

Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
Abteilung für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
Direktor: Prof. Dr. R. Schneppenheim

**Minimal Residual Disease Status
direkt vor und zu verschiedenen Zeitpunkten
nach Stammzelltransplantation
bei Akuter Lymphatischer Leukämie im Kindesalter**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von
Katrin Schröder
aus Wismar
Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 19.08.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:	Prof. Dr. H. Kabisch
---	----------------------

Prüfungsausschuss, 2 Gutachter/in:	Prof. Dr. A. R. Zander
------------------------------------	------------------------

Prüfungsausschuss, 3 Gutachter/in:	Prof. Dr. N. Kröger
------------------------------------	---------------------

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	7
1.1	MRD - DEFINITION UND NACHWEISMÖGLICHKEITEN	7
1.2	MOLEKULARE GRUNDLAGEN DER MRD BESTIMMUNG – DAS REARRANGEMENT	10
1.3	PROGNOSTISCHE RELEVANZ VON MRD FÜR DIE ERSTTHERAPIE DER ALL	13
1.4	KLINISCHE RELEVANZ VON MRD FÜR DIE REZIDIVTHERAPIE	15
1.5	STAMMZELLTRANSPLANTATION	16
1.5.1	Grundlagen, Risiken und Komplikationen	16
1.5.2	Indikation zur SZT nach COALL- und BFM-Rezidiv Studienprotokoll	20
2	ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	23
3	PATIENTEN UND MATERIAL	24
4	METHODEN	27
4.1	ISOLIERUNG MONONUKLEÄRER ZELLEN AUS DEM KNOCHENMARKSPUNKTAT	28
4.2	DNA ISOLIERUNG	29
4.3	IDENTIFIZIERUNG PATIENTENSPEZIFISCHER SEQUENZEN	30
4.4	POLYMERASE-KETTEN-REAKTION – ERSTE PCR	32
4.5	AUSTESTUNG DER SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT FÜR DIE ASO-PCR	34
4.6	ZWEITE PCR – ASO-PCR	36
5	ERGEBNISSE	38
5.1	KLON-SPEZIFISCHE REARRANGEMENTS	38
5.2	PATIENTENGRUPPE A: HOCH MRD POSITIVE VOR SZT	46
5.3	PATIENTENGRUPPE B: GERING MRD POSITIV BZW. NEGATIV VOR SZT	48
5.4	PATIENTEN MIT T(9;22) PH ⁺ ALL	50
5.5	KAPLAN-MEIER LIFETABLE	51
5.6	ZEITLICHER ABSTAND ZWISCHEN PUNKTION UND TRANSPLANTATION	53
5.7	MRD NACH SZT	54
6	DISKUSSION	56
6.1	PROGNOSTISCHE RELEVANZ VON MRD	56
6.1.1	MRD vor SZT	56
6.1.2	Punktionszeitpunkt vor SZT	57
6.1.3	MRD nach SZT	57
6.2	MRD UND GvL-REAKTION	58
6.2.1	Sukzessive MRD Elimination als Ausdruck der GvL-Reaktion	58
6.2.2	Ansatzpunkte für zukünftige Untersuchungen	59
6.3	NACHWEISMETHODEN UND NACHWEISGRENZEN	61
6.4	KLINISCHE ANWENDUNG VON MRD	62

6.5	FAZIT.....	65
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	66
8	REFERENZEN	68
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	82
10	GLOSSAR.....	83
11	DANKSAGUNG	85
12	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	86

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Immunglobulin IgG.....	11
Abbildung 2	Rearrangement IGH und klonale Proliferation.....	12
Abbildung 3	Zweite Stratifizierung in Abhängigkeit vom PVA-Score nach COALL 97	21
Abbildung 4	Übersicht über die Reihenfolge der Arbeitsschritte	28
Abbildung 5	Verwendete Reagenzien zur Isolierung mononukleärer Zellen aus dem Knochenmark.....	29
Abbildung 6	Verwendete Reagenzien zur Isolierung der DNA	30
Abbildung 7	Vorgehen bei der Auswahl eines allel-spezifischen Oligonukleotid- Primers.....	31
Abbildung 8	Zusammensetzung des Ansatzes für die erste PCR	32
Abbildung 9	Einfluss der Temperatur auf Spezifität und Sensitivität	35
Abbildung 10	Einfluss der Zyklenzahl auf die Sensitivität und Spezifität.....	36
Abbildung 11	Agarosegel der ersten PCR, der ASO-PCR sowie der Kontroll- PCR für das TRZD Rearrangement des Patienten 26	37
Abbildung 12	MRD-Profil der Patienten hoch MRD positiv vor SZT	47
Abbildung 13	MRD-Profil der Patienten niedrig MRD positiv oder negativ vor SZT.	49
Abbildung 14	Kaplan-Meier Lifetable	52
Abbildung 15	Relevanz des Zeitpunktes der Punktion vor SZT	54

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Immunphänotypen der Akuten Lymphatischen Leukämie	8
Tabelle 2	Erste Stratifizierung nach Risikofaktoren	20
Tabelle 3	Definition der Therapiegruppen im Rahmen der ALL-Rezidiv-BFM- Studie 1995.....	22
Tabelle 4	Definition des Zeitpunktes des Rezidives	22
Tabelle 5	Patienten mit SZT in erster Remission.....	25
Tabelle 6	Patienten mit SZT in zweiter Remission	26
Tabelle 7	Primerkombinationen für die 1.PCR.....	33
Tabelle 8	Ergebnisse	39
Tabelle 9	Patienten mit einer t(9;22) Ph ⁺ ALL.....	51
Tabelle 10	Zeitspanne zwischen erstem MRD Nachweis nach SZT und Rezidiv	55

1 EINLEITUNG

1.1 MRD - Definition und Nachweismöglichkeiten

Minimal Residual Disease (MRD) ist definiert als die Menge an Leukämiezellen, die im Knochenmark eines Patienten in Remission submikroskopisch durch die heute zur Verfügung stehenden Methoden nachweisbar ist. Eine Remission liegt vor, wenn im Knochenmarkausstrich mikroskopisch weniger als 5% Blasten zu sehen sind.

Eine Leukämie ist eine bösartige Erkrankung der weißen Blutkörperchen hervorgerufen durch klonale Proliferation unreifer Vorläuferzellen während der Hämatopoese. Diese durch fortwährende Teilung aus einer einzigen Zelle hervorgehenden Leukämiezellen sind genetisch identisch aber unterliegen einer verstärkten klonalen Evolution durch Genumlagerungen. Sie werden als Zellklone bezeichnet. Diese Zellen weisen einerseits einen Verlust und andererseits auch einen Gewinn an spezifischen Zellfunktionen auf. Durch ungehemmte Zellteilung akkumulieren sie im Knochenmark und verdrängen gesunde Zellen der anderen Blutzellreihen. Dies führt zu einer Knochenmarkinsuffizienz mit Blutungen oder Infektionen als tödliche Folgen.

In Deutschland erkranken jährlich etwa 500 Kinder und Jugendliche an akuter lymphatischer Leukämie, ALL. Der Altersgipfel der Erkrankungshäufigkeit liegt zwischen dem 2. und 4. Lebensjahr. Die akute lymphatische Leukämie ist mit 80% die häufigste aller Leukämien im Kindesalter. International schwanken die Heilungsraten für die ALL zwischen 70% und 80% (Harms et al, 2000; Schrappe et al, 2000; Pui et al, 2001).

Die Diagnose wird anhand der Zytomorphologie gestellt, wobei die Klassifizierung der ALL anhand der Immunophänotypisierung und der Zytogenetik erfolgt (Bene et al, 1996). Bei der Immunophänotypisierung können durch Anfärben der Zellen mit monoklonalen Antikörpern im Durchflußzytometer aufgrund der Reaktionsmuster die in Tabelle 1 aufgelisteten Untergruppen der ALL unterschieden werden. Dabei

handelt es sich um Differenzierungsantigene, die auch auf normalen, unreifen hämatopoetischen Vorläuferzellen nachgewiesen werden können (Duale Reihe, 1999).

Tabelle 1 Immunphänotypen der Akuten Lymphatischen Leukämie

Differenzierungsantigene	Pro-B-ALL	cALL	Pre-B-ALL	B-ALL	T-ALL
TdT	+	+	+		(+)
HLA-DR	+	+	+	+	
CD 10		+	+	+	(+)
CD 19	+	+	+	+	+
Zytoplasmatisches IgM			+	(+)	
Membranständiges IgM				+	
Zytoplasmatisches CD 3					+
CD 7					+

Die Kombination aus nachgewiesenen Differenzierungsantigenen den CD-Molekülen (cluster of differentiation), Immunglobulin IgM, HLA-DR aus der Gruppe der Histkompatibilitätsantigene und TdT (Terminale Deoxynucleotidyl Transferase) definieren den Phänotyp der ALL (Duale Reihe, 1999, Innere Medizin – modifiziert nach EGIL).

Darüber hinaus ist der Nachweis leukämie-assoziiierter Chromosomenaberrationen für die Prognoseabschätzung unverzichtbar geworden. Aufgrund der Häufigkeit sind hier die Tranlokationen t(12;21)(p13;q22) als prognostisch positiv und die Tranlokationen t(9;22)(q34;q11) sowie t(4;11)(q21;q23) als äußerst ungünstig zu nennen (Borkhardt et al, 1997; Arico et al, 2000; Pui et al, 2002).

Die oben genannte Methode der Immunphänotypisierung wird auch als Nachweismethode für MRD angewandt. Sie ist eine der drei wichtigsten Methoden zur Detektion. Mittels FACS (Fluoreszenz-aktivierter-Cell-Sorter)-Analyse werden abweichende, tumor-assoziierte Kombinationen von Zelloberflächenproteinen der Leukämiezellen gegenüber normalen Zellen über ihre Reaktion mit einem durch ein fluoreszierenden Farbstoff markierten monoklonalen Antikörpern nachgewiesen (Coustan-Smith et al, 1998, 2000 und 2006; Dworzak et al, 2002). Solche Kombinationen finden sich bei etwa 70% der akuten Leukämien im Kindesalter. Diese Untersuchung liefert in wenigen Stunden exakte quantitative Ergebnisse mit einer Sensitivität von bis zu 10^{-3} , also dem Nachweis einer

Leukämiezelle auf 1000 normale Zellen. Und sie lässt sich mit einem geringeren finanziellen Aufwand durchführen als die im Folgenden beschriebenen Methoden.

Die Bestimmung von MRD mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) erfolgt über den Nachweis von leukämie-assoziierten Fusionsgenen oder klonalen Genumlagerungen – den Rearrangements. Man spricht auch von molekularen Markern der Leukämie. So finden sich in 40% der ALL im Kindesalter tumor-spezifische Translokationen. Diese Marker weisen eine exzellente Stabilität und Sensitivität auf, weshalb dies die bevorzugte Nachweismethode ist bei einer Philadelphia-Chromosom positiven, t(9;22) Ph⁺ ALL und bei ALL im Säuglingsalter mit t(4;11) (Feroni et al, 1999 Review Article). Beide Methoden erreichen eine Sensitivität von bis zu 10⁻⁵. Das entspricht einer Leukämiezelle auf 100000 Normalzellen.

Die Detektion von MRD durch Identifizierung klonaler Genumlagerungen auf DNA Ebene von T-Zell-Rezeptor γ (TZRG) und δ (TZRD), Kappa-deleting element (IGK-Kde) und der schweren Kette des Immunglobulingenbereiches (IGH) ist aktuell die Methode der Wahl. (Moppett et al, 2002; Goulden et al, 1998 und 2001; van Dongen et al, 1998). Aus den klonalen PCR Produkten können patienten-spezifische DNA-Sequenzen identifiziert und Oligonukleotide für die allel-spezifische PCR synthetisiert werden.

Im praktischen Teil dieser Arbeit wurde die Quantifizierung der Ergebnisse durch den Vergleich der Stärke der Signale mit einer gleichzeitig amplifizierten Verdünnungsreihe ermittelt. Es handelt sich somit um ein semiquantitatives Verfahren.

Diese Methode ist mit dem Aufkommen der light cycler Technologie durch die real-time quantitative PCR (RQ-PCR) entscheidend verbessert worden (Pongers-Willemsen et al, 1999). Durch die RQ-PCR erfolgt eine direkte Quantifizierung der Ergebnisse um ein Vielfaches schneller.

Als problematischer Aspekt dieser Bestimmungsmethode stellte sich die Tatsache heraus, dass es in etwa 10% der Fälle zu einem Verschwinden des initialen Markers, also dem bei Diagnose detektierten Rearrangement, kam. Dafür ursächlich waren sekundäre Genumlagerungen während des Krankheitsverlaufes, auch als klonale Evolution bezeichnet. Daher konnte ein Rezidiv der Leukämie,

entstanden aufgrund eines solchen Subklones, nicht mehr nachgewiesen werden. Es kam zu falsch negativen Ergebnissen.

Studien zu dieser speziellen Problematik konnten zeigen, dass durch die Verwendung von zwei Markern pro Patient der Einfluss klonaler Evolution minimiert und somit bis zu 98% aller Patienten auf MRD – Ebene verfolgt werden konnten (Goulden, Knechtli & van Dongen et al, 1998; Pongers-Willemse et al, 1999).

Darüber hinaus werden auch Untersuchungen durchgeführt zum Nachweis von MRD mittels PCR im peripherem Blut (Coustan-Smith et al, 2002; van der Velden et al, 2002). Für Patienten mit einer T-ALL stellt dieses Verfahren offensichtlich eine mögliche Alternative zur Knochenmarkuntersuchung dar. Patienten mit einer pre-B-ALL wiesen jedoch zu große Abweichungen zwischen Blut und Knochenmark auf, selbst wenn der regelhafte Sensitivitätsverlust von etwa 1 log in Kauf genommen wird.

1.2 Molekulare Grundlagen der MRD Bestimmung – das Rearrangement

Das Immunsystem ist in der Lage aufgrund der enorm hohen Anzahl von T-Zellrezeptoren und Oberflächenglobulinen der B-Lymphozyten nahezu jedes Antigen hochspezifisch zu erkennen und zu eliminieren. Diese Variabilität entsteht durch die Rekombination von Gensegmenten des T-Zellrezeptors und Immunglobulins, auch als Rearrangement bezeichnet.

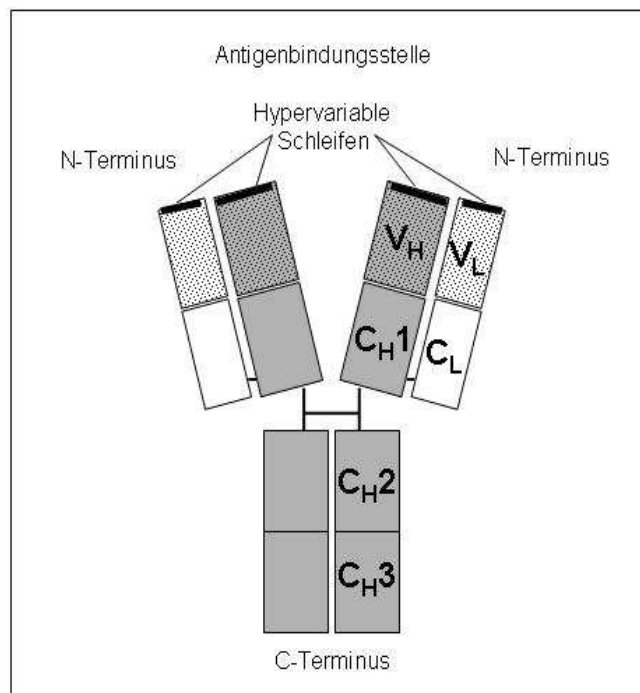
Die dabei resultierenden Verbindungsregionen (junctional region) zwischen diesen Segmenten erhöht die Variabilität noch zusätzlich, indem Nukleotide in die Sequenz eingefügt oder entfernt werden. Die DNA-Sequenz einer solchen Verbindungsregion ist einzigartig und somit klon- und patienten-spezifisch. Sie ermöglicht die Detektion geringster Mengen an Leukämiezellen mittels PCR in einem Knochenmarkpunktat eines Patienten während der Therapie.

Da die Umlagerungen auf DNA-Ebene sowohl bei der schweren als auch bei der leichten Kette der Immunglobuline und ebenso der T-Zellrezeptoren nach dem

gleichen Prinzip ablaufen, soll anhand von IGH der beschriebene Zusammenhang im Detail erläutert werden. Die Immunglobuline bestehen aus zwei mal zwei Polypeptidketten. Zwei identische schwere Ketten IGH werden aufgrund des Molekulargewichtes von den beiden identischen leichten (light) oder auch L-Ketten unterschieden. Es gibt fünf Varianten der schwere Kette. Danach unterscheidet man die Immunglobuline IgM, IgE, IgD, IgA und IgG. Bei den leichten Ketten unterscheidet man lediglich zwei, Lambda (λ) und Kappa (κ).

L- sowie H-Ketten enthalten konstante (C-Domänen) und variable (V-Domänen) Regionen, wobei letztere durch ihre Tertiärstruktur an der Oberfläche des B-Lymphozyten die Antigenbindungsstelle bilden (Abbildung 1).

Abbildung 1 Immunglobulin IgG.

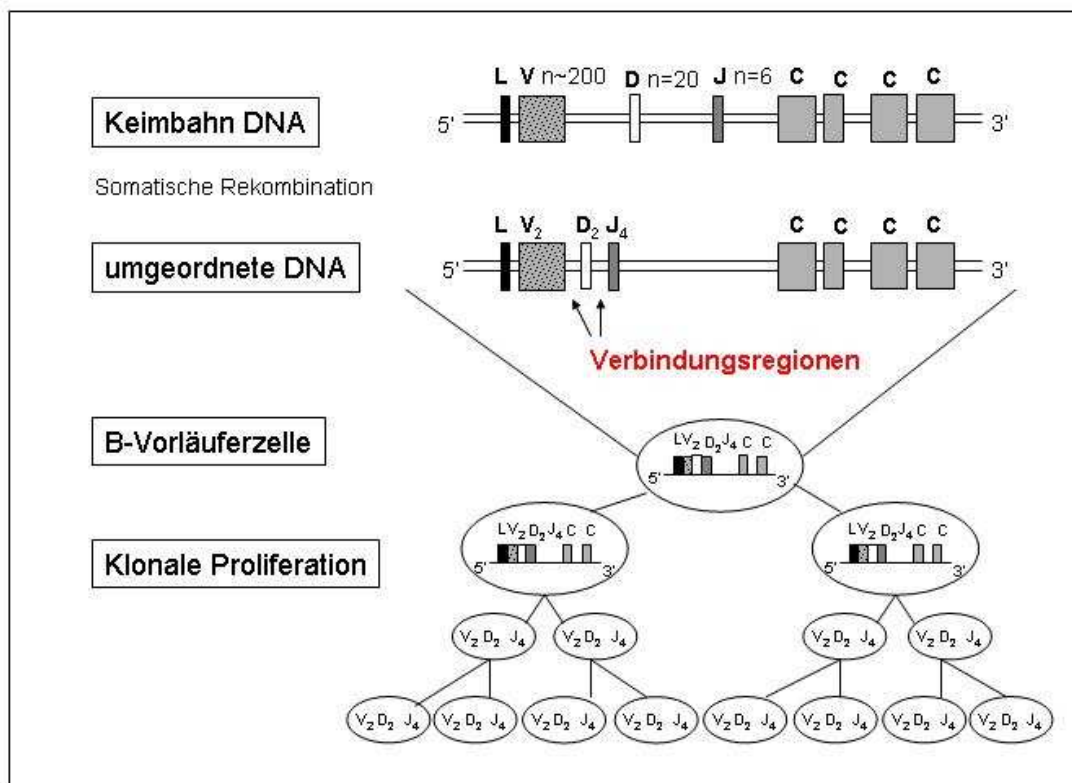


Immunglobulin IgG setzt sich zusammen aus den zwei, dunkel markierten, schweren Ketten mit drei konstanten Domänen CH1, CH2 und CH3 und der variablen Domäne VH sowie aus den zwei, hell dargestellten, leichten Ketten mit einer konstanten CL und einer variablen Domäne VL (Löffler Petrides, 1997, Biochemie und Pathobiochemie – modifiziert).

