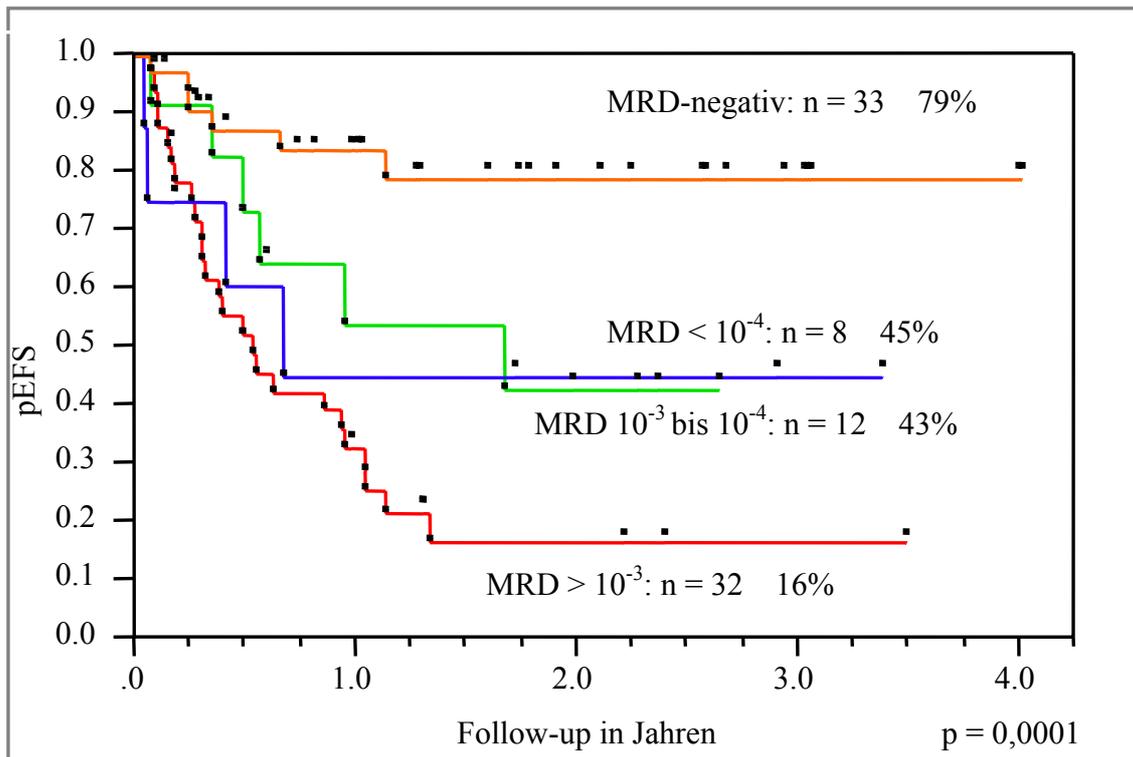


Abbildung 21 : EFS der vier Gruppen MRD-negativ, MRD $< 10^{-4}$, MRD 10^{-3} bis 10^{-4} und MRD $> 10^{-3}$.

Tabelle 18: Statistische Daten zum ereignisfreien Überleben in Abhängigkeit von der Höhe der MRD-Last im Knochenmark; p = Wahrscheinlichkeit, se = Standardabweichung.

MRD-Gruppe	pEFS	se
MRD $> 10^{-3}$	0,162	0,074
MRD 10^{-3} bis 10^{-4}	0,428	0,157
MRD $< 10^{-4}$	0,45	0,188
MRD-negativ	0,788	0,079

Der Log-Rank-Test ergibt hierbei einen Wert von $p = 0,0001$, d.h. auch hier besteht noch ein extrem hoch signifikanter Unterschied bezüglich des EFS zwischen den vier

betrachteten Gruppen, wobei die Gruppe „MRD $< 10^{-4}$ “ (pEFS = 45%) eine bessere Prognose als die Gruppe „MRD 10^{-3} bis 10^{-4} “ (pEFS = 43%) hat.

5.2.1.2 MRD im Peripherblut

Die Patienten, von denen nur eine Peripherblutprobe vorhanden war und deren MRD-Befund im Peripherblut negativ oder positiv aber kleiner 10^{-4} war, werden gesondert betrachtet:

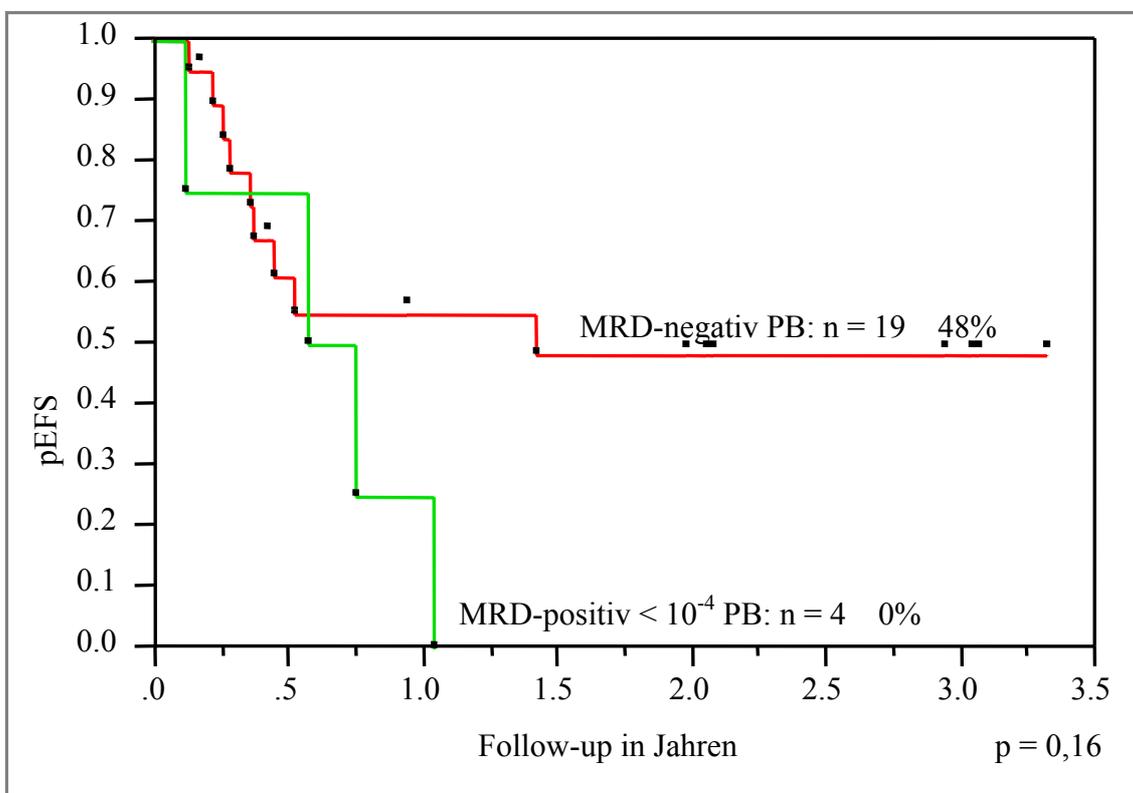


Abbildung 22: EFS der Gruppen MRD-negativ im Peripherblut und MRD-positiv und $> 10^{-4}$ im Peripherblut.

Die Patienten mit einem negativen MRD-Befund scheinen mit einer 3-Jahres-Überlebensrate von 48% eine bessere Prognose zu haben als diejenigen mit einem positiven MRD-Befund im Peripherblut (pEFS = 0%). Der Log-Rank-Test zeigt allerdings mit einem p-Wert von 0,16 dass dieser Unterschied bei kleinen Fallzahlen noch nicht signifikant ist.

5.2.2 Einfluß verschiedener prognostischer Faktoren auf das EFS aller Patienten

5.2.2.1 Phänotyp der ALL

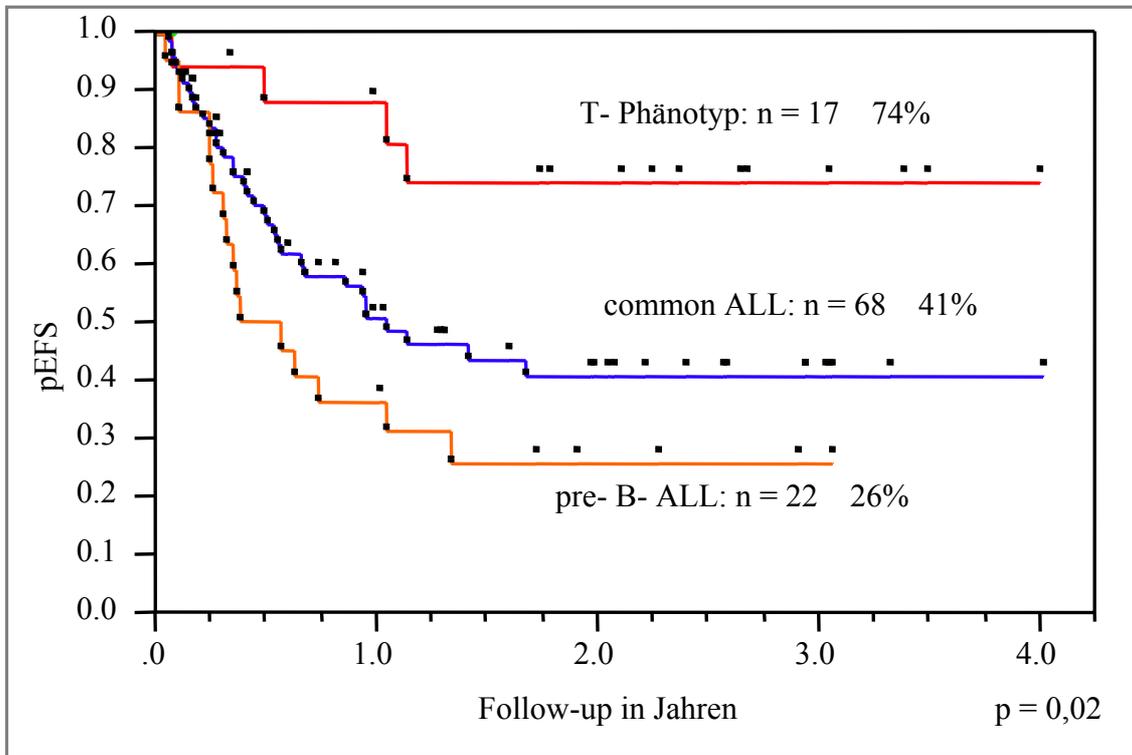


Abbildung 23: EFS in Abhängigkeit vom Immunphänotyp der ALL.