Auf DNA-Ebene wird die variable Domäne der H-Kette von drei Gensegmenten kodiert. Dem V-, J- (von joining für verbindend) und D- (von diversity für Vielfalt) Gensegment. Dem Prozess der Rekombination stehen für die Produktion der

schweren Kette etwa ~200 V-Segmente, ~20 D-Segmente und ~6 funktionale J-Segmente zur Auswahl. Während der Verknüpfung der einzelnen Gensegmente kommt es zur Deletion und Insertion von Nukleotiden. Es entsteht eine DNA-Sequenz, die nach klonaler Proliferation der Vorläuferzelle eines B-Lymphozyten klon-spezifisch und damit leukämie- sowie patienten-spezifisch ist. Die folgende Abbildung 2 veranschaulicht den Ablauf des Rearrangements der schweren Kette von IgG und die Entstehung von identischen Zellklonen bei einer Leukämie.

Abbildung 2 Rearrangement IGH und klonale Proliferation



Aus der DNA entsteht durch Rekombination der Vielzahl, der zur Verfügung stehenden Gensegmente V, D und J die umgeordnete DNA-Sequenz für eine von vielen möglichen schweren Ketten von IgG. Sie enthält die in ihrer Nukleotidabfolge einzigartige Verbindungsregion. Im Falle einer Leukämie kommt es nun zur klonalen Proliferation der B-Vorläuferzelle.

Die Umordnung der leichten Kette Kappa während der B-Zell Differenzierung erfolgt zeitlich eher als die der leichten Kette Lambda. Daher verbleiben die Gene der Lambdakette bei Kappaketten produzierenden B-Zellen normalerweise in der Konfiguration der Keimbahn DNA. Wohingegen im umgekehrten Falle die Gene

der Kappakette in den meisten Fällen auf einem oder beiden Allelen deletiert werden. Dieser Vorgang wird vermittelt durch einen als kappa deleting element (Kde) bezeichneten Genabschnitt. Die Nukleotidabfolge an der Stelle der Deletion ist wiederum durch Einfügen oder Entfernen von Basen klon-spezifisch.

Für die Rekombination von TZRГ existieren auf dem γ -Ketten-Locus 8 V-Gene, denen in 5' Richtung 3 J-Gene und das erste C-Gen folgen. Wobei vor dem zweiten C-Gen noch zwei weitere J-Gene liegen.

Mit 5 V-, 3 D- sowie 6 J-Genen ist der δ -Locus relativ einfach organisiert. Trotzdem ergaben Berechnungen, dass durch Deletion und Insertion von Basen bei der Rekombination 10^{14} verschiedenen δ -Ketten produziert werden können (Löffler G, Petrides PE, 1997).

1.3 Prognostische Relevanz von MRD für die Ersttherapie der ALL

Die Therapie der ALL wird international überwiegend im Rahmen von multizentrischen, kooperativen Studien durchgeführt. In Deutschland ist das die ALL-BFM (Berlin-Frankfurt-Münster)-Studiengruppe bzw. die COALL-Studiengruppe. Die Therapie gliedert sich in mehrere Phasen. Die am Anfang stehende Induktionstherapie erstreckt sich in der Regel über 4 Wochen. Es werden Medikamente wie Prednison, Daunorubicin, Vincristin und L-Asparaginase eingesetzt. Ihr primäres Ziel ist das Erreichen einer Remission. Im Anschluss an die Induktion erfolgt die Intensiv- und Reinduktionstherapie, die je nach Risikogruppe unterschiedlich lange dauert. In diesem Zeitraum wird auch eine präventive Behandlung des zentralen Nervensystems (ZNS) durchgeführt, um Rezidive des zentralen Nervensystems zu verhindern. Es wird Methotrexat intrathekal und systemisch verabreicht und bei Patienten mit hohem Rückfallrisiko zusätzlich eine Schädelbestrahlung durchgeführt.

Nach der Reinduktion beginnt die remissionserhaltende Dauertherapie, die bis zu einer Therapiegesamtdauer von zwei Jahren erforderlich ist. Wesentliche Medikamente während dieser Behandlungsphase sind Antimetabolite. Unter bestimmten Voraussetzungen werden Patienten auch schon in erster Remission

einer Stammzelltransplantation (SZT) zugeführt. Auf die Indikationsstellung wird an anderer Stelle noch ausführlich eingegangen.

In den vergangenen Jahren konnte die Überlebenswahrscheinlichkeit durch Intensivierung der Therapie und Verbesserung der supportiven Therapie immer weiter erhöht werden. Um jedoch die größtmögliche Zahl an Patienten zu heilen mit einem Minimum an Toxizität, erfolgt die Therapie risikoadaptiert (Eden et al, 2000; Schrappe et al, 2000; Gaynon et al, 2000). Anerkannte Risikofaktoren wie das Alter bei Diagnose, die initiale Leukozytenzahl, immunologischer Subtyp der ALL, leukämie-assoziierte Chromosomenabberation, und der zytomorphologisch ermittelte Remissionsstatus am Tag 29 (Ende der Induktionstherapie) werden herangezogen zur Einteilung von Patienten in Hoch- oder Niedrig-Risiko Gruppen (Janka-Schaub et al, 1991; Ludwig et al, 1993; Harms et al, 2000; Schrappe et al, 2000)

Darüber hinaus stellt die In-vitro-Chemoresistenztestung gegenüber Prednison, Vincristin und Asparaginase einen weiteren Prognosescore dar, der als unabhängiger Risikofaktor in den COALL-Protokollen identifiziert wurde (Janka-Schaub et al, 1999).

Die genannten Faktoren und Methoden eignen sich jedoch nicht zur Beurteilung des Ansprechens auf die Chemotherapie nach Erreichen der Remission, also für den Zeitraum nach dem Ende der Induktionstherapie.

Aus diesem Grunde wurden verschiedene Studien angestrengt, um den prognostischen Wert von MRD während der Ersttherapie zu untersuchen (Cave et al, 1998; van Dongen et al, 1998; Coustan-Smith et al, 1998 & 2000). Die Veröffentlichungen von Chessells und Moppett geben eine ausführliche Übersicht über aktuelle Therapieprotokolle und die Interpretation der Ergebnisse der zuvor genannten Studien (Chessells et al, 2000; Moppett et al, 2002). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die prognostische Relevanz von MRD, die der bisher zur Verfügung stehenden Risikofaktoren deutlich übersteigt und sich als Parameter für Verlaufskontrollen gut eignet. Wobei zu beachten ist, dass die prognostische Relevanz von der verwendeten Bestimmungsmethode in jeder einzelnen Studie, den Bestimmungszeitpunkten während der Therapie und dem jeweiligen Therapieprotokoll abhängt.

1.4 Klinische Relevanz von MRD für die Rezidivtherapie

Die Rezidivrate bei Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie nach erfolgreicher Ersttherapie liegt gegenwärtig bei etwa 20 – 30% (Chessells et al, 1998 und 2000; Richards et al, 1998; Schrappe et al, 2000). Von einem Rezidiv spricht man bei dem sicheren Nachweis von Leukämiezellen im Blut, Knochenmark, Liquor oder anderweitigem extramedullären Befall nach einmal erreichter kompletter Remission.

Die Prognose dieser Kinder wird beeinflusst von der Dauer der ersten Remission, dem Ort des Rezidives (intra- oder extramedullär) sowie dem Phänotyp der Leukämie (Einsiedel et al, 2005; Chessells et al, 1998).

Die Stammzelltransplantation (SZT) erwies sich im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie für Patienten mit frühen Rezidiven als deutlich bessere Behandlungsstrategie. Man spricht von frühen Rezidiven, wenn die Remission nicht länger als 36 Monate dauert. Für diese Patienten konnte eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit sowie ein geringeres Rezidivrisiko ermittelt werden. (Dopfer et al, 1991; Barrett et al, 1994). In diesen Studien wurden Transplantate von HLA-identischen Geschwisterkindern verwendet. Jedoch für Patienten mit Spätrezidiven (>36 Monate) ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen nach Chemotherapie oder Transplantation. Ebenso wurde auch für isolierte extramedulläre Rezidive kein Vorteil der Transplantation gegenüber der alleinigen Chemotherapie gesehen (Borgmann et al, 1995).

Daher besteht derzeit die Rezidivtherapie risikoadaptiert aus alleiniger Chemotherapie oder aus Chemotherapie, der Konditionierung und der sich anschließenden Stammzelltransplantation. Die Konditionierung erfolgt unmittelbar vor der Stammzelltransplantation. In einem Zeitraum von vier bis sechs Tagen wird durch Chemotherapie und Ganzkörperbestrahlung eine Knochenmarkaplasie induziert zur Eliminierung der Leukämiezellen und Immunsuppression des Empfängers.

Wie in der Ersttherapie erfolgt auch die Rezidivtherapie risikoadaptiert anhand der o.g. validierten Risikofaktoren. Trotz dieser Bemühungen eine Optimierung der

Therapie zu erreichen, liegt die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten, die in zweiter Remission transplantiert wurden, nur um die 45% bis 60% (Bader et al, 2002; Harrison et al, 2000; Boulad et al, 1999; Knechtli et al, 1998).

Da für MRD im Rahmen der Ersttherapie bereits eine überragende prognostische Relevanz nachgewiesen wurde, lag es nahe, entsprechende retrospektive Untersuchungen zur Bestimmung von MRD vor SZT durchzuführen (Uzunel et al, 2001; Bader et al, 2000; Knechtli et al, 1998). Die Studien konnten auch hier eindeutig die unabhängige prognostische Relevanz von MRD belegen.

Moppett setzt sich in dem Review Artikel von 2002 mit Kritikpunkten dieser Studien auseinander. Er unterstreicht das Potential der MRD Bestimmung und die Notwendigkeit weiterer prospektiver Studien.

1.5 Stammzelltransplantation

1.5.1 Grundlagen, Risiken und Komplikationen

Die Indikation zur SZT in erster als auch in zweiter Remission soll im folgenden besprochen werden. Hierzu ist es notwendig auf Grundlagen, Risiken und Komplikationen der SZT einzugehen. Da diese Faktoren für die Entscheidung zur Transplantation mit berücksichtigt werden müssen.

Der zeitliche Ablauf einer Transplantation gliedert sich in drei Phasen: 1.Konditionierung, 2.Transplantation und 3.Aplastische Phase. Die Konditionierung erfolgt unmittelbar vor der Stammzelltransplantation. In einem Zeitraum von 4 bis 6 Tagen wird durch Chemotherapie und Ganzkörperbestrahlung in hoher Dosis eine maximale Verminderung aller malignen Zellen als auch des eigenen Knochenmarkes angestrebt. Die Immunabwehr des Empfängers wird dadurch nahezu vollständig ausgeschaltet und das Risiko einer Abstoßungsreaktion verringert.

Die eigentliche Transplantation erfolgt als intravenöse Infusion fremder hämatopoetischer Stammzellen. Die Stammzellen sollen sich im Knochenmark des Empfängers ansiedeln, proliferieren und die Blutbildung aufnehmen. Dabei

sichern die T-Zellen des Spenders das Anwachsen des Transplantates. Dieser als Engraftment bezeichnete Vorgang ist definiert als Zeitpunkt zu dem, die Granulozytenzahl im peripheren Blut an drei aufeinander folgenden Tagen mehr als $0,5 \times 10^9/l$ erreicht. Während dieser etwa 14-20 Tage andauernden Phase der Aplasie, in der noch keine Blutzellen gebildet werden, ist eine intensivmedizinische Betreuung unter Quarantäne erforderlich. Die Gefahr einer Infektion mit Bakterien, Viren der Herpesgruppe, Adeno- oder RS-Viren sowie Pilzen ist in dieser Phase als auch im weiteren Verlauf aufgrund der Immunsuppression extrem hoch (Hematopoietic Cell Transplantation, 1999).

In Abhängigkeit von der Herkunft der Stammzellen, dem Spender sowie der Aufbereitung des Transplantates lassen sich verschiedene Arten der Stammzelltransplantation differenzieren.

Die Stammzellen können aus dem Knochenmark, aus dem peripheren Blut oder dem Nabelschnurblut gewonnen werden. Sie sind durch das Oberflächenmolekül CD34 zu detektieren und zu selektionieren (Bensinger et al, 1995).

Werden einem Patienten in Remission Stammzellen entnommen und eingefroren, um sie ihm zu einem späteren Zeitpunkt wieder zuzuführen, spricht man von einer autologen Transplantation.

Bei einem allogenen Transplantat handelt es sich entweder um eine Familienspende, üblicherweise die eines Geschwisterkindes (matched sibling donor MSD) oder um eine Fremdspende (matched unrelated donor MUD). Aufgrund internationaler Datenbanken lässt sich derzeit für etwa 80-85% der Patienten ein passender Spender identifizieren. Ein passendes Transplantat stimmt im Antigenmuster wesentlicher Zelloberflächenproteine, den Histokompatibilitätsantigenen (HLA), mit dem des Empfängers überein. Diese Zelloberflächenproteine werden auf den Genorten (Loci) HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ und -DP codiert (Löffler Petrides, 1997, Biochemie und Pathobiochemie).

Aus Gründen der Dringlichkeit oder des gesundheitlichen Zustandes des Patienten und bei erfolgloser Suche werden auch Transplantate eingesetzt, die bezüglich eines oder mehrerer HLA-Loci nicht identisch sind. Es handelt sich dann um ein Transplantat eines mismatched unrelated donor (MMUD). Das ereignisfreie Überleben (Event-free Survival/EFS) schwankt je nach Studie für beide Optionen

zwischen 34% bis 50% (Casper et al, 1995; Oakhill et al, 1996; Green et al, 1999; Drobyski et al, 2002; Anasetti et al, 2002).

Experimentell werden auch Stammzelltransplantationen mit haploidentischen Transplantaten durchgeführt, bei denen bis zu 5/10 HLA nicht übereinstimmen (Handgretinger et al, 2008; Ciceri et al, 2008)

Die Anwendung von mismatched Transplantaten erhöht jedoch das Risiko einer Transplantatabstoßung (Petersdorf et al, 1998). Bei einer Abstoßungsreaktion wird das Transplantat von überlebenden immunologischen Effektorzellen des Empfängers, den T-Lymphozyten, als fremd erkannt. Die transplantierten Zellen proliferieren nicht (graft failure). Die aplastische Phase persistiert oder es tritt nach vorübergehendem Anstieg der Zellzahl eine Abstoßung im zeitlichen Intervall ein.

Dem gegenüber besteht auch die Gefahr, dass im Transplantat enthaltene immunkompetente T-Lymphozyten gesunde Zellen des Patienten als fremd erkennen. Diese Reaktion wird als GvHD (graft versus host disease) bezeichnet. Dabei handelt es sich um ein lebensbedrohliches Krankheitsbild. Die akute Form der GvHD tritt mit einer Häufigkeit von 20% bis 46% innerhalb der ersten 100 Tage nach Stammzelltransplantation auf. Es können Leber, Haut und Intestinum in Mitleidenschaft gezogen werden (Glucksberg et al, 1974). Die Letalität kann je nach Schwere bis zu 50% erreichen (Hematopoietic Cell Transplantation, 1999). Der Übergang in die chronische GVHD ist möglich. Sie kann jedoch auch als eigenständiges Syndrom etwa 100 Tage nach SZT in Erscheinung treten. Sklerodermieartige Hautveränderungen im Sinne einer Autoimmunkollagenose und chronische Entzündungen vor allem der Schleimhäute sind kennzeichnend. Daher ist in der Posttransplantationsphase eine immunsuppressive Therapie mit üblicherweise Cyclosporin A (CSA) und Methotrexat sowie insbesondere Antithymozytenglobulin (ATG) im Falle eines matched unrelated donor als GvHD-Prophylaxe unverzichtbar. Um das Risiko für das Auftreten einer GvHD zu senken, können Transplantate vorbehandelt werden. Durch die Anwendung immunologischer Techniken in vitro und in vivo werden immunkompetente T-Zellen allogener Transplantate anteilig eliminiert. Diesen Vorgang bezeichnet man als T-Zell-Depletion (Hale et al, 1994; Nimer et al, 1994).

Weitere therapie-assoziierte Komplikationen sind allergische Reaktionen, Mukositis, Diarrhoe und Nierenfunktionsstörungen. Ebenso können Leber, Lunge und Herz beeinträchtigt werden. Es besteht die Gefahr maligner Zweiterkrankungen, Wachstumsstörungen und der Infertilität.

1.5.2 Indikation zur SZT nach COALL- und BFM-Rezidiv Studienprotokoll

Das COALL-Studienprotokoll 1997 sieht eine doppelte Stratifizierung der Patienten vor, aus der sich die Indikation zur SZT in erster Remission bzw. während der Ersttherapie ableitet. Zunächst erfolgt eine Einteilung in zwei Gruppen anhand der Risikofaktoren Alter, initiale Leukozytenzahl, Immunophänotyp der ALL, dem Vorhandensein von Translokationen und dem Remissionsstatus am Tag 29, wie in Tabelle 2 veranschaulicht.

Tabelle 2 Erste Stratifizierung nach Risikofaktoren

Low-Risk Gruppe	High-Risk Gruppe
Leukozyten < 25/nl bei Diagnose und Alter > 1 bis < 10 Jahre und cALL oder prä-B-ALL und Komplette Remission am Tag 29 und keine Translokation t(9;22) oder t(4;11)	Leukozyten > 25/nl bei Diagnose oder Alter > 10 Jahre oder pro-B-ALL oder T-ALL oder keine Remission am Tag 29 oder Translokation t(9;22) oder t(4;11)

Kinder älter als 10 Jahre, mit einer Leukozytenzahl größer als 25/nl, mit einer Pro-B-ALL, T-ALL, den angegebenen Translokationen oder nicht erreichter Remission am Tag 29 werden in die Hoch-Risiko Gruppe eingeteilt.

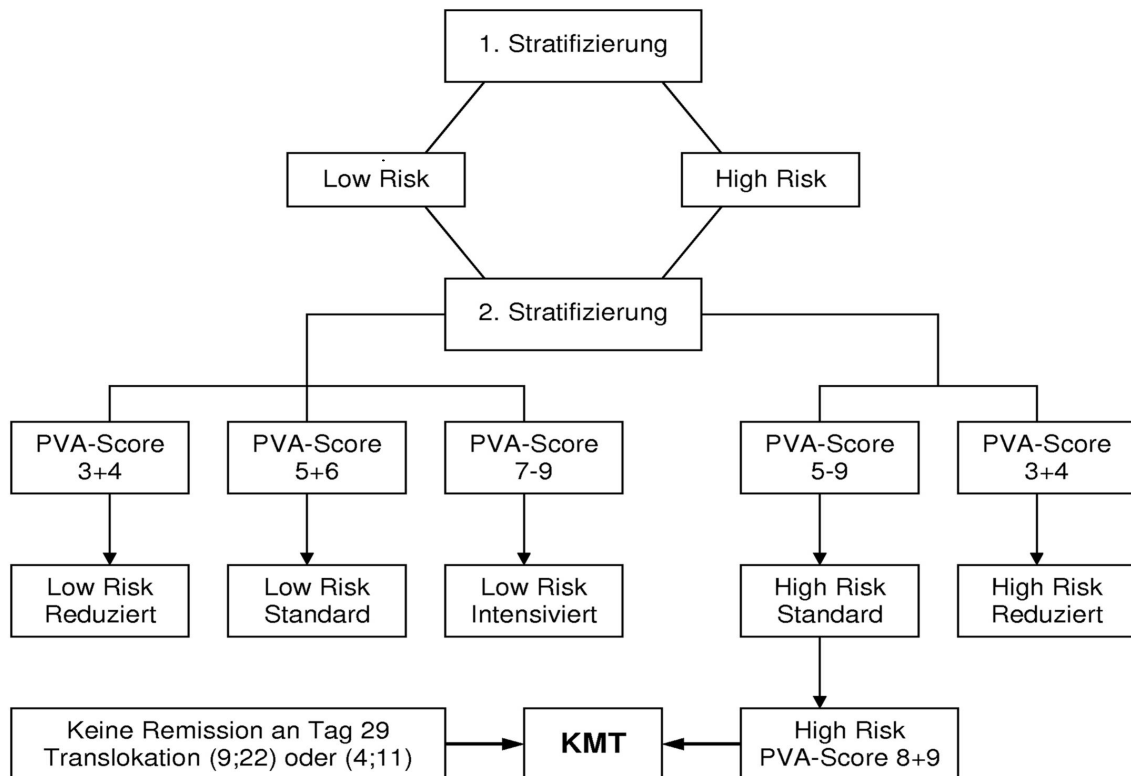
Patienten mit nachgewiesener Translokation t(9;22) oder t(4;11) werden ebenso wie Patienten, die nicht auf die Induktionstherapie ansprechen, also am Tag 29 keine Remission erreichen, einer SZT zugeführt. Letztere Patienten bezeichnet die Fachliteratur als late responder (LR).