Hier ergibt der durchgeführte Log-Rank-Test einen p-Wert von 0,02. Der Unterschied im Überleben der verschiedenen Phänotypen ist signifikant. Die beste Prognose haben hier Patienten mit T-ALL mit einer 3-Jahres-Überlebensrate von 74%. Die schlechteste Prognose hat die pre B-ALL mit einer Überlebenswahrscheinlichkeit von 26%. Dazwischen liegt die common ALL mit einer Überlebenswahrscheinlichkeit von 41%. Ein durchgeführter Fishers-t-Test ergibt, dass 4 von 17 T-ALL Patienten (23,5%), 34 von 68 common ALL-Patienten (50%) und 16 von 22 pre-B-ALL Patienten (72,2%) ein Rezidiv erleiden, dieser Unterschied ist signifikant ($p = .01$)

5.2.2.2 HLA-Kompatibilität und Verwandtschaft zwischen Spender und Empfänger

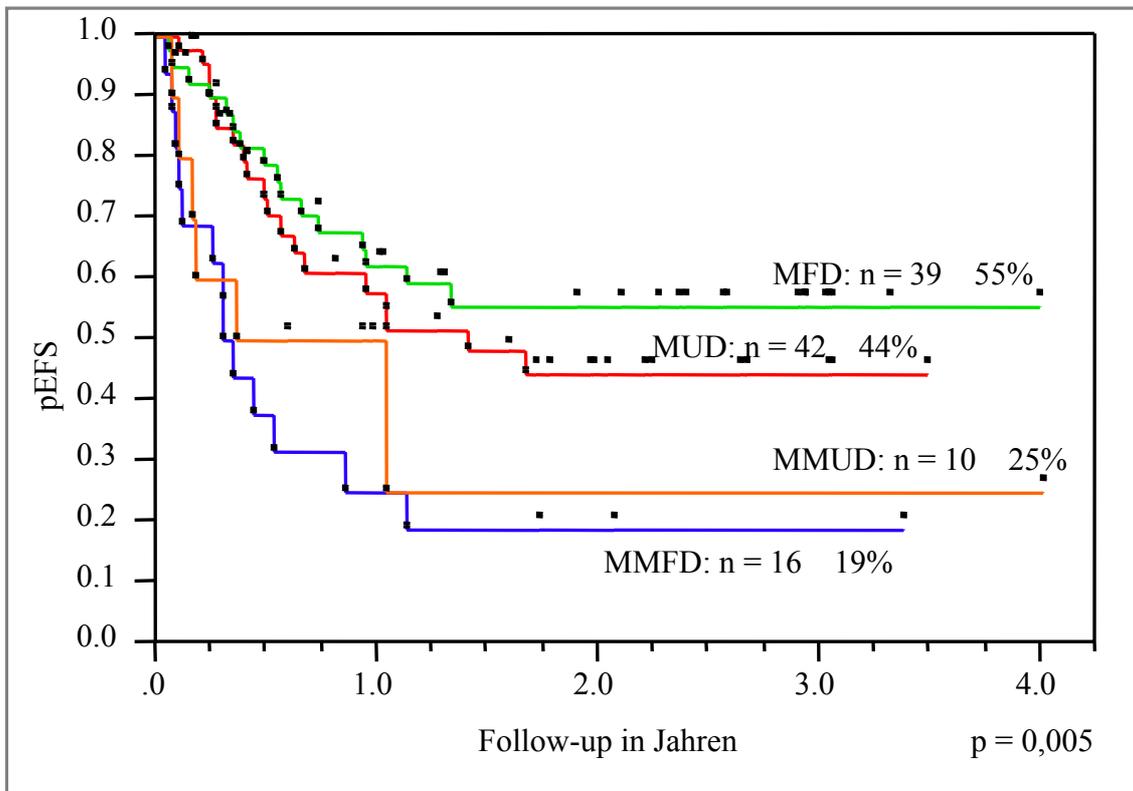


Abbildung 24: EFS in Abhängigkeit vom Spender; MFD = matched family donor, MUD = matched unrelated donor, MMUD = mismatched unrelated donor, MMFD = mismatched family donor.

Der Log-Rank-Test ergibt einen p-Wert von 0,0053. Es besteht ein signifikanter Unterschied bezüglich des ereignisfreien Überlebens in Abhängigkeit von Verwandtschaftsgrad und HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger.

Die beste Prognose haben Empfänger des Transplantats eines verwandten und HLA-kompatiblen Spenders (matched family donor, MFD) mit einer 3-Jahres Überlebensrate von 55%, gefolgt von Empfängern des Transplantats eines nichtverwandten, vollständig HLA-kompatiblen Spenders (matched unrelated donor, MUD) (pEFS = 44%).

Eine schlechtere Prognose haben Empfänger eines Transplantats mit einem HLA-mismatch (pEFS = 25% für unverwandte und pEFS = 19% für verwandte Spender).

5.2.2.3 Konditionierung

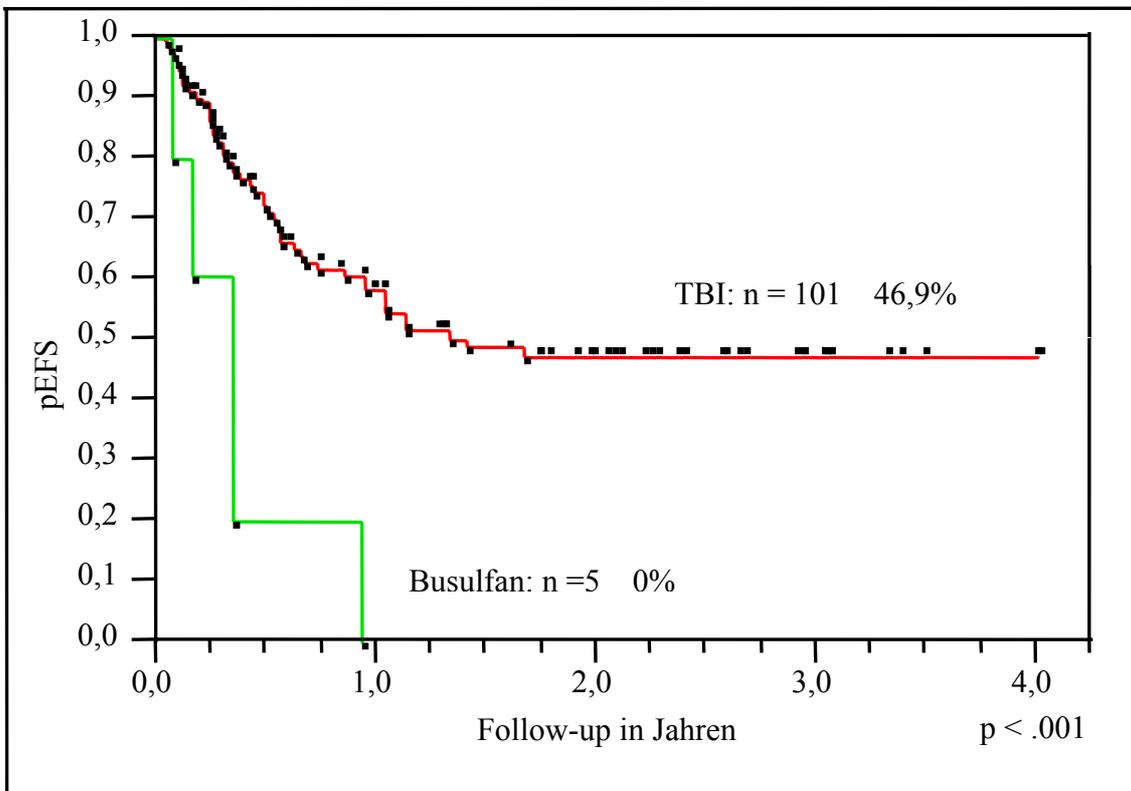


Abbildung 25: EFS in Abhängigkeit von der Art der Konditionierung; TBI = total body irradiation.

Auch die Art der Konditionierung hat einen entscheidenden Einfluß auf das Überleben. Das Überleben der Patienten, die vor Transplantation eine Ganzkörperbestrahlung (total body irradiation, TBI) erhalten haben ist signifikant besser (pEFS = 0,47) als das der Patienten mit auf Busulfan basierender Konditionierung (pEFS = 0).

5.2.2.4 Univariate und multivariate Analyse verschiedener Parameter im Hinblick auf das ereignisfreie Überleben

Tabelle 19: Univariate und Multivariate Analyse; CR = complete remission, KM = Knochenmark, MFD = matched family donor; MMFD = mismatched family donor; MMUD = mismatched unrelated donor; MUD = matched unrelated donor; NS = Nabelschnurblut; PB = peripheral blood; TBI = total body irradiation.

Gruppe		Univariate Analyse (nach Kaplan-Meier)				Multivariate Analyse (Proportional Hazards Analyse)							
		n	3- Jahres- EFS (%)	log- rank test	P-Wert	Gruppen- vergleich	risk ratio	unteres 95% KI	oberes 95% KI	P-Wert			
MRD	negativ	33	78,8	p < .0001	low-level vs. high-level	0,59	0,24	1,3	p < .005				
	low-level	20	43,6							negativ vs. low-level	0,32	0,1	0,95
	High-level	32	16,2							negativ PB vs. negativ KM	3,03	1,04	9,63
										PB <E-04 vs. negativ PB	3	0,74	10,14
Geschlecht	männlich	73	38,9	p = .26	weiblich vs. männlich	1,14	0,56	2,24	p = .7				
	weiblich	35	54,7										
Phänotyp	T-Phänotyp	17	74,3	p < .05									
	common ALL	68	41,0										
	pre-B-ALL	22	26,0										
Remission vor SZT	CR1	35	56,0	p = .14	CR2 vs. CR1	1,61	0,79	3,37	p = .36				
	CR2	53	43,1							> CR2 vs. CR2	0,99	0,45	2,08
	> CR2	20	27,8										
Spender	MUD	42	44,2	p < .01	MMFD vs. MFD	4,18	1,51	11,67	p < .05				
	MFD	39	55,3							MMUD vs. MMFD	0,62	0,21	1,71
	MMFD	15	20,0							MUD vs. MMUD	0,54	0,22	1,45
	MMUD	11	22,7										
Stammzelle	KM	50	53,0	p = .12	PB vs. KM	1,42	0,67	3,01	p = .6				
	PB	55	34,3							NS vs. PB	1,26	0,07	7,32
	NS	3	66,7										
T-Zell- Depletion	ja	33	35,9	p = .29	nein vs. ja	2,19	0,97	5,14	p = .06				
nein	74	48,8											
Kondition.	TBI	101	46,9	p < .001	nein vs. ja	2,96	0,93	7,9	p = .06				
	Busulfan	5	0										

Die multivariate Analyse zeigt, dass die MRD-Last vor allo-SZT einen hoch signifikanten ($p < .005$) Einfluss auf das EFS hat und somit ein von anderen betrachteten Faktoren unabhängiger prognostischer Marker ist. Ein MRD-Befund $< 10^{-3}$ birgt ein um den Faktor 0,59 (95% KI 0,24 bis 1,3) geringeres Risiko für das Eintreten eines Ereignisses als ein MRD Befund $\geq 10^{-3}$.

Ebenso ist ein negativer MRD-Befund im Knochenmark um den Faktor 0,32 (95% KI 0,1 bis 0,95) weniger riskant für das Auftreten eines Ereignisses als ein positiver MRD-Befund $< 10^{-3}$.

Patienten mit einer MRD-negativen Peripherblutprobe haben gegenüber Patienten mit einer MRD-negativen Knochenmarkprobe ein um den Faktor 3,03 (95% KI 1,04 bis 9,63) erhöhtes Risiko.

Wurde im Peripherblut eine MRD-Last von $< 10^{-4}$ gemessen haben diese Patienten gegenüber denen mit negativer Peripherblutprobe ein um das 3fach (95% KI 0,74 bis 10,14) erhöhte Risiko.

Auch die verschiedenen Arten von Spendern zeigen nicht nur in der univariaten Analyse signifikante Unterschiede. Auch die multivariate Analyse zeigt einen signifikanten Einfluß auf das EFS ($p < .05$) unabhängig von den anderen bewerteten Faktoren. So hat ein Familienspender mit einem HLA-mismatch (mismatched family donor, MMFD) ein um den Faktor 4,18 (95% KI 1,51 bis 11,67) erhöhtes Risiko gegenüber einem Familienspender, der HLA-identisch ist (matched family donor, MFD).

Ein HLA-identischer, nichtverwandter Spender (matched unrelated donor, MUD) hat im Vergleich zu einem unverwandten Spender mit einem HLA-Mismatch (mismatched unrelated donor, MMUD) ein um den Faktor 0,54 (95% KI 0,22 bis 1,45) geringeres Risiko für das Auftreten eines Ereignisses.

Diese Risikofaktoren wurden in einem multivariaten Cox-Regressionsmodell berechnet, das außerdem die Merkmale Geschlecht, Phänotyp der ALL, Remissionsstatus vor allo-SZT, Art der Stammzelle und T-Zell-Depletion beinhaltet.

5.3 Ereignisfreies Überleben aller Patienten \geq CR2

Im folgenden sollen nun ausschließlich die Patienten genauer betrachtet werden, die nach dem Auftreten eines oder mehrerer Rezidive transplantiert wurden, sich also zum Transplantationszeitpunkt in CR2 oder $>$ CR2 befanden.

Hier soll der Einfluß der MRD-Last vor allo-SZT auf die den Strategiegruppen S2-S4 zugeteilten Patienten untersucht werden. Außerdem soll gesondert noch die Bedeutung des Rezidivzeitpunktes für das EFS beurteilt werden.