Die In-vitro-Chemoresistenztestung wird als unabhängiger prognostischer Parameter zur 2. Stratifizierung der Patienten herangezogen (Abbildung 3). Es handelt sich bei dieser Untersuchung um die Resistenztestung der initial, also bei Diagnose, entnommenen Leukämiezellen gegenüber den Medikamenten **P**rednison, **V**incristin und **A**sparaginase. Es wird der LC50-Wert ermittelt. Das entspricht der Medikamentenkonzentration, die 50% der Leukämiezellen abtötet. Er dient als Maßstab für die in-vitro-Zytotoxizität (Janka-Schaub et al, 1999; Den Boer et al, 2003). Pro Medikament wird ein Punkt für besonders empfindliche, zwei Punkte für intermediär empfindliche und drei Punkte für resistente Zellen vergeben und zum **PVA**-Score zusammengefasst. Somit beschreibt ein PVA-

Score von drei eine sehr gute Sensibilität der Zellen auf die getesteten Medikamente und ein PVA-Score von neun die Resistenz der Zellen.

Wie in Abbildung 3 ersichtlich, erhalten Patienten der Hoch-Risiko Gruppe mit einem PVA-Score von acht oder neun eine SZT.

Abbildung 3 Zweite Stratifizierung in Abhängigkeit vom PVA-Score nach COALL 97



Einteilung der Patienten in die Therapieprotokolle High Risk und Low Risk nach COALL 06-97 sowie die weitere Stratifizierung in Abhängigkeit vom PVA-Score mit der daraus resultierenden Differenzierung der Therapieprotokolle und der Indikation zur SZT.

Auch im Rahmen der Rezidivtherapie ist die SZT für bestimmte Risikogruppen vorgesehen. Entscheidende Faktoren zur Einteilung der Patienten in diese Risikogruppen sind der Immunophänotyp der ALL, die Dauer der ersten Remission sowie die Lokalisation des Rezidives. Es ist relevant ob das Rezidiv intra- oder extramedullär lokalisiert ist.

Aus der Kombination dieser Faktoren werden die Therapiegruppen S1 bis S4, wie in Tabelle 3 dargestellt, definiert.

Tabelle 3 Definition der Therapiegruppen im Rahmen der ALL-Rezidiv-BFM-Studie 1995

Phänotyp	non-T-ALL			T-ALL		
Lokalisation	extra-medullär	Knochenmark isoliert	Knochenmark kombiniert	extra-medullär	Knochenmark isoliert	Knochenmark kombiniert
Zeitpunkt						
sehr früh	S2	S4	S4	S2	S4	S4
früh	S2	S3	S2	S2	S4	S4
spät	S1	S2	S2	S1	S4	S4

Unter Berücksichtigung der Remissionsdauer, des Phänotypen und der Rezidivlokalisierung werden Patienten im Rahmen der Rezidivtherapie in die Therapiegruppen S1 bis S4 eingeteilt.

Der Therapiegruppe S1 sind alle späten, extramedullären Rezidive zuzuordnen. Patienten mit sehr frühen oder frühen extramedullären Rezidiven sowie späte non T Knochenmarkrezidive und kombinierte frühe oder späte non T Rezidive gehören der Gruppe S2 an. Frühe isolierte non T Knochenmarkrezidive entsprechen der Therapiegruppe S3. Kinder mit sehr frühen, kombinierten oder isolierten Knochenmarkrezidiven sowie alle Leukämien vom T-Phänotyp werden der Therapiegruppe S4 zugeordnet. Für den Zeitpunkt des Rezidives ist zu erläutern, dass Spätrezidive Rezidive sind, die sechs Monate oder später nach dem Ende der Ersttherapie auftreten. Rezidive, die sich später als 18 Monate nach Erstdiagnose und früher als 6 Monate nach Ende der Ersttherapie ereignen, gelten als frühe Rezidive. Tritt ein Rezidiv früher als 18 Monate nach Erstdiagnose auf, bezeichnet man es als sehr früh (Tabelle 4).

Tabelle 4 Definition des Zeitpunktes des Rezidives

Zeitpunkt	nach Ende der Ersttherapie	nach Erstdiagnose
sehr früh	< 6 Monate	und < 18 Monate
früh	< 6 Monate	und > 18 Monate
spät	> 6 Monate	

Die Ersttherapie erstreckt sich regelhaft über einen Zeitraum von zwei Jahren.

Die Ergebnisse der vorangegangenen ALL-Rezidiv-BFM-Studie machten deutlich, dass die Kinder der Therapiegruppen S3 und S4 durch alleinige Chemotherapie keine realistische Überlebenschance haben. Daher soll möglichst jedes dieser Kinder bei Erreichen einer erneuten Remission einer SZT zugeführt werden.

2 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

Das Ziel der hier vorgestellten Arbeit ist die Bestimmung von Minimal Residual Disease direkt vor und zu fest definierten Zeitpunkten nach Stammzelltransplantation bei akuter lymphatischer Leukämie im Kindesalter. Es soll erörtert werden, in wie weit die Ergebnisse mit denen anderer Studien in Bezug auf den prognostischen Werte von MRD vor SZT übereinstimmen. Und welche Erkenntnisse durch die gleichzeitige Bestimmung von MRD vor und nach SZT gewonnen werden können. Außerdem soll durch die Bestimmung von MRD nach SZT eine Aussage getroffen werden, ob daraus eine Prognose für den weiteren Krankheitsverlauf abzuleiten ist.

3 PATIENTEN UND MATERIAL

In dieser Studie wurden die Proben von 28 Kinder im Alter zwischen einem und 16 Jahren mit akuter lymphatischer Leukämie untersucht, die zwischen 1989 und 2001 eine Stammzelltransplantation im Transplantations-Zentrum der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf erhielten. 16 Patienten waren männlich, zwölf weiblich. Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der SZT lag bei acht Jahren. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über mindestens 5 Jahre.

Zehn Patienten hatten eine T-ALL, zehn eine common ALL und acht eine Prä-B-ALL. Weitere wichtige Informationen zu den Patienten wie Leukozytenzahl bei Diagnose oder die Zytogenetik sind in Tabelle 5 und 6 geteilt nach Remissionsstatus zusammengefasst.

Die Erstbehandlung aller Patienten erfolgte gemäß dem COALL-Studienprotokoll 92/97. Siebzehn Patienten wurden in 1. Remission und elf Patienten in zweiter Remission transplantiert.

Die in zweiter Remission transplantierten elf Patienten wurden nach den Richtlinien des ALL-Rezidiv-BFM-Protokolles von 1995 behandelt. Fünf Patienten hatten ein isoliertes Knochenmarkrezidiv und die übrigen 6 einen Befall des Knochenmarks sowie des zentralen Nervensystems.

Die Konditionierung aller Patienten bestand in der Regel aus Ganzkörperbestrahlung mit 12 Gy in 6 Fraktionen, Cyclophosphamid und Etoposid. Zur GvHD-Prophylaxe erhielten die Patienten Cyclosporin A und Methotrexat. ATG, Pentaglobin, Metronidazol und auch Interleukin2-Rezeptorantagonisten wurden in unterschiedlichen Kombinationen ergänzt in Abhängigkeit, ob ein Familienspender oder Fremdspender vorhanden war.

Die Knochenmarkpunktionen wurden zu fest definierten Zeitpunkten, zwischen Tag 30 und 14 vor SZT sowie 30, 100, 360 Tage nach SZT durchgeführt. In zwei Fällen fand die letzte Punktion sechs bzw. acht Wochen vor SZT statt. Weitere zur Verfügung stehende Proben anderer Zeitpunkte des Krankheitsverlaufes wurden zusätzlich untersucht. Insgesamt konnten 192 Proben analysiert werden.

Tabelle 5 Patienten mit SZT in erster Remission

Pat.	Sex	Status	Typ	A/Diagn.	Protokoll	WBC	Cyto	PVA	Risiko	A/SCT	Spender
3	w	1.CCR	T-ALL	10,7	Coall 97	141600		1	H/LR	11,3	MSD
4	w	1.CCR	Prä-B-ALL	9,6	Coall 97	11700	t(9;22)	5	H	9,11	MSD
6	m	1.CCR	T-ALL	13,9	Coall 92	631000		8	H/LR	14,1	MSD
7	w	1.CCR	T-ALL	12,1	Coall 97	388000		9	H/LR	12,4	MUD
9	w	1.CCR	Prä-B-ALL	7,2	Coall 97	115000		8	H	7,8	MSD
10	w	1.CCR	T-All	9,7	Coall 97	389000		1	H/NR	10,5	MUD
11	w	1.CCR	C-All	4,4	Coall 97	81600	t(9;22)	5	H/LR	4,1	MUD
12	w	1.CCR	T-ALL	0,8	Interfant	270900				2,3	MSD
13	m	1.CCR	C-ALL	0,6		29000	t(9;22)	5	H	12,1	autolog
14	w	1.CCR	C-ALL	3,10	Coall 92	86000	t(9;22)	4	H	4,3	MSD
15	w	1.CCR	Prä-B-ALL	10,10	Coall 97	780000	t(4;11)	5	H	11,4	MUD
17	m	1.CCR	C-All	6,5	Coall 92	33000	t(9;22)	6	H	6,11	MSD
19	m	1.CCR	T-ALL	10,5	Coall 92	700000		5	H/LR	11	MUD
21	m	1.CCR	T-ALL	16,5	Coall 97	204000		2	H/ LR	16,11	MSD
23	m	1.CCR	T-ALL	13,0	Coall 92	8900		8	H/ LR	13,5	MSD
24	m	1.CCR	C-ALL	12,5	Coall 92	40000	t(9;22)	5	H	13,2	MUD
27	m	1.CCR	Prä-B-All	2,10	Coall 97	224000		2	H/ LR	3,3	MUD

Spaltenbezeichnung: Patienten; Geschlecht; Remissionstatus bei Transplantation (CCR clinical complete remission); Phänotyp der Leukämie; Alter bei Diagnose in Jahren; Therapieprotokoll; WBC Leukozytenanzahl bei Diagnose pro Mikroliter; Zytogenetik; PVA-Score; Risikogruppe, LR late responder; Alter bei Stammzelltransplantation in Jahren; Art des Spenders, MSD matched sibling donor, MUD matched unrelated donor

Tabelle 6 Patienten mit SZT in zweiter Remission

Pat.	Sex	Status	Typ	A/Diagn.	Protokoll	WBC	Cyto	PVA	Risiko	A/KMT	Z/Rez	Ort/ Rez.	TG	Spender
1	m	2.CCR	T-ALL	3,9	Coall 97	75500		Ø	H	5,4	14	KM, ZNS	S2	MUD
2	m	2.CCR	C-ALL	11,2	Coall 92	Ø		5	H	15,40	45	KM	S2	MUD
5	w	2.CCR	Prä-B-ALL	6,0	Coall 92	4900		5	L	9	26	KM, ZNS	S2	MUD
8	m	2.CCR	T-ALL	9,10	Coall 97	61000		Ø	H	11,3	14	KM, ZNS	S2	MUD
16	m	2.CCR	Prä-B-ALL	0,7	Interfant	640000	t(4;11)	4	H	1,1	3	KM		MUD
18	m	2.CCR	C-ALL	2	Coall 92	16200			L	5,7	30	KM	S3	MUD
20	w	3.CCR	Prä-B-ALL	10,1	Coall 92	26200		6	H	12,0	16	KM	S4	MUD
22	w	2.CCR	C-ALL	1,9	Coall 92	145000		7	H	4,10	29	KM, ZNS	S2	MUD
25	m	2.CCR	Prä-B-ALL	7,8	Coall 92	2900		Ø	L	10,00	26	KM, ZNS	S3	MUD
26	m	2.CCR	C-ALL	1,11	Coall 92	5900		Ø	L	4,1	22	KM		MSD
28	m	2.CCR	C-ALL	1,0	Coall 92	46500		3	H	3,1	28	KM, ZNS	S2	MUD

Spaltenbezeichnung: Patienten; Geschlecht; Remissionsstatus bei Transplantation (CCR clinical complete remission); Phänotyp der Leukämie; Alter bei Diagnose in Jahren; Therapieprotokoll; WBC Leukozytenanzahl bei Diagnose pro Mikroliter; Zytogenetik; PVA-Score; Risikogruppe; Alter bei Stammzelltransplantation in Jahren; Zeit in Monaten zwischen Diagnose und Rezidiv; Ort des Rezidives, KM Knochenmark, ZNS Zentrales Nervensystem; Therapiegruppe während der Rezidivtherapie; Art des Spenders, MSD matched sibling donor, MUD matched unrelated donor

4 METHODEN

Nach der Isolierung der mononukleären Zellen aus dem Knochenmark aller Punktate wurden die Proben bis zum Zeitpunkt der Untersuchung in einem Reagenziengemisch bei -70 bzw -180 °C unter kontrollierten Bedingungen gelagert.

Nach der Gewinnung der DNA wurden die PCR Analysen zur Identifizierung der patientenspezifischen Sequenzen der initialen DNA mit Standardprimern, basierend auf der Methode der angegebenen Veröffentlichungen, durchgeführt (Pongers-Willemse et al, 1999; Zur Stadt et al, 2000 und 2001).

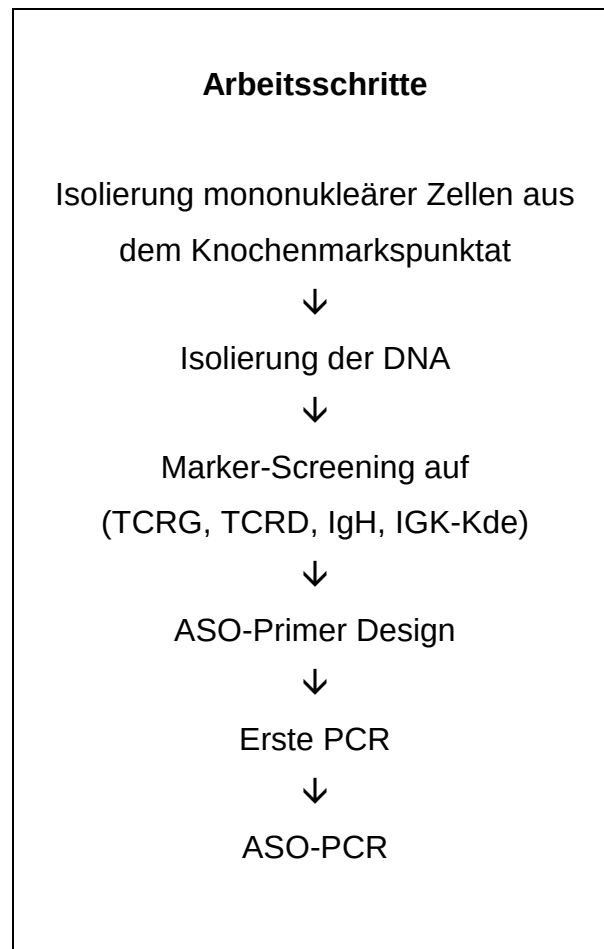
Anhand dieser Sequenzen konnten allel-spezifische Oligonukleotid PCR-Primer (ASO-Primer) erstellt werden.

Zunächst wurde mit der Patienten DNA aller Zeitpunkte eine erste PCR mit Standardprimern und unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Produkte wurden in Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Nach erfolgreicher Amplifizierung wurde die ASO-PCR mit dem allel-spezifischen Primer angeschlossen, die Produkte wiederum elektrophoretisch aufgetrennt und dargestellt.

Die Reihenfolge der Arbeitsschritte ist in Abbildung 4 veranschaulicht und wird im Folgenden detailliert erläutert.

Abbildung 4 Übersicht über die Reihenfolge der Arbeitsschritte



4.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus dem Knochenmarkspunktat

In einem 15 ml Plastikröhrchen wurden 7 ml Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Freiburg) mit 8 ml Knochenmark überschichtet und 20 min bei 2420 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die Schicht der mononukleären Zellen wurde durch Abpipettieren in ein neues Röhrchen überführt und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Mit einer Anzahl von etwa 1×10^7 Zellen in einer Mischung aus 50% FCS, 40% RPMI 1640 Medium und 10% DMSO pro Röhrchen wurde das Material bei -80°C gelagert. Die verwendeten Lösungen sind in Abbildung 5 aufgelistet.

**Abbildung 5 Verwendete Reagenzien zur Isolierung
mononukleärer Zellen aus dem Knochenmark**

PBS (pH 7.2 bei 25 C)	137	mM	NaCl
	2.7	mM	KCl
	10	mM	Na ₂ HPO ₄
	5.5	mM	KH ₂ PO ₄
RPMI 1640 Medium von Gibco			
FCS von Gibco			
DMSO von Sigma			

4.2 DNA Isolierung

Die Extrahierung der DNA aus den Zellkernen erfolgte durch Zellyse in RSB-Puffer mit 0.5% Triton für 5 bis 7 Minuten auf Eis. Es wurde durch eine dreistündige Inkubation bei 37 °C und Zugabe von TENS sowie Proteinase K die nukleären Proteine von der DNA getrennt, anschließend mit 5 M NaCl gefällt und abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die DNA durch eiskalten 100% Äthanol gefällt, in 70% Äthanol gewaschen und in TE aufgenommen. Die verwendeten Chemikalien sind in Abbildung 6 zusammengefaßt.

Abbildung 6 Verwendete Reagenzien zur Isolierung der DNA

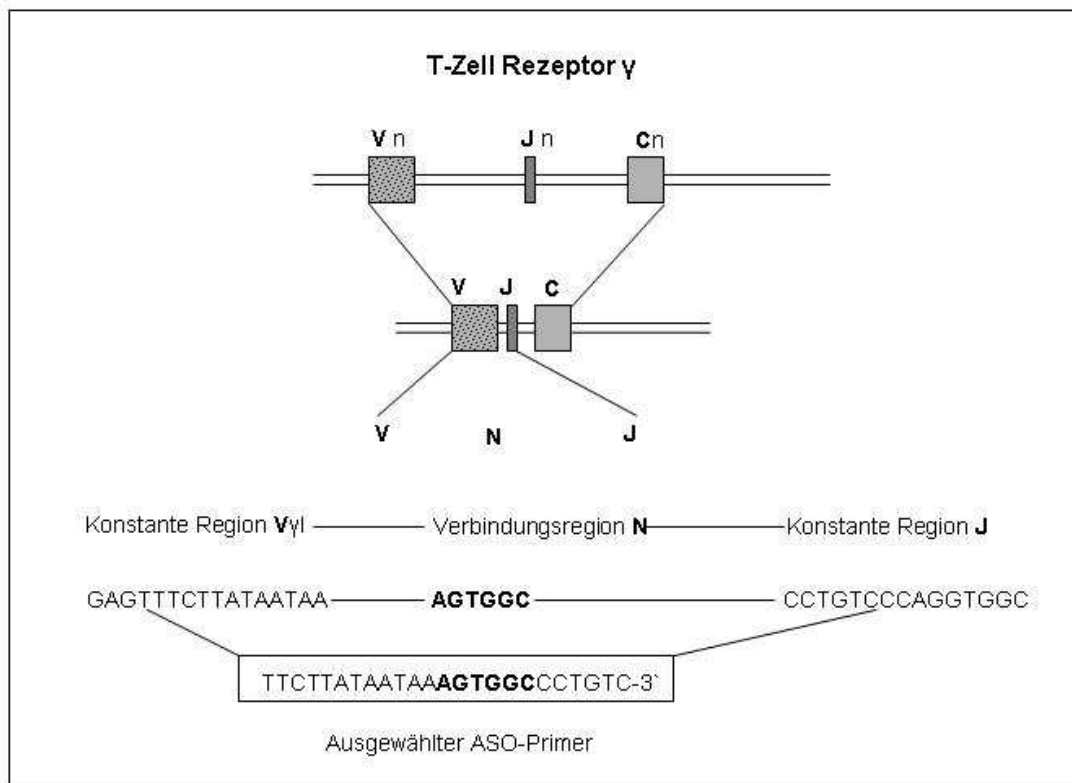
RSB-Puffer	10	mM	Tris/HCL pH 7.4
	10	mM	NaCl
	3	mM	MgCl ₂
TENS	100	mM	Tris/HCl pH 8.0
	40	mM	EDTA pH 8.0
	200	mM	NaCl
	1%		SDS
Proteinase K von peQLab	20	mg/ml	
TE	10	mM	Tris-HCL pH 8.0
	1	mM	EDTA

4.3 Identifizierung patientenspezifischer Sequenzen

Mittels PCR der initialen DNA aller 28 Patienten wurden die klonalen Rearrangements TCRG, TCRD, IGK-Kde und IgH identifiziert und anschließend direkt sequenziert. Dieser Arbeitsschritt wurde von einem hierauf spezialisierten Mitarbeiter übernommen.

Nach Erhalt der Sequenzen konnten allel-spezifische Oligonukleotid-Primer (ASO-Primer) mit einer Länge von 20-24 Basen erstellt werden, welche die patientenspezifische Sequenz im Zentrum enthalten und immer mindestens zwei bis vier Basen der konstanten Region am 3'Ende mit einbeziehen (Abbildung 7).

Abbildung 7 Vorgehen bei der Auswahl eines allel-spezifischen Oligonukleotid-Primers



Anhand der Sequenz des T-Zell Rezeptor Rearrangements, hier V γ 1-J γ 1.3, wird ein ASO-Primer mit einer Länge von etwa 20 bis 24 Basen so gewählt, dass er die patienten-spezifische Sequenz einschließt und die konstante Region überlappt.

4.4 Polymerase-Ketten-Reaktion – Erste PCR

Unter Standardbedingungen wurden 500 ng DNA in einem 50 µl Ansatz mit folgender Zusammensetzung amplifiziert (Abbildung 8).

Abbildung 8 Zusammensetzung des Ansatzes für die erste PCR

5	µl	10xPCR-Puffer (Gibko)
1.5	µl	MgCl ₂ mit 1.5 mM (Gibko)
1	µl	Nukleotide mit 0.2 mM (Gibko)
1	µl	Primer a mit 0.2 µM (metabion)
1	µl	Primer b mit 0.2 µM (metabion)
35	µl	Aqua Bideest
0.4	µl	Taq Polymerase mit 5U/µl (Gibko)

Zu jeder Reaktion wurde eine Positiv- sowie eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Positivkontrolle enthält DNA normaler peripherer Blutzellen. Bei der Negativkontrolle wurde dem Ansatz keine DNA zugefügt, um mögliche Verunreinigungen auszuschließen. Alle Proben wurden doppelt und gleichzeitig zur Verdünnungsreihe amplifiziert. Diese Verdünnungsreihe der DNA bei Diagnose in DNA aus peripherem Blut von gesunden Spendern diente der semiquantitativen Bestimmung der Sensitivität der Ergebnisse.

Alle Reaktionen wurden in einem Trioblock (Biometra, Göttingen) in dünnwandigen Reaktionsgefäßen durchgeführt (Biozym, Hessisch Oldendorf).

Folgende Bedingungen für die Amplifikation des Diagnose- und Folgematerials wurden gewählt. Die Denaturierungstemperatur lag bei 95°C für 30 Sekunden, die Annealingtemperatur bei 60°C für 30 Sekunden und die Synthesetemperatur bei 72°C für 45 Sekunden über insgesamt 35 Zyklen. Die verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Die Produkte der ersten PCR wurden durch Elektrophorese in Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Tabelle 7 Primerkombinationen für die 1.PCR

T-Zellrezeptor γ	T-Zellrezeptor δ	Immunglobulin	Kappa deleting element
V γ I - J γ 1.3/2.3	V δ 1 - J δ 1	VH1 - JH	V1 -KDE
V γ II - J γ 1.3/2.3	V δ 2 - J δ 1	VH3 - JH	V2 -KDE
V γ III - J γ 1.3/2.3	V δ 2 - D δ 3	VH6 - JH	V3 -KDE
V γ IV - J γ 1.3/2.3	D δ 2 - D δ 3		KDE 3'-RSS
	D δ 2 - J δ 1		

Es sind nur die Primerkombinationen aufgelistet, die in dieser Studie Anwendung fanden. Sie wurden in dieser Form eingesetzt für die 1.PCR zur Analyse von TZRG, TZRD, IGH und IGK-Kde Rearrangement.

4.5 Austestung der Sensitivität und Spezifität für die ASO-PCR

Die Sensitivität und Spezifität der PCR wird beeinflusst von der Temperatur und der Anzahl der PCR Zyklen. Die Intensität der spezifischen Bindung des Primers an die DNA ist temperaturabhängig. Jeder Primer besitzt ein Temperaturoptimum. Dabei wirken sich möglichst viele Guanin– und Cytosinmoleküle des Primers aufgrund der drei Wasserstoffbrückenbindungen ebenfalls verstärkend auf die Intensität der Bindung aus. Die Änderung der Annealingtemperatur kann die Sensitivität bis zu einem gewissen Maß verbessern bis die Amplifizierung zu ungenau wird. Die Spezifität sinkt, da die Primer unspezifisch binden. Ebenso wirkt sich auch die Anzahl der PCR Zyklen auf die Genauigkeit der Amplifizierung aus.

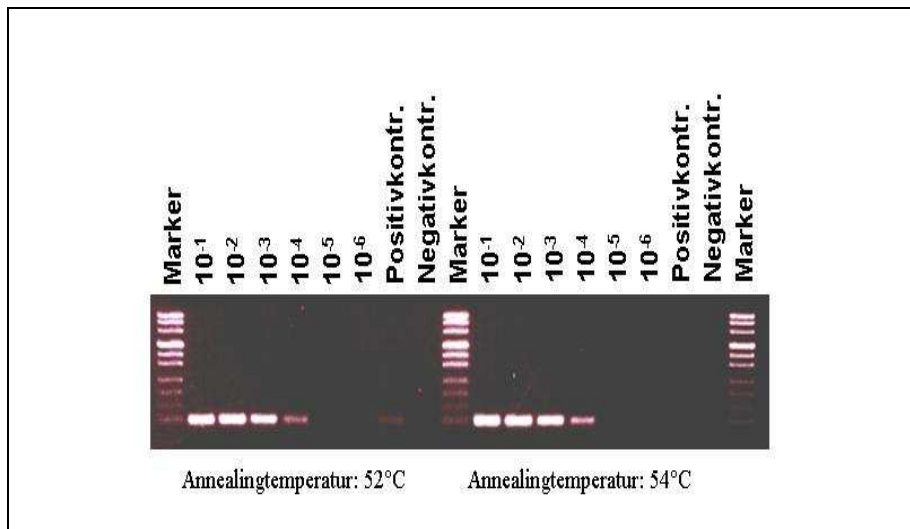
Die optimalen Bedingungen für die 2.PCR wurden bei diesen Untersuchungen überwiegend zunächst nur mit der Verdünnungsreihe der initialen DNA ausgetestet. Dadurch konnte der Verbrauch der DNA der einzelnen Punktionszeitpunkte verringert werden. Es wurden standardmäßig immer eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt.

Abbildung 9 zeigt die Verdünnungsreihe eines Patienten amplifiziert bei 52°C und 54°C und anschließend auf ein Agarosegel zur Elektro phorese aufgetragen. Bei der niedrigeren Temperatur ist eine schwache Bande bei der Positivkontrolle zu erkennen. Wird sie positiv, bedeutet das eine Verschlechterung der Spezifität also eine ungenaue Amplifizierung. Eine Temperatur von 54°C wurde bei diesem speziellen Beispiel als optimal ermittelt.

Der Einfluß der Zyklenzahl auf die Sensitivität und Spezifität soll anhand Abbildung 10 veranschaulicht werden. Es ist das Ergebnis der ASO-PCR eines Patienten mit 17 Zyklen und mit 20 Zyklen. In diesem Fall konnte durch die Erhöhung der Zyklenzahl die Sensitivität von 10^{-3} um eine Logstufe auf 10^{-4} gesteigert werden. Die Positivkontrolle ist negativ, so dass von einer ausreichenden Spezifität ausgegangen werden kann. Die Verbesserung der Sensitivität führte am Tag 114 nach SZT, in diesem Fall mehrere Monate vor dem

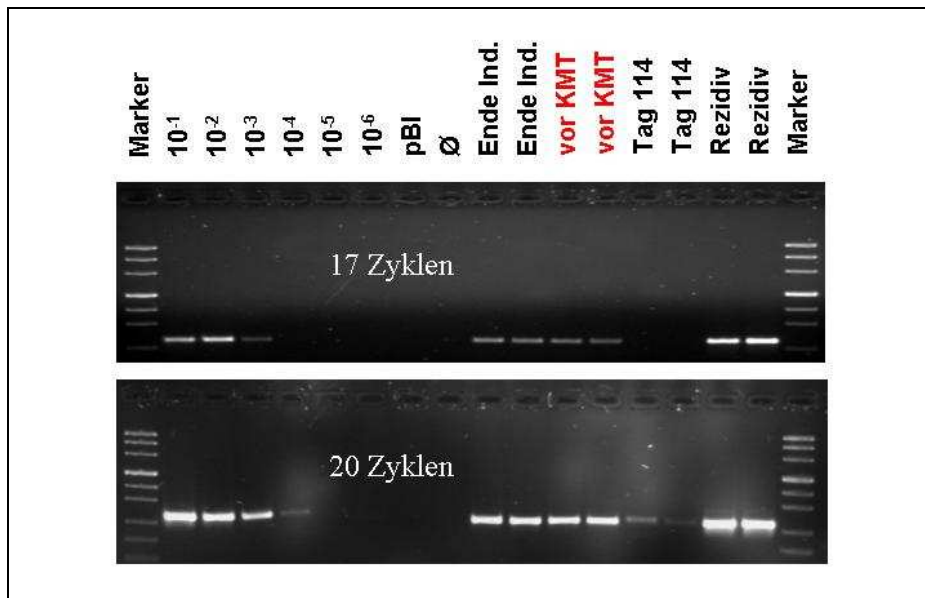
Rezidiv, zum Nachweis von MRD. Die Wahl optimaler Bedingungen für die PCR beeinflusst entscheidend das gesamte Studienergebnis.

Abbildung 9 Einfluss der Temperatur auf Spezifität und Sensitivität



Die Abbildung zeigt ein Agarosegel nach Elektrophorese mit zwei Verdünnungsreihen der initialen DNA eines Patienten amplifiziert bei 52°C und 54°C. Es bildet sich bei einer Temperatur von 52°C eine Bande der Positivkontrolle ab, da es zur ungenaueren Amplifizierung mit Senkung der Spezifität gekommen ist. Rechts wird bei 54°C auch eine Sensitivität von 10⁻⁴ erreicht bei verbesserter Spezifität.

Abbildung 10 Einfluss der Zyklenzahl auf die Sensitivität und Spezifität



Durch Erhöhung der Zyklenzahl kann die Sensitivität bis auf 10^{-4} gesteigert werden. Die Positivkontrolle (pBI) ist weiterhin negativ. Mit der Verdünnungsreihe wurden weitere vier Proben des Patienten amplifiziert. Durch die verbesserte Sensitivität konnte am Tag 114 nach SZT MRD nachweisen werden. Das Rezidiv trat bei diesem Patienten am Tag 270 nach SZT auf.

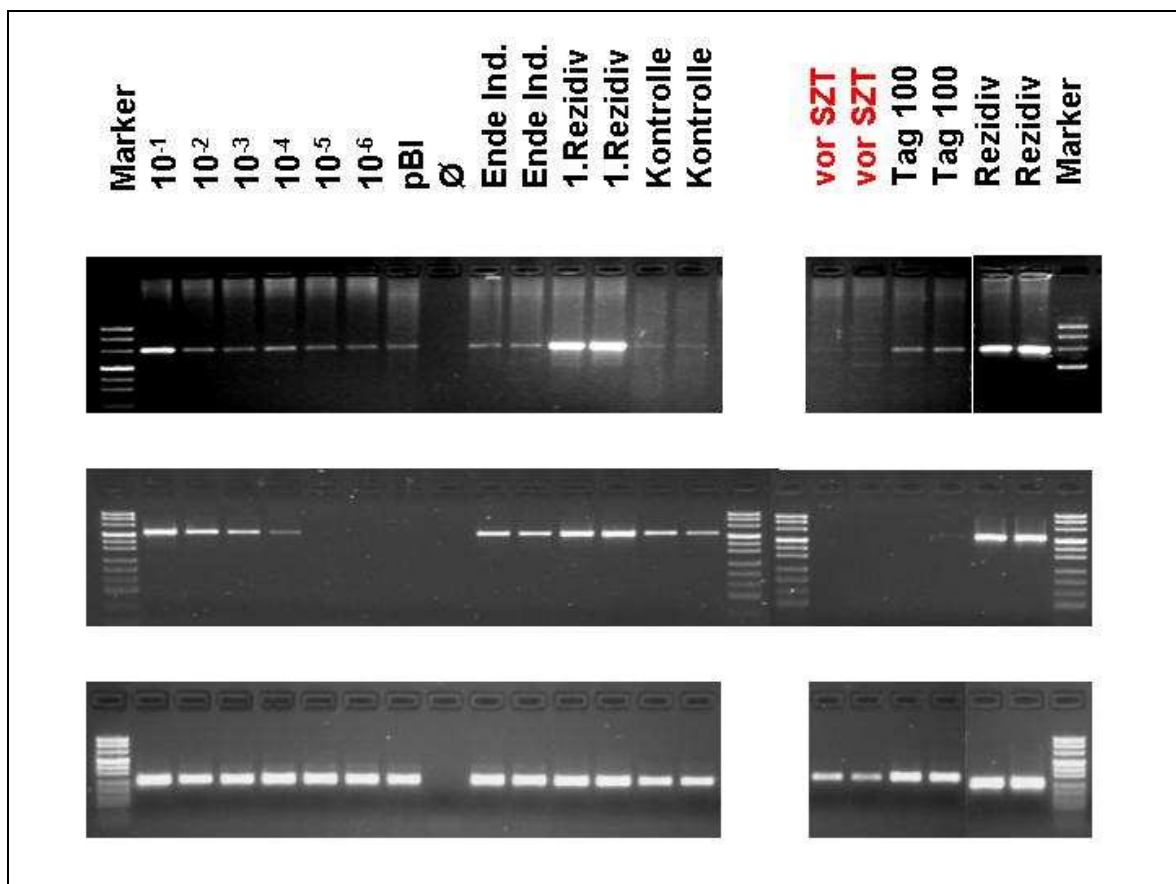
4.6 Zweite PCR – ASO-PCR

Nach erfolgreicher Amplifizierung der ersten PCR wurden die Produkte 1 : 100 verdünnt und die ASO-PCR mit dem patientenspezifischen Primer angeschlossen. Jeweils 5 µl der Verdünnung wurden pro Reaktion in einem Ansatz von 50 µl eingesetzt. Die Zyklenzahl variierte zwischen 15 und 25. 20 µl der Produkte wurden in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid angefärbt. Alle zu untersuchenden Proben wurden immer gleichzeitig zu einer Verdünnungsreihe der initialen DNA amplifiziert, um die Stärke der Signale durch Vergleich semiquantitativ bestimmen zu können.

Abbildung 11 zeigt oben das Ergebnis der ersten PCR des Rearrangements des TZRDR des Patienten 26, in der Mitte die anschließende ASO PCR mit dem patientenspezifischen Primer und unten eine Kontroll-PCR.

Im Falle eines nachgewiesenen Rezidives nach SZT und negativem Ergebnis vor SZT, wurde diese Kontroll-PCR mit den Produkten der ersten PCR durchgeführt. Zu einem der Primer aus der ersten PCR wurde ein interner Primer kombiniert, wodurch als Produkt ein kürzeres DNA Fragment entsteht, welches immer noch die patientenspezifische Sequenz einschließt. Somit konnte ein Arbeitsfehler ausgeschlossen, da der Nachweis erbracht war, dass die Reaktionsgefäße mit den Proben des Zeitpunkt vor SZT DNA enthielten.

Abbildung 11 Agarosegel der ersten PCR, der ASO-PCR sowie der Kontroll-PCR für das TZRDRearrangement des Patienten 26



Für die Probe vor SZT stellt sich bei der ersten PCR (oben) keine Bande dar. Die ASO-PCR (in der Mitte) erreicht eine Sensitivität von 10^{-4} und weist ein erneutes Rezidiv nach SZT nach. Eine Kontroll-PCR (unten) wird durchgeführt mit den Produkten der ersten PCR und internen Primern, um nachzuweisen, dass die Probe vor SZT auch tatsächlich Material enthielt. Die Kontroll-PCR zeigt eindeutig ein positives Ergebnis der Probe.

5 ERGEBNISSE

5.1 Klon-spezifische Rearrangements

Es wurden 39 Rearrangements für 28 Patienten identifiziert, die erfolgreich untersucht werden konnten. Davon entfielen 13 auf TZRG, 10 auf TZRD und IgH sowie sechs auf Kappa-deleting element (IGK-Kde). Somit standen für 11 Patienten zwei Marker zu Verfügung.

Es wurden Insgesamt 79 ASO-Primer in dieser Studie getestet. In 95% der untersuchten Marker konnte eine größere Sensitivität als 10^{-3} erreicht werden. Eine Diskrepanz der Ergebnisse von Proben unterschiedlicher Rearrangements eines Patienten trat in zwei Fällen auf. Beide Patienten waren in der einen Probe vor SZT niedrig MRD und in der anderen hoch MRD positiv. Diese beiden Patienten wurden für die Auswertung als hoch MRD positiv eingestuft. Die für jeden Patienten untersuchten Rearrangements, die einzelnen Punktionszeitpunkte und den entsprechenden Ergebnissen sind in Tabelle 8 detailliert aufgelistet. Auch die Todesursache und Grad der aufgetretenen GvHD ist angegeben.

Tabelle 8 Ergebnisse

Pat.	Rearrange- ment	Punktion	gamma	delta	IgH	kappa	T-Ursache	GvHD
1	Vd2-Jd1 Vy2-Jy1.3	initial Ind.Ende Tag 47 Tag 106 Ende Int. Rez. vor SZT	1,00E-01 1,00E-02 1,00E-04 neg. 1,00E-01 <1,00E-01	1,00E-02 <1,00E-02 >1,00E-04 1,00E-04 1,00E-03 >1,00E-04			therapiere- fraktäres Kreis- laufversagen mit schwerer Infektion	akute GvHD der Haut
2	Dd2-Dd3 VH3-JH	initial Rez. KO vor SZT Tag32 Tag100		>1,00E-01, neg <1,00E-03 neg. neg.	>1,00E-01, <1,00E-04 ? neg. neg.			chr.GvHD II° Haut und Schleimhaut
-	-	Tag100	-	neg.	neg.	-	-	-
3	Vy1-Jy1.3 Vd1-Jd1	initial Ind.Ende vor SZT Tag31 Tag110 Tag359	1,00E-01 neg. neg. neg. neg.	1,00E-02 neg. neg. neg. neg.				Ø
4	V3-KDE	initial Ind.Ende Tag 71 vor SZT Tag49				1,00E-02 1,00E-03 1,00E-01 1,00E-04	Multiorgan- versagen nach 2.SZT	Ø

In der Tabelle sind die untersuchten Rearrangements, die Punktionszeitpunkte mit den entsprechenden Ergebnissen und wenn vorhanden die Todesursache sowie der Grad der aufgetretenen GvHD jedes Patienten angegeben.