5.3.1 EFS aller Patienten nach allo-SZT in CR ≥ 2 im Vergleich mit EFS aller Patienten nach allo-SZT in CR1 in Abhängigkeit vom MRD-Status

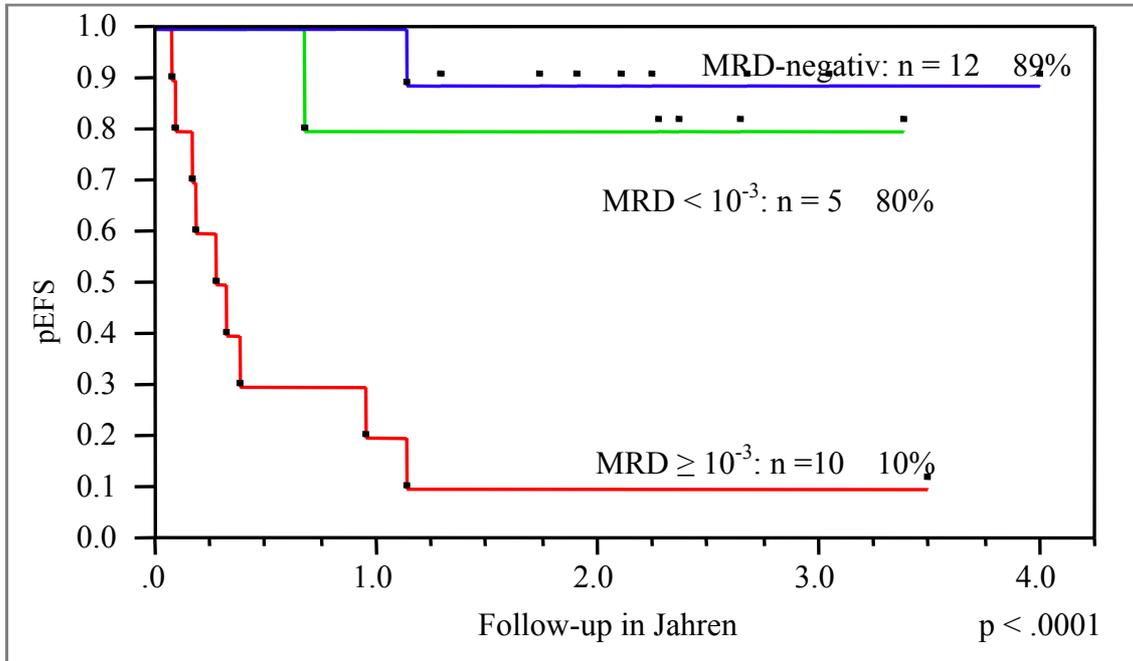


Abbildung 26: EFS nach MRD im KM aller Patienten die in CR1 transplantiert wurden.

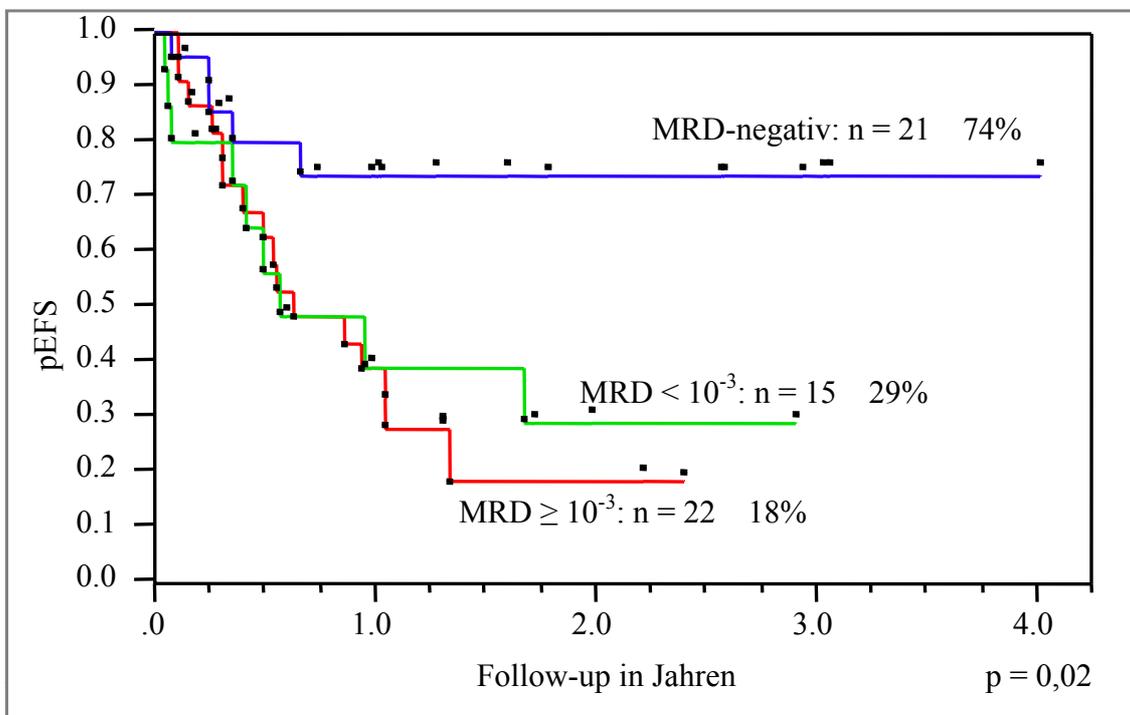


Abbildung 27: EFS aller Patienten nach MRD im KM, die in \geq CR2 transplantiert wurden.

Hierbei fällt auf, dass die Patienten mit einer MRD-Last von $< 10^{-3}$, die in CR1 transplantiert wurden, nach drei Jahren noch eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 80% haben, während die Patienten, die in \geq CR2 transplantiert wurden mit einer MRD-Last von $< 10^{-3}$ nach 2,9 Jahren eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 29% aufweisen. Die Gruppe „MRD $< 10^{-3}$ “ der in CR2 transplantierten Patienten wurde nun weiter in die Gruppen „MRD 10^{-3} bis 10^{-4} “ und „MRD $< 10^{-4}$ “ unterteilt um dann einen Fishers-Exakt-Test durchzuführen, mit Hilfe dessen die Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten eines Events für die einzelnen Gruppen errechnet wurde. Es ergab sich ein p-Wert von 0,0084 und damit ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Folgende Tabelle zeigt die Rezidivwahrscheinlichkeiten der einzelnen Gruppen:

Tabelle 20: Rezidivwahrscheinlichkeiten der einzelnen MRD-Gruppen, p = .0084.

MRD-Gruppe	Rezidivwahrscheinlichkeit
MRD $> 10^{-3}$	73%
MRD 10^{-3} bis 10^{-4}	67%
MRD $< 10^{-4}$	50%
MRD-negativ	24%

Es zeigt sich hier, dass erst ab einer MRD-Last $< 10^{-4}$ die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Ereignisses auf 50% sinkt.

5.3.2 Univariate Analyse verschiedener Merkmale in Hinblick auf das EFS der Patienten in \geq CR2

Tabelle 21: Univariate Analyse verschiedener Merkmale in Hinblick auf das EFS der Patienten in \geq CR2.

Gruppe		Univariate Analyse (nach Kaplan-Meier)		
		n	3-Jahres-EFS (%)	Log-rank test
Strategiengruppen	S2	31	53,5	p = .1
	S3	20	28,3	
	S4	22	25 (2,2 Jahre)	
MRD (Gruppe S2)	negativ	11	70,7	p = .5
	low-level	8	54,7 (2,9 Jahre)	
	high-level	7	33,3 (1,3 Jahre)	
MRD (Gruppe S3 und S4)	negativ	10	75,0	p < .05
	low-level	7	0,0	
	high-level	15	16 (2,4 Jahre)	
	negativ PB	6	33,3	
	low-level PB	4	0,0	
Rezidivzeitpunkt	sehr früh	21	29,3 (2,2 Jahre)	p = .2
	früh	20	22,6	
	spät	32	52,0	
MRD (Pat. mit sehr frühen und frühen Rezidiven)	negativ	10	75,0	p < .05
	Low-level	6	0,0	
	high-level	14	17,1 (2,4 Jahre)	
MRD (Pat. mit späten Rezidiven)	negativ	11	71,0	p = .4
	Low-level	9	48,0	
	high-level	8	28,0	

5.3.2.1 Einfluß der MRD-Last auf das Überleben der Strategieguppen S2-S4

Innerhalb der Strategieguppe S2 besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den MRD-Gruppen „MRD-negativ“, „low-level“ und „high-level“.

Für Patienten, die den Hochrisikogruppen S3 und S4 angehören besteht jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen verschiedenen MRD-Gruppen:

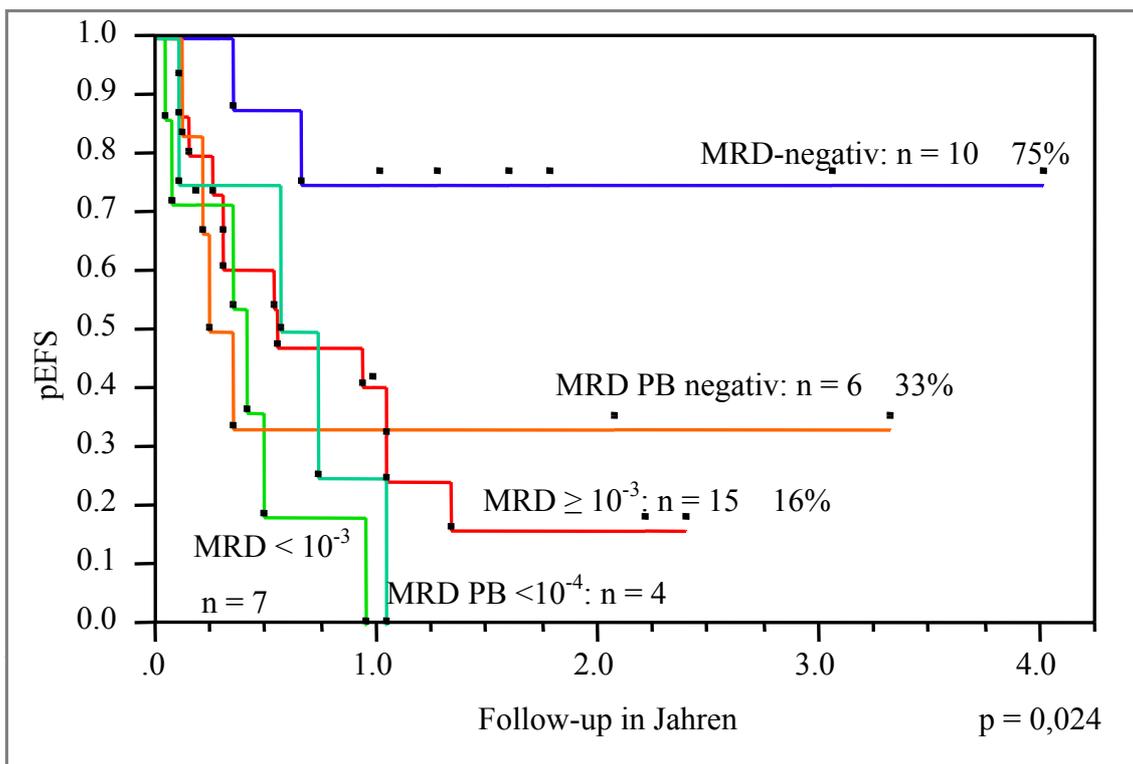


Abbildung 28: EFS der Strategieguppen S3 und S4 nach MRD-Gruppe.

Tabelle 22: EFS der Patienten der Strategieguppen S3/S4 in Abhängigkeit vom MRD-Status ($p < .05$); p= Wahrscheinlichkeit, se = Standardabweichung.

MRD-Gruppe	pEFS	se
MRD-negativ	0,750	0,153
MRD low-level	0	0
MRD high-level	0,160	0,101
MRD-negativ PB	0,333	0,192
MRD $< 10^{-4}$ PB	0	0

Der Log-Rank-Test ergibt einen p-Wert von 0,024. Vor allem die Gruppe „MRD-negativ KM“ hebt sich mit einer Überlebenswahrscheinlichkeit von 75% deutlich von den anderen Gruppen ab.

5.3.2.2 EFS in Abhängigkeit vom Rezidivzeitpunkt

Bei der Einteilung der Patienten in die vier Strategiegruppen S1-S4 werden die prognostischen Faktoren Zeitpunkt, Lokalisation und Immunphänotyp des Rezidivs berücksichtigt.

Nun soll noch isoliert der Einfluß des Rezidivzeitpunktes auf das EFS betrachtet werden. Bei der univariaten Analyse zeigt sich, daß der Rezidivzeitpunkt alleine keinen signifikanten Unterschied bezüglich des EFS darstellt. Für Patienten mit sehr frühen und frühen Rezidiven jedoch ist wiederum der MRD-Befund von Bedeutung, auch hier unterscheidet sich die Gruppe „MRD-negativ KM“ signifikant von den Gruppen „low-level“ und „high-level MRD“ ($p < .05$):

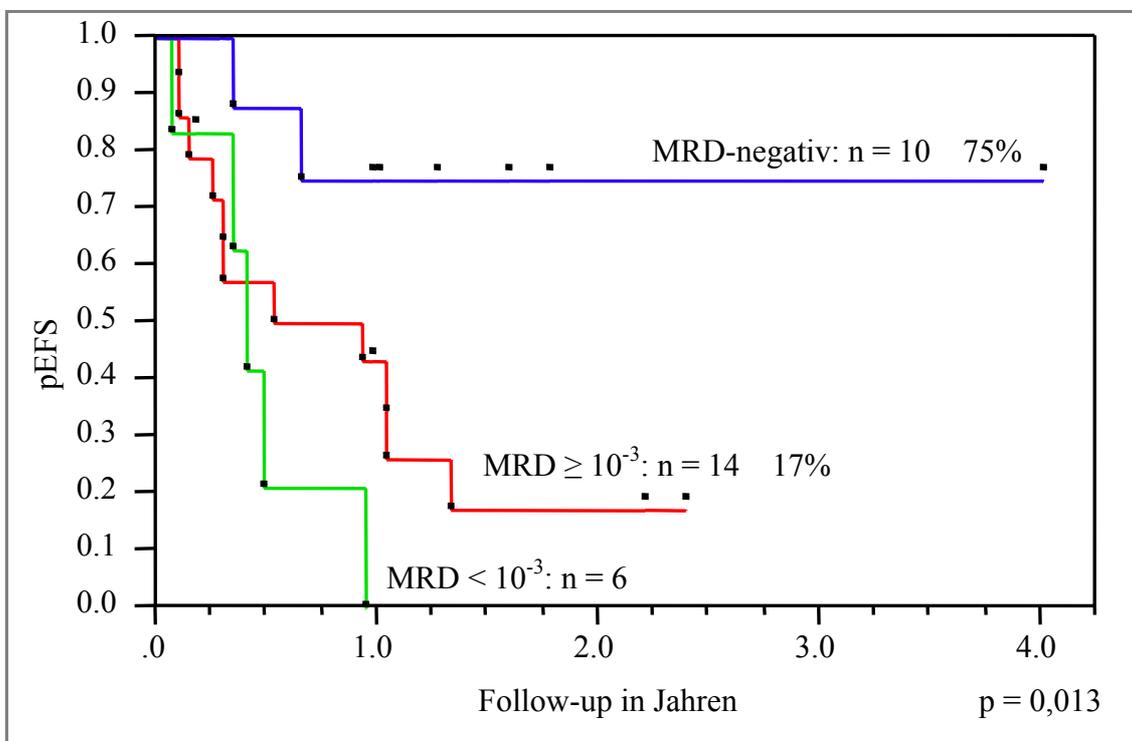


Abbildung 29: EFS von Patienten mit frühen oder sehr frühen Rezidiven in Abhängigkeit von der MRD-Last im Knochenmark.

6 Diskussion

Die allo-SZT ist eine hocheffektive Therapie für Kinder mit ALL. Fortschritte in der Aufbereitung des Transplantats, der Gewebetypisierung und Intensivpflege machen eine SZT heute für nahezu jedes Kind mit ALL möglich.⁵⁸ Eine allo-SZT ist jedoch mit einer nicht unerheblichen therapiebedingten Mortalität und Morbidität verbunden, die transplantationsassoziierte Mortalität aller Transplantationen liegt bei mindestens 10%.⁵⁹

Die allo-SZT sollte deshalb für die Kinder mit Hochrisikofaktoren reserviert bleiben, denen mit alleiniger Chemotherapie nicht geholfen werden kann. Die Indikation zur allo-SZT wird also adaptiert an das individuelle Rückfallrisiko gestellt. Eine Hochrisiko-ALL (T-Zell-Immunphänotyp, Expression von t(9;22) oder t(4;11)), schlechtes Ansprechen auf die Initialtherapie und Rezidiv sind die häufigsten Indikationen für eine allo-SZT. Die Tatsache, dass trotzdem noch 40% der Kinder nach allo-SZT ein Rezidiv erleiden, zeigt, dass derzeitige Methoden der Stratifizierung inakkurat sind.⁷⁰ Ziel ist es nun, prognostische Marker zu finden, mit denen man zwischen Patienten, die von einer allo-SZT profitieren und solchen, die eine modifizierte Therapie erhalten sollen, unterscheiden kann. Dazu ist es nötig, möglichst frühzeitig das Rezidivrisiko eines Patienten beurteilen zu können.

Der Level der minimalen Resterkrankung direkt vor allo-SZT hat sich als solch ein prognostischer Faktor erwiesen. Bereits vor allo-SZT kann anhand des MRD-Levels eine Gruppe von Patienten identifiziert werden, die mit großer Wahrscheinlichkeit nach SZT rezidivieren.^{7,69,120}

6.1 Die Methode

Derzeit werden drei verschiedene Arten von leukämiespezifischen Targets als MRD-Marker bei ALL eingesetzt: Fusionsgentranskripte aus Chromosomenabberationen, leukämie-assoziierte Immunphänotypen und patientenspezifische Immunglobulin- und T-Zellrezeptor-Genrearrangements.

Leukämie-assoziierte Immunphänotypen können bei 60-98% der B-ALLs und bei so gut wie allen T-ALLs gefunden werden. Anhand durchflußzytometrischer Analyse dieser Phänotypen können Sensitivitäten von 10^{-3} bis 10^{-4} erreicht werden. Immunphänotypische Shifts werden während des Krankheitsverlaufs beobachtet, daher sind falsch-negative Befunde nicht auszuschließen.

Die PCR-Analysen von Chromosomenabberationen erreichen Sensitivitäten von 10^{-4} bis 10^{-6} wobei die Targets eine hohe Stabilität aufweisen. Diese Methode ist jedoch nur bei einer Minderheit der ALL-Patienten anwendbar.⁶⁴

Die RQ-PCR-Analyse von Ig- und TZR-Genrearrangements ist die am weitesten verbreitete Methode und wurde auch in der vorliegenden Studie entsprechend den internationalen Standards der „European BIOMED-1 Concerted Action“ durchgeführt.⁸⁴ Im folgenden soll dargestellt werden, ob und weshalb sie alle erforderlichen Voraussetzungen zur verlässlichen MRD-Bestimmung erfüllt.

6.1.1 Anwendbarkeit

Die PCR-Analyse von Ig- und TZR-Genrearrangements kann praktisch bei jedem Kind mit ALL angewandt werden. Durch Einsatz des von der BIOMED-1 CONCERTED ACTION: „Investigation of minimal residual disease in acute leukemia“ publizierten Primersystems kann bei ~90% der pre-B-ALLs und bei ~95% der T-ALLs mindestens ein PCR-Target identifiziert werden.⁸³ Dies macht die große Mehrheit der Patienten zugänglich für diese Methode.

6.1.2 Stabilität

Ein Marker für minimale Resterkrankung sollte während des Krankheitsverlaufes stabil bleiben. Weder die leukämie-assoziierten Immunphänotypen noch die Immunglobulin- und TZR-Genrearrangements erfüllen dieses Kriterium. Häufig findet hier eine klonale Evolution während des Krankheitsverlaufes statt, d.h. die Rearrangements verändern sich und werden von den allelspezifischen Oligonukleotiden nicht mehr erkannt. Falsch-negative Befunde sind die Folge. Um dieses Problem zu umgehen ist es erforderlich, nach Möglichkeit mindestens zwei Genrearrangements pro Patient zu identifizieren und zu beobachten. So wird die Wahrscheinlichkeit eines falsch-negativen Ergebnisses auf <5% reduziert.^{59,78}

6.1.3 Sensitivität

Theoretisch liegt das Detektionslimit der RQ-PCR-Analyse, wenn ein DNA-Segment als PCR-Target eingesetzt wird, bei ungefähr 10^{-6} , d.h. eine maligne Zelle könnte unter 1 000 000 gesunder Zellen erkannt werden.¹²¹ Dieses Limit kann durchaus erreicht werden, in der Regel liegt die Sensitivität jedoch zwischen 10^{-4} und 10^{-6} . Die Sensitivität der RQ-PCR der Genrearrangements hängt von der Art des Rearrangements und vom Background normaler lymphatischer Zellen mit vergleichbaren Ig- oder TZR-Rearrangements ab.

6.1.4 Quantifikation

Die genaue Quantifizierung der residuellen Leukämiezellen ist aus zwei Gründen von Vorteil. Erstens erlaubt sie eine Einschätzung der Sensitivität des Markers, was vor allem bei der Beurteilung negativer Resultate eine große Rolle spielt. Zweitens ist es erst durch eine genaue Quantifizierung möglich, den MRD-Level mit einem Rezidivrisiko zu korrelieren.⁵⁹

Im Gegensatz zur Quantifizierung am Endpunkt der PCR macht es die RQ-PCR möglich, schon während der exponentiellen Phase der PCR-Amplifikation eine genaue

Quantifizierung vorzunehmen. Quantitative Daten können so innerhalb einer kurzen Zeitperiode erhalten werden, ohne die Probe nach der PCR nochmals verarbeiten zu müssen.

6.1.5 Standardisierung

Um eine Risikogruppeneinteilung nach MRD-Befunden in groß angelegte klinische Studien aufzunehmen bedarf es einer Standardisierung der Methode zur MRD-Quantifikation. In vorliegender Studie wurde die Analyse der minimalen Responderkrankung durch Charakterisierung von Immunglobulin- und TZR-Rearrangements entsprechend den internationalen Standards der Biomed-1 Gruppe durchgeführt.⁸³ Der Einsatz von standardisierten Primerkombinationen, Protokollen und MRD-Detektierungssystemen ermöglicht eine vollkommen standardisierte Vorgehensweise.

Aus diesen Voraussetzungen entsteht die Möglichkeit, die erhobenen Befunde einer gegenseitigen Qualitätskontrolle aller teilnehmenden Zentren zu unterziehen. Nur so ist es möglich, MRD-Befunde als Basis für weitreichende therapeutische Entscheidungen heranzuziehen.

Dies ist auch Ziel der „European study group on MRD in ALL (ESG-MRD ALL)“, bei der 23 Labore in zehn verschiedenen europäischen Ländern in Qualitätskontrollen und technische Workshops involviert sind.⁶³ Ein Teil der ESG-MRD ALL ist die „Pre-BMT MRD Study Group“, in der die Möglichkeit einer kombinierten klinischen Studie mit Stratifizierung gemäß MRD-Level vor allo-SZT und Therapiemodifikationen für Patienten in bestimmten MRD-Gruppen diskutiert wird.

6.2 MRD vor allo-SZT als prognostischer Faktor

6.2.1 Knochenmark

In vorliegender Studie wurde bei insgesamt 108 ALL Patienten eine Quantifizierung der residuellen Resterkrankung zu einem Zeitpunkt direkt vor allo-SZT durchgeführt. Bei 85 dieser Patienten konnte die minimale Resterkrankung entweder direkt aus dem Knochenmark bestimmt werden oder es konnte von der MRD-Last im Peripherblut auf die MRD-Last im Knochenmark geschlossen werden. Das ereignisfreie Überleben der MRD-negativen Patienten war mit 79% signifikant besser als das ereignisfreie Überleben der Patienten mit low-level MRD (44%) und den Patienten mit high-level MRD (16%). Dies bestätigt die Ergebnisse von vier bisher veröffentlichten Studien, die die Korrelation zwischen MRD-Last vor der Konditionierung und Rezidiv nach allo-SZT untersucht haben.^{7,69,118,120} Alle vier Studien zeigen einen unbestreitbaren Einfluß des MRD-Levels vor SZT auf das Outcome.