Tabelle 8 Ergebnisse

5	Vd2-Dd3	initial Rez. Ko vor SZT Tag29 Tag98 Tag384		1,00E-01 ! neg. neg. neg. neg.				akute GvHD Haut
6	Vg1-Jg1.3	initial Tag60 vor SZT Tag31 Tag78 Tag124 Tag309	1,00E-01 pos. neg. neg. neg. neg.				Lungenem- bolie bei Erysipel	chr. GvHD Diarrhoe und Mucositis
7	Vy1- Jy1.3/2.3	initial Tag 15 Ind.Ende Tag43 vor SZT Tag 46 Tag76	>1,00E-01 1,00E-01 1,00E-01 <1,00E-01 neg. 1,00E-01				Aspergillen- infektion	Ø
8	Vy1-Jy1.3 Vy3-Jy1.3	initial Rez. Ko vor SZT Tag35 Tag91	>1,00E-01 1,00E-01 1,00E-01 neg. neg.				Aspergillen- infektion des ZNS	akute GvHD Haut, Leber chr. GvHD Darm
9	VH3-JH V2-KDE	initial vor SZT Tag30 Tag100 Tag178			1,00E-04 neg. neg. neg.	neg. neg. neg. neg.		Ø

Tabelle 8 Ergebnisse

10	Vg3-Jg1.3 Dd2-Jd1	initial						Ø
		Ind.Ende	<1,00E-03	neg.				
		KO	neg.	neg.				
		vor SZT	neg.	neg.				
		Tag30	neg.	neg.				
		Tag103	neg.	neg.				
		Tag187	neg.	neg.				
		Tag370	neg.	neg.				
11	VH3-JH	initial						Ø
		KO			1,00E-02			
		vor SZT			1,00E-01			
		Tag19			neg.			
		Tag30			neg.			
		Tag114			neg.			
		Tag223			neg.			
		Tag335			neg.			
12	Vd2-Jd1	initial					Rezidiv	
		vor SZT		<1,00E-1				
		Tag30		>1,00E-3				
		Tag62		>1,00E-3				
		Tag120		>1,00E-3				
		Tag150		<1,00E-1				
		3.Rez.		<1,00E-1				
		KO		>1,00E-1				
		n.PBSCT		1,00E-01				
		n.PBSCT		1,00E-03				
		n.PBSCT		1,00E-02				
13	V2-KDE, Vy1-Jy1.3	initial						Ø
		Ind.Ende	neg.			neg.		
		KO	neg.			neg.		
		vor SZT	neg.			neg.		
		Tag15	neg.			neg.		
		Tag150	neg.			neg.		
		Tag365	neg.			neg.		

Tabelle 8 Ergebnisse

14	Vg1- Jg1.3/2.3	initial						
	V2-KDE	vor SZT	1,00E-01			1,00E-01		
		Tag30				1,00E-04		
		1.Rez.	1,00E-01			1,00E-01	Rezidiv	akute GvHD der Haut und Intestinum
		Ko	1,00E-01			1,00E-01		
		vor 2. SZT				1,00E-01		
		Tag43	neg.			<1,00E-04		
		Tag146	neg.			<1,00E-04		
		Tag364	neg.			1,00E-04		
		2.Rez.	1,00E-01			1,00E-01		
15	Translokation	initial	-5				Rezidiv	
		vor SZT	1,00E-04					
		Tag38	neg.					
		Tag100	neg.					
		Rez.	1,00E-01					
16	VH6-JH	initial						Ø
		Rez.			1,00E-03			
		vor SZT			neg.			
		Tag30			neg.			
		Tag61			neg.			
		Tag138			neg.			
17	VH1-JH	initial					Rezidiv	Ø
	V1-KDE	Ind.Ende			<1,00E-02	<1,00E-02		
		vor SZT			<1,00E-02	<1,00E-02		
		Tag114			1,00E-04	neg.		
		Rez.(Tag270)			1,00E-01	1,00E-01		

Tabelle 8 Ergebnisse

18	VH3-JH,	initial Rez vor SZT Tag98 Tag204			>1,00E-01 neg. neg. neg.			GvHD I° der Haut
19	Vy1-Jy1.3, Vd1-Jd1	initial KO Ende Int. KO vor SZT Tag30	1,00E-01 >1,00E-03 neg.	1,00E-01 1,00E-03 <1,00E-03 neg.				akute GvHD III°
20	VH1-JH,	initial Ind.Ende 1.Rez. KO KO 2.Rez. vor SZT Tag31 Tag170 3. Rez.			<1,00E-03 >1,00E-01 >1,00E-01 >1,00E-01 >1,00E-01 >1,00E-01 neg. <1,00E-04 >1,00E-01		Rezidiv	akute GvHD II° Haut
21	Vd1-Jd1,	initial Tag 15 Ind.Ende Tag 49 Tag 65 KO Tag 42 Tag 200 Tag 230		1,00E-01 >1,00E-01 >1,00E-01 <1,00E-02 <1,00E-03 neg. neg. neg.				akute GvHD I° Haut

Tabelle 8 Ergebnisse

22	Vγ2-Jγ1.3 KDE 3`- RSS	initial Ind.Ende Rez. KO vor SZT Tag43 Tag98 T320=Rez	<1,00E-03 1,00E-01 neg. >1,00E-01 neg. >1,00E-04 >1,00E-03			<1,00E-03 1,00E-01 neg. <1,00E-02 neg. neg. 1,00E-03	Rezidiv	Ø
23	Dd2-Jd1 Vγ2-Jγ1.3,	initial Tag44 vor SZT Tag31 Tag106 Tag465	1,00E-01 1,00E-04 1,00E-04 neg. neg.	1,00E-01 1,00E-03 1,00E-04 1,00E-04 neg.				Ø
24	VH6-JH	initial Ind.Ende vor SZT Tag30 Tag106			neg. neg. neg. neg.			Ø
25	Vγ4-Jγ1.3	initial Ende Int. Rez KO vor SZT Tag153	neg. >1,00E-01 >1,00E-01 >1,00E-01 neg.					akute GvHD I°chr. GvHD der Haut, Muskulatur

Tabelle 8 Ergebnisse

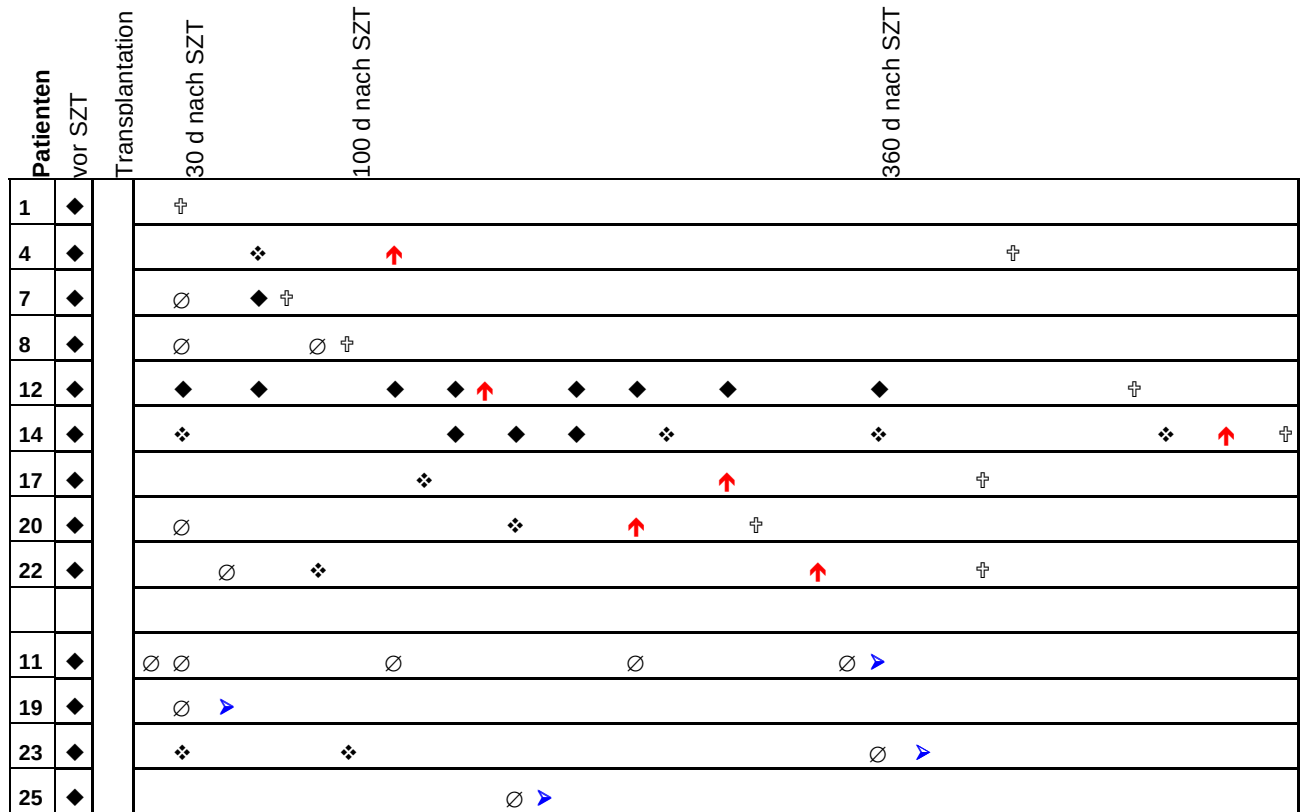
26	Dd2-Dd3	initial Ind.Ende Rez. KO vor SZT Tag100 Rez.		<1,00E-02 >1,00E-01 1,00E-03 neg. pos. >1,00E-01			Rezidiv	Ø
27	VH1-JH	initial KO KO vor SZT Tag 30 Tag 125			1,00E-05 neg. neg. neg. neg.			Ø
28	VH3-JH	initial Ind.Ende Rez. vor SZT Tag 30 Tag 100 Tag 170			neg. 1,00E-01 neg. neg. neg. neg.			leichte GvHD der Haut

5.2 Patientengruppe A: Hoch MRD positive vor SZT

Dreizehn von 28 Patienten waren hoch MRD positiv vor der SZT. MRD größer als 10^{-3} wurde definiert als hoch positives Ergebnis. Von ihnen befinden sich vier Patienten andauernd in Remission (Stand der Ergebnisse 11/06). Neun Kinder verstarben, davon sechs an einem Rezidiv. Bei Patient sieben und acht war die Todesursache eine Pilzinfektion und Patient eins bekam wenige Tage nach Transplantation eine schwere Infektion mit nachfolgendem Kreislaufversagen.

In Abbildung 12 sind die einzelnen Krankheitsverläufe graphisch veranschaulicht.

Abbildung 12 **MRD-Profil der Patienten hoch MRD positiv vor SZT**



☐ negativ

↑ klinisches Rezidiv

- ❖ gering MRD positiv ($< 10^{-3}$)

➤ in Remission

◆ hoch MRD positiv ($10^{-3} - 10^{-1}$)

† verstorben

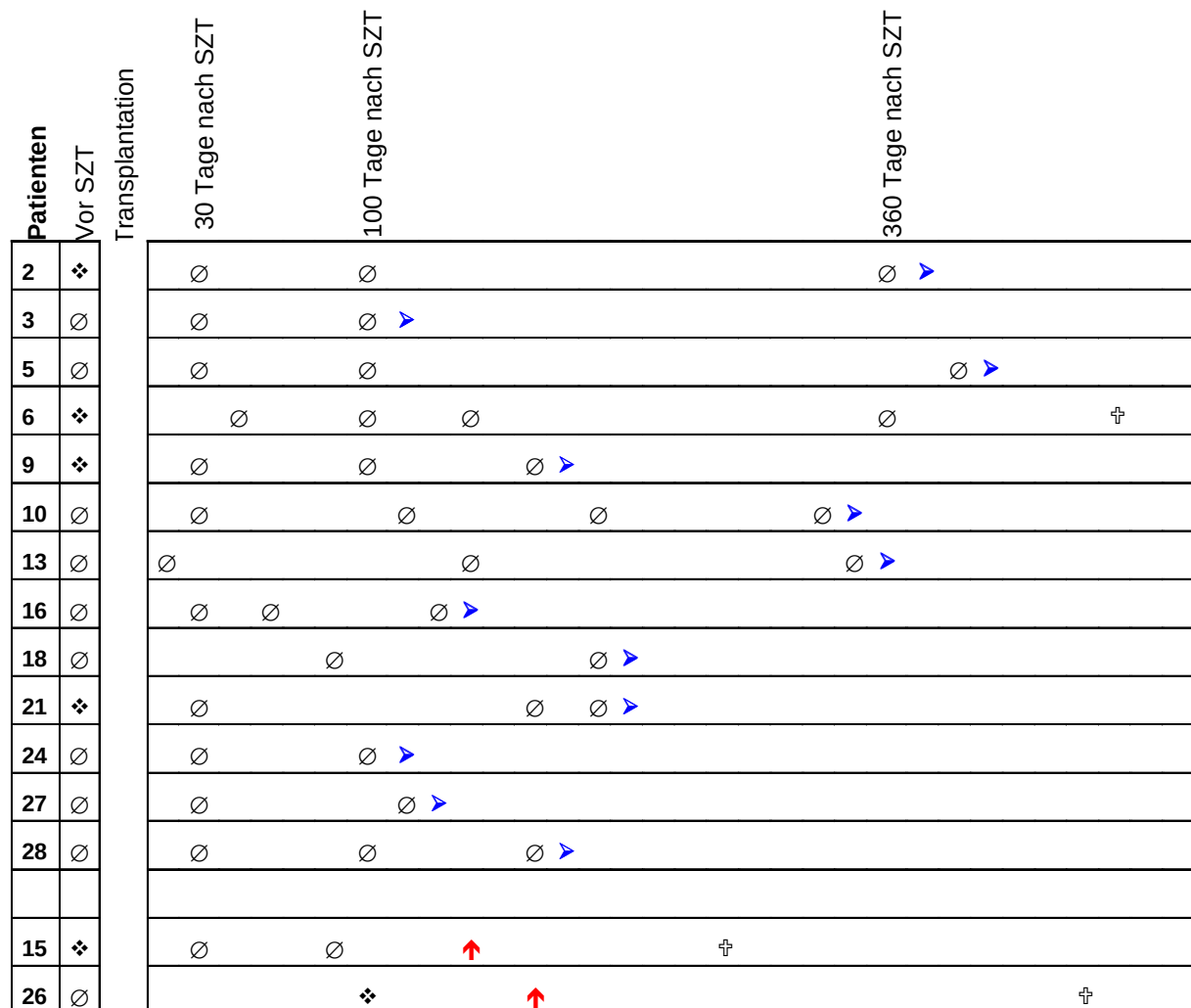
Für 13 Patienten hoch MRD positiv vor SZT wurden die einzelnen Punktionsergebnisse über einen Zeitraum von eineinhalb Jahren aufgetragen. Die vier Patienten dieser Gruppe, die sich in anhaltender Remission befinden, sind im unteren Abschnitt der Abbildung separat dargestellt.

5.3 Patientengruppe B: Gering MRD positiv bzw. negativ vor SZT

Der MRD Nachweis vor SZT kleiner gleich 10^{-3} wurde definiert als gering positives Ergebnis. Dies trifft für 5 Patienten zu. Sie wurden mit den 10 Patienten, die MRD negativ waren vor SZT in einer Gruppe zusammengefasst. Seit durchschnittlich sieben Jahren befinden sich 80 % dieser Kinder (12 von 15) in Remission.

Drei Patienten verstarben. Patient 6 erlitt eine Lungenembolie. Zwei Patienten der Gruppe jeweils negativ oder gering MRD positiv vor SZT (Pat.15 und 26) bekamen ein Rezidiv innerhalb eines halben Jahres nach SZT (Abbildung 13). Patient 15 hatte eine Translokation t(4;11) und somit bekannter Weise ein erhöhtes Rezidivrisiko (Heerema et al, 1999; Taki et al, 1996; Kersey et al, 1998).

Abbildung 13 MRD-Profil der Patienten niedrig MRD positiv oder negativ vor SZT.



⊖ negativ
➤ in Remission

❖ gering MRD positiv ($< 10^{-3}$) † verstorben

↑ Rezidiv

Für fünfzehn Patienten niedrig MRD positiv oder negativ vor SZT wurden die einzelnen Punktionsergebnisse über einen Zeitraum von eineinhalb Jahren aufgetragen. Zwei Patienten dieser Gruppe bekamen ein Rezidiv und sind im unteren Abschnitt der Abbildung separat dargestellt.

5.4 Patienten mit t(9;22) Ph⁺ ALL

Sechs Patienten wurden aufgrund einer t(9;22) Ph⁺ ALL in erster Remission transplantiert. Das Vorhandensein dieser Translokation ist assoziiert mit einem erhöhten Risiko eines Rezidives (Eden et al, 2000; Gaynon et al, 2000). Diese Patienten haben die schlechteste Prognose aller an ALL erkrankten Kinder.

Vier Patienten waren hoch MRD positiv vor SZT. Von ihnen bekamen drei ein Rezidiv. Sie erhielten ein Transplantat eines MSD. Nur Patient 11 aus der Gruppe A erhielt eine Transplantat eines MUD und verblieb in anhaltender Remission.

Ebenso befinden sich auch die zwei Patienten mit t(9;22) Ph⁺ ALL der Gruppe B in anhaltender Remission. Dabei handelt es sich um einen Säugling, der ein autologes Transplantat erhielt und um Patient 24 mit einer passenden Fremdspende.