Knechtli et al. (1998) untersuchten anhand PCR-Analyse von Antigenrezeptorgenen und allelspezifische Sonden 64 Kinder (19 transplantiert in CR1, 39 in CR2, 2 \geq CR3) im Median 23 Tage vor Transplantation auf MRD. Der MRD-Level wurde als hochpositiv eingestuft, wenn eine Bande auf dem Polyacrylamidgel nach Elektrophorese (PAGE) zu sehen war und als niedrig positiv wenn die PAGE negativ aber das Nachweisverfahren mittels radioaktiv gekennzeichneten Sonden positiv ausfiel. Fünf Kinder starben aufgrund transplantations-assoziiertes Komplikationen und wurden deshalb aus der Analyse ausgeschlossen. Das rezidivfreie Überleben nach 5 Jahren betrug 0% bei hoch positivem MRD-Befund (12 Rezidive bei 12 Patienten), 36% bei niedrig positivem MRD-Befund (5 Rezidive bei 9 Patienten) und 73% bei negativer MRD (8 Rezidive bei 38 Patienten).

Bader et al. (2002) benutzten dieselbe MRD-Methode um bei 41 Kindern (7 transplantiert in CR1, 29 in CR2, 5 \geq CR3) die MRD-Last vor allo-SZT zu analysieren. Der Großteil der Kinder (28/41) erhielt ein nichtmanipuliertes Transplantat. Drei Kinder starben an transplantationsassoziierten Komplikationen und wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Das 5-Jahres-Überleben der high-level MRD-positiven Kinder betrug

23% (11 Rezidive bei 15 Patienten), das der low-level MRD-positiven Kinder 48% (5 Rezidive bei 10 Patienten) und das der MRD-negativen 78% (zwei Rezidive bei 13 Patienten).

In einer holländischen Studie von van der Velden et al. (2001) wurden 17 Patienten (9 transplantiert in CR1, 8 in CR2) im Median 20 Tage vor Konditionierung mittels RQ-PCR von Antigen-Rezeptor Rearrangements auf MRD untersucht. Es wurden zum Teil T-Zell-depletierte und zum Teil nicht T-Zell-depletierte Transplantate verwendet. Elf Patienten waren MRD-negativ ($< 10^{-4}$) und sechs waren MRD-positiv. Das ereignisfreie Überleben der MRD-negativen Gruppe betrug 80%, das der MRD-positiven Gruppe 33%. Die zwei Überlebenden der MRD-positiven Gruppe hatten MRD Levels $< 5 \times 10^{-4}$.

In der Studie von Uzunel et al. (2001) wurde MRD bei 30 Patienten vor allo-SZT ebenfalls anhand RQ-PCR von Genrearrangements analysiert. Fünfzehn Patienten hatten high-level MRD (10^{-2} bis 10^{-3}), 10 low-level MRD ($< 10^{-3}$) und fünf waren MRD-negativ. Bei den MRD-negativen Patienten erlitten 0% (0/5) ein Rezidiv, während 52% (13/25) der MRD-positiven Patienten ein Rezidiv erlitten. Unter den MRD-positiven Patienten erlitten nur zwei der elf Patienten mit akuter oder chronischer GvHD ein Rezidiv.

Jede dieser Studien zeigt, dass die MRD-Last vor allo-SZT ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Vorhersagen eines Rezidives ist. Das Überleben der MRD-negativen Patienten ist konstant gut, während es fast nutzlos erscheint, Kinder mit high-level MRD zu transplantieren.⁵⁸

Nur wenige der Kinder mit high-level MRD vor Transplantation können geheilt werden. In unserer Studie blieben dennoch sieben von 32 Patienten mit high-level MRD in kompletter Remission. Vier von ihnen entwickelten eine akute GvHD Grad 1 und ein Patient erhielt eine präventive Immuntherapie (Donorlymphozyteninfusion) aufgrund eines ansteigenden gemischten Chimärismus im Peripherblut.

Ein Erklärungsversuch für das Überleben dieser Kinder könnte sein, dass die GvHD und die Immuntherapie durch ihren Antitumoreffekt einen gewissen Schutz gegen Rezidive darstellen.^{10,64,90,106}

Um die Frage nach der Grenzkonzentration zu klären, die für das Auftreten eines Rezidives prädiktiv sein könnte, wurde die Gruppe „low-level MRD“ weiter unterteilt. Patienten mit einer MRD-Last $< 10^{-4}$ und Patienten mit einer MRD-Last von $< 10^{-3}$ und

$\geq 10^{-4}$ haben mit 45 bzw. 43% signifikant unterschiedliche, jedoch ähnliche Überlebensraten. Ab Erreichen einer MRD-Last von 10^{-3} sinkt das EFS auf 16% ab. Hier stellt sich die Frage, ob das Durchführen einer SZT bei einer MRD-Last $\geq 10^{-3}$ zum Erhalt einer kompletten Remission überhaupt sinnvoll ist.

6.2.2 Peripherblut

Bei vier Patienten war die MRD-Last im Peripherblut vor Transplantation $< 10^{-4}$, 19 Patienten hatten einen negativen MRD-Befund im Peripherblut. Da alle diese Patienten eine non-T-ALL haben, konnten sie aufgrund der oben genannten Kriterien keiner MRD-Gruppe klar zugeordnet werden. Die Patienten mit einem negativen MRD-Befund scheinen zwar mit einer 3-Jahres-Überlebensrate von 48% eine bessere Prognose zu haben als diejenigen mit einem positiven MRD-Befund im Peripherblut (pEFS = 0%), dieses Ergebnis ist jedoch nicht signifikant.

Ergebnisse einer Studie von Coustan-Smith et al. (2002) bestätigen diesen Trend. Hier wurden 718 Paare von Knochenmark- und Peripherblutproben vom jeweils gleichen Zeitpunkt auf MRD untersucht und verglichen.³⁸ Es zeigte sich, dass bei einer T-ALL Knochenmark durch Peripherblut ersetzt werden kann, da hier die Ergebnisse komplett übereinstimmten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei einer B-Linien-ALL ein positiver MRD-Befund im Peripherblut mit einem sehr hohen Rezidivrisiko assoziiert ist.

Nur 37 von 104 positiven Knochenmarkproben hatten jedoch eine entsprechende positive Peripherblutprobe. Folglich kann aufgrund einer MRD-negativen Peripherblutprobe bei einer non-T-ALL keine prognostische Aussage über das Rezidivrisiko gemacht werden.

6.3 Andere prognostische Faktoren

Außer der MRD-Last vor allo-SZT wurden noch andere krankheits- und therapieassoziierte Faktoren untersucht, die auf das ereignisfreie Überleben Einfluß

nehmen könnten. Zunächst wurden diese Faktoren unabhängig voneinander, dann in einer multivariaten Analyse betrachtet.

Der Immunphänotyp der ALL hat einen signifikanten Einfluß auf das EFS der Patienten. Nach unseren Daten hat die T-ALL mit einer Überlebenswahrscheinlichkeit von 74% im Vergleich zu der common-ALL (41%) und der pre-B-ALL (26%) die beste Prognose. Dies steht auf den ersten Blick im Gegensatz zu der Tatsache, dass Kinder mit Rezidiv einer T-ALL ein signifikant schlechteres EFS als Kinder mit einer B-Vorläufer ALL haben.⁶¹ Ungefähr 12% der Kinder mit neu diagnostizierter ALL haben einen T-Phänotyp. Dieser Immunphänotyp ist oft mit folgenden klinischen Merkmalen assoziiert: männliches Geschlecht, höheres Alter, Leukozytose und mediastinale Tumoren. Die T-Zell-Leukämie zählt somit zu den Hochrisiko-ALLs, hat jedoch bei einer intensiven Therapie ein ähnliches Outcome wie die B-Vorläufer ALL.^{86,115}

In vorliegender Studie wurden 12 von 17 T-ALL Patienten aufgrund von Hochrisikofaktoren bereits in CR1 transplantiert. 10 dieser 12 Patienten befanden sich am Ende des Beobachtungszeitraumes in kompletter klinischer Remission. Von den restlichen fünf Patienten waren zwei vor allo-SZT MRD-negativ, auch diese beiden befinden sich in kompletter Remission.

Auch HLA-Kompatibilität und Verwandtschaft zwischen Spender und Empfänger haben signifikanten Einfluß auf das EFS der Patienten. Die beste Prognose haben Empfänger eines HLA-identischen Transplantats, wobei Transplantationen von einem Familienspender prognostisch günstiger sind als Transplantationen eines unverwandten Spenders. Empfänger eines Transplantates mit einem HLA-Mismatch haben eine schlechtere Prognose, wobei nach unseren Daten eine Transplantation von einem unverwandten Spender signifikant besser ist als die eines verwandten Spenders ($p = 0,005$).

Es besteht also die Möglichkeit, bei Fehlen eines HLA-identischen Familienspenders auf einen identischen unverwandten Spender zurückzugreifen. Dies bestätigt auch die Studie von Gustafsson et al. (2000). Hier gleicht das Überleben von Patienten, die ein Transplantat eines identischen nichtverwandten Spenders (MUD) erhalten dem der Patienten, die ein Transplantat eines identischen verwandten Spenders (MSD) erhalten, obwohl das Risiko der Entwicklung einer GvHD bei einer MUD-Transplantation leicht erhöht ist.⁶⁰ Es ist heute zunehmend möglich, allogene Stammzelltransplantationen auch

dann durchzuführen, wenn nicht alle HLA-Merkmale übereinstimmen.⁴¹ Bei schweren Krankheitsverläufen ist eine schnelle Transplantation eines nur teilweise passenden Spenders oft einer verlängerten Suche nach einem HLA-identischen Spender vorzuziehen.¹⁰⁰

So besteht gemäß dem Therapieprotokoll ALL-REZ BFM 2002 für Patienten der Strategiegruppen S3 und S4, für die nach 2-3 Monaten noch kein passender Spender gefunden wurde, die Möglichkeit, eine Transplantation von einem unverwandten HLA-Mismatched-Spender oder von einem haploidenten Elternteil durchzuführen.

Auch die Art der Konditionierung hat einen entscheidenden Einfluß auf das Überleben. Dabei ist das Überleben der Patienten, die eine Konditionierung bestehend aus Cyclophosphamid plus Ganzkörperbestrahlung erhalten signifikant besser als das der Patienten, die Busulfan plus Cyclophosphamid als Konditionierung erhalten ($p < .001$). Dies entspricht den Ergebnissen verschiedener Studien, die trotz häufiger schwerer Spätfolgen einer Ganzkörperbestrahlung ein besseres Überleben und eine geringere transplantationsassoziierte Mortalität nach Konditionierung mit Ganzkörperbestrahlung fanden.^{31,40} Das Durchführen einer multivariaten Analyse dieser verschiedenen Parameter im Hinblick auf das ereignisfreie Überleben zeigt, dass die Art des Spenders ($p < .05$) und der MRD-Level vor allo-SZT ($p < .005$) von den anderen Einflußgrößen unabhängige Faktoren sind. Dabei ist der Einfluß des MRD-Levels vor allo-SZT auf das EFS mit einem p-Wert von $< .005$ hochsignifikant.

6.4 Ereignisfreies Überleben der in \geq CR2 transplantierten Patienten

6.4.1 MRD als prognostischer Faktor-Vergleich CR1 mit CR2/CR3

Von den insgesamt 108 Patienten, die untersucht wurden, wurden 53 in zweiter (CR2) und 20 Patienten in dritter kompletter Remission (CR3) transplantiert. Eine Studie von Woolfrey et al. (2002) zeigt, dass das leukämiefreie Überleben von Patienten, die in CR1 transplantiert werden, signifikant besser ist als das der in \geq CR2 transplantierten.¹³² Auch in unserer Studie zeigt sich ein Trend in diese Richtung, jedoch kein signifikanter Unterschied. Betrachtet man das EFS der Patienten nach Transplantation in zweiter oder dritter kompletter Remission, zeigt sich für die MRD-negativen eine gute Prognose mit einer Überlebensrate von 74%. Vergleicht man aber die „low-level MRD“ Gruppe der in CR1 transplantierten Patienten mit der „low-level MRD“ Gruppe der in CR2/CR3 transplantierten, fällt auf dass sich hier das Überleben erheblich unterscheidet. Eine MRD-Last $< 10^{-3}$ vor allo-SZT in CR2/3 hat mit einem pEFS von 0,29 eine ungünstige Prognose. Ein Fishers-t-Test zeigt zudem, dass erst ab einer MRD-Last $< 10^{-4}$ die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Rezidivs auf 50% absinkt.

Nach unseren Daten wäre eine allo-SZT für Patienten in \geq CR2 nur dann sinnvoll, wenn sie vor Transplantation eine MRD-Last $< 10^{-4}$ haben.

6.4.2 Bedeutung der MRD-Last vor allo-SZT für das Überleben der Strategiegruppen S2-S4

Die Strategiegruppen S1-S4 wurden aus den bekannten prognostischen Faktoren Zeitpunkt, Ort und Immunphänotyp des Rezidivs entwickelt. Sie ermöglichen eine sehr deutliche Diskriminierung der Überlebenswahrscheinlichkeiten. Die größte und heterogenste Gruppe S2 zeichnet sich durch eine intermediäre Prognose nach Chemotherapie aus. Ein Ziel der Therapieoptimierungsstudie ALL-REZ-BFM 2002 ist die Prüfung einer Stratifizierung in einen Zweig mit obligater allo-SZT bei positivem MRD-Befund ($\text{MRD} \geq 10^{-3}$) nach dem zweiten Therapieelement und Weiterführung der

Polychemo- und Dauertherapie bei negativem MRD-Befund. Hiermit soll eine Klärung der SZT-Indikation für die intermediäre Gruppe S2 erreicht werden.

In unserer Studie besteht innerhalb der Strategiegruppe S2 kein signifikanter Unterschied zwischen den MRD-Gruppen.

Die schlechteste Prognose haben Patienten der Gruppen S3 und S4. Sie haben gemäß der ALL-REZ BFM Studien 83-90 ein EFS unter 5% nach alleiniger Chemotherapie, deshalb wurde hier eine obligatorische SZT eingeführt.

In vorliegender Studie besteht für Patienten, die den Hochrisikogruppen S3 und S4 angehören, ein signifikanter Unterschied zwischen den MRD-Gruppen in Bezug auf das Überleben. Trotz ungünstiger Faktoren wie frühen oder sehr frühen kombinierten oder isolierten Knochenmarkrezidiven sowie Knochenmarkrezidiven einer T-ALL haben die Patienten der Gruppen S3/S4 bei MRD-negativem Befund vor allo-SZT eine günstige Prognose. Dies würde eine Reintensivierung der Therapie bei S3/S4 Patienten mit positivem MRD-Befund vor allo-SZT rechtfertigen.

Dasselbe gilt für Patienten mit sehr frühen und frühen Rezidiven unabhängig davon, ob sie der Strategiegruppe S2, S3 oder S4 angehören. Auch hier haben die MRD-negativen Patienten mit einem EFS von 75% eine signifikant bessere Überlebenschance nach allo-SZT als die MRD-positiven Patienten ($p = 0,013$)

7 Zusammenfassung

Die allo-SZT ist ein wesentliches Therapieelement in der Behandlung von Kindern mit ALL. Viele Kinder rezidivieren jedoch nach allo-SZT. Die Menge residueller Leukämieblasten (MRD) vor allo-SZT könnte einen entscheidenden prognostischen Parameter für diese Kinder darstellen. Wir haben retrospektiv den Zusammenhang zwischen der aus einer Knochenmark- oder Peripherblutprobe vor allo-SZT ermittelten MRD-Last und dem ereignisfreien Überleben nach SZT bei Kindern mit ALL untersucht.

108 Patienten, bei denen sowohl mindestens ein molekularer Marker gefunden wurde und außerdem genügend Untersuchungsmaterial vorhanden war, konnten in die Studie eingeschlossen werden. Bei 85 Patienten wurde der MRD-Befund aus dem Knochenmark erhoben, bei 23 Patienten aus dem Peripherblut. Im Median wurde MRD 15 Tage vor allo-SZT quantifiziert. Alle Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Transplantation in kompletter Remission: 35 in CR1, 53 in CR2 und 20 in CR3.

MRD wurde mittels real-time PCR bestimmt, wobei T-Zell-Rezeptor- und Immunglobulingenrearrangements als molekulare Marker dienten. Die Sensitivität lag bei 101 Patienten bei 10^{-4} , d.h. eine leukämische Zelle konnte unter 10 000 normalen Zellen erkannt werden.

Aufgrund des MRD-Befundes wurden die Patienten in die Gruppen MRD high-level ($\text{MRD} \geq 10^{-3}$), MRD low-level ($\text{MRD} < 10^{-3}$) und MRD-negativ eingeteilt. Von den 85 Patienten, bei denen MRD im Knochenmark bestimmt werden konnte, waren 33 Patienten MRD-negativ, 20 low-level positiv und 32 high-level positiv. Die 3-Jahres-Überlebensraten für diese Gruppen waren 79% (negativ), 44% (low-level) und 16% (high-level) ($p < .0001$). Eine multivariate Analyse bestätigt die Signifikanz des MRD-Status als unabhängigen prognostischen Faktor gegenüber den anderen prognostischen Faktoren Geschlecht und Remissionsstatus des Empfängers, HLA-Identität und Verwandtschaft des Spenders, Herkunft der Stammzelle, T-Zell-Depletion und Art der Konditionierung ($p < .005$).

Es besteht ein starker Zusammenhang zwischen MRD-Level vor allo-SZT und Outcome nach allo-SZT. Es können so zum einen die Patienten identifiziert werden, die trotz schlechter Prognose aufgrund Hochrisikofaktoren wie Zugehörigkeit zur

Strategiegruppe S3/4 oder sehr frühen und frühen Rezidiven von einer allo-SZT besonders profitieren.

Zum anderen werden die Patienten identifiziert, die ein hohes Risiko haben, nach allo-SZT zu rezidivieren. Es stellt sich die Frage, ob eine Transplantation bei einem MRD-Level $\geq 10^{-3}$ überhaupt sinnvoll ist. Hier werden neue therapeutische Strategien wie zusätzliche zytoreduktive Therapie vor allo-SZT oder präventive Immuntherapie nach allo-SZT diskutiert. Die Beobachtung, dass auch Kinder mit high-level MRD eine lang anhaltende Remission erreichen können spricht für einen GvL-Effekt, der entweder durch akute GvHD oder Immuntherapie erzielt werden kann.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die quantitative MRD-Detektion mittels RQ-PCR einen starken unabhängigen prognostischen Faktor liefert, der es erlaubt, die Höhe des Rezidivrisikos nach allo-SZT zu erkennen. Es scheint daher angebracht, groß angelegte prospektive Studien durchzuführen, die zum einen eine Stratifizierung gemäß MRD-Level vor allo-SZT beinhalten und zum anderen für Patienten in bestimmten MRD-Gruppen Therapiemodifikationen vorsehen. Ziel ist es, anhand solcher Studien zu bestätigen, dass aufgrund des MRD-Levels vor allo-SZT wichtige therapeutische Entscheidungen getroffen werden können.

8 Literaturverzeichnis

- (1) www.imgt.cines.fr/textes/vquest. 2004.
- (2) www.krebsinfo.de/ki/awmf/paed_onk/15_ponk-211.html. 2004.
- (3) Alt FW, Baltimore D. Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79:4118-4122.
- (4) Ash RC, Casper JT, Chitambar CR, et al. Successful allogeneic transplantation of T-cell-depleted bone marrow from closely HLA-matched unrelated donors. *N Engl J Med*. 1990;322:485-94.
- (5) Bader P, Beck J, Frey A et al. 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*. 1998;21:487-495.
- (6) Bader P, Beck J, Schlegel PG et al. Additional immunotherapy on the basis of increasing mixed hematopoietic chimerism after allogeneic BMT in children with acute leukemia: is there an option to prevent relapse? *Bone Marrow Transplant*. 1997;20(1):79-81.
- (7) Bader P, Hancock J, Kreyenberg H et al. Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL. *Leukemia*. 2002;16:1668-1672.
- (8) Bader P, Holle W, Klingebiel T et al. 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*. 1997;19:697-702.
- (9) Bader P, Klingebiel T, Schaudt A et al. 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*. 1999;13(12):2079-2086.
- (10) Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W et al. 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*. 2004;22:1696-705.
- (11) Bader P, Stoll K, Huber S et al. 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*. 2000;108(4):761-768.
- (12) Barrett A, Horowitz M, Pollock B et al. Bone marrow transplants from HLA-identical siblings as compared with chemotherapy for children with acute lymphoblastic leukemia in a second remission. [abstract]. *N Engl J Med*. 1994;331:1258-1262.
- (13) Barrett AJ, Horowitz MM, Gale RP et al. Marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia: Factors affecting relapse and survival. *Blood*. 1989;74:862-871.
- (14) Baruchel A, Cayuela JM, MacIntyre E, Berger R, Sigaux F. 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*. 1995;90:85-93.

- (15) Bearman SI, Appelbaum FR, Buckner CD et al. Regimen-related toxicity in patients undergoing bone marrow transplantation. *J Clin Oncol.* 1988;6:1562-1568.
- (16) Beatty PG, Clift RA, Mickelson EM, et al. Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings. *N Engl J Med.* 1985;313:765-771.
- (17) Beck JF, Klingebiel T, Kreyenberg H et al. Relapse of childhood ALL, AML and MDS after allogeneic stem cell transplantation can be prevented by donor lymphocyte infusion in a critical stage of increasing mixed chimerism. *Klin Padiatr.* 2002;214(4):201-205.
- (18) Beishuizen A, de Bruijn MA, Pongers-Willems MJ et al. Heterogeneity in junctional regions of immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in B cell leukemias: a new molecular target for detection of minimal residual disease. *Leukemia.* 1997;11:2200-7.
- (19) Beishuizen A, Hahlen K, Hagemeyer A et al. Multiple rearranged immunoglobulin genes in childhood acute lymphoblastic leukemia of precursor B-cell origin. *Leukemia.* 1991;5:657-667.
- (20) Beishuizen A, Verhoeven MA, Mol EJ, van Dongen JJ. Detection of immunoglobulin kappa light-chain gene rearrangement patterns by Southern blot analysis. *Leukemia.* 1994;8:2228-2236.
- (21) Beishuizen A, Verhoeven MA, van Wering ER et al. Analysis of Ig and T-cell receptor genes in 40 childhood acute lymphoblastic leukemias at diagnosis and subsequent relapse: implications for the detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction analysis. *Blood.* 1994;83:2238-2247.
- (22) Bender-Götze C, Walther JU, Rampf U et al. Besonderheiten der akuten Leukämien im Kindesalter. In *Manual Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome*, Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München, 2003; 77-79.
- (23) Bene MC, Castoldi G, Knapp W et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). [abstract]. *Leukemia.* 1995;9(10):1783-1786.
- (24) Bird J, Galili N, Link M, Stites D, Sklar J. Continuing rearrangement but absence of somatic hypermutation in immunoglobulin genes of human B cell precursor leukemia. *J Exp Med.* 1988;168:229-245.
- (25) Borst J, Wicherink A, Van Dongen JJ et al. Non-random expression of T cell receptor gamma and delta variable gene segments in functional T lymphocyte clones from human peripheral blood. *Eur J Immunol.* 1989;19:1559-1568.
- (26) Breit TM, Beishuizen A, Ludwig WD et al. tal-1 deletions in T-cell acute lymphoblastic leukemia as PCR target for detection of minimal residual disease. *Leukemia.* 1993;7:2004-11.
- (27) Breit TM, Mol EJ, Wolvers-Tettero IL et al. Site-specific deletions involving the tal-1 and sil genes are restricted to cells of the T cell receptor alpha/beta lineage: T cell receptor delta gene deletion mechanism affects multiple genes. *J Exp Med.* 1993;177:965-77.
- (28) Breit TM, Wolvers-Tettero IL, Beishuizen A et al. Southern blot patterns, frequencies, and junctional diversity of T-cell receptor-delta gene rearrangements in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1993;82:3063-3074.
- (29) Breit TM, Wolvers-Tettero IL, Hahlen K, van Wering ER, van Dongen JJ. Extensive junctional diversity of gamma delta T-cell receptors expressed by T-cell acute lymphoblastic