Die Daten dieser Patienten und deren wichtige klinische Risikofaktoren sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9 Patienten mit einer t(9;22) Ph⁺ ALL

Pat	Cytog.	Status	A/Diagn.	WBC	PVA	A/SZT	MRD	Spender	GVHD	Outcome
4	t(9;22)	1.Rem.	9,6	11700	5	9,11	Pos.	MSD	Ø	Rezidiv
11	t(9;22)	1.Rem.	4,4	81600	5	4,1	Pos.	MUD	Ø	Remission
13	t(9;22)	1.Rem.	0,6	29000	5	12,1	Neg.	autolog	Ø	Remission
14	t(9;22)	1.Rem.	3,10	86000	4	4,3	Pos.	MSD	Akute GVHD	Rezidiv
17	t(9;22)	1.Rem.	6,5	33000	6	6,11	Pos.	MSD	Ø	Rezidiv
24	t(9;22)	1.Rem.	12,5	40000	5	13,2	Neg.	MUD	Ø	Remission

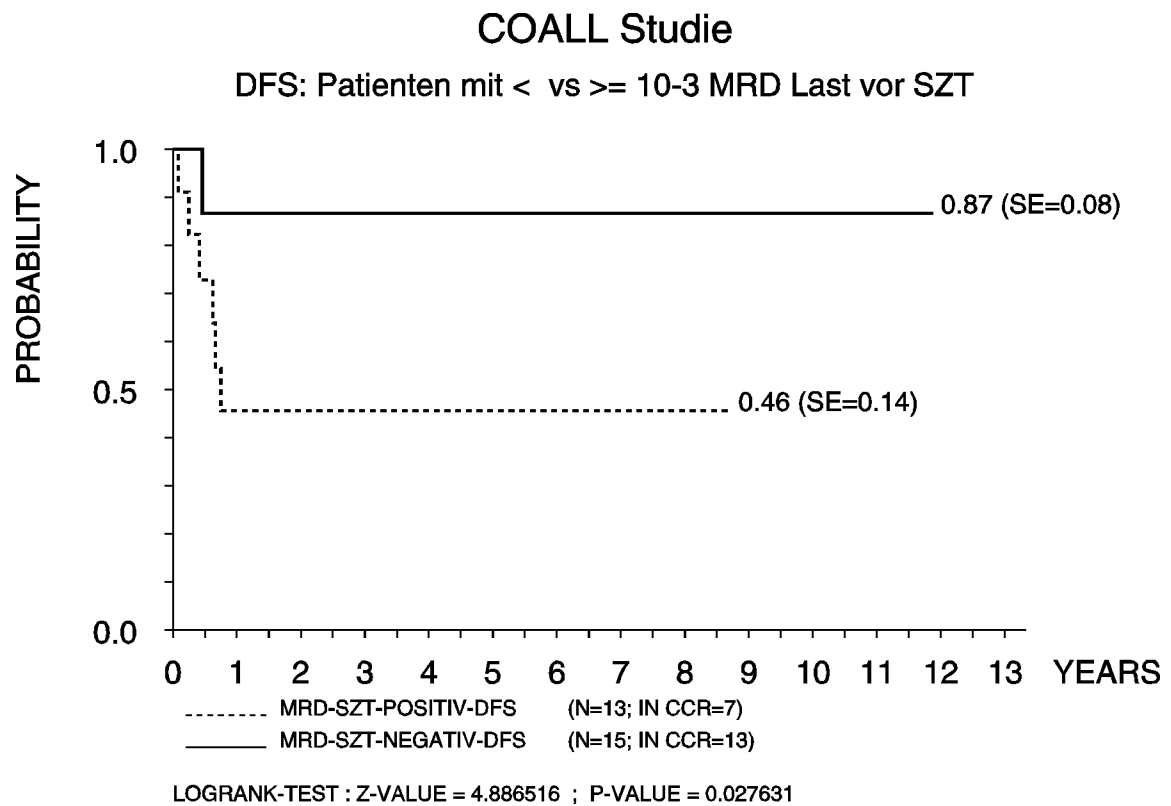
A/Diagn: Alter bei Diagnose in Jahren
 Status: in 1. Remission transplantiert
 WBC: Leukozytenzahl pro µl bei Diagnose
 PVA: PVA-Score
 A/SZT: Alter bei SZT in Jahren

MRD: MRD positiv o. negativ vor SZT
 MUD: passende Fremdspende
 GvHD: graft versus host disease
 Outcome: in Remission befindlich oder
 am Rezidiv verstorben

5.5 Kaplan-Meier Lifetable

In dem folgenden Kaplan-Meier Lifetable (Abbildung 14) ist die Schätzung des Rezidivfreien Überlebens (DFS disease free survival) der Patienten der Gruppe A (n=13) im Vergleich zu dem der Gruppe B (n=15) dargestellt. Die 2-Jahres-DFS für Patienten hoch MRD positiv vor SZT ($> 10^{-3}$) war mit 46% signifikant ($P=0,02$) niedriger verglichen mit 87% für die Patienten negativ oder gering MRD positiv vor SZT ($< 10^{-3}$). Weitere Analysen waren nicht möglich, da dann die Untergruppen zu kleine Fallzahlen beinhalten.

Abbildung 14 Kaplan-Meier Lifetable



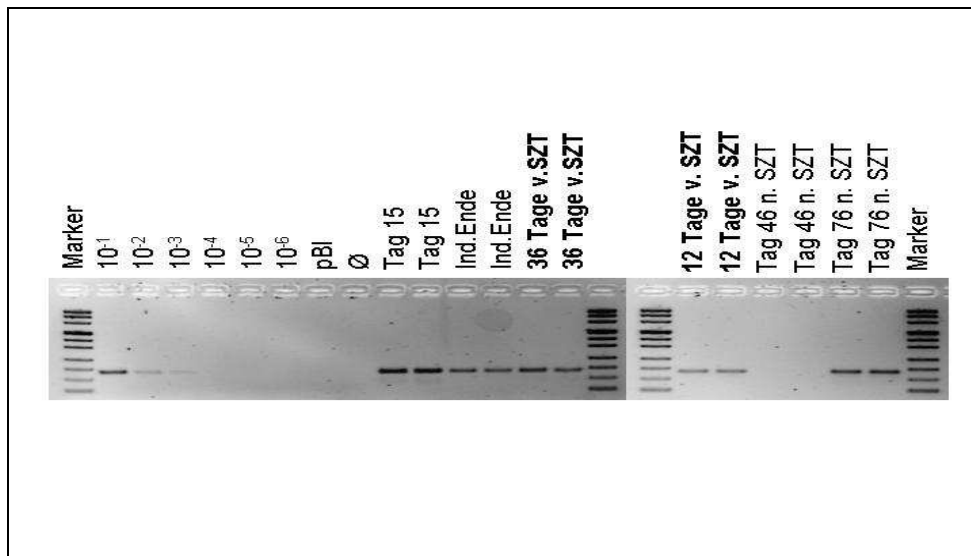
Kaplan-Meier Analyse der Patienten hoch positiv (n=13) und niedrig MRD positiv bzw. MRD negativ vor SZT (n=15). Die Abbildung vergleicht die DFS der beiden Gruppen. Die 2-Jahres-DSF ist jeweils am Ende jeder Kurve angegeben.

5.6 Zeitlicher Abstand zwischen Punktion und Transplantation

Die Abbildung 15 zeigt die Resultate von Patient 7. Als Patient der High-Risk Therapiegruppe und Late Responder mit mehr als 10% Blasten im Knochenmark am Tag 29 wurde eine Knochenmarktransplantation angestrebt und die Therapie fortgeführt bis zum Erreichen der Remission. Zur Kontrolle sieht das Protokoll dann die Knochenmarkpunktion nach 2 Wochen (Tag 36 vor SZT) vor. Falls zu diesem Zeitpunkt noch keine Remission eingetreten sein sollte, erfolgt eine erneute Punktion nach 4 Wochen (Tag 12 vor SZT).

Der Patient hat in diesem kurzen Zeitraum mikroskopisch eine Remission erreicht und ist transplantiert worden. Durch MRD Bestimmung konnten am Tag 36 vor SZT eine MRD Last von 10^{-1} und am Tag 12 vor SZT von 10^{-2} nachgewiesen werden. In diesem kurzen Zeitraum ist eine Reduktion der Leukämiezellen um eine Zehnerpotenz erreicht worden.

Abbildung 15 Relevanz des Zeitpunktes der Punktion vor SZT



Die Abbildung zeigt die ASO-PCR mit sechs untersuchten Proben während des Therapieverlaufes von Patient 7. Der Intensitätsunterschied zwischen den Banden von Tag 36 und 12 vor SZT (fett) ist deutlich zu erkennen und beträgt etwa eine Logstufe.

5.7 MRD nach SZT

Von 28 untersuchten Patienten konnte bei 16 Patienten zu keinem Zeitpunkt nach SZT MRD nachgewiesen werden. Fünfzehn dieser Patienten befinden sich alle in andauernder Remission. Patient 6 verstarb etwa ein Jahr nach SZT aufgrund einer Lungenembolie im Rahmen einer schweren Infektion.

Ein Rezidiv der ALL trat bei insgesamt acht Kindern auf, sechs in der Gruppe A und zwei in der Gruppe B. Mit einer Ausnahme konnte bei jedem dieser Fälle MRD mehrere Monate vor dem klinischen Rezidiv nachgewiesen werden. In Tabelle 10 ist der Abstand zwischen erstem MRD Nachweis nach SZT und klinischem Rezidiv detailliert aufgelistet. Die besagte Ausnahme ist Patient 15 mit einer Translokation t(4;11). Hier trat am Tag 166 nach SZT ein Rezidiv auf ohne dass am Punctionstag 38 oder 100 nach SZT MRD nachgewiesen werden konnte. Die Nachweisgrenze lag bei 10^{-5} .

Tabelle 10 Zeitspanne zwischen erstem MRD Nachweis nach SZT und Rezidiv

Patient	Zeitraum zw. erstem MRD Nachweis nach SZT und Rezidiv
4	2 Monate
12	5 Monate
14	4 Monate
17	5 Monate
20	2 Monate
22	7 Monate

Diese Tabelle verdeutlicht, dass MRD als Kontrollparameter im Krankheitsverlauf oftmals mehrere Monate vor Auftreten eines Rezidives gering gradig nachweisbar ist, was therapeutisch von großem Nutzen sein kann.

Drei Patienten (1, 7, 8) hoch MRD positiv vor SZT verstarben frühzeitig nach SZT an Infektionserkrankungen, so dass keine Ergebnisse vorliegen. Patient 7 wurde am Tag 76 nach SZT bereits wieder MRD positiv getestet. Zwei Wochen danach starb er an einer Aspergilleninfektion.

Lediglich ein Patient (23) befindet sich trotz gering positivem MRD Nachweis nach SZT in anhaltender Remission.

6 DISKUSSION

6.1 Prognostische Relevanz von MRD

6.1.1 MRD vor SZT

Die besondere Bedeutung dieser Arbeit liegt darin, dass im Krankheitsverlauf von 28 Kindern mit ALL MRD bestimmt wurde unmittelbar vor und zu fest definierten Zeitpunkten nach SZT. Mit Ausnahme zweier Säuglinge wurden alle einheitlich behandelt. Das betrifft die Erst- und Rezidivtherapie ebenso wie die Konditionierung und die GVHD-Prophylaxe. Alle Patienten erhielten unmanipulierte Transplantate.

Folgende drei Studien konnten zeigen, dass MRD vor SZT (Knechtli et al, 12/1998; Van der Velden et al, 2001; Bader et al 2002) ein unabhängiger prognostischer Faktor für die Vorhersage eines Rezidives ist. Knechtli untersuchte vierundsechzig Kinder vor SZT. Es ergab sich jeweils für die Patientengruppen hoch MRD positiv ($>10^{-3}$), gering MRD positiv ($\leq 10^{-3}$) bzw. negativ vor SZT die folgende Fünf-Jahres-Ereignisfreie Überlebenswahrscheinlichkeit von 0%, 36% und 73%. Bader et al untersuchte 41 Patienten und erhielt für die gleichen Gruppen folgende Ergebnisse: 23%, 48% und 78%.

Des weiteren berichtet van der Velden in seiner Studie von 17 Kindern. Von denen elf Patienten MRD negativ (Nachweisgrenze 10^{-4}) und sechs MRD positiv waren mit einer Fünf-Jahres-Ereignisfreien Überlebenswahrscheinlichkeit von 80% und 33%.

In dieser Studie wurde für die Patienten hoch MRD positiv (Gruppe A) und gering MRD positiv bzw. negativ vor SZT (Gruppe B) eine ereignisfreie Überlebenswahrscheinlichkeit von 46% und 87% ermittelt. Der Unterschied ist statistisch signifikant und belegt ebenfalls das MRD vor SZT ein unabhängiger prognostischer Faktor ist.

6.1.2 Punktionszeitpunkt vor SZT

Auf einen ganz grundlegenden Kritikpunkt der Arbeiten von Knechtli und Van der Velden bezüglich MRD vor SZT soll an dieser Stelle aufmerksam gemacht werden. In diesen Veröffentlichungen variiert der Punktionszeitpunkt vor SZT zwischen 6 und 81 Tagen.

Im Ergebnisteil unter Punkt 5.6 wird an einem konkreten Beispiel auf den zeitlichen Abstand der letzten Knochenmarkpunktion vor SZT eingegangen. Die MRD Werte der Punktionszeitpunkte eines Patienten am Tag 36 und Tag 12 vor SZT unterschieden sich um eine Logstufe unter der laufenden Therapie. Mit der Intention anhand MRD vor SZT eine Stratifizierung der Patienten in Therapiearme vorzunehmen, sollte die letzte Knochenmarkpunktion vor SZT innerhalb von 14 Tagen liegen. Ansonsten besteht die Gefahr, Patienten als hoch positiv vor SZT einzustufen, die real möglicherweise nur gering MRD positiv sind. Weil der letzte Punktionszeitpunkt zu weit von der Transplantation entfernt ist und die weitergeführte Therapie die MRD-Last anhaltend reduziert. Es müssen hier Rahmenbedingungen für zukünftige Studien erstellt werden, um valide Ergebnisse zu erzielen.

6.1.3 MRD nach SZT

Eine weitere Studie von Knechtli untersuchte isoliert MRD nach SZT bei 71 Kindern über einen Zeitraum von 24 Monaten (Knechtli et al, 06/1998). In Bezug zur Überlebenswahrscheinlichkeit wurde jeder Nachweis von MRD nach SZT als ein signifikant schlechtes prognostisches Zeichen identifiziert.

Eine konkrete Aussage bezüglich der prognostischen Relevanz nach SZT ist anhand unserer Ergebnisse nicht möglich, da es sich um zu wenige Patienten handelt. Insgesamt wurde bei neun Patienten MRD nach SZT nachgewiesen. Sieben bekamen ein Rezidiv und verstarben. Ein Patient starb aufgrund einer Aspergilleninfektion, kurz nachdem das Knochenmark von Tag 76 als hoch MRD positiv getestet wurde. Ein Patient erreichte die Remission. Auf diesen Krankheitsverlauf wird an anderer Stelle noch eingegangen.

Tendenziell unterstützen unsere Resultate die Aussage von Knechtli.

Im Gegensatz zu den oben genannten Studien untersuchten wir MRD vor und nach SZT für jeden einzelnen Patienten.

Der unmittelbare Zusammenhang zwischen hohen MRD Werten vor SZT und der Persistenz oder dem erneuten Nachweis von MRD nach SZT konnte ebenso aufgezeigt werden wie der Zusammenhang zwischen Negativität vor und nach SZT. Aus den Untersuchungen in genau dieser Konstellation lassen sich unterschiedliche Erkenntnisse ableiten, die im Folgenden diskutiert werden.

6.2 MRD und GvL-Reaktion

6.2.1 Sukzessive MRD Elimination als Ausdruck der GvL-Reaktion

Zwischen den Überlebenswahrscheinlichkeiten für die Gruppe hoch MRD positiv vor SZT von 0% bei Knechtli versus 18 – 46% bei den anderen und dieser Studie besteht eine deutliche Diskrepanz.

Als Grund benennt Bader in seiner Diskussion die T-Zell-Depletion der Transplantate und damit indirekt die Abschwächung der GvL-Reaktion. Nur in der Studie von Knechtli (12/1998) erfolgte ausnahmslos eine T-Zell-Depletion in vitro als auch in vivo. Im Rahmen der Studien von Bader, van der Velden und unserer Untersuchung erfolgte lediglich die in vivo T-Zell-Depletion.

Es ist hinlänglich bekannt, dass die T-Zell-Depletion von Transplantaten erfolgreich durchgeführt wird, um die Ausprägung und Häufigkeit der GVHD zu reduzieren (Nimer et al, 1994; Rocha et al, 2001; Eapen et al, 2007). Es hat sich jedoch herausgestellt, dass sich dadurch das Risiko für eine Transplantatabstoßung ebenso erhöht wie das Risiko für ein Rezidiv (Marmont et al, 1991; Kernan et al, 1993; Rocha et al, 2001). Die graft versus leukaemia (GvL) Reaktion, die mit der GVHD assoziiert ist, erfährt offensichtlich durch die T-Zell-Depletion eine deutliche Abschwächung (Horowitz et al, 1990; Kolb et al, 1995; Uzunel et al, 2001). Es wird angenommen, dass aufgrund des beschriebenen Zusammenhanges in der Studie von Knechtli (12/1998) in der Gruppe hoch MRD positiv vor SZT alle Patienten verstarben.

Die MRD-Bestimmung im Krankheitsverlauf ermöglicht bei Patienten hoch MRD positiv vor SZT den direkten Nachweis der sukzessiven Elimination der leukämischen Zellen nach SZT als Ausdruck der GvL-Reaktion.

Für Patient 23 der Gruppe A ist diese sukzessiven Elimination leukämischer Zellen nach SZT dokumentiert. Er wurde am Tag 31 und 106 nach SZT noch gering MRD positiv, im weiteren Verlauf negativ getestet und befindet sich seither in anhaltender Remission. Er war bei Diagnose 13 Jahre alt, hatte eine T-ALL mit einem PVA-Score von 8 und war ein Late-Responder. Er erhielt eine passende Verwandtenspende in erster Remission. Auch Knechtli berichtet in seiner Studie von Juni 1998 von acht Patienten hoch MRD positiv vor SZT mit Persistenz von MRD nach SZT und dessen Reduktion unter die Nachweisgrenze im Intervall. Interessanterweise traten bei Patient 23 und bei vier der Patienten von Knechtli keine Anzeichen einer GVHD auf. Bereits in länger zurückliegenden Studien wurde ebenfalls der antileukämische Effekt der Transplantation ohne Symptome einer GVHD beobachtet (Horowitz et al, 1990; Kolb et al, 1995).

6.2.2 Ansatzpunkte für zukünftige Untersuchungen

Die GvL-Reaktion durch den MRD Nachweis direkt zu dokumentieren, erlaubt den Vergleich zwischen aufgereinigten und nicht aufgereinigten Transplantaten und deren Einfluss durch die GvL-Reaktion auf das Überleben speziell der Patienten hoch MRD positiv vor SZT.

Knechtli beobachtete, dass die sukzessive Elimination der leukämischen Zellen durch die GvL-Reaktion tendenziell häufiger bei in erster Remission transplantierten als in zweiter Remission transplantierten Patienten auftrat. Anhand weiterer Studien ließe sich diese Beobachtung möglicherweise bestätigen, was Vorteile für die Therapie bedeuten könnte.

Ähnliche Überlegungen wie oben erörtert, lassen sich auch für die sechs Patienten dieser Arbeit mit einer t(9;22) Ph⁺ ALL anstellen. Vier von diesen Patienten waren hoch MRD positiv vor SZT. Drei bekamen eine Rezidiv. Diese drei erhielten ein HLA-passendes Transplantat eines Geschwisterkindes.

Nur Patient 11 mit einer t(9;22) Ph⁺ ALL aus der Gruppe A erhielt eine passende Fremdspende und verblieb in anhaltender Remission.

Ebenso befinden sich die zwei Patienten mit t(9;22) Ph⁺ ALL der Gruppe B in anhaltender Remission, ein Säugling mit autologem Transplantat und Patient 24 mit einer passenden Fremdspende.

Für MSD Transplantate wurde in einer der umfangreichsten Studien eine 2-Jahres-Ereignisfreie-Überlebenswahrscheinlichkeit von 38% und 41% für Patienten mit t(9;22) Ph⁺ ALL in erster und zweiter Remission ermittelt (Barrett et al, 1992). Die Überlegenheit einer Transplantation gegenüber der Chemotherapie konnte immer wieder nachgewiesen werden und ist allgemein akzeptiert (Ribeiro et al, 1997; Schrappe et al, 1998; Arico et al, 2000; Wheeler et al, 2000). Die Wahrscheinlichkeit einen MSD zu finden ist sehr gering. In den letzten Jahren stellten sich MUD Transplantate als adäquate und sogar als vorteilhaftere Alternative heraus (Sierra et al, 1997; Marks et al, 1998; Talano et al, 2006). Als Grund wird ebenfalls der GvL-Effekt genannt (Esperou et al, 2003). Die statistischen Daten dieser Studien sind aufgrund der kleinen Fallzahlen sicher mit Vorbehalt zu bewerten. Insbesondere da wiederum die Veröffentlichung von Arico et al, 2000 mit einer Fallzahl von 326 Patienten aus 10 verschiedenen Studiengruppen retrospektiv keinen Vorteil für MUD Transplantate nachwies.

Die Frage, welches Transplantat für Patienten mit einer t(9;22) Ph⁺ ALL bessere Überlebenschancen bietet und wie ausgeprägt der Einfluss der GvL-Reaktion ist, wird kontrovers diskutiert. Auch in diesem Zusammenhang können MRD-Analysen zur Klärung dieses Sachverhaltes beitragen.

Das Erreichen statistisch relevanter Fallzahlen in den zu untersuchenden Subgruppen ist sicher eines der größten Probleme bei der geringen Inzidenz. Hierzu bedarf es entweder eines sehr langen Beobachtungszeitraumes oder der intensiveren überregionalen Zusammenarbeit der Transplantationszentren.

Aus diesem Grund ist die ALL SZT-BFM Studie von 2003 als multizentrische Therapiestudie geplant und umgesetzt worden.

6.3 Nachweismethoden und Nachweisgrenzen

MRD in die Definition von Risikogruppen mit einzubeziehen, verlangt die Vereinheitlichung der MRD-Bestimmungsmethoden.