- leukemias: implications for the detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 1991;5:1076-1086.
- (30) Bruggemann M, Droese J, Bolz I et al. Improved assessment of minimal residual disease in B cell malignancies using fluorogenic consensus probes for real-time quantitative PCR. *Leukemia*. 2000;14:1419-1425.
- (31) Bunin N, Aplenc R, Kamani N et al. Randomized trial of busulfan vs total body irradiation containing conditioning regimens for children with acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Blood and Marrow Transplant Consortium study. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32:543-8.
- (32) Carreras E, Bertz H, Arcese W et al. Incidence and outcome of hepatic veno-occlusive disease after blood or marrow transplantation: a prospective cohort study of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. European Group for Blood and Marrow Transplantation Chronic Leukemia Working Party. *Blood*. 1998;92(10):3599-3604.
- (33) Champlin RE, Horowitz MM, van Bekkum DW, et al. Graft failure following bone marrow transplantation for severe aplastic anaemia: Risk factors and treatment results. *Blood*. 1989;73:606-613.
- (34) Chen Z, Font MP, Loiseau P et al. The human T-cell V gamma gene locus: cloning of new segments and study of V gamma rearrangements in neoplastic T and B cells. *Blood*. 1988;81:2386-2393.
- (35) Choi Y, Greenberg SJ, Du TL et al. Clonal evolution in B-lineage acute lymphoblastic leukemia by contemporaneous VH-VH gene replacements and VH-DJH gene rearrangements. *Blood*. 1996;87:2506-12.
- (36) Cook GP, Tomlinson IM. The human immunoglobulin VH repertoire. *Immunol Today*. 1995;16:237-242.
- (37) Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;96:2691-2696.
- (38) Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML et al. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002;100:2399-402.
- (39) d'Auriol L, Macintyre E, Galibert F, Sigaux F. In vitro amplification of T cell gamma gene rearrangements: a new tool for the assessment of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia*. 1989;3:155-158.
- (40) Davies SM, Ramsay NK, Klein JP et al. Comparison of preparative regimens in transplants for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2004;18:340-7.
- (41) Davies SM, Shu XO, Blazar BR et al. Unrelated donor bone marrow transplantation: influence of HLA A and B incompatibility on outcome. *Blood*. 1995;86:1636-42.
- (42) de Haas V, Verhagen OJ, von dem Borne AE et al. Quantification of minimal residual disease in children with oligoclonal B-precursor acute lymphoblastic leukemia indicates that the clones that grow out during relapse already have the slowest rate of reduction during induction therapy. *Leukemia*. 2001;15:134-140.
- (43) Dini G, Cornish JM, Gardner H et al. Bone marrow transplant indications for childhood leukemias: achieving a consensus. [abstract]. *Bone Marrow Transplant*. 1996;18 Suppl 2:4-7.

- (44) Ebell W, Reiter A, and Riehm H. Chemotherapy versus bone marrow transplantation in childhood acute lymphoblastic leukaemia. BFM study group. [abstract]. *Eur J Pediatr*. 1992;151 Suppl 1:50-54.
- (45) Epstein RB, Storb R, Clift RA, Thomas ED. Transplantation of stored allogeneic bone marrow in dogs selected by histocompatibility typing. *Transplantation*. 1969;8:496-501.
- (46) Feig SA, Harris RE, and Sather HN. Bone marrow transplantation versus chemotherapy for maintenance of second remission of childhood acute lymphoblastic leukemia: a study of the Children's Cancer Group (CCG-1884). [abstract]. *Med Pediatr Oncol*. 1997;29(6):534-540.
- (47) Felix CA, Wright JJ, Poplack DG et al. T cell receptor alpha-, beta-, and gamma-genes in T cell and pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 1987;80:545-556.
- (48) Ferrara JL, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 1991;324(10):667-674.
- (49) Fondell JD, Marolleau JP, Primi D, Marcu KB. On the mechanism of non-allelically excluded V alpha-J alpha T cell receptor secondary rearrangements in a murine T cell lymphoma. *J Immunol*. 1990;144:1094-1103.
- (50) Ford CE, Hamerton JL, Barnes DWH, Loutit JF. Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature*. 1956;177:452-454.
- (51) Forman SJ, Krance RA, O'Donnell MR et al. Bone marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukemia during first complete remission [abstract]. *Transplantation*. 1987;43:650-653.
- (52) Frassoni F, Labopin M, Gluckman E et al. Results of allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia have improved in Europe with time--a report of the acute leukemia working party of the European group for blood and marrow transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant*. 1996;17:13-18.
- (53) Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet*. 1968;2:1366-1369.
- (54) Gianni AM, Siena S, Bregni M et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to harvest circulating haemopoietic stem cells for autotransplantation. *Lancet*. 1989;2:580-585.
- (55) Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 1989;321:1174-1178.
- (56) Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. *N Engl J Med*. 1997;337:373-381.
- (57) Goldman JM, Horowitz MM. The international bone marrow transplant registry. *Int J Hematol*. 2002;76 Suppl 1:393.
- (58) Goulden N, Bader P, Van Der Velden V et al. Minimal residual disease prior to stem cell transplant for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2003;122:24-9.
- (59) Goulden N, Oakhill A, Steward C. Practical application of minimal residual disease assessment in childhood acute lymphoblastic leukaemia annotation. *Br J Haematol*. 2001;112:275-81.

-
- (60) Gustafsson A, Remberger M, Winiarski J, Ringden O. Unrelated bone marrow transplantation in children: outcome and a comparison with sibling donor grafting. *Bone Marrow Transplant.* 2000;25:1059-65.
- (61) Henze G. Chemotherapy for relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Pediatr Hematol Oncol.* 1997;5:199-213.
- (62) Hieter PA, Korsmeyer SJ, Waldmann TA, Leder P. Human immunoglobulin kappa light-chain genes are deleted or rearranged in lambda-producing B cells. *Nature.* 1981;290:368-372.
- (63) Hoelzer D, Gokbuget N, Ottmann O et al. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program).* 2002;162-192.
- (64) Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood.* 1990;75:555-562.
- (65) Huck S, Lefranc MP. Rearrangements to the JP1, JP and JP2 segments in the human T-cell rearranging gamma gene (TRG gamma) locus. *FEBS Lett.* 1987;224:291-296.
- (66) Jacobson LO, Marks EK, Robson MJ et al. Effect of spleen protection on mortality following x-irradiation. *J Lab Clin Med* 1949;34:1538-43.
- (67) Jonsson OG, Kitchens RL, Scott FC, Smith RG. Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin hypervariable region specific oligonucleotide probes. *Blood.* 1990;76:2072-2079.
- (68) Kitamura D, Rajewsky K. Targeted disruption of mu chain membrane exon causes loss of heavy-chain allelic exclusion. *Nature.* 1992;356:154-156.
- (69) Knechtli CJ, Goulden NJ, Hancock JP et al. 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.* 1998;92:4072-9.
- (70) Krejci O, van der Velden VH, Bader P et al. Level of minimal residual disease prior to haematopoietic stem cell transplantation predicts prognosis in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia: a report of the Pre-BMT MRD Study Group. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32:849-51.
- (71) Langerak AW, Szczepanski T, van der Burg M, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJ. Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia.* 1997;11:2192-9.
- (72) Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst.* 1951;12:197-201.
- (73) Mackinnon S, Barnett L, Heller G, O'Reilly RJ. Minimal residual disease is more common in patients who have mixed T-cell chimerism after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 1994;83:3409-3416.
- (74) Marolleau JP, Fondell JD, Malissen M et al. The joining of germ-line V alpha to J alpha genes replaces the preexisting V alpha-J alpha complexes in a T cell receptor alpha, beta positive T cell line. *Cell.* 1988;55:291-300.
- (75) McDonald GB, Hinds MS, Fisher LD et al. Veno-occlusive disease of the liver and multiorgan failure after bone marrow transplantation: a cohort study of 355 patients. *Ann Intern Med.* 1993;118(4):255-267.

- (76) Meyers JD, Flournoy N, Thomas ED. Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation. *J Infect Dis.* 1986;153:478-488.
- (77) Molloy K, Goulden N, Lawler M et al. Patterns of hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation for childhood acute lymphoblastic leukemia from volunteer unrelated donors. *Blood.* 1996;87:3027-3031.
- (78) Moppett J, Burke GA, Steward CG, Oakhill A, Goulden NJ. The clinical relevance of detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J Clin Pathol.* 2003;56:249-253.
- (79) Oakhill A, Pamphilon DH, Potter MN et al. Unrelated donor bone marrow transplantation for children with relapsed acute lymphoblastic leukaemia in second complete remission. *Br J Haematol.* 1996;94:574-578.
- (80) Oliveira JS, Kerbauy FR, Colombo AL et al. Fungal infections in marrow transplant recipients under antifungal prophylaxis with fluconazole. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35(7):789-798.
- (81) Ottinger HD, Muller CR, Goldmann SF et al. Second German consensus on immunogenetic donor search for allotransplantation of hematopoietic stem cells. *Ann Hematol.* 2001;80(12):706-14.
- (82) Park SJ, Min WS, Yang IH et al. Effects of mixed chimerism and immune modulation on GVHD, disease recurrence and survival after HLA-identical marrow transplantation for hematologic malignancies. *Korean J Intern Med.* 2000;15(3):224-231.
- (83) Pongers-Willems MJ, Seriu T, Stolz F et al. 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 leukemia. *Leukemia.* 1999;13:110-8.
- (84) Pongers-Willems MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ et al. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia.* 1998;12:2006-2014.
- (85) Popat U, Carrum G, Heslop HE. Haemopoietic stem cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Treatment Reviews.* 3 A.D.;29:3-10.
- (86) Pui CH. Childhood leukemias. *N Engl J Med.* 1995;332:1618-1630.
- (87) Pulla B, Barri YM, Anaissie E. Acute renal failure following bone marrow transplantation. *Ren Fail.* 1998;20(3):421-435.
- (88) Ramirez M, Diaz MA, Garcia-Sanchez F et al. Chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1996;18:1161-1165.
- (89) Ravetch JV, Siebenlist U, Korsmeyer S, Waldmann T, Leder P. Structure of the human immunoglobulin mu locus: characterization of embryonic and rearranged J and D genes. *Cell.* 1981;27:583-591.
- (90) Ringden O, Hermans J, Labopin M et al. The highest leukaemia-free survival after allogeneic bone marrow transplantation is seen in patients with grade I acute graft-versus-host disease. Acute and Chronic Leukaemia Working Parties of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Leuk Lymphoma.* 1996;24:71-9.

-
- (91) Rivera G, Pinkel D, Simone J, Hancock M, Christ W. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. 30 Years' Experience at St. Jude Children's Hospital. *N Engl J Med.* 1993;329:1289-1295.
- (92) Schroeder H, Jr HJL, Perlmutter RM. Early restriction of the human antibody repertoire. *Science.* 1987;238:791-793.
- (93) Schwartz RS. Jumping genes and the immunoglobulin V gene system. *N Engl J Med.* 1995;333:42-44.
- (94) Shepherd JD, Pringle LE, Barnett MJ et al. Mesna versus hyperhydration for the prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in bone marrow transplantation. *J Clin Oncol.* 1991;9:2016-2020.
- (95) Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL et al. Chronic graft versus host syndrome in man, a long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Amer J Med.* 1980;69:204-217.
- (96) Silverman LB and Weinstein HJ. Treatment of childhood leukemia [abstract]. *Curr Opin Oncol.* 1997;9(1):26-33.
- (97) Siminovitch KA, Bakhshi A, Goldman P, Korsmeyer SJ. A uniform deleting element mediates the loss of kappa genes in human B cells. *Nature.* 1985;316:260-262.
- (98) Snyder D, Blume K, and Chao N. Fractionated total body irradiation (fTBI) and etoposide (VP-16): an effective preparative regimen for allogeneic bone marrow transplantation (BMT) for patients with leukemia in first complete remission (CR). [abstract]. *Proc ASCO.* 1991;10.
- (99) Soiffer RJ, Murray C, Mauch P et al. Prevention of graft-versus-host disease by selective depletion of CD6-positive T-lymphocytes from donor bone marrow. *J Clin Oncol.* 1992;10:1191-1200.
- (100) Souillet G, Rey S, Bertrand Y et al. Outcome of unrelated bone marrow donor searches in 174 children resulting in 45 patients transplanted in the HLA-matched and -mismatched situation. *Bone Marrow Transplant.* 2000;26:31-43.
- (101) Steenbergen EJ, Verhagen OJ, van den Berg H et al. Rearrangement status of the malignant cell determines type of secondary IgH rearrangement (V-replacement or V to DJ joining) in childhood B precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 1997;11:1258-65.
- (102) Steenbergen EJ, Verhagen OJ, van Leeuwen EF, von dem Borne AE, van der Schoot CE. Distinct ongoing Ig heavy chain rearrangement processes in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1993;82:581-9.
- (103) Stewart AK, Schwartz RS. Immunoglobulin V regions and the B cell. *Blood.* 1994;7:1717-1730.
- (104) Storb R, Prentice RL, Thomas ED, et al. Factors associated with graft rejection after HLA-identical marrow transplantation for aplastic anaemia. *Br J Haematol.* 1983;55:573-585.
- (105) Storb R, Weiden PL, Sullivan KM, et al. Second marrow transplants in patients with aplastic anaemia rejecting the first graft: use of a conditioning regimen including cyclophosphamide and antithymocyte globulin. *Blood.* 1987;70:116-121.
- (106) Sullivan KM, Weiden PL, Storb R et al. Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on relapse and survival after bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment of acute and chronic leukemia. *Blood.* 1989;73:1720-1728.

- (107) Szczepanski T, Orfao A, van der Velden VH, San Miguel JF, van Dongen JJ. Minimal residual disease in leukaemia patients. *Lancet Oncol.* 2001;2:409-417.
- (108) Thomas ED, Buckner CD, Banaji M et al. One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood.* 1977;49:511-533.
- (109) Thomas ED, Collins JA, Herman EC Jr, Ferrebee JW. Marrow transplants in lethally irradiated dogs given methotrexate. *Blood.* 1962;19:217-228.
- (110) Thomas ED, Flournoy N, Buckner CD, et al. Cure of leukemia by marrow transplantation. *Leuk Res.* 1977;1:67-70.
- (111) Thomas ED, Lochte HL Jr, Cannon JH et al. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest.* 1959;38:1709-1716.
- (112) Tomlinson IM, Walter G, Marks JD, Llewelyn MB, Winter G. The repertoire of human germline VH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops. *J Mol Biol.* 1992;227:776-798.
- (113) Torres A, Martinez F, Gomez P et al. Allogeneic bone marrow transplantation versus chemotherapy in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia in second complete remission. [abstract]. *Bone Marrow Transplant.* 1989;4(6):609-612.
- (114) Tumkaya T, van der Burg M, Garcia Sanz R et al. Immunoglobulin lambda isotype gene rearrangements in B cell malignancies. *Leukemia.* 2001;15:121-127.
- (115) Uckun FM, Sensel MG, Sun L et al. Biology and treatment of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1998;91:735-46.
- (116) Uderco C and Balduzzi A. Allogeneic bone marrow transplantation versus chemotherapy in childhood very high risk acute lymphoblastic leukemia in first complete remission: a controversial issue. [abstract]. *Haematologica.* 2002;87 (8Suppl):47-50.
- (117) Uderzo C, Dini G, Locatelli F, Miniero R, and Tamaro P. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia after the first relapse: curative strategies. [abstract]. *Haematologica.* 2000;85(11 Suppl):47-53.
- (118) Uzunel M, Mattsson J, Jaksch M, Remberger M, Ringden O. The significance of graft-versus-host disease and pretransplantation minimal residual disease status to outcome after allogeneic stem cell transplantation in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2001;98:1982-4.
- (119) van der Velden VH, Jacobs DC, Wijkhuijs AJ et al. Minimal residual disease levels in bone marrow and peripheral blood are comparable in children with T cell acute lymphoblastic leukemia (ALL), but not in precursor-B-ALL. *Leukemia.* 2002;16:1432-6.
- (120) van der Velden VH, Joosten SA, Willemse MJ et al. Real-time quantitative PCR for detection of minimal residual disease before allogeneic stem cell transplantation predicts outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2001;15:1485-1487.
- (121) van Dongen JJ, Adriaansen HJ. Immunobiology of leukemia. In: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF (eds). *Leukemia*, 6th edition. Philadelphia: WB Saunders Company; 1996:83-130.
- (122) van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grümayer ER et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet.* 1998;352:1731-1738.

- (123) van Dongen JJ, Wolvers-Tettero IL. 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*. 1991;198:93-174.
- (124) van Dongen JJ, Wolvers-Tettero IL, Wassenaar F, Borst J, van den Elsen P. Rearrangement and expression of T-cell receptor delta genes in T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Blood*. 1989;74:334-342.
- (125) Verhagen OJ, Willemse MJ, Breunis WB et al. Application of germline IGH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2000;14:1426-1435.
- (126) Vogelsang GB, Hess AD. Graft-versus-host disease: New directions for a persistent problem. *Blood*. 1994;84:2061-2067.
- (127) Waldmann TA, Davis MM, Bongiovanni KF, Korsmeyer SJ. Rearrangements of genes for the antigen receptor on T cells as markers of lineage and clonality in human lymphoid neoplasms. *N Engl J Med*. 1985;313:776-783.
- (128) Wasserman R, Yamada M, Ito Y et al. VH gene rearrangement events can modify the immunoglobulin heavy chain during progression of B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1992;79:223-8.
- (129) Weisdorf DJ, Bostrom B, Raether D et al. Oropharyngeal mucositis complicating bone marrow transplantation: prognostic factors and the effect of chlorhexidine mouth rinse. *Bone Marrow Transplant*. 1989;4:89-95.
- (130) Weisdorf DJ, Woods WG, Nesbit ME et al. Allogeneic bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukaemia: risk factors and clinical outcome. *Br J Haematol*. 1994;86:62-9.
- (131) Wheeler K, Richards S, Bailey C, Chessells J. Comparison of bone marrow transplant and chemotherapy for relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia: the MRC UKALL X experience. Medical Research Council Working Party on Childhood Leukaemia. *Br J Haematol*. 1998;101:94-103.
- (132) Woolfrey AE, Anasetti C, Storer B et al. Factors associated with outcome after unrelated marrow transplantation for treatment of acute lymphoblastic leukemia in children. *Blood*. 2002;99:2002-8.
- (133) Wright JJ, Poplack DG, Bakhshi A et al. Gene rearrangements as markers of clonal variation and minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 1987;5:735-741.
- (134) Yamada M, Hudson S, Tournay O et al. Detection of minimal disease in hematopoietic malignancies of the B-cell lineage by using third-complementarity-determining region (CDR-III)-specific probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:5123-5127.
- (135) Yancopoulos GD, Blackwell TK, Suh H, Hood L, Alt FW. Introduced T cell receptor variable region gene segments recombine in pre-B cells: evidence that B and T cells use a common recombinase. *Cell*. 1986;44:251-259.
- (136) Yumura-Yagi K, Hara J, Horibe K et al. Outcome after relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. [abstract]. *Int J Hematol*. 2002;76(1):61-68.

9 Abkürzungsverzeichnis

ALL	akute lymphatische Leukämie
aGVH	akute Graft-versus-Host Reaktion
allo-SZT	allogene-Stammzelltransplantation
APS	Ammoniumpersulfat
AR	autologe Rekonstitution
ASO	allelspezifisches Oligonukleotid
ATG	Antithymozytenglobulin
BFM	Berlin Frankfurt Münster
bp	Basenpaare
Bus	Busulfan
CC	vollständiger Chimärismus
CCR	complete clinical remission
CDR3	third complementary region
CMV	Cytomegalievirus
CR	komplette Remission
CR1	erste komplette Remission
CR2	zweite komplette Remission
CR3	dritte komplette Remission
CSA	Cyclosporin A
CSAab	vorzeitiges Absetzen von Cyclosporin A
Ct	Cycle threshold
Cyc	Cyclophosphamid
Dd	D (diversity) Segment der Deltakette des TZR
ddNTP	Didesoxynucleotide
DLA	dog-leukocyte-antigen
DLI	Donor Lymphocyten Infusion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotide
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
EBMT	European Group for Blood and Marrow Transplantation
EFS	ereignisfreies Überleben
Eto	Etoposid
EtOH	Ethanol
F-Primer	Forward-Primer

Flu	Fludarabin
FR3 A	third framework region
G-CSF	granulocyte-colony-stimulating-factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GVHchron	chronische Graft-versus-Host Reaktion
GvHD	Graft versus Host-Erkrankung
GvL	Graft-versus-Leukämie
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HR	high-risk
IgH	schwere Kette der Immunglobuline
IGK	kappa Leichtkette
IgL	leichte Kette der Immunglobuline
in-MC	zunehmender gemischter Chimärismus
IT	Immuntherapie
Jd	J (joining) Segment der Deltakette des TZR
Jg	J (joining) Segment der Gammakette des TZR
JH	J (joining) Segment der schweren Kette
kde	kappa-deleting-element
KI	Konfidenzintervall
KM	Knochenmark
MC	gemischter Chimärismus
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MMFD	mismatched family donor
MNC	mononukleäre Zellen
MRD	minimale Resterkrankung
mRNA	messenger-RNA
MSD	matched sibling donor
MTX	Methotrexat
MUD	matched unrelated donor
NaAc	Natriumacetat
NS	Nabelschnurblut
NTC	no template control
OKT 3	Anti-CD3-Antikörper
PB	Peripherblut
PBS	phosphat buffered saline (Phosphatpuffer)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pEFS	Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens

Phän	Phänotyp
PPR	prednisone poor response
pre-B-ALL	präkursor-B-Zell ALL
Pred	Prednisolon
R-Primer	Reverse-Primer
RAG	recombinase activating genes
REZ	Rezidiv
rlps	Rezidiv
RNA	Ribonukleinsäure
RNA	normalisierter Reporter
RQ-PCR	real-time quantitative PCR
RSS	Recombinations Signal Sequenz
SZT	Stammzelltransplantation
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBI	Ganzkörperbestrahlung
Tdepl	T-Zell-Depletion
TdT	Terminaldesoxynucleotidyltransferase
Temed	Tetramethyl-ethylenediamin
Thio	Thiotepa
TRM	transplantationsassoziierte Mortalität
TZR	T-Zell Rezeptor
UNG	Uracil-N-Glycosylase
UPN	Patientennummer
Vd	V (variables) Segment der Deltakette des TZR
Vg	V (variables) Segment der Gammakette des TZR
VH	variabler Anteil der schweren Kette
Vk	V (variabler) Anteil der leichten Kappakette
VNTR	variable number of tandem repeats
VOD	veno-occlusive disease
ZNS	zentrales Nervensystem

Lebenslauf

Name: Carmen Roth

Geburtsdatum: 07.03.1979

Geburtsort: Balingen

Schulbildung: **1985-1989** Grundschule Meßstetten
1989-1995 Progymnasium Meßstetten
1995-1998 Allgemeines Gymnasium Albstadt
Juni 1998 Abitur

Studium: **Oktober 1998-Mai 2006** Studium der Humanmedizin an
der Eberhard Karls Universität Tübingen
September 2000 Ärztliche Vorprüfung
September 2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002 Annahme der Dissertation
April 2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2005-Mai 2006 Praktisches Jahr am
Kreiskrankenhaus Böblingen
19.05.2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere danke ich Herrn Professor Dr. P. Bader sehr herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, für die optimale Betreuung und die sehr motivierende Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. Kreyenberg für die hervorragende Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die jederzeit freundliche und unermüdliche Anleitung und Hilfestellung bei den Laboruntersuchungen.

Ein großer Dank gilt den gesamten Mitarbeitern des Chimärismuslabors für die gute Zusammenarbeit, die immerwährende Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Zum Schluß möchte ich meiner Mutter, meinen Schwestern Heike und Anja und meinem Freund Uli für Geduld, Unterstützung und Aufmunterung während der langen Zeit der Fertigstellung dieser Arbeit danken!