Das Ziel sollte eine direkt quantitative, flächendeckend praktikable Methode sein, die das Risiko für falsch negative Ergebnisse am nachhaltigsten minimiert.

Die drei häufigsten Verfahrensweisen zur MRD-Bestimmung sind die Fluoreszenzimmunophenotypisierung, der Nachweis tumor-spezifischer Translokationen oder der Nachweis der Rearrangements von IGH, TCRG, TCRD und IGK-Kde mittels PCR. Die letztere Methode erlaubt die Untersuchung nahezu aller an ALL erkrankten Kinder. Der Nachweis einer Leukämiezelle auf 10000, unter Umständen auch auf bis zu 100000 normalen Zellen ist möglich. Das entspricht einer Sensitivität des Verfahrens von 10^{-4} bis 10^{-5} . In welcher Form Faktoren wie die Wahl des Punktionszeitpunktes, die gewählte Zyklenzahl und die Annealingtemperatur der PCR die Sensitivität und Spezifität des Ergebnisses beeinflussen, wurde im Ergebnisteil unter Punkt 5.6 und im Methodenteil unter Punkt 4.5 veranschaulicht. An letzterer Stelle unter Punkt 4.6 wurde auch dargelegt, warum es sich bei der Methode dieser Studie, um ein semiquantitatives Verfahren handelt. Alle diese die Nachweisgrenze beeinflussenden Größen machen einen Vergleich der Resultate der vielen verschiedenen Studiengruppen so gut wie unmöglich und können zu fehlerhaften Einteilung der Patienten in die MRD-Risikogruppen führen (van Dongen et al, 1998; zur Stadt et al, 2000).

Beispielsweise in den Studien von Knechtli 12/1998 und Bader 2002, welche ebenfalls auf dem Nachweis klonaler Rearrangements von IGH, TCRG, TCRD basieren, findet sich lediglich die Angabe, dass die Sensitivität der Ergebnisse zwischen 10^{-3} und 10^{-5} variiert. Es lässt sich somit nicht nachvollziehen, welche Nachweisgrenze im einzelnen für jeden Patienten erreicht wurde. Diese Angaben sind jedoch notwendig, da insbesondere für die Aussage Patient MRD negativ vor SZT eine Sensitivität von 10^{-3} nicht ausreichend ist.

Ein Patient (26) unserer Studie MRD negativ getestet vor SZT verstarb an einem Rezidiv. Der Nachweis erfolgte mit einer Sensitivität von 10^{-4} . Trotzdem wurde

zum Ausschluss eines falsch negativen Ergebnisses aufgrund eines methodischen Fehlers eine Kontroll-PCR durchgeführt, wie unter Punkt 4.6 beschrieben. In Fällen wie diesen sollten regelhaft Kontrolluntersuchungen eingesetzt werden.

Es ist dringend notwendig Leitlinien für die MRD-Bestimmungsmethode sowie für Kontrollverfahren zu erstellen und Nachweisgrenzen zu definieren.

Die Europäische Studiengruppe (ESG) für MRD Analysen hat sich dies zur Aufgabe gemacht und in die Praxis umgesetzt (Verhagen et al, 2000; Szczepanski et al, 2002; Van der Velden et al, 2007a,b).

6.4 Klinische Anwendung von MRD

Unter Berücksichtigung und Verbesserung der eben erläuterten Kritikpunkte steht nichts desto trotz mit der MRD Bestimmung vor und nach SZT ein exzellenter Parameter zur Beurteilung der Wirksamkeit der Therapie zur Verfügung.

Die prognostische Relevanz von MRD unabhängig von Risikofaktoren wie Alter, Leukozytenzahl bei Diagnose, Immunophenotyp oder Geschlecht, ist für die Ersttherapie belegt (van Dongen et al, 1998; Cave et al, 1998; Coustan-Smith et al, 1998). Ebenso wurde auch für Zweittherapie nachgewiesen, dass MRD vor und nach SZT ein unabhängiger prognostischer Faktor ist, unbeeinflusst von klinischen Risikofaktoren wie der Dauer der ersten Remission, Transplantattyp, Transplantatbehandlung oder Geschlecht (Bader, et al 2002; Knechtli, et al 1998). Daher ermöglicht MRD vor SZT eine Stratifizierung der Patienten in die Therapiegruppen negativ, gering bzw. hoch MRD positiv.

Für die in erster Remission transplantierten Hochrisikopatienten konnte kein signifikanter Unterschied der ereignisfreien Überlebenswahrscheinlichkeit zwischen SZT und Chemotherapie aufgezeigt werden (Wheeler et al, 2000).

Es wäre möglich, diese Patienten MRD negativ/gering positiv getestet im Verlauf einer weiterführenden Chemotherapie zuzuführen. Patienten, die auf die Therapie schlecht ansprechen und hoch MRD positiv bleiben unter intensivierter Therapie und MRD Kontrollen möglichst in Aplasie zu transplantieren. Insbesondere auch

wenn zukünftige Studien, wie unter Punkt 6.2. vorgeschlagen, eine höhere Effektivität der GvL-Reaktion in erster Remission nachweisen könnte.

Im Studienprotokoll COALL 07-03 wurde MRD als unabhängiger prognostischer Faktor zur Stratifizierung der High Risk Patienten, wie oben vorgeschlagen, herangezogen.

Patienten transplantiert in zweiter Remission und hoch MRD positiv vor SZT würden eventuell von alternativen Therapieoptionen profitieren. In diesem Zusammenhang wird über die Fortführung der Reinduktion oder die Intensivierung der Konditionierung nachgedacht. Eine Pilotstudie in England (Moppett et al, 2001) hat den Nutzen einer zusätzlichen Therapie vor SZT zur Minimierung der MRD-Last untersucht. Das aktuelle Protokoll der MRC UKALL Studiengruppe enthält einen neuen Therapiearm für Patienten hoch MRD positiv vor SZT (Goulden et al, 2003). Vertreter der einzelnen europäischen Therapiezentren treffen sich regelmäßig, um die Ergebnisse ihrer Langzeitstudien zu besprechen und eine Vereinheitlichung der Therapieprotokolle zu erreichen (Schrappe et al, 2000).

Darüber hinaus könnten noch eine Reihe weiterer Entscheidungen in Abhängigkeit der MRD-Risikogruppen vor SZT getroffen werden.

Erstens wäre eine Anpassung der Frequenz der Knochenmarkpunktionen nach SZT sinnvoll. Beispielsweise trat das klinische Rezidiv von Patient 15 zwischen den geplanten Punktionszeitpunkten Tag100 und Tag 360 nach SZT auf. Hier zeigt sich die Notwendigkeit zusätzliche Punktionszeitpunkte nach SZT für Patienten gering oder hoch MRD positiv zu planen, so denn auch Therapieoptionen bestehen. Im klinischen Alltag lässt sich diese Forderung nur begrenzt umsetzen, da eine Knochenmarkspunktion sehr schmerzhaft ist und von den Kindern begrenzt toleriert wird. Als Lösungsansatz dieser Problematik sind Untersuchungen zum Vergleich von MRD Bestimmung in Knochenmark und peripherem Blut durchgeführt worden. Eine Übereinstimmung der Ergebnisse fand sich bei Patienten mit T-ALL. Abweichung von bis zu einer Zehnerpotenz ergaben sich bei Patienten mit Pre-B-ALL (Martin et al, 1994; Van Rhee et al, 1995; Brisco et al, 1997; van der Velden et al, 2002; Coustan-Smith et al, 2002).

Zweitens ist die Rolle der SZT für Patienten, die länger als sechs Monate nach Ende der Therapie ein Rezidiv erleiden (S2), ungeklärt. In der MRC UKALL R1

Studie erreichten 40% der Patienten eine anhaltende Remission ohne SZT. Möglicherweise ist MRD vor SZT geeignet, zu differenzieren, ob diese Patienten eine SZT oder eine Chemotherapie erhalten sollten.

Und drittens ermöglicht die Stratifizierung anhand von MRD vor SZT eine genauere Abwägung von Risiko und Nutzen der geplanten therapeutischen Maßnahmen.

Sollte es möglich sein, durch die MRD Bestimmung zu klären welche Einfluss die T-Zell-Depletion und die Transplantatwahl auf das langjährige Überleben der Patienten hat, wie unter Punkt 6.2. erläutert, könnte dadurch eine Verbesserung und Optimierung der Therapie der ALL erreicht werden.

Da MRD nicht nur vor sondern auch nachgewiesenermaßen zu jedem Zeitpunkt nach SZT prognostische Wertigkeit besitzt (Knechli ,et al 1998), bieten sich weitere Ansätze für neue Therapiestrategien.

Eine Therapiealternative wäre beispielsweise die Gabe von Spender Lymphozyten Infusionen (DLI) zur Induktion einer graft versus leukaemia (GvL) Reaktion. Bei Auftreten eines definierten Grades einer GVHD als Nebenwirkung und limitierender Faktor, müsste diese Maßnahme dann abgebrochen werden.

Bei unseren Untersuchungen wurde MRD größer 10^{-4} nach SZT für sechs Patienten der Gruppe A nach anfänglich negativen Punktionsergebnissen bereits 2 bis 7 Monate vor dem Auftreten des klinischen Rezidives nachgewiesen. Engmaschige MRD Bestimmungen nach SZT bieten möglicherweise therapeutisch einen erheblichen zeitlichen Vorsprung.

Ein Problem stellt die Persistenz von MRD nach SZT dar. Knechtli schlussfolgerte, man müsse sich mit interventionellen Therapieoptionen auf Patienten konzentrieren, die in zweiter oder dritter Remission transplantiert wurden. Er hatte die sukzessive Elimination von MRD nach SZT überwiegend bei Patienten, transplantiert in erster Remission, beobachtet. So ließe sich das Risiko minimieren, Patienten erneut einer belastenden Therapie auszusetzen, die durch die GvL-Reaktion geheilt würden.

6.5 Fazit

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, die auch von anderen Studiengruppen nachgewiesene prognostische Relevanz von MRD vor SZT. Durch MRD Bestimmung unmittelbar vor und zu fest definierten Zeitpunkten nach SZT, konnte der unmittelbare Zusammenhang zwischen hohen MRD Werten vor SZT und der Persistenz oder dem erneuten Nachweis von MRD nach SZT aufgezeigt werden.

Unterschiedliche Subgruppen von Patienten sind identifiziert worden, für die zukünftig MRD Untersuchungen in dieser Form erfolgen sollten. Konkrete Fragestellungen wurden in diesem Zusammenhang herausgearbeitet.

Mit der Wahl des Punktionszeitpunktes vor SZT, der unterschiedlichen Bestimmungsmethoden und Nachweisgrenzen sowie der Frequenz der Kontrollpunktionen nach SZT wurde auf grundlegende Kritikpunkte aufmerksam gemacht. Und abschließend erfolgte ein Abriss der verschiedenen klinischen Anwendungsmöglichkeiten von MRD und deren teilweisen aktuellen Umsetzung.

Durch intensive Zusammenarbeit der verschiedenen Therapiezentren und Studiengruppen werden Differenzen zwischen Therapieprotokollen und Bestimmungsmethoden angeglichen und durch zusammenhängenden MRD Untersuchungen vor und nach SZT sicher Verbesserungen der Rezidivtherapie der akuten lymphatischen Leukämie erreicht.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Der hervorzuhebende Aspekt der hier vorgestellten Arbeit ist die Bestimmung von Minimal Residual Disease (MRD), direkt vor und zu fest definierten Zeitpunkten nach Stammzelltransplantation (SZT) bei akuter Lymphatischer Leukämie (ALL) im Kindesalter mit dem Ziel den prognostischen Werte von MRD vor und nach SZT zu belegen und neue Erkenntnisse durch die gleichzeitige Bestimmung von MRD vor und nach SZT zu gewinnen.

Es wurden 28 Patienten untersucht, die nach einheitlicher Behandlung in erster und zweiter Remission ein unmanipuliertes Transplantat erhielten.

Die ereignisfreie Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten hoch MRD positiv vor SZT lag mit 46% signifikant niedriger als die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten gering MRD positiv oder negativ vor SZT mit 87%. Diese Ergebnisse belegen, wie bereits entsprechende Studien von Knechtli et al, 12/1998; Van der Velden et al, 2001 und Bader et al, 2002, dass MRD vor SZT ein unabhängiger prognostischer Faktor ist. Die Knochenmarkpunktion vor SZT unserer Patienten erfolgte 14 Tage vor Transplantation mit einer Abweichung von etwa zehn Tagen. Im Zusammenhang damit wurde darauf hingewiesen, dass bei Knechtli und van der Velden der Punktionszeitpunkt vor SZT zwischen einer und elf Wochen schwankte unter laufender Therapie. Anhand eines Beispiels wurde erläutert, in wie weit dadurch eine Verfälschung von Ergebnisse möglich ist.

Eine statistische Auswertung zum Nachweis der prognostischen Relevanz von MRD nach SZT erfolgte aufgrund der kleinen Fallzahl nicht. Es zeichnete sich jedoch eine eindeutige Tendenz ab, welche die Aussage von Knechtli in der Studie von 06/98 unterstützt, dass jeglicher Nachweis von MRD nach SZT ein äußerst schlechtes prognostisches Zeichen ist.

Da wir jedoch im Gegensatz zu den oben genannten Studien MRD vor und nach SZT für jeden einzelnen Patienten untersuchten, konnte der unmittelbare Zusammenhang zwischen hohen MRD Werten vor SZT und der Persistenz oder dem erneuten Nachweis von MRD nach SZT ebenso aufgezeigt werden wie der Zusammenhang zwischen Negativität vor und nach SZT. Folgende

Beobachtungen wurden gemacht, entsprechende Schlussfolgerungen abgeleitet und der klinische Nutzen dargestellt.

Für Patienten der Gruppe A wurde nach anfänglich negativen Punktionsergebnissen nach SZT bereits 2 bis 7 Monate vor dem Auftreten des klinischen Rezidivs wieder MRD nachgewiesen. Es bietet sich somit therapeutisch ein erheblicher zeitlicher Vorsprung.

Bei einem einzigen Patienten der Gruppe A konnte die sukzessive Elimination leukämischer Zellen nach SZT nachgewiesen werden. Knechtli berichtet ebenfalls von solchen Krankheitsverläufen und benennt als Ursache die GvL-Reaktion. Der direkte Nachweis der sukzessiven Elimination leukämischer Zellen nach SZT als Ausdruck der GvL-Reaktion könnte im Rahmen zukünftiger Studien neue Informationen liefern. Geeignete Patientengruppen, für die eventuell diese Untersuchungen therapeutisch von Nutzen sein könnten, wurden identifiziert und konkrete Fragestellungen formuliert.

Zu dem stellten wir fest, dass es sinnvoll wäre, in Abhängigkeit des MRD Ergebnisses vor SZT die Punktionsfrequenz nach SZT zu variieren.

Und es wurde für Patienten hoch MRD positiv vor SZT, für Hochrisikopatienten, transplantiert in erster Remission sowie für Patienten der Rezidivtherapiegruppe S2 herausgearbeitet, welchen Nutzen MRD als prognostischer Faktor für die Auswahl von Therapieoptionen haben kann.

Darüber hinaus ist auf die Nachweismethoden als Grundlage für die klinische Anwendung von MRD eingegangen worden. Unterschiedliche Verfahrensweisen zur Bestimmung von MRD erreichen unterschiedliche Nachweisgrenzen. Dies beeinflusst entscheidend die Sensitivität der Ergebnisse und damit auch die Risikogruppeneinteilung der Patienten anhand von MRD vor SZT. Ursachen als auch Lösungsansätze wurden besprochen.

Zur Vereinheitlichung der Methoden und Verbesserung der Therapie der akuten lymphatischen Leukämie im Kindesalter ist die intensive Zusammenarbeit der vielen internationalen Forschungsgruppen und Therapiezentren notwendig. Die therapiebegleitende MRD Bestimmung während des gesamten Krankheitsverlaufes eines Patienten wird sich mit Sicherheit als Standard durchsetzen.

8 REFERENZEN

Anasetti C. Advances in unrelated donor hematopoietic cell transplantation: improved matching and use of blood stem cells. *Haematologica*. 2002 Aug;87(8 Suppl):1-3.

Aricò M, Valsecchi MG, Camitta B, Schrappe M, Chessells J, Baruchel A, Gaynon P, Silverman L, Janka-Schaub G, Kamps W, Pui CH, Masera G. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2000 Apr 6;342(14):998-1006.

Bader P, Hancock J, Kreyenberg H, Goulden NJ, Niethammer D, Oakhill A, Steward CG, Handgretinger R, Beck JF, Klingebiel T. 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 Sep;16(9):1668-72.

Barrett AJ, Horowitz MM, Ash RC, Atkinson K, Gale RP, Goldman JM, Henslee-Downey PJ, Herzig RH, Speck B, Zwaan FE, et al. Bone marrow transplantation for Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Blood*. 1992 Jun 1;79(11):3067-70.

Barrett AJ, Horowitz MM, Pollock BH, Zhang MJ, Bortin MM, Buchanan GR, Camitta BM, Ochs J, Graham-Pole J, Rowlings PA, et al. Bone marrow transplants from HLA-identical siblings as compared with chemotherapy for children with acute lymphoblastic leukemia in a second remission. *N Engl J Med*. 1994 Nov 10;331(19):1253-8.

Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB.

Classification of acute leukemias: reply from EGIL to Dr van Dongen. Leukemia. 1996 Aug;10(8):1363-4.

Bensinger W. Peripheral blood stem cell transplantation. Cancer Treat Res.

1995;76:169-93. Review. No abstract available.

Borgmann A, Hartmann R, Schmid H, Klingebiel T, Ebell W, Göbel U, Peters C,

Gadner H, Henze G. Isolated extramedullary relapse in children with acute lymphoblastic leukemia: a comparison between treatment results of chemotherapy and bone marrow transplantation. BFM Relapse Study Group. Bone Marrow Transplant. 1995 Apr;15(4):515-21

Borkhardt A, Cazzaniga G, Viehmann S, Valsecchi MG, Ludwig WD, Burci L,

Mangioni S, Schrappe M, Riehm H, Lampert F, Basso G, Masera G, Harbott J, Biondi A. Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica and the Berlin-Frankfurt-Münster Study Group. Blood. 1997 Jul 15;90(2):571-7

Boulad F, Steinherz P, Reyes B, Heller G, Gillio AP, Small TN, Brochstein JA,

Kernan NA, O'Reilly RJ. Allogeneic bone marrow transplantation versus chemotherapy for the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia in second remission: a single-institution study. J Clin Oncol. 1999 Jan;17(1):197-207.

Brisco MJ, Sykes PJ, Hughes E, Dolman G, Neoh SH, Peng LM, Toogood I,

Morley AA. Monitoring minimal residual disease in peripheral blood in B-lineage acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol. 1997 Nov;99(2):314-9.

Casper J, Camitta B, Truitt R, Baxter-Lowe LA, Bunin N, Lawton C, Murray K, Hunter J, Pietryga D, Garbrecht F, et al. Unrelated bone marrow donor transplants for children with leukemia or myelodysplasia. *Blood*. 1995 May 1;85(9):2354-63.

Cavé H, van der Werff ten Bosch J, Suciú S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, Bakkus M, Thielemans K, Grandchamp B, Vilmer E. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group. *N Engl J Med*. 1998 Aug 27;339(9):591-8.

Chessells JM. Relapsed lymphoblastic leukaemia in children: a continuing challenge. *Br J Haematol*. 1998 Jul;102(2):423-38. Review. No abstract available. PMID: 9695956

Chessells JM The management of high-risk lymphoblastic leukaemia in children. *Br J Haematol*. 2000 Feb;108(2):204-16. Review. No abstract available.

Ciceri F, Labopin M, Aversa F, Rowe JM, Bunjes D, Lewalle P, Nagler A, Di Bartolomeo P, Lacerda JF, Lupo Stanghellini MT, Polge E, Frasson F, Martelli MF, Rocha V. A survey of fully-haploidentical hematopoietic stem cells transplantation in adults with high-risk acute leukemia: a risk factor analysis of outcomes for patients transplanted in remission. *Blood*. 2008 Jul 7.

Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC, Rubnitz JE, Rivera GK, Sandlund JT, Pui CH, Campana D. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 1998 Feb 21;351(9102):550-4.

Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC, Sandlund JT, Rivera GK, Rubnitz JE, Ribeiro RC, Pui CH, Campana D. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000 Oct 15;96(8):2691-6.

Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK, Rubnitz JE, Sandlund JT, Pui CH, Campana D. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*

Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Stow P, Zhou Y, Pui CH, Rivera GK, Pedrosa F, Campana D. A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood*. 2006 Jul 1;108(1):97-102. Epub 2006 Mar 14.

Den Boer ML, Harms DO, Pieters R, Kazemier KM, Gobel U, Körholz D, Graubner U, Haas RJ, Jorch N, Spaar HJ, Kaspers GJ, Kamps WA, Van der Does-Van den Berg A, Van Wering ER, Veerman AJ, Janka-Schaub GE. Patient stratification based on prednisolone-vincristine-asparaginase resistance profiles in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2003 Sep 1;21(17):3262-8.

Dopfer R, Henze G, Bender-Gotze C, Ebell W, Ehninger G, Friedrich W, Gadner H, Klingebiel T, Peters C, Riehm H, et al. Allogeneic bone marrow transplantation for childhood acute lymphoblastic leukemia in second remission after intensive primary and relapse therapy according to the BFM- and CoALL-protocols: results of the German Cooperative Study. *Blood*. 1991 Nov 15;78(10):2780-4.

Drobyski WR, Klein J, Flomenberg N, Pietryga D, Vesole DH, Margolis DA, Keever-Taylor CA. Superior survival associated with transplantation of matched unrelated versus one-antigen-mismatched unrelated or highly human leukocyte antigen-disparate haploidentical family donor marrow grafts for the treatment of hematologic malignancies: establishing a treatment algorithm for recipients of alternative donor grafts. *Blood*. 2002 Feb 1;99(3):806-14.

Duale Reihe (1999) Innere Medizin. Hippokrates Verlag im Georg Thieme Verlag Stuttgart, S 1404-1414

Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, Mann G, Pötschger U, Mühlegger N, Fritsch G, Gadner H; Austrian Berlin-Frankfurt-Münster Study Group. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002 Mar 15;99(6):1952-8.

Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ, Camitta BM, Stevens C, Cairo MS, Davies SM, Doyle JJ, Kurtzberg J, Pulsipher MA, Ortega JJ, Scaradavou A, Horowitz MM, Wagner JE. Comparable long-term survival after unrelated and HLA-matched sibling donor hematopoietic stem cell transplantations for acute leukemia in children younger than 18 months. *J Clin Oncol*. 2006 Jan 1;24(1):145-51.

Einsiedel HG, von Stackelberg A, Hartmann R, Fengler R, Schrappe M, Janka-Schaub G, Mann G, Hähnen K, Göbel U, Klingebiel T, Ludwig WD, Henze G. Long-term outcome in children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: results of trial acute lymphoblastic leukemia-relapse study of the Berlin-Frankfurt-Münster Group 87. *J Clin Oncol*. 2005 Nov 1;23(31):7942-50.

Esp rou H, Boiron JM, Cayuela JM, Blanchet O, Kuentz M, Jouet JP, Milpied N, Cahn JY, Faucher C, Bourhis JH, Michallet M, Tanguy ML, Vernant JP, Gabert J, Bordigoni P, Ifrah N, Baruchel A, Dombret H; French Bone Marrow Transplantation. A potential graft-versus-leukemia effect after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: results from the French Bone Marrow Transplantation Society. Bone Marrow Transplant. 2003 May;31(10):909-18.

Foroni L, Harrison CJ, Hoffbrand AV, Potter MN. Investigation of minimal residual disease in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia by molecular analysis. Br J Haematol. 1999 Apr;105(1):7-24. Review.

Gaynon PS, Trigg ME, Heerema NA, Sensel MG, Sather HN, Hammond GD, Bleyer WA. Children's Cancer Group trials in childhood acute lymphoblastic leukemia: 1983-1995. Leukemia. 2000 Dec;14(12):2223-33.

Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Lerner KG, Thomas ED. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. Transplantation. 1974 Oct;18(4):295-304.

Goulden NJ, Knechtli CJ, Garland RJ, Langlands K, Hancock JP, Potter MN, Steward CG, Oakhill A. Minimal residual disease analysis for the prediction of relapse in children with standard-risk acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol. 1998 Jan;100(1):235-44.

Goulden N, Oakhill A, Steward C. Practical application of minimal residual disease assessment in childhood acute lymphoblastic leukaemia annotation. Br J Haematol. 2001 Feb;112(2):275-81. Review. No abstract available.

Green A, Clarke E, Hunt L, Canterbury A, Lankester A, Hale G, Waldmann H, Goodman S, Cornish JM, Marks DI, Steward CG, Oakhill A, Pamphilon DH. Children with acute lymphoblastic leukemia who receive T-cell-depleted HLA mismatched marrow allografts from unrelated donors have an increased incidence of primary graft failure but a similar overall transplant outcome. Blood. 1999 Oct 1;94(7):2236-46.

Hale G, Waldmann H. Control of graft-versus-host disease and graft rejection by T cell depletion of donor and recipient with Campath-1 antibodies. Results of matched sibling transplants for malignant diseases. Bone Marrow Transplant. 1994 May;13(5):597-611.

Handgretinger R, Lang P. The history and future prospective of haplo-identical stem cell transplantation. Cytotherapy. 2008 Jul 10:1-9.

Harms DO, Janka-Schaub GE. Co-operative study group for childhood acute lymphoblastic leukemia (COALL): long-term follow-up of trials 82, 85, 89 and 92. Leukemia. 2000 Dec;14(12):2234-9.

Heerema NA, Sather HN, Ge J, Arthur DC, Hilden JM, Trigg ME, Reaman GH. Cytogenetic studies of infant acute lymphoblastic leukemia: poor prognosis of infants with t(4;11) - a report of the Children's Cancer Group. Leukemia. 1999 May; 13(5):679-86.

Hematopoietic Cell Transplantation. (1999) Blackwell Science, Inc. Editorial Offices, S.515-529, 537-583

Janka GE, Harms D, Göbel U, Graubner U, Haas RJ, Jürgens H, Spaar HJ, Winkler K für die COALL Studiengruppe: Die COALL-Studien 1985 – 1992. Monatsschrift Kinderheilkunde 143: 495, 1995

Janka-Schaub GE, Harms DO, den Boer ML, Veerman AJ, Pieters R. In vitro drug resistance as independent prognostic factor in the study COALL-O5-92 Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia; two-tiered classification of treatments based on accepted risk criteria and drug sensitivity profiles in study COALL-06-97. *Klin Padiatr.* 1999 Jul-Aug;211(4):233-8. German.

Kernan NA, Bartsch G, Ash RC, Beatty PG, Champlin R, Filipovich A, Gajewski J, Hansen JA, Henslee-Downey J, McCullough J, et al. Analysis of 462 transplantations from unrelated donors facilitated by the National Marrow Donor Program. *N Engl J Med.* 1993 Mar 4;328(9):593-602.

Kersey JH, Wang D, Oberto M. Resistance of t(4;11) (MLL-AF4 fusion gene) leukemias to stress-induced cell death: possible mechanism for extensive extramedullary accumulation of cells and poor prognosis. *Leukemia.* 1998 Oct;12(10):1561-4.

Knechtli CJ, Goulden NJ, Hancock JP, Harris EL, Garland RJ, Jones CG, Grandage VL, Rowbottom AW, Green AF, Clarke E, Lankester AW, Potter MN, Cornish JM, Pamphilon DH, Steward CG, Oakhill A. 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 Dec 1;92(11):4072-9.

Knechtli CJ, Goulden NJ, Hancock JP, Harris EL, Garland RJ, Jones CG, Grandage VL, Rowbottom AW, Green AF, Clarke E, Lankester AW, Potter MN, Cornish JM, Pamphilon DH, Steward CG, Oakhill A. Minimal residual disease status as a predictor of relapse after allogeneic bone marrow transplantation for children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 1998 Aug;102(3):860-71.

Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia. Blood. 1995 Sep 1; 86(5):2041-50.

Löffler G, Petrides PE (1997) Biochemie und Pathobiochemie. Springer, Berlin Heidelberg New York, S1064-1071

Ludwig WD, Harbott J, Bartram CR, Komischke B, Sperling C, Teichmann JV, Seibt-Jung H, Notter M, Odenwald E, Nehmer A, et al. Incidence and prognostic significance of immunophenotypic subgroups in childhood acute lymphoblastic leukemia: experience of the BFM study 86. Recent Results Cancer Res. 1993;131:269-82.

Marks DI, Bird JM, Cornish JM, Goulden NJ, Jones CG, Knechtli CJ, Pamphilon DH, Steward CG, Oakhill A. Unrelated donor bone marrow transplantation for children and adolescents with Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol. 1998 Mar;16(3):931-6.

Marmont AM, Horowitz MM, Gale RP, Sobocinski K, Ash RC, van Bekkum DW, Champlin RE, Dicke KA, Goldman JM, Good RA, et al. T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. Blood. 1991 Oct 15;78(8):2120-30.

Martin H, Atta J, Bruecher J, Elsner S, Schardt C, Stadler M, von Melchner H, Hoelzer D. In patients with BCR-ABL-positive ALL in CR peripheral blood contains less residual disease than bone marrow: implications for autologous BMT. Ann Hematol. 1994 Feb;68(2):85-7.

Nimer SD, Giorgi J, Gajewski JL, Ku N, Schiller GJ, Lee K, Territo M, Ho W, Feig S, Selch M, et al. Selective depletion of CD8+ cells for prevention of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. A randomized controlled trial. *Transplantation*. 1994 Jan;57(1):82-7.

Oakhill A, Pamphilon DH, Potter MN, Steward CG, Goodman S, Green A, Goulden P, Goulden NJ, Hale G, Waldmann H, Cornish JM. Unrelated donor bone marrow transplantation for children with relapsed acute lymphoblastic leukaemia in second complete remission. *Br J Haematol*. 1996 Sep;94(3):574-8.

Petersdorf EW, Gooley TA, Anasetti C, Martin PJ, Smith AG, Mickelson EM, Woolfrey AE, Hansen JA. Optimizing outcome after unrelated marrow transplantation by comprehensive matching of HLA class I and II alleles in the donor and recipient. *Blood*. 1998 Nov 15;92(10):3515-20.

Pongers-Willemse MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, Gonzalez M, Bartram CR, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, San Miguel JF, van Dongen JJ. 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 Jan;13(1):110-8.

Pui CH, Boyett JM, Rivera GK, Hancock ML, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Behm FG, Raimondi SC, Gajjar A, Razzouk B, Campana D, Kun LE, Relling MV, Evans WE. Long-term results of Total Therapy studies 11, 12 and 13A for childhood acute lymphoblastic leukemia at St Jude Children's Research Hospital. *Leukemia*. 2000 Dec;14(12):2286-94

Ribeiro RC, Broniscer A, Rivera GK, Hancock ML, Raimondi SC, Sandlund JT, Crist W, Evans WE, Pui CH. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia in children: durable responses to chemotherapy associated with low initial white blood cell counts. *Leukemia*. 1997 Sep;11(9):1493-6.

Richards S, Burrett J, Hann I, Chessells J, Hill F, Bailey C. Improved survival with early intensification: combined results from the Medical Research Council childhood ALL randomised trials, UKALL X and UKALL XI. Medical Research Council Working Party on Childhood Leukaemia. *Leukemia*. 1998 Jul;12(7):1031-6.

Rocha V, Cornish J, Sievers EL, Filipovich A, Locatelli F, Peters C, Remberger M, Michel G, Arcese W, Dallorso S, Tiedemann K, Busca A, Chan KW, Kato S, Ortega J, Vowels M, Zander A, Souillet G, Oakill A, Woolfrey A, Pay AL, Green A, Garnier F, Ionescu I, Wernet P, Sirchia G, Rubinstein P, Chevret S, Gluckman E. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood*. 2001 May 15;97(10):2962-71.

Schrappé M, Aricò M, Harbott J, Biondi A, Zimmermann M, Conter V, Reiter A, Valsecchi MG, Gadner H, Basso G, Bartram CR, Lampert F, Riehm H, Masera G. Philadelphia chromosome-positive (Ph+) childhood acute lymphoblastic leukemia: good initial steroid response allows early prediction of a favorable treatment outcome. *Blood*. 1998 Oct 15;92(8):2730-41.

Schrappé M, Reiter A, Zimmermann M, Harbott J, Ludwig WD, Henze G, Gadner H, Odenwald E, Riehm H. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Munster. *Leukemia*. 2000 Dec;14(12):2205-22.

Sierra J, Radich J, Hansen JA, Martin PJ, Petersdorf EW, Bjerke J, Bryant E, Nash RA, Sanders JE, Storb R, Sullivan KM, Appelbaum FR, Anasetti C. Related Marrow transplants from unrelated donors for treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1997 Aug 15;90(4):1410-4.

Speer CP, Gahr M (2001) Pädiatrie. Springer, Berlin Heidelberg New York, S 663-665, 710-717, 730-739

Szczepański T, Flohr T, van der Velden VH, Bartram CR, van Dongen JJ. Molecular monitoring of residual disease using antigen receptor genes in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2002 Mar;15(1):37-57. Review.

Taki T, Ida K, Bessho F, Hanada R, Kikuchi A, Yamamoto K, Sako M, Tsuchida M, Seto M, Ueda R, Hayashi Y. Frequency and clinical significance of the MLL gene rearrangements in infant acute leukemia. *Leukemia*. 1996 Aug;10(8):1303-7.

Talano JM, Casper JT, Camitta BM, Keever-Taylor CA, Murray KJ, Eapen M, Pierce KL, Margolis DA. Alternative donor bone marrow transplant for children with Philadelphia chromosome ALL. *Bone Marrow Transplant*. 2006 Jan;37(2):135-41.

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 Sep 15;98(6):1982-4.

van der Velden VH, Joosten SA, Willemse MJ, van Wering ER, Lankester AW, van Dongen JJ, Hoogerbrugge PM. 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 Sep;15(9):1485-7. No abstract available.

van der Velden VH, Jacobs DC, Wijkhuijs AJ, Comans-Bitter WM, Willemse MJ, Hahlen K, Kamps WA, van Wering ER, van Dongen 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 Aug;16(8):1432-6.

van der Velden VH, Panzer-Grümayer ER, Cazzaniga G, Flohr T, Sutton R, Schrauder A, Basso G, Schrappe M, Wijkhuijs JM, Konrad M, Bartram CR, Masera G, Biondi A, van Dongen JJ. Optimization of PCR-based minimal residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting. *Leukemia*. 2007 Apr;21(4):706-13. Epub 2007 Feb 8.

van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grumayer ER, Flohr T, Sutton R, Cave H, Madsen HO, Cayuela JM, Trka J, Eckert C, Foroni L, Zur Stadt U, Beldjord K, Raff T, van der Schoot CE, van Dongen JJ; European Study Group on MRD detection in ALL (ESG-MRD-ALL). Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 2007 Apr;21(4):604-11. Epub 2007 Feb 8.

van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Pongers-Willemse MJ, Corral L, Stolz F, Schrappe M, Masera G, Kamps WA, Gadner H, van Wering ER, Ludwig WD, Basso G, de Bruijn MA, Cazzaniga G, Hettinger K, van der Does-van den Berg A, Hop WC, Riehm H, Bartram CR. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet*. 1998 Nov 28;352(9142):1731-8.

van Rhee F, Marks DI, Lin F, Szydlo RM, Hochhaus A, Treleaven J, Delord C, Cross NC, Goldman JM. Quantification of residual disease in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia: comparison of blood and bone marrow. *Leukemia*. 1995 Feb;9(2):329-35.

Verhagen OJ, Willemse MJ, Breunis WB, Wijkhuijs AJ, Jacobs DC, Joosten SA, van Wering ER, van Dongen JJ, van der Schoot CE. Application of germline IGH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2000 Aug;14(8):1426-35.

Wheeler KA, Richards SM, Bailey CC, Gibson B, Hann IM, Hill FG, Chessells JM. Bone marrow transplantation versus chemotherapy in the treatment of very high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia in first remission: results from Medical Research Council UKALL X and XI. *Blood*. 2000 Oct 1;96(7):2412-8.

9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALL	Acute lymphatische Leukämie
ASO	Allel-spezifisches Oligonukleotid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EFS	Ereignisfreies Überleben
HLA	Histokompatibilitätsantigen
IGH	Schwere Kette des Immunglobulins
IGK-Kde	Leicht Kette κ des Immunglobulins – kappa deleting element
MMUD	Mismatched unrelated donor
MRD	Minimal residual disease
MSD	Matched sibling donor
MUD	Matched unrelated donor
PCR	Polymerasekettenreaktion
PVA-Score	Prednison/Vincristin/Asparaginase-Punktwert
RQ-PCR	Real-time quantitative PCR
SZT	Stammzelltransplantation
TZRD	T-Zell-Rezeptor δ
TZRG	T-Zell-Rezeptor γ

10 GLOSSAR

Akkumulation	Häufung, Ansammlung
Allele	Ausprägungen eines Gens, die auf homologen Chromosomen am gleichen Genort lokalisiert sind
Amplifikation	Vervielfältigung eines DNA Abschnittes – einer Basensequenz
Antigen	Substanz, die von einem Körper als fremd erkannt wird und dadurch eine spezifische Immunantwort auslöst
Antimetabolite	Chemische Verbindungen, die einen lebenswichtigen Stoffwechselprozeß blockieren oder verändern
Chromosomenaberration	Abweichung von der normalen Chromosomenzahl oder strukturelle Abweichungen einzelner Chromosomen
Deletion	Verlust eines DNA Abschnittes infolge einer Mutation
Detektion	Nachweis
Extramedullär	Außerhalb des Knochenmarks
Initial	Am Anfang stehend
Insertion	Spontane oder durch Mutagene bedingte Einfügung einer oder mehrerer Nukleotide
Intramedullär	Im Knochenmark gelegen
Intrathekal	Im Liquorraum
Knochenmarkaplasie	Verminderung aller hämatopoetischen Zellformen im Knochenmark
Liquor	Gehirn-Rückenmark-Flüssigkeit

Locus	Genort, Lage eines Gens in einem Chromosom
Oligonukleotid	Kurze Nukleinsäure aus mehreren Mononukleotiden, die über Phosphatdiesterbindungen verknüpft sind
Philadelphia-Chromosom	Translokation des langen Armes von Chromosom 22 auf das Chromosom 9
Proliferation	Wucherung
Quantitative	Mengenmäßig
Sensitivität	Fähigkeit eines diagnostischen Tests, Personen mit einer fraglichen Erkrankung als krank zu erkennen
Spezifität	Fähigkeit eines diagnostischen Tests, Personen ohne eine fragliche Erkrankung als Nichtkranke zu erkennen
Translokation	Umlagerung eines Bruchstücks eines Chromosoms an ein anderes Chromosom
Zytologie	Lehre vom Bau und der Funktion der Zellen
Morphologie	Lehre von der (Körper-)form und (Körper-)struktur

11 DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Schneppenheim als Leiter der Abteilung Pädiatrische Hämatologie und Onkologie der Klinik für Jugend- & Kindermedizin des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf für die zur Verfügungsstellung der Laboratorien, der Einrichtung sowie des Untersuchungsmaterials und des Equipment.

Besonderer Dank gilt Frau Prof. Janka-Schaub als Leiterin der COALL-Studie und Frau Dr. Gabi Escherich für die statistische Auswertung der Daten.

Herrn Dr. Udo zur Stadt und Herrn Prof. Kabisch danke ich für die praktische als auch theoretische Anleitung. Diese war von unschätzbarem Wert.

Darüber hinaus möchte ich allen an diesem Projekt beteiligten Mitarbeitern der Laboratorien und Kollegen der Klinik für ihre Unterstützung danken, wie unter anderen Steffi Golta, Dagmar Grabowski, Elke Freise und Belinda Weber.

12 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.